



HAL
open science

Mise en évidence, par spectroscopies de Résonance
Paramagnétique Electronique et d'absorption
électronique UV-visible, de la formation de radicaux
Tryptophanyles et Tyrosyles par transfert d'électron
intramoléculaire vers l'hème dans les catalases
monofonctionnelles et peroxydases bifonctionnelles

Julie Colin

► To cite this version:

Julie Colin. Mise en évidence, par spectroscopies de Résonance Paramagnétique Electronique et d'absorption électronique UV-visible, de la formation de radicaux Tryptophanyles et Tyrosyles par transfert d'électron intramoléculaire vers l'hème dans les catalases monofonctionnelles et peroxydases bifonctionnelles. Sciences pharmaceutiques. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT: . tel-00326339

HAL Id: tel-00326339

<https://theses.hal.science/tel-00326339>

Submitted on 1 Sep 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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole Doctorale INTER///BIO

Spécialité : Biophysique-Biochimie

Présentée par

Julie COLIN

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR de L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE, PARIS VI

Sujet de la thèse :

Mise en évidence, par spectroscopies de Résonance Paramagnétique Electronique et d'absorption électronique UV-visible, de la formation de radicaux Tryptophanyles et Tyrosyles par transfert d'électron intramoléculaire vers l'hème dans les catalases monofonctionnelles et peroxydases bifonctionnelles

Soutenue le 21 février 2008

Devant le jury composé de :

Pr. P. KRONECK
Pr. A.-M. ENGLISH
Dr. D. MANDON
Pr. G. TRUGNAN
Dr. A. IVANCICH

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Je tiens à remercier l'institut de Biologie et Biotechnologies de Saclay, ainsi que Pierre Legrain et Alfred William Rutherford, de m'avoir accueillie et permis d'effectuer ma thèse dans de bonnes conditions au sein du service de bioénergétique, biologie structurale et mécanismes, dans le laboratoire hyperfréquences, métalloprotéines et système de spin.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements à Monsieur Peter KRONECK, Professeur à l'Université de Constance, pour avoir accepté la tâche d'être rapporteur de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Ann-Mary ENGLISH, Professeur à l'université Concordia de Montréal (Canada), pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail de thèse en acceptant d'en être rapporteur. Je la remercie pour sa gentillesse et son enthousiasme.

Je suis également très reconnaissante à Monsieur Germain TRUGNAN, Professeur à l'université Pierre et Marie Curie, Paris VI, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie également vivement Monsieur Dominique MANDON, Directeur de recherche à l'Institut de Chimie de Strasbourg, d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci à Anabella IVANCICH de m'avoir encadré tout au long de ce travail de thèse, en particulier pour toutes les discussions que nous avons eues et pour ses conseils judicieux.

Je tiens également à remercier le Prof. Peter LOEWEN (Canada) pour les discussions très enrichissantes que nous avons eues, mais également pour avoir participé activement à mon projet de recherche. Je voudrais également remercier le Prof. Luigi CASELLA et le Dr. Enrico MONZANI (Italie) ainsi que le Prof. Andy T. SMITH (Angleterre) pour leur gentillesse et pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires.

Merci à Alain Desbois et Pierre Dorlet pour leurs relectures attentives du manuscrit en fin de rédaction.

Je remercie également toute l'équipe du SBE pour la gentillesse dont elle a fait preuve à mon égard tout au long de ma thèse. Un merci spécial pour le 2^{ème} étage, à Alain Boussac, Sun Un, Alfred Rutherford, Anja Krieger et Diana Kirilowsky pour leurs conseils avisés, à Karine et Isabelle, qui ont toujours su me faciliter les difficultés administratives, à Sandrine de s'être toujours occupée du matériel.

Je tiens adresser ma vive reconnaissance et un très grand merci à Adjélé, Than Lan, Leandro et Sophie, pour leur soutien sans faille. Ils ont toujours répondu présents dans les moments difficiles. Je tenais également à les remercier pour leur gentillesse et pour leur amitié, ainsi que pour tous les moments partagés autour d'une tasse de thé ou d'un déjeuner à discuter de tout et de rien...

Je tenais également à remercier ceux qui ont partagé ma vie au laboratoire : Fernando, Naoko, Arezki, Alistair, Rahul, Christian, Amandine, Claire, Christine. Merci à Gwénaëlle d'avoir formé avec moi la queue du peloton pendant nos footings. Ils ont tous participé à rendre mon séjour au SB₂SM très agréable.

Je remercie enfin spécialement mes parents, ma sœur Charlotte et mon frère Antoine. Ils se sont toujours intéressés à ce travail. Ils ont toujours été présents dans les moments les plus durs et m'ont toujours soutenue même si pour eux la RPE reste un mystère... Je leur témoigne toute mon affection.

Enfin, je tiens à adresser un TRES TRES TRES grand merci à Renaud, qui m'a toujours soutenue et encouragée. Je le remercie pour sa relecture du manuscrit mais également pour m'avoir supportée, d'avoir été présent durant ses trois ans et demi de thèse. Renaud encore MERCI.

RESUME.

Les catalases, les peroxydases et les catalase-peroxydases (KatGs) à hème régulent la concentration cellulaire du peroxyde d'hydrogène. Dans ces protéines, nous avons caractérisé la formation d'intermédiaires issus de l'oxydation de tyrosines et/ou tryptophanes. La prise en compte de ces radicaux nécessite le réexamen du mécanisme de ces enzymes, centré sur l'oxydo-réduction de l'hème. Pour étudier ces intermédiaires, nous avons utilisé une approche combinant la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique multifréquences (9-285 GHz), l'absorption UV-visible, la mutagenèse dirigée et le marquage isotopique.

L'étude de huit catalases, nous a permis de démontrer que la température de réaction, le pH et l'excès d'oxydant favorisent la formation du radical tyrosyle dans les catalases de foie de bœuf, d'érythrocytes humains, de *B. abortus* et de *M. lysodeikticus*. Nos résultats expliqueraient les différences d'efficacité dans la dismutation du H₂O₂. Le transfert spontané d'électron entre la tyrosine et la porphyrine serait en compétition avec la réaction entre l'intermédiaire [Fe(IV)=O Por^{•+}] et le H₂O₂.

Avec la catalase-peroxydase de *B. pseudomallei*, nous avons identifié la formation d'un radical tyrosyle et de deux intermédiaires tryptophanyles, l'un formé sur le Trp330. Notre étude de sept KatGs a démontré que les radicaux tryptophanyles sont uniques mais que les sites de formation ne sont pas les mêmes, ce qui expliquerait en partie leurs différences de réactivité vis-à-vis de l'ABTS et de l'isoniazide. Nous avons démontré que, dans les KatGs, les radicaux protéiques peuvent jouer le rôle de cofacteurs dans l'oxydation des substrats et que le mécanisme de la réaction de dismutation du H₂O₂ diffère de celui des catalases.

Mots clés: Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique, Peroxydase, Catalase, Radicaux protéiques, Intermédiaires réactionnels, transfert d'électron, stress oxydant.

Tryptophanyl and tyrosyl radicals formed by intramolecular electron transfer to the heme in catalases and bi-functional peroxidases and characterized by an Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and UV-visible electronic absorption spectrophotometry.

ABSTRACT.

Catalases, peroxidases and catalase-peroxidases (KatGs) regulate the cellular concentration of hydrogen peroxide. We investigated the reactive intermediates of these enzymes by combining multifrequency (9-285 GHz) Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy, UV-visible electronic absorption, deuterium labelling and site-directed mutagenesis. We identified tyrosyl and tryptophanyl radicals as alternative reactive intermediates to the $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$. The comparative study of eight catalases allowed us to demonstrate that temperature, pH and oxidant concentration favour the formation of the $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$ species in beef liver, human erythrocytes, *B. abortus* and *M. lysodeikticus* catalases. These findings would explain the different specific activities with H_2O_2 of these enzymes. If considering that the spontaneous electron transfer between tyrosine and the porphyrin would be in competition with the H_2O_2 disproportionation.

KatGs are bifunctional enzymes, which disproportionate the H_2O_2 as efficiently as monofunctional catalases, due to specific structural features. Our EPR study showed that the reaction mechanism of KatGs is more complex than that of peroxidases and catalases. One tyrosyl and two tryptophanyle radicals were detected in *B. pseudomallei* KatG. Substrates tests performed with ABTS and isoniazid (front-line pro-drug used in the treatment of tuberculosis) revealed that these protein-based radicals could play the role of cofactors. Comparison of the protein-based intermediates formed by seven KatGs, showed that the tryptophan radical site is unique but not conserved. The localisation and the nature of the protein-based radicals may influence the reactivity of KatGs towards substrates.

Key words: Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy, peroxidase, catalase, protein-based radicals, reactive intermediate, electron transfer, oxidative stress.

LISTE DES ABREVIATIONS

μL	microlitre
μM=μmol. L⁻¹	micro molaire
μW	microwatt
A ou Ala	Alanine
A[•]	Radical
Å	Angström
AA	Acide Arachidonique
ABTS	Acide 2,2'-Azino-bis(3-éthylebenzthiazoline)-6-sulfonique
AcO	Acétate
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ado[•]	Radical 5'-désoxyadénosyle
AdoMet ou SAM	S-adénosylméthionine
AfKatG	Catalase-peroxydase d' <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
AH	Substrat
Ala ou A	Alanine
APX	Ascorbate peroxydase
Arg ou R	Arginine
Asn ou N	Asparagine
Asp ou D	Aspartate
BAC	Catalase de <i>Brucella abortus</i>
BFC	Catalase de <i>Bactéroïdes fragilis</i>
BLC	Catalase de foie de bœuf
BPC	Catalase de <i>Bordatella pertussis</i>
BpKatG	Catalase-peroxydase de <i>Burkholdéria pseudomallei</i>
BsKatG	Catalase-peroxydase de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
C ou Cys	Cystéine
CatF	Catalase de <i>Pseudomonas syringae</i>
CcO	cytochrome <i>c</i> oxydase
CcP	cytochrome <i>c</i> peroxydase
Chl	Chlorophylle
c_i	Concentration initiale
Co	Cobalt
coll	Collaborateurs
C-term	C-terminal
Cu	Cuivre
Cys ou C	Cystéine
Cyt c	cytochrome <i>c</i>
D ou Asp	Aspartate
E ou Glu	Glutamate
e⁻	électron
EcKatG	Catalase-peroxydase d' <i>Escherichia coli</i>
F ou Phe	Phénylalanine

[Fe(IV)=O Por^{•+}]	Oxoferryle radical porphyrinique cationique
[Fe(IV)=O Trp[•]]	Oxoferryle radical tryptophanyle
[Fe(IV)=O Trp^{•+}]	Oxoferryle radical tryptophanyle sur le résidu proximal
[Fe(IV)=O Tyr[•]]	Oxoferryle radical tyrosyle
Fe	Fer
G ou Gly	Glycine
G	Gauss
g^{eff}	g effectif
GHz	Giga Hertz
g_{iso}	g isotrope
Gln ou Q	Glutamine
Glu ou E	Glutamate
Gly ou G	Glycine
GO	Galactose Oxydase
H ou His	Histidine
H⁺	Proton
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HEC	Catalase d'érythrocyte humain
His ou H	Histidine
HPC	Catalase d' <i>Helicobacter pylori</i>
HPI	Catalase-peroxydase d' <i>Escherichia coli</i>
HPH	Catalase d' <i>Escherichia coli</i> .
HRP	Peroxydase de raifort
I ou Ile	Isoleucine
Ile ou I	Isoleucine
INH	Isoniazide
K ou Lys	Lysine
K	Calvin
KatG	Catalase-peroxydase
kcal.mol⁻¹	Kilocalorie par mole
k_{cat}	Constante catalytique
kDa	Kilo Dalton
kJ. mol⁻¹	Kilo joule par mole
K_m	Constante de Michaelis-Menten
L ou Leu	Leucine
Leu ou L	Leucine
LiP	Peroxydase de lignine
LL	Boucle large (large loop)
Lys ou K	Lysine
M ou Met	Méthionine
M⁻¹. s⁻¹	Mole par litre par seconde
mCPBA	Acide <i>m</i> -chloroperoxybenzoïque

Met ou M	Méthionine
min ou mn	minute
mL	millilitre
MLC	Catalase de <i>Micrococcus lysodeikticus</i>
mM=mmol. L⁻¹	milli molaire
Mn	Manganèse
ms	milliseconde
mT	milli tesla
MtKatG	Catalase-peroxydase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mV	millivolt
MW	Poids moléculaire
N ou Asn	Asparagine
NADP(H)	β -nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate
NDP	Ribonucléotides diphosphates
nm	nanomètre
NTP	Ribonucléotides triphosphates
O₂	Dioxygène
P ou Pro	Proline
P_{1/2}	Puissance de saturation
PAA	Acide Peracétique
PerA	Catalase-peroxydase de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
PFL	Pyruvate Formiate Lyase
PGG₂	Prostaglandine G ₂
PGH₂	Prostaglandine
PGHS	Prostaglandine H synthase.
Ph	Phéophytine
Phe ou F	Phénylalanine
pH_f	pH final
PMC	Catalase de <i>Proteus mirabilis</i>
PMC-PR	Catalase de <i>Proteus mirabilis</i> résistante aux peroxydes
Pro ou P	Proline
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
PVC	Catalase de <i>Penicillium vitale</i>
Q ou Gln	Glutamine
Q	Quinone
R ou Arg	Arginine
RcKatG	Catalase-peroxydase de <i>Rhodobacter capsulatus</i>
RNR	Ribonucléotide Réductase
ROH	Alcool
ROOH	Peroxyde
ROS	Espèces de l'oxygène actives

RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
S ou Ser	Sérine
s	seconde
SAM ou AdoMet	S-adénosylméthionine
Ser ou S	Serine
SMC	Catalase de <i>Serratia marcescens</i>
SyKatG	Catalase-peroxydase de <i>Synechocystis</i> PCC9803
T ou Thr	Thréonine
tBHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
Thr ou T	Thréonine
Trp ou W	Tryptophane
Tyr ou Y	Tyrosine
UV	Ultraviolets
V ou Val	Valine
Val ou V	Valine
W ou Trp	Tryptophane
Y ou Tyr	Tyrosine
ZFS	Levée de dégénérescence en champ nul

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
LES RADICAUX PROTEIQUES IMPLIQUES DANS LA CATALYSE ENZYMATIQUE	7
INTRODUCTION.....	9
I. LES RADICAUX PROTEIQUES EN BIOLOGIE.....	10
<i>I.1-Principe de la catalyse radicalaire.....</i>	<i>10</i>
I.1-1 Le transfert mono-électronique.....	10
I.1-2 Les réactions de transfert d'atome d'hydrogène.....	11
I.1-3 Les réactions de transfert couplé proton-électron.....	11
<i>I.2-Identification et propriétés des radicaux protéiques.....</i>	<i>12</i>
II. LES RADICAUX PROTEIQUES ET LA CATALYSE ENZYMATIQUE.....	15
<i>II.1-Les Ribonucléotides Réductases.....</i>	<i>15</i>
II.1-1 Formation du radical tyrosyle chez les RNRs de classe I.....	19
II.1-2 Formation du radical glycylyle chez les RNRs de classe III.....	20
II.1-3 Rôle du radical thiyle chez les RNRs.....	21
<i>II.2-La Galactose Oxydase.....</i>	<i>22</i>
<i>II.3-La Prostaglandine H Synthase.....</i>	<i>25</i>
<i>II.4-Le Photosystème II.....</i>	<i>27</i>
II.4-1 Chaîne de transfert d'électron au sein du photosystème II.....	28
II.4-2 Rôle proposé pour les radicaux tyrosyles Z et D.....	29
<i>II.5-La cytochrome c oxydase.....</i>	<i>30</i>
<i>II.6-La cytochrome c peroxydase.....</i>	<i>32</i>
CONCLUSIONS	36
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37

APPROCHE EXPERIMENTALE : SPECTROSCOPIE DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE ET SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ELECTRONIQUE UV-VISIBLE

INTRODUCTION.....	47
I. LA SPECTROSCOPIE DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE).....	48
<i>I.1-Les principes fondamentaux de la spectroscopie RPE.....</i>	<i>49</i>
I.1-1 Généralités.....	49
I.1-2 L'effet Zeeman isotrope.....	50
I.1-3 Les interactions hyperfines.....	54
I.1-4 Le facteur g.....	56
I.1-5 La transition RPE.....	59
I.1-6 Levée de dégénérescence en champ nul.....	61
I.1-7 Généralités sur le spectre RPE.....	63
I.1-7 a) Interactions magnétiques.....	63
I.1-7 b) Position de raie et anisotropie.....	63
I.1-7 c) Origine de la forme et de la largeur de raie.....	64
I.1-7 d) Amplitude du signal RPE.....	65
I.1-7 e) Le phénomène de saturation.....	65
I.1-7 f) Le phénomène de relaxation.....	66
<i>I.2-Les différentes techniques de la spectroscopie RPE.....</i>	<i>67</i>
I.2-1 La spectroscopie RPE conventionnelle.....	67
I.2-2 La spectroscopie RPE à champ intense et à haute fréquence.....	73
<i>I.3-Les spectres RPE dans le cas de poudres et de solutions gelées.....</i>	<i>76</i>
I.3-1 Allure générale d'un spectre à symétrie axiale.....	76
I.3-2 Allure générale d'un spectre à symétrie rhombique.....	78
<i>I.4-Spectres des espèces d'intérêt de ce travail.....</i>	<i>81</i>
I.4-1 Spectre du Fe(III) spin fort du site actif des catalases et des KatGs.....	81
I.4-2 Spectre du composé I [Fe(IV)=O Por ^{•+}]: L'interaction d'échange.....	88
I.4-2 a) Généralités.....	88
I.4-2 b) Cas du composé I.....	89
I.4-2 c) Les radicaux protéiques tyrosyle et tryptophanyle.....	92

II. LA SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ELECTRONIQUE UV-VISIBLE	95
II.1- Principes de la spectroscopie d'absorption électronique.....	95
II.1-1 Généralités.....	95
II.1-2 Introduction théorique.....	96
II.1-2 a) Transitions électroniques.....	96
II.1-2 b) Absorption lumineuse et spectre associé.....	97
II.1-2 c) Types particuliers de transitions.....	99
II.2- Spectres d'absorption électroniques des espèces étudiées dans ce travail.....	101
II.2-1 La porphyrine.....	102
II.2-1 a) Généralités sur les porphyrines.....	102
II.2-1 b) Caractéristiques spectrales.....	103
II.2-2 Les espèces protéiques.....	105
II.2-2 a) L'enzyme natif : Fe(III) spin fort.....	105
II.2-2 b) Les composés oxoferryles: [Fe(IV)=O Por ^{•+}] et [Fe(IV)=O], [Fe(IV)=O Tyr [•]], [Fe(IV)=O Trp [•]].....	106
III. APPROCHE GENERALE.....	108
CONCLUSIONS	109
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	110
LES CATALASES : NOUVELLES PERSPECTIVES MECANISTIQUES	115
INTRODUCTION.....	117
A. LES CATALASES A HEME : PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTION.....	117
I. LES CATALASES : STRUCTURES.....	119
I.1-Description de la structure globale.....	119
I.2-Le site actif et les canaux d'accès.....	121
I.3-Le site de fixation du NADP(H).....	123
II. LES CATALASES : ASPECTS FONCTIONNELS.....	125
II.1- Réaction catalytique.....	126
II.2- Structures des intermédiaires catalytiques.....	126
III. PROBLEMATIQUE.....	127
B. ETUDE COMPARATIVE DES CATALASES PAR SPECTROSCOPIE DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE ET PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION UV- VISIBLE.....	129
I. CARACTERISTIQUES DU SPECTRE RPE ET DU SPECTRE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DES CATALASES A L'ETAT FERRIQUE.....	130
II. CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES FORMES AU COURS DU CYCLE CATALYTIQUE DES CATALASES.....	133
II.1- Formation d'un composé [Fe(IV)=O Por ^{•+}] stable : catalases de <i>B. pertussis</i> et de <i>B. fragilis</i>	133
II.1-1 Résultats pour la catalase de <i>B. pertussis</i>	135
II.1-2 Résultats pour la catalase de <i>B. fragilis</i>	136
II.2- Formation d'un intermédiaire alternatif [Fe(IV)=O Tyr [•]].....	139
II.2-1 Influence du pH.....	139
II.2-2 Influence de l'excès d'acide peracétique.....	143
II.2-3 Influence du temps de réaction.....	146
II.2-4 Influence de la concentration.....	149
II.2-5 Puissance de saturation du radical tyrosyle.....	150
II.3- Aucun intermédiaire radicalaire détecté.....	153
II.3-1 Cas de la catalase d' <i>E. coli</i>	153
II.3-2 Cas de la catalase de <i>P. syringae</i>	154
II.3-3 Cas de la catalase de <i>S. marcescens</i>	157
II.4- Discussion.....	159
II.4-1 Analyses de séquence des catalases et proposition de candidats pour le site de formation du radical tyrosyle.....	159
II.4-2 Analyse des structures cristallographiques.....	163
III. CORRELATION ENTRE LA STABILITE DES INTERMEDIAIRES FORMES ET L'ACTIVITE CATALYTIQUE.....	166
IV. VERS UNE ACTIVITE PEROXYDASIQUE DES CATALASES ?.....	170
CONCLUSIONS	181
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183

CATALASE-PEROXYDASES : VERS LA COMPREHENSION DU ROLE DES RADICAUX PROTEIQUES DANS LE CYCLE CATALYTIQUE CHEZ LES ANCETRES DES PEROXYDASES.	189
INTRODUCTION.....	191
A. LES CATALASE-PEROXYDASES.....	191
I. BpKATG: STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE ET PARTICULARITES.....	192
I.1-Structure globale.....	192
I.2-Présence de trois larges boucles et d'un 'short stretch' dans la région catalytique.	195
I.3-Le canal d'accès des substrats.....	197
I.4-L'adduit Trp(111)-Tyr(238)-Met(264) et la conformation de l'Arg426	198
I.5-Modification du Trp111 de BpKatG.	200
II. RELATIONS ENTRE LES DIFFERENTES ACTIVITES DE BpKATG.....	202
III. LES CATALASE-PEROXYDASES: LES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES.	203
IV. OBJECTIFS.....	204
B. CARACTERISATION DES RADICAUX FORMES CHEZ LES KATGS PAR RPE MULTIFREQUENCE ET MUTAGENESE DIRIGEE.	206
I. CARACTERISATION PAR RPE DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES DE BpKATG.....	207
I.1-Etude de la réaction de BpKatG avec l'acide peracétique.....	207
I.2-Le cycle catalytique de BpKatG en absence de substrat.....	216
I.3-Effet de l'acétate de sodium.....	219
I.4-Réaction de BpKatG avec d'autres oxydants.....	220
I.5-Réactivité des intermédiaires radicalaires vis-à-vis des substrats dans la réaction de type peroxydase.....	222
I.5-1 Réaction entre BpKatG et l'ABTS.....	225
I.5-2 Réaction entre BpKatG et l'isoniazide.....	227
II. CARACTERISATION ET COMPARAISON DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES FORMES PAR LES KATGS.....	228
II.1-Dépendance du signal RPE à 9 GHz des KatGs natives avec le pH.....	228
II.2-Intermédiaires radicalaires formés par les KatGs.....	231
II.3-Influence de la température de mélange sur la formation des intermédiaires radicalaires des KatGs.....	234
II.4-Détermination du rôle des intermédiaires radicalaires : tests avec les substrats.....	237
II.4-1 Réaction avec l'ABTS.....	238
II.4-2 Réaction avec l'INH.....	243
CONCLUSIONS	246
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	250
VERS LA COMPREHENSION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DETERMINANT LA STABILISATION DES INTERMEDIAIRES TRYPTOPHANYLES ET TYROSYLES	253
INTRODUCTION	255
A. LA PEROXYDASE DE RAIFORT	255
I. GENERALITES ET STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE	257
II. MECANISME CATALYTIQUE	258
III. CARACTERISATION PAR SPECTROSCOPIES D'ABSORPTION UV-VISIBLE ET DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE.....	262
B. LA PEROXYDASE DE RAIFORT MODIFIEE.....	263
I. RECONSTITUTION DE LA PEROXYDASE DE RAIFORT	266
II. CARACTERISATION DE LA PEROXYDASE DE RAIFORT MODIFIEE	267
CONCLUSIONS	274
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	275
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	277

ANNEXES	283
I. Spécifications et préparations.	285
I.1-Instrumentation.....	285
I.2-Les Enzymes.....	285
I.3-Purification de la catalase de foie de bœuf.....	286
I.4-Mise au point des conditions expérimentales pour les expériences RPE	286
II. Procédures expérimentales de chimie organique	288
II.1-Synthèse de l'isoniazide marqué à l'azote 15.....	288
II.2- Synthèse du composé Protohémine-6-(7)-L-méthyl-ester de la tyrosine.....	289
II.3- Déprotection de la tyrosine	291
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	292

INTRODUCTION GENERALE

Dans les systèmes biologiques, les réactions de transfert d'électron sont spécifiques à plusieurs processus biologiques, tels que le métabolisme énergétique (photosynthèse, respiration ou fixation de l'azote), la biosynthèse hormonale ou la détoxification. La plupart des protéines impliquées dans ces processus possèdent un ion métallique dans leur site actif (les plus fréquents étant le Fe, le Mn, le Mo et le Cu) qui intervient en tant que centre redox. Certains systèmes disposent de cofacteurs organiques, comme les flavines ou les quinones, susceptibles de former des radicaux relativement stables. Les quinones participent aux transferts d'électron dans les mitochondries ou au cours de la photosynthèse, tandis que les flavines sont des intermédiaires dans des réactions de transfert d'électron chez les enzymes contenant des hèmes, des centres fer-soufre ou du molybdène. Parfois, à l'instar des centres photosynthétiques, des radicaux protéiques et pas uniquement les centres métalliques sont impliqués dans la catalyse. Ainsi, les molécules de chlorophylle, les cytochromes, les centres fer-soufre, les sites à manganèse, les semiquinones et les radicaux tyrosyles sont associés les uns aux autres de façon à assurer, par leurs propriétés redox respectives, un transfert d'électron efficace au niveau de la membrane photosynthétique.

Il devient de plus en plus évident que les radicaux issus de l'oxydation d'acides aminés ont un rôle important dans la catalyse enzymatique¹ même si peu d'entre eux n'aient encore été parfaitement caractérisés et clairement associés à une fonction biologique. Dans le **premier chapitre** de ce manuscrit est exposé l'état des connaissances sur des métalloprotéines pour lesquelles le rôle des radicaux protéiques dans la catalyse enzymatique a été identifié, comme la ribonucléotide réductase, la galactose oxydase, les prostaglandines H synthases et le Photosystème II.

Les catalases et les peroxydases, et également les superoxyde-dismutases, jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de régulation du stress oxydant cellulaire. Chez les êtres vivants, ces enzymes ont des fonctions complémentaires : ils sont impliqués dans l'élimination d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS), telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les peroxydes organiques, les radicaux superoxyde (O_2^{\bullet}) et hydroxyle ($^{\bullet}OH$), qui sont naturellement produits *in vivo* par la cellule mais qui ont à fortes doses, des effets néfastes, tels que le cancer et l'accélération du vieillissement cellulaire. Les ROS intracellulaires sont majoritairement produites dans la mitochondrie, mais on les retrouve également dans le cytosol. Les espèces O_2^{\bullet} et H_2O_2 sont aussi produites dans les chloroplastes de plantes et des cyanobactéries. La protection contre ces espèces oxygénées est alors assurée par les superoxyde-dismutases, l'ascorbate peroxydase et la catalase-peroxydase (à hème). Le peroxyde d'hydrogène joue un rôle ambivalent : pour de faibles concentrations,

il est impliqué dans la signalisation cellulaire, alors que pour des valeurs plus élevées il devient toxique pour la cellule. Les relations entre la présence des catalases et des catalase-peroxydases, leurs activités enzymatiques et le rôle ambigu bivalent du peroxyde d'hydrogène ne sont pas bien connues.

Les catalases et les peroxydases mono- et bi-fonctionnelles sont des hémoprotéines. Bien que le site catalytique de ces enzymes soit localisé au niveau de l'hème, des radicaux issus de l'oxydation d'acides aminés sont formés chez certaines de ces hémoprotéines. L'identification de radicaux protéiques en tant qu'intermédiaires du cycle catalytique des catalases et des peroxydases offre une nouvelle perspective d'étude de leurs mécanismes et nécessite un réexamen de la relation structure-fonction de ces enzymes. L'étude détaillée, et notamment, la détermination précise de la structure électronique des intermédiaires redox du cycle enzymatique, s'avère nécessaire pour mieux comprendre le rôle physiologique de ces enzymes, leurs différences fonctionnelles et leurs spécificités vis-à-vis des substrats et des inhibiteurs. Pour obtenir des informations sur les structures électroniques et la réactivité des intermédiaires réactionnels, nous avons choisi d'utiliser les spectroscopies de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) multifréquences (9-285 GHz) et d'absorption électronique UV-visible par stopped-flow, associées à des expériences de mutagenèse dirigée et de marquage isotopique. Les principes théoriques de la RPE et de l'absorption électronique, aussi bien que la description de l'approche expérimentale utilisée dans ce travail sont décrits dans **le second chapitre**.

Ce travail de thèse est structuré autour de deux axes principaux et complémentaires :

i) les catalases, enzymes avec un cycle catalytique relativement simple et bien connu.

Un des résultats importants de notre étude est la mise en évidence d'un caractère commun avec d'autres hémoprotéines qui utilisent un mécanisme radicalaire.

ii) les catalase-peroxydases (KatGs), peroxydases avec une double activité enzymatique, considérées comme les ancêtres des peroxydases monofonctionnelles. Pour ces enzymes, et à la différence des catalases, le cycle catalytique n'est pas définitivement établi et les travaux de notre groupe à Saclay, en collaboration avec l'équipe autrichienne du Prof. Christian Obinger (BOKU, Vienne) et l'équipe canadienne du Prof. Peter Loewen (University of Manitoba, Canada) ont été à l'origine de propositions concernant les intermédiaires réactionnels. Malgré la complexité de fonctionnement des KatGs, nous sommes en train de définir les intermédiaires du cycle catalytique et d'identifier les paramètres structuraux et environnementaux qui confèrent aux KatGs une multifonctionnalité dépendante du pH,

unique à ces enzymes. Cette étude présente aussi des enjeux pharmacologiques avec notamment l'étude de la KatG de *M. tuberculosis*.

Après la mise en évidence de la formation d'un intermédiaire inattendu de type [Fe(IV)=O Tyr[•]] comme état consécutif à la formation de l'intermédiaire [Fe(IV)=O Por^{•+}] dans la catalase de foie de bœuf², il est devenu important de déterminer si ce radical tyrosyle ne constituait qu'une particularité de fonctionnement de la catalase de foie de bœuf ou s'il pouvait être présent dans d'autres catalases à hème. D'autre part, la prise en compte d'un chemin alternatif de transfert d'électron intramoléculaire entre l'une des tyrosines et la porphyrine pourrait expliquer les importantes différences de réactivité de l'intermédiaire [Fe(IV)=O Por^{•+}] vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. La grande homologie structurale, tout particulièrement au niveau de l'environnement de l'hème, sont en désaccord avec ces variations de l'activité spécifique, qui peuvent atteindre jusqu'à un ordre de grandeur. Le **troisième chapitre** est consacré à une étude comparative sur des catalases de mammifères (foie de bœuf et érythrocytes humains), de bactéries (*E. coli*, *B. abortus*, *B. pertussis*, *B. fragilis*, *S. marcescens* et *P. syringae*). Notre approche consiste à tester différentes conditions telles que le pH du milieu, la température de réaction, le temps de réaction, l'excès de substrat, afin de déterminer les facteurs favorisant la formation des radicaux protéiques au sein de cette famille d'enzymes et puis de tester si ces protéines utilisent ces radicaux protéiques pour une activité de type peroxydase.

La caractérisation des catalase-peroxydases, en particulier celle de *B. pseudomallei*, donne lieu à une étude plus approfondie du rôle des intermédiaires radicalaires protéiques au cours du cycle enzymatique. L'étude comparative des intermédiaires radicalaires formés par les KatGs de *B. pseudomallei*, *M. tuberculosis*, *B. stearothermophilus*, *A. fulgidus*, *R. capsulatus* et *E. coli*, nous a permis de mieux comprendre la complexité et la diversité de ces enzymes. La caractérisation des réactions de ces dernières avec des substrats dont le potentiel d'oxydo-réduction et/ou l'encombrement stérique sont différents, a été réalisée pour mieux comprendre la spécificité des intermédiaires radicalaires vis-à-vis de ces substrats et pour déterminer les sites de fixation de ces derniers. Le **quatrième chapitre** décrit ces études.

L'objectif du **cinquième chapitre** est de comprendre les propriétés physico-chimiques permettant et favorisant la formation de radicaux protéiques en tant qu'intermédiaires alternatifs à l'intermédiaire typique des hémoprotéines, le composé [Fe(IV)=O Por^{•+}]. Parmi les différentes stratégies possibles, telles que l'utilisation de systèmes modèles comme la

microperoxydase ou l'ingénierie des sites de formation des radicaux protéiques, nous avons choisi d'étudier une peroxydase de raifort reconstituée dans laquelle l'hème, avant d'être remplacé dans la protéine, a été modifié par liaison covalente avec un résidu tyrosine ou tryptophane.

1. J. Stubbe, and W. A. Van der Donk, Protein Radicals in Enzyme Catalysis, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 705-762.
2. A. Ivancich, H.-M. Jouve, and J. Gaillard, EPR Evidence for a Tyrosyl Radical Intermediate in Bovine Liver Catalase., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 12852-12853.

**LES RADICAUX PROTEIQUES IMPLIQUES
DANS LA CATALYSE ENZYMATIQUE**

INTRODUCTION

Les radicaux sont des espèces chimiques qui possèdent au moins un électron non apparié sur leurs couches de valence, soit parce que le nombre d'électrons est impair soit parce qu'une dégénérescence orbitale conduit à la stabilisation d'électrons non appariés dans l'état fondamental (comme dans le cas du dioxygène). Un électron est dit célibataire lorsqu'il occupe une orbitale atomique ou moléculaire à lui seul. La plupart du temps, la présence d'un électron célibataire confère aux molécules une grande instabilité ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques. La durée de vie en solution des radicaux est donc souvent très courte. Les radicaux sont généralement obtenus par rupture homolytique de liaisons chimiques. Mais les liaisons chimiques ayant des énergies de l'ordre de centaines de kcal. mol⁻¹ les conditions mises en jeu pour former les radicaux sont souvent drastiques : hautes températures, radiations ionisantes, ultraviolets.

La science des radicaux dans les organismes vivants s'est développée depuis qu'en 1969 McCord et Fridovich ont découvert la superoxyde dismutase^{1,2}. Ils ont démontré que les radicaux jouaient un rôle important en biologie. Aujourd'hui, de nombreuses preuves montrent que les organismes vivants ont non seulement su s'adapter, mais qu'ils ont également développé des mécanismes pour les utiliser à leurs avantages.

Le nombre d'études sur l'implication des radicaux protéiques, persistants ou transitoires, dans la catalyse enzymatique a énormément augmenté ces dernières années. Cet intérêt a conduit à la production de nombreuses revues dans le domaine. Dans ce chapitre, nous exposerons uniquement les principes généraux qui régissent la formation des radicaux protéiques et le rôle de ces radicaux dans la catalyse enzymatique. Ainsi, nous nous limiterons aux systèmes enzymatiques qui utilisent des radicaux issus de l'oxydation d'un résidu aminé ou d'un acide aminé modifié.

I. LES RADICAUX PROTEIQUES EN BIOLOGIE.

Parmi les grands types de réactions présents en chimie et en biologie, deux processus ont retenus notre attention : les réactions acide-base et les réactions d'oxydo-réduction. Les réactions acido-basiques impliquent la formation ou la rupture hétérolytique de liaisons chimiques. Les substrats qui peuvent réagir selon un mécanisme acide-base sont des molécules polaires. Parmi les enzymes utilisant ce type de réaction, nous pouvons citer les peptidases, les phosphorylases (réactions d'hydrolyse) et les kinases (réactions de transfert de phosphate).

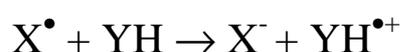
Les réactions d'oxydo-réduction agissent par transfert d'électron. Les réactions d'oxydo-réduction peuvent avoir comme bilan le transfert d'un atome d'oxygène (réaction des oxygénases) ou d'un atome d'hydrogène (réaction type déshydrogénase). Les réactions impliquant la formation de radicaux font parties des réactions d'oxydo-réduction, dans le sens où elles impliquent un transfert d'électron entre une molécule possédant un nombre impair d'électrons et la rupture ou la formation homolytique d'une liaison chimique.

I.1-PRINCIPE DE LA CATALYSE RADICALAIRE

Les radicaux sont intrinsèquement différents de la majorité des espèces chimiques, dans lesquelles les électrons sont appariés. Ces différences s'expriment essentiellement du point de vue de leur réactivité chimique. La chimie radicalaire est dominée par des réactions à un électron, incluant des transferts mono-électroniques, les transferts d'atome d'hydrogène et les transferts couplés proton-électron.

I.1-1 Le transfert mono-électronique

Les réactions de transfert mono-électronique impliquent l'oxydation à un électron d'un partenaire redox et la réduction du radical. Le principe de la conservation des charges électriques implique qu'au cours de la réduction de l'espèce radicalaire des charges nettes complémentaires sont formées pour chaque espèce impliquée:



Equation 1-1

La réaction de transfert mono-électronique influe sur les propriétés acide-base des espèces formées. En effet, l'espèce X^- est plus basique que X^\bullet et $YH^{\bullet+}$ est plus acide qu' YH . La constante de vitesse des réactions de transfert mono-électronique dépend donc du pH de la solution. Des facteurs géométriques comme le recouvrement orbitalaire^{3,4} peuvent également la modifier.

Le changement dans la répartition des électrons sur les orbitales moléculaires a des conséquences importantes au niveau de la réactivité chimique. Supprimer des électrons d'une orbitale liante (ou à l'inverse ajouter des électrons dans une orbitale non liante) va entraîner une déstabilisation moléculaire qui peut être à l'origine de l'activation catalytique.

I.1-2 Les réactions de transfert d'atome d'hydrogène.

Le processus le plus classique, dans les ruptures de liaisons, associé aux réactions radicalaires est le transfert d'un atome d'hydrogène dans lequel le proton et l'électron constituant l'atome d'hydrogène sont simultanément arrachés du substrat^{5,6,7,8,9}. L'arrachement d'un atome d'hydrogène implique la rupture d'une liaison simple. Le transfert concerté du proton et de son électron permet d'éviter une séparation de charges, défavorable pour la réaction. L'équation bilan d'une réaction de transfert d'un atome d'hydrogène est donnée par l'équation 2 :



La force motrice des réactions de transfert d'hydrogène est basée sur la stabilité relative des radicaux X^\bullet et Y^\bullet entre eux. Cela peut être simplement analysé en terme d'enthalpie de liaison entre l'état X-H et Y-H⁸. La force de liaison apparaît donc comme un facteur déterminant de la réactivité des radicaux.

I.1-3 Les réactions de transfert couplé proton-électron.

Les réactions de transfert couplé proton-électron sont les processus les plus rencontrés dans les réactions radicalaires non concertées. Les transferts non concertés d'un proton et d'un électron impliquent soit une résolution spatiale soit une résolution temporelle des deux processus élémentaires. Les deux éléments (H^+ , e^-) peuvent utiliser différents chemins entre l'accepteur et le donneur, comme cela est représenté par le schéma 1-1.

Plus généralement, les transferts couplés (H^+ ; e^-) sont des processus séquentiels, le transfert des deux entités se faisant donc l'un après l'autre¹⁰⁻¹¹.

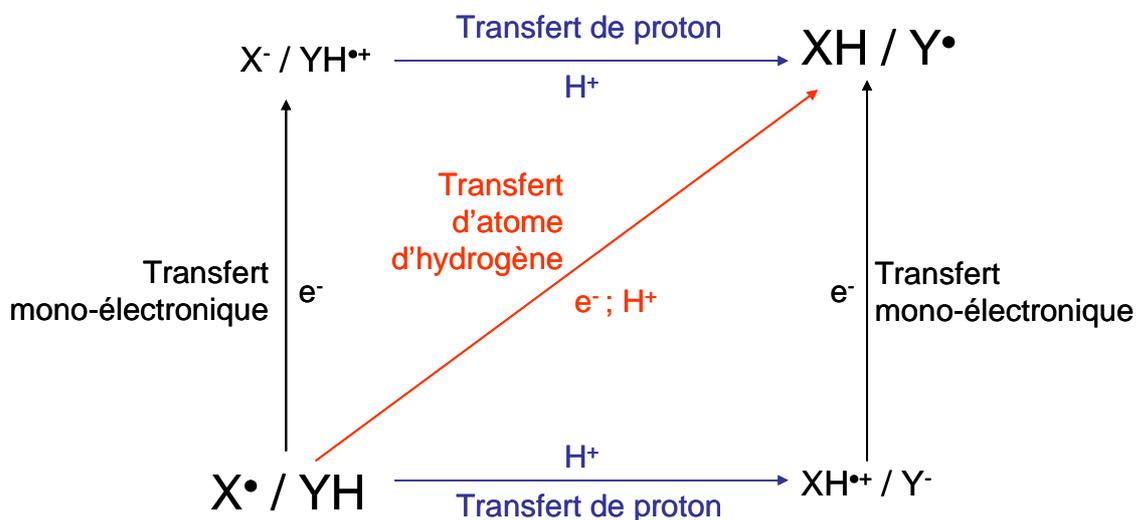


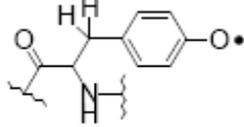
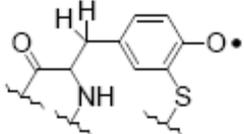
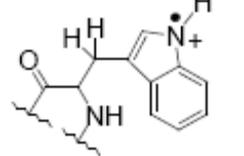
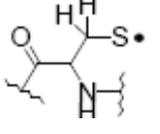
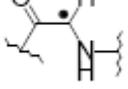
Schéma 1- 1: Chemins réactionnels possibles pour le transfert couplé proton/électron

Les paires donneur/accepteur d'électron et de proton peuvent être des espèces distinctes. Le transfert d'un atome d'hydrogène représente ainsi un cas limite de réaction de transfert couplé proton-électron dans lequel le transfert de proton et d'électron sont concertés et synchrones.

1.2-IDENTIFICATION ET PROPRIETES DES RADICAUX PROTEIQUES.

En 1977, Sjöberg et Reichard¹² ont démontré l'existence chez la ribonucléotide réductase d'*Escherichia coli* d'un radical persistant nécessaire à la réduction des ribonucléotides. Depuis, de nombreuses études effectuées sur diverses métalloprotéines ont permis de mettre en évidence la formation de radicaux protéiques, de longues ou de faibles durées de vie, nécessaires à l'activité enzymatique. Ces radicaux sont issus de l'oxydation de tyrosines, de tryptophanes, de cystéines et de glycines^{13,14,15,16,17,18} mais également de tyrosines et tryptophanes modifiés^{19,20,21,22}. Le tableau 1-1 présente les radicaux protéiques rencontrés dans les systèmes biologiques. Ces radicaux ont été pour la plupart caractérisés par spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), la méthode biophysique de

choix pour étudier de telles espèces. Nous détaillerons les principes de cette spectroscopie dans le chapitre suivant.

Amino-acide	Système enzymatique	Radical	Référence
Tyrosine	RNR ^a de classe I		Sjöberg 1977
	Photosystème II		Barry 1987
	Prostaglandine H synthase		Karthein 1988
Tyrosine modifiée	Galactose oxydase		Whittaker 1990
Tryptophane	cytochrome c peroxydase		Sivaraja 1989
Cystéine	RNR de classe II		Licht 1996
Glycine	RNR de classe III		Mulliez 1993
	Pyruvate formiate-lyase		Wagner 1992

^aRNR=Ribonucléotide Réductase

Tableau 1- 1: Diversité des radicaux protéiques impliqués dans la catalyse enzymatique

Les espèces radicalaires formées en solution se comportent différemment de celles formées au sein d'une protéine. En effet, l'environnement protéique stabilise généralement l'espèce radicalaire formée. Par exemple, dans le cas des ribonucléotides réductases de classe I en absence de substrat, le radical tyrosyle formé possède un temps de demi-vie de 4 jours alors qu'en solution le temps de demi-vie d'un radical tyrosyle est de l'ordre de la milliseconde²³. La grande réactivité des espèces radicalaires protéiques générées pendant la catalyse enzymatique implique donc un contrôle strict, exercé par l'environnement protéique. L'environnement protéique peut aussi modifier les propriétés physico-chimiques des radicaux et en particulier influencer le potentiel d'oxydo-réduction. Dans le photosystème II, par exemple, les deux radicaux tyrosyles formés ont des potentiels d'oxydo-réduction qui diffèrent de 250 mV, respectivement à 750 et 1000 mV²⁴. La galactose oxydase forme, sur un résidu tyrosine lié de façon covalente à un résidu cystéine, un radical tyrosyle dont le potentiel d'oxydo-réduction est de 400 mV, c'est-à-dire diminué de 600 mV par rapport aux potentiels mesurés pour des radicaux tyrosyles associés à de petits peptides²⁵.

Les radicaux issus de l'oxydation des acides aminés sont formés lors de la catalyse enzymatique par un processus redox faisant intervenir un cofacteur métallique. Ce cofacteur est situé soit à proximité de l'acide aminé qui va être oxydé soit sur un autre enzyme, appelé protéine activatrice. Les métaux les plus souvent impliqués dans la formation de radicaux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le cobalt (Co) ou le manganèse (Mn)²⁶. Le fer, en particulier, est très représenté. Il peut intervenir associé à des ligands tels que les porphyrines ou constituer des centres binucléaires comme dans les centres [4Fe-4S]. Le dioxygène peut également initier la réaction de formation du radical *via* l'oxydation du centre métallique^{27,28,29,30,31,32,33,34}. Dans le cas des systèmes anaérobies, le même dioxygène détruit le centre métallique¹⁵ et d'autres cofacteurs sont alors utilisés pour initier le transfert d'électron.

Dans la majorité des enzymes décrits dans ce chapitre, la fonction du cofacteur est de générer un radical protéique transitoire, qui va interagir directement avec le substrat. Cependant, leur courte durée de vie rend difficile l'attribution de leur nature chimique et/ou de leur fonction biologique. Les espèces radicalaires protéiques peuvent catalyser plusieurs cycles, comme dans le cas de la prostaglandine H synthase (PGHS)³⁵. Toutefois dans la majorité des cas, le radical protéique est formé et régénère l'acide aminé sous forme réduite à chaque cycle catalytique^{36,37}. Les protéines radicalaires peuvent s'inactiver pendant leur cycle catalytique en absence de substrat. Ce phénomène est exacerbé quand un analogue du substrat est utilisé. Ceci prouve que les radicaux protéiques sont très spécifiques par rapport à leur substrat^{38,39,40,41}.

II. LES RADICAUX PROTEIQUES ET LA CATALYSE ENZYMATIQUE.

II.1-LES RIBONUCLEOTIDES REDUCTASES.

Les ribonucléotides réductases (RNRs) fournissent les briques nécessaires à la réplication de l'ADN dans toutes les cellules vivantes, en catalysant la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides associés⁴²⁻⁴³.

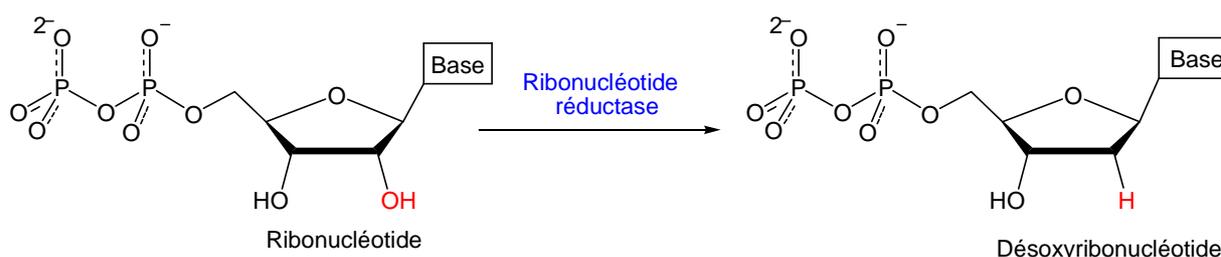


Figure 1- 1: Réaction de conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides catalysée par les RNRs

Malgré ce rôle central dans le métabolisme, les RNRs possèdent des structures primaires et quaternaires très diverses. Les RNRs ont été subdivisées en trois classes selon le cofacteur utilisé pour leur catalyse⁴².

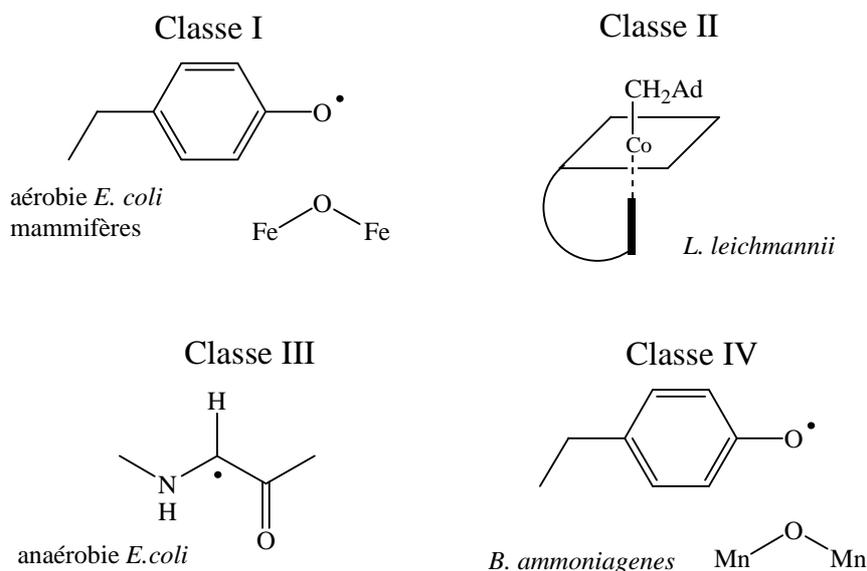


Figure 1- 2: Classification des différentes RNRs d'après la nature du cofacteur utilisé dans la réaction de catalyse. La fonction de tous ces cofacteurs est de générer le radical thiyle qui va initier la réaction de réduction des ribonucléotides. D'après Stubbe 1998²⁶

Les RNRs de classe I (ou aérobies), découvertes par Reichard dans les années 50⁴⁴, forment un radical tyrosyle grâce à un centre binucléaire à fer et en présence de dioxygène. Les RNRs de classe II, découverte par Blakley et Beck⁴⁵⁻⁴⁶, emploient le coenzyme adénosylcobalamine comme source de radicaux et les RNRs de classe III, identifiées d'abord par Barlow⁴⁷ puis étudiées par les équipes de Fontecave, Eliasson et Reichard⁴⁸, forment un radical glycyle grâce à la S-adénosylméthionine et à un centre fer-soufre. Malgré le peu d'homologie de séquence au sein des RNRs, elles procèdent par la même chimie radicalaire au niveau du nucléotide⁴³⁻⁴⁹⁻⁵⁰. Le tableau 1-2 récapitule les différentes caractéristiques des trois classes de RNRs.

	Classe Ia	Classe Ib	Classe Ic	Classe II	Classe III
Sensibilité à O ₂	Aérobie	Aérobie	Aérobie	Aérobie/ Anaérobie	Anaérobie
Structure	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha(\alpha_2)$	$\alpha_2\beta_2$
Radical	Tyr.Cys	Tyr.Cys	Cys	AdB12.Cys	AdoMet.Gly.Cys ?
Site métallique	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe	Fe-O-Mn	Co	Fe-S
Substrat	NDP ^a	NDP	NDP ^a	NDP/NTP ^b	NTP
Réducteur	Thiorédoxine Glutarédoxine	NrdH-rédoxine Glutarédoxine		Thiorédoxine	Formiate
Site allostérique par chaîne polypeptidique	2	1		1	2
Inhibition par dATP	oui	non		non	Oui
Prototype	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>L. leishmanii</i>	<i>E. coli</i>

^aNDP=ribonucléotides diphosphates; ^b NTP: ribonucléotides triphosphates

Tableau 1-2: Caractéristiques générales des trois classes de ribonucléotides réductases.

La fonction des différents cofacteurs est d'initier la formation d'un radical sur le nucléotide. Le mécanisme de réduction du nucléotide ne sera pas détaillé dans ce chapitre. Afin de comprendre la formation et surtout le rôle des radicaux protéiques, seules les grandes étapes de la réduction du nucléotide sont présentées (figure 1-3).

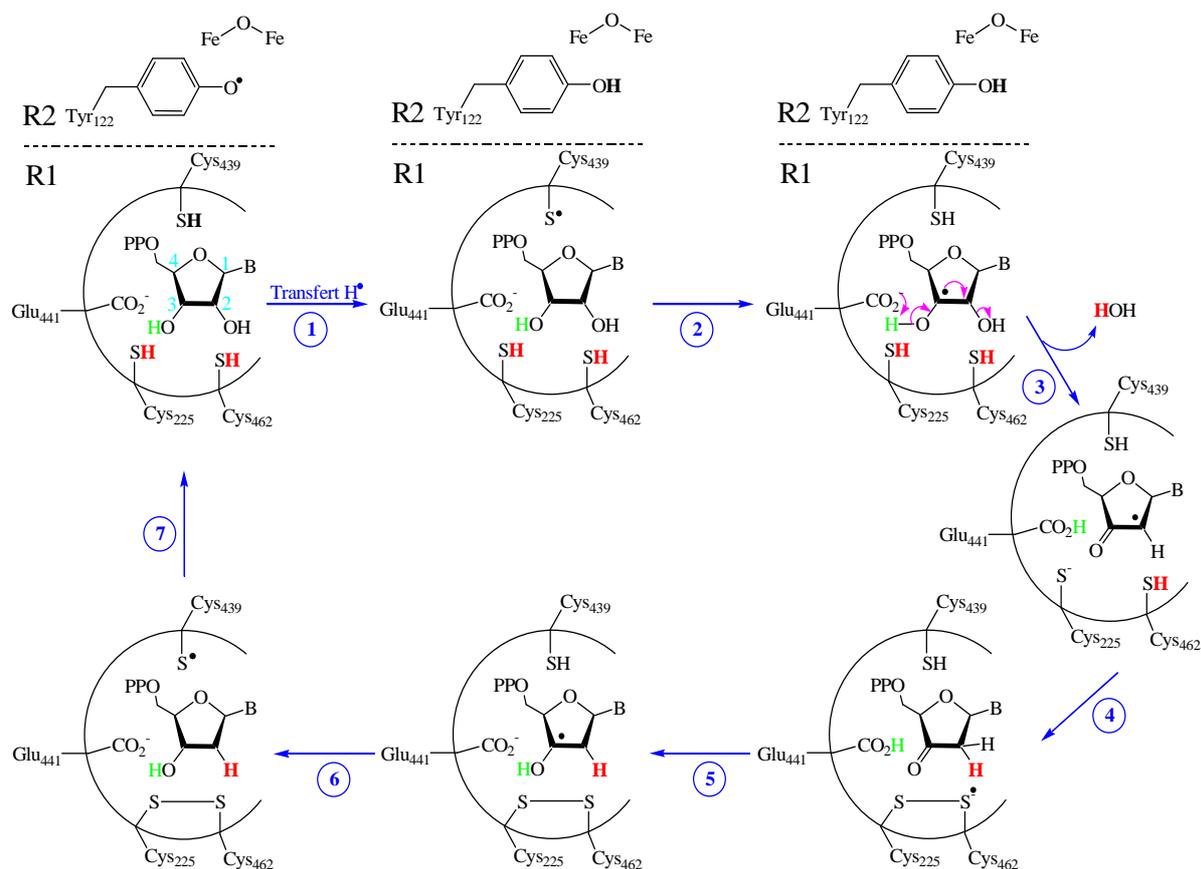


Figure 1-3: Mécanisme radicalaire de la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides par les RNRs de classe I. D'après Stubbe 1998²⁶

La réaction est initiée par la liaison du substrat dans le site actif de l'enzyme, celle-ci étant sous forme réduite. Le radical thiyle, formé par un transfert d'électron depuis le radical tyrosyle, va initier la réduction du ribonucléotide proprement dit en arrachant un atome d'hydrogène au carbone C-3 de l'unité ribose (2), générant ainsi un substrat radicalaire. La formation de ce radical facilite le départ, sous forme d'une molécule d'eau, du groupe OH du carbone C-2 (3). Un atome d'hydrogène est alors transféré à partir d'un troisième résidu cystéine pour terminer la réduction au niveau de C-2, une liaison disulfure est formée (4). Le radical est ensuite reformé en C-3, par transfert d'un atome d'hydrogène ddu glutamate 441 et réduction du radical anion disulfide (5). Finalement l'atome d'hydrogène arraché par la cystéine 439 est capté par l'atome C-3 du nucléotide. Le radical thiyle est à nouveau formé et le désoxyribonucléotide est libre de quitter l'enzyme (6). La liaison disulfure créée dans le site actif de l'enzyme est alors réduite par des protéines spécifiques (7) contenant un centre redox de type disulfures, tels que la thiorédoxine. Pendant toute la catalyse, l'acide glutamique 441 stabilise l'interaction entre l'enzyme et le substrat en formant des liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygènes des carbones C-2 et C-3 du substrat.

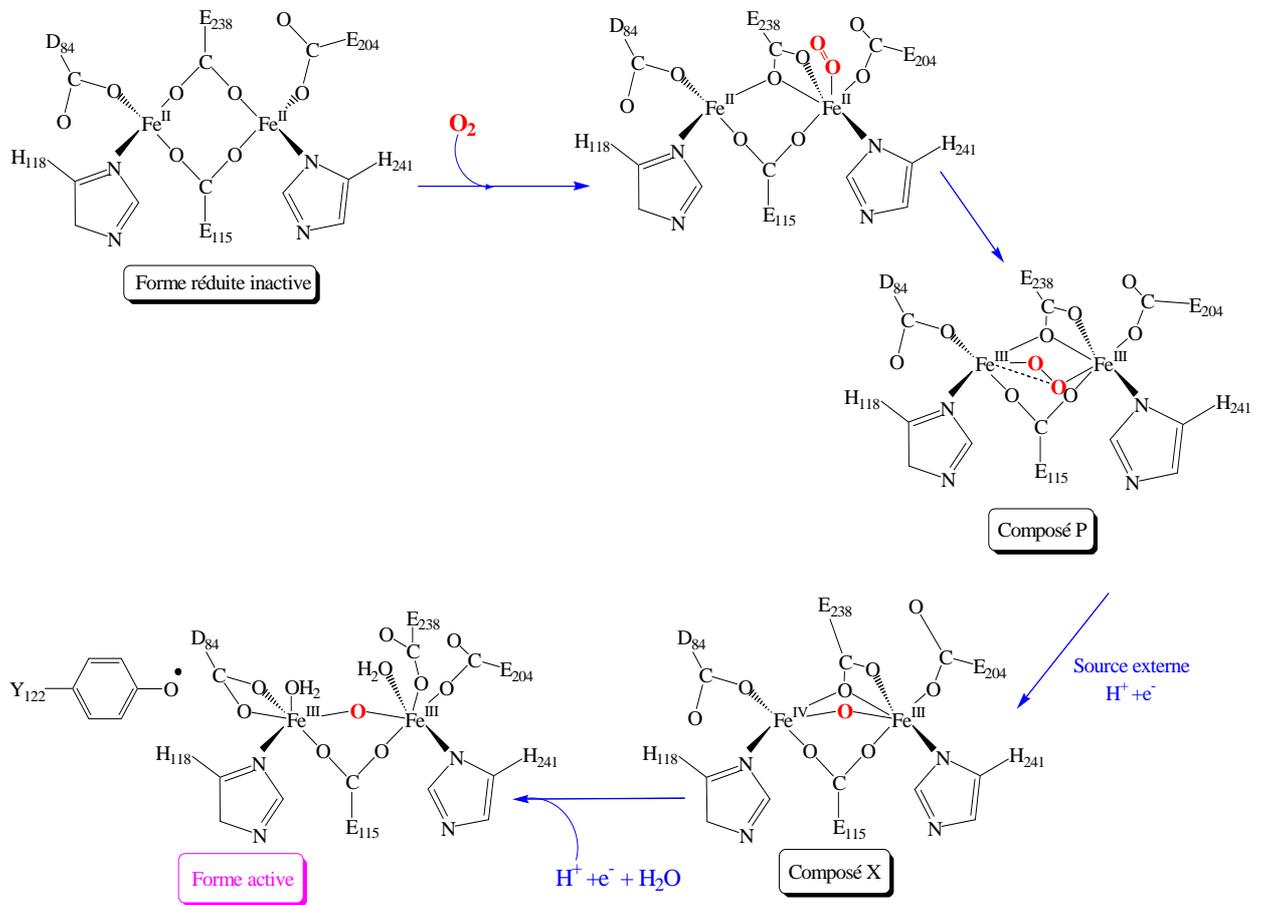


Figure 1-4: Mécanisme proposé pour la formation du radical tyrosyle chez les RNRs de classe I. La forme réduite de R2, inactive, résulte de la chélation de deux ions ferreux par l'apoprotéine. Une réduction à deux électrons du dioxygène par le centre binucléaire à fer conduit à la formation d'un composé P. La réduction et la protonation de ce composé conduit au composé X. La réduction à un électron de ce dernier par la tyrosine adjacente mène à la forme active de R2. La numérotation correspond à l'enzyme d'*Escherichia coli*. D'après Andersson 1999⁵⁹

II.1-1 Formation du radical tyrosyle chez les RNRs de classe I.

Les RNRs de classe I sont constituées de deux sous-unités homodimériques R1 et R2. La réduction du nucléotide a lieu dans la sous-unité R1. La sous-unité R2 contient le radical tyrosyle (formé sur la Tyr122 dans la RNR d'*E. coli*) et le centre à fer, constitué de deux atomes de fer spin fort en interaction antiferromagnétique *via* un pont μ -oxo [Fe(II)-O-Fe(II)]^{51,52,53,54}. Des expériences de spectroscopie RPE et de marquage isotopique sur la sous-unité R2 ont révélées que la bande d'absorption à 410 nm en UV-visible et le doublet centré à $g=2,004$, observés pendant le cycle catalytique, étaient dus à la formation d'un radical tyrosyle^{55,12,56,57,58}.

Dans la forme inactive de la protéine, les deux atomes de fer sont au degré d'oxydation +II, distants de 3,9 Å et reliés entre eux par des ponts carboxylates bidentates créés par deux résidus glutamates. Au cours de la première étape une molécule de dioxygène se lie à l'un des centres métalliques de la forme réduite. Un tel complexe n'a pas pu être observé dans le cas de la RNR mais des cristaux de la protéine R2, contenant une molécule d'azote liée au centre bimétallique, ont été obtenus avec un mutant de la RNR d'*E.coli*⁵⁹. Le centre binucléaire à Fe(II) réagit ensuite avec le dioxygène pour former un composé peroxy (composé P). Cette espèce n'a pu être observée que dans des complexes modèles⁶⁰ ou avec des mutants de R2^{61,62}. La réduction, couplée à une protonation de ce complexe, conduit à l'intermédiaire X, au sein duquel les deux atomes de fer sont distants de 2,5 Å⁶³. Cette espèce a été formellement décrite comme un complexe mixte Fe(IV)-Fe(III)⁶⁴. Au sein de cette espèce, le résidu tyrosine est alors oxydé formant ainsi l'intermédiaire catalytiquement actif. L'espèce active est constituée du centre binucléaire, Fe(III)-Fe(III) liés par un pont μ -oxo, et du radical tyrosyle. La figure 1-4 reprend le mécanisme proposé pour le passage de la forme inactive à la forme active des RNRs de classe I.

Un troisième intermédiaire, appelé composé U, contenant un radical tryptophanyle protoné couplé à un centre Fe(III)-Fe(IV) a été également proposé. Ce radical, localisé sur le tryptophane 48, a été observé lorsque l'apport en fer est limité^{65,66}.

Le radical tyrosyle est nécessaire à l'activité catalytique des RNRs de classe I. Le site actif de la réaction est localisé dans la sous-unité R1 et contient la Cys439, essentielle pour la catalyse, car elle initie la réduction du nucléotide⁶⁷⁻⁶⁸. La Cys439 et la Tyr122 étant distantes de 35 Å, d'autres acides aminés assurent le transfert d'électron entre ces deux résidus⁶⁹. Récemment, Seyedsayamdost et *coll.* ont montré que la Tyr356 est impliquée dans ce transfert d'électron mais le chemin complet n'est pas encore tout à fait élucidé⁷⁰.

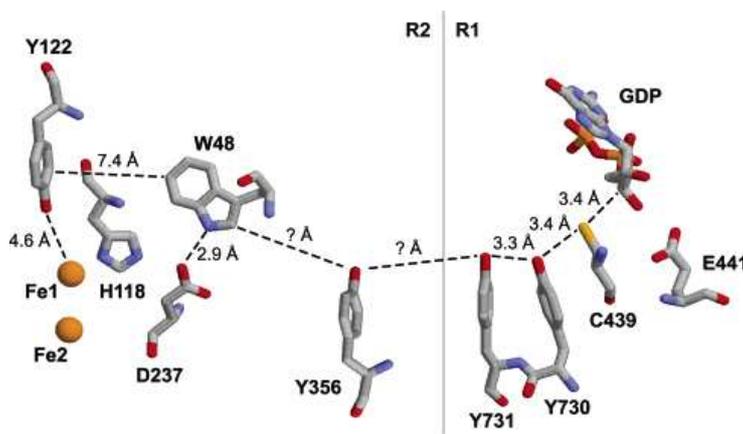


Figure 1- 5 : Chemin proposé pour le transfert d'électron entre le résidu Tyr122 et le résidu Cys439 dans la RNR de classe I d'*E. coli*.⁷¹.

II.1-2 Formation du radical glycyle chez les RNRs de classe III

La formation du radical glycyle dans la sous-unité α_2 des RNRs de classe III est moins bien comprise que celle du radical tyrosyle des RNRs de classe I. Généralement, les enzymes à radical glycyle permettent aux organismes anaérobies stricts ou facultatifs de catalyser des réactions chimiquement difficiles^{72,73}. Le radical glycyle est essentiel pour la catalyse et est très sensible au dioxygène. Par contre, en absence de dioxygène, ce radical est stable pendant plusieurs heures. La stabilité inhérente des radicaux glycyloxy est due aux effets combinés des substituants NH et CO, respectivement électrodonneur et électroattracteur, et à son enfouissement au sein de la protéine.

Les signaux RPE des radicaux glycyloxy présentent des caractéristiques spécifiques. Il s'agit d'un doublet avec un couplage hyperfin de 1,4-1,5 mT centré à $g=2,0035$ en RPE bande X. Ce spectre a été observé notamment dans le cas de la Pyruvate Formiate-Lyase (PFL)^{13,74}. Le cycle catalytique de tous les enzymes à radical glycyle débute probablement par le transfert du radical glycyle sur le groupe thiol d'une cystéine spatialement proche du résidu glycine. Le radical thiyle résultant initie ensuite la réaction radicalaire⁷⁵. Cependant pour être activées, les protéines à radical glycyle nécessitent l'intervention d'une protéine à centre fer-

soufre. Celle-ci en combinaison avec la *S*-adénylméthionine (SAM) peut initier une catalyse radicalaire et réaliser des réactions diverses telles que des méthylations inhabituelles, isomérisations, cyclisations, oxydations, insertions de soufre ou encore la formation de radicaux protéiques⁷⁶. Malgré la diversité des réactions catalysées, on suppose que ces protéines utilisent un mécanisme commun de génération des espèces radicalaires qui est représenté par la figure 1-6.

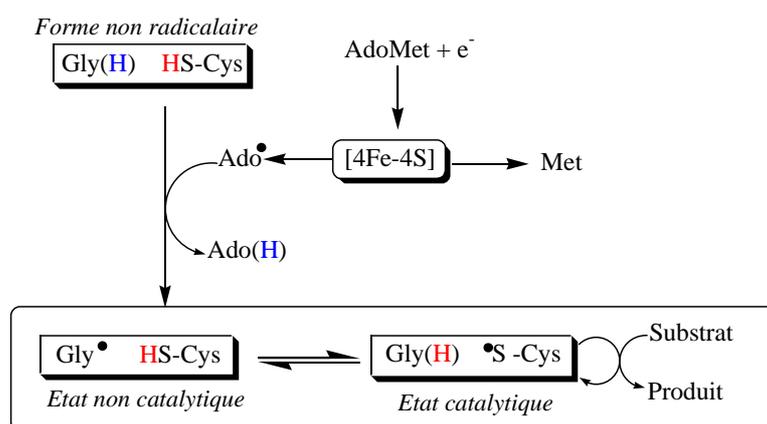


Figure 1-6: Modèle de fonctionnement des enzymes à radical glycyle. D'après Knappe 2001⁷⁵

Le radical 5'-déoxyadénylyle (Ado^\bullet) issu de la réduction de la SAM oxyde un résidu glycine. Le radical glycyle est réduit par une cystéine du centre actif, formant un radical thiyle. Le radical thiyle formé est ensuite transféré au substrat qui est converti en produit par un mécanisme radicalaire⁷⁷.

II.1-3 Rôle du radical thiyle chez les RNRs.

Le radical thiyle est une espèce transitoire capable d'arracher un atome d'hydrogène au substrat sur des positions activées. En effet, l'énergie de dissociation de la liaison S-H est de l'ordre de 90 kcal.mol^{-1} alors que l'énergie de dissociation mise en jeu lors de la rupture de la liaison du substrat est de l'ordre de 80 kcal.mol^{-1} ²⁶. Les radicaux thiyles sont très efficaces car ils sont capables d'arracher un atome d'hydrogène avec des vitesses de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, même si cette faculté est masquée par leur capacité à donner un atome d'hydrogène encore plus rapidement⁷⁸.

II.2-LA GALACTOSE OXYDASE.

La galactose oxydase (GO)⁷⁹ est une métalloprotéine à cuivre de type II, de 68,5 kDa, isolée d'un champignon : *Fusarium spp.* Elle fait partie de la classe des oxydases radicalaires à cuivre qui incluent également la Glyoxal Oxydase⁸⁰. Elle catalyse l'oxydation à deux électrons du D-galactose en présence de dioxygène avec départ de l'hydrogène pro-*S* du substrat. Les produits de réaction sont le sucre oxydé et le peroxyde d'hydrogène⁸⁰. Il est intéressant de noter que la protéine accepte comme substrat un très grand nombre d'alcools primaires et les oxyde en aldéhydes avec réduction concomitante de dioxygène en peroxyde d'hydrogène^{79,33}.

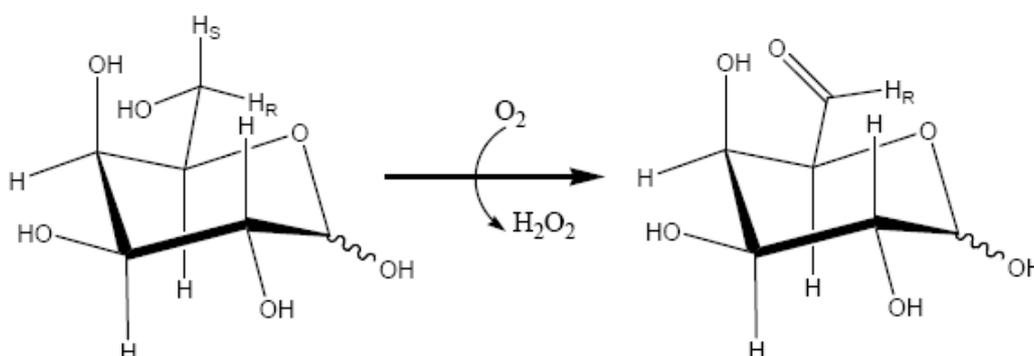


Schéma 1- 2 : Oxydation du D-galactose par la galactose oxydase.

La structure cristallographique de la forme inactive de la galactose oxydase a été résolue par Ito et coll. en 1994⁸¹. Le site actif de la forme inactive est constitué d'un atome de cuivre dans une géométrie de type pyramidal à base carrée, avec le résidu tyrosine 495 en position axiale. Les histidines 581 et 496, la tyrosine 272 et un ligand exogène (eau ou acétate) coordinent le cuivre en position équatoriale. Un fait remarquable dans cette structure est la présence d'une liaison covalente entre le soufre de la cystéine 228 et la tyrosine 272⁸¹ (en position ortho de la fonction phénol de la tyrosine).

La galactose oxydase catalyse la réduction des alcools primaires en aldéhydes. Cette réaction met en jeu deux électrons, alors que son site actif ne contient qu'un seul atome de cuivre (susceptible de ne transférer qu'un seul électron par la réaction $\text{Cu(II)} + 1 \text{ e}^- \rightleftharpoons \text{Cu(I)}$). Ce problème n'est qu'apparent, car au cours de son cycle catalytique la galactose oxydase met en jeu un autre site redox, non métallique, qui a été identifié comme un radical protéique. La forme active de l'enzyme contient donc un ion de cuivre (II) et un radical organique. L'oxydation, *via* le dioxygène, de l'apoprotéine génère ce radical sur la Tyr495 puis, par transfert d'électron le radical est formé sur la Tyr272 liée par liaison covalente au résidu

cystéine⁷⁹⁻⁸⁰⁻⁸¹⁻⁸². En spectroscopie RPE cela se traduit par la présence d'un couplage hyperfin avec un seul hydrogène en ortho de la fonction phénol.

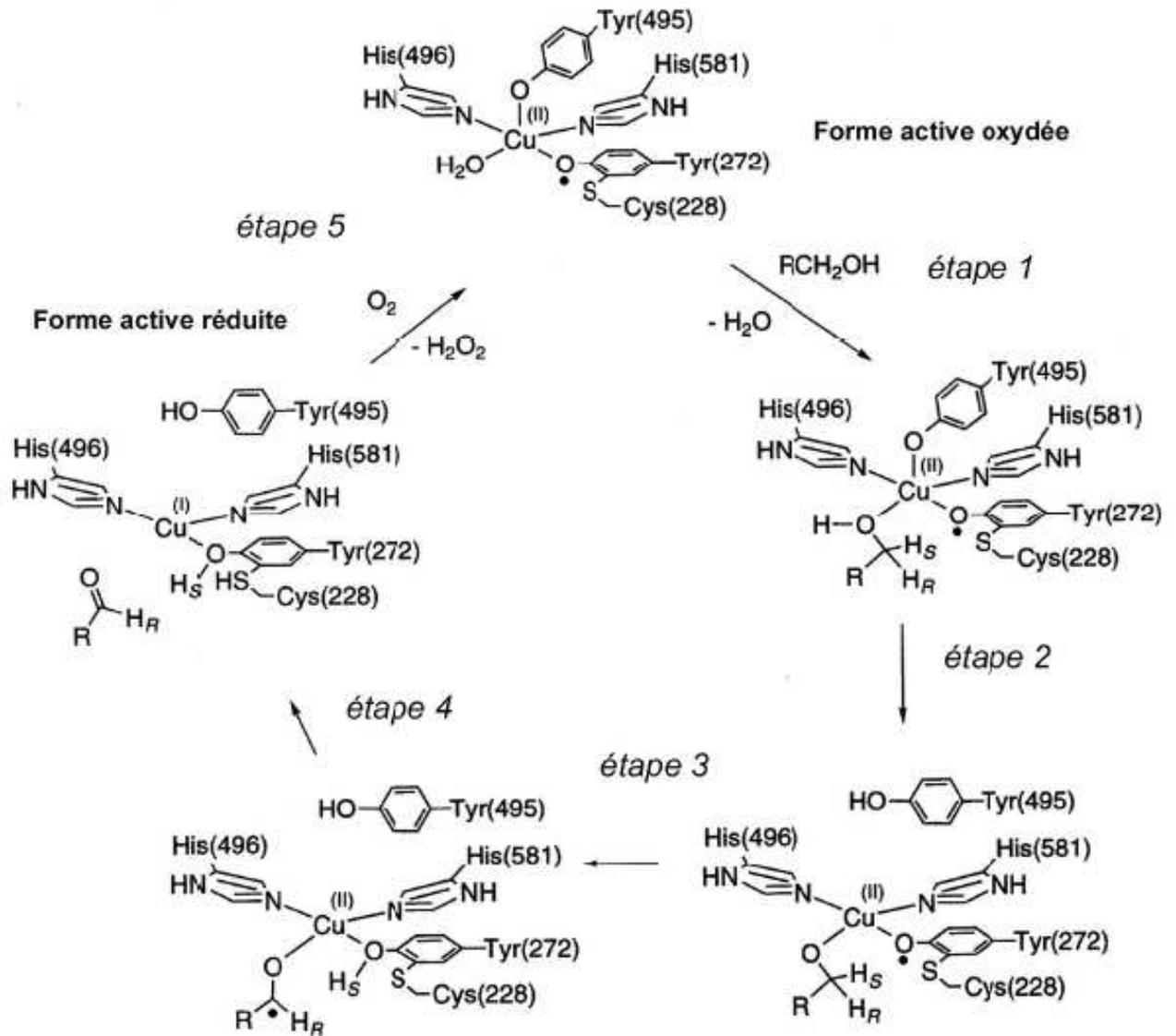


Figure 1-8 : Détails du mécanisme d'oxydation des substrats proposé pour la galactose oxydase. D'après Whittaker⁸³.

En se basant sur des études de marquages isotopiques ainsi que sur la structure cristallographique, Whittaker⁸³ a proposé un mécanisme pour l'oxydation des substrats (figure 1-8). Dans la première étape, le substrat se fixe au cuivre(II) par l'oxygène hydroxylique et vient occuper la cinquième position échangeable du site actif. Le site actif relativement ouvert et accessible au solvant est en accord avec la faible sélectivité en substrat de l'enzyme. Dans la seconde étape, la tyrosine 495 capte un proton rendu plus acide de la fonction alcool. Cette déprotonation est facilitée par la présence d'une liaison hydrogène⁸⁴ entre l'hydroxyle et le phénolate de la tyrosine 495 et par une faible différence de pKa entre la tyrosine 495 et l'alcool coordonné. La troisième étape est la coupure homolytique de la liaison C α -H par le radical tyrosyle Tyr₂₇₂ \bullet et la formation d'un radical cétyle sur le substrat. Au cours de la quatrième étape, le radical cétyle réduit le cuivre(II) en cuivre(I) par transfert d'un électron. Ce double transfert d'électron aboutit à la forme réduite de l'enzyme et à l'aldéhyde. Dans ce complexe, les deux tyrosines du centre actif sont protonées et sont supposées être en faible interaction avec le cuivre. La dernière étape de cette réaction d'oxydation, est la ré-oxydation de la galactose oxydase. La forte instabilité du complexe oxygéné fait que le mécanisme de ré-oxydation du site est beaucoup moins connu que l'étape d'oxydation du substrat.

II.3-LA PROSTAGLANDINE H SYNTHASE.

La prostaglandine H synthase (PGHS) catalyse les premières étapes de la biosynthèse des prostaglandines^{85,86,87,88}. Une première activité de type cyclooxygénase permet la conversion de l'acide arachidonique (AA) en prostaglandine G₂ (PGG₂) grâce à deux molécules de dioxygène. Puis grâce à une activité peroxydase, la PGG₂ pourra être réduite en prostaglandine PGH₂. La PGHS existe sous deux isoformes PGHS-1 et PGHS-2. Les deux activités catalytiques peuvent être observées pour chacune des deux isoformes. Les sites actifs de ces deux activités sont différents, cependant d'un point de vue mécanistique l'activité cyclooxygénase est liée à l'activité peroxydase⁸⁹.

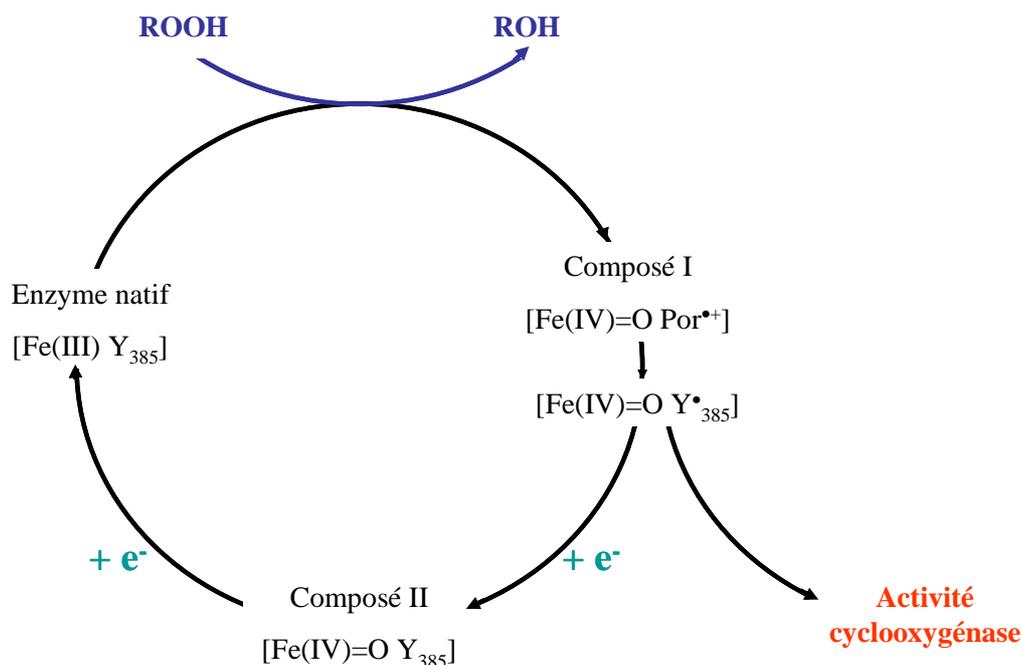


Figure 1-9 : Cycle peroxydase pour la PGHS-1. D'après Shi 2000⁹⁵.

Dans le cycle peroxydase, l'enzyme à l'état natif réagit avec un peroxyde pour former le composé I $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$. Ce composé est formé initialement d'une espèce oxoferryle en interaction avec un radical porphyrinique cationique^{89,17,90}, mais ce radical est réduit par un acide aminé aromatique, respectivement la Tyr385^{91,92} pour la PGHS-1 et la Tyr371 pour la PGHS-2^{93,94}. Il se forme donc l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$. Ce radical tyrosyle est responsable de l'abstraction d'un atome d'hydrogène de l'acide arachidonique, ce qui constitue l'étape d'initiation du cycle cyclooxygénase. L'oxydation de l'hème (activité peroxydase), conduisant au composé I, est donc nécessaire à l'activité cyclooxygénase. En revanche, l'activité peroxydase peut très bien exister indépendamment de l'activité cyclooxygénase^{95,96}.

Depuis que Ruf et *coll.* ont mis en évidence la formation d'une espèce active en spectroscopie RPE dans le cycle catalytique, de nombreuses équipes ont cherché à définir la structure de cette espèce paramagnétique¹⁷. Trois états différents de la PGHS-1 peuvent être observés en RPE. Les spectres associés correspondent à un doublet large, un singulet large et un singulet étroit^{92,97,98}. Plusieurs études suggèrent que l'espèce, dont le spectre est le doublet large (3,5 mT) est un intermédiaire du cycle de cyclooxygénation. Son apparition est corrélée avec la consommation de peroxyde et sa disparition avec la formation de PGG₂^{99,92}. De plus, avec le mutant Y385F plus aucune activité cyclooxygénase n'est détectée et le doublet large n'est effectivement plus observé^{100,101}. Avec ce mutant, l'activité peroxydase est, elle aussi, réduite de 50 % par rapport à la souche sauvage. Ceci corrobore donc l'idée que les deux sites actifs sont indépendants l'un de l'autre mais partage le même cofacteur hémique¹⁰².

Lorsque l'échantillon correspondant au doublet large est incubé dans la glace plusieurs minutes, le signal évolue vers un signal singulet stable d'approximativement la même largeur. Si l'incubation est prolongée quelques heures, ce singulet large évolue vers un singulet plus étroit, d'environ 2,5 mT de largeur⁹⁸, qui apparaît après la formation de PGG₂.

Des expériences menées dans des conditions anaérobies ont montré qu'en absence d'acide arachidonique, le spectre correspondant au doublet large est détecté. Si l'acide arachidonique est ajouté au milieu, le doublet large disparaît au profit d'un nouveau signal⁹¹. Des expériences de marquages isotopiques de l'acide arachidonique ont montré que ce nouveau signal provenait du substrat lui-même (AA[•]). En revanche, lors d'une expérience de marquage réalisée lorsque seul le singulet étroit est détecté, aucun nouveau signal radicalaire n'est détecté⁹¹. Le signal du doublet large semble donc correspondre à une espèce qui initie la chimie d'oxydation du substrat, tandis que celui du singulet étroit, à une espèce dégradée. Des résultats encore plus convaincants⁹³ sont obtenus avec l'incubation de l'enzyme PGHS-2 avec du peroxyde d'éthyle. En RPE, un singulet large, correspondant à un radical tyrosyle, est détecté. Ce radical va réagir avec l'acide arachidonique pour générer en RPE un signal à sept raies qui peut être simulé par un radical pentadienyle. Ce dernier pourrait être une espèce dérivée de l'acide arachidonique.

II.4-LE PHOTOSYSTEME II.

Au cours de la photosynthèse oxygénique, un transfert d'électron, induit par l'énergie solaire, a lieu. Les systèmes impliqués dans ce transfert sont le photosystème I (PS I) et le photosystème II (PS II). Le photosystème II est constitué d'un ensemble de protéines membranaires contenant, entre autre, des chlorophylles et un centre à manganèse, site catalytique pour la réaction d'oxydation de l'eau^{103,104}.

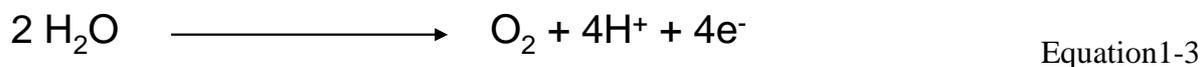
Dans le PSII, l'eau est oxydée en dioxygène et en protons, tandis qu'une plastoquinone est réduite en quinol. Ces réactions se produisent dans des sites distincts de la protéine, connectés entre eux par une série de cofacteurs permettant le transfert d'électron de l'un vers l'autre. Une chlorophylle initie le mouvement des électrons: son état initialement réducteur évolue par perte d'électron vers une espèce fortement oxydante (P₆₈₀⁺).

II.4-1 Chaîne de transfert d'électron au sein du photosystème

II.

La photochimie du PSII¹⁰⁵⁻¹⁰³ commence par l'excitation d'une paire spéciale de molécules de chlorophylle liées aux sous-unités D₁ et D₂. Cette paire absorbe des radiations de longueurs d'ondes 680 nm et est appelée P₆₈₀ (figure 1-10). A la suite de l'excitation, le P₆₈₀ transfère, en quelques picosecondes, un électron à une molécule de phéophytine voisine (une chlorophylle démétaillée avec deux ions H⁺ à la place de l'ion Mg²⁺) formant ainsi le cation correspondant P₆₈₀⁺. L'électron est ensuite successivement transféré à une plastoquinone, Q_A, accepteur d'un électron, puis à une autre plastoquinone Q_B, qui peut accepter deux électrons. P₆₈₀⁺ est suffisamment puissant pour oxyder le centre à manganèse du centre de dégagement de l'oxygène et ce *via* une tyrosine (Y_Z), qui forme un radical intermédiaire. Dans ce modèle, la tyrosine Z fait partie intégrante du site catalytique.

La réaction d'oxydation de l'eau est une réaction à quatre électrons dont l'équation bilan est la suivante :



Il faut donc quatre séparations de charge à l'intérieur du centre réactionnel avant que la réaction n'aboutisse. Le centre à manganèse agit comme accumulateur de charges et stocke quatre équivalents d'oxydants au cours du cycle catalytique.

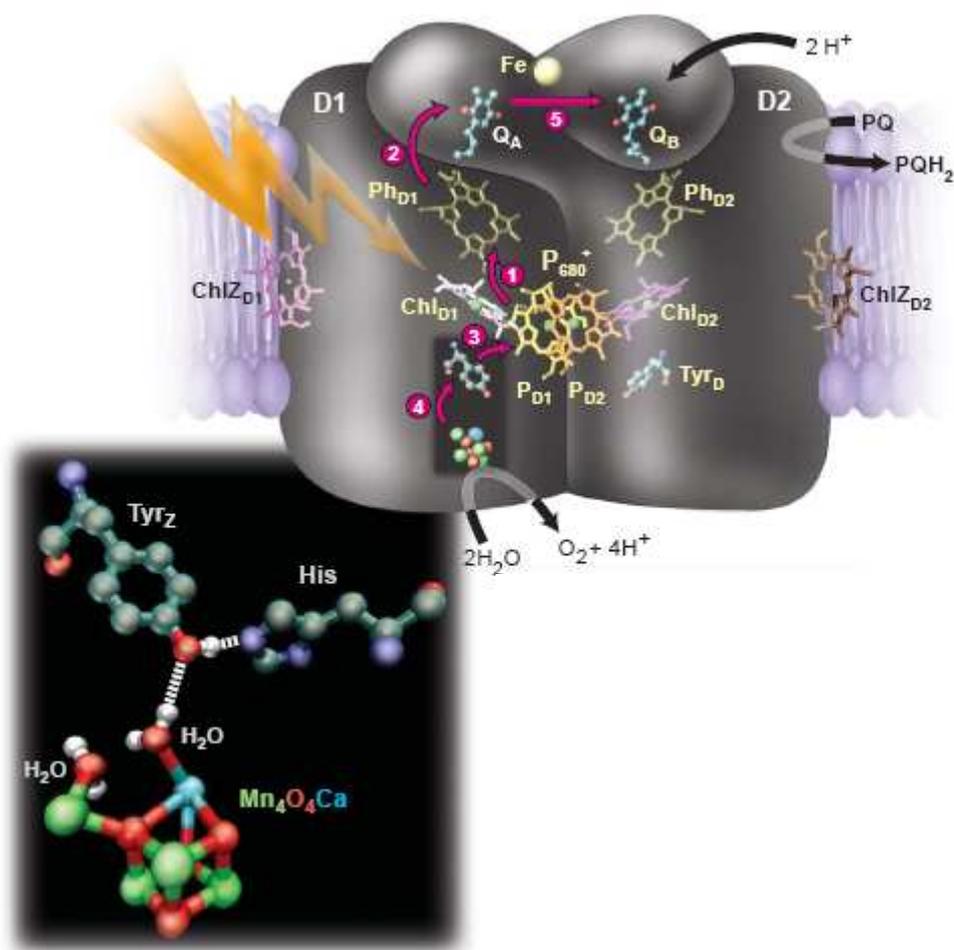


Figure 1-10 : Mécanisme de l'oxydation de l'eau en dioxygène. 1 Séparation de charge entre Chl_{D1} et Ph_{D1} conduisant à la formation de l'espèce P_{680}^+ ; 2 Transfert d'électron de Ph_{D1} vers Q_A ; 3 Oxydation de la tyrosine Z par P_{680}^+ ; 4 Oxydation du centre à manganèse par $\text{Y}_\text{Z}^\bullet$; 5 Transfert d'électron entre Q_A^- et Q_B . D'après Rutherford 2004¹¹⁴.

II.4-2 Rôle proposé pour les radicaux tyrosyles Z et D

Deux résidus tyrosines localisés à proximité de la chlorophylle P_{680}^+ , respectivement en position 161 de la chaîne D1 et 160 de la chaîne D2, peuvent fournir un électron à l'espèce P_{680}^+ et former un radical^{106.107.108.109}. Toutefois un seul, noté Z en position 161, permet l'oxydation de l'eau en dioxygène et n'existe donc que transitoirement. L'autre radical, noté D, est en revanche stable.

Le radical $\text{Y}_\text{Z}^\bullet$ doit induire la rupture homolytique de la liaison O-H d'une molécule d'eau liée au centre à manganèse, par arrachement de l'atome d'hydrogène¹¹⁰. Ce mécanisme nécessite deux particularités structurales : premièrement, le résidu tyrosine doit être proche (idéalement lié par liaison hydrogène) de la molécule d'eau et deuxièmement, l'atome d'hydrogène arraché au résidu tyrosine doit être expulsé du centre actif pour qu'une fois formé, le radical tyrosyle Z, soit capable d'arracher l'atome d'hydrogène du substrat. Grâce à

la structure cristallographique du photosystème II obtenue par Zouni et *coll.*¹¹¹, il est apparu que l'ion calcium et la tyrosine sont distants de seulement 5,1 Å (figure 1-10), ce qui rend plausible l'oxydation directe de l'eau par le radical tyrosyle. D'autre part, une histidine (His191) déprotonée est suffisamment proche de la tyrosine pour capter son proton, qui serait ensuite évacué par des réarrangements structuraux au cours du cycle catalytique. Le centre à manganèse et l'ion calcium sont, en effet, soumis à des changements structuraux dans les états d'oxydation les plus élevés du cycle catalytique^{112,113}. Ceci suggère que la tyrosine Z n'arrache un proton et un électron de l'eau qu'uniquement dans les états d'oxydation les plus élevés.

En ce qui concerne le radical de la tyrosine D, stable et, *a priori* sans rôle catalytique, des hypothèses ont été avancées pour expliquer sa formation. Son rôle serait essentiellement redox. D'une part, le radical semble être un oxydant du centre à manganèse et le maintien ainsi au potentiel redox adéquat lors du cycle. Ce rôle redox pourrait également être important lors de l'assemblage du centre à manganèse car les formes très réduites du manganèse sont oxydées par le radical tyrosyle D. D'autre part, l'atome d'hydrogène arraché à la tyrosine D, lors de la formation du radical correspondant, resterait proche de celle-ci et aurait une influence électrostatique sur le potentiel de la chlorophylle cationique P₆₈₀⁺. Cette influence pourrait s'étendre à la cinétique de l'oxydation de la tyrosine Z. Le turnover de l'enzyme serait ainsi augmenté et il serait protégé contre les dommages induits par la lumière. Le second rôle de ce résidu tyrosine, considéré comme générateur de charge positive dans un environnement hydrophobe, serait nouveau en biologie¹¹⁴.

II.5-LA CYTOCHROME C OXYDASE.

Lors de la respiration aérobie, le dioxygène est réduit en eau par la cytochrome *c* oxydase (CcO). Trois centres redox rendent possible cette réaction: le cuivre Cu_A (transfert d'électron), l'hème *a* (transfert d'électron) et un centre binucléaire contenant l'hème *a*₃ et le cuivre Cu_B (réduction du dioxygène).

Depuis la fin des années 70, Babcock et *coll.* ont travaillé sur le développement de techniques de spectroscopie Raman résolues en temps pour étudier les protéines redox et en particulier pour identifier les intermédiaires du cycle catalytique de la cytochrome *c* oxydase¹¹⁵. Depuis que la structure de l'intermédiaire P, d'abord supposé être un Fe-O-O, a été démontré comme étant une espèce oxoferryle [Fe(IV)=O]¹¹⁶, la possibilité de la participation d'un radical tyrosyle, au cycle catalytique de la CcO, a été émise (figure 1-11).

Le clivage de la liaison O-O du dioxygène nécessite quatre électrons, c'est-à-dire un de trop par rapport à ce que peut fournir le centre actif. Par contre, celui-ci peut être libéré en générant un radical sur un résidu amino-acide. C'est ce qu'ont proposé Proshlyakov et coll.¹¹⁷ après avoir montré que la molécule de dioxygène était clivée en une seule étape. Des expériences de marquage à l'iode et de séquençage de la protéine ont ensuite permis de montrer, qu'un radical protéique se forme et qu'il est localisé sur une tyrosine liée par liaison covalente à l'histidine du site actif. La liaison entre ces deux résidus se formerait pendant la catalyse par réaction du radical tyrosyle sur l'histidine lors du premier turn-over.

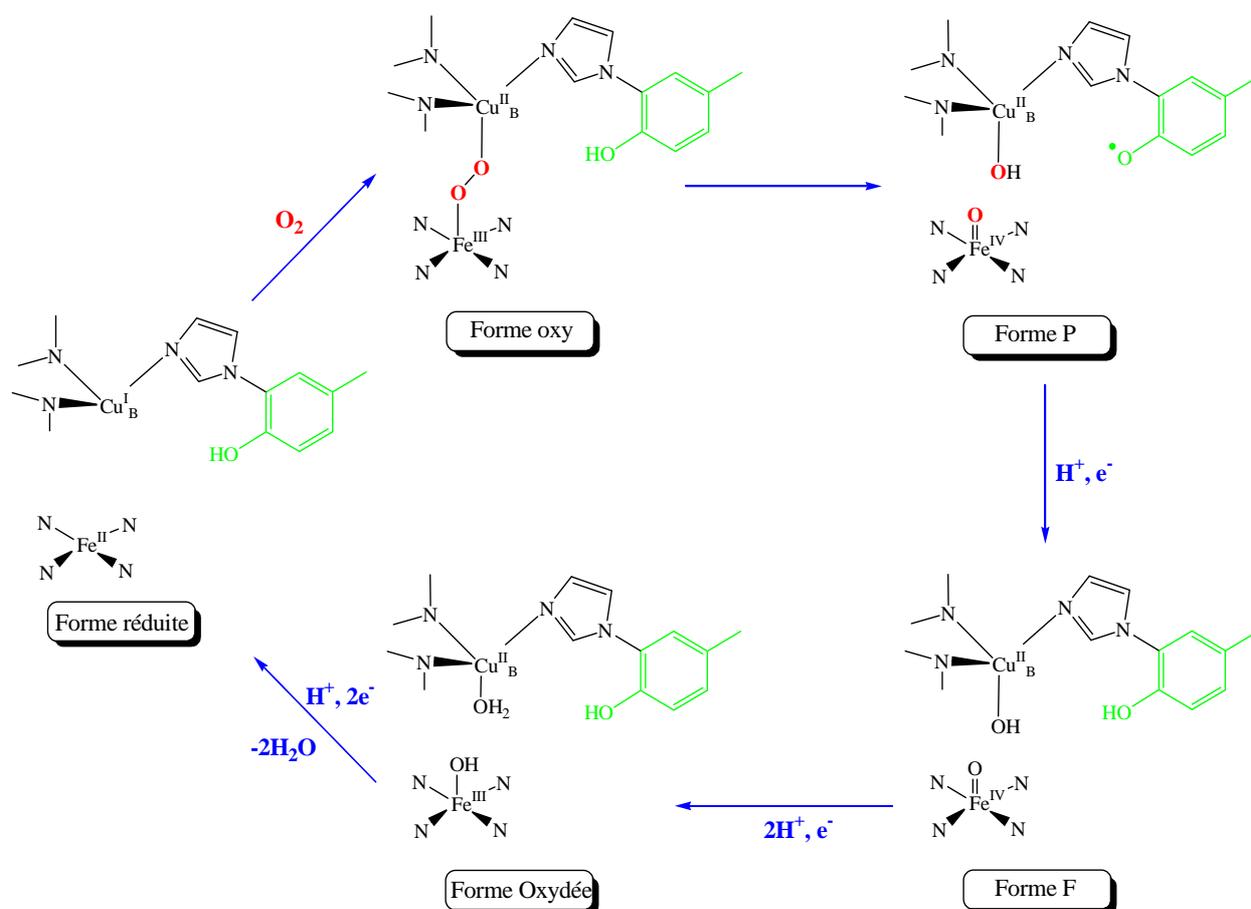


Figure 1- 11: Mécanisme de réduction du dioxygène en eau par la cytochrome c oxydase. D'après Chang 2004¹¹⁸.

Cette liaison servirait à maintenir la géométrie du site actif et à moduler les propriétés de la tyrosine, notamment en diminuant le pKa du groupe phénol, favorisant ainsi la libération d'un proton et la formation du radical tyrosyle. Ces résultats mis en commun avec des données d'autres groupes ont fourni la preuve que la paire Histidine-Tyrosine du site actif joue un rôle de cofacteur redox essentiel dans la catalyse de la CcO^{116-117,118-119,120,121,122}.

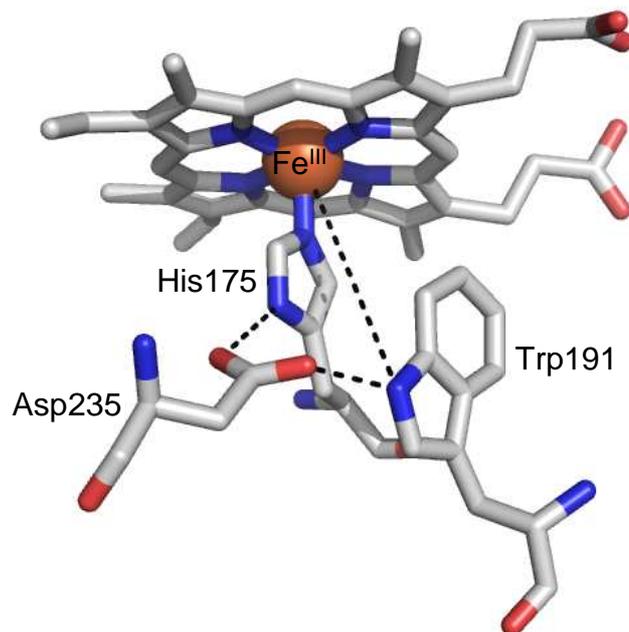
II.6-LA CYTOCHROME C PEROXYDASE.

La cytochrome *c* peroxydase (CcP) est une hémoprotéine, isolée d'une levure, qui catalyse l'oxydation de deux molécules de ferrocyclochrome *c* en ferricytochrome *c* et la réduction concomitante du peroxyde d'hydrogène en eau (figure 1-12).

Une propriété des peroxydases est la formation d'un état intermédiaire hautement oxydant, appelé composé I, susceptible d'oxyder divers substrats. Cet état intermédiaire provient de l'oxydation à deux électrons de l'enzyme natif par une molécule de peroxyde d'hydrogène, en oxydant le Fe(III) héminique en une espèce oxoferryle [Fe(IV)=O] et accompagné d'un radical. En général, ce radical se forme au niveau de la porphyrine. Cet intermédiaire est ensuite réduit pour régénérer la forme native de l'enzyme par deux réactions successives à un électron, *via* la formation d'un autre intermédiaire appelé composé II. Le composé II correspond à une espèce oxoferryle [Fe(IV)=O]¹²³. Toutefois, comme l'avait suggéré Yonetani *et coll.* en 1966¹²⁴, dans le cas de la CcP le composé I évolue vers la réduction du radical porphyrinique cationique par un amino-acide voisin.

Le signal observé en RPE à 9 GHz pour le composé I de la CcP est très axial et a pu être modélisé par un signal avec un couplage d'échange faible entre le radical tryptophanyle et l'espèce oxoferryle^{125,126}. Une telle distribution pour les couplages ferro- et antiferromagnétiques avait été proposée auparavant pour expliquer le signal RPE très large observé pour l'intermédiaire radical porphyrinique cationique dans le cas de la peroxydase de raifort¹²⁷, ainsi que pour le composé I de la catalase de *Micrococcus lysodeikticus*¹²⁸. Des informations structurales ont suggéré que les meilleurs candidats responsables du signal observé en spectroscopie RPE, étaient les résidus tryptophanes 151 et 191 et la méthionine 172. Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'éliminer le Trp151 et la Met172^{129,130,131}. En revanche, des études spectroscopiques sur le mutant W191F¹³² ont permis de montrer que ce dernier, comme attendu, forme un oxoferryle en présence de peroxyde d'hydrogène mais ne génère pas la formation du signal caractéristique observé dans le cas de l'enzyme sauvage. A la place, un signal correspondant à un radical porphyrinique cationique transitoire ($t_{1/2}=20$ ms) est détecté¹³³. Avec ce même mutant l'activité de la CcP vis-à-vis du Cyt *c* chute de 1000s^{-1} à 1s^{-1} et un radical tyrosyle est observé.

A



B

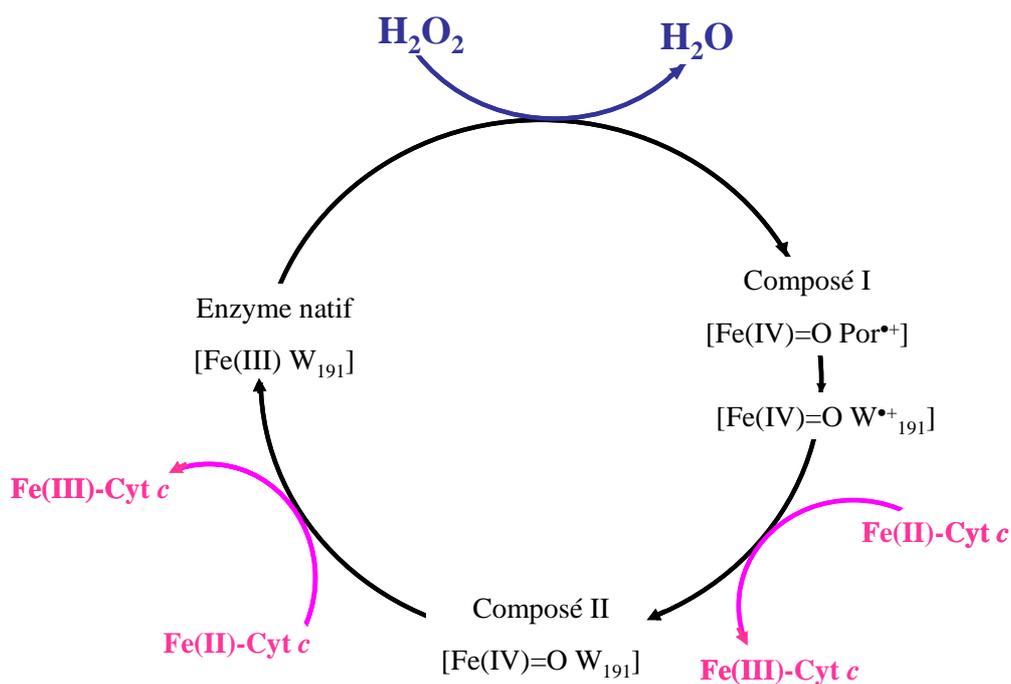


Figure 1- 12: (A) Structure du site actif de la cytochrome *c* peroxydase. D'après Pelletier et Kraut¹³⁶. Numéro PDB : 2CYP. (B) Cycle catalytique de la cytochrome *c* peroxydase.

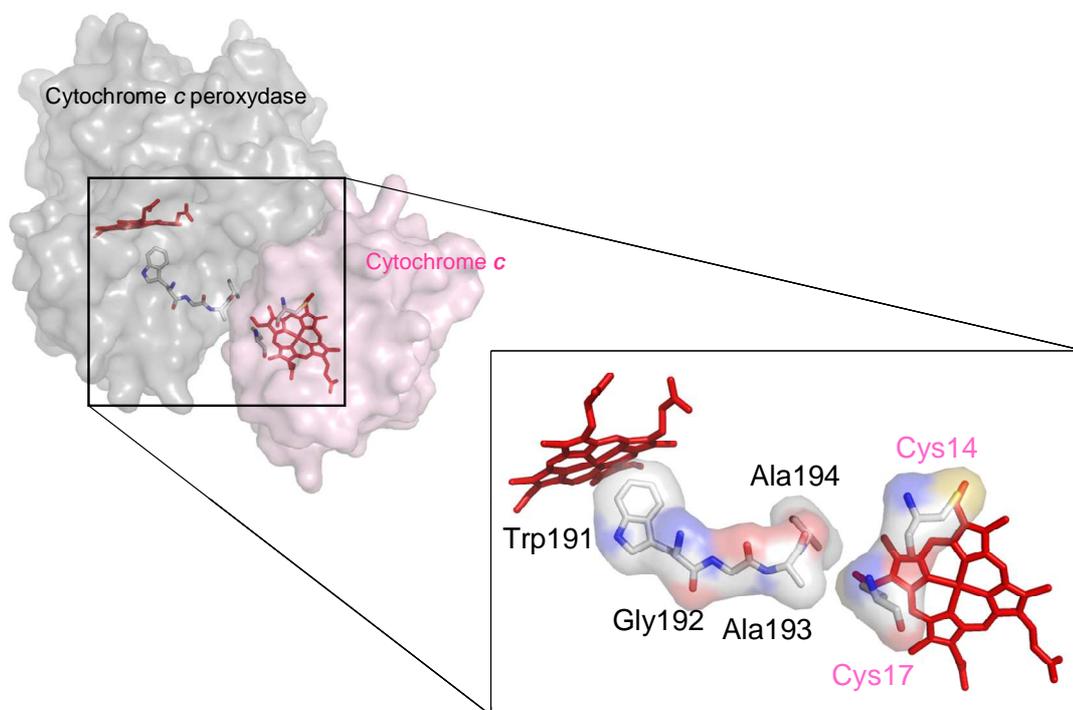


Figure 1- 13: Gauche : Structure de complexe CcP/Cyt *c* d'après Pelletier 1992¹³⁶. Numéro PDB : 2PCC. Droite: Chaîne de transfert d'électron proposée de l'hème du Cyt *c* (à droite sur chaque figure) à l'hème de la CcP (à gauche sur chaque figure). Les cystéines du cytochrome *c* en interaction avec l'hème sont également représentées.

Des études complémentaires de spectroscopie ENDOR ont de plus démontré que le radical est localisé sur un résidu tryptophane protoné. Millet et *coll.* ont montré qu'un électron est transféré directement au site radicalaire de la CcP dans le complexe CcP/Cyt *c* de levure mais également dans le complexe CcP/Cyt *c* de cœur de cheval^{134,135} et l'étude de la structure cristallographique du complexe CcP /Cyt *c* obtenue par Pelletier et Kraut¹³⁶ a mis en évidence qu'une courte chaîne d'acide aminé, impliquant le Trp191 (en contact de Van Der Waals avec l'hème de la CcP), la Gly192, l'Ala193 et l'Ala194, relie l'hème du cytochrome *c* à celui de la cytochrome *c* peroxydase (figure 1-13). Ceci confirme donc que le radical observé dans le cas de l'enzyme sauvage est formé sur le Trp191.

Le mécanisme de réduction du composé I en composé II et du composé II à l'enzyme natif de la CcP, n'est pas clairement établi. Contrairement à la peroxydase de raifort, ou d'autres peroxydases végétales, dans lesquelles la réduction à un électron du composé I conduit à la réduction du radical porphyrinique cationique, la réduction à un électron de l'espèce [Fe(IV)=O Trp^{•+}] de la CcP conduit à l'équilibre en solution entre les espèces [Fe(IV)=O TrpH] et [Fe(III) Trp^{•+}], cet équilibre dépendant du pH.

CONCLUSIONS

Les études des radicaux issus de l'oxydation des acides aminés, dans le cycle catalytique de certains enzymes, ont montré que les radicaux formés au sein d'une protéine possèdent des propriétés différentes de ceux formés en solution. Ils ont des durées de vie plus importantes et ne sont pas forcément liés aux dommages causés à la cellule. Ces radicaux protéiques sont essentiels pour la catalyse enzymatique car ils sont souvent responsables de l'activation du substrat.

Jusqu'à maintenant, les catalases n'ont jamais été considérées comme des protéines radicalaires car l'intermédiaire catalytique correspond à une espèce oxoferryle en interaction magnétique avec le radical cation porphyrinique cationique. Cependant en 1996, notre groupe a mis en évidence la formation d'un radical tyrosyle au sein de la catalase de foie de bœuf¹³⁷. Cette découverte implique de réexaminer le cycle catalytique des catalases, et dans cette optique de les considérer comme des protéines radicalaires.

Les catalase-peroxydases, quant à elles, sont des protéines qui ont été peu étudiées d'un point de vue intermédiaire radicalaire. Or, cette famille d'enzymes est particulièrement intéressante car les catalase-peroxydases sont considérées comme les ancêtres communs des catalases et des peroxydases. Comprendre leur mécanisme d'action par rapport au peroxyde d'hydrogène et leur spécificité vis-à-vis des différents substrats, nous permettra de mieux appréhender les différences de réactivité par rapport au peroxyde d'hydrogène des catalases et des peroxydases.

L'objectif de cette thèse est d'approfondir nos connaissances sur la nature des intermédiaires radicalaires formés chez ces deux familles d'enzymes ainsi que de comprendre le rôle que ces intermédiaires jouent dans l'activité enzymatique de ces protéines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. J. McCord, and I. Fridovich, The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide and oxygen, *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 6056-6063.
2. J. McCord, and I. Fridovich, The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome *c* reduction by a variety of electron carriers, *J. Biol. Chem.*, **1970**, *245*, 1374-1377.
3. H. Gray, and J. Winkler, Electron transfer in proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, 537-561.
4. J. Onuhic, Pathway analysis of protein electron-transfer reactions, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1992**, *21*, 349-377.
5. Y. Cha, C. Murray, and J. Klinman, Hydrogen tunneling in enzyme reactions, *Science*, **1989**, *243*, 1325-1330.
6. B. Bahnson, and J. Klinman, Hydrogen tunneling in Enzyme catalysis, *Methods Enzymol.*, **1995**, *249*, 373-397.
7. B. Bahnson, T. Colby, J. Chin, B. Goldstein, and J. Klinman, A link between protein structure and enzyme catalyzed hydrogen tunneling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 12797-12802.
8. J. Mayer, Hydrogen Atom Abstraction by Metal-oxo Complexes: Understanding the Anagomy with Organic Radical Reactions, *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 441-450.
9. A. Kohen, and J. Klinman, Hydrogen tunneling in biology, *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, R191-R198.
10. R. Cukier, Mechanism for Proton-Coupled Electron-Transfer Reactions, *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 2377-2381.
11. J. Fang, and S. Hammes-Schiffer, Proton-Coupled Electron-Transfer Reactions in solution: Molecular Dynamics with quantum transitions for model systems, *J. Chem. Phys.*, **1997**, *106*, 8442-8454.
12. B.-M. Sjöberg, and P. Reichard, Nature of the free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **1977**, *252*, 536-541.
13. V. Unkrig, F. A. Neugebauer, and J. Knappe, The free radical of pyruvate formate-lyase. Characterization by EPR spectroscopy and involvement in catalysis as studied with the substrate-analogue hypophosphite, *Eur. J. Biochem.*, **1989**, *184*, 723-728.
14. E. Mulliez, M. Fontecave, J. Gaillard, and P. Reichard, An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 2296-2299.
15. S. Licht, G. J. Gerfen, and J. Stubbe, Thiyl Radicals in ribonucleotide reductases, *Science*, **1996**, *271*, 477-481.
16. B. A. Barry, M. K. el-Deeb, P. O. Sandusky, and G. T. Babcock, Tyrosine radicals in Photosystem II and related model compounds. Characterization by isotopic labeling and EPR spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 20139-20143.
17. R. Karthein, R. Dietz, W. Nastainczyk, and H. H. Ruf, Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *171*, 313-320.
18. J. E. Huyett, P. E. Doan, R. Gurbiel, A. L. P. Houseman, M. Sivaraja, D. B. Goodin, and B. M. Hoffman, Compound ES of Cytochrome *c* Peroxidase contains a Trp π -cation radical: Characterization

- by continuous wave and pulsed Q-band External Nuclear Double Resonance Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 9033-9041.
19. D. M. Dooley, M. A. McGuirl, D. E. Brown, P. N. Turowski, W. S. McIntire, and P. F. Knowles, A Cu(I)-semiquinone state in substrate-reduced amine oxidases, *Nature*, **1991**, *349*, 262-264.
 20. M. M. Whittaker, and J. W. Whittaker, A tyrosine-derived free radical in apogalactose oxidase, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 9610-9613.
 21. W. S. McIntire, D. E. Wemmer, A. Chistiserdov, and M. E. Lidstrom, A new cofactor in a prokaryotic enzyme: tryptophan tryptophylquinone as the redox prosthetic group in methylamine dehydrogenase, *Science*, **1991**, *252*, 817-824.
 22. L. Y. Chen, F. S. Mathews, V. L. Davidson, E. G. Huizinga, F. M. Vellieux, J. A. Duine, and W. G. Hol, Crystallographic investigations of the tryptophan-derived cofactor in the quinoprotein ethylamine dehydrogenase, *FEBS Lett.*, **1991**, *287*, 163-166.
 23. J. Stubbe, and P. Riggs-Gelasco, Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase, *Trends Biochem. Sci.*, **1998**, *23*, 438-443.
 24. I. Vass, and S. Styring, pH-dependent charge equilibria between tyrosine-D and the S states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 830-839.
 25. J. M. Johnson, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, Redox activation of galactose oxidase: thin-layer electrochemical study, *Biochemistry*, **1985**, *24*, 1579-1585.
 26. J. Stubbe, and W. A. Van der Donk, Protein Radicals in Enzyme Catalysis, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 705-762.
 27. J. M. J. Bollinger, D. E. Edmondson, B. H. Huynh, J. Filley, J. R. Norton, and J. Stubbe, Mechanism of assembly of the tyrosyl-radical-dinuclear iron cluster cofactor of ribonucleotide reductase, *Science*, **1991**, *253*, 292-298.
 28. P. Nordlung, B.-M. Sjöberg, and H. Eklung, Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase, *Nature*, **1990**, *345*, 593-598.
 29. D. Cai, and J. Klinman, Evidence of a self-catalytic mechanism of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in yeast copper amine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 32039-32042.
 30. R. Matsuzaki, S. Suzuki, K. Yamaguchi, T. Fukui, and K. Tanizana, Spectroscopic studies on the mechanism of the 6-hydroxyDOPA quinone generation in bacterial monoamine oxidase, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4524-4530.
 31. M. R. Parsons, M. A. Convery, C. M. Wilmot, K. D. S. Yadav, V. Blakeley, A. S. Corner, S. E. V. Phillips, M. J. McPherson, and P. F. Knowles, Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution, *Structure*, **1995**, *3*, 1171-1184.
 32. C. E. Ruggiero, J. A. Smith, K. Tanizana, and D. M. Dooley, Mechanism studies of TOPA Quinone biogenesis in phenylethylamine oxidase, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1953-1959.
 33. M. M. Whittaker, and J. W. Whittaker, The active site of galactose oxidase, *J. Biol. Chem.*, **1988**, *263*, 6074-6080.
 34. N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav, and P. F. Knowles, Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase, *Nature*, **1991**, *350*, 87-90.
 35. C. Wei, R. J. Kulmacz, and A.-L. Tsai, Comparison of branched-chain and tightly coupled reaction mechanisms for prostaglandin H synthase, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 8499-8512.

36. S. S. Licht, S. Booker, and J. Stubbe, Studies on the catalysis of carbon-cobalt bond homolysis by ribonucleoside triphosphate reductase: evidence for concerted carbon-cobalt bond homolysis and thiyl radical formation, *Biochemistry*, **1999**, 38, 1221-1233.
37. C. W. Hoganson, N. Lydais-Simantiris, X.-S. Tang, C. Tommos, K. Warncke, G. T. Babcock, A. Diner, J. McCracken, and S. Styring, A hydrogen-atom abstraction model for the function of Y_Z in photosynthetic oxygen evolution, *Photosynth. Res.*, **1995**, 46, 177-184.
38. R. J. Kulmacz, Prostaglandin H synthase and hydroperoxides: peroxidase reaction and inactivation kinetics, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1986**, 249, 273-285.
39. J. A. Hamilton, R. Yamada, R. L. Blakley, H. P. C. Hogenkamp, F. D. Looney, and M. E. Winfield, Cobamides and ribonucleotide reduction.VIII. Cob(II)alamin as a sensitive probe for the active center of ribonucleotide reductase, *Biochemistry*, **1971**, 10, 347-355.
40. R. Yamada, Y. Tamao, and R. L. Blakley, Cobamides and ribonucleotide reduction. Degradation of 5'-deoxyadenosylcobalamin by ribonucleoside triphosphate reductase and binding of degradation products to the active center, *Biochemistry*, **1971**, 10, 3959-3968.
41. F. Wu, L. J. Katsir, M. Seavy, and B. J. Gaffney, Role of radical formation of tyrosine 193 in the allene oxide synthase domain of a lipoxygenase-AOS fusion protein from coral, *Biochemistry*, **2003**, 42, 6871-6880.
42. P. Reichard, From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductase?, *Science*, **1993**, 260, 1773-1777.
43. J. Stubbe, and W. A. Van der Donk, Ribonucleotide reductases: radical enzymes with suicidal tendencies, *Chem. Biol.*, **1995**, 2, 793-801.
44. P. Reichard, and B. Estborn, Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides, *J. Biol. Chem.*, **1950**, 188, 839-846.
45. R. L. Blakley, and H. A. Barker, Cobamide stimulation of the reduction of ribotides to deoxyribotides in *Lactobacillus leichmannii*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1964**, 16, 391-397.
46. W. Beck, and J. Hardy, Requirement of ribonucleotide reductase for cobamide coenzyme, a product of ribosomal activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1965**, 54, 286-293.
47. T. Barlow, Evidence for a new ribonucleotide reductase in anaerobic *E. coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 155, 747-753.
48. M. Fontecave, R. Eliasson, and P. Reichard, Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 2147-2151.
49. P. Reichard, The evolution of ribonucleotide reduction, *Trends Biochem. Sci.*, **1997**, 22, 81-85.
50. J. Stubbe, Ribonucleotide reductases: amazing and confusing, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 5329-5332.
51. J. B. Lynch, C. Juarez-Garcia, E. Münck, and L. J. Que, Mössbauer and EPR studies of the binuclear iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. A new iron-to-protein stoichiometry, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 8091-8096.
52. B.-M. Sjöberg, T. M. Loehr, and J. Sanders-Loehr, Raman spectral evidence for a μ -oxo bridge in the binuclear iron center of ribonucleotide reductase, *Biochemistry*, **1982**, 21, 96-102.
53. M. Sahlin, L. Peterson, A. Gräslund, A. Ehrenberg, B.-M. Sjöberg, and L. Thelander, Magnetic interaction between the tyrosyl free radical and antiferromagnetically coupled iron center in ribonucleotide reductase, *Biochemistry*, **1987**, 26, 5541-5548.
54. L. Peterson, A. Gräslund, A. Ehrenberg, B.-M. Sjöberg, and P. Reichard, The iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255, 6706-6712.

55. C. L. Atkin, L. Thelander, P. Reichard, and G. Lang, Iron and free radical in ribonucleotide reductase exchange of iron and Mössbauer spectroscopy of the protein B2 subunit of the *Escherichia coli* enzyme, *J. Biol. Chem.*, **1973**, 248, 7464-7472.
56. B.-M. Sjöberg, P. Reichard, A. Gräslund, and A. Ehrenberg, The tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 6863-6865.
57. A. Ehrenberg, and P. Reichard, Electron Spin Resonance of the iron-containing protein B2 from Ribonucleotide Reductase, *J. Biol. Chem.*, **1972**, 247, 3485-3488.
58. M. Sahlin, A. Gräslund, A. Ehrenberg, and B.-M. Sjöberg, Structure of the tyrosyl radical in bacteriophage T4-induced ribonucleotide reductase, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 366-369.
59. M. E. Andersson, M. Högbom, A. Rinaldo-Matthis, K. K. Andersson, B.-M. Sjöberg, and P. Nordlung, The crystal structure of an azide complex of the diferrous R2 subunit of ribonucleotide reductase displays a novel carboxylate shift with important mechanistic implications for diiron-catalyzed oxygen activation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2346-2352.
60. V. L. MacMurdo, H. Zheng, and L. J. Que, Model for the cofactor formation reaction of *E. coli* ribonucleotide reductase. From diiron(II) to an Fe^{III}Fe^{IV} species via peroxo intermediate, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 2254-2255.
61. J. M. J. Bollinger, C. Krebs, A. Vicol, S. Chen, B. A. Ley, D. E. Edmondson, and B. H. Huynh, Engineering the diiron site of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2 to accumulate an intermediate similar to H_{peroxo}, the putative peroxodiiron(III) complex from methane monooxygenase catalytic cycle, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 1094-1095.
62. P. Moënné-Loccoz, J. Baldwin, B. A. Ley, T. M. Loehr, and J. M. J. Bollinger, O₂ activation by non-heme diiron proteins: identification of a symmetric μ -1,2-peroxide in a mutant of ribonucleotide reductase, *Biochemistry*, **1998**, 37, 14659-14663.
63. P. Riggs-Gelasco, L. Shu, S. Chen, D. Burdi, B. H. Huynh, L. J. Que, and J. Stubbe, EXFAS characterization of the intermediate X generated during the assembly of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase R2 diferric tyrosyl radical cofactor, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 849-860.
64. B. E. Sturgeon, D. Burdi, S. Chen, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, J. Stubbe, and B. M. Hoffman, Reconsideration of X, the diiron intermediate formed during cofactor assembly in *E. coli* ribonucleotide reductase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 7551-7557.
65. J. Baldwin, C. Krebs, B. A. Ley, D. E. Edmondson, B. H. Huynh, and J. M. J. Bollinger, Mechanism of rapid electron transfer during oxygen activation in the R2 subunit of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. 1. Evidence for a transient tryptophan radical, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12195-12206.
66. C. Krebs, S. Chen, J. Baldwin, B. A. Ley, U. Patel, D. E. Edmondson, B. H. Huynh, and J. M. J. Bollinger, Mechanism of rapid electron transfer during oxygen activation in the R2 subunit of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. 2. Evidence for and consequences of blocked electron transfer in the W48F variant, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12207-12219.
67. U. Uhling, and H. Eklung, Structure of ribonucleotide reductase protein R1, *Nature*, **1994**, 370, 533-539.
68. B.-M. Sjöberg, The ribonucleotide reductase jigsaw puzzle: a large piece falls into place, *Structure*, **1994**, 2, 793-796.
69. C. S. Yee, M. R. Seyedsayamdost, M. C. Y. Chang, D. G. Nocera, and J. Stubbe, Generation of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by intein chemistry: insertion of 3-Nitrotyrosine at residue 356 as a probe of the radical initiation process, *Biochemistry*, **2003**, 42, 14541-14552.
70. M. R. Seyedsayamdost, and J. Stubbe, Site-specific replacement of Y₃₅₆ with 3,4-Dihydroxyphenylalanine in the β_2 subunit of *E. coli* ribonucleotide reductase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 2522-2523.

71. M. R. Seyedsayamdost, C. S. Yee, S. Y. Reece, D. G. Nocera, and J. Stubbe, pH rate profiles of the F_nY₃₅₆-R2s (n= 2, 3, 4) in *Escherichia coli* ribonucleotide reductase: evidence that Y₃₅₆ is a redox-active amino acid along the radical propagation pathway, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 1562-1568.
72. W. Buckel, and B. T. Golding, Radical species in catalytic pathways of enzymes from anaerobes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1999**, *22*, 523-541.
73. P. Frey, Radical Mechanisms of enzymatic catalysis, *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, 121-148.
74. A. F. Wagner, P. Frey, F. A. Neugebauer, W. Schafer, and J. Knappe, The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 996-1000.
75. J. Knappe, and A. F. Wagner, Stable glycy radical from pyruvate formate-lyase and ribonucleotide reductase(III), *Adv. Protein Chem.*, **2001**, *58*, 277-315.
76. H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, and N. E. Miller, Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanism: functional characterization using new analysis and information visualization methods, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, 1097-1106.
77. L. Yu, M. Blaser, P. I. Andrei, A. J. Pierik, and T. Selmer, 4-hydroxyphenylacetate decarboxylases: properties of a novel subclass of glycy radical enzyme systems, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 9584-9592.
78. E. S. Huyser, and R. M. Kellog, Free-radical cleavage of β -hydroxy thio ethers to ketones and mercaptans, *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 3366-3369.
79. J. W. Whittaker, Galactose oxidase, *Adv. Prot. Chem.*, **2002**, *60*, 1-49.
80. M. M. Whittaker, P. J. Kersten, N. Nobuhumi, J. Sanders-Loehr, E. S. Schweizer, and J. W. Whittaker, Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper oxidase, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 681-687.
81. N. Ito, S. E. V. Phillips, K. D. S. Yadav, and P. F. Knowles, Crystal structure of a free radical enzyme galactose oxidase, *J. Mol. Biol.*, **1994**, *238*, 794-814.
82. J. W. Whittaker, Free radical catalysis by galactose oxidase, *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 2347-2363.
83. M. M. Whittaker, D. P. Ballou, and J. W. Whittaker, Kinetic isotope effects as probes of the mechanism of galactose oxidase, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 8426-8436.
84. M. M. Whittaker, C. A. Ekberg, J. Peterson, M. S. Sendova, E. P. Day, and J. W. Whittaker, Spectroscopic and magnetochemical studies on the active site copper complex in galactose oxidase, *J. Mol. Cat. B.: Enzymatic.*, **2000**, *8*, 3-15.
85. W. L. Smith, and L. J. Marnett, Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, *1083*, 1-17.
86. W. L. Smith, T. E. Eling, R. J. Kulmacz, L. J. Marnett, and A.-L. Tsai, Tyrosyl radicals and their role in hydroxide-dependent activation and inactivation of prostaglandin endoperoxide synthase, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 3-7.
87. W. L. Smith, R. M. Garavito, and D. L. DeWitt, Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenases)-1 and -2, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 33157-33160.
88. W. L. Smith, D. L. DeWitt, and R. M. Garavito, Cyclooxygenase: structural, cellular and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, *69*, 145-182.
89. A.-L. Tsai, G. Wu, G. Palmer, B. Bambai, J. A. Koehn, P. J. Marshall, and R. J. Kulmacz, Rapid kinetics of tyrosyl radical formation and heme redox state changes in protagladin H synthase-1 and -2, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 21695-21700.

90. R. Dietz, W. Nastainczyk, and H. H. Ruf, Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G₂, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *171*, 321-328.
91. A.-L. Tsai, J. Richard, R. J. Kulmacz, and G. Palmer, Spectroscopic evidence for reaction of prostaglandin H synthase-1 tyrosyl radical with arachidonic acid, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 10503-10508.
92. A.-L. Tsai, G. Palmer, and R. J. Kulmacz, Prostaglandin H synthase. Kinetics of tyrosyl radical formation and of cyclooxygenase catalysis, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 17753-17759.
93. A.-L. Tsai, G. Palmer, G. Xiao, D. C. Swinney, and R. J. Kulmacz, Structural characterization of arachidonyl radicals formed by prostaglandin H synthase-2 and prostaglandin H synthase-1 reconstituted with manganese protoporphyrin IX, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 3888-3894.
94. L. C. Hsi, C. W. Hoganson, G. T. Babcock, and W. L. Smith, Characterization of a tyrosyl radical in prostaglandin endoperoxide synthase-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *202*, 1592-1598.
95. V. Koshkin, and H. B. Dunford, Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1430*, 341-348.
95. W. Shi, C. W. Hoganson, M. Espe, C. J. Bender, G. T. Babcock, G. Palmer, R. J. Kulmacz and A. Tsai, Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase 1, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 4112-4121.
96. K. Mizuno, S. Yamamoto, and W. E. Lands, Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities, *Prostaglandins*, **1982**, *23*, 743-757.
97. G. Lassman, R. Odenwaller, J. F. Curtis, J. A. DeGray, R. P. Mason, L. J. Marnett, and T. E. Eling, Electron Spin Resonance investigation of tyrosyl radicals of prostaglandin H synthase, *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 20045-20055.
98. J. A. DeGray, G. Lassman, J. F. Curtis, T. A. Kennedy, L. J. Marnett, T. E. Eling, and R. P. Mason, Spectral analysis of the protein-derived tyrosyl radicals from prostaglandin H synthase, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 23583-23588.
99. A.-L. Tsai, G. Wu, and R. J. Kulmacz, Stoichiometry of the interaction of prostaglandin H synthase with substrates, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 13085-13094.
100. A.-L. Tsai, L. C. Hsi, R. J. Kulmacz, G. Palmer, and W. L. Smith, Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 5085-5091.
101. L. C. Hsi, C. W. Hoganson, G. T. Babcock, R. M. Garavito, and W. L. Smith, An examination of the source of the tyrosyl radical in ovine prostaglandin endoperoxide synthase-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *207*, 652-660.
102. T. Shimokawa, R. J. Kulmacz, D. L. DeWitt, and W. L. Smith, Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 20073-20076.
103. G. T. Babcock, B. A. Barry, R. J. Debus, C. W. Hoganson, M. Atamian, L. McIntosh, I. Sithole, and C. F. Yocum, Water oxidation in photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 9557-9565.
104. D. F. Ghanotakis, and C. F. Yocum, Photosystem II and the oxygen-evolving complex, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1990**, *41*, 255-276.
105. A. F. Miller, and G. W. Brudvig, A guide to Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy of Photosystem II membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, *1056*, 1-18.

106. R. J. Debus, B. A. Barry, I. Sithole, G. T. Babcock, and L. McIntosh, Directed mutagenesis indicates that the donor to P₆₈₀⁺ in Photosystem II is tyrosine-161 of the D₁ polypeptide, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 9071-9074.
107. J. G. Metz, P. J. Nixon, M. Rögner, G. W. Brudvig, and B. A. Diner, Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: evidence that the tyrosine-161 is the redox component Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P₆₈₀, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 6960-6969.
108. R. J. Debus, B. A. Barry, G. T. Babcock, and L. McIntosh, Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 427-430.
109. W. F. Vermaas, A. W. Rutherford, and O. Hansson, Site-directed mutagenesis in Photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Donor D is a tyrosine residue in the D₂ protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 8477-8481.
110. C. W. Hoganson, and G. T. Babcock, A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis, *Science*, **1997**, *277*, 1953-1956.
111. A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, and P. Orth, Crystal structure of Photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3,8 Å resolution, *Nature*, **2001**, *409*, 739-743.
112. Y. Yachandra, Structure of the manganese complex in Photosystem II: insights from X-ray spectroscopy, *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.*, **2002**, *357*, 1347-1358.
113. A. Boussac, and A. W. Rutherford, Ca²⁺ binding to the oxygen evolving enzyme varies with the redox state of the Mn cluster, *FEBS Lett.*, **1988**, *236*, 432-436.
114. A. W. Rutherford, A. Boussac, and P. Faller, The stable tyrosyl radical in Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1655*, 222-230.
115. S. Fergusson-Miller, and G. T. Babcock, Heme/Copper terminal oxidases, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 2889-2907.
116. G. T. Babcock, How oxygen is activated and reduced in respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 12971-12973.
117. D. A. Proshlyakov, M. A. Pressler, and G. T. Babcock, Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 8020-8025.
118. D. A. Proshlyakov, M. A. Pressler, C. DeMaso, J. F. Leykam, D. L. DeWitt, and G. T. Babcock, Oxygen activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244, *Science*, **2000**, *290*, 1588-1591.
118. C. J. Chang, M. C.Y. Chang, N. H. Damrauer and D. G. Nocera, Proton-coupled electron transfer: a unifying mechanism for biological charge transport, amino acid radical initiation and propagation, and bond making/breaking reactions of water and oxygen, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1655*, 13-28.
119. R. B. Gennis, Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1365*, 241-245.
120. A. Sucheta, I. Szundi, and O. Einarsdottir, Intermediates in the reaction of fully reduced Cytochrome *c* Oxidase with dioxygen, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 17905-17914.
121. F. MacMillan, A. Kannt, J. Behr, T. Prisner, and H. Michel, Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of Cytochrome *c* Oxydase with hydrogen peroxide, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 9179-9184.
122. T. Uchida, T. Mogi, and T. Kitagawa, Resonance Raman studies of oxo intermediates in the reaction of Cytochrome *b₀* with hydrogen peroxide, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 6669-6678.
123. G. Lang, K. Spartalian, and T. Yonetani, Mössbauer spectroscopic study of compound ES of Cytochrome *c* peroxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *451*, 250-258.

124. T. Yonetani, H. Schleyer, and A. Ehrenberg, Studies on Cytochrome *c* Peroxidase. VII. Electron Paramagnetic Resonance Absorption of the enzyme and complex ES in dissolved and crystalline forms, *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 3240-3243.
125. M. Sivaraja, D. B. Goodin, M. Smith, and B. M. Hoffman, Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in Cytochrome *c* Peroxidase compound ES, *Science*, **1989**, *245*, 738-740.
126. A. L. P. Houseman, P. E. Doan, D. B. Goodin, and B. M. Hoffman, Comprehensive explanation of the anomalous EPR spectra of wild-type and mutant Cytochrome *c* Peroxidase compound ES, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 4430-4443.
127. C. E. Schulz, P. W. Devaney, H. Winkler, P. G. Debrunner, P. E. Doan, R. Chiang, R. Rutter, and L. P. Hager, Horseradish peroxidase compound I: evidence for spin coupling between the heme iron and a 'free' radical, *FEBS Lett.*, **1979**, *130*, 102-105.
128. M. J. Benecky, J. E. Frew, N. Scowen, P. Jones, and B. M. Hoffman, EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 11929-11933.
129. D. B. Goodin, A. G. Mauk, and M. Smith, Studies of the radical species in compound ES of Cytochrome *c* Peroxidase altered by site-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 1295-1299.
130. L. A. Fishel, J. E. Villafranca, J. M. Mauro, and J. Kraut, Yeast Cytochrome *c* Peroxidase: Mutagenesis and expression in *Escherichia coli* show Tryptophan 51 is not the Radical Site in Compound I, *Biochemistry*, **1987**, *26*, 351-360.
131. D. B. Goodin, A. G. Mauk, and M. Smith, The peroxide complex of Yeast Cytochrome *c* Peroxidase contains two distinct radical species, neither of which resides at Methionine 172 or Tryptophan 51, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 7719-7724.
132. J. M. Mauro, L. A. Fishel, J. T. Hazzard, T. E. Meyer, T. Gordon, M. A. Cusanovich, and J. Kraut, Tryptophan191Phenylalanine, a proximal-side mutation in Yeast Cytochrome *c* Peroxidase that strongly affects the kinetics of ferrocycytochrome *c* oxidation, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 6243-6256.
133. J. E. Erman, L. B. Vitello, J. M. Mauro, and J. Kraut, Detection of an oxoferryl π -cation-radical intermediate in the reaction between hydrogen peroxide and a mutant Yeast Cytochrome *c* Peroxidase. Evidence for Tryptophan-191 involvement in the radical site of compound I, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 7992-7995.
134. L. Geren, S. Hahm, B. Durham, and F. Millet, Photoinduced electron transfer between Cytochrome *c* Peroxidase and Yeast Cytochrome *c* labeled at Cys102 with (4-bromomethyl-4'-Methylbipyridine)[bis(bispyridine)]ruthenium²⁺, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 9450-9457.
135. S. Hahm, B. Durham, and F. Millet, Photoinduced electron transfer between Cytochrome *c* Peroxidase and Horse Cytochrome *c* labeled at specific lysines with (dicarboxybipyridine)(bisbipyridine) ruthenium (II), *Biochemistry*, **1992**, *31*, 3472-3477.
136. H. Pelletier, and J. Kraut, Crystal structure of a complex between Electron transfer partners, Cytochrome *c* Peroxidase and Cytochrome *c*, *Science*, **1992**, *258*, 1748-1755.
137. A. Ivancich, H.-M. Jouve, and J. Gaillard, EPR Evidence for a Tyrosyl Radical Intermediate in Bovine Liver Catalase., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 12852-12853.

CHAPITRE 2

APPROCHE EXPERIMENTALE : SPECTROSCOPIE DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE ET SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ELECTRONIQUE UV-VISIBLE

INTRODUCTION

Ce travail de thèse porte sur l'étude des transferts d'électron mis en jeu lors du cycle catalytique des catalases et des catalases-peroxydases. Notre objectif est de déterminer d'une part la structure électronique des espèces radicalaires formées par ces protéines et d'autre part les paramètres expérimentaux qui stabilisent ces espèces. L'approche méthodologique choisie a donc été d'utiliser des techniques spectroscopiques et spectrométriques adaptées à l'étude de telles espèces, à courte durée de vie.

L'utilisation de la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) permet, entre autre, de caractériser, spécifiquement les espèces radicalaires ainsi que de sonder l'environnement de Fe(III) héminique.

La spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible a été utilisée afin de contrôler l'état redox de l'atome de fer héminique. En effet, l'exploitation des spectres d'absorption électronique permet d'obtenir le degré d'oxydation de l'atome de fer grâce à des bandes d'absorption caractéristiques. En particulier, la spectrophotométrie UV-visible permet de quantifier la formation de l'espèce oxoferryle, qui est silencieuse en spectroscopie RPE. Nous avons également utilisé la spectroscopie d'absorption électronique UV-visible à mélange rapide (Stopped-flow). Cette technique nous a permis d'obtenir les spectres d'absorption électronique UV-visible dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées en spectroscopie RPE et ainsi de comparer les résultats obtenus avec ces deux techniques.

I. LA SPECTROSCOPIE DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE).

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une spectroscopie d'absorption d'énergie qui a beaucoup de points communs avec la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ces deux techniques sont basées sur l'interaction entre les moments magnétiques présents dans la matière et une onde électromagnétique. Dans le cas de la RMN, les moments magnétiques sont associés aux noyaux, dans le cas de la RPE, aux électrons.

Tout matériau montre une aimantation quand il est soumis à de forts champs magnétiques. Les matériaux sont classés selon leurs propriétés de magnétisation en trois catégories : les matériaux diamagnétiques, les matériaux paramagnétiques et les matériaux ferromagnétiques.

Les matériaux diamagnétiques, de susceptibilité magnétique χ négative, développent un moment magnétique dans la direction opposée au champ magnétique \vec{B} et sont repoussés par un aimant. Dans les matériaux diamagnétiques, il y a compensation d'un spin électronique par un autre et le moment magnétique total est donc nul.

Les matériaux paramagnétiques, de susceptibilité magnétique χ positive, réagissent de manière inverse aux matériaux diamagnétiques. Le paramagnétisme repose sur l'existence d'un moment magnétique intrinsèque des électrons (particules avec spin). Quand les électrons dans un atome ne sont pas couplés en paires de spins opposés, l'atome a un dipôle magnétique total. Dans le cas d'un très grand nombre d'atomes, ces dipôles sont orientés au hasard en raison du mouvement thermique. Les champs magnétiques des dipôles élémentaires se compensent et le corps n'a pas de champ magnétique résultant. Si ces matériaux sont placés dans un champ magnétique, les atomes s'alignent plus ou moins avec le champ extérieur et le corps s'aimante. L'aimantation cesse dès que le champ extérieur est supprimé.

Le ferromagnétisme est la propriété qu'ont certains corps de s'aimanter très fortement sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, et pour certains (les aimants, matériaux magnétiques durs) de garder une aimantation importante même après la disparition du champ extérieur.

La RPE est un puissant moyen d'investigation des systèmes paramagnétiques, c'est-à-dire ayant des électrons non appariés tels que les sels et les complexes de métaux de transition, les radicaux, etc. Les renseignements fournis par la RPE concernent la structure électronique et géométrique des systèmes étudiés, leur comportement dynamique, les

mécanismes de réaction, etc. Sa sensibilité est telle que, des radicaux ou des ions paramagnétiques peuvent être utilisés comme sondes dans des systèmes diamagnétiques, sans pour autant perturber ces systèmes (techniques de marquage de spin). On peut alors réaliser des études de solvation, des études de mécanismes de transferts dans les systèmes biologiques, des études conformationnelles de polymères, etc.

Comparée à la RMN, la RPE est une technique beaucoup plus sensible (facteur 1000-2000), mais l'interprétation des spectres est plus délicate, notamment à cause des effets d'anisotropie et à cause du couplage entre les moments de spin électronique et orbital.

***I.1-LES PRINCIPES FONDAMENTAUX DE LA SPECTROSCOPIE RPE.*^{1,2,3,4,5,6}**

I.1-1 Généralités.

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) repose sur l'interaction entre les moments magnétiques électroniques présents dans la matière et une onde électromagnétique. La gamme de fréquence électromagnétique absorbée va de 1 à 500 GHz. Toute onde électromagnétique peut être considérée comme un champ électrique \vec{E}_1 et un champ magnétique \vec{B}_1 perpendiculaires entre eux et à la direction de propagation de l'onde. \vec{E}_1 et \vec{B}_1 oscillent à la fréquence ν . Pour la plupart des spectroscopies, c'est le champ électrique \vec{E}_1 qui interagit avec la matière. Pour qu'une absorption ait lieu, deux conditions doivent être satisfaites :

- 1) Le quantum d'énergie $h\nu$ associé à la radiation doit coïncider exactement avec l'écart énergétique entre deux niveaux.
- 2) Le champ électrique \vec{E}_1 doit pouvoir interagir avec un dipôle (ou un multipôle) électrique.

Dans le cas de spectroscopies de résonance magnétique, c'est le champ magnétique \vec{B}_1 de l'onde électromagnétique qui est impliqué. La deuxième condition se réécrit donc : 2) le champ magnétique \vec{B}_1 doit pouvoir interagir avec un dipôle (ou un multipôle) magnétique.

Cette condition (existence d'un dipôle) est réalisée pour les molécules possédant un moment magnétique permanent en l'absence de champ magnétique, il s'agit des systèmes paramagnétiques ou ferromagnétiques. Pour révéler le paramagnétisme des molécules il est

nécessaire d'appliquer un champ magnétique externe, aussi appelé statique, \vec{B}_0 . Celui-ci permet d'aligner les moments magnétiques au sein de l'échantillon. La spectroscopie RPE est basée sur l'absorption d'énergie par le système étudié lors de l'application de ce champ magnétique.

Ainsi, la RPE s'intéresse à des molécules paramagnétiques placées dans un champ magnétique extérieur \vec{B}_0 . Les informations obtenues sont déduites du spectre d'absorption de l'onde électromagnétique excitatrice. Pour des raisons techniques, la fréquence ν de l'onde électromagnétique appartient au domaine des micro-ondes et est fixée. Le balayage s'effectue en champ magnétique (*i.e.* c'est le champ \vec{B}_0 qui varie). Les raies observées en RPE sont souvent larges et parfois difficiles à distinguer. Pour contourner cet inconvénient, le signal enregistré correspond à la dérivée première de l'absorption.

I.1-2 L'effet Zeeman isotrope

La transition RPE est basée sur une transition entre deux niveaux Zeeman. Les électrons non appariés sont des systèmes quantiques et, en mécanique quantique, on ne peut raisonner que sur des vecteurs. De façon générale, on peut écrire :

$$\hat{H}|\Psi_i\rangle = E_i|\Psi_i\rangle \quad \text{Equation 2-1}$$

\hat{H} désigne l'Hamiltonien du système, E_i est l'observable associé à l'énergie du système : c'est une valeur propre (réelle) de l'Hamiltonien \hat{H} , $|\Psi_i\rangle$ est une fonction qui caractérise le système lorsqu'il possède l'énergie E_i : c'est la fonction propre de l'Hamiltonien \hat{H} associé à l'énergie E_i .

La théorie de la RPE fait donc appel aux équations fondamentales de la mécanique quantique :

$$\begin{aligned} \hat{S}^2|S, m_s\rangle &= S(S+1)|S, m_s\rangle \\ \hat{S}_z|S, m_s\rangle &= m_s|S, m_s\rangle \end{aligned} \quad \text{Equation 2-2}$$

où \hat{S} est l'opérateur réduit associé au spin électronique S , \hat{S}_z la composante de \hat{S} selon l'axe de quantification z , et m_s la projection du spin électronique sur cet axe ($-S \leq m_s \leq S$, par saut d'une unité).

Le cas le plus simple étudié en RPE est celui d'un système de spin électronique $S=1/2$. En absence de champ magnétique externe, les deux niveaux correspondant aux projections $m_s = \pm 1/2$ sont dégénérés. L'électron non apparié se trouve à un niveau énergétique E_0 (les spins sont orientés de façon aléatoire). En présence du champ magnétique \vec{B}_0 , on observe une levée de dégénérescence, due à l'interaction des dipôles magnétiques avec le champ \vec{B}_0 . Le spin électronique, de valeur $S=1/2$ ne peut donc connaître que $2S+1=2$ niveaux énergétiques possibles : soit les spins électroniques s'orientent de manière parallèle au champ (dans le même sens) ; soit ils s'orientent de manière antiparallèle. Dans ce cas, seuls deux niveaux énergétiques peuvent être décrits : le niveau N_1 ($m_s=-1/2$) le plus stable et le niveau N_2 ($m_s=1/2$) d'énergie plus élevée (figure 2-1).

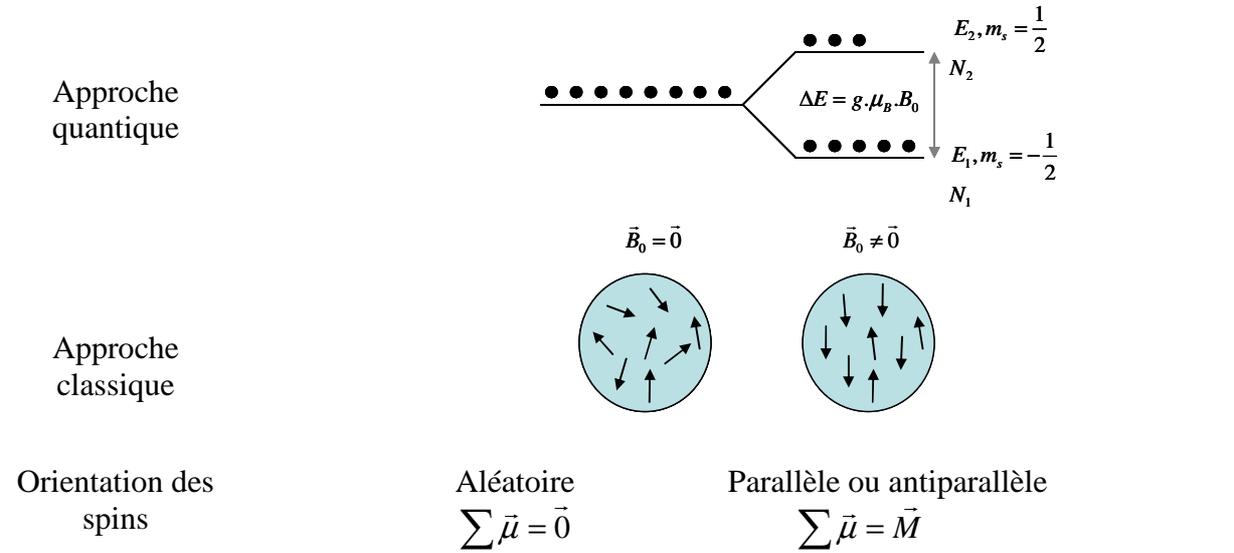


Figure 2- 1: Organisation des niveaux d'énergie pour un spin électronique $s=1/2$ en présence d'un champ magnétique

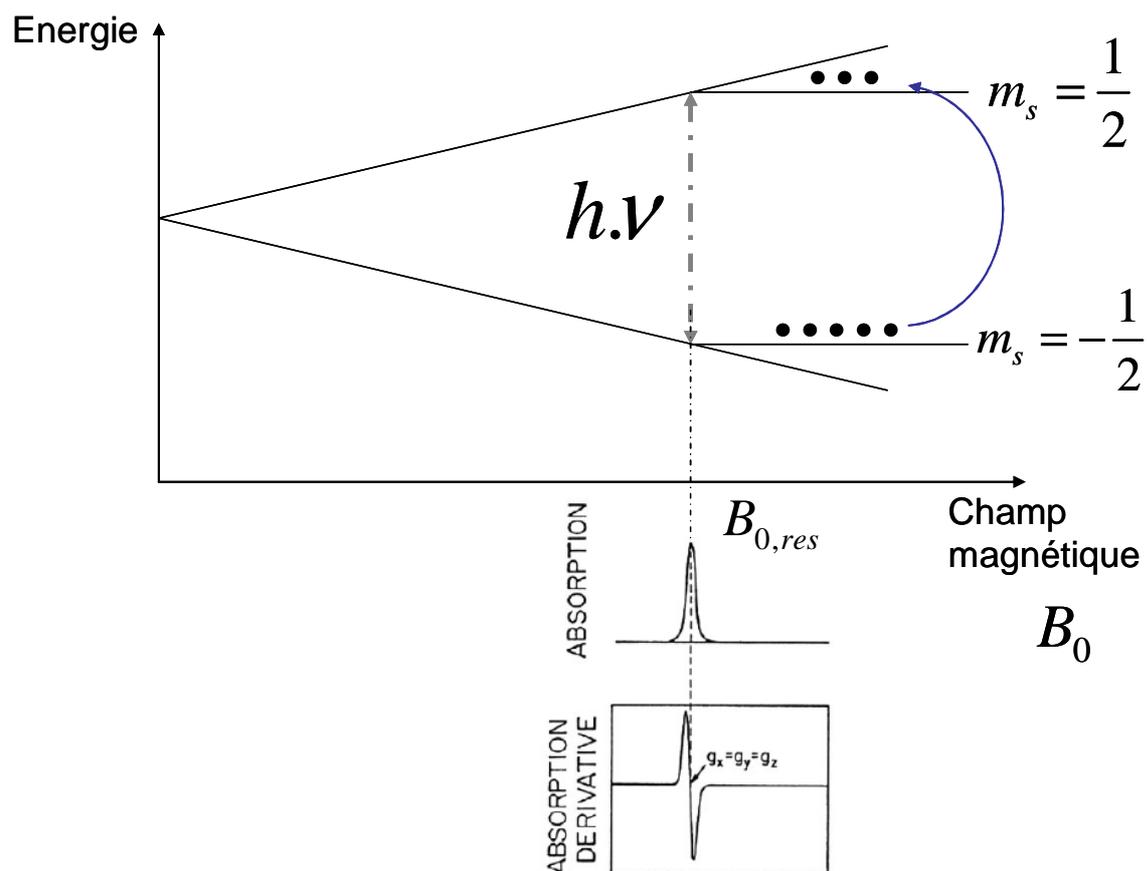


Figure 2- 2: Eclatement du doublet $m_s = \pm 1/2$ associé au spin électronique $S=1/2$ d'un système isotrope sous l'action du champ magnétique \vec{B}_0 . Phénomène de résonance.

C'est l'effet Zeeman, traduit en mécanique quantique par l'Hamiltonien Zeeman :

$$\hat{H}_{Zeeman} = \mu_B \hat{B}_0 [g] \hat{S} \quad \text{Equation 2-3}$$

où μ_B est le magnéton de Bohr, $\mu_B = \frac{e\hbar}{2mc}$ ($\mu_B = 9,2741 * 10^{-24}$ J/T). \hat{B} l'opérateur associé au champ magnétique et $[g]$, nommé abusivement tenseur $[g]$ (en réalité seul $[g] \cdot [g]$ est un tenseur) est propre à chaque système.

Dans le cas particulier d'un système isotrope (i.e. $[g] = g_{iso} \cdot [Id_3]$ où $[Id_3]$ est la matrice identité d'ordre 3), l'Hamiltonien précédent se simplifie et s'écrit :

$$\hat{H}_{Zeeman,z} = \mu_B B_0 g_{iso} \hat{S}_z \quad \text{Equation 2-4}$$

L'énergie des deux sous-niveaux devient alors :

$$E(m_s) = \mu \cdot B_0 \quad \text{Equation 2-5}$$

avec $\mu = m_s \cdot g_{iso} \cdot \mu_B$, et la différence d'énergie entre deux niveaux énergétiques s'écrit (équation 2-6) :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = g_{iso} \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad \text{Equation 2-6}$$

La condition de résonance (nécessaire mais non suffisante) s'exprime selon l'équation 2-7 :

$$\Delta E = h\nu = g_{iso} \cdot \mu_B \cdot B_{0,res} \Leftrightarrow B_{0,res} = \frac{h\nu}{\mu_B g_{iso}} \Leftrightarrow g_{iso} = \frac{h\nu}{\mu_B B_{0,res}} \quad \text{Equation 2-7}$$

La position du champ résonant donne alors directement accès au paramètre g_{iso} , caractéristique du système étudié. Le facteur g , permet de rendre compte des valeurs expérimentales, c'est-à-dire des déviations de g par rapport à sa valeur pour l'électron libre.

Le phénomène de transition correspond donc à un changement d'orientation du moment dipolaire magnétique pour une fraction de l'échantillon. En effet, il y a passage du niveau associé à $m_s = -1/2$ au niveau associé $m_s = +1/2$. Le moment de spin passe donc d'un alignement antiparallèle à un alignement parallèle au champ magnétique statique \vec{B}_0 (figure 2-2). C'est le rayonnement électromagnétique qui doit apporter l'énergie nécessaire à cette réorientation. Si le champ magnétique de l'onde électromagnétique \vec{B}_1 est parallèle au champ statique \vec{B}_0 qui crée les niveaux Zeeman, le moment dipolaire est sensible au champ magnétique total.

$$\vec{B}_{tot} = \vec{B}_0 + \vec{B}_1 \quad \text{Equation 2-8}$$

qui est parallèle à \vec{B}_0 . Ceci n'a pour effet que de moduler les énergies des niveaux Zeeman et ne permet en aucun cas une transition. Pour avoir une transition, il est donc nécessaire que le champ magnétique du rayonnement ait une composante perpendiculaire au champ magnétique statique.

I.1-3 Les interactions hyperfines

A l'intérieur d'une molécule, les électrons célibataires interagissent avec les protons et autres atomes les plus proches. Cette interaction entraîne une multiplicité des raies spectrales. La constante de couplage hyperfin représente la mesure de l'interaction entre les spins électroniques et nucléaires. Cette constante varie selon le type de noyau. Le nombre de raies hyperfines correspond aux transitions permises. L'analyse du nombre de raies, de leur intensité relative, de leur séparation peut permettre de déterminer le nombre et le type de spins nucléaires qui interagissent avec l'électron et donc la structure du radical. Le nombre de raies et l'intensité relative de chaque raie dépend du nombre de noyaux dans la molécule. Le couplage entre le spin électronique et le spin nucléaire résulte d'une interaction entre les moments magnétiques, entraînant une structure hyperfine. Un exemple est donné sur la figure 2-3 pour un couplage hyperfin d'un spin électronique $S=1/2$ avec un noyau de spin nucléaire $I=3/2$.

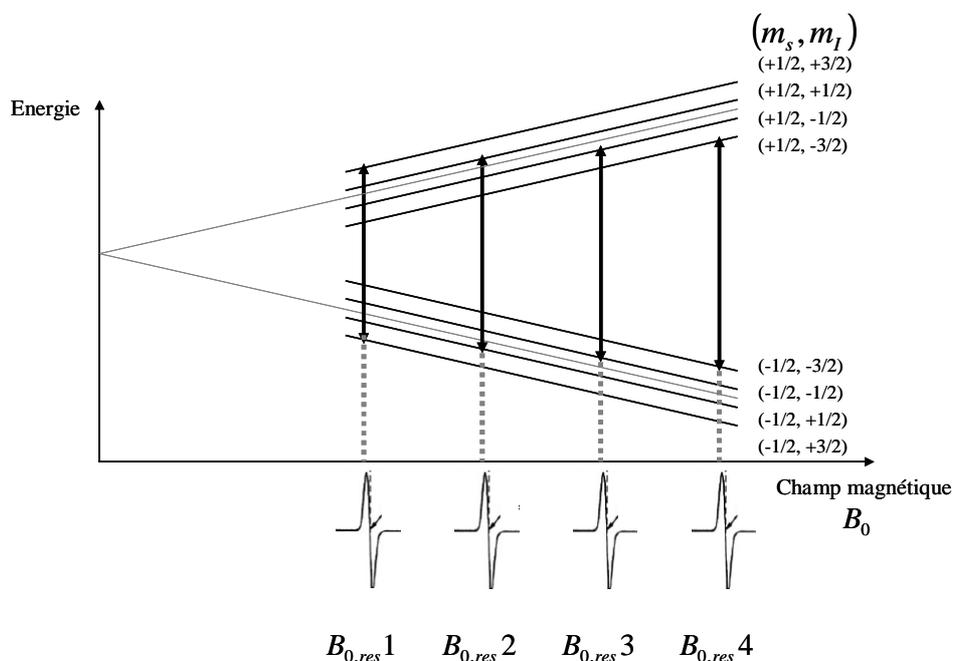


Figure 2-3: Illustration du couplage hyperfin d'un spin électronique $S=1/2$ avec un noyau de spin nucléaire $I=3/2$

L'interaction hyperfine a pour effet de diviser les niveaux Zeeman et donc les raies observées. Elle se traduit par l'Hamiltonien suivant :

$$\hat{H}_{\text{hyperfine}} = \hat{I}[a]\hat{S} \quad \text{Equation 2-9}$$

où les éléments de $[a]$ sont homogènes à une énergie et contiennent l'information sur la structure électronique du centre paramagnétique.

Si l'on suppose le champ magnétique statique \vec{B}_0 suffisamment fort pour aligner dans sa direction moment magnétique électronique $\vec{\mu}_e$ et moment magnétique nucléaire $\vec{\mu}_{\text{nuc}}$, l'Hamiltonien de structure hyperfine s'écrit :

$$\hat{H}_{\text{hyperfine}} = A_{\text{iso}} \hat{S}_z \cdot \hat{I}_z \quad \text{Equation 2-10}$$

où seules les projections \hat{S}_z et \hat{I}_z comptent. Le paramètre A_{iso} est appelé constante hyperfine isotrope et représente l'énergie d'interaction entre le spin électronique et le spin nucléaire.

Les énergies du système sont les valeurs propres associées à l'Hamiltonien Zeeman électronique auquel on ajoute maintenant l'Hamiltonien de structure hyperfine :

$$\hat{H} = \hat{H}_{\text{Zeeman}} + \hat{H}_{\text{hyperfine}} = g_{\text{iso}} \mu_B B_0 \hat{S}_z + A_{\text{iso}} \hat{S}_z \hat{I}_z \quad \text{Equation 2-11}$$

En toute rigueur, le terme Zeeman nucléaire (effet du champ statique sur le moment magnétique nucléaire) devrait être additionnée à l'équation 2-11 mais en RPE bande X, cet effet est faible devant l'interaction hyperfine et il sera donc négligé.

Si l'on développe le premier terme de l'équation 2-11, on a :

$$g_{\text{iso}} \mu_B B_0 \hat{S}_z |S, m_s\rangle = g_{\text{iso}} \mu_B B_0 m_s |S, m_s\rangle \quad \text{Equation 2-12}$$

Cette même fonction $|S, m_s\rangle$ est satisfaite pour le second terme de l'Hamiltonien (*i.e* l'Hamiltonien de structure hyperfine). En ce qui concerne l'opérateur \hat{I}_z , il est l'analogue à \hat{S}_z mais concerne le spin nucléaire. Il faut donc inclure dans la fonction qui va décrire le système étudié, des informations sur la valeur du spin nucléaire, ainsi que sur sa projection. D'où la fonction :

$$|\Psi\rangle = |S, m_s, I, m_I\rangle = |S, m_s\rangle \times |I, m_I\rangle \quad \text{Equation 2-13}$$

Soit en termes d'énergie :

$$E(m_s, m_I) = g_{\text{iso}} \mu_B B_0 m_s + A_{\text{iso}} m_s m_I \quad \text{Equation 2-14}$$

On constate que chaque niveau Zeeman est constitué de $(2I+1)$ sous-niveaux caractérisés chacun par la valeur de la projection du spin magnétique nucléaire sur l'axe d'application du champ magnétique statique \vec{B}_0 .

Dans le cas de l'interaction hyperfine isotrope, la répartition de la densité de spin est déterminante. Plus la densité de spin sera élevée sur un centre, plus l'interaction hyperfine sera forte. De plus la constante hyperfine isotrope dépend du facteur g nucléaire du noyau concerné.

Jusqu'à maintenant nous avons considéré l'interaction hyperfine dans le cas isotrope mais l'interaction possède deux composantes : une composante isotrope qui est directement reliée à la densité électronique du noyau, et une composante anisotrope dont l'origine est une interaction dipôle-dipôle. L'anisotropie d'un système physique est généralement traduite par un tenseur : on passe d'un scalaire (milieu isotrope) à un tenseur qui indique que la réponse du système dépend de la direction de la perturbation. On peut voir les tenseurs comme des matrices 3×3 à 9 composantes dans l'espace.

L'Hamiltonien total d'interaction hyperfine est donc :

$$\hat{H}_{\text{hyperfine}} = A_{\text{iso}} \hat{S} \cdot \hat{I} + \hat{S} [A_{\text{aniso}}] \hat{I} = \hat{S} [A] \hat{I} \quad \text{Equation 2-15}$$

Le tenseur $[A]$ contient toute l'information relative à l'interaction entre le spin nucléaire et le spin électronique.

Cependant, l'interaction Zeeman électronique est l'interaction prépondérante tandis que les autres interactions sont des termes dits de perturbations.

I.1-4 Le facteur g .

Dans les radicaux organiques, on a généralement $g = g_e$ c'est-à-dire que la valeur du facteur g marquant la position de la résonance est très proche de la valeur calculée pour un électron libre ($g_e=2,0023$). Cependant, on peut déjà observer quelques écarts par rapport à g_e . On parle alors d'anisotropie du facteur g .

Pour les radicaux comportant des hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote ou le soufre, on attend à observer une anisotropie plus forte que celle des radicaux uniquement hydrocarbonés. Ceci s'explique par deux effets : tout d'abord les constantes de couplage spin-orbite augmentent avec le numéro atomique ($S > O > N > C$) et les atomes d'oxygène possèdent des paires électroniques non liantes qui occupent des orbitales sp^2 . Les énergies d'excitation qui correspondent à la transition d'un électron d'une orbitale non-liante vers la SOMO (*singly occupied molecular orbital*) sont souvent faibles. Ces deux conditions augmentent l'anisotropie du facteur g . Pour les atomes d'azote, une situation similaire se rencontre selon la configuration de la molécule. En effet, un atome d'azote protoné, qui

appartient à un hétérocycle conjugué n'a pas de paire électronique non-liante. Par contre, un atome d'azote déprotoné appartenant à un même cycle peut apporter une contribution majeure à l'anisotropie du facteur g car il possède une paire électronique non-liante. En général, les systèmes π ne possédant que des atomes de carbone ont une anisotropie de g faible. Les états excités de basse énergie de ces radicaux sont de caractère π ou π^* et ne se mélangent pas à l'état fondamental. Dans les métalloprotéines ou les complexes métalliques, l'anisotropie du facteur g provient du fait que l'environnement de l'ion métallique, où est localisée la densité électronique, n'est plus isotrope.

L'environnement géométrique, pour un ion métallique influence la levée de dégénérescence des orbitales 3d. Cette levée de dégénérescence est obtenue en utilisant la théorie du champ cristallin et est illustrée par la figure 2-4.

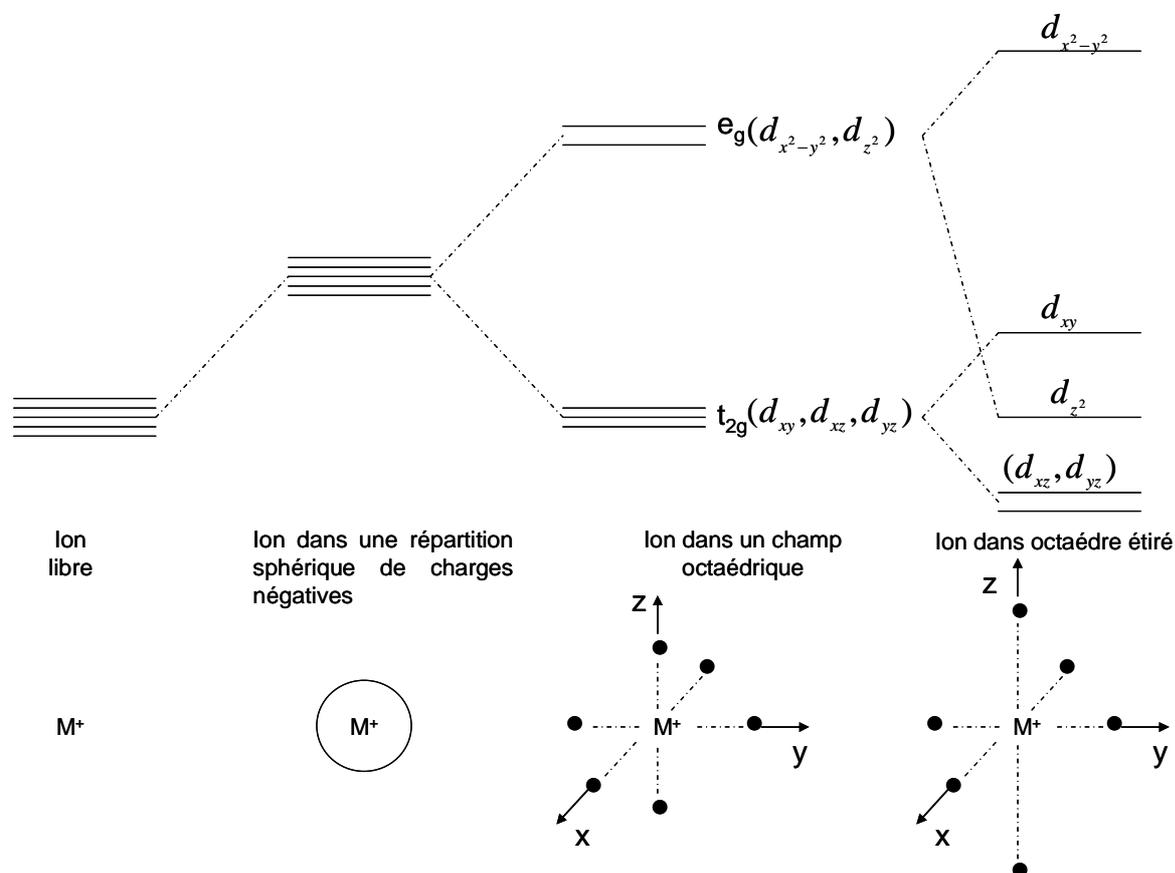


Figure 2-4: Influence de l'environnement sur la levée de dégénérescence des orbitales d

Pour des ions métalliques dans des complexes de coordination, on observe donc des valeurs de g souvent très différentes de g_e , et une forte anisotropie de la matrice $[g]$. Pour comprendre ces écarts du facteur g par rapport à l'électron libre, ainsi que l'anisotropie observée, il faut tenir compte du fait que les orbitales autres que celles à symétrie sphérique

font intervenir leur moment angulaire orbital. Le ‘bon’ nombre quantique est alors $J=L+S$. Par ailleurs, des effets relativistes sont observables lorsque la taille des atomes augmente : c’est le couplage spin-orbite.

$$\hat{H}_{so} = \lambda \hat{L} \cdot \hat{S}. \quad \text{Equation 2-16}$$

Cet Hamiltonien traduit le mélange entre configurations électroniques issues du même terme spectroscopique de l’ion libre. Le taux de mélange est déterminé par la force de couplage spin-orbite (paramètre λ) et par la différence d’énergie entre les termes spectroscopiques fondamental et excité : plus l’écart est grand, plus le mélange est faible.

Si maintenant on inclut ce phénomène dans l’expression de l’Hamiltonien Zeeman, on obtient l’équation suivante :

$$\hat{H}_{Zeeman} = \mu_B (g_{\perp} B_{0,x} \hat{S}_x + g_{\perp} B_{0,y} \hat{S}_y + g_{\parallel} B_{0,z} \hat{S}_z) \quad \text{Equation 2-17}$$

Avec les relations suivantes :

$$g_{\perp} = g_e \frac{2\lambda}{\Delta_3} \quad g_{\parallel} = g_e \frac{8\lambda}{\Delta_1} \quad \text{Equation 2-18}$$

λ désigne la constante de couplage spin-orbite. Δ_1 (respectivement Δ_3) désigne l’écart d’énergie entre le terme spectroscopique fondamental issu de la configuration électronique fondamentale et le terme spectroscopique issu de la configuration électronique excitée. Ces deux paramètres peuvent être mesurés par spectroscopie UV-visible.

L’anisotropie de l’effet Zeeman a son origine dans la structure électronique même des composés, structure qui est étroitement liée à l’environnement du centre paramagnétique. Cette anisotropie détectée par RPE donne donc de précieux renseignements sur la structure géométrique des systèmes étudiés.

I.1-5 La transition RPE

La transition RPE est toujours provoquée par l'excitation électromagnétique à un champ magnétique \vec{B}_1 donné. Comme il existe deux moments magnétiques au sein du système étudié (électronique et nucléaire), on a *a priori* deux effets Zeeman, électronique et nucléaire, simultanément. Cela signifie que pour connaître l'effet du champ \vec{B}_1 de la radiation, on doit étudier l'Hamiltonien suivant :

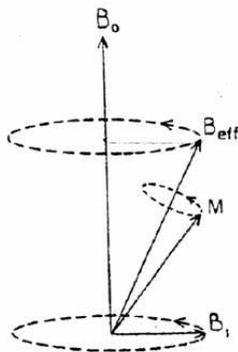
$$\hat{H}_{pert} = g_{iso} \mu_B \hat{B}_1 \cdot \hat{S} + g_H \mu_N \hat{B}_1 \cdot \hat{I} \quad \text{Equation 2-19}$$

Comme nous l'avons précisé auparavant, l'effet Zeeman nucléaire est très faible devant l'effet Zeeman électronique (de l'ordre de 1000 fois inférieur), cet effet sera donc négligé. L'Hamiltonien \hat{H}_{pert} se résume au premier terme. Aucun opérateur agissant sur le spin nucléaire n'y figure et l'effet Zeeman électronique n'agissant que sur la partie électronique de la fonction d'onde, la transition RPE est donc une transition entre niveaux électroniques caractérisés par la même valeur de m_l , les valeurs de m_s différant d'une unité.

La règle de sélection pour qu'une transition RPE ait lieu est donc :

$$\Delta m_s = \pm 1 \quad \text{et} \quad \Delta m_l = 0 \quad \text{Equation 2-20}$$

L'onde électromagnétique doit posséder une propriété supplémentaire pour induire des transitions entre l'état 1 et l'état 2. En effet, seules les composantes perpendiculaires à z (c'est-à-dire à la direction du champ magnétique statique) sont efficaces pour induire la transition. L'onde électromagnétique induisant les transitions doit donc osciller dans une direction perpendiculaire à \vec{B}_0 . C'est ce que l'on appelle une configuration de Bloch (figure 2-5)



décrite ci-après :

Pour qu'une transition RPE ait lieu il faut :

- 1) un champ magnétique statique \vec{B}_0 provoquant la levée de dégénérescence (Effet Zeeman électronique)
- 2) envoyer une onde électromagnétique perpendiculairement à \vec{B}_0 .

Figure 2-5: configuration de Bloch. D'après Turek³.

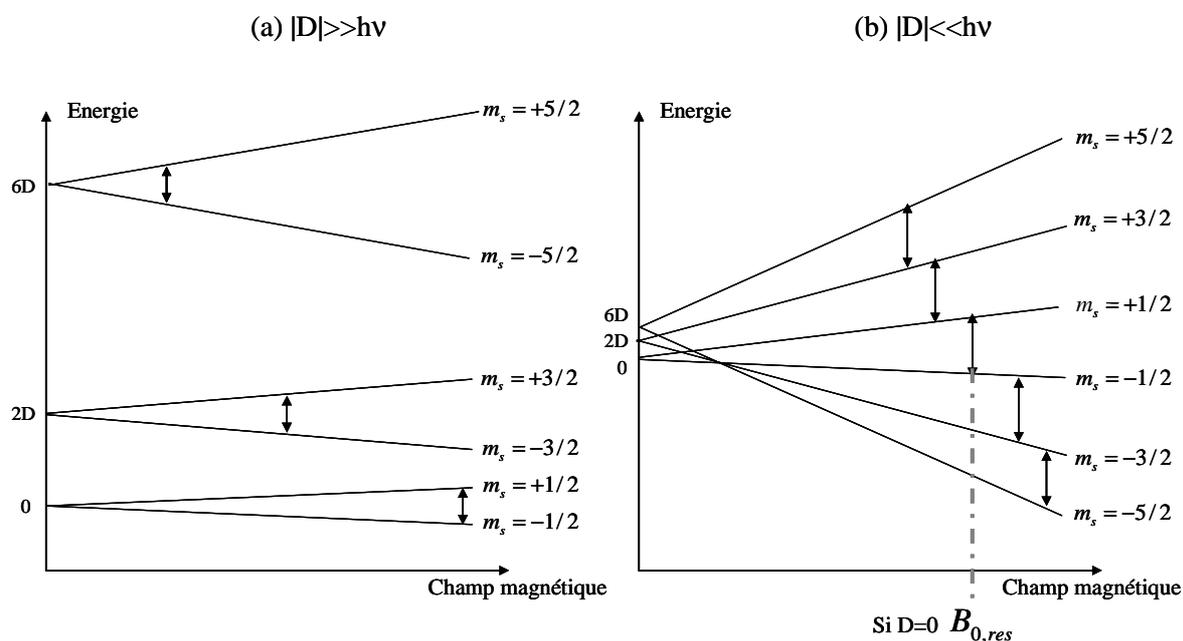


Figure 2-6: Diagrammes énergétiques (a) $|D| \gg h\nu$, (b) $|D| \ll h\nu$. Cas d'une symétrie axiale et d'un champ magnétique appliqué selon l'axe z de distorsion de la levée de dégénérescence en champ nul.

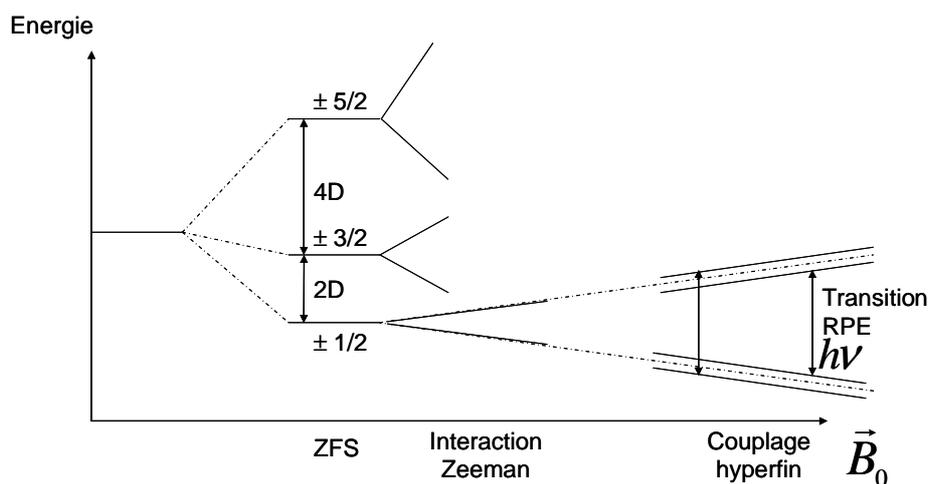


Figure 2-7: Illustration des effets des différentes interactions magnétiques sur les niveaux énergétiques d'un atome de Fe(III) spin fort

I.1-6 Levée de dégénérescence en champ nul

Jusqu'à maintenant, nous nous sommes attachés à décrire la transition RPE dans le cas de système de spin $S=1/2$. Cependant il existe de nombreux systèmes dont le spin électronique est supérieur à $1/2$: c'est le cas en particulier des métalloprotéines et des complexes de métaux de transition.

Pour les systèmes de spin électronique $S>1/2$, il faut considérer un phénomène supplémentaire, présent en l'absence de champ magnétique (d'où son nom : ZFS=Zero Field Splitting) qui lève la dégénérescence des niveaux de spin. Ce phénomène se traduit par l'Hamiltonien :

$$\hat{H}_{zfs} = \hat{S}[D]\hat{S} \quad \text{Equation 2-21}$$

Avec la trace de $[D]$ nulle et où les éléments de $[D]$ sont homogènes à une énergie et trouvent leur origine dans le couplage spin-orbite et la distorsion du système.

Selon la valeur de $|D|$ par rapport au quantum d'énergie $h\nu$, deux cas limites peuvent être considérés. Ils sont schématisés sur la figure 2-6, dans le cas d'un spin électronique $S=5/2$.

D'après le théorème de Kramers, on sait que lorsqu'un système possède un nombre impair d'électrons non appariés (spin demi-entier) les niveaux énergétiques se groupent par couples et restent au moins deux fois dégénérés en l'absence de champ magnétique. On parle alors de doublet de Kramers. La dégénérescence résiduelle ne peut être levée qu'en présence d'un champ magnétique.

Ce phénomène de levée de dégénérescence en champ nul a plusieurs origines : le couplage spin-orbite et les interactions spin-spin. Les conséquences d'un couplage spin-orbite pour un système de spin électronique $S>1/2$ impliquent que les niveaux Zeeman ne sont pas dégénérés à la même énergie lorsque le champ est nul. De plus, un spin $S>1/2$ suppose l'existence de plusieurs électrons non-appariés qui peuvent interagir entre eux et ceci conduit à la même conclusion : les $(2S+1)$ niveaux ne sont pas dégénérés en champ nul (figure 2-7).

La levée de dégénérescence en champ nul s'exprime grâce au tenseur $[D]$ de trace nulle :

$$[D] = \begin{pmatrix} D_x & 0 & 0 \\ 0 & D_y & 0 \\ 0 & 0 & D_z \end{pmatrix} \text{ avec } D_x + D_y + D_z = 0 \quad \text{Equation 2-22}$$

Ceci permet d'écrire l'Hamiltonien en fonction de deux paramètres, notés D (paramètre de distorsion axiale) et E. L'Hamiltonien de levée de dégénérescence en champ nul s'écrit donc sous la forme :

$$\hat{H}_{zfs} = D \left[\hat{S}_z^2 - \frac{1}{3} \hat{S}^2 \right] + E \left[\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2 \right] \quad \text{Equation 2-23}$$

avec les relations :

$$\begin{aligned} D_x &= -\frac{1}{3}D + E \\ D_y &= -\frac{1}{3}D - E \\ D_z &= \frac{2}{3}D \end{aligned} \quad \text{Equation 2-24}$$

Dans les expressions ci-dessus l'axe \vec{z} est l'axe privilégié et désigne l'axe de plus forte distorsion. Ce choix implique :

$$0 \leq \frac{E}{D} \leq \frac{1}{3} \quad \text{Equation 2-25}$$

Le paramètre D peut être positif ou négatif. Le paramètre E est ici choisi du même signe que D. Le rapport E/D est appelé rhombicité. Lorsqu'il est nul, la symétrie est axiale, et lorsqu'il vaut 1/3, la rhombicité est maximale. L'expression générale de l'Hamiltonien de spin est donc :

$$\hat{H} = \mu_B \vec{B} [g] \vec{S} + \vec{S} [D] \vec{S} + \hat{H}_{\text{hyperfin}} \quad \text{Equation 2-26}$$

Pour interpréter les spectres RPE des systèmes de spin $S > 1/2$, il faut traiter en même temps l'effet Zeeman et la levée de dégénérescence en champ nul. Il faut donc comparer l'ordre de grandeur relatif de ces deux phénomènes.

I.1-7 Généralités sur le spectre RPE.

Le spectre RPE est caractérisé par sa forme, sa position, sa largeur (ΔB_{pp}) et son amplitude (A_{pp}) (figure 2-8). Plusieurs données peuvent être obtenues à partir d'un spectre RPE : la position de raie permet de déduire le facteur g et donc le couplage entre l'électron et le champ magnétique ; la largeur ΔB_{pp} , la forme et l'amplitude A_{pp} de la raie donnent, quant à elles, des informations sur le type d'interaction et le mouvement des spins.

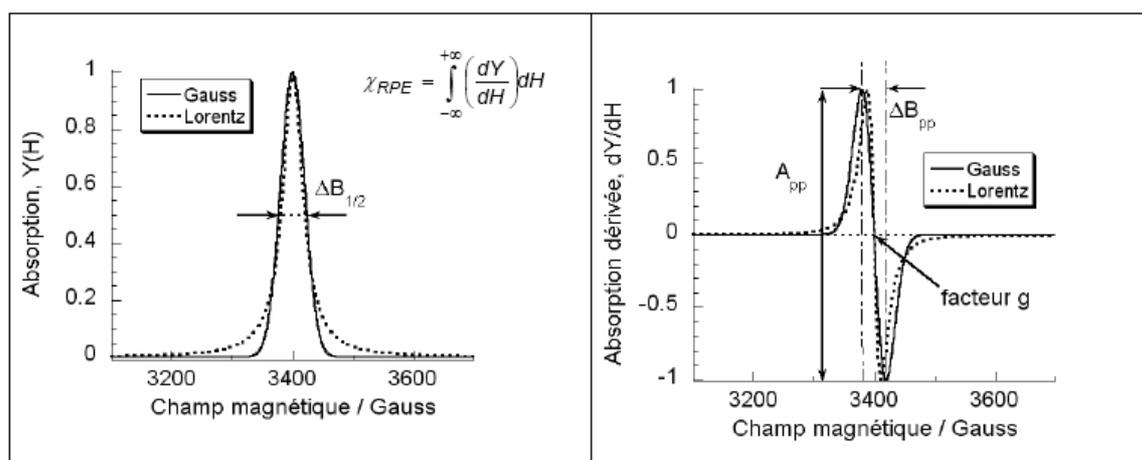


Figure 2-8: Représentation des paramètres: $\Delta B_{1/2}$ largeur de raie à mi-hauteur pour le signal en absorption (gauche) et l'amplitude pic à pic, A_{pp} , la largeur de raie pic à pic ΔB_{pp} et la position de résonance, le facteur g sur le spectre détecté en RPE (droite). D'après Turek³

I.1-7 a) Interactions magnétiques.

Un spectre RPE peut présenter une structure complexe résultant des différentes interactions magnétiques que nous avons présentées (effet Zeeman électronique, interactions hyperfines, interactions superhyperfines, interactions dipolaires, interactions fines). Les niveaux d'énergie électroniques sont perturbés et de nouvelles transitions apparaissent. Celles-ci se traduisent sur le spectre RPE par l'apparition de raies supplémentaires.

I.1-7 b) Position de raie et anisotropie.

La position de la raie est définie par le facteur g qui dépend uniquement de la structure électronique de l'espèce paramagnétique et de son environnement local. Cette position est définie par la condition de résonance : $h\nu = \mu_B g B_0$. Dans le cas général, un électron peut être délocalisé sur plusieurs atomes et donc appartenir à plusieurs orbitales. Si l'électron possède à la fois un spin et un moment angulaire orbital, le facteur g n'est plus une constante,

c'est une matrice anisotrope $[g]$ dépendant de l'orientation du champ par rapport aux molécules. La structure atomique du matériau anisotrope crée un champ magnétique interne qui est pris en compte dans le facteur g . Les interactions auxquelles est soumis l'électron peuvent donc être indépendantes de l'orientation du système par rapport au champ externe (isotrope) ou dépendre fortement de l'orientation du système par rapport au champ extérieur (anisotrope).

1.1-7 c) Origine de la forme et de la largeur de raie

La forme (gaussienne ou lorentzienne) et la largeur de raie ΔB_{pp} sont des paramètres importants. L'augmentation de la largeur de raie découle principalement de phénomènes de relaxation ou de phénomènes de recouvrement de raies. La probabilité d'interaction Zeeman électronique n'est différente de zéro qu'au voisinage de la fréquence de résonance, sur un intervalle de fréquence qui est à l'origine de la largeur de raie. La largeur de raie est fonction de l'inverse des temps de relaxation. En effet, d'après le principe d'incertitude d'Heisenberg on peut écrire :

$$\Delta B_{1/2} \geq \frac{\hbar}{2 \cdot g \cdot \mu_B \cdot \Delta t} \quad \text{Equation 2-27}$$

Avec $\Delta B_{1/2}$ la largeur de la raie à mi-hauteur et Δt la durée d'excitation des spins qui dépend des temps de relaxation T_1 et T_2 .

A la largeur de raie due à l'interaction Zeeman électronique, viennent s'ajouter d'autres contributions qui peuvent modifier la raie de façon homogène et/ou inhomogène. L'élargissement homogène de la raie RPE (forme lorentzienne) peut être dû à la délocalisation des spins qui dépend du couplage des spins entre eux mais aussi du réseau. L'élargissement inhomogène de la raie RPE (forme gaussienne) est dû principalement à l'interaction hyperfine. L'interaction dipolaire entre spins dans une structure hétérogène ou en présence d'un champ magnétique extérieur inhomogène entraîne des résonances à des fréquences légèrement différentes et contribue à l'élargissement inhomogène de la raie. Dans la plupart des cas, la largeur de raie résulte de contributions homogènes et inhomogènes. La forme gaussienne ou lorentzienne de la raie peut être déterminée à partir du rapport entre la largeur de raie à mi-hauteur $\Delta B_{1/2}$ et la largeur de raie pic à pic ΔB_{pp} .

En RPE, la puissance absorbée par l'échantillon correspond à la valeur moyenne de l'énergie électromagnétique reçue par l'échantillon. A partir des équations de Bloch, on peut montrer que la puissance absorbée moyenne est de la forme :

$$P_{abs}(\omega) = \frac{1}{2} \omega \chi'' B_1^2 = \frac{1}{2} \omega \omega_0 \chi f(\omega - \omega_0) B_1^2 \quad \text{Equation 2-28}$$

Dans cette expression, χ est la susceptibilité statique de l'échantillon mesuré, ω_0 est la fréquence de résonance (fréquence de Larmor) et $f(\omega - \omega_0)$ est la forme de raie:

$$f(\omega - \omega_0) = \frac{2T_2}{1 + T_2^2(\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} \quad \text{Equation 2-29}$$

Si $\gamma^2 B_1^2 T_1 T_2 \ll 1$ (facteur de saturation), alors la forme de raie simplifiée est lorentzienne. Un signal de RPE a toujours une forme comprise entre ces deux formes limites. En général une raie de solide a une forme lorentzienne, alors qu'une raie de molécule en solution a une forme gaussienne

1.1-7 d) Amplitude du signal RPE

L'évaluation de l'intensité du signal RPE peut être obtenue par la méthode de double intégration du spectre ou la méthode pic à pic. La méthode de double intégration consiste à intégrer deux fois le spectre RPE différentiel mesuré sur l'intervalle entier. La méthode pic à pic consiste à mesurer la différence entre le maximum et le minimum associés ou entre le maximum et la ligne de base déterminée à partir du spectre entier et symétrique.

La méthode la plus rigoureuse pour obtenir une valeur qui est proportionnelle à la concentration de spin est la méthode de double intégration. Cependant cette méthode donne une valeur qui est proportionnelle à la concentration totale en spin de l'échantillon, elle ne permet donc pas de distinguer les espèces radicalaires résonant à la même fréquence.

1.1-7 e) Le phénomène de saturation

Comme nous l'avons vu précédemment, dans le cas de l'électron libre, en présence d'un champ magnétique statique \vec{B}_0 , deux niveaux d'énergie existent N_1 et N_2 .

Pour pouvoir observer une absorption micro-onde, le peuplement du niveau de plus basse énergie doit être supérieur à celui du niveau de plus haute énergie. Initialement, avant toute irradiation, le système est en équilibre thermique et la répartition des spins entre les deux niveaux de populations N_1 et N_2 est régie par la distribution de Boltzmann (équation 2-30) :

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B \cdot T}} \quad \text{Equation 2-30}$$

avec k_B la constante de Boltzmann et T la température absolue (K).

La population de spins est légèrement plus élevée sur le niveau N_1 par rapport au niveau N_2 et cette distribution dépend de la température. Lorsqu'on envoie une onde électromagnétique de puissance P_0 , on induit des transitions entre le niveau inférieur et le niveau supérieur mais également l'inverse. Pour observer un signal RPE, il est essentiel qu'il existe une différence de population entre le niveau inférieur et le niveau supérieur. Quand on augmente la puissance de l'onde électromagnétique, on augmente le nombre de transitions, mais dans le cas d'une puissance trop importante, l'écart des populations des niveaux énergétiques 1 et 2 tend à s'annuler, ce qui supprime le transfert d'énergie. Il n'y a alors plus de signal RPE détecté. Il se produit alors un phénomène de saturation.

1.1-7 f) Le phénomène de relaxation

Le retour des spins à leur position d'équilibre à la fin de l'excitation s'effectue par un phénomène de relaxation. Il existe deux phénomènes de relaxation (figure 2-9). On oppose la relaxation longitudinale ou spin-réseau, définie par le temps de relaxation T_1 , à la relaxation transversale ou spin-spin, définie par le temps T_2 .

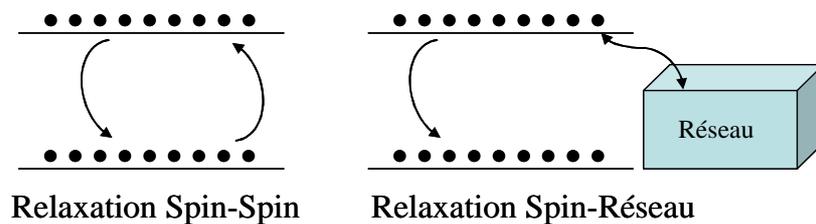


Figure 2- 9: Les deux types de relaxation.

La relaxation spin-réseau est due à l'interaction des spins avec le milieu dans lequel ils se trouvent. Les spins excités rendent le surplus d'énergie par collision avec les atomes voisins. La relaxation spin-réseau se produit suivant trois processus principaux: Direct (émission ou absorption d'un phonon); Raman (diffusion d'un phonon) et Orbach (intervention d'un troisième état).

La largeur de raie dépend beaucoup de T_1 : plus T_1 sera faible, plus la raie sera large. La raie sera d'ailleurs plus difficile à observer à haute température. Des temps de relaxation brefs existent lorsque l'état fondamental a la possibilité de se mélanger avec des états excités, soit parce que ceux-ci sont proches en énergie, soit parce qu'il existe un terme de mélange significatif (couplage spin-orbite).

La relaxation spin-spin a lieu quand à l'intérieur du système de spin, par suite des diverses interactions, les électrons peuvent passer du niveau supérieur au niveau inférieur. Puisque l'échange d'énergie dans le cadre de ces interactions s'effectue entre les diverses

parties du système de spins, l'énergie du système de spins considéré comme un tout ne varie pas.

Si on suppose que le radical ne donne lieu à aucun phénomène d'échange (il n'y a pas, par exemple, de variation de structure du radical au cours du temps). La largeur de raie est alors une grandeur directement fonction des temps de relaxation :

$$\Delta B = \frac{1}{\tau} = \frac{1}{T_1} + \frac{1}{2T_2} \quad \text{Equation 2-31}$$

La relaxation spin-spin (T_2) génère des petits champs magnétiques variables locaux. Ceci signifie que chaque dipôle (spin) voit le même champ magnétique moyen, mais que ce champ fluctue. Puisque l'écart entre les niveaux d'énergie varie par élargissement de ceux-ci, il en résulte un élargissement du signal. Les fluctuations du champ local dans le temps (fluctuations dynamiques) causent un élargissement séculaire homogène. Des fluctuations du champ dans l'espace causent un élargissement inhomogène. T_1 est déterminé par l'échange d'énergie entre le système de spin et le milieu. Cet échange se fait essentiellement *via* les vibrations du milieu et sera d'autant plus efficace que le couplage spin orbite sera grand. Il sera donc fonction de la température et des atomes composant l'espèce paramagnétique.

I.2-LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE LA SPECTROSCOPIE RPE.

I.2-1 La spectroscopie RPE conventionnelle.

Les premiers spectromètres commerciaux utilisaient une fréquence micro-onde de 9 GHz, ce qui est encore le cas pour la majorité des spectromètres RPE dits « conventionnels » ou « classiques ». Ils sont également qualifiés de spectromètres « bande X ». D'autre part, le mode de détection le plus répandu est dit « perpendiculaire » (*i.e.* le champ magnétique appliqué \vec{B}_0 et le champ magnétique \vec{B}_1 de l'onde électromagnétique sont perpendiculaires). Dans ce cas les règles de sélection qui régissent les transitions RPE sont $\Delta m_s = \pm 1$, et $\Delta m_l = 0$. Enfin, la cavité dans laquelle est placé l'échantillon est de type résonante, *i.e.* sa géométrie peut être adaptée (*via* la vis d'iris) pour que les ondes y soient stationnaires, ce qui accroît la puissance disponible des micro-ondes.

Cette technique donne accès à un très grand nombre de renseignements sur l'espèce paramagnétique étudiée: degré d'oxydation, nucléarité, géométrie, nombre de coordination et est maintenant utilisée comme une méthode de caractérisation tout aussi indispensable

qu'accessible, dans différents domaines de la chimie mais aussi de la physique. Elle est en particulier très exploitée pour caractériser des sites actifs d'enzymes ou des modèles chimiques, contenant des métaux de transition comme le Cuivre, le Manganèse et le $\text{Fe}^{3,5,7,8,9,10,11}$.

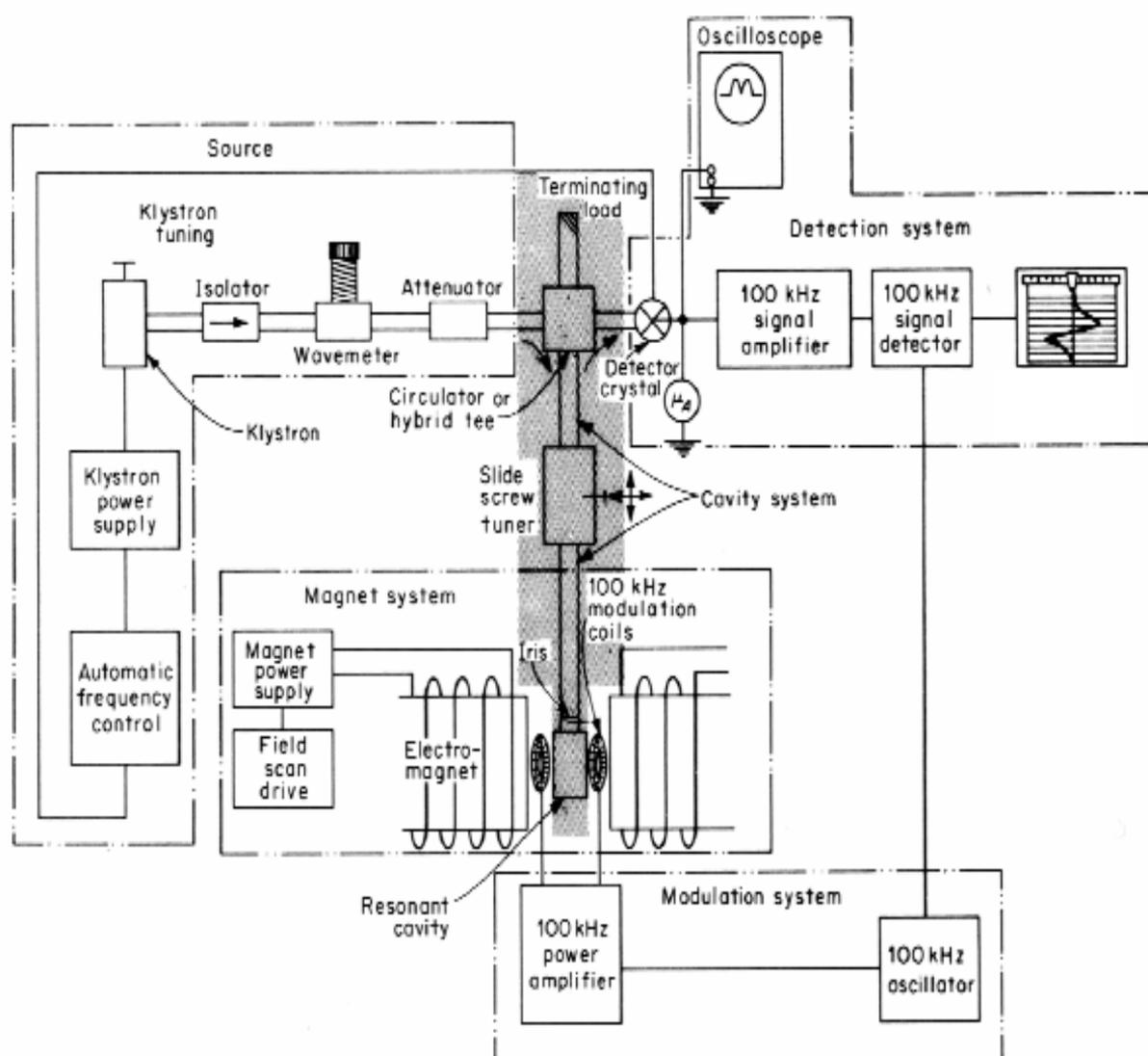


Figure 2- 10: Schéma d'un spectromètre RPE bande X utilisant une détection synchrone avec une modulation à 100kHz. D'après Weil et coll. 1994³.

De l'équation fondamentale :

$$h\nu = g\mu_B B_{0,res} \quad \text{Equation 2-32}$$

on tire l'existence de deux possibilités pour observer une transition : soit on fixe la fréquence ν du rayonnement électromagnétique et l'on fait varier le champ magnétique statique \vec{B}_0 , ou alors on fixe \vec{B}_0 et on fait varier la fréquence ν . Pour des raisons pratiques c'est la première solution qui est mise en œuvre. La figure 2-10 montre le schéma de principe d'un appareil RPE. Cet appareil est constitué de quatre parties : la source d'onde électromagnétique ; la source du champ statique, le système de modulation et le système de détection. A ceci il faut ajouter un cinquième élément qui est la cavité.

La source de l'onde électromagnétique.

Une diode à effet Gunn (anciennement un klystron était utilisé) génère de façon cohérente une onde électromagnétique de fréquence ν . Historiquement, les fréquences utilisées dans les tous débuts de la spectroscopie RPE étaient celles utilisées par les radars lors de la seconde guerre mondiale. Celle qui était la plus répandue correspondait à $\nu = 9,5$ GHz, la seconde s'élevait à 35 GHz. On les appelle respectivement bande X et bande Q. Le tableau suivant reprend les différentes fréquences de travail ainsi que leurs dénominations :

Bande	Fréquence (GHz)	Longueur d'onde (cm)	Champ à g=2 (T)
S	3,2	9,37	0,114
X	9,5	3,19	0,336
Q	35	0,88	1,215
W	95	0,32	3,394
	115	0,26	4,108
	190	0,15	6
	285	0,1	10

Tableau 2- 1: Propriétés des différentes fréquences utilisées en spectroscopie RPE.

Cette fréquence peut varier dans un petit intervalle et est ajustée en début d'expérience. Elle est maintenue à cette valeur grâce à un système d'astreinte : le contrôle automatique de fréquence (AFC) puis le lock offset. Un isolateur sélectionne les ondes qui viennent de la diode à effet Gunn et absorbe les ondes réfléchies de la cavité. Un atténuateur permet le réglage de la puissance de l'onde électromagnétique, cela correspond à un

ajustement de l'amplitude du champ magnétique \vec{B}_1 . Un guide d'onde permet la transmission sans perte d'énergie de la radiation.

La cavité.

Il existe plusieurs types de cavité mais le modèle TE₁₀₂ est la cavité la plus couramment utilisée. Dans cette cavité, l'échantillon se trouve au centre, (*i.e.* là où le champ électrique est minimal et où le champ magnétique \vec{B}_1 est orthogonal au champ statique \vec{B}_0).

On commence par créer des ondes stationnaires dans la cavité en ajustant la fréquence ν de la diode à effet Gunn. Pour minimiser les pertes, la cavité possède des parois en argent recouvertes d'or. La vis d'iris permet d'optimiser la sensibilité de la cavité (ajustement du facteur de qualité pour assurer un minimum de perte au niveau des parois).

Le système de détection

Les ondes analysées sont uniquement celles réfléchies par la cavité. L'existence d'un système d'ondes stationnaires au sein de la cavité signifie que dans une situation idéale, ce système d'ondes est confiné dans la cavité. Cependant dans toutes cavités, il existe des fuites et ce sont ces fuites que l'on analyse. On règle le guide d'onde (vis d'iris) pour que, quelle que soit la puissance de la radiation, les fuites de la cavité soient minimales. Quand on applique le champ magnétique et qu'il y a résonance, le système d'ondes stationnaires est modifié et apparaissent les fuites. C'est cette modification que l'on détecte.

La modulation

Pour différentes raisons, la raie RPE peut être très large et présenter un maximum peu élevé. De telles raies sont difficiles à détecter. Pour améliorer la détection de tels signaux on utilise la modulation. Cela consiste à ajouter au champ statique \vec{B}_0 une composante oscillante de fréquence de 10 à 100 kHz, dont on peut choisir l'amplitude.

La figure 2-11 A présente le principe de la modulation. On mesure la différence de courant $\Delta i = i_b - i_a$ où i_j correspond au courant lorsque le champ appliqué vaut B_j . On a

$B_a = B_0 - \frac{B_m}{2}$ et $B_b = B_0 + \frac{B_m}{2}$. Lorsque B_0 devient suffisamment fort pour qu'il y ait

absorption de la radiation mais avec $B_0 \ll B_{0,res}$, la différence de courant mesurée est non nulle et positive. Lorsque B_0 se rapproche de $B_{0,res}$, c'est-à-dire qu'on se rapproche du maximum

d'absorption, la différence de courant diminue, voire s'annule à la résonance. Lorsque B_0 s'éloigne de $B_{0,res}$ on a toujours absorption de la radiation mais la différence de courant mesurée devient négative car i_b est inférieur à i_a . Enfin lorsque B_0 est trop grand pour qu'il y ait absorption de la radiation, on a à nouveau $i_a = i_b = 0$. Si l'on trace la différence de courant en fonction du champ magnétique, on obtient la dérivée première de l'absorption. Les raies peu intenses ou larges sont ainsi détectées.

Cependant la modulation utilisée ne doit pas être excessive, car si la modulation est trop importante, une déformation de la résonance est détectée. Ce phénomène est illustré par la figure 2-11 B

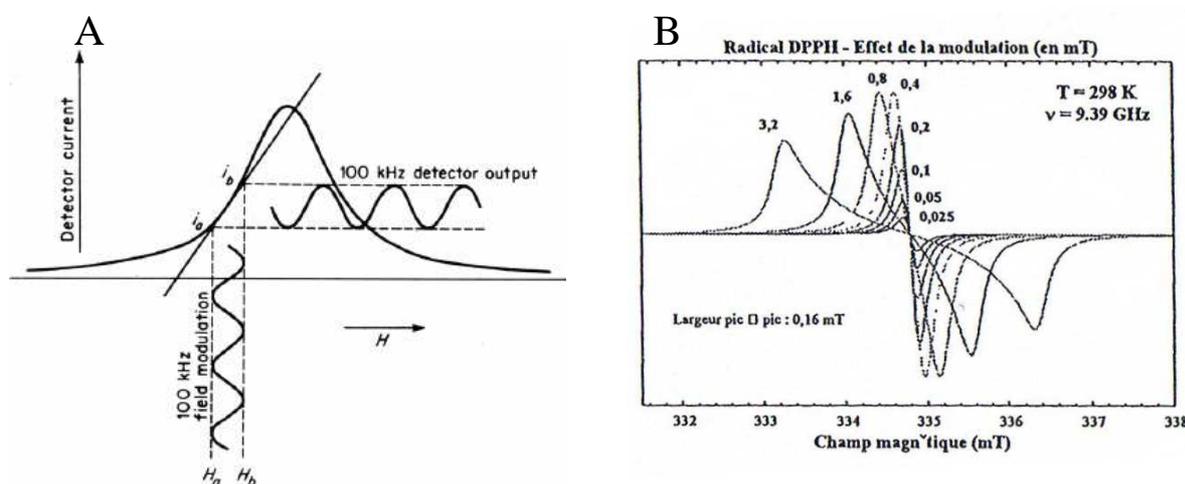


Figure 2- 11: (A) Principe de la modulation. (B) Effet d'une modulation croissante (de 0,1 à 3,2 mT) sur le spectre du 2,2'-phényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). D'après Turek³.

L'échantillon

L'échantillon est placé dans un tube en quartz dépourvu d'impuretés paramagnétiques. Un cryostat permet de travailler à basse température. Les solutions doivent être réalisées avec un solvant qui gèle correctement. L'eau une fois gelée ne présente aucun inconvénient particulier, sa constante diélectrique ayant fortement chuté (donc les micro-ondes sont moins absorbées). Ceci est très important pour les échantillons biologiques car la plupart des tampons utilisés sont à base d'eau. Les échantillons de protéines pourront donc être analysés à basse température.

L'amplitude du signal RPE est influencée par la variation de la position angulaire liée à l'anisotropie du signal RPE et par la variation de la position verticale au sein de la cavité. Une

faible variation de la position du tube contenant le matériau peut avoir des répercussions sur l'amplitude du signal RPE.

Conditions d'enregistrement d'un spectre.

En jouant sur les paramètres expérimentaux tels que la puissance des micro-ondes, la modulation d'amplitude, les constantes de temps et le gain, il est possible d'améliorer le rapport signal sur bruit. Cependant, il faut trouver un compromis entre le maximum de sensibilité et la résolution du spectre. Lorsque les échantillons sont stables il est toujours possible d'améliorer le rapport signal sur bruit en augmentant le nombre de scans effectués. Lorsqu'on effectue n scans le rapport signal sur bruit est amélioré par le facteur \sqrt{n} .

On peut également augmenter le rapport signal sur bruit en jouant sur la constante de temps, qui filtre le bruit en intégrant partiellement la réponse du spectromètre. Lorsque la constante de temps augmente, le niveau de bruit s'abaisse. Si la constante de temps choisie est trop longue par rapport à la vitesse de balayage en champ, le signal RPE peut être distordu ou même filtré. S'il est nécessaire d'utiliser une constante de temps longue pour voir un faible signal, la vitesse de balayage doit être diminuée en proportion. Le temps nécessaire d'acquisition du spectre RPE doit être en moyenne dix fois plus long que la constante de temps. Le temps de conversion est le temps nécessaire au convertisseur analogique numérique pour intégrer une valeur de champ donnée avant de passer à la suivante. Si le temps de conversion est trop court, les plus petits signaux sont perdus dans l'étape de numérisation.

Le paramètre température.

Les électrons, excités par l'onde électromagnétique, perdent leur énergie en la transmettant à leur environnement par le processus de relaxation spin-réseau. Ce processus est caractérisé par le temps de relaxation T_1 . Dans la plupart des complexes de fer, T_1 est particulièrement rapide à température ambiante. Ceci entraîne un grand élargissement des raies RPE. Il est nécessaire de diminuer la température d'enregistrement du spectre RPE à des températures cryogéniques dans le but d'obtenir le spectre RPE d'une métalloprotéine à fer. De plus, en diminuant la température on augmente la taille du signal car on augmente le facteur de Boltzmann. Cependant, si la température est trop basse, la relaxation spin-réseau devient pratiquement inefficace et la taille du signal diminue aux fortes puissances car le nombre d'électrons dans les états fondamental et excité s'égalise, ce qui donne naissance au phénomène de saturation (voir ci-dessous).

La puissance des micro-ondes

La puissance des micro-ondes est un paramètre très important lorsqu'on enregistre un spectre RPE. Elle est à optimiser afin d'avoir le meilleur rapport signal sur bruit. Aux faibles puissances, l'amplitude du signal RPE augmente proportionnellement avec la racine carrée de la puissance. A puissance plus élevée, le signal diminue et l'élargissement de raies apparaît. Cet effet est appelé saturation. Afin d'éviter tout phénomène de saturation, on utilise une puissance optimale définie dans la zone de linéarité en dessous de la puissance de saturation. L'équation suivante comporte le paramètre d'homogénéité ϵ introduit par Innes et Brudvig¹². Cette équation permet de tracer la courbe théorique de saturation en puissance et d'obtenir la puissance de saturation.

$$A_{pp} = \frac{a\sqrt{P}}{\left(1 + \frac{P}{P_{sat}}\right)^\epsilon} \quad \text{Equation 2-34}$$

A_{pp} est l'amplitude pic à pic du signal RPE, a un coefficient de proportionnalité, P_{sat} la puissance des micro-ondes qui caractérise le comportement de saturation du signal et ϵ le paramètre d'homogénéité variant de $\epsilon=0,5$ pour des raies inhomogènes (gaussienne) à $\epsilon=1,5$ pour des raies homogènes (lorentzienne).

La position de l'échantillon reste inchangée lors de l'expérience de saturation afin de s'assurer que tous les spectres soient enregistrés dans des conditions identiques.

I.2-2 La spectroscopie RPE à champ intense et à haute fréquence.

Généralités.

Afin d'obtenir le maximum d'informations sur un système donné, il est utile de moduler l'effet Zeeman (dépendant linéairement du champ magnétique) par rapport aux effets intrinsèques du système (interaction hyperfine et levée de dégénérescence en champ nul) qui sont indépendants du champ magnétique appliqué. Mais si on augmente le champ magnétique, il faut augmenter également la fréquence de l'onde électromagnétique d'irradiation. On se situe alors dans le domaine de la RPE (HF)², (*i.e.* High-Field, High-Frequency).

Typiquement, l'anisotropie Zeeman des radicaux organiques n'est pas plus large que 0,01 en valeur de g. Elle est donc en général du même ordre de grandeur que l'interaction hyperfine et, pour des radicaux organiques, les champs intenses nécessaires pour que

l'anisotropie du tenseur g soit dominante commencent à plusieurs teslas. C'est pourquoi la RPE à champ intense a été principalement appliquée à l'étude de radicaux organiques afin de résoudre la très faible anisotropie du tenseur $[g]$ ^{13,14,15,16,17,18,19,20} mais cette technique a également été appliquée aux complexes d'ions de transition. Dans la pratique, pour obtenir une bonne résolution expérimentale des valeurs de g , il faut que la différence entre deux valeurs de g consécutives soit nettement supérieure à l'élargissement de la raie dû aux couplages non résolus.

Instrumentation

Pour comprendre l'avantage pratique de l'utilisation de fréquences micro-ondes élevées et de champs intenses il faut considérer les dimensions physiques de l'instrumentation. A 9 GHz la longueur d'onde correspondante est de 30 mm. En conséquence, les parties du spectromètre, telles que le guide d'onde et la cavité sont approximativement de cette taille. A 300 GHz, la longueur d'onde correspondante est de 1mm et la taille des composants réduite en conséquence. D'autre part, alors que le champ magnétique requis pour effectuer des mesures à 9 GHz peut être atteint avec des petits électroaimants à noyau de fer doux, à 300 GHz, un aimant supraconducteur de 10 T est requis.

La plupart du travail de RPE à champ intense des échantillons biologiques a été effectué sur deux types de spectromètres très différents. Le premier type est basé sur l'utilisation d'une cavité et fonctionne sur le même principe que les spectromètres conventionnels. Les spectromètres à 95 GHz commerciaux appartiennent à cette catégorie. Le deuxième type de spectromètre n'utilise pas de cavité et ressemble davantage à un spectromètre d'absorption optique. Les spectromètres à cavité devraient être techniquement supérieurs avec une meilleure sensibilité et une utilisation plus efficace de la puissance micro-onde. Cependant, ils présentent un inconvénient majeur : la taille d'un résonateur est limitée par la longueur d'onde.

Les systèmes sans cavité n'ont pas une sensibilité aussi élevée que les systèmes basés sur l'utilisation d'un résonateur (la perte de sensibilité est d'au moins un facteur 1000). Cependant, la perte de sensibilité est compensée par plusieurs facteurs. Sans cavité, les contraintes sur la géométrie des échantillons sont nettement plus flexibles. Ce qui est très utile lorsqu'on veut travailler avec des échantillons biologiques. Les échantillons utilisés dans le spectromètre de Saclay peuvent occuper un volume cylindrique de 15 à 20 mm de hauteur et 10mm de diamètre. L'un des avantages majeurs est que l'on peut ainsi utiliser les tubes RPE conventionnels de 4 mm de diamètre ce qui nous permet d'étudier et de caractériser des échantillons à la fois avec un spectromètre standard à 9 GHz puis de les transférer dans le

spectromètre à champ intense pour obtenir les spectres RPE jusqu'à des fréquences de 285 GHz.

Le spectromètre RPE à champ intense construit au laboratoire fonctionne sur le même principe que celui décrit par Muller et *coll.*²¹ et est représenté de façon schématique sur la figure 2-12.

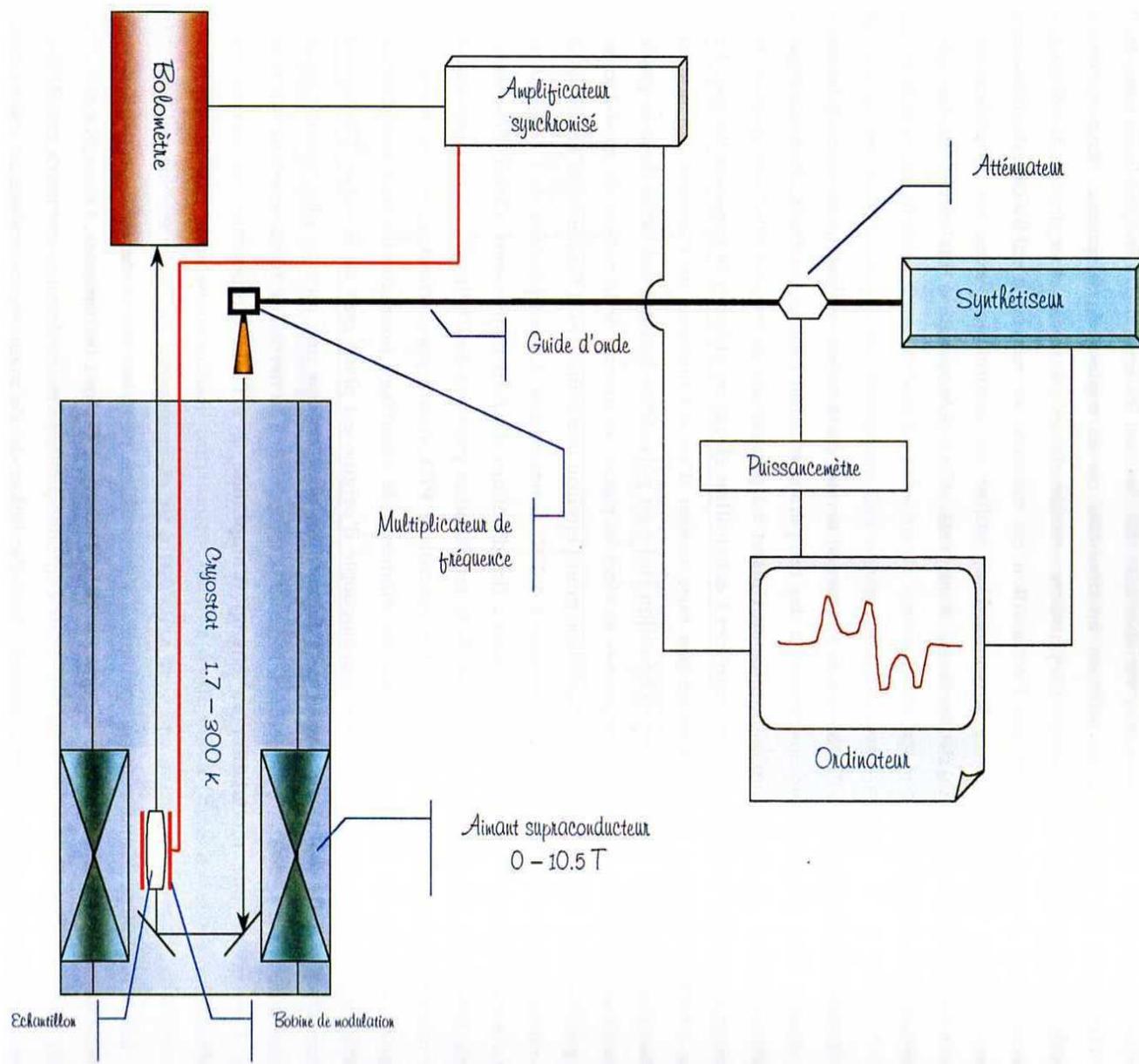


Figure 2- 12: Schéma de principe de fonctionnement du spectromètre à champ intense du laboratoire. D'après Dorlet 2001²¹.

La source de micro-ondes est un synthétiseur (ELVA-1, Saint-Pétersbourg, Russie) de 95 GHz. Cette fréquence peut être multipliée en utilisant un doubleur ou un tripleur de fréquence (Radiometric Physics, Menkenheim, Allemagne), les fréquences de 190 et 285 GHz peuvent ainsi être atteintes. La puissance maximale de sortie est alors de 3 à 4 mW. La

puissance micro-onde absorbée par l'échantillon est mesurée au moyen d'un bolomètre (QMC Instruments Ltd., Royaume-Uni). L'acquisition du signal se fait par ordinateur.

L'échantillon est placé à l'intérieur de l'insert au niveau de la bobine utilisée pour la modulation en champ. L'échantillon est placé dans un porte-échantillon, un tube de polycarbonate, qui est lâché dans le guide d'onde. La température de l'échantillon est contrôlée de 1,7 à 300K par un cryostat à flux d'hélium (Oxford Instruments, Oxon, Royaume-Uni). L'hélium utilisé pour la régulation de la température provient de l'hélium liquide dans lequel est immergé l'aimant supraconducteur.

Le champ magnétique externe appliqué à l'échantillon pour la mesure RPE provient de cet aimant supraconducteur à bobine unique (modèle Teslatron, Oxford Instruments, Oxon, Royaume-Uni). La valeur maximale du champ est de 10,5 T.

I.3-LES SPECTRES RPE DANS LE CAS DE POUDRES ET DE SOLUTIONS GELEES.

I.3-1 Allure générale d'un spectre à symétrie axiale.

Dans le cas d'une solution gelée, les molécules sont figées et orientées statistiquement et de façon équiprobable : aucune direction n'est privilégiée. Le spectre RPE sera déterminé d'une part par la probabilité de trouver le champ magnétique statique \vec{B}_0 dans une certaine direction par rapport aux axes de la molécule et d'autre part par le spectre associé à chacune des orientations du champ magnétique \vec{B}_0 . La symétrie axiale se manifeste en RPE par le fait que la réponse du système n'est pas la même selon l'orientation du champ magnétique statique \vec{B}_0 par rapport à la molécule. Par analogie avec le système isotrope, on désigne par g_z ou $g_{//}$ la valeur du facteur g du système si le champ \vec{B}_0 est selon l'axe de symétrie (\vec{z}) et par g_{\perp} la valeur du facteur g si le champ \vec{B}_0 est appliqué dans le plan perpendiculaire à l'axe de symétrie ((\vec{x}, \vec{y})).

L'Hamiltonien Zeeman électronique s'écrit donc :

$$\hat{H}_{Zeeman} = \mu_B (g_{\perp} B_{0,x} \hat{S}_x + g_{\perp} B_{0,y} \hat{S}_y + g_{//} B_{0,z} \hat{S}_z) \quad \text{Equation 2-34}$$

De part la symétrie de révolution autour de l'axe \vec{z} , on peut limiter l'étude à un seul plan contenant l'axe \vec{z} . On aura alors l'ensemble des caractéristiques du système et ce pour toutes les orientations du champ magnétique par rapport à la molécule.

En utilisant les coordonnées sphériques pour le champ magnétique, définie par le schéma 2-1, la valeur de g à la résonance s'écrit :

$$g(\theta) = \sqrt{g_{\perp}^2 \sin^2 \theta + g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta} \quad \text{Equation 2-35}$$

On peut montrer que dans cette orientation, le champ magnétique résonant possède l'amplitude $B_{0,res}(\theta)$ satisfaisant à la relation :

$$h\nu = g(\theta)\mu_B B_{0,res}(\theta) \quad \text{Equation 2-36}$$

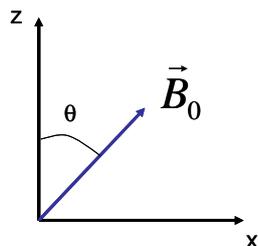


Schéma 2- 1: Coordonnées sphériques définissant le champ magnétique dans un repère cartésien.

Pour cette orientation, le spectre est donc constitué d'une raie, analogue à ce que l'on a vu pour les systèmes isotropes, centrée sur $B_{0,res}(\theta)$ et dont l'intensité dépend de la probabilité de transition. De plus, ces équations indiquent que l'amplitude du champ magnétique statique à appliquer pour observer la résonance dépend de l'orientation de ce même champ par rapport à la molécule. Pour une solution gelée, θ peut varier entre 0 et 90°. Un angle nul correspond au cas où le champ est selon l'axe \vec{z} , un angle de 90° à la situation

où le champ est selon l'axe \vec{x} . Le champ résonant peut prendre toute valeur entre $\frac{h\nu}{g_{\perp} \cdot \mu_B}$ et

$\frac{h\nu}{g_{\parallel} \cdot \mu_B}$ puisque le facteur $g(\theta)$ varie entre g_{\perp} et g_{\parallel} . On a donc maintenant un spectre qui

s'étend sur un domaine de champ.

Le profil d'un spectre RPE de solutions gelées en dérivée première dans le cas de symétrie axiale est illustré par la figure 2-13.

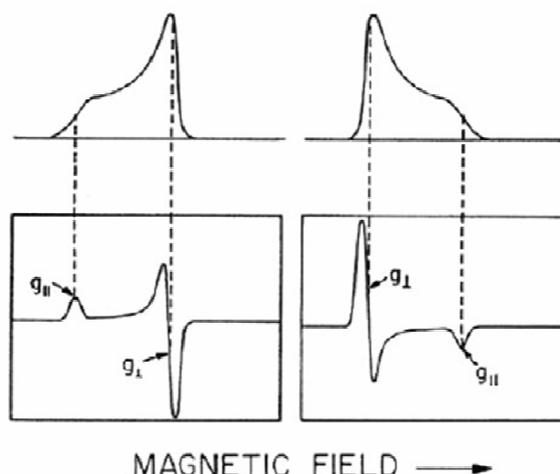


Figure 2- 13: Spectre RPE de solution gelée en première dérivé dans le cas d'une symétrie axiale Cas 1 (gauche) : $g_{||} > g_{\perp}$; Cas 2 (droite) : $g_{||} < g_{\perp}$

I.3-2 Allure générale d'un spectre à symétrie rhombique.

L'adjectif rhombique signifie que l'effet Zeeman est le plus anisotrope possible : il existe trois directions particulières de l'espace pour lesquelles, si on applique le champ magnétique statique \vec{B}_0 dans ces directions, la réponse du système se caractérise par trois valeurs différentes de g . Si l'on note \vec{x} , \vec{y} et \vec{z} ces trois directions, on désignera par g_x , g_y et g_z les trois valeurs du facteur g . Pour un radical organique, on choisit par convention $g_x > g_y > g_z$. Par analogie avec la symétrie axiale, cela signifie que l'Hamiltonien associé à l'effet Zeeman admet pour expression :

$$\hat{H}_{Zeeman} = \mu_B (g_x B_{0x} \hat{S}_x + g_y B_{0y} \hat{S}_y + g_z B_{0z} \hat{S}_z) \quad \text{Equation 2-37}$$

Où x , y , z dénotent les coordonnées dans le repère principal lié à la matrice $[g]$. Les valeurs de g_x , g_y et g_z sont les valeurs principales du tenseur $[g]$ et g est la valeur intervenant dans l'équation de résonance 2-38 :

$$h\nu = g\mu_B B_0 \quad \text{Equation 2-38}$$

En utilisant les coordonnées sphériques pour le champ magnétique, définie par le schéma 2-2, la valeur de g pour la résonance s'écrit :

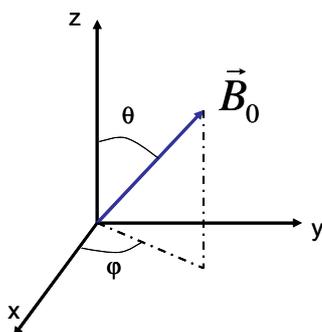


Schéma 2- 2: Coordonnées sphériques définissant le champ magnétique dans un repère cartésien.

$$g(\theta, \varphi) = \sqrt{g_x^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + g_y^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + g_z^2 \cos^2 \theta} \quad \text{Equation 2-39}$$

où θ représente l'angle entre le champ magnétique et l'axe z du repère principal et φ représente l'angle entre l'axe x et la projection du champ magnétique sur le plan (x,y) . Cette équation correspond à celle d'un ellipsoïde de révolution. Dans le cas d'une poudre ou d'une solution gelée, le champ magnétique peut prendre toutes les orientations possibles dans le repère principal et le spectre d'absorption RPE qui en résulte est la somme du signal RPE correspondant à chacune des orientations. Ce spectre de poudre est représenté par la figure 2-14.

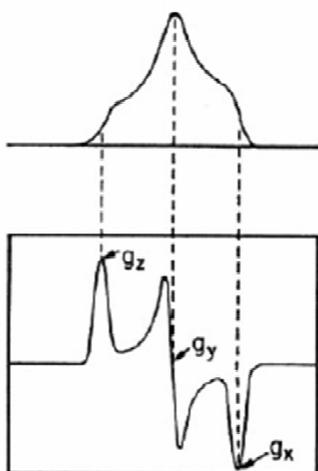


Figure 2- 14: Profil d'absorption d'un spectre sur poudre en symétrie rhombique (haut); Profil en première dérivée d'un spectre sur poudre en symétrie rhombique (bas).

La valeur de g pour laquelle la condition de résonance est satisfaite dépend donc de l'orientation du champ magnétique par rapport aux axes moléculaires (axes principaux du tenseur $[g]$) ce qui permet de sélectionner les orientations des molécules lorsque la valeur du champ appliqué est suffisante pour résoudre l'anisotropie de l'interaction Zeeman (condition champ intense).

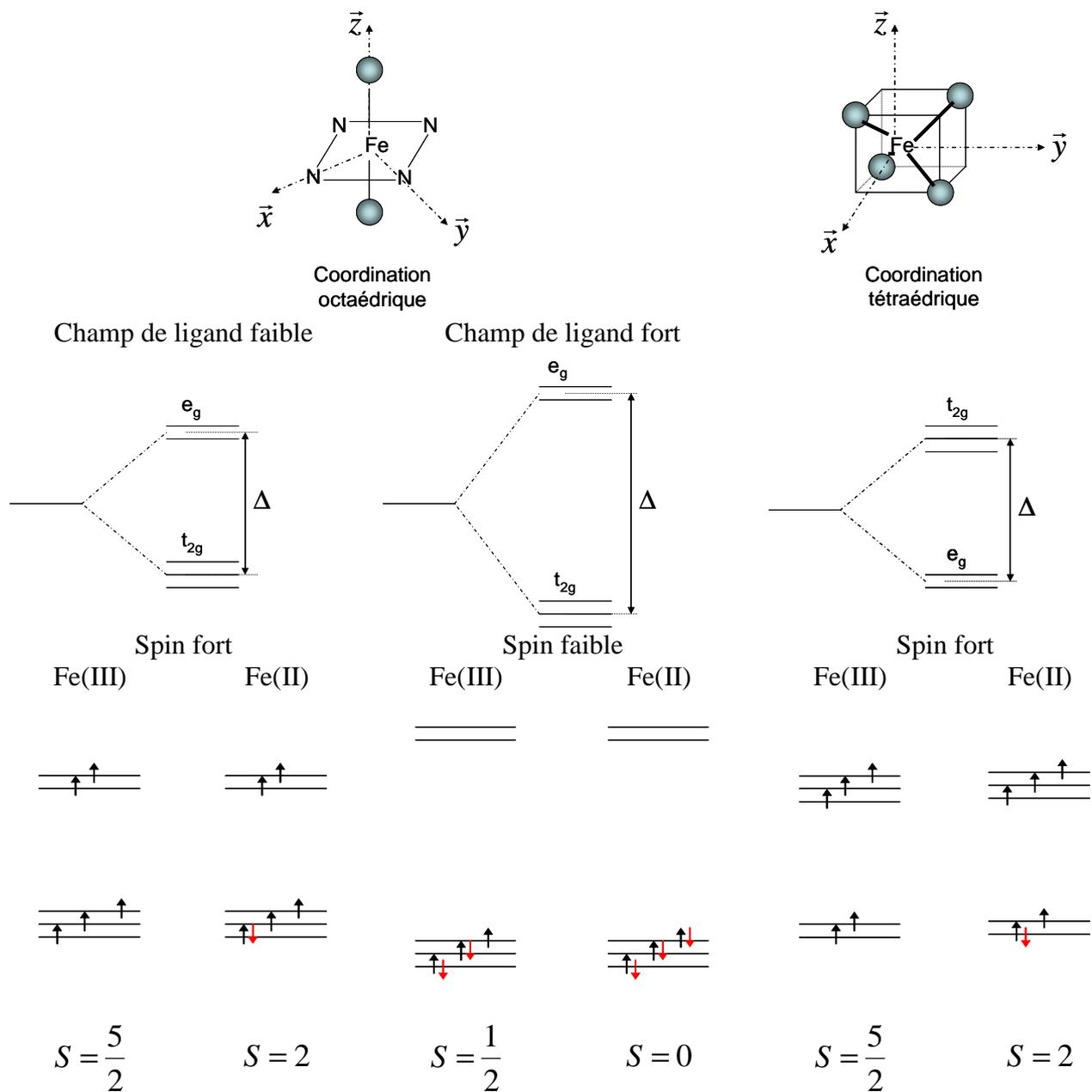


Figure 2-15: Niveaux énergétiques des électrons d de l'ion Fer et distributions des électrons dans les modes de coordinations octaédrique et tétraédrique.

I.4-SPECTRES DES ESPECES D'INTERET DE CE TRAVAIL.

I.4-1 Spectre du Fe(III) spin fort du site actif des catalases et des catalase-peroxydases.

Le fer peut exister sous trois degrés d'oxydation dans les échantillons biologiques : le Fe(II) ou ferreux, avec une configuration électronique d^6 ; le Fe(III) ou ferrique, dont la configuration électronique d^5 et le Fe(IV) ou ferryle dont la configuration électronique d^4 . Parmi ces espèces, seul le Fe(III) possède un nombre impair d'électrons, ce qui signifie que les niveaux électroniques dégénérés peuvent être éclatés par application d'un champ magnétique. Les autres états de valence peuvent être magnétiques mais l'éclatement des niveaux énergétiques est supérieur au quantum énergétique apporté par l'onde électromagnétique, ainsi ils ne sont pas détectés en RPE bande X.

L'état de spin de l'ion Fe(III) a une grande influence sur le spectre RPE (figure 2-15). Les électrons d ont chacun un spin $S=1/2$ et sont distribués sur cinq orbitales. A cause de la répulsion électrostatique, ces électrons ont tendance à occuper des orbitales différentes, dans ce cas l'atome de fer est dit spin fort. Cependant les interactions avec le champ de ligand entraînent un éclatement des niveaux énergétiques des électrons d . Si le champ de ligand est assez fort, les électrons vont plutôt se coupler et remplir les orbitales de plus basse énergie, on parle alors de spin faible. Dans le cas de l'atome de fer, il existe un spin intermédiaire ($S=3/2$). L'amplitude de l'éclatement des niveaux énergétiques, Δ , détermine l'état de spin de l'atome de fer. Il dépend des types de ligands mais également de leurs géométries. Le fer, dans une géométrie tétraédrique, est toujours dans un état de spin fort. Dans le cas d'une coordination octaédrique, qui est proche de la coordination de l'atome de fer dans les hémoprotéines, l'atome de fer peut être soit spin fort soit spin faible, selon la nature des ligands axiaux. Le champ électrique local, créé par les électrons des ligands les plus proches de l'espèce paramagnétique, contribue au moment magnétique. Lorsque $S>1/2$, le champ de ligand est à l'origine de la levée de dégénérescence en champ nul. Quand le champ local est asymétrique, ce qui reflète le caractère et la disposition des ligands, les orbitales et la levée de dégénérescence en champ nul le sont également. (figure 2-16).

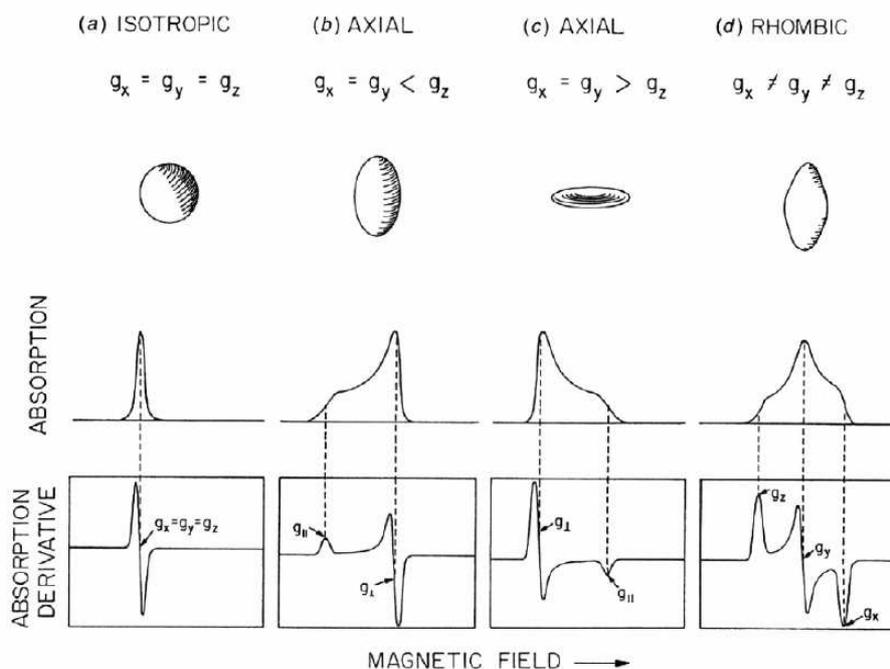


Figure 2- 16: Représentation schématique du tenseur $[g]$ et conséquences sur les spectres RPE. En haut sont représentées les formes des différentes symétries : sphérique, axiale et rhombique. Au centre : spectre d'absorption selon la symétrie. En bas : spectres RPE selon les symétries

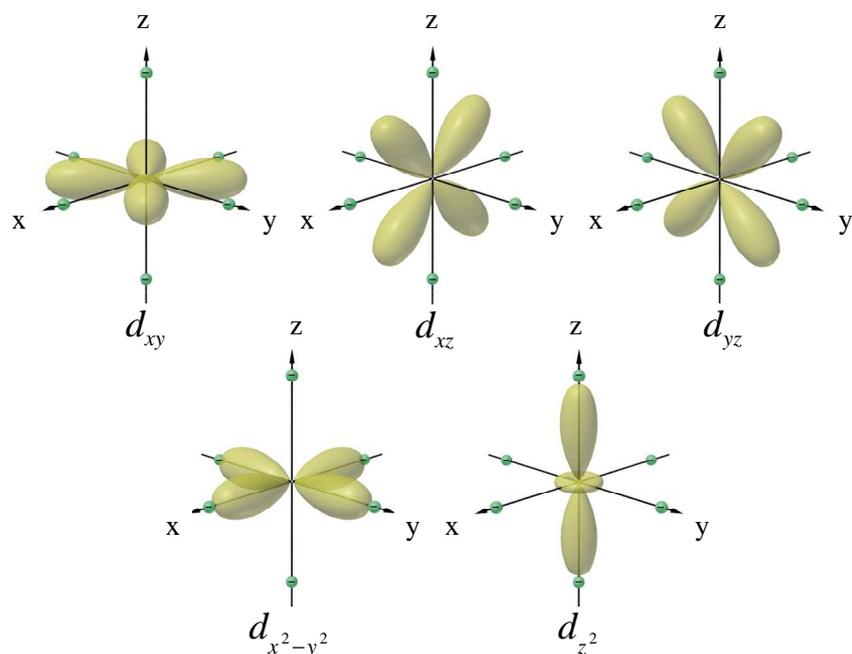
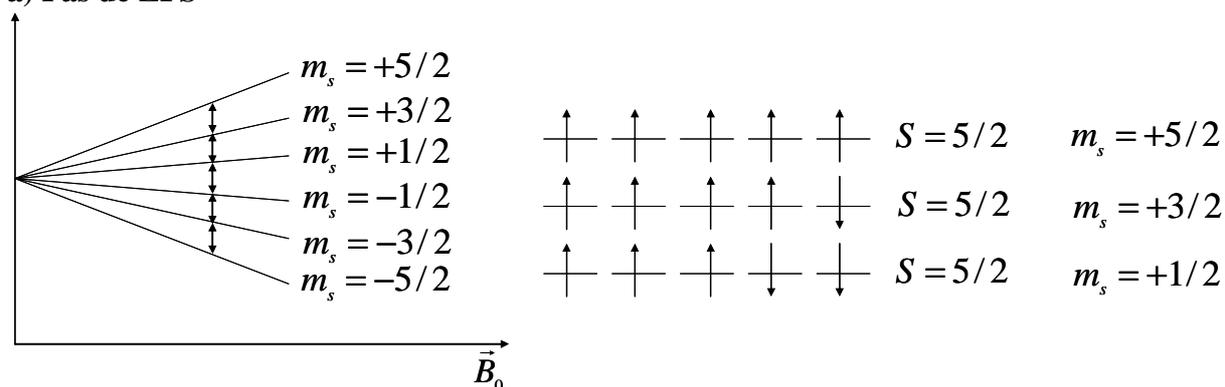


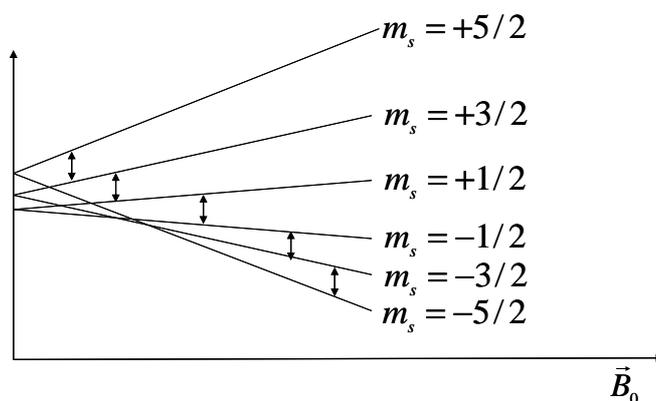
Figure 2-17: Symétries des cinq orbitales d

Il est important de connaître les propriétés de symétrie des orbitales pour connaître les relations qui existent entre elles par rotation autour d'un axe (figure 2-17). Par exemple, une rotation autour de l'axe \vec{z} 'transforme' $d_{x^2-y^2}$ en d_{xy} et d_{xz} en d_{yz} . Cependant aucune rotation autour de cet axe ne 'transforme' l'orbitale d_{z^2} . Comme $d_{x^2-y^2}$ et d_{xy} sont liées entre elles par rotation autour de l'axe \vec{z} , lorsque le champ statique \vec{B}_0 est appliqué selon \vec{z} il y a mélange de ces deux orbitales. Ainsi $d_{x^2-y^2}$ acquiert un peu de caractère de d_{xy} et le résultat est qu'il est possible pour un électron présent dans $d_{x^2-y^2}$ de circuler autour de \vec{z} . Cette circulation crée un courant dans le plan xy et ce courant circulaire est équivalent à un aimant possédant un moment magnétique orbitalaire. Ce moment magnétique influence donc le moment magnétique de spin : on parle de couplage spin-orbite. Pour les systèmes possédant plusieurs électrons non appariés, l'interaction entre les électrons non appariés et le champ de ligands mène à une différence énergétique des sous états de spin ($m_s \pm 1/2, \pm 3/2, \pm 5/2$) même en absence de champ magnétique. A première vue, il paraît étrange qu'un champ électrique puisse affecter le spin électronique, mais ceci est la conséquence du principe de Pauli, d'après lequel les électrons qui possèdent le même spin ne peuvent pas occuper le même espace. Ainsi, les configurations telles que ($\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow, m_s = 5/2$), dans laquelle les cinq électrons non appariés ont la même orientation de spin et ($\uparrow\uparrow\uparrow\downarrow\downarrow, m_s = 1/2$), dans laquelle les électrons non appariés ont le maximum de spin opposés, diffèrent dans le mouvement que possède chaque électron.

a) Pas de ZFS



b) ZFS faible



c) ZFS fort

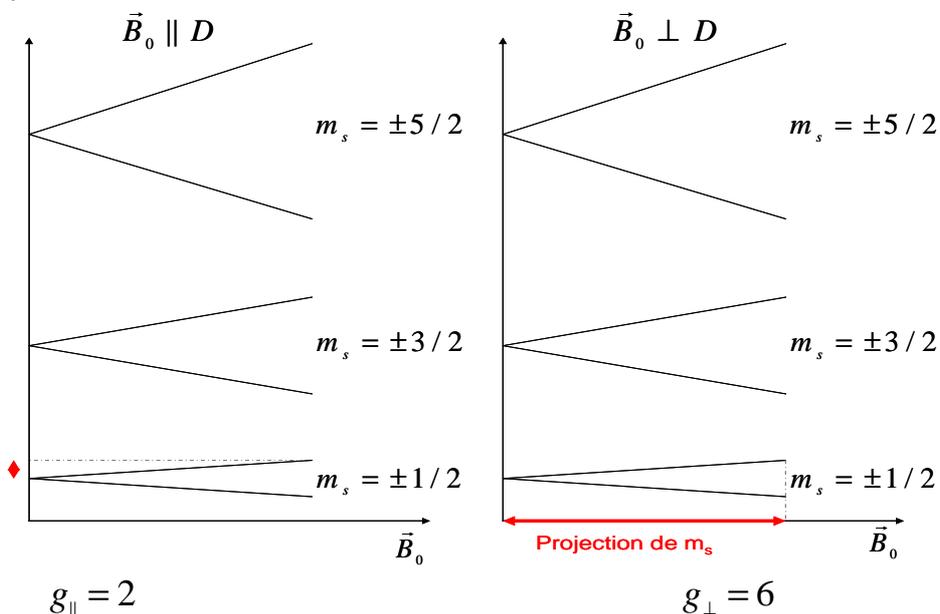


Figure 2- 18: Niveaux énergétiques pour un composé dont $S=5/2$ selon l'intensité du ZFS. (a) en absence de ZFS ($D=0$), une seule résonance isotrope est observée en RPE ; (b) avec un faible ZFS cinq résonances centrées en $g=2$ sont observées en RPE, (c) avec un fort ZFS, un signal anisotrope provenant du doublet $m_s=\pm 1/2$ est observé en RPE.

La RPE, en particulier pour des systèmes de $S=5/2$, est très sensible aux petits écarts par rapport à la symétrie tétragonale. Pour une distorsion purement axiale, l'amplitude de ce dédoublement est quantifiée par le paramètre D . Dans le cas le plus simple, (cas idéal $D=0$) (figure 2-18 A) quand le champ magnétique est nul, tous les niveaux convergent vers une même valeur et une simple résonance en $g=2$ est observée. Chaque transition satisfait la règle de sélection $\Delta m_s = \pm 1$ et pour toutes les valeurs du champ statique toutes les transitions ont la même amplitude. Lorsque $D < h\nu$ (figure 2-18 B) une faible levée de dégénérescence en champ nul se produit. Si le doublet $\pm 1/2$ reste le plus bas en énergie, alors on parle d'un D négatif. Les valeurs de m_s qui diffèrent de 1 peuvent ainsi être résolues. Lorsque $D \gg h\nu$ (figure 2-18 C) la levée de dégénérescence en champ nul est importante et avec les champs magnétiques conventionnels seules les transitions au sein du premier doublet sont observables. Lorsque le champ magnétique statique est parallèle à D , la projection de m_s le long de \vec{B}_0 est petite, une résonance simple est alors observée en $g=2$; quand le champ magnétique statique est perpendiculaire à D , la projection de m_s selon D donne naissance à la résonance en $g=6$.

Avec une symétrie plus basse que la symétrie axiale un autre paramètre doit être introduit, le paramètre E , utilisé pour décrire les distorsions rhombiques, on a alors trois valeurs de g . En particulier dans le cas du Fe(III) spin fort, la levée de dégénérescence en champ nul affecte énormément le facteur g observé. On introduit alors le rapport $\lambda = E/D$ qui traduit la rhombicité du système et peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 1/3. Lorsque λ vaut 0, la symétrie du système est axiale et une rhombicité de 1/3 correspond à l'état où la rhombicité est maximale. Pour un état de spin donné, le facteur g attendu peut être calculé en fonction de λ .

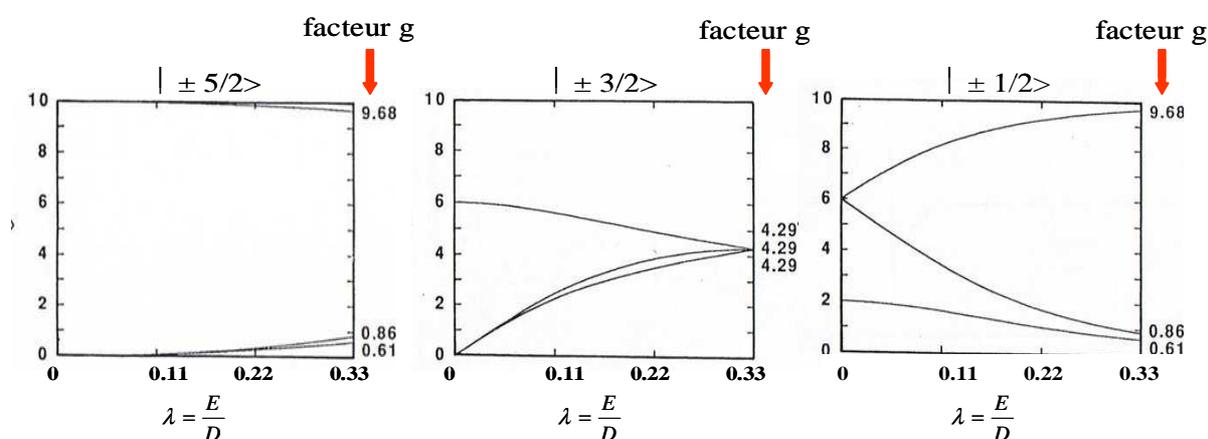


Figure 2-19: Rhombogramme du Fe(III) spin fort ($S=5/2$). Des signaux RPE sont obtenus lors de transitions non seulement entre le doublet de plus basse énergie ($1/2$) mais également entre transitions des doublets de plus haute énergie. Quand la température augmente, les doublets de plus hautes énergies sont plus peuplés et leur signaux augmentent.

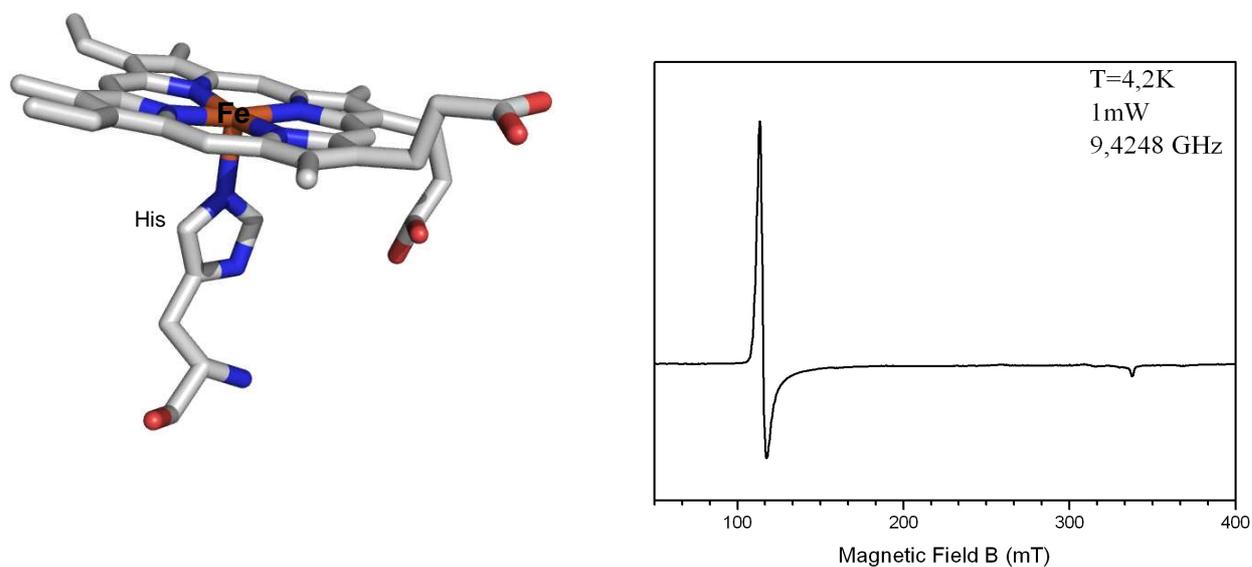


Figure 2- 20 : Coordination de l'ion Fe(III) spin fort dans la myoglobine (gauche). Numéro PDB : 1VXD, Spectre RPE en bande X de la myoglobine en solution gelée pH=7,2 (droite). La résonance intense correspond à $g_{\perp}=6$ et la faible résonance à $g_{\parallel}=2$. D'après ce travail.

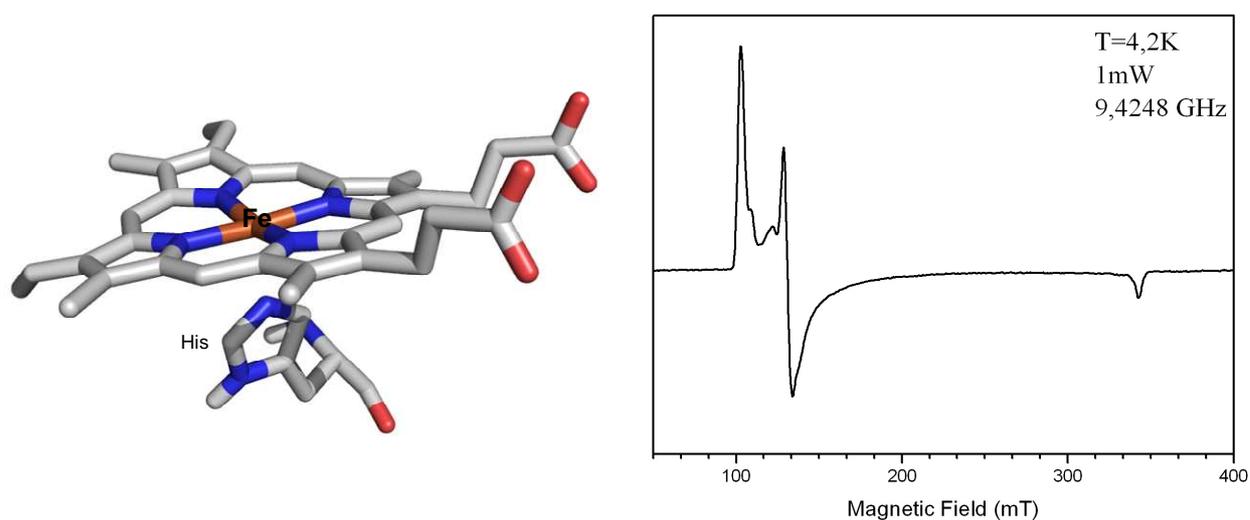


Figure 2- 21 : Coordination de l'ion Fe(III) spin fort dans la peroxydase de raifort (gauche). Numéro PDB :1ATJ , Spectre RPE en bande X de la peroxydase de raifort en solution gelée à pH=7,5 (droite). Les résonances intenses correspondent à $g_x=6,55$ et $g_y=5,13$ et la faible résonance à $g_z=1,97$. D'après ce travail.

Lorsque la symétrie est axiale il y a deux résonances prédominantes une à $g_{\perp}=6$ et l'autre à $g_{\parallel}=2$. Lorsqu'il apparaît un faible degré de rhombicité, les valeurs g_x et g_y diffèrent et s'éloignent de 6 comme dans le cas des catalases et des peroxydases pour lesquelles la rhombicité est aux alentours de 7,5 %²². En effet, si localement la symétrie est réduite (cas de la symétrie rhombique par rapport à la symétrie axiale), la distorsion résultante du plan de l'hème entraîne une différence d'énergie entre les orbitales d_{xz} et d_{yz} . Cette distorsion de l'hème est essentiellement due à la contrainte qu'impose la protéine sur son centre actif. Plus la contrainte est forte, plus la distorsion est importante, et donc plus les valeurs de g_x et g_y s'éloignent de $g=6$. Les caractéristiques du spectre RPE peuvent donc être utilisées pour décrire la symétrie de l'hème.

L'interaction totale peut s'écrire ;

$$\hat{H} = DS_z^2 + E(S_x^2 - S_y^2) \quad \text{Equation 2-40}$$

Ainsi, les expressions résultantes pour les valeurs de g en présence d'une distorsion rhombique sont :

$$\begin{aligned} g_x &= 6,01 + 24 \frac{E}{D} - 18,7 \frac{E^2}{D^2} \\ g_y &= 6,01 - 24 \frac{E}{D} - 18,7 \frac{E^2}{D^2} \\ g_z &= 2 - 33,8 \frac{E^2}{D^2} \end{aligned} \quad \text{Equation 2-41}$$

Pour les hémoprotéines, les caractéristiques du spectre RPE sont donc sensibles aux changements conformationnels de la protéine qui induisent un changement de géométrie de l'hème. En effet, pour l'hémoglobine et les myoglobines, qui sont des systèmes à symétrie axiale, le spectre en solution gelée (figure 2-20) correspond à une symétrie axiale. Cette symétrie implique que l'environnement électronique des électrons d est équivalent dans les directions \vec{x} et \vec{y} . Par contre pour la peroxydase de raifort la symétrie est plus basse, ceci signifie qu'aucun des trois axes principaux \vec{x} , \vec{y} et \vec{z} ne sont équivalents. Dans le cas de la peroxydase de raifort, les directions \vec{x} et \vec{y} ne sont pas trop différentes entre elles mais diffèrent de la direction \vec{z} . Dans ce cas, il n'y a pas de rupture majeure de la structure de base de la porphyrine mais il y a des perturbations dans l'environnement de l'atome de fer qui proviennent de l'asymétrie structurale et électronique du système d'électrons π de l'hème. Ces asymétries sont dues à la liaison d'une autre espèce directement sur le système π ou alors cette liaison implique un encombrement stérique au sein de la protéine qui va contraindre

l'hème. Ce dernier ne sera donc plus dans une configuration semi planaire et le spectre RPE correspondra à une symétrie rhombique (figure 2-21).

I.4-2 Spectre du composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}] : L'interaction d'échange.

I.4-2 a) Généralités.

L'interaction d'échange²³, caractérisée par J, est due aux recouvrements des orbitales et aux interactions électrostatiques. En effet, lorsque les orbitales se recouvrent, l'électron a la possibilité de délocaliser sur l'une ou l'autre des orbitales ce qui lui confère un caractère indiscernable. L'interaction d'échange entraîne ainsi une séparation énergétique des niveaux des états du spin global.

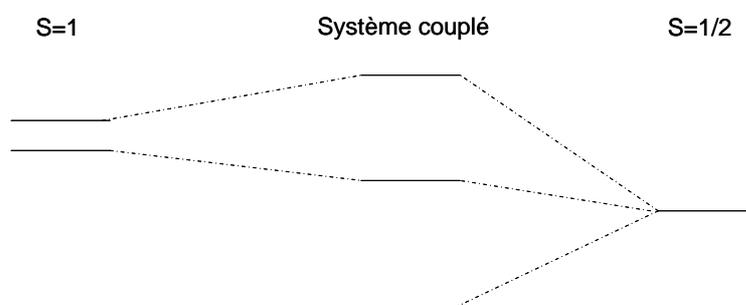


Schéma 2- 3 : Interaction d'échange dans un système couplé.

Cette interaction d'échange peut donc être décrite par un Hamiltonien dit Hamiltonien d'Heisenberg :

$$\hat{H}_e = -J\hat{S}_A\hat{S}_B \quad \text{Equation 2-42}$$

Si on considère deux centres paramagnétiques de spins électroniques S_A et S_B en interaction d'échange, l'Hamiltonien global s'écrit alors (Equation 2-43) :

$$\hat{H} = \hat{H}_A + \hat{H}_B - J\hat{S}_A\hat{S}_B + D\left[\hat{S}_{Az}\hat{S}_{Bz} - \frac{1}{3}S(S+1)\right] + E\left[\hat{S}_{Ax}\hat{S}_{Bx} - \hat{S}_{Ay}\hat{S}_{By}\right]$$

J représente l'interaction d'échange isotrope entre les deux ions métalliques. D et E sont associés aux interactions anisotropes (axiale et rhombique respectivement). Ils regroupent les termes provenant de la composante anisotrope de l'interaction d'échange, de l'interaction dipolaire entre les deux moments magnétiques d'origine électronique et de l'interaction d'échange pseudo-dipolaire faisant intervenir le couplage spin orbite.

Dans le cas où J est dominant, il est plus approprié de caractériser le système par le spin électronique total S

$$\hat{S} = \hat{S}_A + \hat{S}_B$$

$$|S_A - S_B| \leq S \leq S_A + S_B$$

Equation 2-44

Chaque état de spin peut être alors décrit par un nouvel Hamiltonien :

$$\hat{H}_S = \mu_B \hat{B}_0 [g_S] \hat{S} + D_S \left[\hat{S}_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) \right] + E_S \left[\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2 \right]$$

Equation 2-45

On retrouve une description analogue aux précédentes avec un terme décrivant l'interaction Zeeman et les termes axial et rhombique du ZFS global de l'état S. Il ne faut pas oublier l'effet de l'interaction d'échange sur l'énergie des états de spin S. Ceci se traduit pour chaque S par la contribution :

$$E_s = -\frac{J}{2} [S(S+1) - S_A(S_A+1) - S_B(S_B+1)]$$

Equation 2-46

De plus J possède deux composantes J_1 , qui est la composante ferromagnétique et J_2 qui est la composante antiferromagnétique. J_1 domine lorsque le recouvrement des orbitales est faible, et J_2 domine quand le recouvrement des orbitales est grand. Pour qu'il y ait interaction d'échange, il faut qu'il y ait un recouvrement des orbitales et plus ce recouvrement est important plus l'interaction est forte. Si le recouvrement des orbitales est direct, la valeur de J va être très sensible à l'orientation des orbitales mais également à la distance entre les centres paramagnétiques. Ainsi, quand la distance augmente l'interaction d'échange (donc J) diminue. Cependant, le recouvrement peut également être indirect, c'est-à-dire qu'il se fait *via* une espèce non paramagnétique, comme dans le cas de complexes où un ligand ponte les deux centres métalliques.

1.4-2 b) Cas du composé I.

Le composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}]^{24,25,26,27,28,29,30} est un composé avec un nombre impair de spins non appariés. Celui-ci est donc paramagnétique et possède un signal en spectroscopie RPE (figure 2-22).

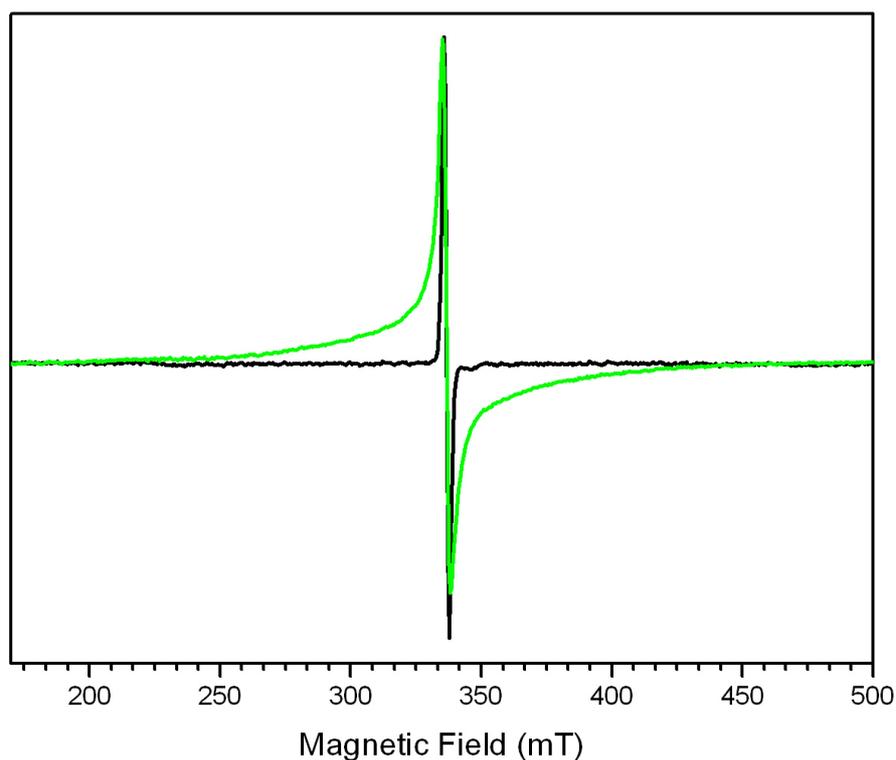


Figure 2- 22 : Spectre RPE en bande X du composé [Fe(IV)=O Por^{•+}] formé par réaction entre la peroxydase de raifort et l'acide peracétique (courbe verte). Pour comparaison le spectre RPE en bande x du radical tyrosyle formé par la catalase de foie de bœuf est représenté (courbe noire). D'après ce travail.

Etant donné que la porphyrine est une espèce organique, on s'attend à ce que le signal détecté, possède, comme tout radical organique, une résonance centrée à $g=2$ et que la largeur de raie soit relativement étroite (0,01T). Or d'après la littérature les spectres RPE de composés I des peroxydases montrent une résonance centrée à $g=2$ mais celui-ci est un spectre large ($>0,2T$) qui possède des ailes de part et d'autre de $g=2$. Ceci s'interprète en considérant l'interaction d'échange entre la partie ferryle [Fe(IV)=O] de spin $S=1$ et le radical organique de spin $S'=1/2$.

Le spectre RPE du composé I de la peroxydase de raifort peut être décrit en utilisant l'Hamiltonien suivant :

$$\hat{H} = D(\hat{S}_z^2 - S(S+1)/3) + E(\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2) + \mu_B \vec{S} \cdot [g] \cdot \vec{B} \quad \text{Equation 2-47}$$

S étant le spin effectif de l'état fondamental de l'atome de fer tel que la multiplicité $(2S+1)$ est le nombre total de sous états dans lequel l'état fondamental peut se diviser, $\vec{S} = (\hat{S}_x, \hat{S}_y, \hat{S}_z)$ est l'opérateur de spin et les paramètres D et E décrivent le ZFS axial et rhombique. Le dernier terme quand à lui représente l'interaction Zeeman dans un champ externe B . Cependant pour réellement décrire le composé I d'autres termes doivent être

ajoutés à l'Hamiltonien précédent, car le composé I contient un radical de spin $S'=1/2$ qui est en interaction d'échange avec le spin $S=1$ du fer hémique. L'Hamiltonien s'écrit alors :

$$\hat{H}' = \mu_B g \vec{S}' \cdot \vec{B} + \vec{S} [J] \vec{S}' \quad \text{Equation 2-48}$$

$[J]$ est le tenseur qui représente l'interaction.

Comme le fer ferryle a un ZFS large et positif, seul le doublet de Kramers de plus basse énergie du système couplé est peuplé aux températures auxquelles un signal RPE est détecté. Si on suppose le radical cation porphyrinique comme isotrope, c'est-à-dire que la résonance a lieu quand $g' \approx 2$ et si la rhombicité E/D n'est pas trop importante, le tenseur effectif g_{eff} du doublet fondamental a sa composante selon z qui diffère de 2 simplement au second ordre en J/D alors que les composantes selon x et y diffèrent de 2 au premier ordre en J/D , c'est-à-dire qu'elles vont être plus grandes ou plus petites que 2 selon le signe de J . D'après le modèle du champ de ligand, la direction z représente la normale au plan de l'hème, les axes x et y sont dans le plan de l'hème mais n'ont pas de directions prédéterminées. Il s'ensuit que le centre du signal RPE est proche de 2, correspond à $g_{eff,z}$ alors que les ailes de part et d'autres proviennent des composantes du plan de l'hème $g_{eff,x}$ et $g_{eff,y}$. En outre, l'interaction d'échange peut être antiferromagnétique ($J > 0$, $g_{eff} < 2$) aussi bien que ferromagnétique ($J < 0$, $g_{eff} > 2$).

La partie anisotrope de $-\hat{S} \cdot [J] \cdot \hat{S}'$ est proportionnelle à r^{-3} , r étant la distance entre les spins. La partie ferryle et le radical cation porphyrinique étant très proche spatialement, le couplage entre ces deux espèces devrait être important. On s'attend donc à ne pas détecter de spectre RPE car le phénomène d'interaction d'échange devrait avoir élargi le spectre au point de le faire disparaître. Il faut alors s'intéresser à la contribution du recouvrement des orbitales du métal et de ces ligands, contribution qui est difficile à évaluer. L'interaction d'échange, qui dépend du recouvrement des fonctions d'onde, devrait toutefois être sensible à l'énergie des orbitales $4p_z$ de l'atome de fer qui sont peu peuplées. La population des orbitales $4p_z$ dépend de la géométrie de l'hème, en particulier des distances avec les ligands axiaux. Dans tous les cas, la faible valeur du couplage s'explique par le manque de recouvrement orbitalaire entre les orbitales du Fe(IV) et celles du radical porphyrinique cationique.

De plus les propriétés de relaxation de l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ sont très différentes de celles d'un radical organique isolé non couplé magnétiquement avec l'atome de fer. A

cause de l'interaction d'échange entre le spin $S'=1/2$ du radical cation porphyrinique et le spin $S=1$ de la partie ferriyle du composé I, le signal RPE est large et le temps de relaxation T_1 est plus petit que celui d'un radical organique typique. Le temps de relaxation T_1 est fortement dépendant de la température et les valeurs de T_1 , pour lesquelles le rapport signal sur bruit est bon, sont obtenues lorsque la température est faible ($T < 10\text{K}$). En augmentant la température d'enregistrement du spectre RPE, le signal correspondant au radical porphyrinique va disparaître par élargissement de la raie. Ainsi il est possible de séparer la contribution de cette espèce au spectre RPE en augmentant la température d'enregistrement.

I.4-2 c) Les radicaux protéiques tyrosyle et tryptophanyle.

Les spectres RPE à 9 GHz des radicaux tyrosyles sont extrêmement variés^{31,32,33}. Cependant un fort couplage hyperfin dû aux protons β (figure 2-23), dont l'intensité dépend de l'orientation des protons β par rapport au plan phénolique, domine le spectre.

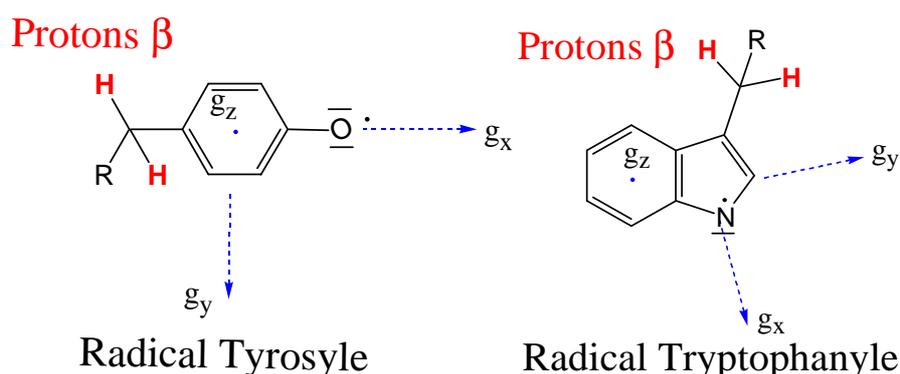


Figure 2-23: Radicaux tyrosyle et tryptophanyle ainsi que l'orientation du tenseur g

L'anisotropie du facteur g est donc masquée par ces couplages hyperfins. La résolution de l'anisotropie du facteur g nécessite un champ plus important, ce qui a conduit les chercheurs à développer la RPE à champ intense. Ce tenseur g dépend de l'architecture de la molécule, il peut donc être utilisé pour identifier la nature chimique des espèces radicalaires organiques (figure 2-24).

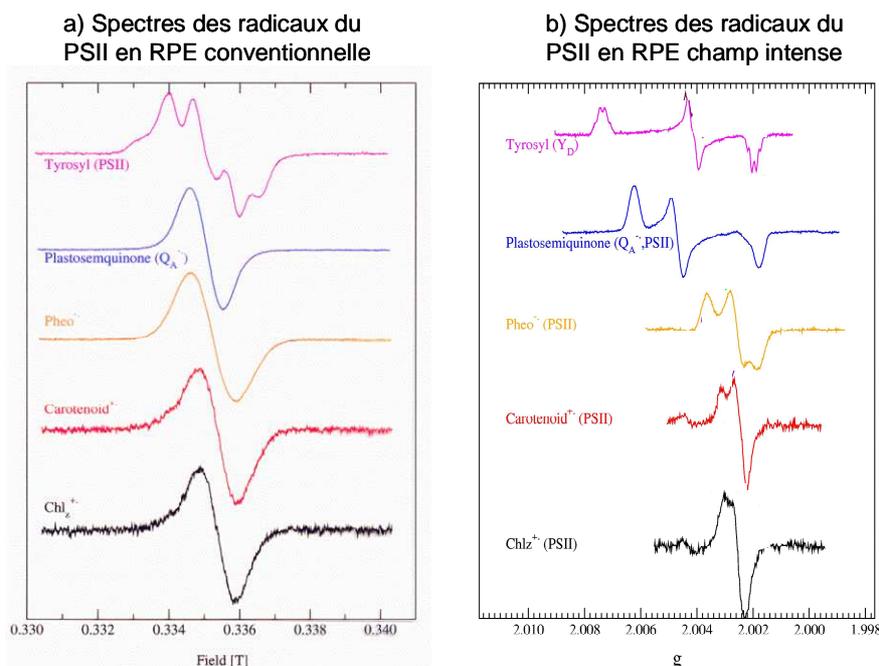


Figure 2-24: Spectres RPE des radicaux organiques formés par le PSII. A) Spectres enregistrés en RPE conventionnelle à 9 GHz, tous les spectres sont centrés en $g_{iso} = 1/3(g_x + g_y + g_z) \approx 2,002-2,004$. B) Spectres des mêmes radicaux enregistrés en RPE à champ intense

Les valeurs de g des radicaux dépendent également de la structure électronique de ces radicaux. Ainsi, elles peuvent servir de sondes pour les identifier et étudier leurs interactions avec leur environnement. Des études ont montré que dans le cas des radicaux tyrosyles, la valeur de g_x (et dans une moindre mesure g_y) est très sensible à l'environnement électrostatique du radical et en particulier l'oxygène phénolique (figure 2-25).

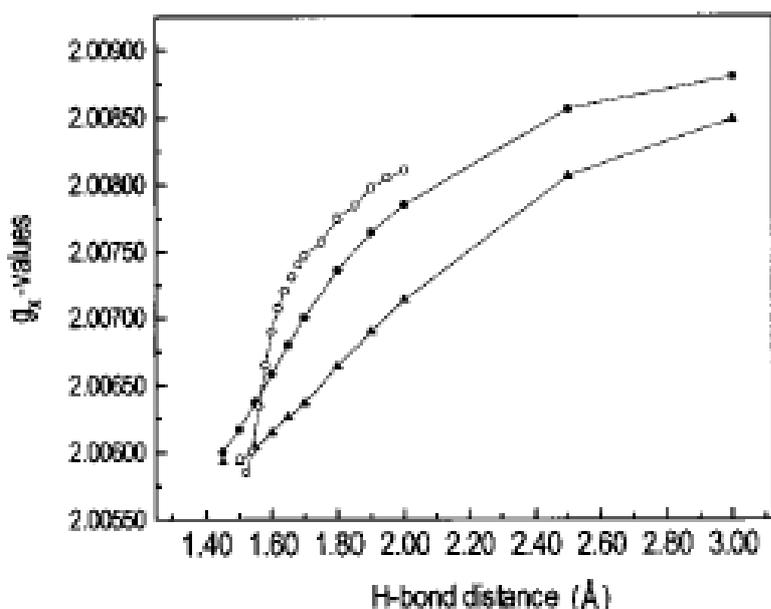


Figure 2-25 : Variation de la composante g_x (composante selon la direction de la liaison C-O) du radical *p*-méthylphénoxy en fonction de la distance de la liaison hydrogène avec une (courbe solide avec les cercles) ou deux (courbe solide avec les triangles) molécules d'eau. L'effet d'une molécule d'acide acétique en tant que donneur de liaison hydrogène est représenté par la courbe en pointillés avec les cercles. D'après Ivancich 1999³⁶.

L'anisotropie du facteur g pour le radical tyrosyle de la ribonucléotide réductase¹³ est très différente de celle de la tyrosine D du photosystème II^{13,34} ou du radical tyrosyle de la

catalase de foie de bœuf^{35,36} (figure 2-26). Ceci est dû aux différences au niveau des liaisons hydrogène^{13,37} qui sont des interactions électrostatiques.

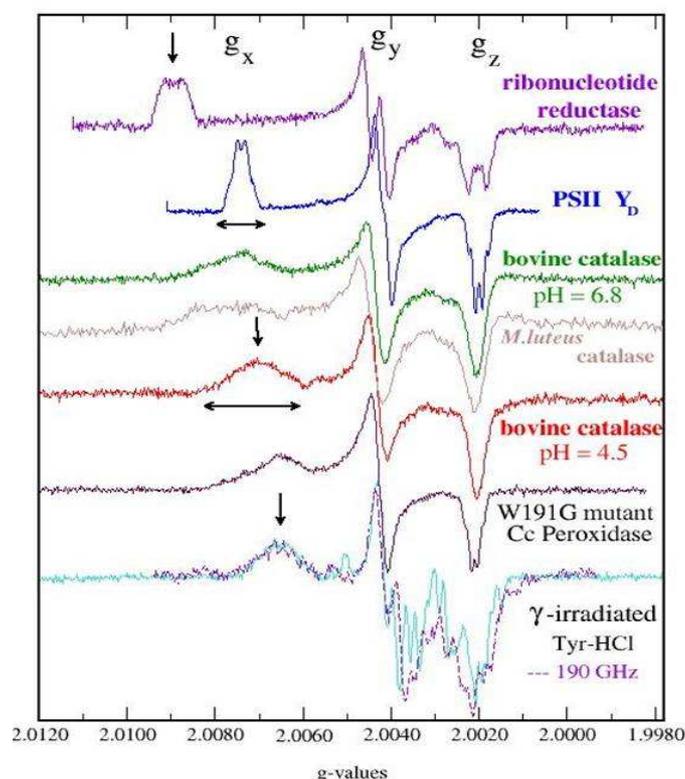


Figure 2- 26 : Spectres RPE en champ intense de différents radicaux tyrosyles observés. Les flèches indiquent les déplacements et les élargissements de la composante g_x en fonction du pH (cas de la catalase de foie de bœuf) et de la force des liaisons hydrogène. D'après Un¹³, Ivancich^{35,36}.

Dans le cas d'interactions électrostatiques moyennes (cas des liaisons hydrogène), l'effet principal, pour les radicaux tyrosyles, est un changement d'énergie des électrons non-liants. L'anisotropie du facteur g diminue lorsque l'on passe d'un radical tyrosyle isolé (par exemple celui de la RNR) à un radical avec liaison hydrogène forte (comme dans le cas des radicaux tyrosyles obtenus par irradiation de cristaux de tyrosine).

La RPE à champ intense est donc nécessaire non seulement pour déterminer la nature chimique des radicaux organiques formés au cours des cycles catalytiques des catalases et des catalase-peroxydases, mais également pour déterminer l'environnement électrostatique du radical, et donc sa localisation au sein de la protéine.

II. LA SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ELECTRONIQUE UV-VISIBLE.

La spectroscopie d'absorption électronique est un outil particulièrement efficace pour explorer les états excités d'une molécule ainsi que les différentes interactions qui peuvent se produire entre les états excités. Ces interactions sont de première importance dans des processus tels que les transferts d'électron³⁸, ou les réactions photochimiques³⁹. Les bandes provenant des transitions d-d permises par le spin sont visibles sur les spectres d'absorption électronique de nombreux complexes de métaux de transition. Ces bandes, par leur allure, leur intensité et leur position témoignent aussi bien de modifications géométriques de la structure à l'état excité que des interactions entre états électroniques excités.

II.1- PRINCIPES DE LA SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ELECTRONIQUE.

II.1-1 Généralités.

Lorsqu'une molécule interagit avec un rayonnement électromagnétique, celle-ci peut l'absorber et ainsi se retrouver dans un état appelé excité. Ce phénomène est à la base de la spectroscopie d'absorption électronique et correspond à une transformation de la structure électronique de la molécule sous l'effet d'une radiation électromagnétique. Un électron peut changer de nombre quantique de spin, ou changer d'orbitale moléculaire, entraînant ainsi une modification de la distribution électronique autour de la molécule. Il est possible, à partir de l'observation d'une molécule dans son état excité (*i.e.* analyse de son spectre d'absorption électronique), d'en déduire une corrélation entre ses propriétés physiques et ses propriétés électroniques.

Un spectre d'absorption électronique constitue un moyen précis d'observer le comportement d'une molécule sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique. A partir d'un montage expérimental très simple, il est possible de quantifier la nature du changement, c'est-à-dire d'évaluer exactement la proportion de lumière absorbée en fonction de la nature du rayonnement. Une molécule absorbe certaines radiations et en laisse passer d'autres : c'est le cas par exemple de n'importe quelle substance colorée.

Ainsi, chaque absorption électronique (révélée sur un spectre par l'apparition d'une bande plus ou moins intense et plus ou moins large) correspond à une transition vers un état

électronique (ou état excité) différent de celui de la molécule qui ne subit aucune influence électromagnétique (ou état fondamental).

Il est remarquable d'observer que des changements physiques peuvent avoir une influence sur l'énergie des états électroniques excités. Une substitution de ligands crée une déstabilisation ou une stabilisation de l'énergie des états excités, entraînant un déplacement des bandes spectroscopiques.

L'énergie des états électroniques dépend ainsi de la force du champ des ligands en ceci que différentes valeurs du champ des ligands donneront différentes valeurs énergétiques des états excités.

II.1-2 Introduction théorique.

II.1-2 a) Transitions électroniques.

L'interaction entre des ondes électromagnétiques et des molécules conduit, par absorption dans le domaine des ultraviolets et de la lumière visible, à l'excitation d'électrons, en général des électrons de valence. La figure 2-27 montre ces différents domaines du spectre électromagnétique. Le domaine des UV rejoint celui de la lumière visible pour l'œil humain à $\lambda=400$ nm et celui des proches infra rouges vers 750 nm.

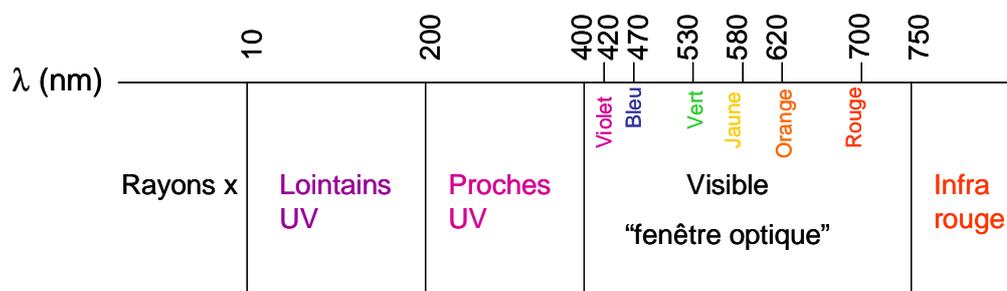


Figure 2- 27: Domaine UV-visible du spectre électromagnétique.

Si la lumière, de fréquence propre ν , rencontre une molécule dans son état fondamental ψ_0 , alors elle peut être absorbée et la molécule peut être portée dans un état électronique excité ψ_1 . Par émission spontanée ou stimulée, sous l'influence de l'onde lumineuse, le système peut revenir dans son état fondamental (figure 2-28).

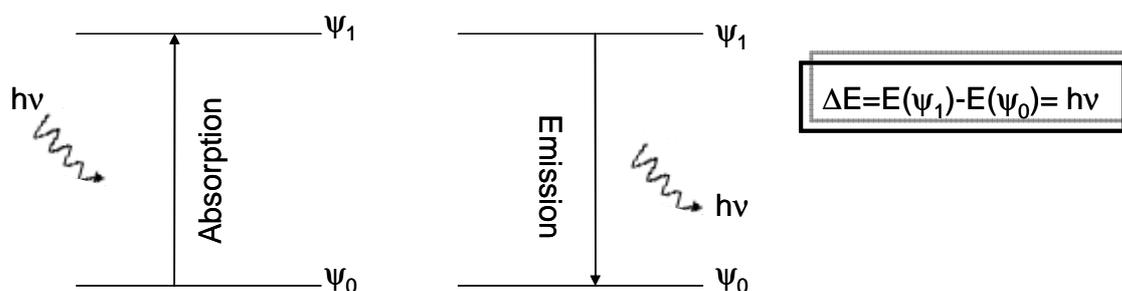


Figure 2-28: Transmissions électroniques et processus de rayonnement.

Au contraire de ceux des atomes, les différents états électroniques des molécules ont des domaines énergétiques relativement larges en raison de l'additivité des niveaux vibratoires et rotationnels. L'énergie totale d'un niveau déterminé correspond donc à un état de vibration et de rotation déterminé de la molécule.

En première approximation, on peut diviser, l'énergie totale en trois composantes :

$$E_{tot} = E_{elec.} + E_{vibr.} + E_{rot.} \quad \text{Equation 2-49}$$

Pour qu'une transition électronique ait lieu, il faut donc que :

$$\Delta E = \Delta E_{elec.} + \Delta E_{vibr.} + \Delta E_{rot.} \quad \text{Equation 2-50}$$

La composante électronique est toujours beaucoup plus grande que la composante vibrationnelle, qui elle-même est plus grande que la composante rotationnelle.

II.1-2 b) Absorption lumineuse et spectre associé.

Intensité des raies spectrales

Si un rayon lumineux d'intensité I_0 pénètre dans un milieu homogène isotrope d'épaisseur d , si l'on néglige les pertes par réflexion et diffraction, il peut être affaibli par absorption. L'intensité I du rayon sortant (transmission) vaut alors :

$$I = I_0 - I_{abs} \quad \text{Equation 2-51}$$

De l'équation différentielle de la perte d'intensité dI du rayon lumineux, occasionnée par la traversée d'un élément d'épaisseur dx :

$$dI = -\alpha \cdot I dx \quad \text{Equation 2-52}$$

On obtient, par intégration, l'équation 2-53 :

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha d} \quad \text{Equation 2-53}$$

où α est un coefficient d'absorption caractéristique du milieu. Si on considère uniquement des solutions diluées de concentration c , on obtient :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Equation 2-54}$$

Avec d l'épaisseur en cm, c la concentration en mol.L⁻¹ et ε le coefficient d'extinction molaire. Cette loi établie par Bouguer (1728), Lambert (1760) et Beer (1852) est valable pour une lumière monochromatique et des solutions diluées ($c \leq 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$). Sauf exception, l'absorption est une propriété additive.

Si pour tout λ , on détermine d'après la loi de Beer-Lambert l'absorption et la grandeur ε spécifique à la substance étudiée, on obtient un spectre d'absorption électronique de l'espèce spécifique. En raison de l'étendue énergétique des niveaux électroniques, il s'agit de spectres de bandes.

On peut classer les transitions électroniques (bandes) en fonction des orbitales moléculaires (OM) impliquées dans ces transitions. Un électron peut s'élever d'une orbitale σ ou π liante occupée ou des orbitales n non liantes dans les orbitales σ^* ou π^* antiliantes (figure 2-29).

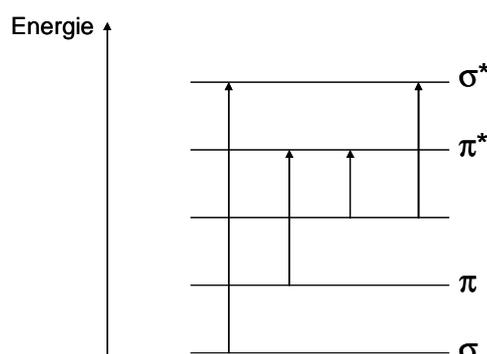


Figure 2- 30: Orbitales Moléculaires et transitions électroniques.

L'énergie des bandes d'absorption dépend de la nature de la transition électronique. La position des bandes est particulièrement influencée par les effets stériques inductifs et mésomériques. Un déplacement vers les grandes longueurs d'onde d'une transition est appelé un effet bathochrome. Un déplacement vers les longueurs d'ondes plus courtes est un effet hypsochrome. On parle d'effet hyperchrome lorsqu'on a une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption. L'hypochromie traduit, au contraire, une diminution de l'intensité de la bande d'absorption.

Structure vibrationnelle.

La forme et la structure sont d'autres propriétés importantes des bandes d'absorption. Les spectres en solution correspondent à la superposition des bandes électroniques et des bandes de vibrations. Spécifiques à la substance, les absorptions mesurées sont plus ou moins structurées. Après une transition électronique les noyaux d'une molécule sont soumis à diverses forces auxquelles la molécule peut réagir en se mettant à vibrer. Dans le cas d'échantillon gazeux, la structure vibrationnelle peut être résolue mais, dans un liquide les raies se mélangent donnant habituellement une large bande sous forme d'un continuum.

La structure vibrationnelle d'une transition électronique est expliquée par le principe de Frank-Condon⁴⁰ : **les noyaux ayant une masse beaucoup plus importante que les électrons, une transition électronique se produit beaucoup plus rapidement que la réponse des noyaux.**

Du fait de la transition, la densité électronique augmente rapidement dans de nouvelles régions de la molécule et disparaît dans d'autres, et les noyaux initialement statiques sont soudain soumis à un nouveau champ de forces. Ils répondent en vibrant et en oscillant autour de leur position d'origine.

Avant l'absorption, la molécule se trouve dans l'état vibrationnel inférieur à son état énergétique le plus bas. La position la plus probable des noyaux correspond à leur distance à l'équilibre. C'est cette distance internucléaire qui est la plus favorable à la transition électronique. Quand la transition a lieu, la molécule est excitée et d'après le principe de Frank-Condon, le squelette nucléaire est inchangé par cette excitation. Pour l'interférence des bandes de vibrations avec les bandes électroniques, on détermine deux types de cas limites, reconnaissables à la forme de l'absorption.

II.1-2 c) Types particuliers de transitions.

Il y a des transitions permises et des transitions interdites. Pour les complexes des éléments de transition, les règles de sélection pour les transitions électroniques sont les suivantes :

Règle de Laporte : les seules transitions permises sont des transitions accompagnées d'un changement de parité..

Règle de spin : les transitions donnant lieu à un changement de la multiplicité du spin (donc $\Delta S \neq 0$) sont interdites. Autrement dit, pendant la transition, le nombre d'électrons célibataires ne doit pas varier.

Ces règles interdisent donc les transitions d-d. En réalité, ces transitions sont expérimentalement observées. La règle de Laporte n'est rigoureusement valable que pour des complexes centrosymétriques. Mais du fait de l'agitation thermique (vibrations), la symétrie des complexes varie rapidement dans le temps ce qui a pour conséquence une probabilité de transition non nulle. Les transitions sont donc observées mais avec une intensité faible.

La règle de spin n'est pas valable dans le cas d'un couplage spin-orbite, c'est-à-dire que les transitions correspondantes peuvent être observées, mais avec une intensité très faible.

Transitions d-d

Dans un atome à l'état libre, les cinq orbitales $3d$ sont dégénérées. Dans les complexes des métaux de transition, où l'environnement immédiat de l'atome n'est plus sphérique, les orbitales d ne sont pas toutes dégénérées et les électrons peuvent absorber de l'énergie en effectuant des transitions entre ces orbitales. Comme nous l'avons déjà précisé auparavant, dans un complexe octaédrique, les cinq orbitales d de l'atome central se séparent en deux ensembles : un ensemble trois fois dégénéré noté t_{2g} et un ensemble deux fois dégénéré noté e_g , les orbitales t_{2g} étant de plus basses en énergie. Dans un complexe tétraédrique, les orbitales d se répartissent également en deux sous ensembles mais les orbitales e sont cette fois-ci les orbitales de plus basse énergie. Les séparations n'étant pas importantes, bien que ce soit des transitions électroniques, les transitions entre les deux ensembles d'orbitales se produisent dans la région visible du spectre et sont responsables des couleurs très caractéristiques des complexes des métaux du groupe d .

Transitions vibroniques.

Dans le cas des complexes octaédriques, l'interprétation des spectres visibles pose un problème majeur car leurs transitions d-d sont interdites.

Cependant une transition interdite peut devenir permise si le centre de symétrie est détruit par une vibration asymétrique. Quand le centre de symétrie disparaît, les transitions d-d ne sont plus interdites par la parité et la transition $t_{2g} \rightarrow e_g$ devient faiblement permise. Une transition dont l'intensité dérive d'une vibration asymétrique de la molécule est appelée transition vibronique.

Transitions par transfert de charge

Un complexe peut absorber une radiation du fait d'un transfert d'un électron des ligands vers les orbitales d de l'atome central, ou vice-versa. Dans ce type de transition, par transfert de charge, l'électron est transféré sur une grande distance, ce qui signifie que le moment dipolaire de transition peut être important et l'absorption intense.

Transitions $\pi \rightarrow \pi^$ et $n \rightarrow \pi^*$*

Dans le cas d'une double liaison C=C, l'absorption fait passer un électron π -liant dans une orbitale π^* antiliante. L'activité des chromophores est donc due à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Dans les composés carbonylés, la transition responsable de l'absorption est due aux paires d'électrons libres de l'atome d'oxygène. L'un de ces électrons peut être excité vers une orbitale π^* vide du groupe carbonyle, donnant ainsi lieu à une transition $n \rightarrow \pi^*$. Les transitions $n \rightarrow \pi^*$ des carbonyles étant interdites par symétrie, les absorptions sont faibles.

**II.2- SPECTRES D'ABSORPTION ELECTRONIQUES DES ESPECES ETUDIEES
DANS CE TRAVAIL.**

Les protéines étudiées dans le cadre de ce travail de thèse sont des hémoprotéines. Le groupe prosthétique est constitué d'une protoporphyrine IX de fer. Le spectre d'absorption électronique dans la région du visible de ces protéines reflète essentiellement la structure de la porphyrine. Cependant, la configuration électronique locale de l'atome de fer héminique perturbe le spectre de la porphyrine. Ainsi, il est possible de distinguer en spectroscopie d'absorption l'enzyme native, dans laquelle l'atome de fer est au degré d'oxydation III spin fort, le composé I, de configuration électronique $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ et le composé II de configuration électronique $[\text{Fe(IV)=O}]$. De même, La configuration électronique de la porphyrine est influencée par les interactions entre le fer héminique et les ligands en cinquième et sixième positions. La nature de ces perturbations est telle que le spectre d'absorption correspond à une signature d'une structure électronique.

II.2-1 La porphyrine

II.2-1 a) Généralités sur les porphyrines.

Structure.

Les porphyrines sont des macrocycles fortement conjugués, constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthine. Le squelette de base est aromatique à 22 électrons π dont 18 participent à l'aromaticité. Trois types d'atomes de carbone peuvent être distingués dans ces molécules, que l'on note respectivement α , β , et *meso*. Le schéma suivant représente la plus simple des porphyrines (la porphine).

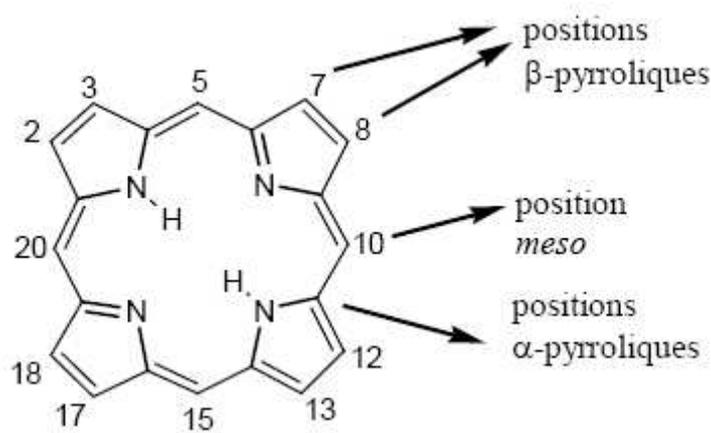


Schéma 2- 4: structure de la porphine et nomenclature des porphyrines.

Les porphyrines peuvent être classées selon les substituants portés par les atomes de carbone β .

Géométrie du cycle.

Les porphyrines sont des macrocycles relativement flexibles. Des études structurales en phase solide ont mis en évidence l'existence de différentes conformations possibles pour ce macrocycle, représentées par le schéma suivant :

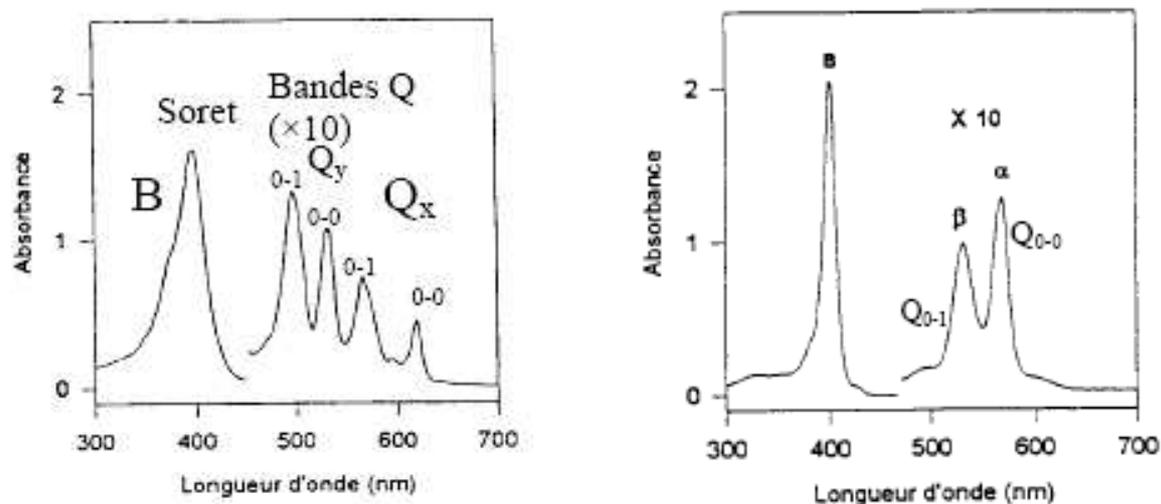


Figure 2-31 : Spectres d'absorption UV-Vis d'une porphyrine base libre (gauche) et d'une métalloporphyrine (droite). Les bandes ont été nommées en utilisant la nomenclature de Platt-Gouterman. D'après Gouterman 1961⁴².

Les facteurs qui déterminent l'adoption d'une conformation en particulier sont diverses :

La nature des substituants du macrocycle.

La nature et le degré d'oxydation du métal complexé.

La nature des coordinats supplémentaires présents sur le métal.

L'environnement du macrocycle dans la maille cristalline

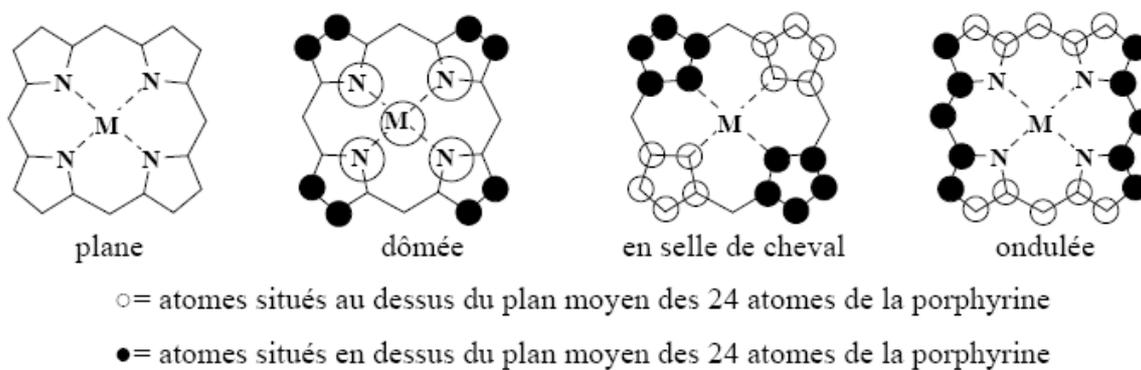


Schéma 2- 1: Conformations les plus rencontrées des porphyrines. D'après Gouterman 1961⁴².

II.2-1 b) Caractéristiques spectrales.

En raison de leur structure électronique particulière, les porphyrines sont des molécules très colorées. En effet, les porphyrines possèdent un système d'électrons π

fortement conjugué, elles absorbent donc dans le domaine du visible et ont un spectre très caractéristique. Elles présentent dans le domaine de l'ultra-violet et du visible deux types de bandes d'absorption électronique, attribuées à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$:

Une bande très intense ($\epsilon \geq 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) située entre 380 et 450 nm, appelée bande de Soret. Elle est caractéristique de l'aromaticité de la molécule.

Une série de bandes dans le visible appelée bandes Q, moins intenses ($\epsilon \sim 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) mais néanmoins responsables de la couleur des porphyrines. Le nombre de bandes Q permet généralement de distinguer les porphyrines bases libres et les métallo-porphyrines. Les bases libres présentent quatre bandes Q⁴¹ tandis que les porphyrines métallées, qui sont plus symétriques, ne présentent que deux (figure 2-31) bandes Q, appelées α et β en partant des grandes longueurs d'ondes. L'énergie et l'intensité de ces bandes dépendent de l'identité des substituants de la porphyrine, du métal, des ligands additionnels sur le métal, des déformations du macrocycle, du solvant. En particulier, les intensités relatives des bandes α et β ne dépendent pas de la substitution du macrocycle, par contre, la nature de l'ion métallique fixé, et par conséquent la plus ou moins grande stabilité du complexe porphyrine-métal, engendrent d'importantes modifications du rapport des intensités de ces deux bandes. En effet, un rapport d'intensité $\alpha/\beta > 1$ indique généralement la présence d'un métal impliqué dans un complexe plan. Par contre, lorsque le métal peut être facilement remplacé par deux protons, on observe un rapport $\alpha/\beta < 1$.

Ces différentes bandes d'absorption peuvent être interprétées en faisant appel au « modèle à quatre orbitales » de Gouterman⁴². Ces quatre orbitales frontières π (2 LUMO et 2 HOMO) sont représentées sur la figure 2-32 dans le cas d'une porphyrine très symétrique (axes x et y équivalents).

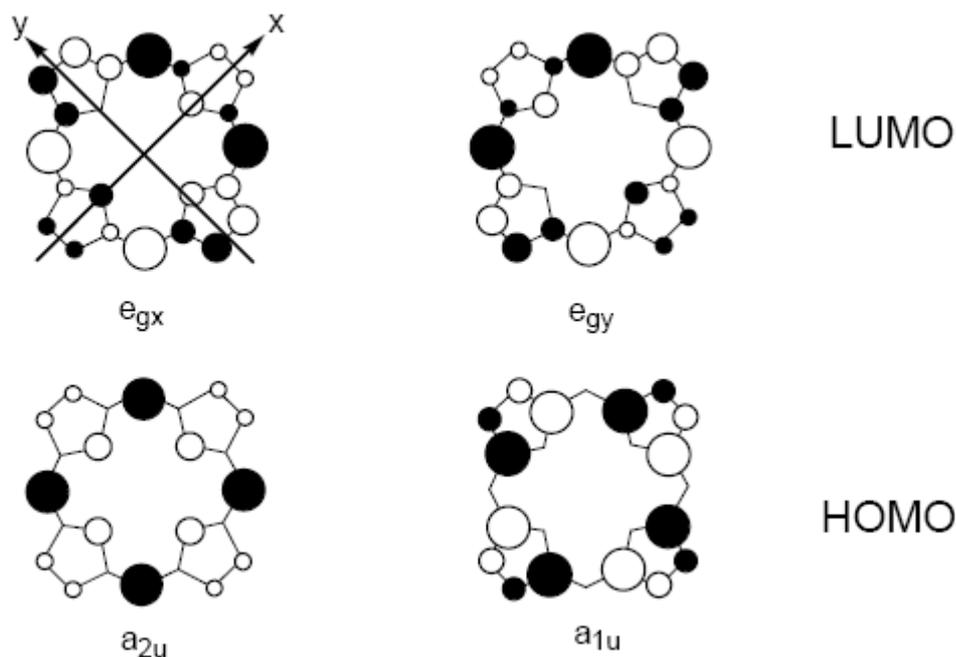


Figure 2- 32: Orbitales frontières des porphyrines. D'après Gouterman 1961⁴².

De manière générale, l'ordre énergétique de ces orbitales dépend des substituants des positions β ou *meso*- pyrroliques de la porphyrine.

La bande de Soret correspond à une transition permise entre l'état fondamental et le deuxième état excité singulet de la porphyrine. Il y a donc promotion d'un électron d'une orbitale a_{1u} vers les orbitales e_g . Les bandes Q correspondent à des transitions interdites entre l'état fondamental et le premier état excité singulet. Il y a donc promotion d'un électron de l'orbitale a_{2u} vers les orbitales e_g . Cette transition électronique s'accompagne en général d'une structure vibrationnelle.

Lorsqu'elles sont métallées, les porphyrines présentent des bandes d'absorption électronique dans le visible et le proche infrarouge (vers 500 nm et 640 nm). Ces bandes sont dues à des transferts de charges entre le ligand et le métal.

II.2-2 Les espèces protéiques.

II.2-2 a) L'enzyme natif : *Fe(III) spin fort*.

Les bandes d'absorption des peroxydases et les catalases dans le visible et l'ultraviolet proche (Soret) sont de deux types. Elles sont dues à des interactions $\pi \rightarrow \pi^*$ ou à des transitions de transfert de charge. Trois bandes d'absorption électronique sont observées, la bande de Soret, la bande β et la bande α . La transition qui correspond à la bande α , provient de la promotion d'un électron de l'état a_{2u} à l'état π^* , supérieur en énergie, qui est appelé e_g .

La bande β , représente la transition d'un électron de l'état a_{2u} vers un niveau vibrationnel excité de l'état e_g . La bande de Soret, quant à elle, correspond à la transition d'un électron de l'état a_{1u} vers l'état e_g .

L'atome fer n'a ses orbitales d que partiellement remplies, ce qui implique que la métallo-porphyrine est irrégulière. D'autres transitions peuvent alors être observées. Ces transitions correspondent à des transitions de transfert de charge, dans lesquelles des électrons sont transférés de la HOMO (*highest occupied molecular orbital*) de la porphyrine à la LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) de l'atome de fer. De plus, les orbitales de l'atome de fer et les orbitales de la porphyrine sont en interaction entre elles et les transitions observées dans le cas de porphyrines de fer sont plus intenses que dans le cas de porphyrines base-libre.

II.2-2 b) Les composés oxoferryles: $[Fe(IV)=O \text{ Por}^{\bullet+}]$ et $[Fe(IV)=O]$, $[Fe(IV)=O \text{ Tyr}^{\bullet}]$, $[Fe(IV)=O \text{ Trp}^{\bullet}]$.

Le spectre du composé I $[Fe(IV)=O \text{ Por}^{\bullet+}]$ en spectroscopie d'absorption électronique UV-visible possède une bande aux alentours de 400-410 nm, une large bande aux alentours de 660 nm et une bande aux environs de 570-580 nm^{43,44}. La première correspond à la bande de Soret et la dernière à la bande α . L'intensité de ces deux bandes, par comparaison avec le spectre de l'enzyme native, est largement réduite. Ceci traduit le fait que la porphyrine est en interaction avec l'atome de fer central. En effet, dans le cas du composé l'intensité de la bande de Soret diminue de 50 à 60 %. Ceci est causé par la superposition de transitions de transfert de charge entre la porphyrine et le métal. Plus la contribution des transitions dues aux transferts de charge est importante, plus l'intensité de la bande de Soret est diminuée. Les bandes présentes dans la région 600-700 nm correspondent à des bandes de transferts de charge.

Lorsqu'on écrit les formes mésomères du composé I $[Fe(IV)=O \text{ Por}^{\bullet+}]$, il apparaît une forme où l'atome de fer est sous forme Fe(V). Pour le composé II, il n'est pas possible d'écrire une telle forme. L'environnement électronique de l'atome de fer est donc différent entre le composé I et le composé II, ce qui se caractérise sur le spectre d'absorption électronique UV-visible par un déplacement de la bande de Soret ainsi que des bandes Q. De plus, la bande aux alentours de 650-660 nm caractéristique du radical π cation porphyrinique disparaît car le radical n'est plus présent.

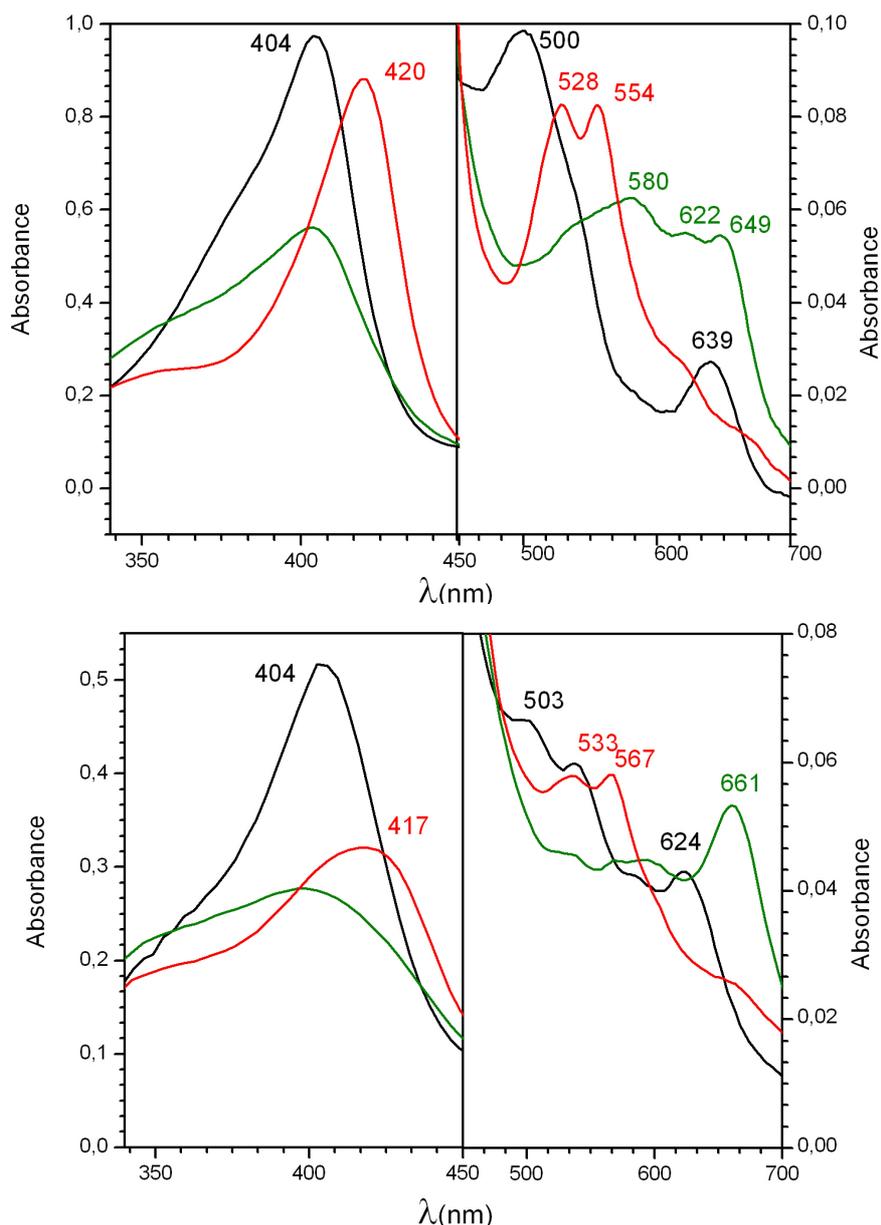


Figure 2- 33: Spectre d'absorption électronique UV-visible de la peroxydase de raifort (haut) et de la catalase humaine (bas). Pour les deux hémoprotéines le spectre en noir correspond à l'enzyme native ; en vert au composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}]; et en rouge le composé II [Fe(IV)=O] pour la HRP et le composé [Fe(IV)=O Tyr[•]] pour la catalase humaine. D'après ce travail.

Dans le cadre de ce travail de thèse, des intermédiaires de structures électroniques [Fe(IV)=O Tyr[•]] et [Fe(IV)=O Trp[•]] ont été mis en évidence (voir chapitres suivants). Le spectre d'absorption électronique de telles espèces ne diffère pas de l'espèce oxoferryle [Fe(IV)=O]. La tyrosine sous forme radicalaire absorbe vers 405-410 nm^{45,46,47}, alors que le radical tryptophane sous forme radicalaire neutre absorbe vers 510 nm et vers 560 nm lorsqu'il est sous forme radical cation^{48,47}. En outre, les protéines étudiées contiennent une vingtaine de résidus tyrosines et tryptophanes et un seul de ces résidus forme un radical. L'absorption électronique des radicaux protéiques est donc masquée par l'absorption de la porphyrine. De plus, les radicaux protéiques formés ne sont pas en interaction d'échange avec

l'atome de fer héminique car ils sont relativement éloignés de l'hème, ainsi ils n'influencent pas sur l'environnement électronique de la partie ferryle et n'influencent pas sur le spectre d'absorption.

III. APPROCHE GENERALE.

L'approche générale pour l'étude des intermédiaires réactionnels formés par les catalases et les catalase-peroxydase est la suivante :

1) Caractérisation des états natifs et des intermédiaires par spectroscopie RPE conventionnelle.

Avant toute réaction, le spectre RPE de l'enzyme native est enregistré à basse température permet de quantifier la protéine sous forme spin faible, qui sera inactive par rapport au substrat. Cette étape inclut également le titrage de l'excès de réactif par rapport à l'enzyme et le titrage en pH pour chaque état intermédiaire. Le rendement de la réaction en radical est également calculé à partir des spectres RPE. L'obtention des profils de saturation en puissance des différents intermédiaires est également réalisée pour identifier les radicaux formés.

2) Spectroscopie d'absorption électronique UV-visible.

Comme le fer sous l'état oxoferryle n'a pas de signal RPE, des données complémentaires sont obtenues grâce à la spectroscopie d'absorption électronique. Ceci permet de comparer la nature des intermédiaires mis en évidence par spectroscopie RPE avec les données disponibles dans la littérature.

3) Spectroscopie RPE à champ intense.

L'utilisation de la spectroscopie RPE à champ intense nous permet de résoudre l'anisotropie du facteur g ainsi que les couplages hyperfins pour les radicaux organiques. Ainsi, grâce à cette technique, nous sommes capables de sonder l'environnement du radical tyrosyle.

4) Spectroscopie d'absorption électronique UV-visible à mélange rapide (Stopped-flow).

Afin de pouvoir corréler les résultats obtenus en spectroscopie RPE, qui sont obtenus dans des conditions expérimentales très différentes de celles des études cinétiques classiques, nous utilisons la technique du stopped-flow.

CONCLUSIONS

Comme nous l'avons décrit précédemment, la **spectroscopie RPE** nous informe sur :

1) L'environnement de l'atome de fer dans l'enzyme natif.

Les valeurs de g et la forme du spectre nous renseignent sur la **géométrie de l'hème** mais également sur **l'état du spin du fer** au sein de l'hème.

2) Les intermédiaires radicalaires formés.

Les études de saturation du signal RPE, permettent de déterminer la **nature de l'espèce radicalaire formée**. Comme nous l'avons expliqué, le composé I ne sature qu'à de fortes puissances, mais il disparaît, par élargissement de la raie, à des températures supérieures à 30K (phénomène de relaxation). Par contre, les radicaux protéiques isolés saturent à basse puissance et à très basse température (4K). Lorsqu'un radical protéique est en interaction magnétique avec le centre métallique, les propriétés de saturation sont différentes de celles du radical isolé. En jouant sur la puissance et la température, nous sommes ainsi capables de distinguer le radical porphyrinique cationique des radicaux protéiques isolés, ainsi que des radicaux protéiques en interaction magnétique avec le fer héminique.

3) Le **rendement de la réaction en radical**.

Nous sommes capables de distinguer les radicaux formés par des réactions secondaires des réels intermédiaires radicalaires.

4) Sur la **nature chimique des radicaux protéiques**.

En utilisant la **RPE à champ intense**, l'anisotropie du facteur g ainsi que les couplages hyperfins sont résolus. Il est, ainsi, possible de faire la distinction entre un radical tryptophanyle et un radical tyrosyle. De plus, selon la valeur de la composante g_x du tenseur g il est possible de déterminer l'environnement du radical formé.

L'utilisation de la RPE ne permet pas d'observer le fer héminique lorsque celui-ci est sous forme ferryle [Fe(IV)=O]. Pour cela nous utilisons **la spectroscopie d'absorption électronique UV-visible** et en particulier la technique du **stopped-flow**. Ces techniques sont particulièrement adaptées à l'étude des hémoprotéines qui sont des protéines colorées et qui absorbent dans la région UV-visible du spectre électromagnétique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- 1 P. C. Taylor, J. F. Baugher and H. M. Kriz, Magnetic Resonance Spectra in Polycrystalline Solids, *Chem. Rev.*, **1975**, 75, 203-240.
- 2 C. P. Slichter, Principles of Magnetic Resonance. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, **1990**.
- 3 J. A. Weil, J. R. Bolton and J. E. Wertz, Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications. Wiley interscience, **1994**.
- 3 P. Turek, Cours de spectroscopie de résonance paramagnétique électronique.
- 4 F. E. Mabbs and D. Collison, Electron Paramagnetic Resonance of d Transition Metal Compounds, Vol 16, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands., **1992**.
- 5 A. Abragam and B. Bleaney, Résonance Paramagnétique Electronique des Ions de Transition, Institut national des sciences et technique nucléaires, Presses universitaires de France., **1971**.
- 6 D. J. E. Ingram, Biological and biochemical applications of Electron Spin Resonance, Adam Hilger., **1969**.
- 7 A. E. Meier, M. M. Whittaker and J. W. Whittaker, EPR Polarization Studies on Mn Catalase from *Lactobacillus plantarum*, *Biochemistry*, **1996**, 35, 348-360.
- 8 L. Le Pape, B. Lamotte, J. Mouesca and G. Rius, Paramagnetic States of Four Iron-Four Sulfur Clusters. 1. EPR Single-Crystal Study of 3+ and 1+ Clusters of an Asymmetrical Model Compound and General Model for the Interpretation of the g-Tensor of These Two Redox States., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9757-9770.
- 9 S. K. Smoke, J. Teller, B. A. Bernad, C. L. Rife, R. N. Armstrong and B. M. Hoffman, EPR Study of Substrate Binding to the Man(II) active site of the Bacterial Antibiotic Resistance Enzyme Forsa: A Better Way to Examine Man(II). *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2318-2326.
- 10 B. S. Antharavally, R. R. Poyner and P. W. Ludden, EPR Spectral Evidence for a Binuclear Mn(II) Center in Dinitrogenase Reductase-Activating Glycohydrolase from *Rhodospirillum rubrum*., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8897-8898.
- 11 B. E. Schultz, B.-H. Ye, X.-y. Li and S. I. Chan, Electronic Paramagnetic Resonance and Magnetic Properties of Model Complexes for Binuclear Active Sites in Hydrolase Enzymes., *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 2617-2622.
- 12 J. B. Innes and G. W. Brudvig, Location and Magnetic Relaxation Properties of the Stable Tyrosine Radical in Photosystem II., *Biochemistry*, **1989**, 28, 1116-1125.
- 13 S. Un, M. Atta, M. Fontecave and A. W. Rutherford, g-values as a Probe of the Local Protein Environment: High-Field EPR of Tyrosyl Radicals in Ribonucleotide Reductase and Photosystem II., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 10713-10719.
- 14 K. V. Lakshmi, M. J. Reifler, G. W. Brudvig, O. G. Poluektov, A. M. Wagner and M. C. Thurnauer, High-Field EPR Study of Carotenoid and Chlorophyll Cation Radicals in Photosystem II., *J. Phys. Chem. B.*, **2000**, 104, 10445-10448.
- 15 A. Ivancich, G. Mazza and A. Desbois, Comparative Electron Paramagnetic Resonance Study of Radical Intermediates in Turnip Peroxidase Isozymes, *Biochemistry*, **2001**, 40, 6860-6866.

- 16 S. Un, C. Gerez, E. Ellingand and M. Fontecave, Sensitivity of Tyrosyl Radical g-Values to Changes in Protein Structure: A High-Field EPR Study of Mutants Of Ribonucleotide Reductase, *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, *123*, 3048-3054.
- 17 G. Bleifuss, M. Kolberg, S. Potsch, W. Hofbauer, R. Bittl, W. Lubitz, A. Graslund, G. Lassmann and F. Lenzian, Tryptophan and Tyrosine Radicals in Ribonucleotide Reductase: A Comparative High-Field EPR Study at 94 GHz., *Biochemistry*, **2001**, *40*, 15362-15368.
- 18 A. Ivancich, P. Dorlet, D. B. Goodin and S. Un, Multifrequency High-Field EPR Study of the Tryptophanyl and Tyrosyl Radical Intermediates in Wild-type and the W191G Mutant of Cytochrome c Peroxidase, *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, *123*, 5050-5058.
- 19 S. Un, X. S. Tang and B. A. Diner, 245 GHz High-Field EPR Study of Tyrosine-D and Tyrosine-Z in Mutants of Photosystem II., *Biochemistry*, **1996**, *35*, 679-684.
- 20 W. Lubitz, F. Lenzian and R. Bittl, Radicals, Radical Pairs and Triplet States in Photosynthesis, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 313-320.
- 21 F. Muller, M. A. Hopkins, N. Coron, M. Grynberg, L. C. Brunel and G. Martinez, A high magnetic field EPR spectrometer, *Rev. Sci. Instrum.*, **1989**, *60*, 3681-3684.
- 21 P. Dorlet. Thèse de doctorat, **2001**.
- 22 J. Peisach, S. Blumberg, S. Ogawa, E. A. Rachmilewitz and R. Oltzik, The effects of Protein Conformation on the Heme Symmetry in High Spin Ferric Heme Proteins as Studied by Electron Paramagnetic Resonance., *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 3342-3355.
- 23 A. Bencini and D. Gatteschi, EPR of Exchange Coupled Systems. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York., **1990**,
- 24 M. J. Benceky, J. E. Frew, N. Scowen, P. Jones and B. M. Hoffman, EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 11929-11933.
- 25 D. Dolphin, A. Forman, D. C. Borg, J. Fajer and R. H. Felton, Compound I of Catalase and Horse-Radish Peroxidase: pi-Cation Radicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1971**, *68*, 614-618.
- 26 C. E. Schulz, P. W. Devaney, H. Winkler, P. G. Debrunner, N. Doan, R. Chiang, R. Rutter and L. P. Hager, Horseradish Peroxidase Compound I: Evidence for spin coupling between the heme iron and a 'free' radical, *FEBS Lett.*, **1979**, *130*, 102-105.
- 27 C. E. Schulz, R. Rutter, J. T. Sage, P. G. Debrunner and L. P. Hager, Mössbauer and Electron Paramagnetic Resonance Studies of Horseradish Peroxidase and Its Catalytic Intermediates., *Biochemistry*, **1984**, *23*, 4773-4754.
- 28 A. L. P. Houseman, P. E. Doan, D. B. Goodin and B. M. Hoffman, Comprehensive Explanation of the Anomalous EPR Spectra of Wild-Type and Mutant Cytochrome c Peroxidase Compound ES., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 4430-4443.
- 29 R. Rutter, M. Valentine, M. P. Hendrich, L. P. Hager and P. G. Debrunner, Chemical Nature of the Porphyrine pi-Cation Radical in Horseradish Peroxidase Compound I., *Biochemistry*, **1983**, *22*, 4769-4774.
- 30 J. T. Colvin, R. Rutter, H. J. Stapleton and L. P. Hager, Zero-Field Splitting of Fe³⁺ in Horseradish Peroxidase and of Fe⁴⁺ in Horseradish Peroxidase Compound I from Electron Spin Relaxation Data., *Biophys. J.*, **1983**, *41*, 105-108.
- 31 C. W. Hoganson and G. T. Babcock, Electron-Transfer Events near the Reaction Center in O₂ Evolving Photosystem II., *Biochemistry*, **1988**, *27*, 5848-5855.

- 32 G. Lassmann, R. Odenwaller, J. F. Curtis, J. A. DeGray, R. P. Mason, L. J. Marnett and T. E. Eling, Electron Spin Resonance Investigation of Tyrosyl Radicals of Prostaglandin H Synthase. Relation to Enzyme Catalysis, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 20045-20055.
- 33 C. Galli, M. Atta, K. Andersson, A. Graslund and G. W. Brudvig, Variations of the Diferric Exchange Coupling in the R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase from Four Species as Determined by Saturation-Recovery EPR Spectroscopy., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 740-746.
- 34 S. Un, X.-S. Tang and B. A. Diner, 245GHz High-Field EPR Study of Tyrosine-D° and Tyrosine-Z° in Mutants of Photosystem II., *Biochemistry*, **1996**, 35, 679-684.
- 35 A. Ivancich, H. M. Jouve and J. Gaillard, EPR Evidence for a Tyrosyl Radical Intermediate in Bovine Liver Catalase., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 12852-12853.
- 36 A. Ivancich, T. A. Mattioli and S. Un, Effect of Protein Microenvironment on Tyrosyl Radicals. A High-Field (285GHz) EPR, Resonance Raman and Hybrid Density Functional Study, *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121, 5742-5753.
- 37 M. Engström, F. Himo, A. Graslund, B. Minaev, O. Vahtras and H. Agren, Hydrogen Bonding to Tyrosyl Radical Analyzed by Ab Initio g-Tensor Calculations, *J. Phys. Chem. A.*, **2000**, 104, 5149-5153.
- 38 G. Valverde-Aguilar, X. Wang, S. F. Nelsen and J. I. Zink, Photoinduced Electron Transfer in 2-tert-Butyl-3-(Anthracen-9-yl)-2,3-Diazabicyclo[2.2.2]octane., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6180-6185.
- 39 D. Romstad, G. Granucci and M. Persico, Nonadiabatic transitions and interference in photodissociation dynamics., *Chem. Phys.*, **1997**, 219, 21-30.
- 40 E. U. Condon, Nuclear Motions Associated With Electron Transitions in Diatomic Molecules., *Phys. Rev.*, **1928**, 32, 858-872.
- 41 M. Gouterman, Study of the effects of substitution of the absorption spectra of porphyrin., *J. Chem. Phys.*, **1959**, 30, 1139.
- 42 M. Gouterman, Spectra of Porphyrins, *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1961**, 6, 138-163.
- 43 G. R. Schonbaum and S. Lo, Interaction of Peroxidases with Aromatic Peracids and Alkyl Peroxides., *J. Biol. Chem.*, **1972**, 247, 3353-3360.
- 44 J. S. Stillman, M. J. Stillman and H. B. Dunford, Photochemical Reactions of Horseradish Peroxidase Compounds I and II at Room Temperature and 10K, *Biochemistry*, **1975**, 14, 3183-3188.
- 45 S. Solar, W. Solar and N. Getoff, Reactivity of OH with Tyrosine in Aqueous Solution Studied by Pulse Radiolysis, *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88, 2091-2095.
- 46 J. Feitelson and E. Hayon, Electron Ejection and Electron Capture by Phenolic Compounds, *J. Phys. Chem.*, **1973**, 77, 10-15.
- 47 W. A. Prütz and E. J. Land, Charge transfer in peptides. Pulse radiolysis investigation of one-electron reactions in dipeptides of tryptophan and tyrosine, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1979**, 36, 513-520.
- 48 S. Solar and N. Getoff, Oxidation of Tryptophan and *N*-Methylindole by N₃^o, Br₂⁻, and (SCN)₂⁻ Radicals in Light- and Heavy- Water Solutions: A pulse radiolysis Study., *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 3639-3643.

CHAPITRE 3

LES CATALASES : NOUVELLES PERSPECTIVES MECANISTIQUES

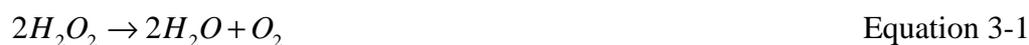
INTRODUCTION

Les catalases sont des enzymes qui ont été largement étudiées et de nombreuses revues leurs ont été consacrées^{1,2,3,4}. Dans la première partie de ce chapitre, nous ne présenterons que les propriétés structurales et fonctionnelles des catalases monofonctionnelles. L'étude de ces propriétés a permis de soulever des questions encore non résolues.

Pour tenter d'y répondre, les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse seront détaillés dans la seconde partie de ce chapitre. Nous décrirons les caractéristiques spectroscopiques obtenues notamment par Résonance Paramagnétique Electronique mais également par spectroscopie d'absorption électronique UV-visible des différents intermédiaires observés chez les catalases. La mise en évidence de différences dans la stabilité et la nature des intermédiaires entre les protéines étudiées appuiera l'existence d'une corrélation entre ces intermédiaires et la réactivité des ces protéines vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

A. LES CATALASES A HEME : PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTION.

Les catalases, ou hydroperoxydases, sont spécialisées dans la dismutation du peroxyde d'hydrogène, en oxygène et en eau, traduite par l'équation suivante :



Parmi les catalases, nous pouvons distinguer les catalases héminiques^{5,6,7}, les catalases à manganèse^{8,9} et les catalase-peroxydases (voir chapitre suivant)^{10,11}. Dans la suite de ce chapitre, seules les catalases monofonctionnelles à hème seront étudiées.

La principale fonction de ces enzymes est d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, avant qu'il ne cause des dommages à la cellule. En accord avec ce rôle de protection, la proportion de catalase dans la cellule dépend du stress oxydant. Dans les conditions physiologiques, les catalases jouent également un rôle de senseur de la concentration en peroxyde d'hydrogène¹² et ont donc une fonction de signalisation^{13,14}.

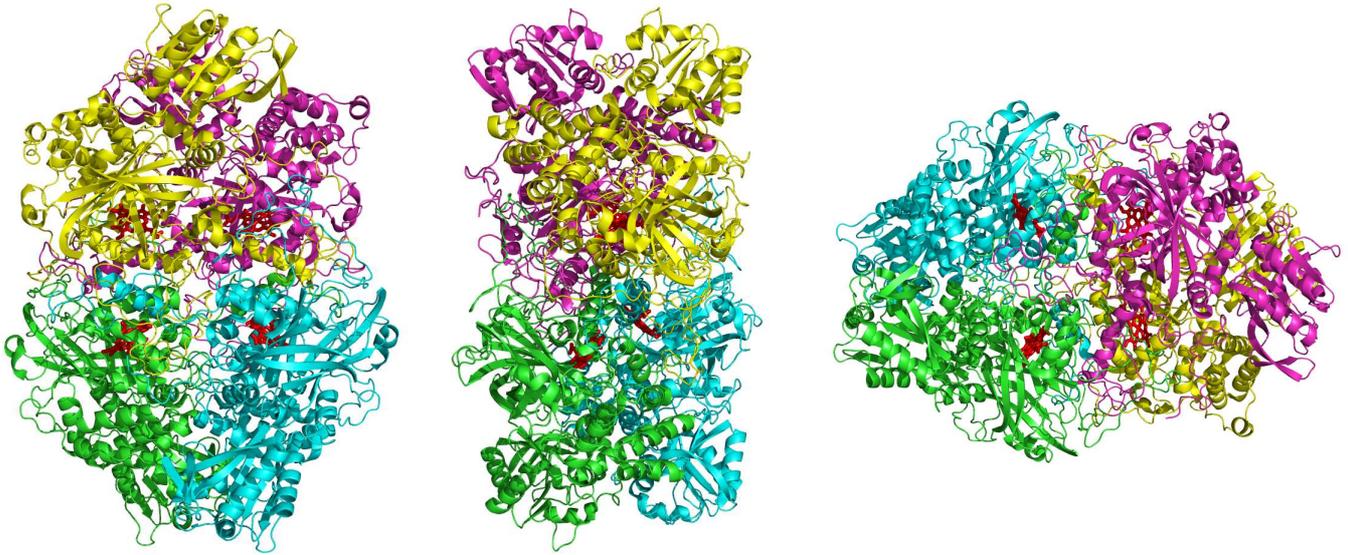


Figure 3-1: Vues selon les trois axes moléculaires (P, Q et R) du tétramère de la catalase d'*Escherichia coli* (HPII). Chaque sous-unité est représentée par une couleur différente et l'hème, présent dans chaque sous-unité, est représenté en rouge. D'après Bravo 1999²². Numéro PDB : 1IPH.

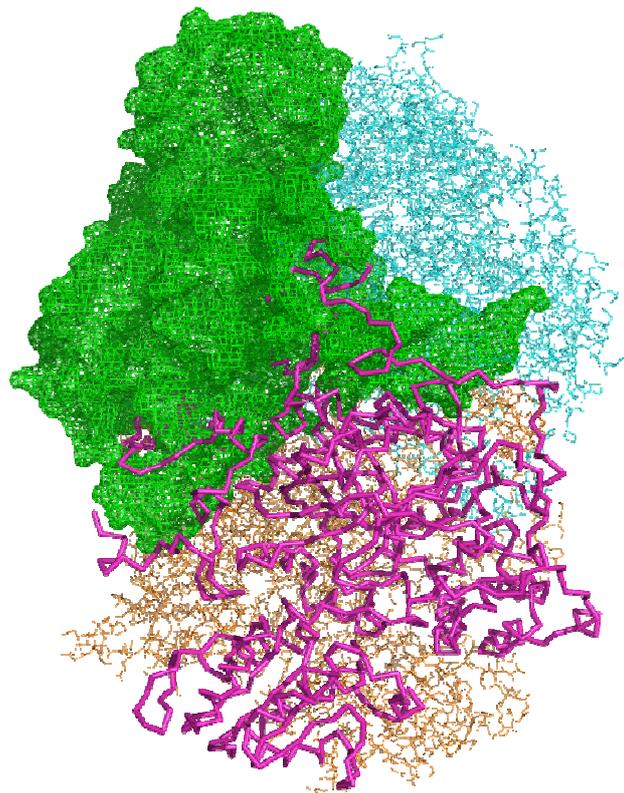


Figure 3-2: Représentation dans la catalase d'*Escherichia coli* (HPII) de l'insertion de la partie N-terminale d'une sous-unité dans la boucle d'une autre sous-unité. Cette structure est commune à toutes les catalases à hème monofonctionnelles. D'après Bravo 1999²². Numéro PDB : 1IPH.

I. LES CATALASES : STRUCTURES.

Les premières structures cristallographiques aux rayons X de catalases furent celles de *P. vitale* (PVC) à 3,5 Å de résolution¹⁵ et de foie de bœuf (BLC) à 2,5 Å de résolution^{16,17}. Aujourd'hui, les structures cristallographiques à haute résolution de treize catalases à hème de différentes espèces sont disponibles. Par exemple la structure de la catalase de *M. lysodeikticus* (MLC) a été obtenue avec une résolution de 0,88 Å¹⁸. L'obtention de structures cristallographiques à haute résolution reste encore un enjeu d'importance car, malgré les nombreuses études consacrées aux catalases, des questions restent toujours sans réponse. Ainsi, en 2006, la structure de PVC à 1,71 Å de résolution a été publiée.

I.1-DESCRIPTION DE LA STRUCTURE GLOBALE.

Selon leur séquence, deux sous-groupes peuvent être distingués au sein de cette famille : les catalases de petite taille, dont la longueur de chaîne correspond à 500 acides aminés par sous-unités et les catalases à grandes sous-unités, qui ont plus de 700 acides aminés par sous-unités. La comparaison des 225 séquences de catalases disponibles révèle une forte homologie de séquence sur près de 400 aminoacides⁵. Dans toutes les séquences douze acides aminés conservés, dont l'histidine distale, essentielle pour la réaction de catalyse et la tyrosine proximale, ligand axial.

Toutes les catalases sont des tétramères. Les quatre sous-unités sont liées par trois axes perpendiculaires appelés P, Q et R¹⁷. Les catalases à petites sous-unités ont une forme d'haltère avec comme dimensions 100 Å × 80 Å × 100 Å selon les axes P, Q et R respectivement. Pour les catalases à grandes sous-unités la seule différence notable est selon l'axe R. La distance est ici de 140 Å (figure 3-1). Une des particularités de la structure des catalases est le glissement de la partie N-terminale d'une sous unité sous la boucle d'une autre sous unité (figure 3-2).

Quatre domaines peuvent être distingués dans la structure:

1) la partie N-terminale, qui contient l'histidine essentielle pour la dismutation du peroxyde d'hydrogène, est de longueur variable au sein des catalases. Elle compte de 53 résidus pour la catalase de *P. mirabilis* (PMC) à 127 résidus pour la catalase d'*E. coli* (HPH). Cependant, d'après l'analyse de séquences, la plupart des catalases à petites sous-unités contiennent 60 résidus dans ce domaine. Ce domaine est impliqué dans les interactions entre sous-unités et les résidus de cette partie contribuent à la symétrie de la poche hémique.

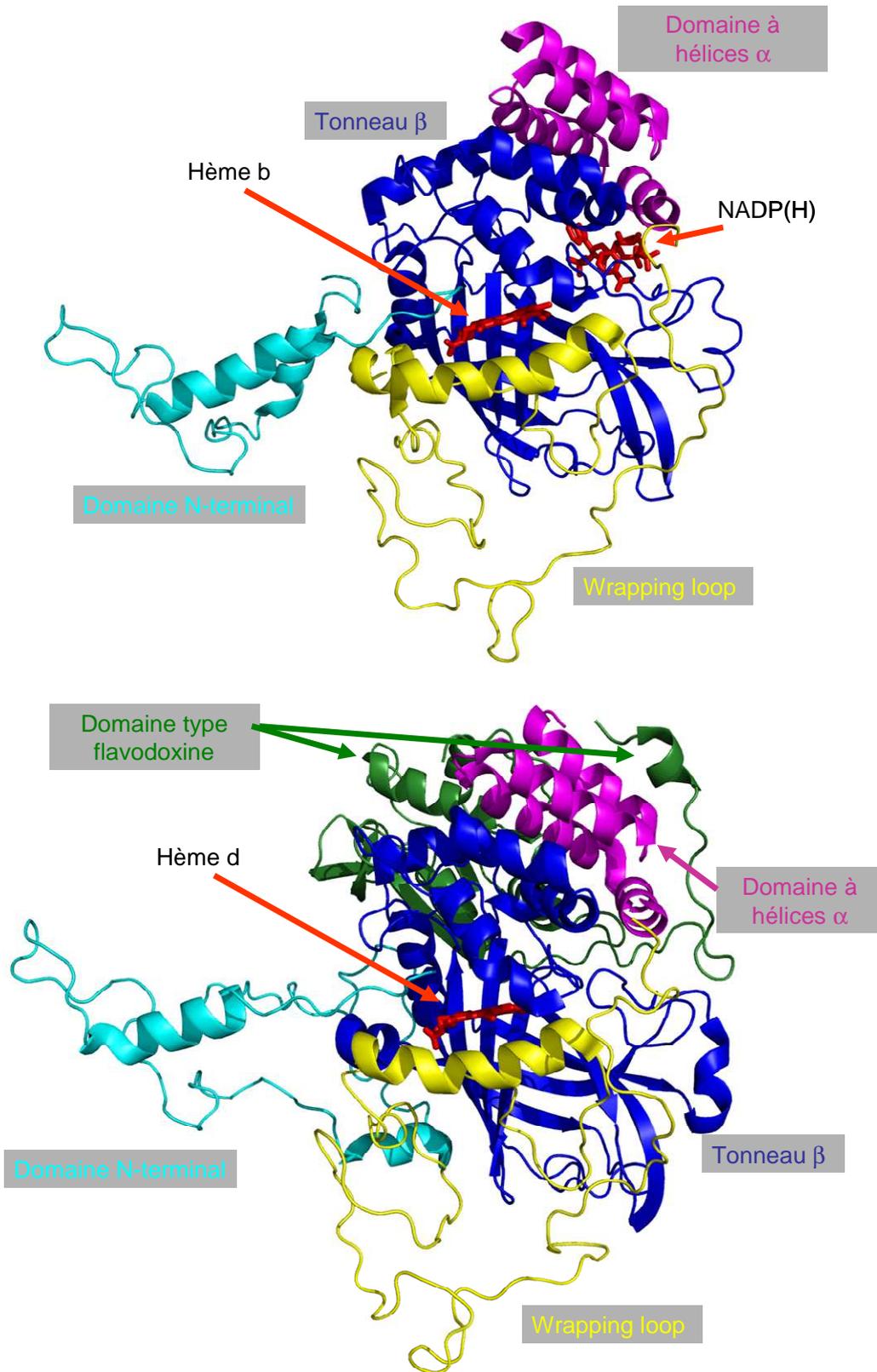


Figure 3- 3: Structure d'une sous-unité de la catalase de foie de bœuf (haut) et de HPII (bas). La localisation de l'hème dans les deux structures et celle du NADPH dans la structure de la BLC sont indiquées. Les quatre régions moléculaires définies dans les catalases à petites sous-unités (BLC) et les cinq régions dans les catalases à grandes sous-unités (HPII) sont représentées en différentes couleurs. Pour la BLC : numéro PDB : 7Cat et pour HPII numéro PDB : IPH.

- 2) un domaine de huit feuillets β antiparallèles, agencés en tonneau. Cette région est l'élément central du repliement des catalases. Les feuillets sont liés entre eux par des liaisons hydrogène. La première moitié du tonneau contient la plupart des résidus qui forment la partie distale de la poche héminique^{19,20}. La seconde moitié forme le site de fixation du NADP(H) dans les catalases qui lient ce cofacteur.
- 3) une boucle, appelée le 'wrapping loop' est une région qui compte environ 110 résidus qui lie le tonneau β au domaine des hélices α . Ces résidus forment la partie proximale de la poche héminique. La tyrosine proximale, en particulier se situe dans ce domaine.
- 4) un domaine en hélices α qui contient entre 60 et 65 résidus (figure 3-3).

Les structures des deux catalases à grandes sous-unités, celle de PVC²¹ et HPII²², présentent un domaine supplémentaire d'environ 150 acides aminés (figure 3-3) dont les éléments de structure secondaire sont organisés de la même manière qu'une flavodoxine. Cependant il n'a jamais été associé à une quelconque activité. Son rôle fonctionnel et structural reste indéterminé pour le moment⁵.

1.2-LE SITE ACTIF ET LES CANAUX D'ACCES.

En 1936, Stern a mis en évidence que le groupe prosthétique de la catalase de foie de cheval était une protoporphyrine IX de fer, ou hème *b*²³. Il en est ainsi dans toutes les catalases à petites sous-unités. Chaque sous-unité doit posséder un hème, mais un certain pourcentage peut être dégradé sous forme de biliverdine (pigment vert) ou de bilirubine (pigment jaune)^{24,25}. Dans les protéines à grandes sous-unités, le groupe prosthétique a été caractérisé comme étant une protoporphyrine IX en partie oxydée, ou hème *d*²⁶.

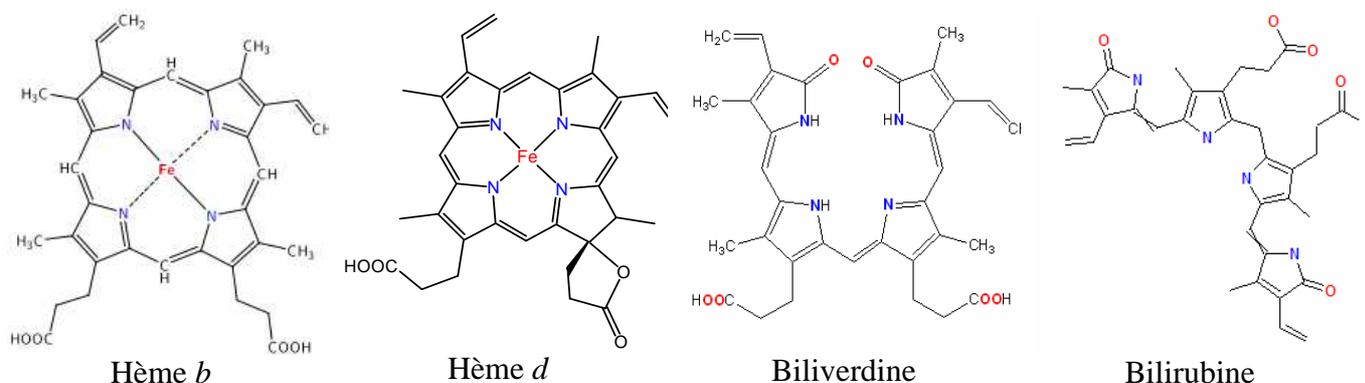


Figure 3- 4 : Représentation des différents hèmes et produits de dégradation observés chez les catalases monofonctionnelles à hème.

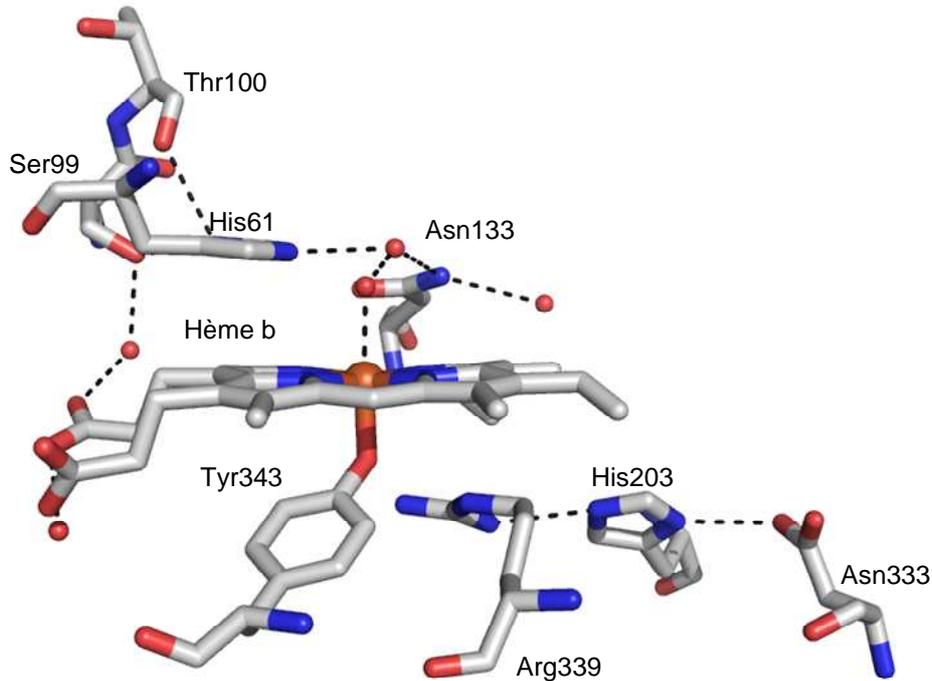


Figure 3- 5 : Environnement de l'hème des catalases. L'hème ainsi que les principaux résidus de la poche héminique sont représentés. La numérotation correspond à la catalase de *M. lysodeikticus*. D'après Murshudov 2002¹⁸. Numéro PDB : 1HBZ.

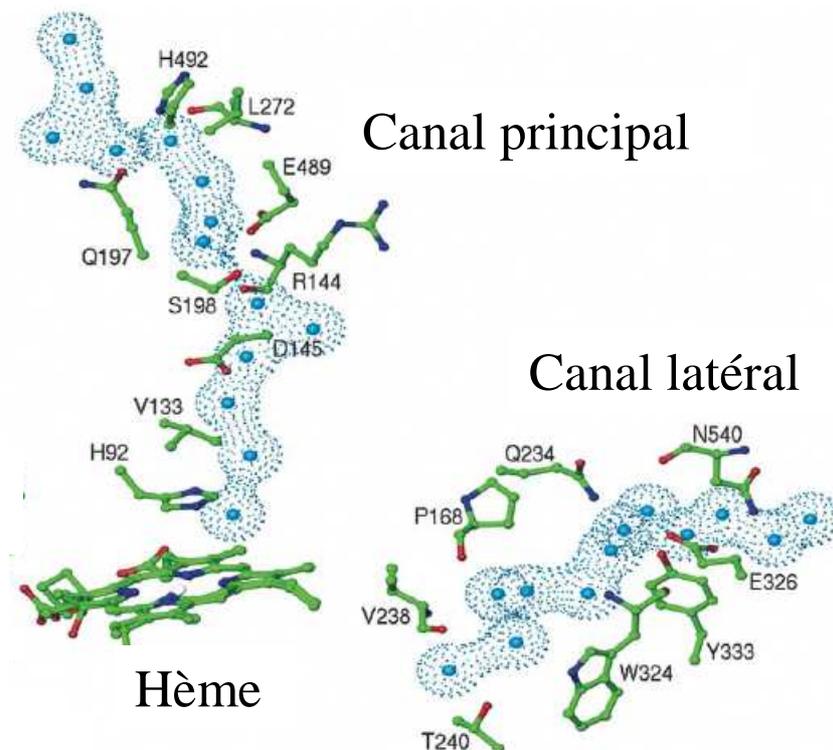


Figure 3- 6 : Canaux d'accès chez la catalase de *N. crassa*. Les résidus et les molécules d'eau qui délimitent le canal principal et le canal latéral sont représentés. Le canal latéral commence à environ 14 Å du côté proximal de l'hème. Sur la modélisation l'hème est une superposition d'un hème *b* et d'un hème *d*. D'après Diaz 2004²⁵.

Dans les catalases, trois résidus sont considérés comme essentiels pour la catalyse : la tyrosine proximale et une histidine et une asparagine dans la partie distale. L'oxygène phénolique de la tyrosine proximale sert de cinquième ligand à l'atome de fer. Du côté distal, le groupe imidazole du résidu histidine est pratiquement parallèle à l'hème, à une distance d'à peu près 3,5 Å du cycle pyrrolique III de l'hème *b* (du cycle IV dans le cas de PVC, HP11 et CatF). Un résidu sérine est lié par liaison hydrogène à un atome d'azote de l'histidine et peut jouer un rôle dans la catalyse en favorisant une des formes tautomères de l'histidine. Le résidu histidine forme également une liaison hydrogène avec un résidu thréonine. Cette liaison faciliterait les petites rotations du cycle imidazole et pourrait être utilisée pendant la catalyse. L'autre atome d'azote de l'histidine se situe près de l'atome de fer, mais reste trop loin pour une éventuelle coordination (figure 3-5).

L'hème est profondément enfouie dans la catalase, l'atome de fer étant à environ 20 Å de la surface moléculaire la plus proche^{25,19}. La poche hémique est très hydrophobe, en particulier du côté distal. Les résidus hydrophobes semblent avoir un rôle majeur dans la sélection de la forme et de la taille des substrats. L'accès limité à l'hème nécessite l'existence de canaux d'accès entre la surface et l'hème. Un réseau complexe de cavités et de canaux moléculaires est très conservé, en particulier chez les catalases à petites sous-unités. Un canal principal atteint le site distal de la poche hémique au niveau des résidus histidine et asparagine, pratiquement perpendiculairement au plan de l'hème (figure 3-6). Dans les catalases à petites sous-unités ce canal a la forme d'un entonnoir et est long d'environ 30 Å. Dans les catalases à grandes sous-unités ce canal est plus étroit et plus long (environ 50 Å). Un second canal, latéral, est également présent chez les catalases. Ce second canal émerge dans le site de fixation du NADP(H) dans les catalases qui lient cette molécule.

1.3-LE SITE DE FIXATION DU NADP(H).

La fixation du NADP(H) était totalement inattendue quand elle a été découverte chez quelques catalases de mammifères^{27,28}. Aujourd'hui, il est fréquent de trouver un site de fixation du NADP(H) dans les catalases à petites sous-unités. Les catalases à grandes sous-unités, en revanche, ne le fixent pas.

La distance entre le NADP(H) et l'atome de fer le plus proche est d'environ 20 Å. Les résidus formant le site de fixation du NADP(H) sont très conservés et les différences majeures, observées dans la force de fixation du NADP(H) sont essentiellement dues à des modifications ponctuelles de ces résidus (figure 3-7). Par exemple, une histidine présente chez

les enzymes qui fixent fortement le NADP(H) (His304 dans la BLC) est remplacée par une glutamine chez les catalases qui ne le lient que faiblement (Gln302 dans la catalase de *S. cerevisiae*)²⁹. L'étude comparative de structures avec et sans molécule de NADP(H), dans le cas de la catalase d'érythrocyte humain et de PMC, a montré que la fixation de la molécule de NADP(H) impliquait d'importants réarrangements structuraux^{25,30}.

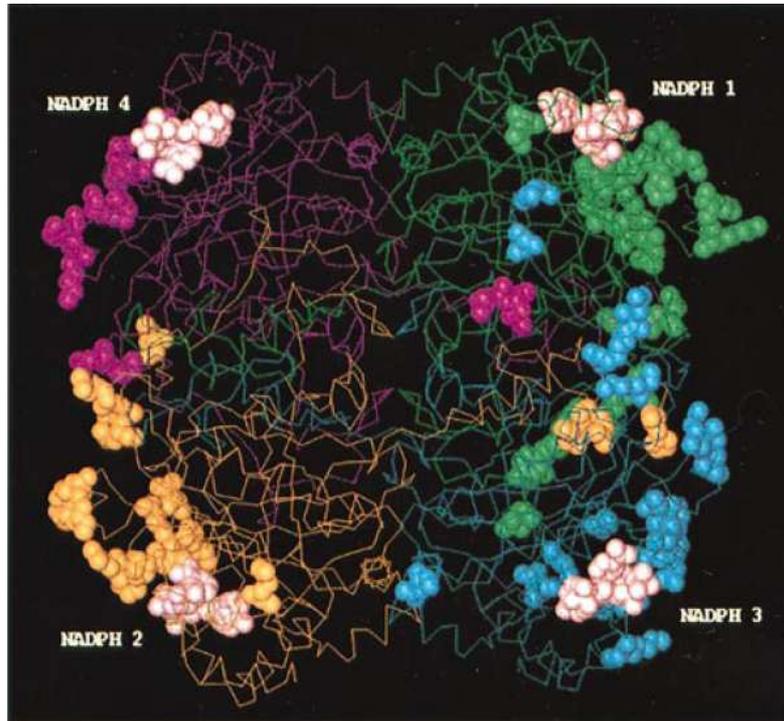


Figure 3- 7 : Structure du tétramère de la catalase de *Saccharomyces cerevisiae* liant les molécules de NADP(H) (représentées en blanc dans chaque sous-unité). Sont également représentés en couleurs les résidus qui sont impliqués dans le contact avec le NADP(H) dans chaque sous unité (en vert, orange, bleu et rose pour les sous-unités 1, 2, 3 et 4 respectivement). D'après Gouet²⁵.

Le rôle, supposé du NADP(H), est d'empêcher la formation du composé II, inactif²⁷ vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène, mais ce mécanisme reste encore mal compris^{31,32,33,34}. De récentes études ont montré que les catalases de mammifères étaient responsables de la génération d'espèce à oxygène actives (ROS) lorsque les cellules étaient irradiées avec des ultraviolets. Même si ce mécanisme reste peu compris actuellement, il semblerait que l'hème ne soit pas impliqué dans cette formation de ROS. Comme le NADP(H) est fixé par les catalases de mammifères, celui-ci pourrait être impliqué dans ce mécanisme³⁵.

II. LES CATALASES : ASPECTS FONCTIONNELS.

La réaction des catalases monofonctionnelles à hème a été analysée par différentes techniques spectroscopiques. Il faut noter un aspect particulièrement délicat : les catalases ne suivent pas la cinétique typique de Michaelis-Menten. Les constantes, K_m et k_{cat} , ne sont donc que des constantes apparentes. Il n'est pas possible de définir une unique valeur de ces constantes cinétiques pour toutes les catalases, car celles-ci varient énormément. De légères différences au niveau structural influenceraient l'accessibilité du substrat à l'hème et la sortie des produits. Ces subtiles différences de structure sont souvent invoquées pour expliquer les variations observées au niveau de l'activité catalytique. Le tableau 3-1 résume les résultats d'une étude comparative réalisée sur 16 catalases de souches différentes³⁶.

Source	Activité spécifique (unités par mg de protéine.)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1}) * 10^5
<i>E. coli</i>	20 700	64	0,7
<i>A. niger</i>	21 400	465	2,79
<i>H. pylori</i>	61 400	127	2,7
<i>B. fragilis</i>	69 100	279	3,8
<i>P. aeruginosa</i>	71 800	67	0,7
<i>P. syringae</i>	84 600	92	2,8
<i>L. seeligeri</i>	89 300	111	2,14
BLC ^a	91 800	93	2,12
<i>S. marcescens</i>	98 900	228	2,4
<i>X. campestris</i>	99 900	77	2,8
<i>M. lysodeikticus</i>	109 100	152	3,1
<i>S. cerevisiae</i>	116 100	125	3,55
<i>B. abortus</i>	145 800	174	5,6
<i>P. mirabilis</i>	160 000	537	16,3
<i>B. pertussis</i>	225 000	154	5,95
HEC ^b	273 800	80	5,9

^a BLC=Catalase de foie de bœuf ; ^b HEC=Catalase d'érythrocyte humain.

Tableau 3- 1 : Paramètres cinétiques des différentes catalases monofonctionnelles à hème. Toutes les mesures ont été réalisées sur le même appareil et dans les mêmes conditions afin de pouvoir comparer les résultats. D'après Switala 2002³⁶.

II.1- REACTION CATALYTIQUE.

La dismutation catalytique du peroxyde d'hydrogène par les catalases à hème nécessite deux étapes, chacune faisant intervenir une molécule de substrat^{37,38,39}. La première molécule de peroxyde d'hydrogène est réduite en eau par oxydation d'une part de l'atome de fer et d'autre part de la porphyrine qui forme un radical π -cation où l'électron est délocalisé sur le cycle. Le composé I [$Fe(IV)=O$ Por^{•+}] est ainsi formé (Equation 3-2)^{40,41} :



Puis une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène réagit avec le composé I afin de le réduire et régénérer l'enzyme sous sa forme ferrique, avec libération d'une autre molécule d'eau et du dioxygène (Equation 3-3) :



Cependant en présence de faible concentration en peroxyde d'hydrogène, le composé I pourrait réagir avec de petits substrats organiques (tels que les alcools aliphatiques) ou avec l'acide 2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique (ABTS)⁴² et former un composé appelé composé II, qui provient d'une réduction à un électron du composé I (Equation 3-4).



L'état de protonation de ce composé II a fait, récemment, l'objet de nombreuses études^{43,44,45,46,47,48,49,50,51}. Les derniers résultats montrent que dans le composé II, le fer au degré d'oxydation +IV est lié soit à un groupe hydroxo soit à un groupe oxo selon les protéines.

II.2- STRUCTURES DES INTERMÉDIAIRES CATALYTIQUES.

Les structures cristallographiques des composés I et II ont tout d'abord été réalisées avec la catalase résistante aux peroxydes de *P. mirabilis* : PMC-PR²⁵. L'analyse de ces structures, à 2,7 Å de résolution, a révélé uniquement des réarrangements locaux et mineurs par rapport à la structure de l'enzyme natif. Les structures des composés I de PVC et de HPC⁵² et du composé II de MLC¹⁸ ont également été obtenues, à 1,71, 1,86 et 1,96 Å de

résolution respectivement. Ces structures confirment le peu de réarrangements par rapport à l'enzyme natif.

Dans les structures de HPC et de PVC, traitées avec de l'acide peracétique, il apparaît que la distance Fe-O est de 1,72 Å pour PVC, distance attendue pour une double liaison, alors que cette même liaison est de 1,85 Å dans le cas de HPC, suggérant une liaison simple Fe-O. D'après Alfonso-Prieto et coll.⁵², lorsque PVC est traitée avec de l'acide peracétique, le composé I formé comporterait une liaison oxoferryle Fe=O alors que dans le cas de HPC, il s'agirait d'une liaison hydroxoferryle Fe-OH. Dans cette dernière, la réduction du radical porphyrinique permettrait la polarisation et l'allongement de la liaison Fe(IV)=O qui formerait une espèce Fe(IV)-O⁻ et par protonation formerait Fe(IV)-OH. La réduction du radical porphyrinique s'expliquerait par un transfert d'électron intramoléculaire qui conduirait à la formation d'un radical protéique.

III. PROBLEMATIQUE.

Comme nous venons de le décrire précédemment, la structure tertiaire des catalases et en particulier l'environnement de l'hème sont très conservés. Cependant, leurs activités, testées dans des conditions strictement identiques, peuvent varier d'un facteur 10. Les structures cristallographiques des composés catalytiquement actifs mettent en évidence de légères différences entre les espèces, mais celles-ci sont insuffisantes pour expliquer les différences au niveau de l'activité catalatique. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces différences étaient dues à la nature et à la stabilité des intermédiaires formés pendant le cycle catalytique.

En effet, en 1996 notre équipe⁵³ a mis en évidence que la catalase de foie de bœuf (BLC) forme un intermédiaire oxoferryle-tyrosyle, comme état consécutif à la formation du composé I alors que la catalase de *P. mirabilis* (PMC)⁴¹, dans les mêmes conditions expérimentales, stabilise uniquement le composé oxoferryle-radical π -cation porphyrinique. Les paramètres cinétiques vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène de ces deux enzymes sont également très différents. Les valeurs de K_m et k_{cat} de PMC sont respectivement 6 et 8 fois plus importantes que leurs équivalents chez la BLC. Il semble donc que la réactivité des catalases vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène varie en fonction des intermédiaires réactionnels formés.

Il reste également à déterminer si la formation de cet intermédiaire alternatif, [Fe(IV)=O Tyr[•]] constitue une particularité de la BLC ou bien s'il est possible que cet intermédiaire soit formé dans d'autres catalases à hème. Si plusieurs catalases forment des radicaux protéiques, elles feraient alors partie de la famille des enzymes radicalaires, présentées dans le premier chapitre. La prise en compte de la formation des radicaux protéiques au cours du cycle catalytique des catalases constitue une nouvelle approche de leur fonctionnement. Cette approche nécessite de réexaminer le mécanisme réactionnel de ces protéines, dont l'hème était considéré comme le site actif primordial. Elle pose également la question de la bi-fonctionnalité des catalases ainsi que celle du rôle physiologique de ce type d'intermédiaires radicalaires protéiques.

B. ETUDE COMPARATIVE DES CATALASES PAR SPECTROSCOPIE DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE ET PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION UV-VISIBLE.

Afin de comprendre pourquoi des enzymes, dont la structure et la séquence sont aussi conservées, présentent des propriétés physicochimiques aussi différentes, une étude comparative complète de catalases provenant de souches différentes a été réalisée. Le tableau suivant résume les différentes caractéristiques des catalases étudiées :

Source	Abréviation	MW (par sous-unité)	Hème	Classe
<i>B. pertussis</i>	BPC	54 514	Hème <i>b</i>	III
<i>B. fragilis</i>	BFC	55 912	Hème <i>b</i>	III
<i>B. abortus</i>	BAC	56 452	Hème <i>b</i>	III
<i>M. lysodeikticus</i>	MLC	55 585	Hème <i>b</i>	III
Catalase de foie de bœuf	BLC	57 592	Hème <i>b</i>	III
Catalase d'érythrocyte humain	HEC	59 837	Hème <i>b</i>	III
<i>E. coli</i>	HPII	84 172	Hème <i>d</i>	II
<i>P. syringae</i>	CatF	56 730	Hème <i>b</i>	I
<i>S. marcescens</i>	SMC	55 876	Hème <i>b</i>	III

Tableau 3- 2 : Propriétés des catalases. D'après Loewen 1997¹.

I. CARACTERISTIQUES DU SPECTRE RPE ET DU SPECTRE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DES CATALASES A L'ETAT FERRIQUE.

La spectroscopie RPE, réalisée à la température de l'hélium liquide sur des échantillons congelés, a été utilisée afin d'observer les changements dans la poche hémique induits par le pH. La grande sensibilité de cette technique à de légères modifications de l'environnement de l'hème permet de savoir si un changement de pH conduit à de telles modifications à proximité immédiate de l'atome de fer. C'est donc un outil important pour mieux comprendre les variations d'activités en fonction du pH. Comme nous l'avons précisé auparavant, le site actif des catalases est une protoporphyrine IX de fer, le fer étant pentacoordiné et sous sa forme spin fort. Ceci est confirmé par les spectres RPE à 9 GHz à basse température (figure 3-8).

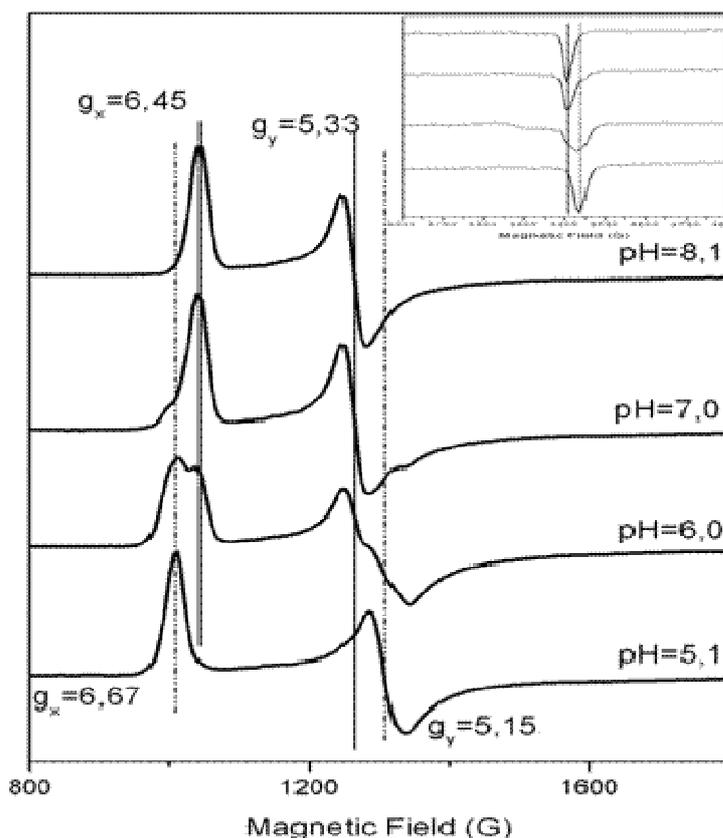


Figure 3- 8 : Spectres RPE à 9 GHz de la catalase d'érythrocyte humain à l'état ferrique en fonction du pH. Deux signaux rhombiques sont distingués (lignes pleines et lignes en pointillés) : le signal le plus large à $g_x=6,67$ et $g_y=5,15$ et le signal le plus étroit à $g_x=6,45$ et $g_y=5,33$. **En encadré:** Agrandissement de la partie à haut champ pour obtenir les valeurs de g_z . Tous ces spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions : $T=4K$, puissance des microondes $P=1mW$, $4G$ de modulation d'amplitude, $100kHz$ de modulation de fréquence. Ce travail

Ces spectres présentent deux résonances majeures, l'une à $g \approx 6$ et l'autre à $g \approx 2$. Deux signaux, de rhombicité différente, peuvent être observés selon les valeurs du pH. Le signal le moins rhombique domine le spectre aux pHs les plus élevés alors que le signal le plus rhombique est dominant à bas pH.

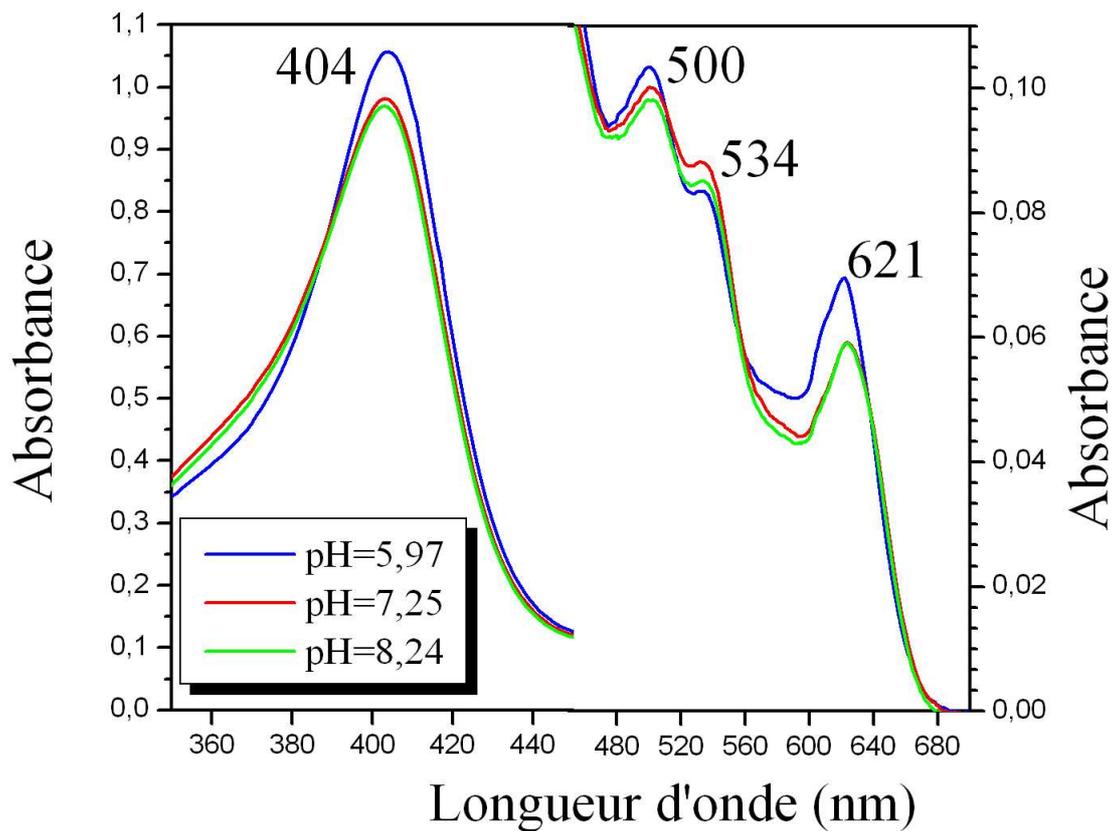


Figure 3- 9 : Profil d'absorption UV-visible de la catalase d'érythrocyte humain en fonction du pH. Tous les spectres présentent les mêmes bandes d'absorption : la bande de Soret à 404 nm, et deux bandes de transfert de charge à 500 nm de charge à 621 nm. Tous les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions : T=25°C. Ce travail.

Le tableau suivant résume les valeurs de g des deux formes rhombiques pour les différentes catalases ainsi que les bandes d'absorption lorsque les protéines sont à l'état natif.

Source	Forme la plus rhombique ^a	Forme la moins rhombique ^a	Bandes d'absorption UV-visible ^b	Intermédiaire(s) détecté(s)
BPC	6,63; 5,29; 1,96	6,28; 5,57; 1,99	405; 503; 541; 627	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]
BFC	6,69; 5,26; 1,96	6,38; 5,36; 1,99	413; 513; 551; 573; 627	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]
BAC	6,66; 5,28; 1,96	6,42; 5,43; 1,98	406; 510; 550; 627	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]
MLC	6,60; 5,28; 1,97	6,38; 5,43; 1,99	405; 500; 536; 619	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]
BLC	6,68; 5,14; 1,95	6,47; 5,36; 1,99	403; 502; 536; 622	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]
HEC	6,67; 5,15; 1,96	6,45; 5,33; 1,98	404; 500; 534; 623	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]
HPII	6,6; 5,34; 1,97		404; 588	nd ^c
CatF	6,54; 5,29; 1,97	6,38; 5,41; 1,98	404; 503; 539; 624	nd
SMC	6,69; 5,16; 1,96	6,24; 5,56; 1,99	403; 503; 537; 627	nd

^a Les valeurs de g sont donné dans l'ordre g_x , g_y et g_z respectivement.

^b Les valeurs des bandes d'absorption sont classées selon : Bande de Soret, bande β , bande α et bande de transfert de charge.

^c Non déterminé dans les conditions utilisées.

Tableau 3- 3 : Propriétés spectroscopiques des catalases à l'état ferrique.

D'après le tableau précédent, il apparaît que les valeurs de g restent assez proches pour l'ensemble de ces protéines. Il est à noter que pour la catalase HPII, la forme la moins rhombique est absente. Le spectre RPE est très sensible à la position de l'atome de fer par rapport au plan de l'hème, à la position des molécules d'eau ainsi qu'à l'état de protonation des azotes. Or le changement de configuration dans le signal ferrique des catalases se produit aux alentours de $\text{pH} \approx 6$. Les résultats obtenus suggèrent donc que la protonation de la chaîne latérale de l'histidine distale ou qu'une molécule d'eau dans la partie distale pourrait avoir une influence sur la géométrie de l'environnement de l'hème.

En revanche, le spectre d'absorption UV-visible des catalases ne présentent pas de dépendance vis-à-vis du pH (figure 3-9). Seul le rapport d'intensité des deux bandes α et β varie légèrement : de 0,81 à $\text{pH}=8,24$ jusqu'à 0,87 à $\text{pH}=5,97$. Deux catalases se distinguent par leur spectre d'absorption. Il s'agit de BFC et de HPII. Sous la forme native, le spectre d'absorption UV-visible de la catalase de *B. fragilis* présente des bandes qui sont en accord

avec une forme spin faible de l'enzyme, mais cette forme n'est pas observée en RPE. Il se peut donc que la congélation de l'échantillon modifie la coordination d'une molécule d'eau en sixième ligand.

II. CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES FORMES AU COURS DU CYCLE CATALYTIQUE DES CATALASES.

Suite aux résultats obtenus au cours de cette étude, il est apparu que les catalases stabilisent des intermédiaires radicalaires différents selon les conditions de pH, de concentration, de température, de temps de mélange ou d'excès d'acide peracétique. Trois comportements majeurs se dégagent :

- un seul intermédiaire radicalaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ est suffisamment stable pour être observé
- un deuxième intermédiaire radicalaire, localisé sur une tyrosine, peut être observé à basse température, comme c'est le cas pour la catalase de foie de bœuf.
- aucun intermédiaire radicalaire n'est stabilisé dans les conditions utilisées.

Pour chacune des catalases, toutes les conditions expérimentales (pH, temps de mélange, concentration, température et excès d'oxydant (acide peracétique)) ont été testées. Dans un souci de clarté, seuls les résultats les plus pertinents seront présentés dans la suite.

II.1- FORMATION D'UN COMPOSE $[\text{Fe(IV)=O POR}^{\bullet+}]$ STABLE : CATALASES DE *B. PERTUSSIS* ET DE *B. FRAGILIS*.

Dans un premier groupe de catalases seul le composé oxoferryle radical porphyrinique cationique, $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, est détecté et ceci quelque soit les conditions. L'intermédiaire formé ne dépend ni du pH, ni du temps de mélange, ni de l'excès d'acide peracétique ajouté. Parmi ces enzymes, on peut citer celle de *P. mirabilis*⁴¹. En effet, Ivancich et coll.⁴¹ ont démontré que PMC ne forme qu'un seul et unique intermédiaire, de structure électronique $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, c'est à dire le composé I. Cet intermédiaire, formé en présence d'acide peracétique, est suffisamment stable pour être détecté lorsque le mélange est réalisé manuellement (temps de mélange d'environ 15s), au contraire de la BLC, qui forme un composé I de courte durée de vie beaucoup plus brève, détecté uniquement par la méthode de

freeze-quench (temps de mélange d'environ 40ms). Parmi les catalases que nous avons étudiées, la catalase de *B. pertussis* et celle de *P. fragilis* présentent les mêmes résultats que ceux obtenus avec la PMC.

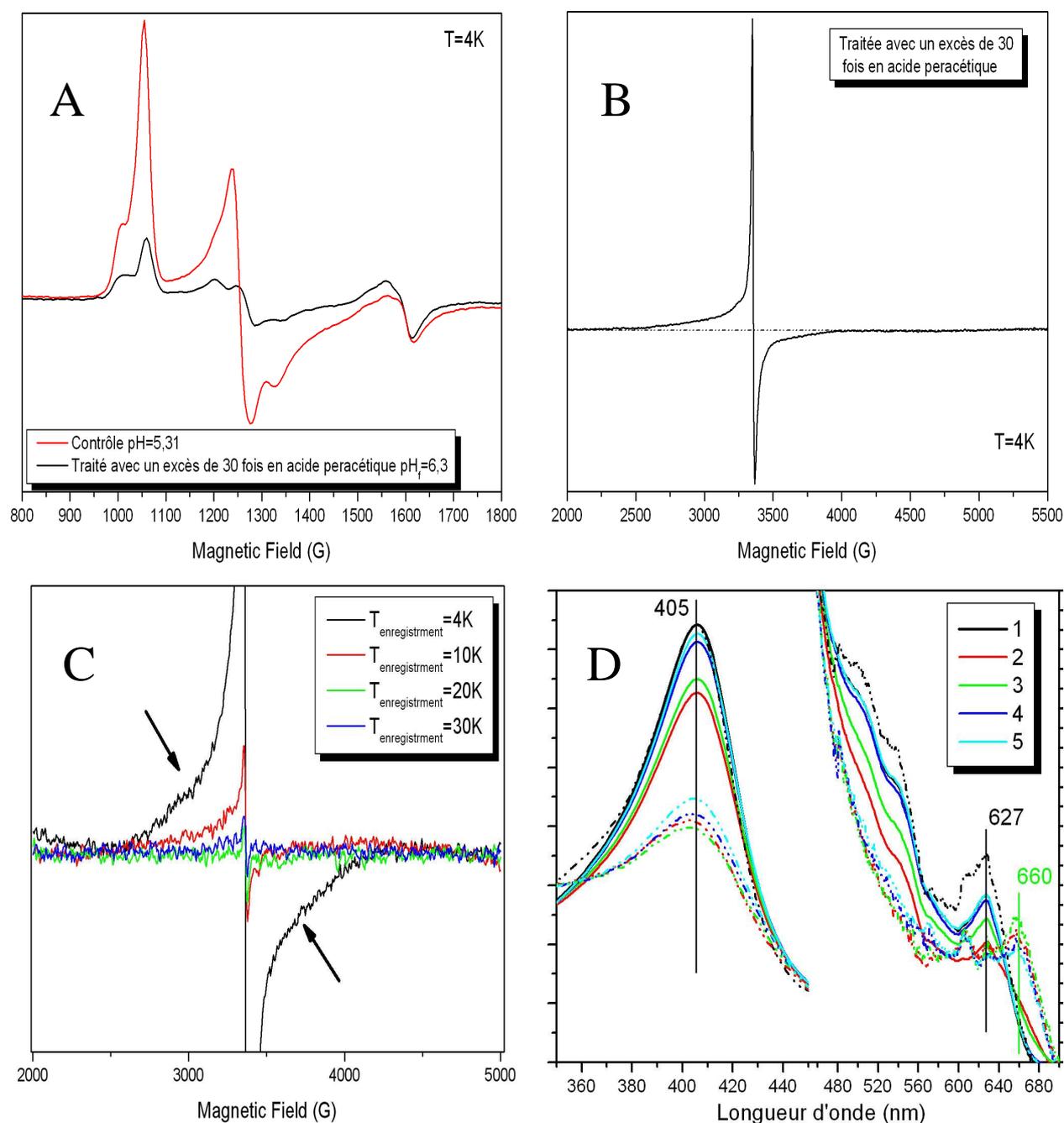


Figure 3- 10 : Spectres RPE à 9 GHz et spectres d'absorption UV-visible de la catalase de *B. pertussis*. (A) : Spectres RPE à 4K de la partie bas-champ de BPC native et après traitement par l'acide peracétique. (B) : Agrandissement de la partie à haut-champ du spectre RPE après réaction avec l'acide peracétique, (C) : Spectre RPE de l'intermédiaire formé en fonction de la température d'enregistrement. Conditions : puissance des microondes P=1mW, 4G de modulation d'amplitude, 100kHz de modulation de fréquence. (D) : En traits pleins : spectres obtenus l'acide peracétique ajouté 30 fois en excès. En pointillés : spectres obtenus l'acide peracétique ajouté 130 fois en excès. 1 : enzyme natif, 2 5s après addition de l'acide peracétique, 3 après 30s de réaction ; 4 après 4 min de réaction et 5 après 10 min de réaction. Les spectres ont été obtenus en utilisant une cuvette de 1mL en quartz contenant 700 μ L de protéine de concentration 1,5 μ M à pH=7,2 auquel est ajouté 5 μ L d'acide peracétique de concentration telle que l'excès soit de 30 ou de 130.

II.1-1 Résultats pour la catalase de *B. pertussis*.

Lorsque BPC est traitée avec de l'acide peracétique, le spectre RPE obtenu diffère significativement du spectre de l'enzyme natif. Tout d'abord le signal dans la région $g \approx 6$, caractéristique du Fer(III) spin fort est diminué de 80 % (figure 3-10 A), alors qu'un signal asymétrique, large (2000G) dans la région $g \approx 2$ est observé (figure 3-10 B). Ce signal coupe la ligne de base en $g_{iso} = 1,98$ et ressemble aux signaux obtenus avec PMC⁴¹ ou la peroxydase de raifort⁵⁴. Ce signal est également détecté lorsque l'acide peracétique est ajouté en plus grand excès. Lorsque l'excès d'acide peracétique est multiplié par 4, l'intensité du signal en $g = 1,98$ du radical porphyrinique est multipliée par 1,3 alors que le rapport des intensités du signal du fer hémique est de 2,3. L'augmentation de l'excès d'acide peracétique se traduit donc par la formation d'une faible quantité (~20 %) de composé II. Ce composé étant silencieux en RPE, la quantification de cette espèce se révèle délicate. La figure 3-10 C représente les spectres du même échantillon en fonction de la température d'enregistrement. Il apparaît que l'intensité du signal observé diminue drastiquement avec la température. Déjà à 10K, il devient difficile de l'observer. A 10K, la partie large est 5 fois moins intense que celle du spectre enregistré à 4K. Pour des températures supérieures, telles que 20K ou 30K, aucun signal large n'est détecté. Comme expliqué dans le chapitre II, ce phénomène est caractéristique d'un temps de relaxation longitudinal rapide. Nous avons donc attribué ce signal à une espèce oxoferryle [Fe(IV)=O] en interaction magnétique avec le radical cation porphyrinique, l'ensemble correspondant au composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}].

Nous avons également réalisé les spectres d'absorption à basse température ($T = 4^\circ\text{C}$). Les spectres d'absorption UV-visible obtenus dans ces conditions sont représentés sur la figure 3-10 D Le spectre de l'enzyme natif obtenu à cette température est en parfait accord avec celui enregistré à température ambiante décrit par Chance et coll.^{55,56}. Les bandes d'absorption observées sont la bande de Soret à 405 nm, les bandes à 506 et 537 nm et la bande de transfert de charge à 627 nm. Les spectres d'absorption UV-visible obtenus après traitement par l'acide peracétique révèlent les changements typiques dus à la formation du composé I^{55,56,41,57}, c'est-à-dire une hypochromicité et un élargissement de la bande de Soret et le déplacement bathochrome de la bande de transfert de charge à 660 nm. Par contre dans le cas de BPC, aucune bande correspondant à la formation du composé II n'est observée même avec un grand excès ce qui est contradictoire avec les résultats RPE. Ainsi, les spectres d'absorption UV-visible indiquent que la BPC est majoritairement sous l'état de composé I.

Le taux de conversion en composé I est multiplié par trois environ (il passe de 14 % à 44 %) lorsque l'ajout d'acide peracétique est augmenté de 30, par rapport à l'hème, à 130 fois en excès. Or en RPE, le rapport de rendement n'est que de 1,3. Les deux techniques spectroscopiques nécessitent des températures de mélange et de mesure différentes. Pour les expériences de spectroscopie RPE, les réactifs sont mélangés pendant 15s à 0°C et l'échantillon est tout de suite congelé par immersion dans un bain éthanol/carboglance puis dans l'azote liquide. La réaction est bloquée et le spectre RPE est en quelque sorte une photographie d'un instant précis. Dans le cas des spectres d'absorption, les réactifs sont mélangés à 4°C et la solution reste à l'état liquide. Pendant l'accumulation du spectre (qui dure 15s), le mélange évolue encore. Une réaction est d'autant plus rapide que la température est élevée. Donc, lorsqu'on utilise l'acide peracétique ajouté 30 fois en excès, l'acide a été totalement consommé lorsqu'on réalise le spectre, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on ajoute un excès 4 fois plus important. Dans le cas d'un faible excès, les spectres obtenus représentent plutôt la disparition du composé I : la bande à 660 nm ressemble plus à un épaulement et à partir de 30s le composé I n'est plus observable. A l'inverse, dans le cas d'un fort excès d'acide peracétique, les premiers spectres enregistrés correspondent à la formation du composé I : entre 0 et 30s après ajout des réactifs (spectres en pointillé 2 et 3), l'intensité de la bande à 660 nm augmente. Les spectres suivants représentent la décomposition du composé I. Dans le cas d'un grand excès, ce composé a une durée de vie supérieure à 10min. On note également que pour un fort excès d'acide peracétique, l'enzyme ne se dénature pas puisqu'au bout de 20 min, 80 % de l'enzyme est retourné sous sa forme native.

Aux vues de ces résultats, il apparaît que l'espèce formée par la catalase de *B. pertussis* ne dépend pas des conditions expérimentales utilisées. Ici, aucun transfert d'électron intramoléculaire n'est observé.

II.1-2 Résultats pour la catalase de *B. fragilis*.

Pour la catalase de *B. fragilis* les résultats nous ont menés aux mêmes conclusions. La figure 3-11 représente les spectres RPE à 9 GHz pour T=4K de cette catalase traitée par l'acide peracétique.

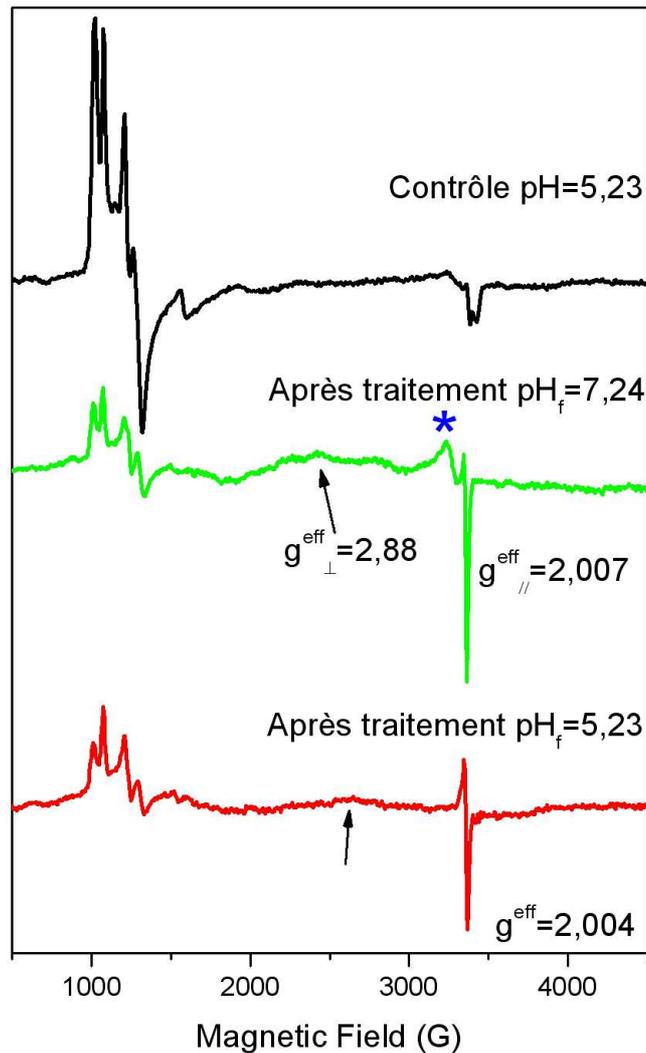


Figure 3- 11 : Spectres RPE à 9 GHz pour $T=4K$ de la catalase de *B. fragilis* à l'état ferrique c'est à dire natif (courbe noire) et après traitement par l'acide peracétique en fonction du pH. **Courbe verte :** pH final = 7,24 ; **Courbe rouge** pH final =5,23. Tous ces spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions : $T=4K$, puissance des microondes $P=1mW$, 4 G de modulation d'amplitude, 100 kHz de modulation de fréquence. L'étoile bleue représente le signal du fer spin faible.

Tout comme BPC, le spectre obtenu après traitement par l'acide peracétique est large (2000G) et lorsqu'on augmente la température d'enregistrement du spectre, le signal diminue drastiquement. L'espèce observée est donc une espèce couplée. Mais dans ce cas le couplage est différent de celui observé chez BPC et est plus proche de celui observé avec la catalase de *M. lysodeikticus*⁵⁸ ou celui observé avec l'ascorbate peroxydase.

Les spectres d'absorption électronique UV-visible (figure 3-12) présentent la bande à 660 nm caractéristique de l'oxoferryle radical porphyrinique cationique. L'habituel composé I est donc formé dans la catalase de BFC. D'après les spectres RPE, dans les deux conditions de pH examinées, la conversion du signal ferrique est supérieure à 80 % ce qui ne correspond pas à l'intensité de composé I formé. L'enzyme ne forme pas non plus de fer spin faible, car la quantité de cette espèce est constante entre le contrôle et après ajout de l'acide peracétique.

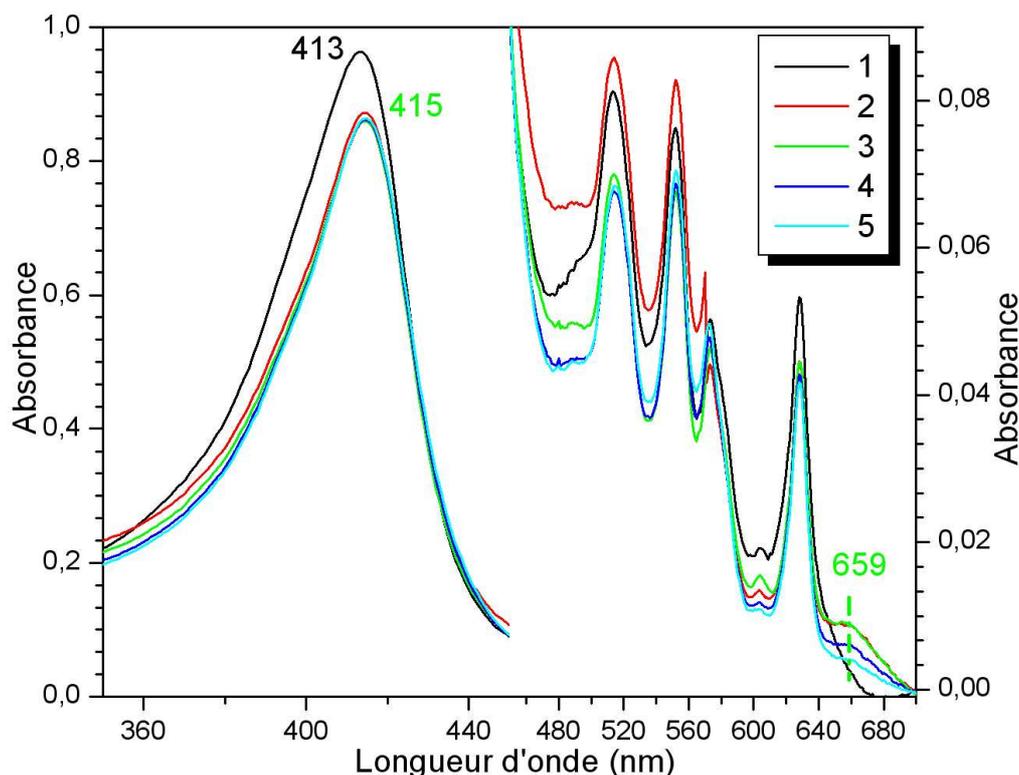


Figure 3- 12 : Spectres d'absorption UV-visible de la catalase de *B. fragilis* en présence d'un grand excès d'acide peracétique. Spectres obtenus l'acide peracétique étant ajouté 130 fois en excès. **1** : enzyme natif, **2** juste après addition de l'acide peracétique, **3** après 30s de réaction ; **4** après 4 min de réaction et **5** après 10 min de réaction. Les spectres ont été obtenus en utilisant une cuvette de 1mL en quartz contenant 700µL de protéine de concentration 1,5µM à pH=7,2 auquel est ajouté 5µL d'acide peracétique.

Le signal manquant est très probablement dû à la formation de composé II [Fe(IV)=O], qui est silencieux en RPE. Cependant, ceci ne peut être confirmé par les spectres UV-visible. En effet, les bandes de l'enzyme natif sont situés aux mêmes longueurs d'onde. Le signal de l'enzyme ferrique masque donc la formation du composé II. Même avec un grand excès d'acide peracétique (130 fois par rapport à l'hème), l'hypochromicité observée n'est que de 20 % et aucune bande caractéristique du composé II n'est observée.

Même si le taux de conversion en composé I est relativement faible, il est suffisamment stable pour être détecté et aucun autre radical organique n'est observé dans le cas de BFC.

II.2- FORMATION D'UN INTERMEDIAIRE ALTERNATIF [Fe(IV)=O TYR*].

Certaines catalases, telles que la catalase de foie de bœuf, la catalase d'érythrocyte humain, de *M. lysodeikticus* et de *B. abortus* forment comme premier intermédiaire le composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}]. Cependant, dans certaines conditions expérimentales, il est possible d'observer un autre intermédiaire radicalaire. Il est intéressant de noter que les paramètres, qui permettent la stabilisation de cet autre intermédiaire, diffèrent selon les catalases.

II.2-1 Influence du pH.

Dans le cas de la catalase humaine, un unique intermédiaire est observé quelque soit le pH final de la solution. Cependant, le rendement augmente avec le pH (conversion du signal ferrique de 74 % à pH=8,2 contre 35 % à pH=5,6). Le spectre RPE à 9 GHz enregistré à T=60K est représenté sur la figure 3-13 A. Ces spectres sont très similaires à celui du radical tyrosyle de la catalase de foie de bœuf. Les deux radicaux présentent la même largeur pic-à-pic de 15G et une largeur totale d'environ 60 G. Cependant, comme nous l'avons précisé dans le chapitre II, attribuer la nature chimique d'un radical à partir d'un spectre RPE à 9 GHz uniquement est ambigu, l'anisotropie du tenseur g n'étant pas résolue. Nous avons donc réalisé les spectres RPE à champ intense (figure 3-13 B) de ces mêmes échantillons afin de vérifier la nature chimique et électronique du radical observé.

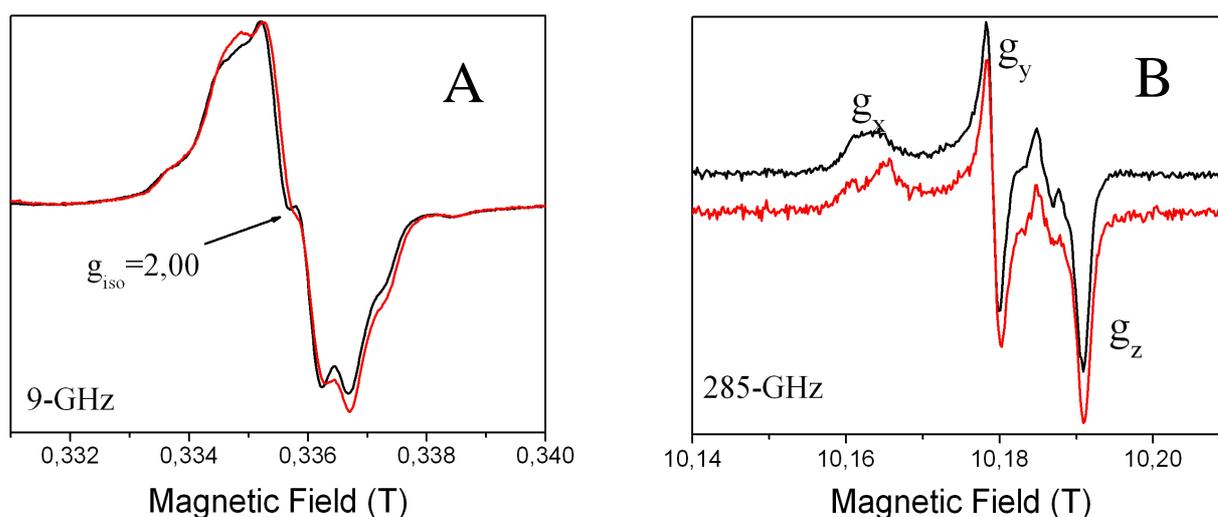


Figure 3-13: Spectres RPE à 9 GHz et à 285 GHz du radical formé par la catalase d'érythrocyte humain à pH=8,2 (courbes noires) et à pH=6 (courbes rouges). (A) : Spectres à 9 GHz enregistrés à 60K avec une modulation d'amplitude de 0,5 G. (B) : Spectres à 285 GHz. Courbe noire enregistrée à 20K avec une modulation d'amplitude de 5 G ; courbe rouge enregistrée à 10K avec une modulation d'amplitude de 5 G.

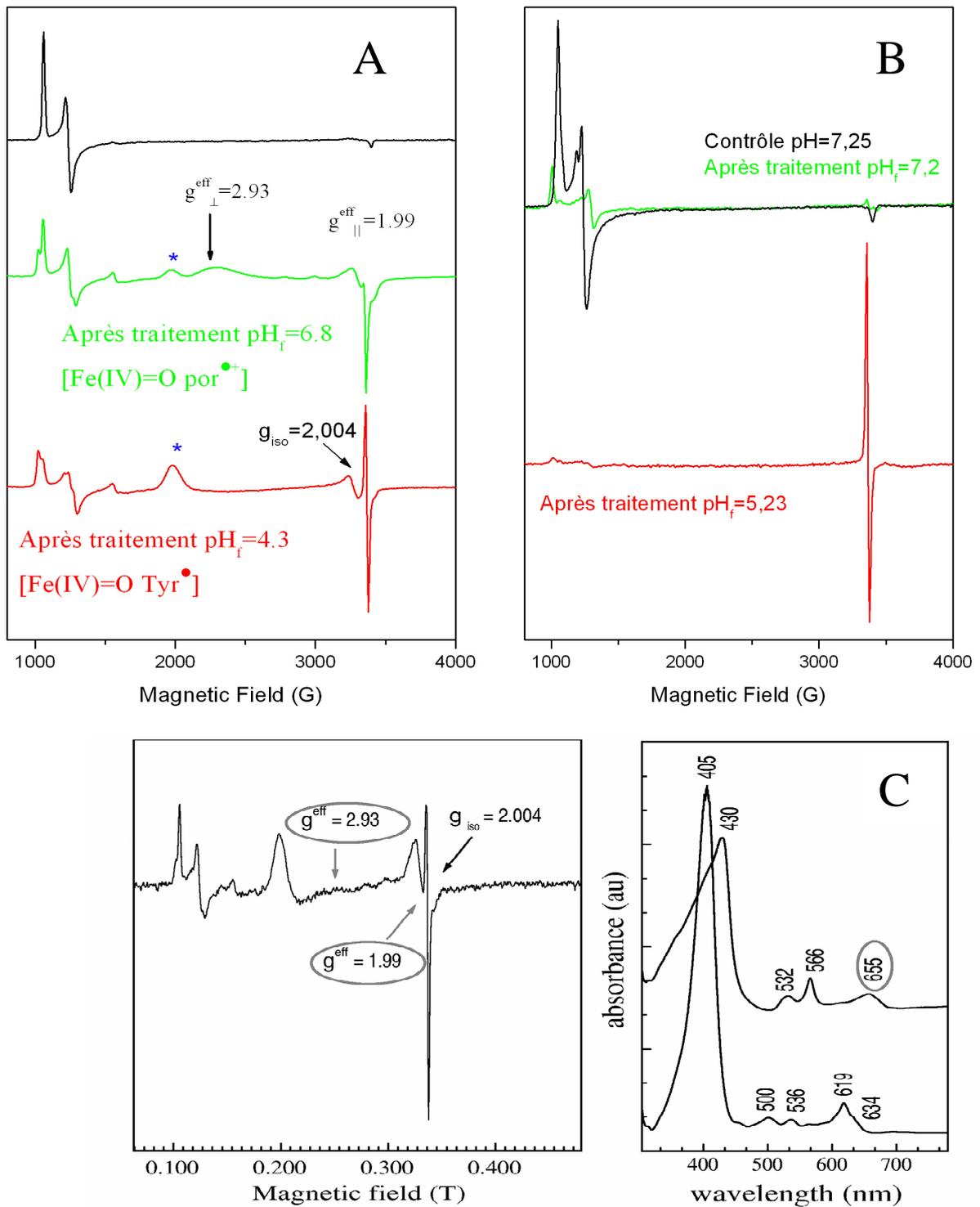


Figure 3- 14 : Spectres RPE à 9 GHz de la catalase de *M. lysodeikticus* (A) et de *B. abortus* (B). Dans les deux cas, le spectre noir correspond au contrôle, le **spectre vert** à l'intermédiaire formé à haut pH et le **spectre rouge** à celui à bas pH. Les spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions que sur la figure 3-11. (C) : Spectre RPE 9 GHz et spectre d'absorption UV-visible à basse température (4K) du même échantillon de *M. lysodeikticus* à pH intermédiaire=5,5. Les bandes à 430, 532 et 566 nm ainsi que la résonance à $g_{\text{iso}}^{\text{eff}}=2,004$ proviennent de l'espèce [Fe(IV)=O Tyr[•]]. La bande à 655 nm et le signal axial en RPE (valeurs de g^{eff} de 2,93 et 1.99) proviennent de l'espèce [Fe(IV)=O Por^{•+}].

Les spectres RPE à champ intense de l'unique radical observé dans le cas de HEC présentent des valeurs de g et des couplages hyperfins caractéristiques d'un radical tyrosyle. Les valeurs de g observées sont de 2,0076 ; 2,0044 et 2,0021 pour g_x , g_y et g_z respectivement pour l'échantillon à haut pH (spectre noir). Pour le spectre à bas pH (spectre rouge) seule la composante de g_x est différente : il apparaît deux contributions pour g_x une à 2,0081 et une à 2,0072. Ces valeurs concordent parfaitement avec celles des radicaux tyrosyles formés dans le PSII, la RNR ou la catalase de foie de bœuf. Les résultats obtenus en RPE conventionnelle ainsi que ceux de RPE à champ intense, nous permettent d'identifier l'intermédiaire formé par la catalase d'érythrocyte humain à un radical tyrosyle.

Si la nature de l'intermédiaire formé par la catalase humaine ne dépend pas du pH, il n'en n'est pas de même pour les catalases MLC et BAC (figure 3-14). A haut pH, le spectre RPE de MLC présente toutes les caractéristiques du composé oxoferryle radical π -cation porphyrinique (figure 3-14 A). Il est large (environ 2000 G de largeur totale) avec des valeurs pour g effectif de $g_{\perp}=2,93$ et $g_{\parallel}=1,99$ et dès que la température d'enregistrement est augmentée, il devient difficile d'observer ce signal exactement comme pour la BFC et la BPC. Par contre, dans les mêmes conditions de mélange mais à bas pH, le spectre RPE observé est étroit avec une valeur de g_{iso} aux alentours de 2. Le spectre enregistré à plus haute température ainsi que les spectres RPE à champ intense, nous permettent d'affirmer que ce signal correspond à un radical tyrosyle. Sur les spectres de la figure 3-14 A et la figure 3-14 C, il apparaît également une résonance en $g=3,4$, notée par une étoile bleue. Cette résonance peut être attribuée, soit à un atome de fer à l'état spin faible, soit à une contribution différente du composé I, comme celle observée avec l'ascorbate peroxydase en $g=3,3$ ⁵⁹.

Dans le cas de la catalase BAC, le spectre RPE à 9 GHz d'une solution à bas pH présente une résonance étroite et le spectre enregistré à plus haute température est totalement superposable au spectre du radical tyrosyle de la catalase humaine. Par contre, à haut pH, après traitement à l'acide peracétique, le radical tyrosyle ne se forme plus car aucun signal centré à $g=2$ n'est détecté. La conversion du signal ferrique est pourtant de 78 %. De plus la rhombicité du signal correspond à la rhombicité à bas pH et non à celle attendue. L'hypothèse la plus simple aurait été que BAC forme un composé II à haut pH mais elle est infirmée par les spectres d'absorption UV-visible, qui sont en accord avec la formation d'un composé I.

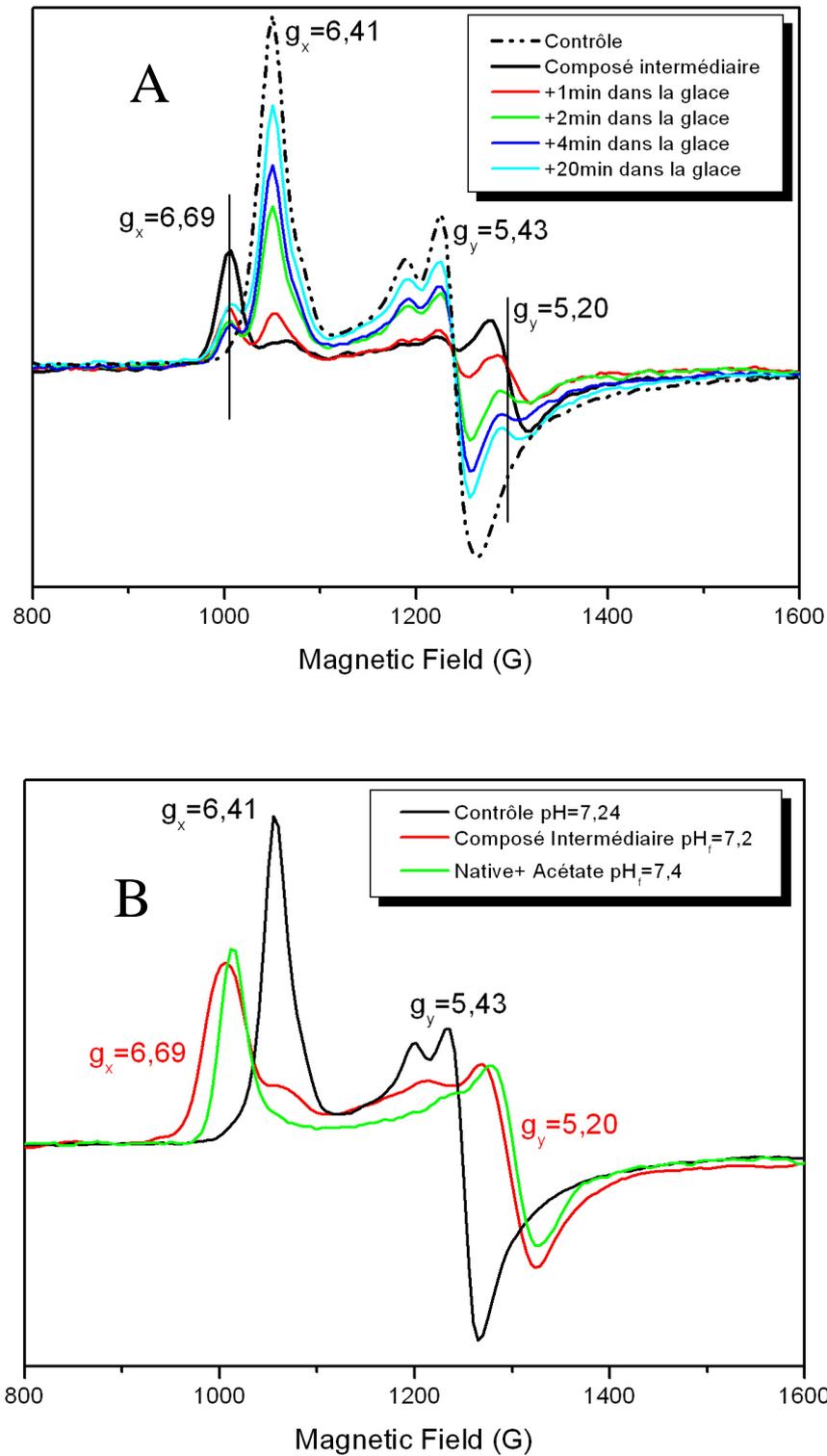


Figure 3- 15 : Spectres RPE à 9 GHz enregistrés à 4K de la partie ferrique de l'échantillon de la catalase de *B. abortus*, à pH=8 traitée par de l'acide peracétique, décongelé progressivement (A) et de l'effet de l'acétate sur le signal ferrique (B). Les conditions d'enregistrement des spectres sont identiques à celles de la figure 3-11.

Une autre explication est qu'à un tel pH une molécule d'acide peracétique se lie soit près de l'hème, soit se lie à l'hème directement modifiant la rhombicité, et empêche ainsi la réaction. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons placé l'échantillon congelé à très basse température (température de l'azote liquide) dans un bain de glace (figure 3-15 A). L'échantillon reste sous forme solide mais les transferts d'électron au sein de la protéine redeviennent possibles. Nous avons enregistré le spectre RPE de ces échantillons après des temps de réaction dans le bain de glace de plus en plus longs. Déjà, après 1 min, l'intensité du signal ferrique le plus rhombique diminue, tandis que celui de rhombicité identique au contrôle apparaît. Plus le temps passé dans la glace est important, plus l'intensité de ce dernier signal, identique au contrôle, augmente : de 45 % après 2 min jusqu'à 77 % après 20 min dans la glace. Il apparaît donc que l'enzyme n'est pas dénaturé et que le signal obtenu après traitement à l'acide peracétique de la catalase BAC à pH=8,2 correspond à la fixation près ou sur l'hème d'une molécule d'acide protonée ou non. Une confirmation supplémentaire est obtenue en ajoutant à l'enzyme native de l'acétate de sodium concentré (figure 3-15 B). L'acétate étant un ligand des hèmes, il devrait impliquer des réarrangements géométrie au niveau de ce dernier et donc modifier le spectre RPE. Le signal obtenu présente alors la même différence de rhombicité qu'avec l'acide peracétique, les pH finaux des solutions étant identiques. Le site de fixation de l'ion acétate (ou de l'acide peracétique) se trouve donc soit près de l'hème soit la molécule se fixe directement sur l'hème, car sa fixation implique une forte perturbation du signal RPE. Cette fixation n'est pas irréversible mais elle empêche sans doute la réaction, d'où l'absence de signal centré à $g=2$.

Ces exemples confirment que les catalases capables de former un intermédiaire alternatif au composé oxoferryle radical porphyrinique cationique n'ont pas le même comportement vis-à-vis du pH. D'autres conditions expérimentales peuvent également avoir une influence sur la stabilité relative du radical porphyryle vis-à-vis du radical tyrosyle comme par exemple l'excès de substrat.

II.2-2 Influence de l'excès d'acide peracétique.

La figure 3-16 A représente un élargissement de la région $g=2$ du spectre RPE à 9 GHz pour $T=4K$, pour les intermédiaires formés par HEC (en vert) et ceux formés par BAC, l'acide peracétique étant ajouté 30 (en noir) ou 130 (en rouge) fois en excès par rapport à l'hème. Tous les échantillons ont été testés après décongélation pour retrouver le signal du contrôle.

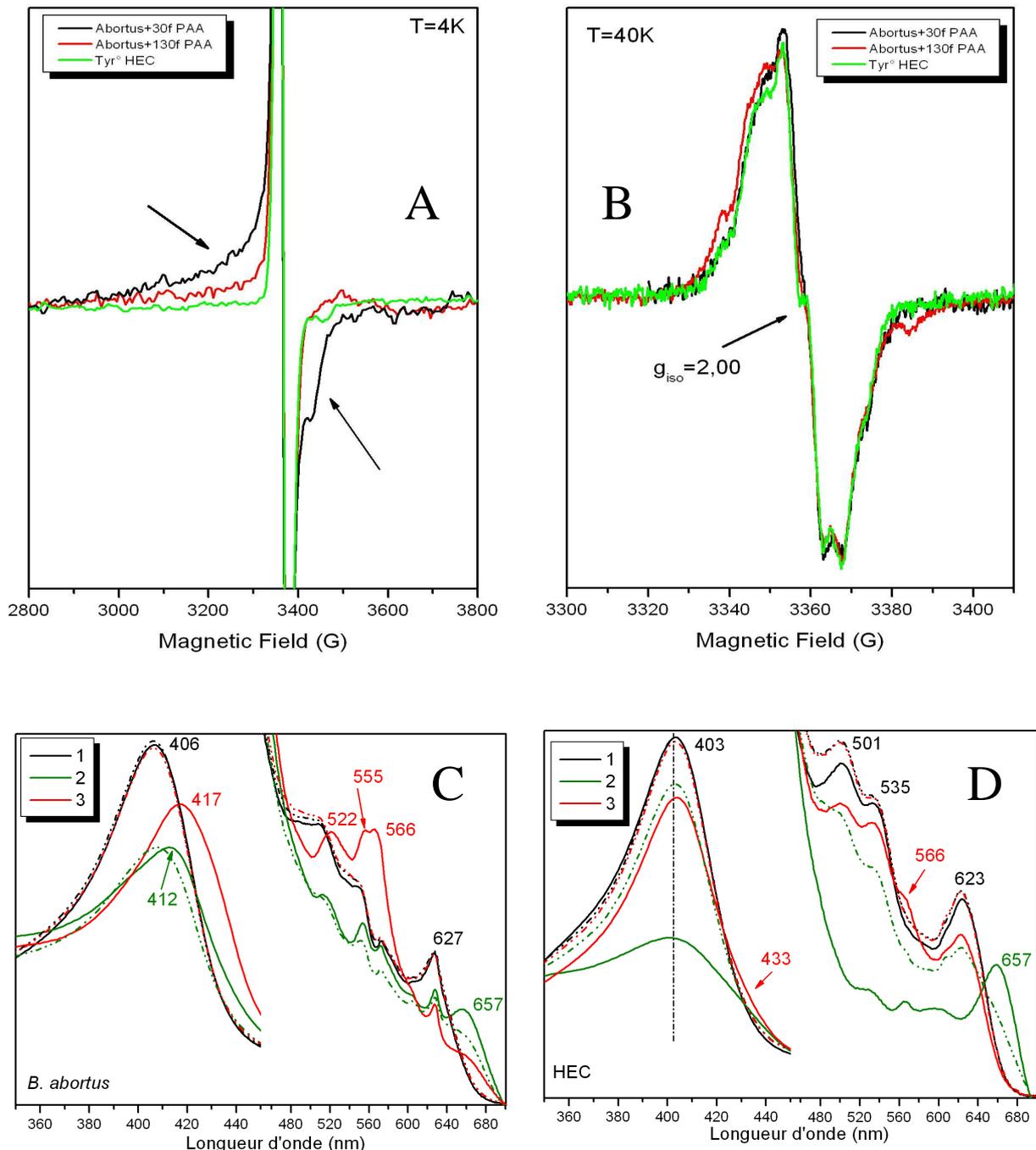


Figure 3- 16 : (A) : Région haut champ des spectres RPE à 9 GHz pour T=4K des intermédiaires formés par la catalase de *B. abortus* selon l'excès d'acide peracétique. En noir le spectre correspond à un excès de 30 fois par rapport à l'hème et en rouge pour un excès de 130 fois. Le radical tyrosyle de HEC est montré en vert pour comparaison. Les conditions d'enregistrement sont les mêmes que pour la figure 3-11. **(B) : Spectres RPE normalisés à 9 GHz pour T=40K des mêmes échantillons.** Le code couleur est identique. Conditions d'enregistrement : T=40K, puissance des microondes P=50 μ W, 1,5 G de modulation d'amplitude, 100 kHz de modulation de fréquence. **(C) : Spectres d'absorption UV-visible de la catalase de *B. abortus* traitée par l'acide peracétique, ajouté 130 fois en excès (trait plein) et 30 fois en excès (trait pointillé)** Les conditions de réaction : 700 μ L de protéines de concentration 10 μ M en hème auxquels on ajoute 5 μ L d'acide peracétique. Le spectre noir (1) correspond à l'enzyme natif ; le spectre vert (2) juste après addition de l'acide et le spectre rouge (3) après 10 min de réaction à T=4°C. **(D) : Spectres d'absorption UV-visible de la catalase humaine.** Les codes trait plein et pointillés ainsi que le code couleur sont les mêmes que pour (C).

Sur la figure 3-16 A, il apparaît que le signal obtenu en faible excès d'acide peracétique est plus large que celui obtenu avec un plus grand excès. De plus, à faible excès, le signal est asymétrique. En augmentant la température d'enregistrement, ce signal devient de plus en plus symétrique et l'intensité des épaulements, présents à 4K, diminue alors que la région plus étroite du spectre est encore détectée à 40K. Par contre, pour le signal obtenu avec un plus grand excès d'acide peracétique, les épaulements ne sont pas présents et dès T=4K le signal est symétrique. L'augmentation de la température d'enregistrement du signal n'implique pas sa disparition et il est toujours présent à T=40K. Un mélange de deux espèces radicalaires : $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ et $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$ est détecté avec un faible excès d'acide peracétique tandis que seul le radical tyrosyle est observé pour de plus grand excès d'acide peracétique. La figure 3-16 B correspond aux spectres des échantillons précédents enregistrés dans des conditions telles que le signal du composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ ne soit pas détecté. Les signaux obtenus avec la catalase de *B. abortus* sont superposables à celui du radical tyrosyle de la catalase humaine. La catalase de *B. abortus* forme donc dans les deux conditions d'excès un radical tyrosyle et celui-ci est favorisé, par rapport au radical π -cation porphyrinique, avec un fort excès d'acide peracétique.

Les spectres d'absorption UV-visible confirment également cette observation. Sur la figure 3-16 C sont représentés les spectres obtenus avec l'acide peracétique ajouté 130 fois en excès par rapport à l'hème (traits pleins) et 30 fois en excès dans le cas de la catalase de *B. abortus*. La figure 3-16 D correspond aux spectres d'absorption UV-visible de la catalase humaine traitée par l'acide peracétique dans les mêmes conditions que BAC. Dans le cas de HEC, immédiatement après réaction avec l'acide peracétique, les bandes de l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ sont observées (*i.e.* décroissance de la bande de Soret et déplacement de la bande de transfert de charge à 657 nm). D'autre part, après 10 min de réaction dans le cas d'un grand excès d'acide peracétique, un épaulement aux alentours de 420-430 nm ainsi qu'une bande à 566 nm sont observés tandis que la bande à 657 nm disparaît. Ces bandes nouvelles sont similaires à celles observées par Ivancich et *coll.*⁴¹ dans les spectres d'absorption à basse température (T=10K) de la catalase de foie de bœuf et à celles de la figure 3-14 C pour la catalase de *M. lysodeikticus*.

Dans le cas de *B. abortus*, dans les mêmes conditions d'excès et de mélange, en même temps que les bandes du composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, les bandes correspondant à une autre espèce oxoferryle sont détectées (417 nm, 554 nm, 566 nm) et ce dès l'introduction de l'acide peracétique. Par rapport à HEC, la proportion de cette nouvelle espèce $[\text{Fe(IV)=O}]$ est plus importante et son spectre est, ainsi, mieux résolu, le déplacement de la bande de Soret, en

particulier. Notons également que dans le cas de *B. abortus*, cette espèce est encore majoritaire après 10min de réaction. En revanche, dans le cas d'un faible excès d'acide peracétique, pour les deux protéines (HEC et BAC) seul le composé I est observé et après 10min de réaction, tout l'enzyme est retourné à sa forme native. De plus le rendement en composé I est alors bien inférieur à celui obtenu avec un excès de 130. Il apparaît donc, d'après les résultats de RPE et de spectrophotométrie d'absorption UV-visible, qu'un excès plus important en acide peracétique favorise la formation du radical tyrosyle par rapport au radical π -cation porphyrinique chez BAC et même, à un degré moindre, chez HEC.

	PAA ajouté 30 fois en excès		PAA ajouté 130 fois en excès	
	Rendement en [Fe(IV)=O Por ^{•+}]	Rendement en [Fe(IV)=O Tyr [•]]	Rendement en [Fe(IV)=O Por ^{•+}]	Rendement en une espèce de type [Fe(IV)=O]
HEC	13,5 %	nd ^a	56 %	16 %
BAC	28 %	nd ^a	39 %	67 %

^and= non déterminé

Tableau 3- 4 : Rendement en composé I et en une espèce du type oxoferryle selon l'excès d'acide peracétique pour la catalase humaine et la catalase *B. abortus*.

Au contraire, la température de la réaction, favorise la stabilisation du radical porphyrinique. En effet à 0°C, seule l'absorption du radical tyrosyle est détectée dans le cas de HEC, tandis qu'à 4°C, les bandes correspondant au composé I apparaissent en spectroscopie UV-visible. Parallèlement en RPE, le taux de conversion en radical tyrosyle passe de 56 % à 0°C à seulement 32 % à 10°C. Pour détecter le radical porphyrinique dans le cas de la BLC, Ivancich et coll.⁴¹ ont recours à la technique de freeze-quench, technique de mélange rapide qui permet de piéger les intermédiaires formés après des temps de mélange très courts. Le temps de mélange est, d'ailleurs, un autre facteur qui influe sur la formation du radical tyrosyle.

II.2-3 Influence du temps de réaction.

La figure 3-17 représente l'évolution du radical tyrosyle en fonction du temps de mélange pour les catalases humaine, de foie de bœuf et de *B. abortus*. Il apparaît que les différentes catalases ne présentent pas le même comportement vis-à-vis du temps. Dans le cas de la catalase humaine, trois phases peuvent être mises en évidence.

-Entre 2s et 10s, le taux de conversion en radical tyrosyle augmente, le maximum de radical tyrosyle étant obtenu avec un temps de mélange de 10s.

-Entre 10 et 40s à mesure que le temps de réaction augmente ce taux de conversion chute très rapidement (il est de 25 % lorsque le temps de mélange est de 60s).

-A partir de 40s, le taux de conversion diminue mais plus lentement qu'au cours de la deuxième phase. Entre 40s et 5 min le rendement est ainsi divisé par 2,7 (contre 3,3 entre 10s et 40s).

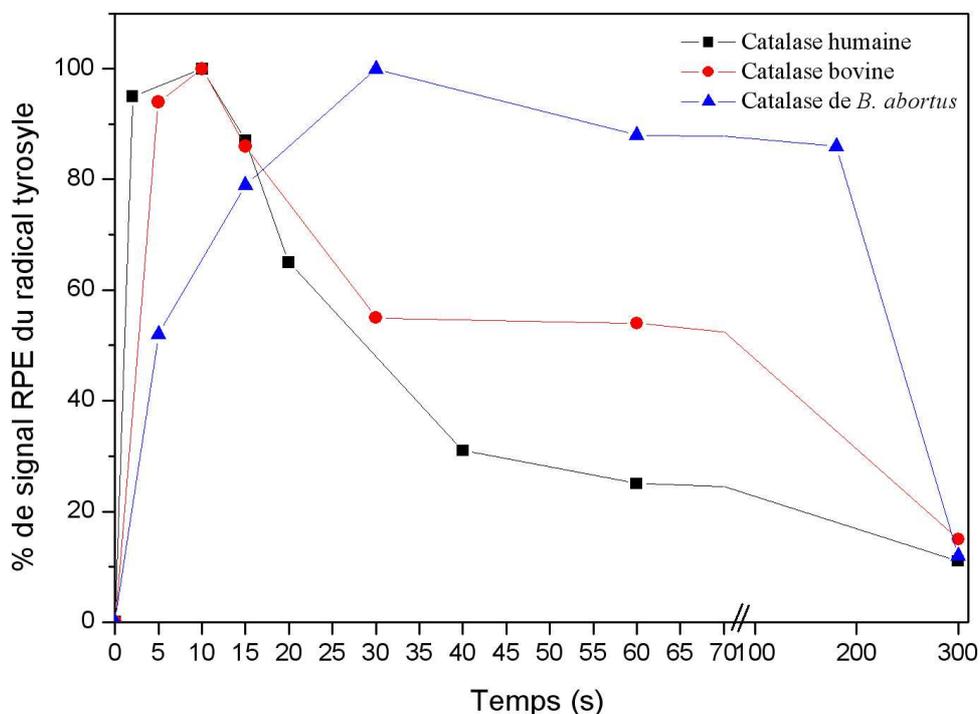


Figure 3- 17 : Influence du temps de mélange sur le taux de conversion en radical tyrosyle pour la catalase humaine, la catalase de foie de bœuf et la catalase de *B. abortus*. Le rendement a été normalisé à 100 % pour le temps de mélange correspondant au maximum d'intensité du signal du radical tyrosyle. Les courbes ne correspondent pas à des fonctions mais sont là juste pour aider à la lecture du graphique.

Le profil d'évolution du taux de conversion en radical tyrosyle dans le cas de la BLC est proche de celui de HEC, avec une deuxième phase un peu moins rapide et une troisième phase accélérée. La catalase de *B. abortus* présente, elle, un profil complètement différent. En effet, le taux de conversion est maximum pour un le temps de mélange de 30s. La formation du radical tyrosyle serait donc plus lente avec BAC qu'avec HEC ou BLC, mais ce radical serait stable plus longtemps car la décroissance du taux de conversion est beaucoup plus lente. Le radical tyrosyle se forme après le radical porphyrinique. Le transfert d'électron entre la tyrosine et la porphyrine s'effectue beaucoup plus lentement avec BAC qu'avec BLC ou HEC, puisqu'en RPE avec *B. abortus* il est encore possible de détecter le radical π -cation porphyrine après 10s de réaction alors que l'on ne le détecte plus au delà de quelques

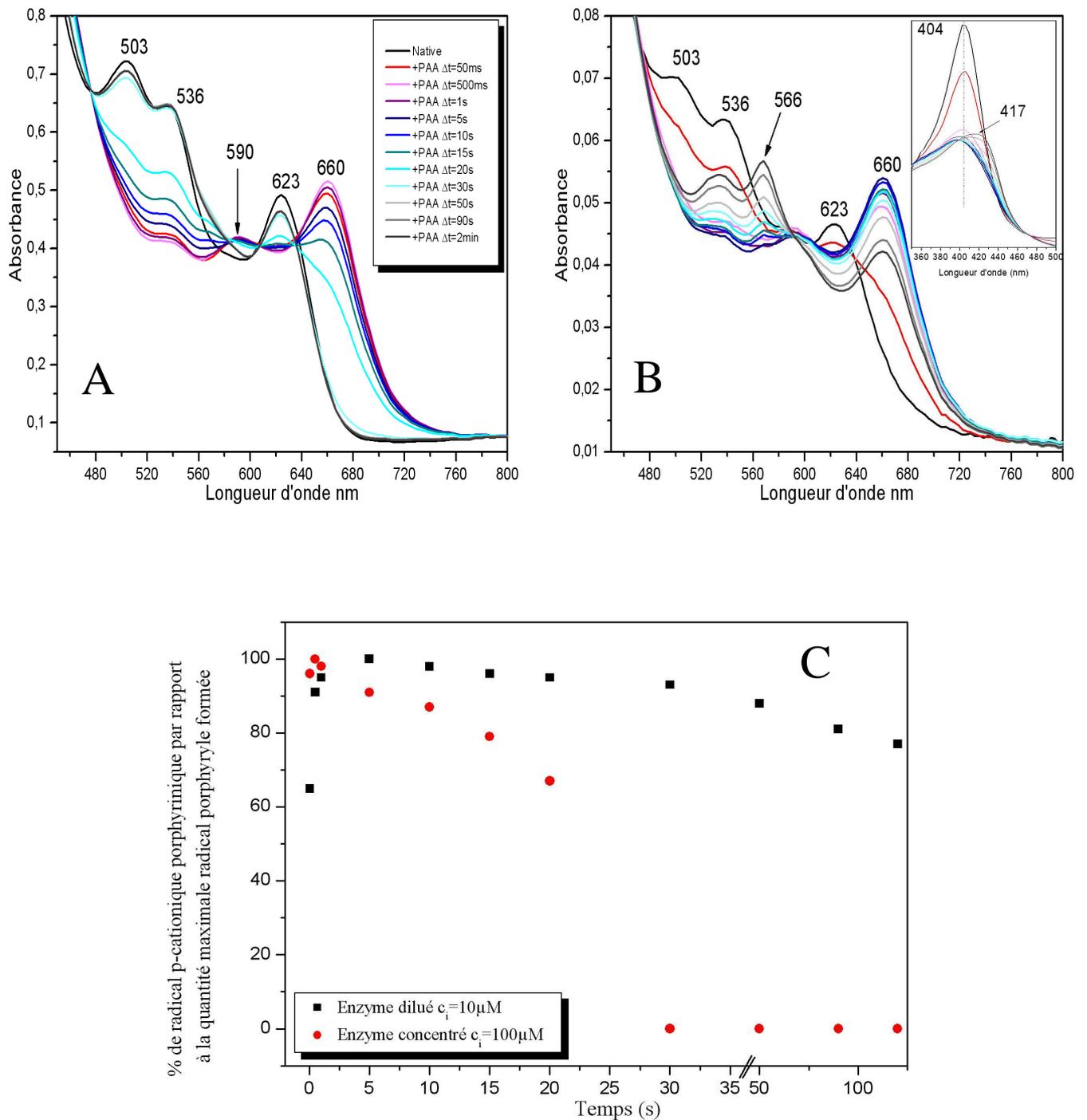


Figure 3- 18 : (A) : Spectres d'absorption UV-visible par stopped flow de la catalase humaine concentrée ($c=100\mu\text{M}$) traitée par l'acide peracétique. Le spectre noir correspond à l'enzyme natif ; les spectres suivants correspondent au mélange après une durée Δt de réaction entre l'acide peracétique et l'enzyme ; le temps $t=0$ étant l'instant où l'acide est introduit dans la cellule de mélange. (PAA=Acide peracétique). Les spectres ont été enregistrés à $T=10^\circ\text{C}$, volume d'enzyme= $40\mu\text{L}$, volume d'acide= $40\mu\text{L}$, l'acide peracétique ajouté 30 fois en excès par rapport à l'hème. **(B) : Spectres d'absorption UV-visible par stopped flow de la catalase humaine diluée ($c=10\mu\text{M}$) traitée par l'acide peracétique.** Le code couleur est le même que pour la figure A et hormis la concentration de l'enzyme toutes les autres conditions expérimentales sont identiques à (A). **Encadré : Zone du spectre correspondant à la bande de Soret dans le cas de l'enzyme diluée.** **(C) : Evolution de l'intensité du signal du radical porphyrinique selon la concentration enzymatique.**

millisecondes avec les deux autres catalases. Les comportements cinétiques différents laissent penser que la formation du radical tyrosyle serait moins favorisée chez BAC.

Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus en spectroscopie d'absorption électronique UV-visible. D'après ces spectres, la formation d'un composé possédant une partie oxoferryle autre que le composé I est plus rapide chez BAC que chez HEC. Deux hypothèses peuvent donc être formulées : soit les bandes observées en absorption correspondent à un vrai composé oxoferryle [Fe(IV)=O] sans radical tyrosyle, soit il s'agit d'un effet de concentration. En effet, les échantillons utilisés doivent être beaucoup plus concentrés en spectroscopie RPE (de l'ordre de 200 μ M en hème) qu'en spectroscopie d'absorption UV-visible (10 à 20 μ M). Pour chercher à répondre à cette question nous avons procédé à une étude en concentration pour la catalase humaine en utilisant la technique de stopped flow. Cette technique permet d'obtenir les spectres d'absorption UV-visible après un temps de réaction de l'ordre de quelques de millisecondes.

II.2-4 Influence de la concentration.

Les figures 3-18 A et B représentent les spectres d'absorption UV-visible, obtenus par stopped flow, de la catalase humaine traitée par l'acide peracétique à forte et à faible concentration en protéines (100 μ M en hème et 10 μ M respectivement). Nous en déduisons l'évolution du pourcentage de l'enzyme sous forme de composé I par rapport au maximum obtenu, en fonction du temps pour ces deux concentrations (figure 3-18 C). La rapidité de formation du composé I et sa stabilité (relative) varient énormément en fonction de la concentration en protéine. En effet, dans le cas de l'enzyme concentré, le maximum de composé I est obtenu après seulement 500ms de mélange et au bout de 30s de réaction les bandes caractéristiques de cette espèce ne sont plus détectées. En revanche, dans le cas de l'échantillon dilué (figure 3-18 B), la formation du composé I est plus lente, le maximum étant obtenu après 5s de mélange et cet intermédiaire est persistant jusque 120s. L'échelle de temps que nous utilisons pour réaliser les expériences RPE est de l'ordre de la dizaine de secondes et comme dans le cadre de ces expériences la concentration en enzyme est encore plus importante, l'instant auquel aucun composé I n'est détecté est sans doute encore plus faible 30s (d'après la figure 3-18). C'est pourquoi en RPE, il faut réaliser avec cette protéine des expériences de freeze-quench pour piéger l'espèce [Fe(IV)=O Por^{•+}]. La variation de la durée de vie de [Fe(IV)=O Por^{•+}], selon la concentration, s'explique simplement en

considérant que le nombre des chocs efficaces par unités de temps et de volumes augmente avec la concentration : la réaction de formation du composé I mais aussi de disparition sont plus rapides à concentration élevée.

Dans le cas dilué, des bandes d'absorption (517 nm et 566 nm) correspondant à une espèce autre oxoferryle que le composé I sont observées dès 10s de réaction et sa proportion au cours du temps ne fait qu'augmenter au détriment du composé I. Dans le cas de l'échantillon concentré, la bande de Soret ne peut être détectée car le spectre est saturé dans cette région de longueur d'onde et seul un petit épaulement vers 570 nm est observé. D'après ces spectres aucune autre espèce oxoferryle ne se forme, ce qui est en désaccord avec nos observations en spectroscopie RPE.

Cependant, comme nous l'avons précisé précédemment, ces expériences sont réalisées à $T=10^{\circ}\text{C}$ et lorsque l'on réalise les expériences RPE à cette même température le rendement en radical tyrosyle est divisé par 1,75 au profit de celui du Fe(III) spin fort. La concentration en espèce oxoferryle, dans le cas de l'absorption électronique UV-visible, n'est peut-être pas assez élevée pour que des bandes bien résolues apparaissent. Celles-ci sont en plus masquées par les bandes correspondant à l'enzyme natif. D'où cette absence de signature évidente d'une espèce oxoferryle dans le cas de l'échantillon concentré par rapport au cas de l'enzyme diluée. Il est également possible que les équilibres entre la réaction catalase et le transfert d'électron intramoléculaire soient différents dans le cas concentré par rapport au cas dilué. En effet, dans le cas concentré la probabilité de chocs efficaces étant plus grande, le composé I va plutôt avoir tendance à réagir avec une autre molécule d'acide peracétique et le transfert d'électron intramoléculaire ne sera pas favorisé alors que dans le cas dilué, où la probabilité de chocs efficaces est moindre, le composé I pourra évoluer par transfert d'électron.

II.2-5 Puissance de saturation du radical tyrosyle.

Pour les radicaux tyrosyles observés chez BLC, HEC, MLC et BAC, nous avons réalisé des études de saturation en puissance (figure 3-19). Les spectres ont été enregistrés à une température suffisamment élevée pour s'affranchir de la contribution du radical porphyrinique, notamment pour la BAC, dans laquelle on détecte simultanément les deux radicaux.

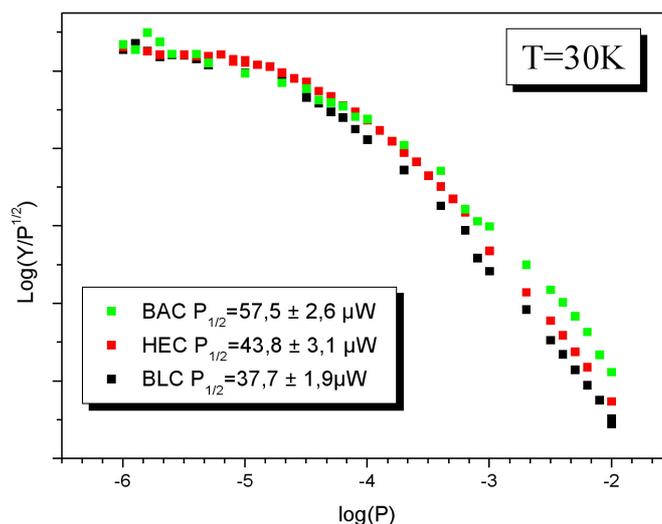


Figure 3- 19 : Courbes de saturation en puissance pour les radicaux formés par la BLC, HEC et BAC obtenues avec une température d'enregistrement de 30K.

La relation entre la puissance de saturation et la distance à l'hème est complexe. En effet, l'interaction entre le métal et le radical est constituée de deux termes : une interaction de type dipôle-dipôle, une interaction d'échange, qui varient toutes deux en fonction de la distance et de l'orientation des moments magnétiques du radical organique et du fer.

Les valeurs de la puissance de saturation pour la catalase humaine et la catalase de foie de bœuf sont proches (rapport de 1,16). Il est envisageable que le radical tyrosyle dans ces deux enzymes se forme à la même distance de l'hème. Ces deux radicaux tyrosyles doivent présenter des environnements électrostatiques proches et être notamment impliqués dans un réseau de liaisons hydrogène et être situés à proximité d'une charge positive. Ceci a été déduit de l'anisotropie du facteur g et en particulier de la valeur de la composante g_x par spectroscopie RPE à champ intense.

Par contre, dans le cas de BAC la puissance de saturation est différente (rapports entre les puissances de saturation de 1,3 et de 1,5 respectivement avec HEC et BLC). Cela nous amène à penser que le radical tyrosyle formé chez BAC doit être localisé sur un résidu différent de celui de la BLC. Tout comme pour MLC, dont la puissance de saturation est de 40 μ W (contre 64 pour la BLC) à T=20K.

Comme nous venons de l'exposer, plusieurs catalases telles que la catalase de foie de bœuf, la catalase humaine, la catalase de *M. lysodeikticus* et la catalase de *B. abortus* sont capables de stabiliser un intermédiaire radicalaire alternatif, $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^\bullet]$, mais dans des proportions et des vitesses différentes selon les catalases.

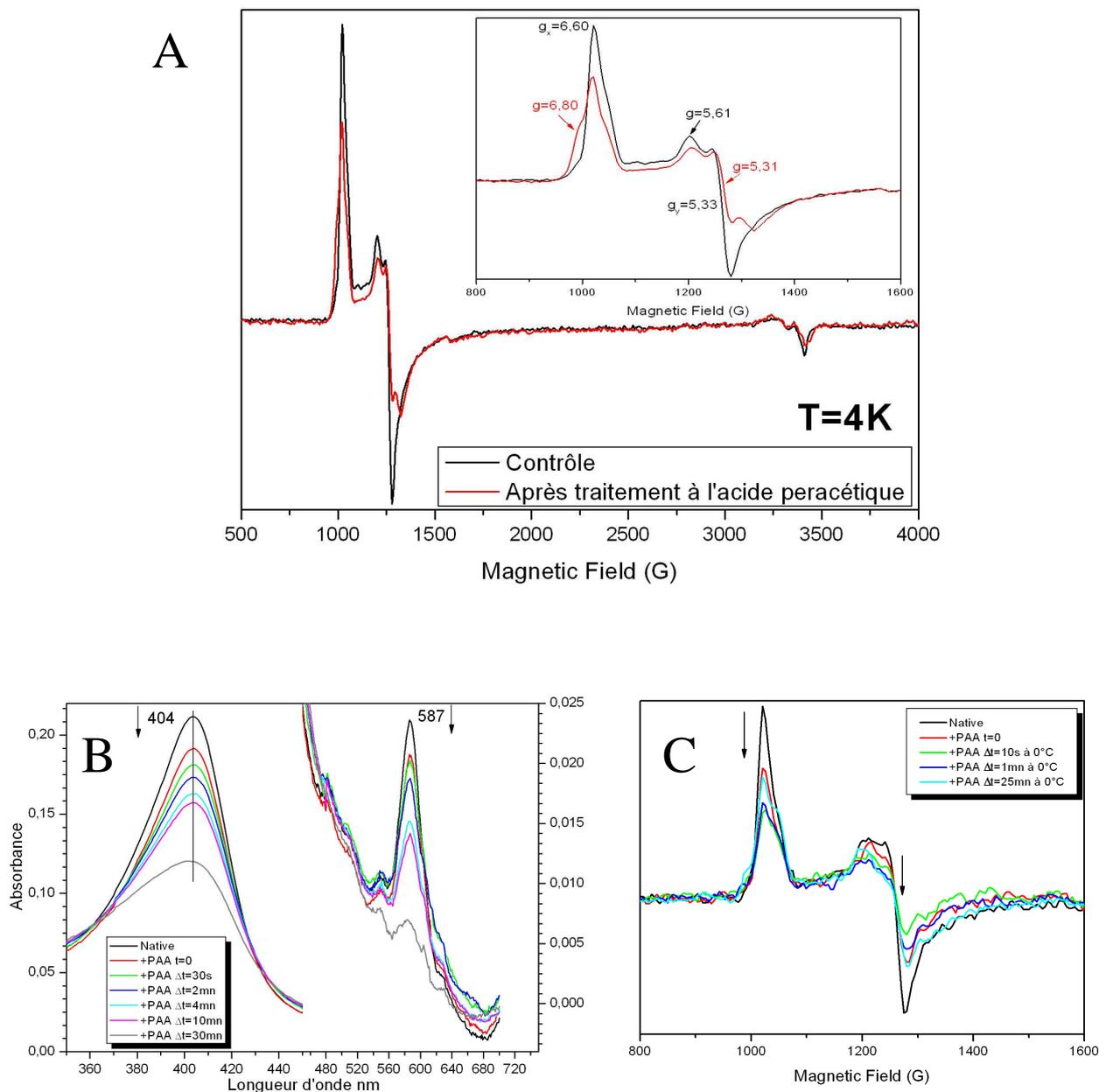


Figure 3- 20: (A) : Spectres RPE 9 GHz à T=4K de la catalase d'*E. coli* native (spectre noir) et après traitement par l'acide peracétique (spectre rouge). Les conditions d'enregistrement des spectres sont identiques à celles de la figure 3-11. Encadré : Elargissement de la région g=6 des spectres RPE à 9 GHz pour T=4K (B) : Spectres d'absorption UV-visible de la catalase d'*E. coli* après traitement par l'acide peracétique. L'acide peracétique est ajouté 130 fois en excès par rapport à l'hème, ces mêmes conditions ont été utilisées pour les spectres RPE de la figure A. (C) : Elargissement de la région g=6 des spectres RPE à 9 GHz pour T=4K représentés en fonction du temps de décongélation.

II.3- AUCUN INTERMEDIAIRE RADICALAIRE DETECTE.

Dans le cas des catalases d'*E. coli*, de *P. syringae* et de *S. marcescens*, aucun intermédiaire radicalaire n'a pu être détecté et ce quelques soient les paramètres expérimentaux. Aussi dans un souci de clarté, seuls quelques spectres seront présentés pour illustrer nos propos.

II.3-1 Cas de la catalase d'*E.coli*.

Sur la figure 3-20 A est représenté le spectre RPE à 9 GHz de l'enzyme après traitement par l'acide peracétique ajouté 130 fois en excès (spectre rouge). Il est clair qu'aucun signal n'est détecté en $g=2$, ce qui signifie qu'aucun radical organique n'est formé dans cette protéine. Notons que seulement 28 % du signal ferrique est converti mais sous une forme non détectée en RPE. L'ajout d'acide peracétique n'implique pas de changement spectaculaire au niveau du signal ferrique, comme nous l'avons observé pour la catalase de *B. abortus* à haut pH. Il n'y a donc pas de preuve de la fixation d'une molécule d'acide qui empêcherait la réaction de se produire.

La spectroscopie d'absorption électronique UV-visible permet d'affirmer que l'enzyme n'est pas converti en composé II (silencieux en RPE) car aucune bande attribuable à une telle espèce n'est observée (figure 3-19 B). Cependant, notons que la formation du composé I est bien plus lente qu'avec les autres catalases (le taux de conversion varie de 10 % après introduction de l'acide peracétique jusqu'à 57 % après 25 min de réaction) et la particularité du spectre du composé I, qui ne présente pas de bande à 660 nm comme l'ont montré Obinger et coll.⁶¹, car l'hème présent est un hème *d* et non un hème *b*. On remarque donc que contrairement aux autres catalases, la formation de ce composé I est très lente. L'association des ligands est moins efficace avec les hèmes *d* qu'avec les hèmes *b*. Cet hème *d* rendrait donc l'enzyme moins réactif que l'hème *b* vis-à-vis de l'acide peracétique, qui n'est pas le substrat naturel des catalases mais un pseudo-substrat utilisé pour diminuer la vitesse de réaction et empêcher la formation de dioxygène.

Afin de vérifier si un temps de mélange plus long permet de visualiser la formation d'une espèce radicalaire, en RPE, nous avons procédé à la décongélation progressive dans la glace de l'échantillon (figure 3-20 C). Seule la décroissance du signal ferrique est observée, sans apparition d'un autre signal. De 10s à 1 min, le signal ferrique restant correspond à la

moitié de l'intensité du signal du contrôle. Ultérieurement, la forme ferrique initiale réapparaît progressivement mais sa régénération totale n'a pas pu être observée car l'enzyme précipite au-delà de 25 min. Sous quelle autre forme l'enzyme peut elle exister ? Deux hypothèses sont envisageables :

- Bien que Loewen et coll.⁶² aient montré par absorption que les catalases à grandes sous-unités, comme HP11, sont incapables de former le composé II, cette espèce reste possible car les conditions expérimentales en RPE sont complètement différentes de celles de l'absorption UV-visible.
- La catalase formerait une espèce spin faible dont la concentration serait trop faible pour être détectée.

II.3-2 Cas de la catalase de *P. syringae*

Les figures 3-21 A et 3-21 B présentent les résultats obtenus avec CatF pour des excès en acide peracétique différents respectivement en spectroscopie RPE et absorption UV-visible.

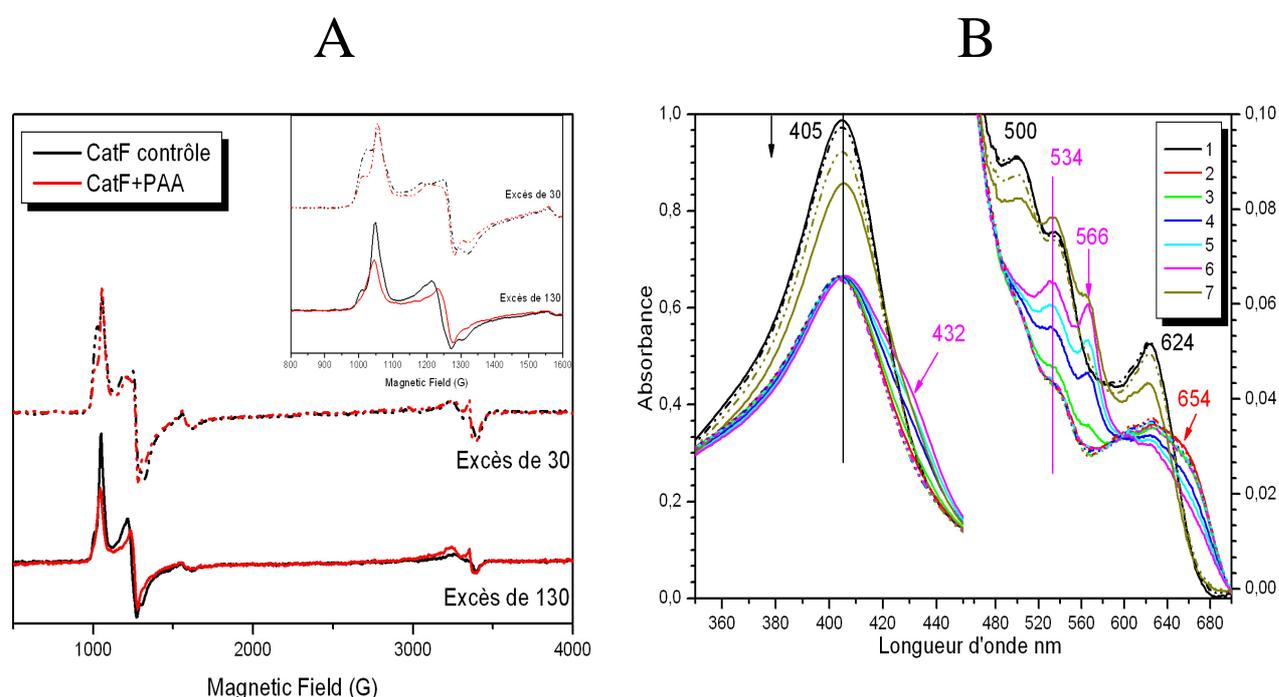


Figure 3- 21 : (A) : Spectres RPE 9 GHz de la catalase de *P. syringae* native (spectre noir) et traitée par l'acide peracétique ajouté 130 fois en excès (spectre rouge) par rapport à l'hème (traits pleins) ou 30 fois en excès (traits pointillés). Les conditions d'enregistrement sont identiques à la figure 3-11. Encadré : Elargissement de la partie du spectre en $g=6$. (B) : Spectres d'absorption de CatF en fonction du temps, traitée par l'acide peracétique ajouté 130 (traits pleins) et 30 fois en excès (trait pointillés). (1) Enzyme natif ; (2) Après introduction de l'acide peracétique ; (3) après 30s de réaction ; (4) après 2 min de réaction ; (5) après 4 min de réaction ; (6) après 10 min de réaction ; (7) après 1 heure de réaction.

Avec un faible excès, aucune réaction ne semble avoir lieu puisque les signaux RPE avant et après la réaction sont superposables. Par contre, pour un excès plus important, l'intensité du signal ferrique dû à l'enzyme natif diminue significativement, jusqu'à 30 % après 10s de mélange.

Toutefois, en spectroscopie UV-visible, on détecte la formation du composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}] dans les deux situations. Avec un fort excès en acide peracétique, la présence de composé I n'est que suggérée par un épaulement aux alentours de 654 nm. Rapidement (4 min) deux nouvelles bandes à 566 et 534 nm apparaissent. Il se forme une espèce oxoferryle. Avec un faible excès, le composé I a une durée de vie relativement longue : après 1 min de réaction il est toujours détecté dans les mêmes proportions qu'après 30s de réaction. Par contre, aucune bande ni épaulement correspondant à la formation de composé II n'est observé. Ceci est en accord avec les résultats obtenus en RPE, puisque, rappelons-le, le composé II est silencieux en RPE. Il faut également remarquer que malgré l'excès d'acide, l'enzyme n'est nullement dénaturé puisqu'après une heure de réaction 87 % de l'enzyme natif est retrouvé (et 93 % dans le cas d'un excès plus faible).

La catalase de *P. syringae* formerait donc jusqu'à 30 % de composé II lorsqu'elle est soumise à un excès d'acide peracétique important mais malgré la présence des bandes caractéristiques du composé I en spectrophotométrie d'absorption UV-visible, aucune espèce radicalaire n'a été détectée en RPE. On se retrouve ici dans le même cas que pour la catalase de foie de bœuf, où l'intermédiaire porphyrinique avait été observé en absorption mais avait nécessité l'utilisation de la technique de freeze-quench pour être détecté en spectroscopie RPE.

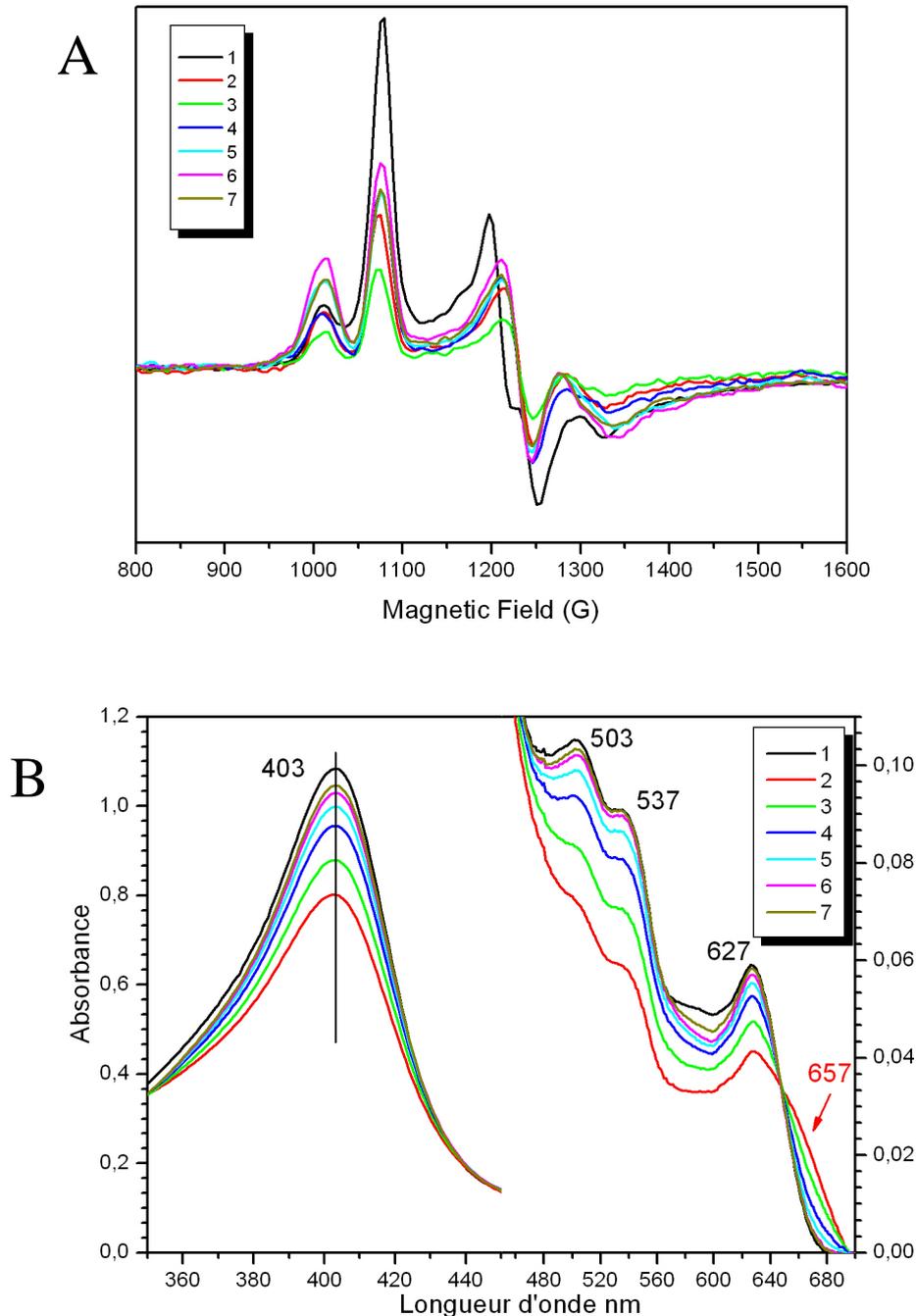


Figure 3- 22 : (A) : Elargissement de la région g=6 des spectres RPE à 9 GHz de *S. marcescens* pour T=4K représentés en fonction du temps de décongélation. (1) Contrôle ; (2) Après introduction de l'acide peracétique ; (3) Après 30s à T=0 C; (4) après 1 min à T=0°C; (5) Après 3 min à T=0°C; (6) Après 5 min à T=0°C; (7) Après 10 min à T=0°C. (B) : Spectres d'absorption de la catalase de *S. marcescens* traitée par l'acide peracétique ajouté 130 fois en excès. Les spectres sont représentés en fonction du temps (1) Enzyme natif ; (2) Après introduction de l'acide peracétique ; (3) Après 30s de réaction ; (4) Après 2 min de réaction ; (5) Après 4 min de réaction ; (6) Après 10 min de réaction ; (7) Après 1 heure de réaction.

II.3-3 Cas de la catalase de *S. marcescens*

La réaction entre l'acide peracétique et la catalase de *S. marcescens*, dans les conditions utilisées pour réaliser les expériences de spectroscopie RPE, n'a pas révélé la présence d'un radical (figure 3-22 A).

Pourtant, comme avec HP11 ou CatF, l'intensité du signal de l'enzyme natif diminue. Il y a deux composantes rhombiques dans ce signal. Juste après introduction de l'acide peracétique (2s), seule l'intensité du signal le moins rhombique a diminué, mais fortement (de 45 %) alors qu'après 30s à 0°C (seuls les transferts d'électron sont possibles), c'est l'intensité des deux signaux qui a encore diminué de 1,5 fois. Ensuite le comportement des deux signaux est le même, à savoir que leurs intensités ré-augmentent. Il semble donc que SMC forme un composé II. Cependant, sur les spectres d'absorption (figure 3-22 B) aucune preuve de formation de composé II n'est observée. Même la formation de composé I est très faible (environ 25 % de l'enzyme est convertie en composé I) et celui-ci est peu stable puisqu'il a complètement disparu après 2 min de réaction.

La catalase de *S. marcescens* semble donc être peu réactive vis-à-vis de l'acide peracétique.

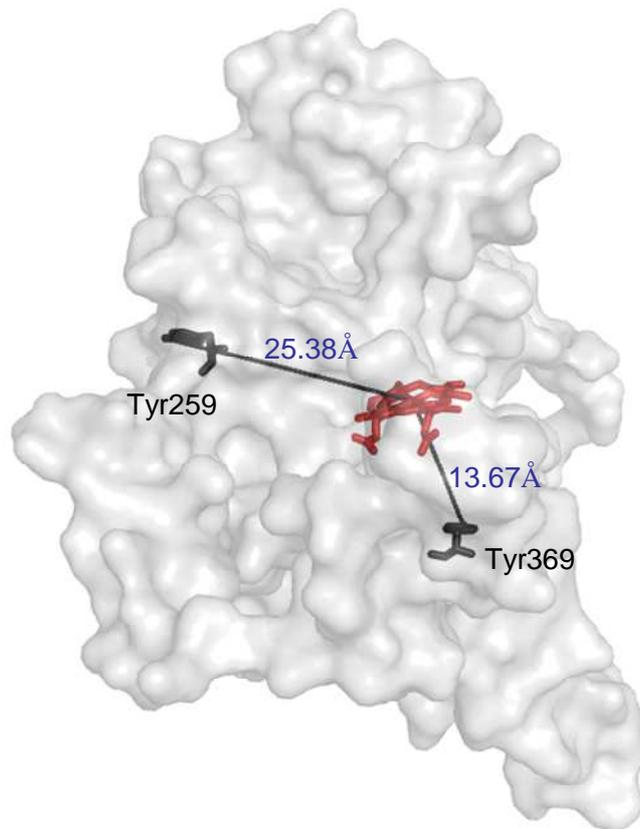


Figure 3- 23 : Résidus tyrosine proposés comme étant les sites d'oxydation possibles conduisant à la formation du radical tyrosyle chez la catalase de foie de bœuf. D'après Ivancich 1997⁴¹ et 1999⁶³

II.4- DISCUSSION.

II.4-1 Analyses de séquence des catalases et proposition de candidats pour le site de formation du radical tyrosyle.

Dans le cas de la BLC, des caractérisations spectroscopiques ont été entreprises afin de déterminer le microenvironnement du radical tyrosyle. Grâce à la RPE à champ intense et à la spectroscopie Raman^{53,63}, il a été démontré qu'il existe une distribution de liaisons hydrogènes sur le radical tyrosyle de la BLC dont la force dépend du pH.

Souvent, afin d'identifier le site de formation du radical protéique, la technique de mutagenèse dirigée, combinée avec la spectroscopie RPE, est utilisée. Cependant, dans le cas de la BLC, toutes les tentatives d'expression dans une souche bactérienne ont échouées. Il n'est donc pas possible d'obtenir des mutants de cette protéine. Les études de RPE à champ intense et de spectroscopie de résonance Raman ont permis à notre équipe de proposer des candidats pour le site de formation de l'intermédiaire tyrosyle^{53,41}. Deux candidats ont été mis en avant dans le cas de la BLC : la tyrosine 369 et la tyrosine 259 (figure 3-23). La Tyr259 se trouve à la surface de la protéine et peut former des liaisons hydrogènes avec un résidu aspartate ainsi qu'avec une molécule d'eau. La Tyr369 est, quant à elle, enfouie au sein de la protéine et relativement proche de l'hème (distance=13 Å). Elle peut également former une liaison hydrogène avec un résidu aspartate et une molécule d'eau.

Pour la catalase humaine, d'après les expériences de RPE à champ intense, l'environnement électrostatique du radical tyrosyle est identique à celui de la BLC. Les Tyr260 et Tyr370 correspondent aux Tyr259 et Tyr369 de la BLC (Tableau 3-5). Ces deux résidus se trouvent à la distance d'une liaison hydrogène avec le groupement carboxylique d'un aspartate. De plus, dans le cas de la Tyr370 un résidu histidine se trouve à 4 Å de l'oxygène phénolique. On se trouve ici dans une configuration similaire à celle de la catalase de foie de bœuf. Par analogie, dans la catalase humaine deux candidats peuvent être retenus.

Source	Candidat	Distance Fe----O _{Tyr} (Å)	Donneur de liaison H	Distance liaison H (Å)	Acide aminé positivement chargé (à moins de 10 Å)	Distance N(H)---O _{Tyr} (Å)
BLC	<i>Tyr259</i>	25,38	Asp206	2,42	His210	6,97
			Eau31	6	Arg209	8,56
	<i>Tyr369</i>	13,67	Asp334	2,56	His361	4,24
			Eau47	4,24		
HEC	<i>Tyr260</i>	25,14	Asp207	2,02	Arg210	6,55
			Eau1338	2,99	His211	7,52
	<i>Tyr370</i>	13,33	Asp335	2,68	His362	4,03
MLC	<i>Tyr271</i>	25,71	Glu408	2,66	Lys214	3,99
					Lys275	4,00
	<i>Tyr277</i>	25,0	Asp292	2,05	Arg278	3,97
	<i>Tyr293</i>	27,21	Glu273	2,64	Aucun	
Eau291			2,63			
BAC^a	<i>Tyr287</i>		Asp277			
	<i>Tyr349</i>		Ser314			

^a Observation basée sur l'analyse de séquence la structure cristallographique de BAC n'étant pas disponible.

Tableau 3- 5 : Environnement électrostatique des candidats pour le site de formation du radical tyrosyle chez BLC, HEC, MLC et BAC.

Dans le cas de MLC, le radical présente les mêmes caractéristiques environnementales que celui de BLC, mais d'après les études en saturation, il est peu probable qu'il se forme sur le même résidu. La structure cristallographique indique trois résidus tyrosine possédant l'environnement adéquat : Tyr271, Tyr277 et Tyr293. En effet, pour tous ces résidus, l'oxygène phénolique se trouve à distance de liaison hydrogène d'un groupement carboxylique d'un acide glutamique ou aspartique et en plus, pour les résidus 271 et 277, un résidu pouvant être chargé positivement (lysine ou arginine) se situe à moins de 4 Å de l'oxygène phénolique. Toutefois, les résidus proposés comme site d'oxydation alternatif sont relativement éloignés de l'hème (25 Å) et tous très proches les uns des autres.

Dans le cas de BAC, aucune structure cristallographique n'est actuellement disponible. Nous avons donc procédé à l'alignement de sa séquence avec celles de BLC, HEC et MLC. La séquence de BAC possède vingt tyrosines dont neuf sont conservées dans la séquence de la

BLC et 8 dans la séquence de MLC. De la comparaison de séquence (tableau 3-6) deux candidats possibles pour la catalase de *B. abortus* apparaissent : la Tyr287 et la Tyr349. Ces deux candidats sont d'autant plus probables que leurs équivalents, respectivement dans MLC pour la Tyr287 et dans la BLC pour la Tyr349, sont également des sites potentiels de formation de radical tyrosyle. Toutefois, les études en puissance de saturation sont en désaccord avec des intermédiaires radicalaires qui se formerait sur le même résidu. En effet, la puissance de saturation à T=30K de BAC est de 57 μ W tandis que celle de la BLC est de 38 μ W et celle de MLC sera inférieure à sa valeur à 20K qui s'élève à 40 μ W. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser une expérience de RPE à champ intense avec la catalase BAC, que nous n'avons pu mener à bien faute d'un échantillon suffisamment concentré.

Séquence de BAC	Séquence de BLC	Séquence de MLC	Observations dans les structures de BLC et MLC
Tyr74	Tyr93	Tyr80	Pas de liaison H, Arg à 4,0 Å → Arg, d(O—Fe)=28,76 Å Pas de liaison H, Lys à 3,91 Å → Arg, d(O—Fe)=28,55 Å
Tyr116	Tyr136	Tyr122	Pas de liaison H, d(O—Fe)=18,41 Å Pas de liaison H, d(O—Fe)=18,21 Å
Tyr194	Tyr214	Tyr200	Pas de liaison H, Arg à 3,58 Å → Arg, d(O—Fe)=18,11 Å Pas de liaison H, Arg à 3,11 Å → Arg, d(O—Fe)=17,78 Å
Tyr199	Phe219	Tyr205	Pas de liaison H, Arg à 4,06 Å → Arg, d(O—Fe)=9,49 Å
Tyr287	Tyr307	Tyr293	Pas de liaison H, d(O—Fe)=26,75 Å Glu à 2,64 Å → Asp, d(O—Fe)=27,21 Å
Tyr304	Tyr324	His310	Pas de liaison H, Arg à 4,35 Å → Arg, d(O—Fe)=16,24 Å
Tyr337	Tyr357	Tyr343	Ligand axial
Tyr349	Tyr369	Val355	Asp à 2,56 Å → Ser, d(O—Fe)=13,76 Å
Tyr364	Asn384	Tyr370	Pas de liaison H, His à 4,10 Å → His, d(O—Fe)=32,28 Å
Tyr384	Asn402	Tyr387	Pas de liaison H, d(O—Fe)=39,88 Å
Tyr385	Tyr403	Val388	Pas de liaison H, d(O—Fe)=40,5 Å
Tyr470	Tyr488	Ile476	Pas de liaison H, d(O—Fe)=23,21 Å

Tableau 3- 6 : Alignement de séquence de la catalase de BAC avec celles de la BLC et de MLC. Lecture du tableau : par exemple, la Tyr287 de BAC correspond à la Tyr293 dans MLC, est proche d'un acide glutamique (bleu dans MLC) alors que dans la séquence de BAC, le Glu correspond à un acide aspartique (en noir dans BAC).

Source	Intermédiaire(s) observé(s)	Candidats pour les sites de formation du radical tyrosyle				
BLC ^b	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]	Tyr259	Phe285	Phe291	Tyr307	Tyr369^c
HEC ^b	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]	Tyr260^c	Phe286	Phe292	Tyr308	Tyr370^c
MLC ^b	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]	Phe245	Tyr271^c	Tyr277^c	Tyr293^c	Val355
BAC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]]	Ser239	Glu265	Thr271	Tyr287^d	Tyr349^d
BPC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]	Ser242	Glu268	Tyr274	Tyr290	His352
BFC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]	Ser239	Glu265	Tyr271	Phe287	Ser349
PMC ^b	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]	Ser239	Glu265	Val271	Tyr287	His349
CatF ^b	nd ^a	His262	Pro288	Phe294	Val308	Gly370
HPH ^b	nd	Phe318	Glu343	Phe349	Val365	Phe428

^a Non déterminé dans les conditions utilisées. ^b Catalases dont la structure cristallographique est disponible. ^c Candidat possible d'après l'analyse de structure cristallographique. ^d Candidat possible sur la base des alignements de séquence. Dans la partie inférieure du tableau (sous la ligne) sont inscrits, pour les catalases qui ne forment de radical tyrosyle, les résidus homologues aux candidats possibles.

Tableau 3- 7 : Candidats possibles pour les catalases qui stabilisent un intermédiaire [Fe(IV)=O Tyr[•]].

Bien que les sites de formation du radical tyrosyle n'aient pu être déterminés de façon univoque pour ces catalases, nos observations ont fait ressortir un point important quant aux critères habituellement utilisés pour proposer les sites de formations de radicaux chez les catalases et chez les peroxydases : la simple comparaison des résidus conservés par alignements des séquences primaires ne permet pas de conclure, quant à la localisation du site radicalaire.

Ici, ce critère ne s'avère pas suffisant. Parmi les trois sites possibles de formation du radical tyrosyle chez MLC, seule la Tyr271 n'est pas conservée dans les protéines qui ne forment pas de radical tyrosyle (BFC, BFC, CatF et HPH). On pourrait donc penser que c'est l'absence de ce résidu qui empêche la formation du radical tyrosyle dans ce groupe de

catalase, et parallèlement, que chez MLC, cette tyrosine constitue le site, tout désigné, de formation du radical. Cependant, bien que cette même tyrosine ne soit pas conservée chez BLC, HEC et BAC, ces catalases forment également un radical tyrosyle. Il est donc difficile de lier séquences primaires et site radicalaire. Une autre observation est que la Tyr293, proposée comme site radicalaire possible pour MLC, est conservée chez toutes les catalases qui forment un radical tyrosyle. Cette tyrosine semblerait donc être un site idéal pour la formation du radical pour ces protéines. Mais il a été démontré que le site de formation du radical de la BLC ne pouvait se localiser sur un tel résidu⁶³. De plus, ce même résidu est conservé chez BPC et PMC, deux catalases qui ne forment pas de radical protéique. Il apparaît donc que, plus que la localisation, c'est l'environnement électrostatique du radical qui est conservé.

On peut également supposer que plus que le résidu en lui-même, ce qui doit être conservé c'est l'accessibilité au résidu, c'est à dire la chaîne de transfert d'électron entre la tyrosine et l'hème. En effet, le résidu homologue à la Tyr293 de MLC correspond à une tyrosine chez BPC et PMC, qui ne stabilisent que le radical porphyrinique cationique. Il se peut donc que le radical ne soit pas formé dans ces deux dernières catalases car il manque un maillon dans la chaîne de transfert d'électron.

II.4-2 Analyse des structures cristallographiques.

D'après ce qui précède, il apparaît qu'une analyse des structures est nécessaire afin de déterminer les microenvironnements des résidus aminés. Pour cela nous avons comparé les catalases suivantes dont la structure cristallographique est connue.

Source	Intermédiaire(s)	Structure(s)
BLC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]] ⁴¹	7cat ²⁸
HEC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]] ^f	1dgb ³⁰
MLC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]] ^{f, 58}	1gwe ¹⁸ , 1gwf ^{d, 18}
HPC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}], [Fe(IV)=O Tyr [•]] ^g	1qwl ⁶⁴ , 2iqf ^{e 52}
PMC ^a	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] ⁴¹	1m85 ²⁵ , 1mqf ^{e 65} , 2cag ^{d, 57}
PVC ^b	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]	2iuf ^{e 52}
HPH	nd ^{c, f}	1ye9 ⁶⁶
CatF	nd ^{c, f}	1m7s ⁶⁷

^a PMC=*Proteus mirabilis* catalase, ^b PVC=*Penicillium vitale* catalase, ^c nd= Non déterminé, ^d structure du composé II, ^e structure du composé I, ^f ce travail, ^g communication personnelle

Tableau 3- 8 : Structures des catalases monofonctionnelles.

L'étude de ces structures révèle qu'au niveau de l'hème de petites différences existent et ceci pourrait être à l'origine de la stabilisation ou non d'une espèce radicalaire. En effet, il apparaît que la structure globale de CatF est très similaire à celles des autres catalases, mais il existe des différences au niveau de l'hème. Dans la structure de CatF, ainsi que dans celle de HP11, les positions des groupements vinyles et méthyles des cycles I et II sont inversés par rapports aux autres catalases. Ceci se traduit par une orientation de l'hème basculée de 180° par rapport aux autres catalases. En effet, les interactions entre les groupements vinyles et méthyles avec la protéine, comme deux points d'ancrage, définissent l'orientation de l'hème, donc si ces derniers sont localisés à l'inverse cela implique une orientation différente pour l'hème. Chez BLC, HEC, MLC HPC et PMC, qui font parties du sous-groupe III (classe III) défini par Klotz et *coll.*⁵, l'hème est orienté de façon à ce que l'histidine distale soit au dessus du cycle III, alors que dans les catalases de CatF (classe I), HP11 et PVC (classe II) la même histidine est au dessus du cycle IV.

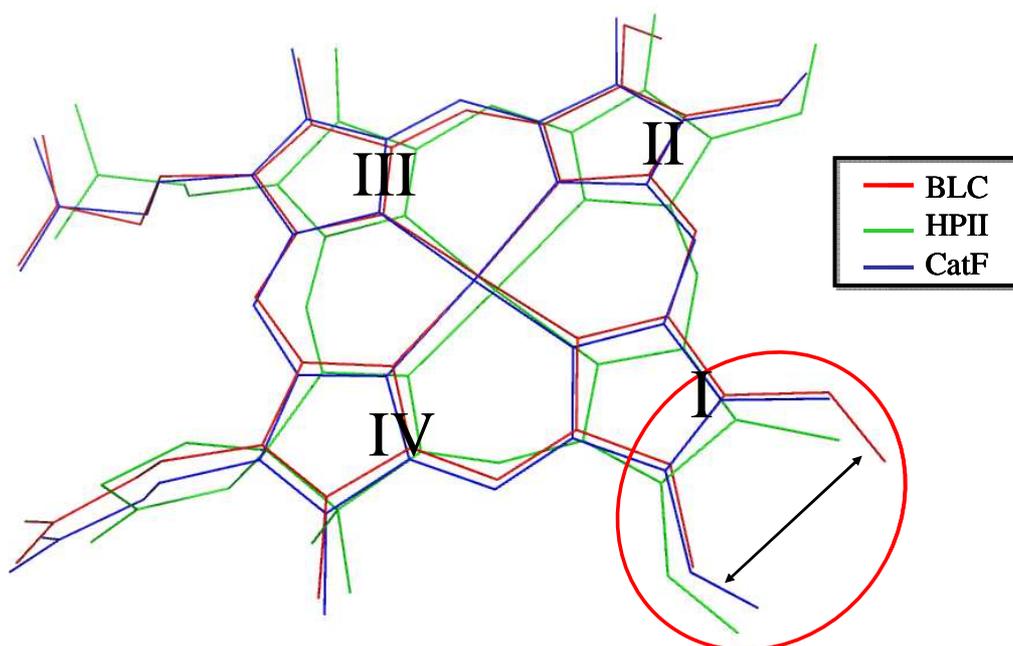


Figure 3- 24 : Représentation des superpositions des hèmes de BLC, HP11 et CatF. La numérotation des cycles de la porphyrine sont représentés. Le cercle rouge met en évidence la position relative des groupements vinyles et méthyles du cycle I (il en est de même pour le cycle II).

Ces données peuvent être interprétées en termes d'intermédiaires formés. En effet, CatF et HP11 sont deux des trois catalases qui ne forment pas de radical observable dans les conditions testées. Si le basculement de l'hème induit une forte modification des interactions hème-protéine alors des changements de planéarité de l'hème, des différences de stabilité

et/ou de réactivité des diverses espèces radicalaires pourraient être observés. Trois interprétations différentes peuvent alors être avancées :

1) Une déstabilisation relative de l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ élèverait le potentiel redox du fer et celui-ci ne serait plus capable de réagir avec l'acide peracétique, qui n'est pas le substrat physiologique des catalases. Cependant, en ce qui concerne CatF, cet enzyme n'est pas inactif vis à vis de l'acide peracétique puisque des bandes d'absorption caractéristiques du composé I et du composé oxoferryle, apparaissent à faible concentration.

2) L'espèce $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ est tellement déstabilisée qu'elle devient très instable et se transforme rapidement en d'autres espèces (composé II ?). Cela expliquerait notamment l'absence de signal pour les solutions très concentrées.

3) Tandis que le transfert d'électron intramoléculaire serait bloqué, le composé I, très réactif, retourne très vite à l'état natif. Des expériences de freeze-quench (mélange rapide) pourraient confirmer ou infirmer ces hypothèses.

Les structures cristallographiques nous renseignent également sur le nombre de molécules d'eau présentes dans le canal d'accès principal : six pour les catalases HP11 et CatF, quatre pour HEC et MLC et seulement deux pour PMC.

Source	Intermédiaire	Nombre de molécules d'eau dans le canal principal
HP11	nd	6
CatF	nd	6
HEC	$[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$	4
MLC	$[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$	4
PMC	$[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$	2

Tableau 3- 9 : Nombres de molécules d'eau dans le canal principal selon les catalases.

Il semble donc que le nombre de molécules d'eau présent dans le canal principal peut être corrélé à la stabilité du radical porphyrinique. Dans le cas de PMC, le composé I est observé à tous les pHs et il est suffisamment stable pour qu'aucun radical tyrosyle ne soit détecté. Pour HEC la formation du radical tyrosyle implique que le composé I se forme mais il est moins stable que chez PMC, puisque réduit par transfert d'électron intramoléculaire. Pour MLC, la formation du radical tyrosyle est observée à bas pH, et les quatre molécules d'eau sont observées dans la structure réalisée à bas pH, donc dans les conditions où le radical

porphyrinique de MLC est moins stable. Enfin, comme on ne détecte pas l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ chez HP11 et CatF, on peut supposer que ce dernier est très peu stable. Il apparaît donc que plus le nombre de molécules d'eau dans le canal principal est important plus la stabilité du composé I est faible.

Une autre observation révèle que la molécule d'eau qui pourrait coordonner l'atome de fer en tant que sixième ligand, est située différemment parmi les catalases. En effet, dans le cas de HP11 et CatF, elle se situe à 2,39 Å et 1,99 Å respectivement du fer, la molécule d'eau pourrait coordonner l'atome de fer. En revanche, dans le cas de PMC, la même molécule d'eau se trouve à 3,46 Å du fer et cette distance passe à 4,44 Å dans le cas de la catalase humaine et elle ne peut en aucun cas coordonner l'atome de fer. Il apparaît, ici encore, une corrélation avec la stabilité du composé I formé par ces catalases. Toutefois dans le cas de la catalase de MLC, cette distance est de 2,4 Å, la molécule d'eau peut coordonner l'atome de fer, ce qui ne va pas dans le sens de la corrélation. La coordination ou non de la molécule d'eau ne semble donc pas influencer la stabilité de l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$.

III. CORRELATION ENTRE LA STABILITE DES INTERMEDIAIRES FORMES ET L'ACTIVITE CATALYTIQUE.

En combinant les résultats obtenus en RPE et ceux de l'absorption UV-visible à basse température, il apparaît que toutes les catalases forment en premier lieu le radical porphyrinique, et seulement dans certains cas celui-ci peut évoluer vers un autre intermédiaire, où l'électron célibataire est porté par une espèce protéique. Ainsi, au sein des catalases, la stabilité relative du composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ varie vis à vis d'autres sites radicalaires potentiels.

Afin de vérifier si la formation d'un radical protéique pouvait, d'une manière ou d'une autre, influencer la réactivité catalytique des protéines vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène, nous avons réalisé différents tests d'activité. En supposant que le radical tyrosyle se forme préférentiellement avec le peroxyde d'hydrogène dans les mêmes conditions qu'avec l'acide peracétique nous avons fait varier la concentration en oxydant et la température (tableau 3-10).

Source	Intermédiaire(s) observé(s) en RPE	Stabilité du composé I en		Activité avec		Activité avec	
		Absorption UV-visible		50mM H ₂ O ₂ ^b		10mM H ₂ O ₂ ^b	
		PAA ajouté 30 fois en excès	PAA ajouté 130 fois en excès ^c	T=10°C	T=37°C	T=10°C	T=37°C
CatF	nd ^a	10min	2min	80 800	122 000	25 700	35 700
HPC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] puis [Fe(IV)=O Tyr[•]]	nd ^a	nd ^a	84 000	77 600	28 000	36 900
BLC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] puis [Fe(IV)=O Tyr[•]]	<30s	4min	94 000	108 000	33 300	30 700
BAC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] et [Fe(IV)=O Tyr[•]]	30s	4min	110 000	163 000	48 000	65 200
MLC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] ou ^d [Fe(IV)=O Tyr[•]]	nd ^a	nd ^a	145 000	202 000	50 000	43 000
BPC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]	30s	4min	219 000	239 000	54 600	83 500
HEC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] puis [Fe(IV)=O Tyr[•]]	<30s	2min	232 000	282 000	69 700	80 600

^a nd=Non déterminé

^b en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \mu\text{mol hème}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

^c Excès calculé par rapport à la quantité d'hème, PAA= Acide peracétique.

^d selon le pH.

Tableau 3- 10 : Paramètres cinétiques observés et intermédiaires formés par les catalases. En gras : irrégularités dans le classement de l'activité.

La catalase la moins efficace pour la dismutation du peroxyde d'hydrogène à basse température est CatF. Même si à basse température, en RPE, aucun intermédiaire radicalaire n'est observé, en spectroscopie d'absorption UV-visible, le composé I semble être un des plus stables. Le basculement de l'hème implique vraisemblablement que le composé I est différent de celui des autres catalases, ce que nous observons effectivement au niveau de la bande à 660 nm, qui est anormalement large. Cela pourrait expliquer sa faible réactivité par rapport au peroxyde d'hydrogène mais également à l'acide peracétique.

Dans la série HPC, BLC, BAC, MLC et BPC, l'efficacité de dismutation du peroxyde d'hydrogène peut être corrélée à la formation de l'intermédiaire protéique. HPC et BLC, présentent les activités plus élevées dans cette série. Or pour ces deux catalases, le radical tyrosyle est formé et c'est même la seule espèce observée en RPE conventionnelle. Pour

observer le composé radical porphyrinique, il faut se placer à des temps très courts de réaction en utilisant la méthode de freeze-quench.

BAC possède une activité catalytique plus élevée que HPC et BLC, en moyenne multipliée par 1,5 par rapport à BLC. Or chez cet enzyme, si le radical tyrosyle est observé, il l'est simultanément avec le radical porphyrinique. La stabilisation du radical porphyrinique se traduit donc par une augmentation de l'efficacité de la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène. La stabilisation relative du radical porphyrinique par rapport au radical tyrosyle se traduit donc par une augmentation de l'efficacité de la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène.

La catalase la plus active suivante est MLC. Chez cette catalase, le radical tyrosyle est observé mais seulement à bas pH. La mesure d'activité a été menée à pH=7, c'est à dire lorsque seul le radical porphyrinique est présent. L'activité vis à vis du peroxyde d'hydrogène est alors élevée. On pourrait s'étonner qu'à faibles concentrations en peroxyde d'hydrogène, l'activité catalytique de MLC peut être inférieure à celle de BAC. Il faut alors se rappeler qu'à faibles excès d'acide peracétique, la proportion de radical tyrosyle est faible pour BAC (voir II. 2.4.).

Enfin la catalase de BPC, qui forme uniquement le radical porphyrinique, possède une activité catalytique des plus élevées.

Si on considère uniquement cette série de catalases, il apparaît que les catalases, qui forment uniquement le radical porphyrinique, possèdent les activités catalytiques les plus importantes, alors que les catalases qui sont capables de former, *via* un transfert d'électron intramoléculaire, un radical tyrosyle voient leurs activités diminuées. Ceci s'explique aisément si on considère le schéma réactionnel 3-1 : la formation du radical tyrosyle y est en compétition avec la réaction du peroxyde d'hydrogène. Ce schéma réactionnel suppose donc que l'intermédiaire protéique ne réagit pas avec le peroxyde d'hydrogène. Dans ce cas, la formation du radical tyrosyle implique une diminution de la concentration en radical porphyrinique et donc également de l'efficacité enzymatique, puisque $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^\bullet]$ est inactif vis à vis du peroxyde d'hydrogène.

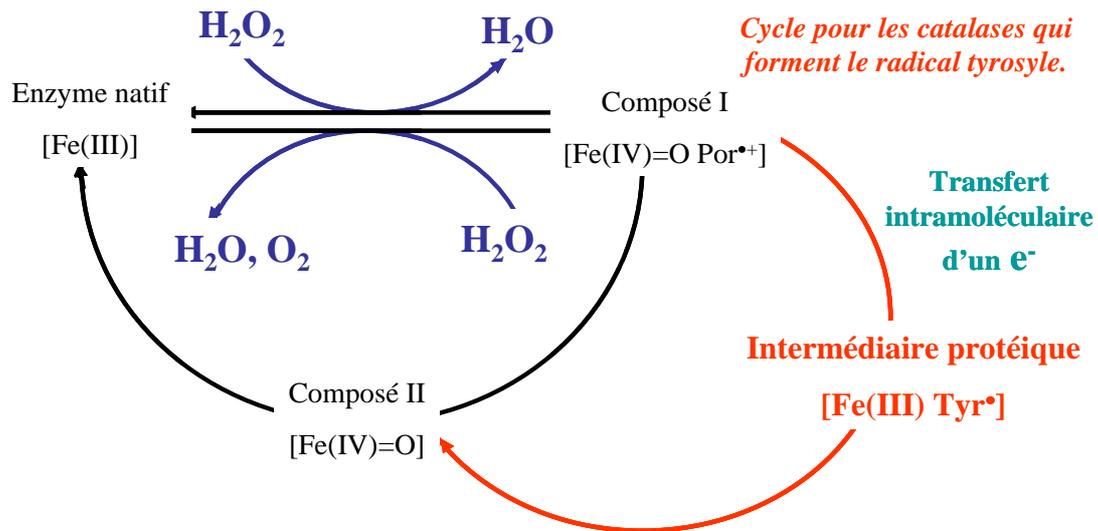


Schéma 3- 1 : Mécanismes catalytiques des catalases. A gauche, cycle classique. A droite, formation d'un radical protéique au cours du cycle.

A première vue, le cas de la catalase humaine semble en désaccord avec la corrélation proposée. En effet, dans HEC et BLC, on peut observer la formation des deux radicaux : le composé I $[Fe(IV)=O Por^{\bullet+}]$ et le composé $[Fe(IV)=O Tyr^{\bullet}]$, et d'après la spectroscopie d'absorption UV-visible, le radical porphyrinique possède, dans les deux conditions d'excès en acide peracétique, la même durée de vie. Et pourtant, l'activité de la catalase humaine vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène est 2,5 fois plus importante que celle de la BLC.

Il faut alors s'intéresser plus particulièrement à la proportion de radical sous sa forme *a priori* active (c'est à dire le radical tyrosyle) pour proposer une explication cohérente.

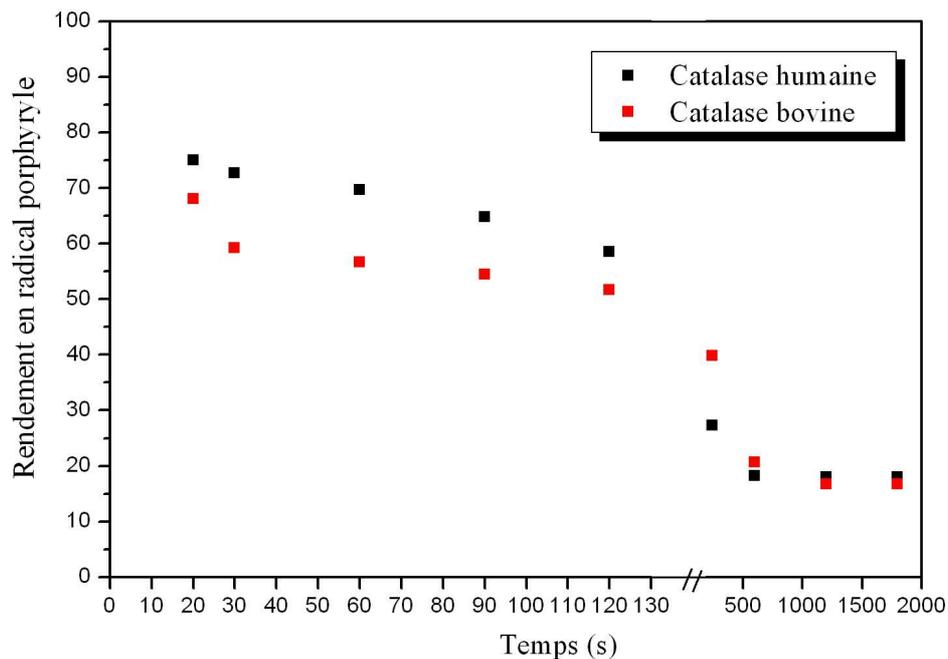


Figure 3- 25 : Rendement en radical porphyryle en fonction du temps de réaction pour les catalases humaine (point noir) et bovine (point rouge).

Au temps $t=0$ s aucun radical n'est détecté. D'après la figure 3-25, il apparaît que chez HEC, pour des temps inférieurs à 2 min, la proportion d'enzyme sous forme active est significativement plus importante que chez BLC. Au delà de 2 min, ces proportions deviennent identiques mais il très vraisemblable que pour des catalyseurs aussi efficaces que les catalases, le comportement après un tel temps de réaction n'ait plus qu'une influence négligeable sur l'activité, car tout le peroxyde d'hydrogène est d'ores et déjà consommé. On retrouve alors le cas de la corrélation : l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ étant la seule espèce active vis à vis du peroxyde d'hydrogène, plus sa concentration est importante, plus l'activité de l'enzyme est élevée.

On peut également remarquer que même après des temps relativement longs (2000s) ; l'enzyme n'est pas entièrement retourné sous sa forme native. Cela peut être dû au fait qu'une partie de l'enzyme soit dégradée.

IV. VERS UNE ACTIVITE PEROXYDASIQUE DES CATALASES ?

Le radical tyrosyle, éventuellement formé, a-t-il une utilité, notamment catalytique, ou n'est-il qu'un produit dérivé ? Le radical tyrosyle est formé à la suite du radical porphyrinique, mais bien que ce dernier ait un temps de vie très court, le turn-over d'un enzyme comme la BLC vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène est tellement élevé, qu'il est fort peu probable que le radical tyrosyle puisse jouer un rôle dans la fonction catalytique des catalases. Par contre, cet intermédiaire protéique pourrait jouer un rôle dans une activité type peroxydase. En effet, il a été démontré que dans le cas de la CcP, c'est le radical tryptophanyle qui réagit spécifiquement avec le ferrocyclochrome *c*. De même dans le cas des catalase-peroxydases, Singh et *coll.* ont montré que l'intermédiaire tryptophanyle formé par la KatG de *M. tuberculosis* réagit spécifiquement avec l'isoniazide⁷³.

Pour tester ce type d'activité nous avons choisi un substrat couramment utilisé dans les tests d'activité peroxydasique, l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) ou ABTS (schéma 3-2).

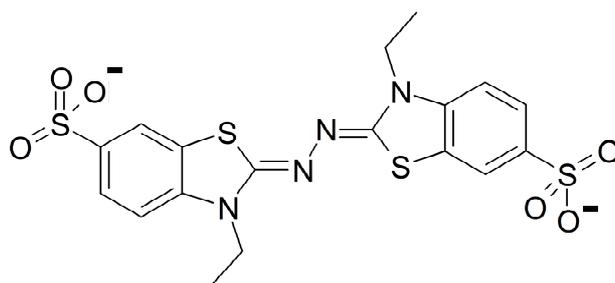


Schéma 3- 2 : Formule semi-développée de la molécule d'ABTS.

Cette molécule est fréquemment utilisée comme co-substrat avec le peroxyde d'hydrogène pour les peroxydases. La forme radicalaire (oxydée) de ce composé a une couleur différente de la forme réduite. La cinétique de sa formation peut donc être suivie en spectrophotométrie d'absorption UV-visible.

Comme pour les catalases, nous avons utilisé l'acide peracétique comme oxydant et non pas le peroxyde d'hydrogène, nous avons mesuré l'activité peroxydasique des catalases vis-à-vis de l'ABTS, ainsi que celle d'une catalase-peroxydase (BpKatG) et une peroxydase monofonctionnelle, la peroxydase de raifort (HRP), dans les mêmes conditions (tableau 3-11) :

Protéine	Intermédiaire(s) formé(s)	Substrats	Activité (mM ABTS. min ⁻¹ . μM hème ⁻¹)
CatF	nd ^a	PAA ^b +ABTS	0,2±0,01
BPC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]	PAA ^b +ABTS	0,47±0,06
HEC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] puis [Fe(IV)=O Tyr [•]]	PAA ^b +ABTS	0,51±0,07
BLC	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] puis [Fe(IV)=O Tyr [•]]	PAA ^b +ABTS	1,31±0,15
BpKatG	[Fe(IV)=O Por ^{•+}] puis [Fe(IV)=O Trp ^{•+}], [Fe(IV)=O Trp [•]], [Fe(IV)=O Tyr [•]]	PAA ^b +ABTS	3,42±0,42
HRP	[Fe(IV)=O Por ^{•+}]	PAA ^b +ABTS	5,5±0,09

^a nd=Non déterminé

^b PAA= Acide peracétique

Tableau 3- 11 : Activité peroxydase pour les catalases monofonctionnelles de *P. syringae*, de *B. pertussis*, humaine et bovine en utilisant l'acide peracétique et l'ABTS comme substrats. Pour comparaison les valeurs de l'activité peroxydase dans les mêmes conditions de la peroxydase bifonctionnelle de *B. pseudomallei* et de la peroxydase monofonctionnelle de raifort sont données.

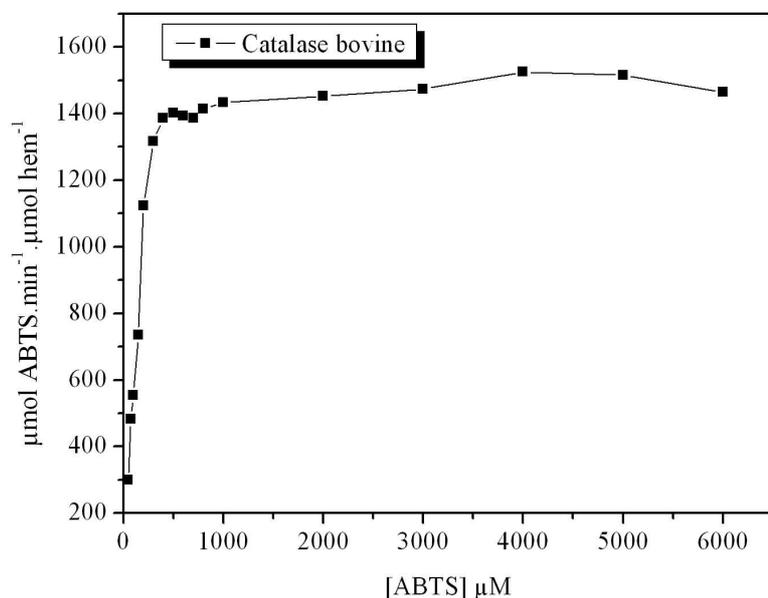
Hormis la catalase bovine, les activités mesurées sont trop faibles pour considérer que les autres catalases peuvent agir en tant que peroxydase. L'activité de BLC, déjà observée, par Baker et coll.⁴², bien que 4 et 2,6 fois inférieure à celle d'une peroxydase monofonctionnelle et à celle d'une peroxydase bi-fonctionnelle respectivement, ne peut pas être négligée.

Une hypothèse élégante pour expliquer l'activité peroxydasique ou non des catalases serait la suivante : c'est le radical tyrosyle qui réagirait avec l'ABTS et parallèlement les catalases les plus performantes en tant que peroxydase seraient celles dont l'activité de type catalase serait moindre, comme si d'avoir étendu leur spectre de substrats leur avait fait perdre

en efficacité. L'exemple de BPC est en accord avec cette théorie. En effet, celle-ci, qui forme uniquement le radical porphyrinique cationique, est une des catalases les plus efficaces pour la dismutation du peroxyde d'hydrogène mais ne possède pas d'activité peroxydasique notable, du moins dans les conditions utilisées en spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible. On remarque également que la BLC, capable de réagir comme une peroxydase, n'est pas une des catalases les plus efficaces.

Toutefois, si on suppose que le radical tyrosyle est l'intermédiaire réactif vis-à-vis de l'ABTS, une première contradiction apparaît. En effet, la catalase humaine forme également un tel radical mais ne présente aucune activité peroxydasique. De plus, ce radical est vraisemblablement très proche de celui formé chez BLC⁶³ : d'après l'analyse de séquences et de structure, ces deux radicaux seraient situés sur le même résidu tyrosine et d'après la RPE à champ intense, ils posséderaient le même environnement électrostatique. Comment ces deux radicaux, *a priori* proches dans leurs propriétés, pourraient dans un cas être réactif et dans l'autre inactif ?

Pour mieux comprendre l'activité de la BLC vis-à-vis de l'ABTS, nous avons alors cherché à déterminer les paramètres cinétiques (figure 3-26) de cette réaction.



Substrat	K_m (mM) observée	V_{max}^b
ABTS	$0,15 \pm 0,02$	$1516,8 \pm 16$
$H_2O_2^a$	93	$1,08 * 10^7$

a: Données tirées de la référence de Switala et coll. 2002³⁶

b: V_{max} en $\mu\text{mol substrat} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{mol Hème}^{-1}$.

Figure 3- 26 : Détermination des paramètres cinétiques de la réaction de la catalase de foie de bœuf avec l'ABTS et comparaison de ces paramètres avec ceux obtenus avec le peroxyde d'hydrogène.

La détermination de la constante K_m montre que la BLC possède une grande affinité pour l'ABTS, plus grande que celle pour le peroxyde d'hydrogène, puisque la constante K_m avec l'ABTS est 600 fois plus faible que celle avec le peroxyde d'hydrogène. Par contre, bien

que l'ABTS se lie fortement à la BLC, la réaction entre eux n'est pas très efficace. En comparaison, la réaction de la BLC avec le peroxyde d'hydrogène est 7000 fois plus rapide que celle avec l'ABTS. Finalement, l'ABTS se révèle un substrat médiocre pour la BLC.

Afin de vérifier la réactivité du radical tyrosyle vis-à-vis de l'ABTS nous avons étudié cette réaction par spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique. Nous avons suivi cette réaction entre l'ABTS et deux catalases, une qui forme le radical tyrosyle (BLC) et une qui ne le forme pas (BPC).

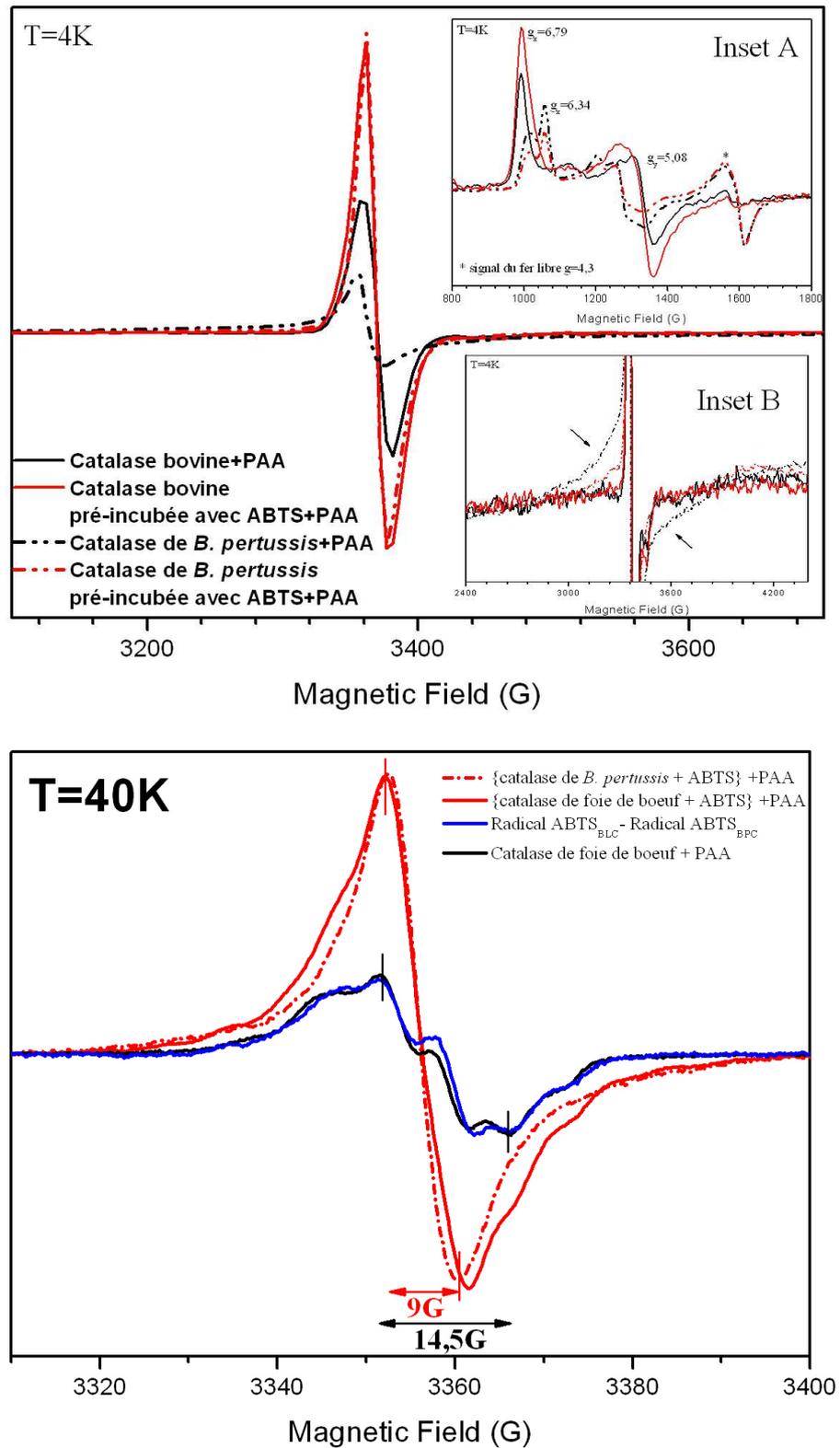


Figure 3- 28 : Réaction entre les catalases et l'ABTS suivie par spectroscopie RPE à 9 GHz. En haut : Spectres enregistrés à 4K. En Bas : Spectres enregistrés à 40K. En encadré A : Signal de la partie ferrique des spectres après réaction. En encadré B : Agrandissement de la partie en $g=2$ des spectres.

La figure 3-28 représente les spectres RPE à 9 GHz des enzymes pré-incubés avec l'ABTS, en proportions équimolaires, puis l'acide peracétique est ajouté 30 fois en excès (spectres rouges). Les spectres noirs correspondent aux témoins (*i.e* sans l'ABTS). En présence d'ABTS, la catalase BPC forme un signal étroit très différent de celui du contrôle à 4K. Ce signal ne correspond donc pas au composé I. Il s'agirait d'un radical organique, sans interaction magnétique avec le fer qui représente jusqu'à 80 % de toutes les espèces radicalaires, tandis que le composé I, lui, n'en représente que 18 % (figure 3-28 Encadré A). Dans ce cas, le spectre entre les deux échantillons ne présente pas de différences majeures hormis l'intensité du signal, qui est deux fois plus importante en présence d'ABTS. Notons également que la conversion du signal ferrique entre pour BPC et BLC (figure 3-28 encadré A) est similaire avec et sans ABTS et le rendement total en radical est d'environ 80%.

A 40K, pour BPC, en absence d'ABTS, on observe, comme attendu, aucun signal puisque chez cet enzyme seul le composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ est formé (voir partie II). En présence d'ABTS, un radical étroit de 9 G est détecté. Avec la BLC, on observe également ce signal étroit de 9 G, mais la forme de ce dernier est légèrement différente que celle du signal obtenu avec BPC. Des épaulements de part et d'autre de $g=2,004$ sont superposables au spectre du radical tyrosyle. Cette observation laisse supposer que le spectre observé avec la BLC correspond à l'addition de deux signaux. Effectivement, lorsque que l'on soustrait au signal de BLC le signal obtenu avec BPC (spectre bleu), un spectre superposable à celui du radical tyrosyle apparaît. Le spectre rouge de la figure 3-28, correspond donc à la superposition d'un signal dû au radical tyrosyle et d'un autre dû au radical de l'ABTS.

D'une part, on peut donc constater que dans les conditions utilisées pour les expériences RPE contrairement à celles de l'absorption UV-visible, BPC présente une activité peroxydasique, puisqu'elle oxyde l'ABTS. D'autre part, il semble clair que ce n'est pas le radical tyrosyle mais le radical porphyrinique cationique qui réagisse avec l'ABTS. Chez BLC, on observe simultanément le radical tyrosyle et le radical issu de l'ABTS. La réaction entre l'ABTS et le radical porphyrinique semble donc être en compétition avec le transfert d'électron intramoléculaire, responsable de la formation du radical tyrosyle.

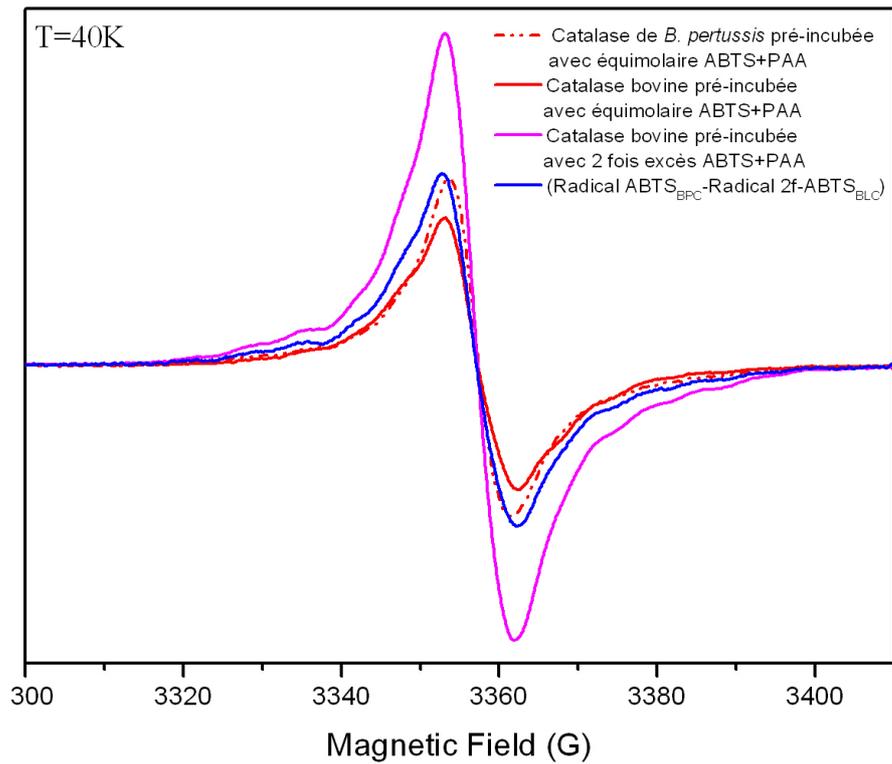


Figure 3- 29 : Effet de l'excès d'ABTS sur le spectre RPE à 9 GHz de la catalase de foie de boeuf

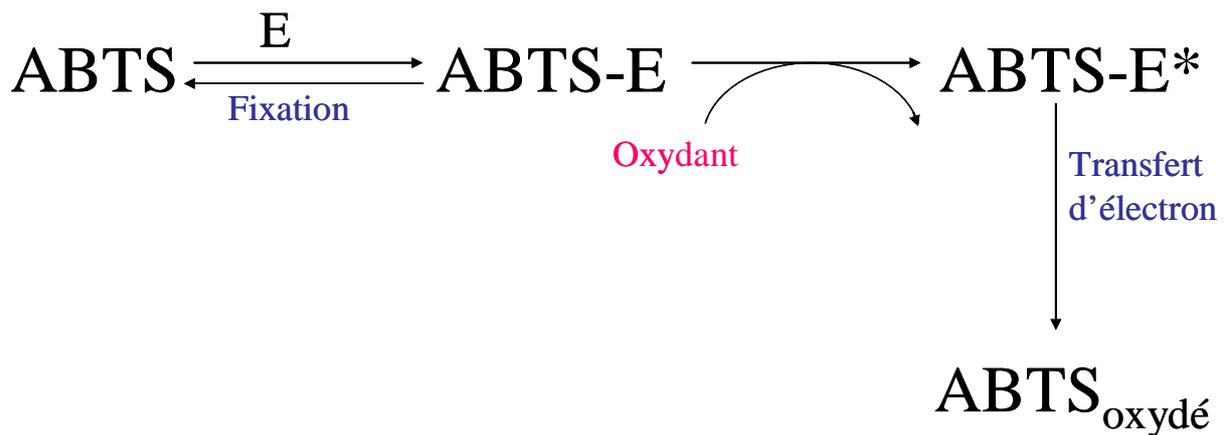


Schéma 3- 3 : Etape de la réaction d'oxydation de l'ABTS par les catalases.

Si l'ABTS est deux fois en excès par rapport à la concentration en hème, on ne détecte plus chez BLC (encore une fois par soustraction avec le signal obtenu avec BPC) le radical tyrosyle (figure 3-29). Un excès en ABTS favorise donc bien la réaction de formation du radical ABTS par rapport au transfert d'électron intramoléculaire, comme attendu pour des réactions concurrentes.

Cependant, un excès de deux fois n'est pas si important et il est assez remarquable que l'oxydation de l'ABTS soit autant favorisée par rapport à la formation du radical tyrosyle.

Pour expliquer ce résultat, on peut modéliser l'oxydation de l'ABTS comme un processus en plusieurs étapes : fixation de l'ABTS sur l'enzyme ; formation du radical porphyrinique puis oxydation d'une molécule d'ABTS (schéma 3-3)

Afin de comparer les vitesses relatives des deux réactions, mais également pour estimer l'importance de la fixation de l'ABTS à l'enzyme, nous avons introduit les réactifs dans un ordre différent (figure 3-30) :

- 1) La BLC est tout d'abord pré-incubée avec l'ABTS avant que l'acide peracétique ne soit ajouté.
- 2) A l'inverse : l'enzyme est mélangé avec l'acide peracétique suffisamment longtemps (2s) pour que le radical porphyrinique ait évolué vers le radical tyrosyle avant l'ajout de l'ABTS.
- 3) L'acide peracétique et l'ABTS sont introduits en même temps mais ils ne sont pas mélangés entre eux.

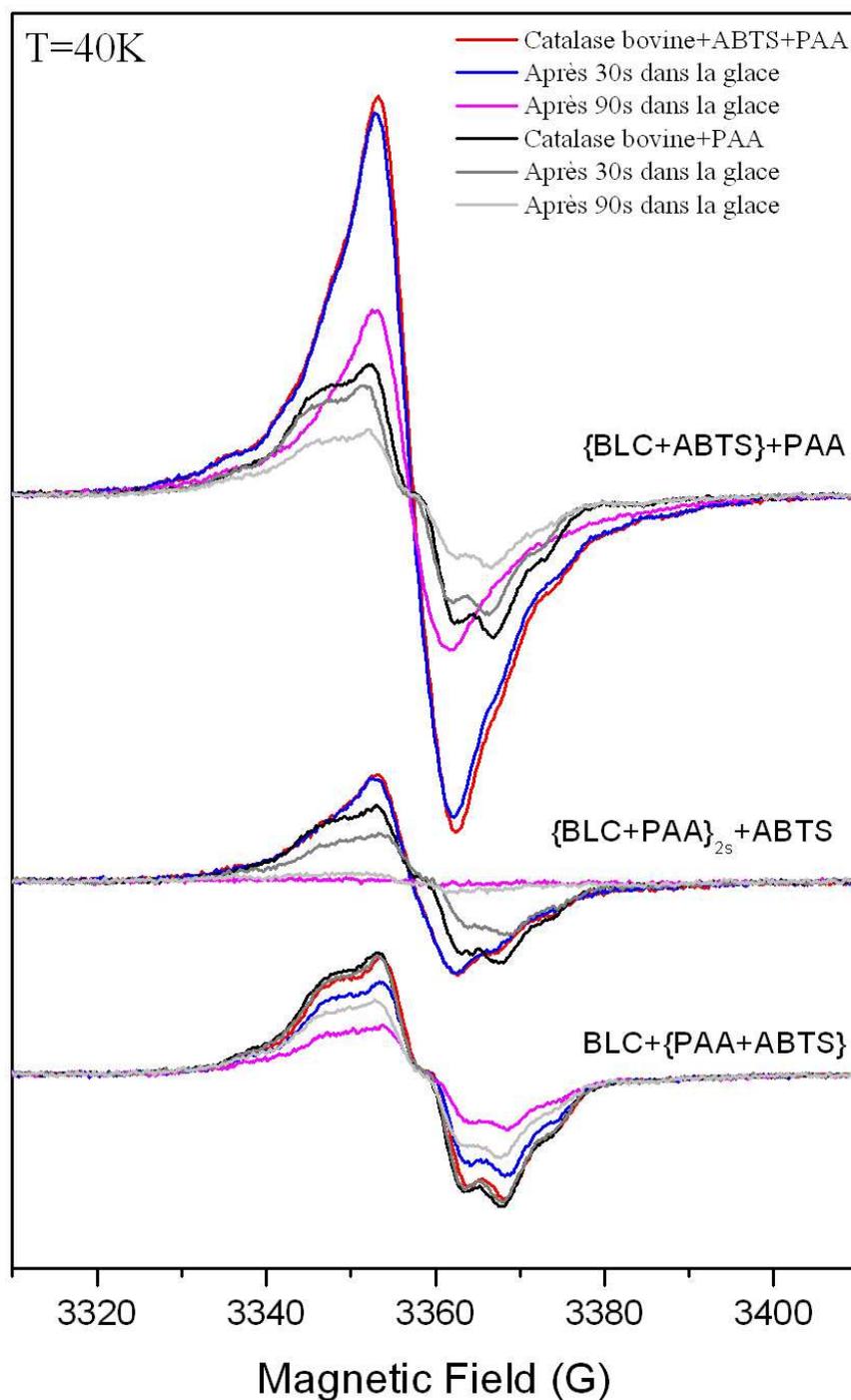


Figure 3- 30 : Effet des conditions de mélange sur le rendement en radical ABTS. (A) La BLC est pré-incubée avec l'ABTS et l'acide peracétique est ajouté ensuite. La réaction est réalisée dans la glace et stoppée par immersion dans l'azote liquide après 10s de 'mélange actif'. (B) : La BLC est mélangé pendant deux secondes avec l'acide peracétique puis l'ABTS est ajouté. (C) : L'acide peracétique et l'ABTS sont introduits en même temps mais ne sont pas pré-mélangés.

Dans les conditions de l'expérience 2, le signal du radical tyrosyle prédomine largement et l'ABTS est oxydé dans de très faibles proportions (rendement de 6 %). Cela signifie que l'évolution du radical porphyrinique vers le radical tyrosyle n'est pas réversible, la formation d'ABTS oxydé étant due à la présence de composé I dont on ne peut s'affranchir totalement à cause du grand excès en acide peracétique.

Il semblerait que le transfert d'électron entre la tyrosine et la porphyrine soit plus lent que l'oxydation de l'ABTS mais plus rapide que la fixation de l'ABTS à l'enzyme. En effet, nous avons vu (figure 3-29) que lorsque l'ABTS est déjà fixé à l'enzyme son oxydation est tellement plus rapide que la formation du radical tyrosyle que celui-ci n'est pas du tout détecté. Dans l'expérience 1 (figure 3-30), on montre également que le radical de l'ABTS oxydé est stable puisque après 30s dans la glace, le signal est le même qu'après 10s. Après 10s de mélange, la réaction entre la BLC et l'ABTS est donc terminée.

En revanche, dans les conditions de l'expérience 3, seul le radical tyrosyle et non celui issu de l'oxydation de l'ABTS est observé, ce qui s'explique aisément par une étape de fixation de l'ABTS à l'enzyme lente.

D'après la valeur de K_m , l'ABTS se lie fortement à la BLC. Or l'ABTS est une grosse molécule et comme nous l'avons précisé dans la première partie de ce chapitre, le canal d'accès menant à l'hème est en forme d'entonnoir et est très étroit. Il est donc très improbable que la molécule d'ABTS se fixe près de l'hème. D'ailleurs le spectre RPE du signal ferrique lorsque l'enzyme est pré-incubé avec l'ABTS est tout à fait superposable à celui où il n'y a pas d'ABTS dans le milieu, montrant ainsi que l'ABTS ne se lie pas près de l'atome de fer.

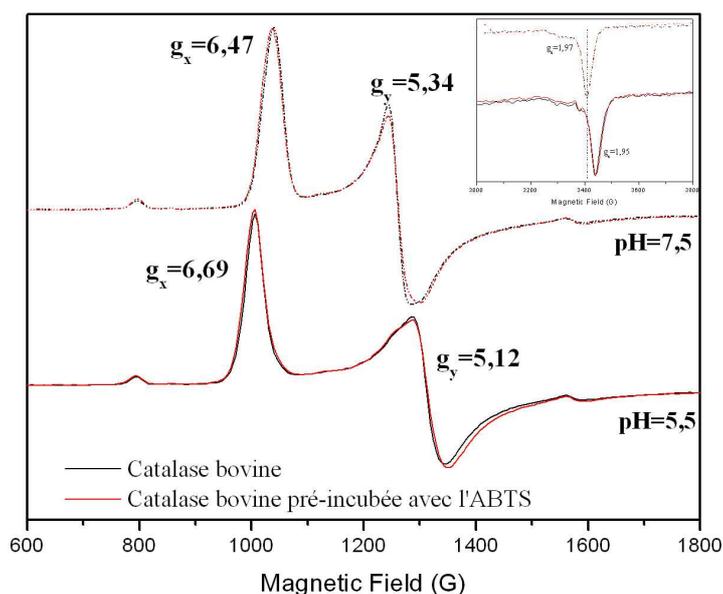


Figure 3- 27 : Signal ferrique de la catalase de foie de bœuf pré-incubée ou non avec l'ABTS à deux pHs différents.

La caractérisation par spectroscopie RPE de la réaction entre la BLC et l'ABTS a montré que le radical tyrosyle n'est pas impliqué dans cette réaction et que la réaction est réalisée *via* l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$. Le site de fixation de l'ABTS n'est cependant pas connu. L'ABTS se lie vraisemblablement en surface et réagit avec le radical porphyrinique par transfert d'électron. Cependant le mécanisme de réaction et même l'état de protonation exacte du radical ABTS ne sont pas connus.

Il apparaît donc que l'ABTS n'est pas un substrat spécifique du radical tyrosyle. Mais ce radical ne peut être considéré uniquement comme un sous-produit parasite aux vues, par exemple, du rendement de sa formation. Des recherches sont encore en cours pour déterminer d'autres éventuels substrats du radical tyrosyle.

CONCLUSIONS

La formation d'un radical tyrosyle dans d'autres catalases que la BLC n'est pas tout à fait inattendue. Dans notre étude comparative portant sur neuf catalases provenant de sources différentes, quatre sont capables de stabiliser un intermédiaire tyrosyle. Les facteurs influençant la formation et la stabilisation de cette espèce ne sont cependant pas les mêmes pour toutes les catalases. Deux points nous semblent particulièrement importants.

D'une part la formation du radical tyrosyle au sein des catalases ne dépend pas de la source de celle-ci. En effet, la BLC est une catalase de mammifère tandis que MLC est une catalase de bactérie et toutes deux forment néanmoins un radical tyrosyle. De plus, il apparaît que l'alignement de séquence n'est pas un critère suffisant pour expliquer la formation ou non d'un radical protéique. Ce qu'il faut considérer, c'est l'environnement électrostatique des radicaux tyrosyles, imposé par le repliement de la protéine. Il apparaît que cet environnement, essentiellement électropositif, est conservé parmi les catalases qui forment un radical tyrosyle.

D'autre part, alors que les catalases possèdent une vingtaine de résidus tyrosine, le radical ne se forme que sur une seule tyrosine spécifiquement. Le mécanisme de stabilisation de l'intermédiaire radicalaire sur le résidu spécifique reste cependant inconnu. La formation du radical tyrosyle dans le cas des catalases est réalisée par un transfert d'électron intramoléculaire, comme il l'a été démontré dans les peroxydases telles que la CcP. Se pourrait-il que les catalases et les peroxydases puissent réagir de la même manière ? Pour les catalases, la formation d'un intermédiaire, autre que le composé I, n'est pas nécessaire pour la dismutation du peroxyde d'hydrogène mais elle pourrait être impliquée dans l'oxydation de substrats, qu'il reste à déterminer. En revanche, dans le cas des peroxydases, étant donné que chaque enzyme possède un substrat spécifique, la formation d'un intermédiaire radicalaire protéique alternatif est importante. En effet, le potentiel redox d'un radical protéique peut être modulé par son environnement et grâce à l'existence de cet autre site l'accès du substrat à l'hème n'est pas nécessaire. Ainsi, la peroxydase de lignine forme un radical tryptophanyle à sa surface, qui participerait à l'oxydation de l'alcool veratrylique^{74,75,76}.

Puisque les catalases et les peroxydases forment le même type d'intermédiaire, il est envisageable que ces deux familles d'enzymes aient évoluées à partir d'un ancêtre commun. Les différences structurales des catalases et des peroxydases se situent au niveau de l'accessibilité à l'hème. Dans les catalases, l'étroitesse du canal menant à l'hème, impliquerait que les substrats, autres que le peroxyde d'hydrogène ne puissent pas l'atteindre^{30,77}. Il a

également été proposé que la différence de mécanisme entre les peroxydases et les catalases soit due à la présence ou non d'une molécule d'eau dans le site actif⁷⁸. Cependant si l'on considère la formation des radicaux protéiques pendant le cycle catalytique de ces protéines, ces deux hypothèses ne tiennent plus puisqu'il n'est pas alors nécessaire au substrat d'atteindre l'hème. Il apparaît que les catalase-peroxydases (voir chapitre suivant), qui possèdent une activité catalatique et également une activité peroxydasique, forment le composé I mais également des radicaux protéiques^{79,80}. Les catalase-peroxydases pourraient donc être l'ancêtre commun des catalases et des peroxydases.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- 1 P. C. Loewen, Bacterial catalases, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Rayleigh, **1997**, 273-308.
- 2 H. Ruis and F. Koller, Biochemistry, Molecular biology and cell biology of yeast and fungal catalases., *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Rayleigh, **1997**, 309-342.
- 3 J. G. Scandalios, G. Lingqiang and A. N. Polidoros, Catalases in Plant: Gene structure, Properties, Regulation and Expression, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Rayleigh, **1997**, 343-406.
- 4 J. Bravo, I. Fita, P. Gouet, H.-M. Jouve, W. R. Melik-Adamyan and G. N. Murshudov, Structure of catalases, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Rayleigh, **1997**, 407-445.
- 5 M. G. Klotz, G. R. Klassen and P. C. Loewen, Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases, *Mol. Biol. Evol.*, **1997**, *14*, 951-958.
- 6 J. Bravo, I. Fita, P. Gouet, H.-M. Jouve, W. R. Melik-Adamyan and G. N. Murshudov, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Rayleigh, **1997**, 407-445.
- 7 M. Zamocky and F. Koller, Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **1999**, *72*, 19-66.
- 8 W. F. Beyer and I. Fridovich, Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*: evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit, *Biochemistry*, **1985**, *24*, 6460-6467.
- 9 D. W. Christianson, Structural Chemistry and Biology of Manganese Metalloenzymes, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **1997**, *67*, 217-252.
- 10 M. W. Fraaije, H. P. Roubroeks, W. R. Hagen and W. J. H. Van Berkel, Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*., *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *235*, 192-198.
- 11 H. Ruis, F. Koller and J. G. Scandalios, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Rayleigh, **1997**, 309-342.
- 12 S. Mueller, H.-D. Riedel and W. Stremmel, Determination of catalase activity at physiological hydrogen peroxide concentrations, *Anal. Biochem.*, **1997**, *245*, 55-60.
- 13 A. U. Khan and T. Wilson, Reactive oxygen species as cellular messengers, *Chem. Biol.*, **1995**, *2*, 437-445.
- 14 R. H. Burdon, Superoxide and Hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation, *Free Rad. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 775-794.
- 15 B. K. Vainshtein, W. R. Melik-Adamyan, V. V. Barynin, A. A. Vagin and A. I. Grebenko, Three dimensional structure of the enzyme catalase, *Nature*, **1981**, *293*, 411-412.
- 16 M. R. N. Murthy, T. J. Reid, A. Sicignano, N. Tanaka and M. G. Rossmann, Structure of beef liver catalase., *J. Mol. Biol.*, **1981**, *152*, 465-499.

- 17 T. J. Reid III, M. R. N. Murthy, A. Sicignano, N. Tanaka, W. D. L. Musick and M. G. Rossmann, Structure and Heme environment of beef liver catalase at 2.5Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1981**, 78, 4767-4771.
- 18 G. N. Murshudov, a. I. Grebenko, J. A. Brannigan, A. A. Antson, V. V. Barynin, G. G. Dodson, K. S. Wilson and W. R. Melik-Adamyanyan, The structure of micrococcus lysodeikticus catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex, *Acta Crystallography D*, **2002**, 58, 1972-1982.
- 19 I. Fita and M. G. Rossmann, The active Center of Catalase, *J. Mol. Biol.*, **1985**, 185, 21-37.
- 20 I. Fita, A. Silva, M. R. N. Murthy and M. G. Rossmann, The refined structure of beef liver catalase at 2,5Å resolution, *Acta Cryst. B*, **1986**, 42, 497-515.
- 21 B. K. Vainshtein, W. R. Melik-Adamyanyan, V. V. Barynin, A. I. Grebenko, V. V. Borisov, K. S. Bartels, I. Fita and M. G. Rossmann, Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0Å resolution., *J. Mol. Biol.*, **1986**, 188, 49-61.
- 22 J. Bravo, M. J. Mate, T. Schneider, J. Switala, K. S. Wilson, P. C. Loewen and I. Fita, Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **1999**, 34, 155-166.
- 23 K. G. Stern, The constitution of the prosthetic group of catalase., *J. Biol. Chem.*, **1936**, 112, 661-669.
- 24 R. B. Frydman, M. L. Tomaro, J. Awruch and B. Frydman, Isolation from rat liver of a peroxisomal enzyme which converts molecular form 1 of biliverdin reductase into molecular form 3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 121, 249-254.
- 25 P. Gouet, H.-M. Jouve and O. Dideberg, Crystal Structure of *Proteus Mirabilis* PR Catalase with and without Bound NADPH., *J. Mol. Biol.*, **1995**, 249, 933-954.
- 25 A. Diaz, E. Horjales, E. Rudino-Pinnera, R. Arreola and W. Hansberg, Unusual Cys-Tyr Covalent Bond in a Large Catalase, *J. Mol. Biol.*, **2004**, 342, 971-985.
- 26 J. T. Chiu, P. C. Loewen, J. Switala, R. B. Gennis and R. Timkovich, Proposed structure for the prosthetic group of the catalase HPII from *Escherichia coli*., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 7046-7050.
- 27 H. N. Kirkman and G. F. Gaetani, Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1984**, 81, 4343-4347.
- 28 I. Fita and M. G. Rossmann, The NADPH binding site on beef liver catalase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1985**, 82, 1604-1608.
- 29 M. J. Mate, M. Zamocky, L. M. Nykyri, C. Herzog, P. M. Alzari, C. Betzel, F. Koller and I. Fita, Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 268, 135-149.
- 30 C. D. Putnam, a. S. Arvai, Y. Bourne and J. A. Tainer, Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism, *J. Mol. Biol.*, **2000**, 296, 295-309.
- 31 A. Hillar and P. Nicholls, A mechanism for NADPH inhibition of catalase compound II formation, *FEBS Letters*, **1992**, 314, 179-182.
- 32 L. P. Olson and T. C. Bruice, Electron Tunneling and *ab Initio* Calculations Related to One Electron Oxidation of NAD(P)H Bound to Catalase, *Biochemistry*, **1995**, 34, 7335-7347.
- 33 O. Almarsson, A. Sinha, E. Gopinath and T. C. Bruice, Mechanism of one-electron oxidation of NAD(P)H and function of NADPH bound to catalase., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7093-7102.

- 34 H. N. Kirkman, M. Rolfo, A. M. Ferraris and G. Gaetani, Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH: Kinetics and Stoichiometry, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 13908-13914.
- 35 D. E. Heck, A. M. Vetrano, T. M. Mariano and J. D. Laskin, UVB Light Stimulates Production of Reactive Oxygen Species. Unexpected role for Catalase, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 22432-22436.
- 36 J. Switala and P. C. Loewen, Diversity of properties among catalases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**, *401*, 145-154.
- 37 G. R. Schonbaum and C. Britton, Catalase, *The enzymes, 3rd ed.*, in P. D. Boyer, eds Academic press, New York, Vol 13, 363-407, **1976**,
- 38 B. Chance and D. Herbert, The Enzyme-Substrate Compounds of Bacterial Catalase and Peroxides. *The Enzymes.*, **1950**, *2*, 402-414.
- 39 P. Nicholls, The Formation and Catalytic Role of Catalase Peroxide Compound II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, *81*, 479-495.
- 40 D. Dolphin, A. Forman, D. C. Borg, J. Fajer and R. H. Felton, Compound I of Catalase and Horse-Radish Peroxidase: pi-Cation Radicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1971**, *68*, 614-618.
- 41 A. Ivancich, H.-M. Jouve, B. Sartor and J. Gaillard, EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: Formation of Porphyrin and tyrosyl Radical Intermediates, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 9356-9364.
- 42 W. L. Baker, C. Key and G. T. Lonergan, A Note Concerning acetate activation of Peroxidative activity of catalases using 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid as a substrate, *Biotechnology prog*, **2005**, *21*, 751-755.
- 43 G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen and J. Hajdu, The Catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution., *Nature*, **2002**, *417*, 463-468.
- 44 K. Nilsson, H.-P. Hersleth, T. H. Rod, K. K. Andersson and U. Ryde, The protonation Status of Compound II in Myoglobin, Studied by a combination of Exerimental Data and Quantum Chemical Calculations: Quantum Refinement., *Biophys. J.*, **2004**, *87*, 3437-3447.
- 45 C. Rovira, Structure, Protonation State and Dynamics of Catalase Compound II, *Chemphyschem*, **2005**, *6*, 1820-1826.
- 46 R. Silaghi-dumitrescu, The Nature of the High-valent complexes in the catalytic cycles of hemoproteins, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, *9*, 471-476.
- 47 M. T. Green, J. H. Dawson and H. B. Gray, Oxoiron(IV) in Chloroperoxidase Compound II Is Basic: Implications for P450 Chemistry, *Science*, **2004**, *304*, 1653-1656.
- 48 H.-P. Hersleth, U. Ryde, P. Rydberg, C. H. Gorbitz and K. K. Andersson, Structures of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 460-476.
- 49 X. Carpena, B. Wiseman, T. Deemagarn, R. Singh, J. Switala, A. Ivancich, I. Fita and P. C. Loewen, A molecular switch and electronic circuit modulate catalase activity in catalase-peroxidases., *EMBO Rep.*, **2005**, *6*, 1156-1162.
- 50 M. T. Green, Application of Badger's Rule to Heme and Non-Heme Iron-Oxygen Bonds: An Examination of Ferryl Protonation States., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 1902-1906.
- 51 R. K. Behan and M. T. Green, On the status of ferryl protonation, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 448-459.

- 52 M. Alfonso-Prieto, A. Borovik, X. Carpena, G. N. Murshudov, W. R. Melik-Adamyanyan, I. Fita, C. Rovira and P. C. Loewen, The Structures and Electronic Configuration of Compound I Intermediates of *Helicobacter pylori* and *Penicillium vitale* Catalases Determined by X-Ray Crystallography and QM/MM Density Functional Theory Calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13436-13446.
- 53 A. Ivancich, H.-M. Jouve and J. Gaillard, EPR Evidence for a tyrosyl radical intermediate in Bovine Liver Catalase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 12852-12853.
- 54 C. E. Schulz, P. W. Devaney, H. Winkler, P. G. Degranner, N. Doan, R. Chiang, R. Rutter and L. P. Hager, Horseradish peroxidase compound I: evidence for spin coupling between the heme iron and a 'free' radical, *FEBS Lett.*, **1979**, *103*, 102-105.
- 55 B. Chance, The spectra of the enzyme-substrate complexes of catalase and peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1952**, *41*, 404-415.
- 56 H.-M. Jouve, J. Gaillard and J. Pelmont, Characterisation and spectral properties of *Proteus mirabilis* PR catalase, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **1984**, *62*, 935-944.
- 57 P. Gouet, H.-M. Jouve, P. A. Williams, I. Andersson, P. Andreoletti, L. Nussaume and J. Hajdu, Ferryl intermediates of catalase captured by time-resolved Weissenberg crystallography and UV-Vis spectroscopy, *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, *3*, 951-956.
- 58 M. J. Benecky, J. E. Frew, N. Scowen, P. Jones and B. M. Hoffman, EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 11929-11933.
- 59 W. R. Patterson, T. L. Poulos and D. B. Goodin, Identification of a Porphyrin π -Cation Radical in Ascorbate Peroxidase Compound I, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4342-4345.
- 60 M. M. Palcic and H. B. Dunford, The reaction of human erythrocyte catalase with hydroperoxides to form compound I, *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 6128-6132.
- 61 C. Obinger, M. Maj, P. Nicholls and P. C. Loewen, Activity, Peroxide compound Formation, and Heme d Synthesis in *Escherichia coli* HPII Catalase., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, *342*, 58-67.
- 62 P. C. Loewen, Probing the structure of catalase HPII of *Escherichia coli*- a review, *Gene*, **1996**, *179*, 39-44.
- 63 A. Ivancich, T. A. Mattioli and S. Un, Effect of Protein Microenvironment on Tyrosyl Radicals. A High-Field (285 GHz) EPR, Resonance Raman and Hybrid Density Functional Study, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 5742-5753.
- 64 P. C. Loewen, X. Carpena, C. Rovira, A. Ivancich, R. Perez-Luque, R. Haas, S. Odenbreit, P. Nicholls and I. Fita, Structure of helicobacter pylori catalase, with and without Formic acid bound, at 1,6Å Resolution, *Biochemistry*, **2004**, *43*, 3089-3103.
- 65 P. Andreoletti, A. Pernoud, G. Sainz, P. Gouet and H.-M. Jouve, Structural studies of *Proteus mirabilis* catalase in its ground state, oxidized state and in complex with formic acid, *Acta crystallographica*, **2003**, *D59*, 2163-2168.
- 66 P. Chelikani, X. Carpena, R. Perez-Luque, L. J. Donald, H. W. Duckworth, J. Switala, I. Fita and P. C. Loewen, Characterization of a Large Subunit Catalase Truncated by Proteolytic Cleavage, *Biochemistry*, **2005**, *44*, 5597-5605.
- 67 X. Carpena, M. Soriano, M. G. Klotz, H. W. Duckworth, L. J. Donald, W. R. Melik-Adamyanyan, I. Fita and P. C. Loewen, Structure of the Clade 1 catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **2003**, *50*, 423-436.

- 68 O. Horner, J.-L. Oddou, J.-M. Mousesca and H.-M. Jouve, Mossbauer identification of a protonated ferryl species in catalase from *Proteus mirabilis*: Density functional calculations on related models, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**,
- 69 S. P. de Visser, What external Perturbations Influence the Electronic Properties of catalase Compound I?, *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 9551-9557.
- 70 O. M. Lardinois and P. M. Ortiz de Montellano, Autoreduction of Ferryl Myoglobin: Discrimination among the Three Tyrosine and Two Tryptophan Residues as Electron Donors, *Biochemistry* **2004**, *43*, 4601-4610.
- 71 V. Schünemann, F. Lenzian, C. Jung, J. Contzen, A.-L. Barra, S. G. Sligar and A. X. Trautwein, Tyrosine Radical Formation in the Reaction of Wild Type and Mutant Cytochrome P450cam with Peroxy Acids: A MULTIFREQUENCY EPR STUDY OF INTERMEDIATES ON THE MILLISECOND TIME SCALE, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 10919-10930.
- 72 C. A. Bonagura, B. Bhaskar, H. Shimizu, H. Li, M. Sundaramoorthy, D. E. McRee, D. B. Goodin and T. L. Poulos, High-Resolution Crystal Structures and Spectroscopy of Native and Compound I Cytochrome c Peroxidase, *Biochemistry* **2004**, *42*, 5600-5608.
- 73 R. Singh, J. Switala, P. C. Loewen and A. Ivancich, Communication personnelle, **2007**,
- 74 M. D. S. Gelpke, J. Lee and M. H. Gold, Lignin peroxidase oxidation of veratryl alcohol: effects of the mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3498-3506.
- 75 A. T. Smith and N. C. Veitch, Substrate binding and catalysis in heme peroxidases, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, *2*, 269-278.
- 76 W. Blodig, A. T. Smith, W. K. and K. Piontek, Evidence from spin-trapping for a transient radical on tryptophan residue 171 of lignin peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, *370*, 86-92.
- 77 S. G. Kalko, J. L. Gelpi, I. Fita and M. Orozco, Theoretical Study of the Mechanisms of Substrate Recognition by Catalase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 9665-9672.
- 78 P. Jones, Roles of Water in Heme Peroxidase and Catalase Mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 13791-13796.
- 79 A. Ivancich, C. Jakopitsch, M. Auer, S. Un and C. Obinger, Protein-based radicals in the catalase-peroxidase of *Synechocystis* PCC6803: A multifrequency EPR investigation of Wild-type and variants on the environment of the heme active site., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14093-14102.
- 80 S. Chouchane, S. Giroto, S. Yu and R. S. Magliozzo, Identification and Characterization of Tyrosyl radical Formation in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG), *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 42633-42638.

CHAPITRE 4

CATALASE-PEROXYDASES : VERS LA COMPREHENSION DU ROLE DES RADICAUX PROTEIQUES DANS LE CYCLE CATALYTIQUE CHEZ LES ANCETRES DES PEROXYDASES.

INTRODUCTION

A. LES CATALASE-PEROXYDASES.

Les catalase-peroxydases, également appelées KatGs d'après le gène codant pour ces protéines, sont présentes chez les bactéries, les archaebactéries et quelques champignons. En 1992, Zhang et coll.¹ ont démontré que la résistance à l'isoniazide, l'un des quatre antibiotiques utilisés dans le traitement de la tuberculose, était due à des mutations du gène *katG* codant pour la catalase-peroxydase de *M. tuberculosis*.

Tandis qu'en 1979 Claiborn et Fridovich² ont rapporté l'existence d'une peroxydase chez *Escherichia coli*, il aura fallu attendre dix ans pour que Loewen et coll.³ démontrent que cet enzyme possédait une activité catalasique, bien que celui-ci ne présente aucune similarité de séquence avec la catalase HP11 d'*E. coli*. En revanche, la séquence de cet enzyme possède de grandes similarités avec les celles des peroxydases à hème de plantes, l'ascorbate peroxydase et la cytochrome *c* peroxydase.

Les essais de cristallisation de la catalase-peroxydase d'*E. coli* aussi bien que ceux de la catalase-peroxydase de *M. tuberculosis* par un groupe de l'institut Pasteur échouèrent pendant environ dix ans. La première structure cristallographique fut finalement obtenue en 2001 par Yamada et coll.⁴ avec la catalase-peroxydase de *H. marismortui*, bactérie halophile. Peu après, l'équipe du professeur Loewen^{5,6} a déterminé la structure cristallographique de la catalase-peroxydase de *B. pseudomallei*. Dans le but d'utiliser la catalase-peroxydase de *B. pseudomallei* (BpKatG), comme un cas d'étude, pour comprendre le rôle des radicaux protéiques dans les peroxydases et les catalases à hème, nous avons entamé une collaboration avec l'équipe du professeur Loewen.

I. BpKATG: STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE ET PROPRIETES.

I.1-STRUCTURE GLOBALE.

Les quatre structures cristallographiques disponibles^{7,6,8,9} montrent que les catalase-peroxydases sont des homodimères dont chaque sous-unité est constituée de deux domaines. Malgré leur très grande homologie, attribuée à une duplication de gène¹⁰, seul un de ces domaines peut accueillir le cofacteur héminique (figure 4-1).

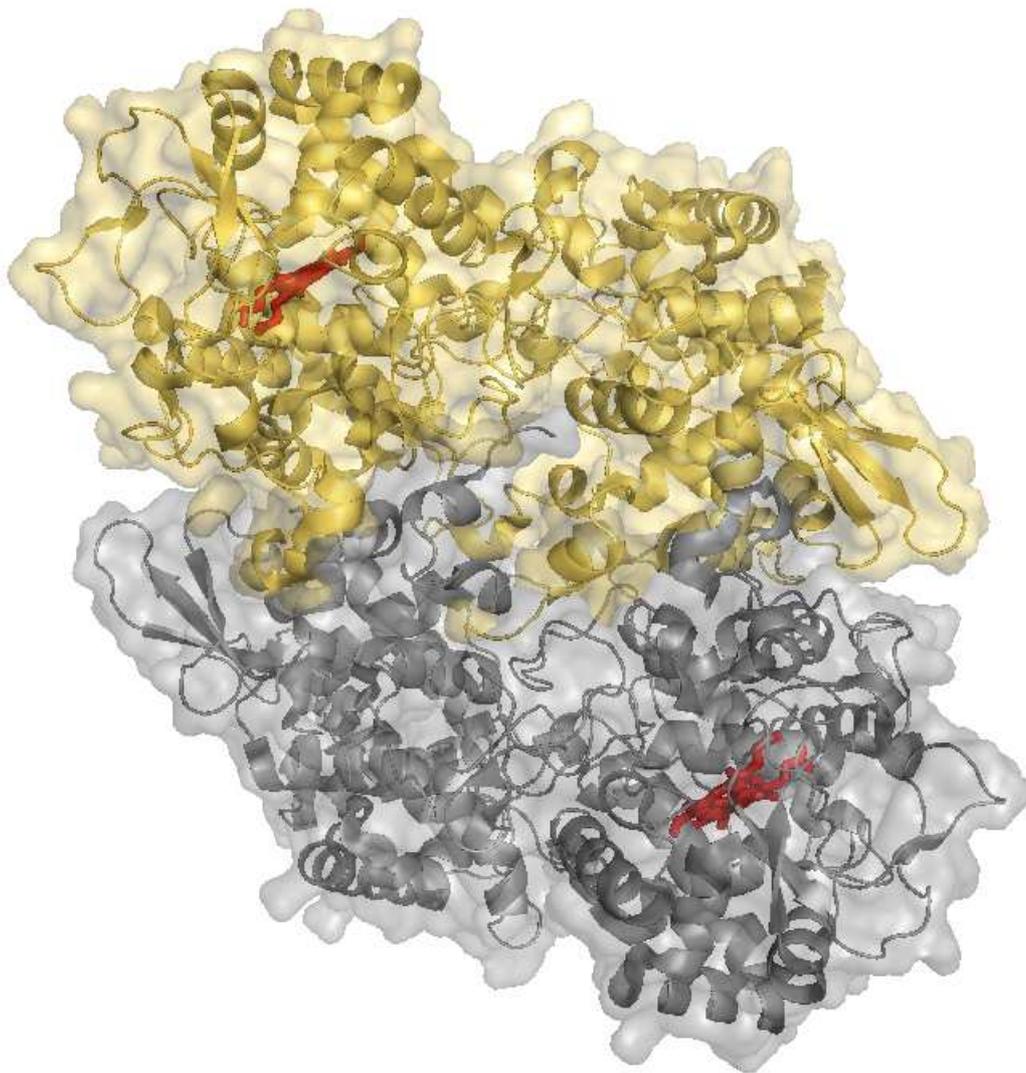


Figure 4- 1 : Structure de la catalase-peroxydase de *B pseudomallei*. Chaque sous-unité est représentée dans une couleur différente et les hèmes sont mis en évidence en rouge.D'après Carpena⁶. Numéro PDB : 1MWV.

Le centre actif des catalase-peroxydases est constitué d'une protoporphyrine IX de fer. Dans la partie distale, les résidus essentiels pour la catalyse chez les peroxydases de plantes^{4,6,11,8}, l'arginine et l'histidine, sont conservés chez les KatGs. Du côté proximal, le

cinquième ligand de l'atome de fer hémique est une histidine reliée par liaison hydrogène à un aspartate et un à tryptophane comme observé dans chez la CcP (figure 4-2).

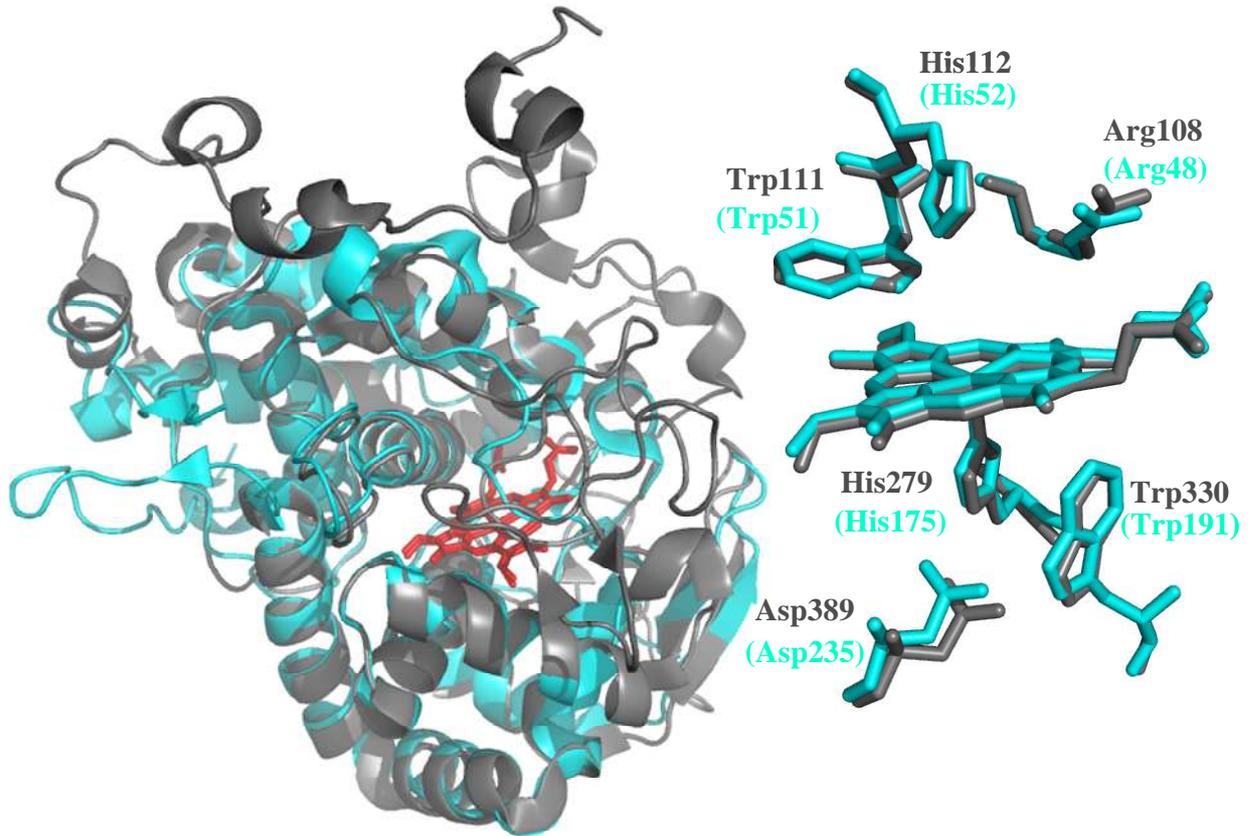


Figure 4- 2 : Superposition des parties N-terminales de la catalase-peroxydase de *B. pseudomallei* (en gris) et de la CcP (en cyan) ainsi que des résidus essentiels conservés des parties distale et proximale. Numéro PDB de BpKatG : 1MWV ; Numéro PDB de CcP : 1ZBY.

Si le site actif de BpKatG ressemble globalement à celui de la CcP, dans le détail il existe des différences significatives au niveau de l'environnement de l'hème qui confèrent leur spécificité aux catalase-peroxydases.

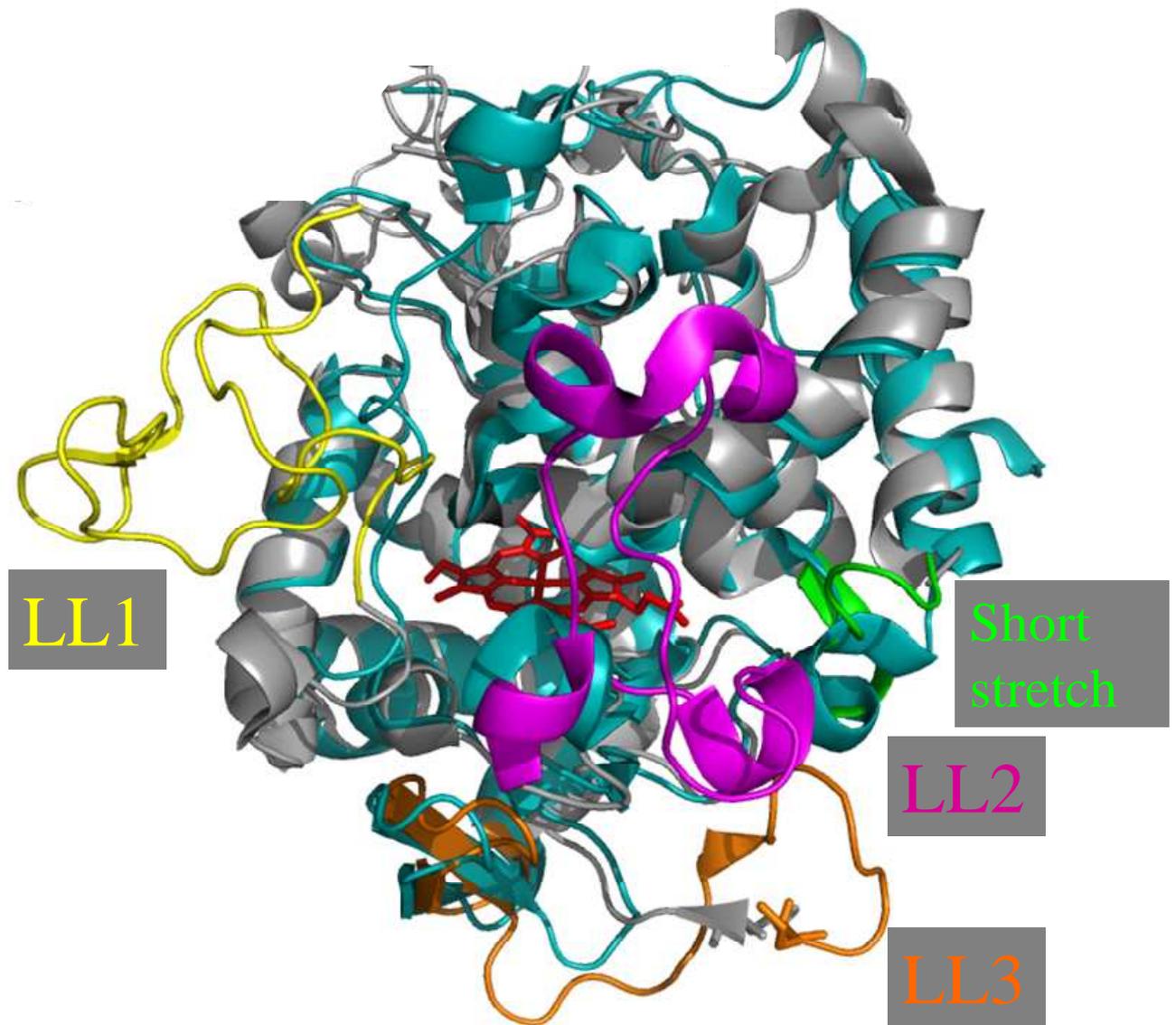


Figure 4- 3 : Superposition des structures de la catalase-peroxydase de *B. pseudomallei* (gris) et de la cytochrome c peroxydase (cyan). Les insertions présentes dans la structure de BpKatG sont mises en évidence par des couleurs : le 'short stretch' est en vert, la large boucle 1 est en jaune, la boucle 2 en magenta et la boucle 3 en orange. Numéro PDB : 1MWV.

I.2-PRESENCE DE TROIS LARGES BOUCLES ET D'UN 'SHORT STRECH' DANS LA REGION CATALYTIQUE.

L'arrangement des éléments de structure secondaire des KatGs est très similaire à celui de la CcP¹² et de l'ascorbate peroxydase (APX)¹³ qui appartiennent à la superfamille des peroxydases de classe I. Cependant, les KatGs possèdent des particularités, incluant une extension dans la partie N-terminale, un 'short stretch' et trois grandes boucles (LL1, LL2, LL3). Toutes ces insertions sont à la surface des protéines (figure 4-3).

Le 'short stretch' est formé par les résidus 91-102 (numérotation BpKatG). Ce 'short stretch' est très conservé (>95 %) parmi les KatGs. Notre groupe^{14,15} a démontré que le site unique de formation du radical tryptophanyle chez SyKatG est localisé sur le résidu 95 (numéroté 106 chez *Synechocystis*) qui appartient au 'short stretch'. Ce résidu est lié au site actif *via* un réseau de liaisons hydrogène, qui est primordial pour l'activité catalasique. Nous avons également démontré que la déplétion de ce 'short stretch' implique d'importants réarrangements au niveau de l'environnement de l'hème, puisque le spectre RPE de l'enzyme natif caractéristique d'un Fe(III) spin fort est transformé en spectre correspondant à un Fe(III) spin faible en absence du 'short stretch'. Cette insertion a donc un rôle crucial dans la géométrie de l'environnement de l'hème qui permet l'accès du peroxyde d'hydrogène au site actif.

La première boucle est localisée de la position 199 à 240 dans BpKatG (41 résidus). Dans les autres catalase-peroxydases, elle est formée de 36 à 43 résidus. Elle est située entre les domaines catalytiques distal et proximal. La deuxième boucle se localise aux positions 289-323. Elle est formée de 35 ou 36 résidus et est conservée chez les KatGs. Cette boucle 2 correspond au site de fixation du cytochrome *c* dans la CcP. La troisième boucle est localisée au niveau des résidus 346-379. Cette troisième boucle n'est pas conservée chez toutes les KatGs. Il est intéressant de remarquer que chez la CcP il existe une boucle similaire, plus courte, à cette position.

La conservation des boucles LL1 et LL2, ainsi que du 'short stretch' distal suggèrent que ces particularités structurales des catalase-peroxydases sont primordiales pour leurs activités¹⁶.

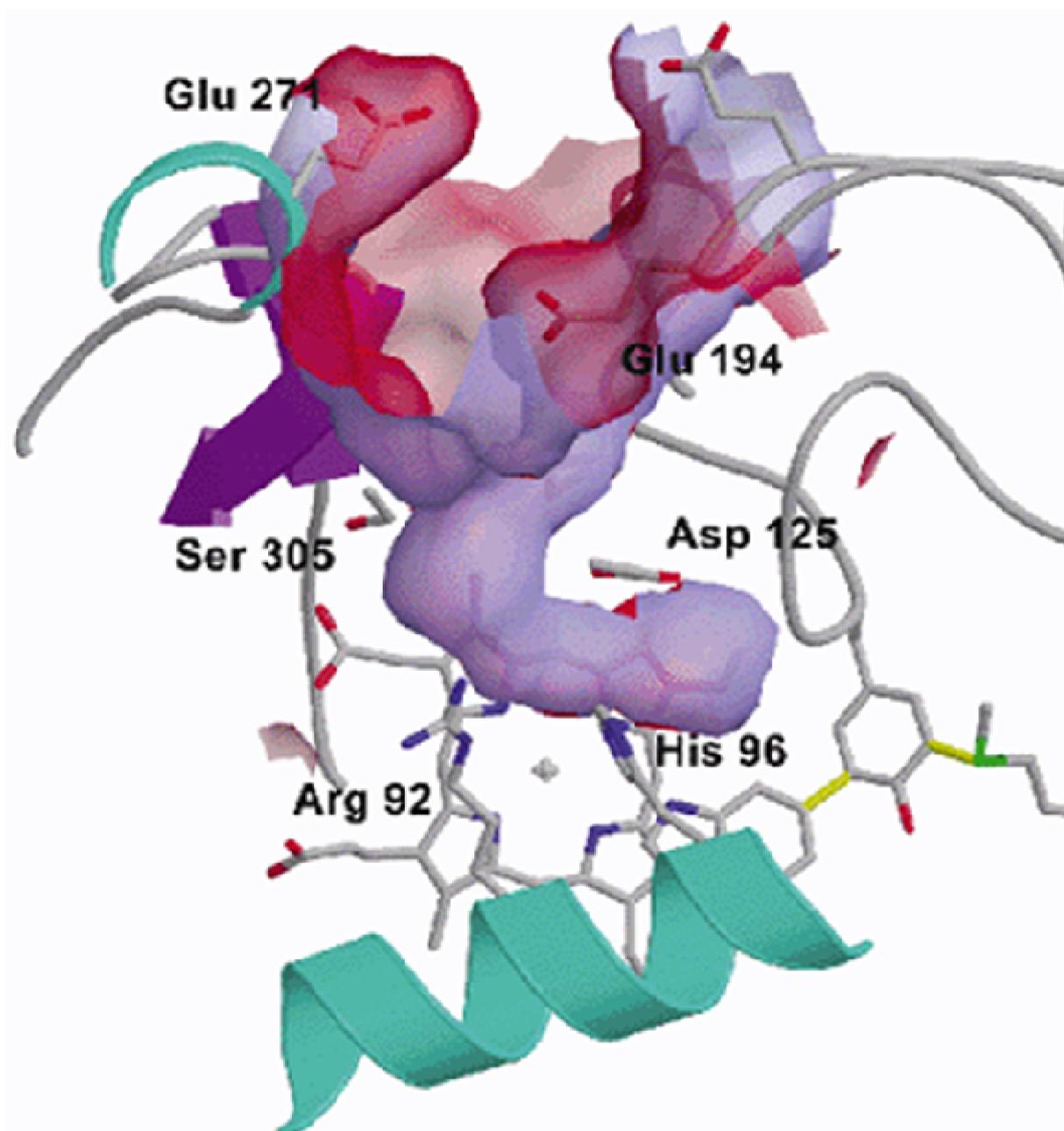


Figure 4- 4 : Canal d'accès menant au site actif de HmKatG. La région en rouge est accessible au solvant et la surface pointant vers l'intérieur de la protéine est en bleu. Avec la numérotation de BpKatG : Ser324↔Ser305, Arg108↔Arg92 ; His112↔His96, Asp141↔Asp125. D'après Yamada 2002⁷

I.3-LE CANAL D'ACCES DES SUBSTRATS.

L'analyse des structures cristallographiques de HmKatG⁷, de BpKatG⁶, de *Synechococcus*¹¹ et MtKatG⁸, a révélé plusieurs particularités des KatGs par rapport aux peroxydases monofonctionnelles. Ces particularités se sont avérées essentielles pour l'accès du substrat au site d'actif.

Le canal principal d'accès des substrats, ainsi que du peroxyde d'hydrogène, est en forme d'entonnoir et est positionné comme celui des peroxydases mais en plus long et plus contraint⁶ (figure 4-4). Ce canal est plus étroit au niveau des résidus Ser324 et Asp141, à environ 14 Å de l'atome de fer hémique. Grâce à la portion contrainte du canal d'accès, le peroxyde d'hydrogène entre dans la cavité distale de BpKatG en étant directement en contact avec les résidus Arg109, Trp111 et His112 et conduit à la formation du composé [Fe(IV)=O Por^{•+}], nécessaire aux réactions de type catalase et peroxydase⁶. Si le canal d'accès des KatGs est plus contraint que celui des peroxydases, il ne l'est pas autant que celui des catalases monofonctionnelles. Comme pour les catalases, deux résidus acides sont présents dans le canal d'accès, le Glu242 à l'entrée du canal et l'Asp141. Notre équipe a démontré que la mutation de l'Asp141 diminue de façon significative l'activité catalasique de BpKatG, par contre le double mutant D141A/R108A restaure cette activité à un niveau pratiquement égal à celui de l'enzyme natif. Il est proposé que l'Asp141 et l'Arg108 favorisent l'activité catalasique en créant un autre site de fixation, différent de celui entre l'Arg108 et l'His112, pour le peroxyde d'hydrogène. La fixation du peroxyde d'hydrogène à l'Asp141 et l'Arg108 contrôle l'accès au site actif et module la réaction catalasique.

La plupart des peroxydases possède un deuxième canal d'accès à l'hème, approximativement dans le plan de ce dernier, mais ce canal n'a pas d'équivalent chez les KatGs, car il est bloqué par la présence des boucles. Cependant, un second canal en forme d'entonnoir menant à une cavité au centre de BpKatG a été identifié⁶. Ce second canal fournit un accès direct au centre de la protéine et à une région qui englobe deux autres particularités structurales des KatGs : la chaîne latérale du résidu Arg426 qui peut exister sous deux conformations (voir au verso) et le site de fixation potentiel des substrats.

I.4-L'ADDUIT TRP(111)-TYR(238)-MET(264) ET LA CONFORMATION DE L'ARG426

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, il existe au sein des métalloprotéines des modifications covalentes post-traductionnelles, telles que la liaison Tyr-His dans la cytochrome *c* oxydase^{17,18,19} ou la liaison Tyr-His dans la galactose oxydase²⁰, qui sont directement reliées à la fonction enzymatique. Chez les catalase-peroxydases, deux liaisons covalentes entre les chaînes latérales de trois résidus du côté distal de l'hème le Trp111, la Tyr238 et la Met264 ont été observées. Il est à noter qu'aucun autre adduit de trois résidus n'a été détecté dans d'autres protéines. Cet adduit est présent dans les quatre structures résolues des KatGs. Les liaisons covalentes impliquent le cycle indole du Trp111 et l'atome de soufre de la Met264 qui lie la Tyr238 aux deux positions ortho²¹.

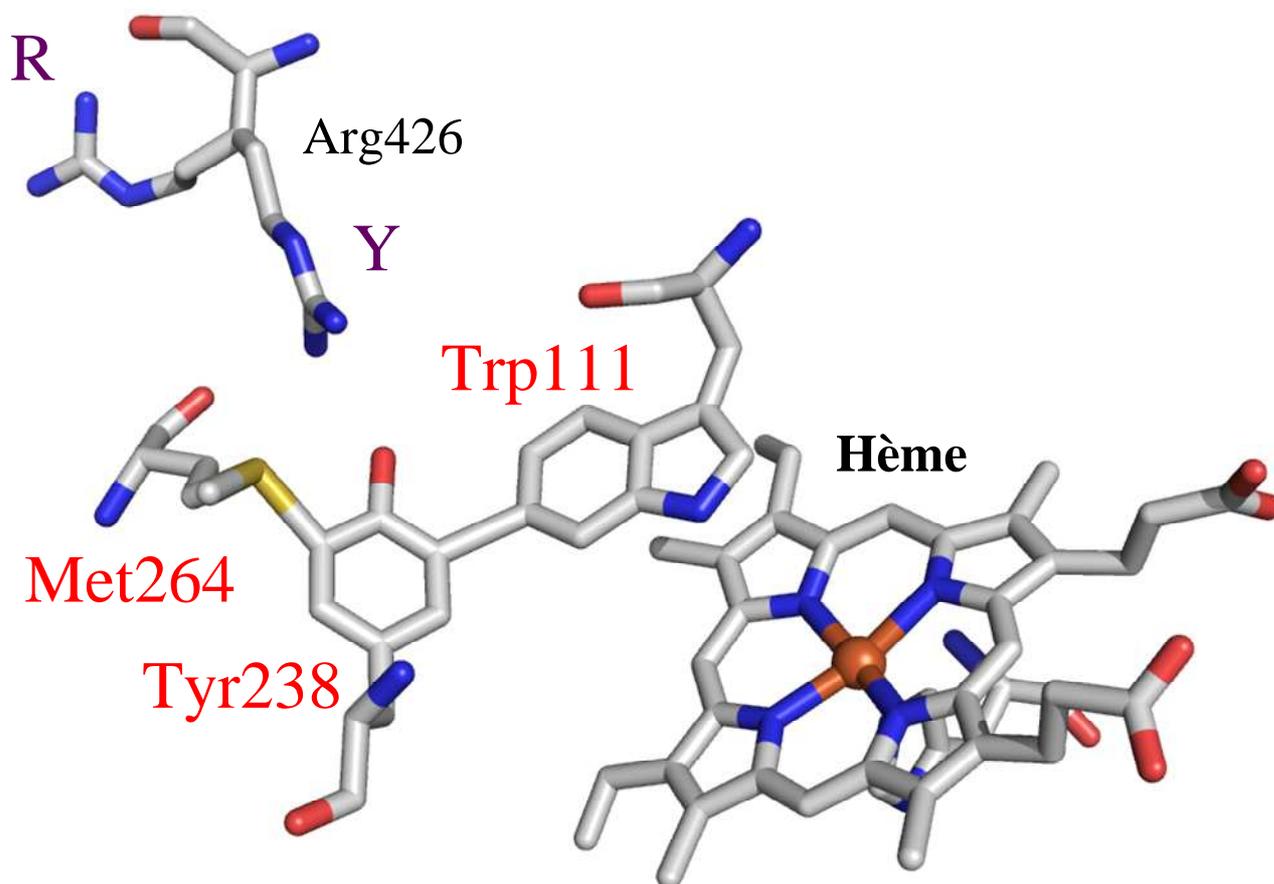


Figure 4- 5 : Représentation de la modification covalente conduisant à la formation de l'adduit entre Trp111-Tyr238-Met264 (en rouge) ainsi que des deux conformations (R et Y) possibles de l'Arg426 (en violet). La numérotation correspond à celle de BpKatG. D'après Carpena 2005 et 2006^{26,27}. Numéro PDB : 2FXG.

Basé sur le fait qu'il est essentiel pour l'activité catalasique de BpKatG et MtKatG^{21,22,23,24,25}, l'adduit Met-Tyr-Trp est proposé comme étant une caractéristique commune à toutes les catalase-peroxydases. Les peroxydases monofonctionnelles ne forment

pas cet adduit car les résidus tyrosine et méthionine n'y sont pas conservés et le Trp111 n'est présent que dans la CcP. Dans les autres peroxydases monofonctionnelles, ce tryptophane est remplacé par une phénylalanine.

Cette modification a été également observée par spectrométrie de masse chez BpKatG²¹ et chez MtKatG^{24,23}. Nos collaborateurs ont démontré que l'adduit entre les trois résidus est présent en solution. L'analyse des peptides issus de la digestion de BpKatG a également démontré que certains fragments ne présentent que la liaison entre la tyrosine et le tryptophane distal. La même expérience réalisée avec le mutant W111F révèle que l'adduit n'y est pas présent. Ceci se traduit par une perte de l'activité catalasique. Avec des mutants de la méthionine, la liaison covalente entre le tryptophane et la tyrosine est toujours présente, alors que dans les mutants de la tyrosine, l'adduit n'est pas présent. La présence du tryptophane et de la tyrosine sont donc nécessaires à la formation de l'adduit, alors que la mutation de la méthionine n'empêche pas la formation de l'adduit Trp-Tyr. La formation de l'adduit est donc séquentielle : dans un premier temps la liaison entre le tryptophane et la tyrosine s'établit, puis dans un deuxième temps la méthionine se lie à l'adduit Trp-Tyr.

Ortiz de Montellano et *coll.*²⁴ ont surexprimé l'apo-MtKatG dans laquelle ils ont réintroduit l'hème en absence de peroxyde. Ils obtiennent alors une protéine sans adduit. Chez cette dernière, par réaction avec le peroxyde, le composé [Fe(IV)=O Por^{•+}] conduit à l'oxydation des résidus tyrosine et tryptophane distaux en radicaux. Ces deux radicaux réagissent entre eux pour former la liaison covalente entre le tryptophane et la tyrosine. Dans le cycle suivant, la formation du composé I résulte en l'oxydation de l'adduit Trp-Tyr et permet l'attaque nucléophile de l'atome de soufre de la méthionine sur l'adduit. La conséquence de cette réaction est la formation de l'adduit final Trp-Tyr-Met.

Notre équipe a récemment^{26,27} démontré que le pH induit des changements dans la structure du site actif de BpKatG qui pourraient jouer un rôle clé dans la modulation des différentes activités des KatGs. Nous avons également démontré que l'Arg426, conservée parmi les KatGs, pouvait agir comme un interrupteur moléculaire en oscillant entre deux conformations, R et Y (figure 4-5). Dans la conformation Y, l'Arg426 est en interaction ionique avec la Tyr238 *via* son groupement guanidinium. Par contre dans la conformation R, cette interaction avec l'adduit n'est pas possible. Notre groupe a clairement établi une corrélation entre le pH de cristallisation et la proportion d'arginine en conformation Y. A

pH=8,5, pratiquement 100 % des Arg426 sont dans la conformation Y contre moins de 5 % à pH=4,5.

Ce changement de positionnement de la chaîne latérale de l'Arg426 et surtout son interaction avec l'adduit explique en partie le profil d'activité des KatGs. A pH=4,5, l'arginine est majoritairement sous conformation R, c'est-à-dire qu'elle n'interagit pas avec la Tyr238. Ainsi la charge négative du tyrosinate peut être délocalisée sur l'hème favorisant la formation de l'oxoferryle et la réaction peroxydasique. Lorsque les proportions d'Arg426 en conformation R et en Y sont identiques (pH=6,5), la formation et la réduction de l'oxoferryle par le peroxyde d'hydrogène sont favorisées l'une comme l'autre, ce qui est nécessaire pour l'activité catalasique. A pH=8,5, l'arginine est en conformation Y, c'est à dire en interaction électrostatique avec la Tyr238. Cette interaction permet de diminuer la densité électronique au niveau de l'hème et de l'adduit ce qui favorise la réduction de la modification perhydroxy du Trp111, comme cela est observé dans l'activité NADH-oxydasique.

1.5-MODIFICATION DU TRP111 DE BPKATG.

En 2005, notre équipe^{28,27} a mis en évidence l'existence d'une densité électronique supplémentaire sur le cycle indole du Trp111 dans le mutant S324T et dans BpKatG lorsque la cristallisation est réalisée à pH=8,5, mais qui disparaît à pH=4,5. Afin de déterminer, l'origine de cette densité électronique, la spectroscopie RPE, réalisée à la température de l'hélium liquide (T=4K), a été utilisée pour observer les changements induits par le pH sur l'environnement de l'hème.

Les spectres, en fonction du pH, sont caractéristiques d'un atome de Fe(III) sous forme spin fort ($S=5/2$), pentacoordiné et possèdent deux résonances majeures à $g \approx 6$ et $g \approx 2$. Ils montrent qu'il y a une contribution de deux signaux, un signal axial en $g_{\text{Al}}=5,94$ et $g_{\text{A}/}=1,99$ et un signal rhombique en $g_{\text{Bx}}=6,44$, $g_{\text{By}}=5,11$ et $g_{\text{Bz}}=1,97$ (figure 4-6). Le rapport des deux signaux dépend du pH. Le signal axial prédomine aux pH acides ($\text{pH} < 5$) tandis que le signal rhombique domine à pH neutre. Alors que nous nous attendions à ce que le signal axial domine le spectre aux pH basiques, comme cela a été démontré pour SyKatG¹⁴, BpKatG, lorsque le $\text{pH} \geq 7,6$, présente un tout autre comportement. Cette observation combinée avec les structures de BpKatG à différents pH, a permis de démontrer qu'en milieu basique il existe une modification du Trp111, interprétée comme étant une modification perhydroxy sur le cycle indole du Trp111. Cette modification implique une réorganisation du réseau des molécules d'eau présentes dans la poche hémique d'où le changement du spectre RPE.

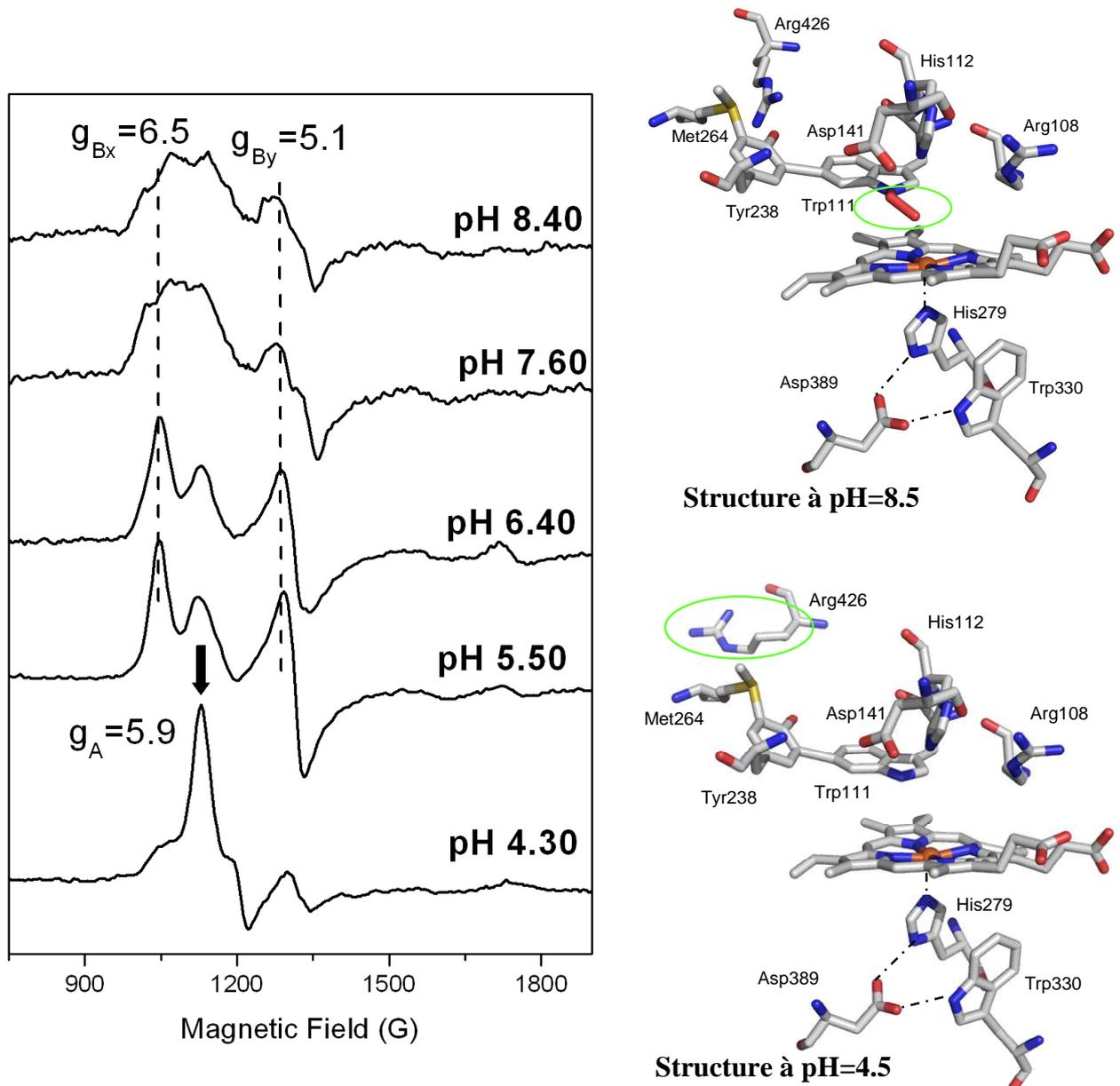


Figure 4- 6 : Gauche : Spectres RPE à 9 GHz de BpKatG sauvage sous l'état ferrique en fonction du pH. Par soucis de clarté seul l'agrandissement autour de $g \approx 6$ est montré. Les spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions : température d'enregistrement $T=4K$; Modulation d'amplitude 5 G ; puissance des micro-ondes 1 mW ; modulation de fréquence 100 kHz. **Droite : Structure du centre actif selon le pH de cristallisation. En haut à pH basique et en bas à pH acide.** La modification sur le Trp111 est soulignée avec un cercle vert sur la structure à pH=8,5. Ainsi que le changement de conformation de l'Arg426 sur la structure à pH=4,5. D'après Carpena 2005, 2006^{26,27}

Le rendement de modification du Trp111 de 100 % après seulement 1 min d'immersion du cristal à pH=8,5, suggère que la réaction entre le Trp111 et l'oxygène, présent dans le tampon, est rapide. Cette modification perhydroxy du Trp111 est à mettre en relation avec l'activité NADH-oxydase que possède BpKatG à pH basique²⁹.

II. RELATIONS ENTRE LES DIFFERENTES ACTIVITES DE BpKATG.

Toutes les particularités structurales décrites précédemment influencent l'activité catalasique et l'activité NADH-oxydasique de BpKatG. Cependant, cet enzyme possède trois autres types d'activité : peroxydasique, synthase et d'hydrazinolyse. Une activité peut dominer en fonction du pH : l'activité peroxydasique à pH=4,5, l'activité catalasique à pH=6,5 et enfin l'activité NADH-oxydasique à pH=8,75 ²⁹ (figure 4-6).

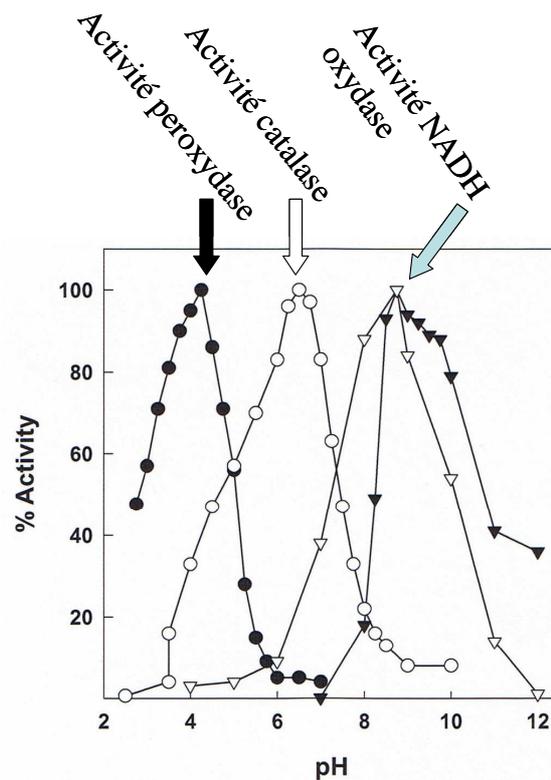


Figure 4- 7: Profil d'activité de BpKatG en fonction du pH. Activité peroxydasique mesurée avec l'ABTS (●) ; Activité catalasique (○) ; NADH-oxydasique (▽) et (▼). La détermination de l'activité NADH oxydasique a été réalisée de deux façons différentes : en mesurant la formation du radical à 560 nm (mesure indirecte) et en mesurant la disparition du NADH à 340 nm (mesure directe). D'après Singh et coll. 2004²⁹

L'existence de cinq fonctions enzymatiques différentes chez les catalase-peroxydases rend ces enzymes complexes. Les activités catalasique et peroxydasique sont étroitement liées mais, en revanche, elles sont indépendantes des activités oxydase, synthase et d'hydrazinolyse. Non seulement, les pH optimaux sont différents, mais contrairement aux activités catalasique et peroxydasique, les trois autres activités ne nécessitent ni la présence du peroxyde d'hydrogène ni la formation d'intermédiaires hémiques oxydés. Les activités synthase et hydrazinolyse sont étroitement liées car l'hydrazinolyse doit avoir lieu avant la fixation du NAD⁺ au radical isonicotinoylé. La réaction oxydasique n'est liée à aucune autre activité d'un point de vue mécanistique. Il est toutefois probable que cette réaction partage le

même site de fixation du NAD^+/NADH que celui de l'activité synthasique. La réaction oxydasique pourrait servir de source de NAD^+ pour l'activité synthasique et de peroxyde d'hydrogène pour les activités catalasique et peroxydasique.

Alors que l'analyse des particularités structurales du canal d'accès et de la partie distale permet d'expliquer comment l'enzyme réagit avec le peroxyde d'hydrogène par un mécanisme différent de celui des catalases monofonctionnelles (figure 4-8), les propriétés propres à la réaction peroxydasique des KatGs, restent à découvrir.

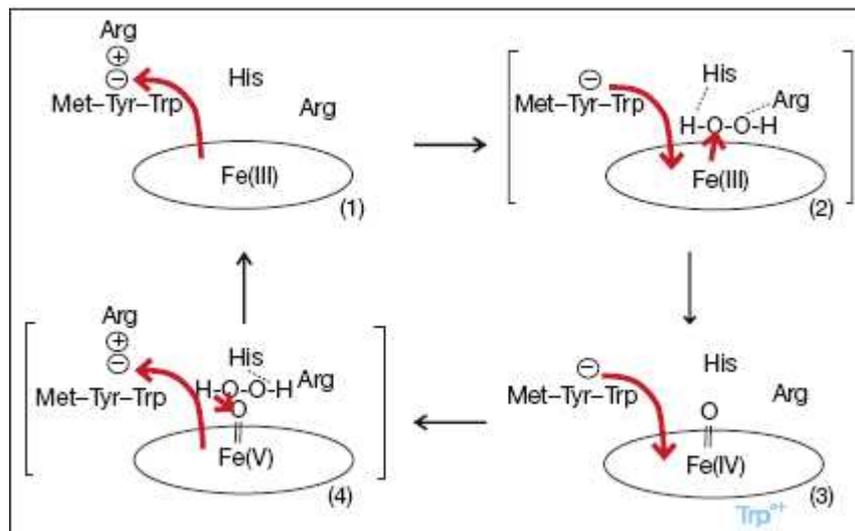


Figure 4- 8 : Schéma décrivant le flux d'électrons et la réactivité de l'hème suivant la conformation de l'Arg426. 1) Etat natif, l'Arg426 est en conformation Y. 2) Intermédiaire conduisant à la formation du composé I : Arg426 en conformation R permet le flux d'électron vers l'hème pour favoriser l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène, lié à l'H112 et à l'Arg108. 3) Intermédiaire obtenu par transfert d'électron intramolécule entre un résidu protéique et l'hème. 4) Intermédiaire conduisant à la réduction du composé I avec le peroxyde d'hydrogène lié au Trp111 et à l'His112. Le mouvement de la chaîne latérale de l'Arg426 entre les deux conformations R et Y induit l'oxydation et la réduction de l'hème. D'après Carpena 2006²⁷

III. LES CATALASE-PEROXYDASES: LES INTERMÉDIAIRES RADICALAIRES.

Comme nous l'avons souligné dans les chapitres précédents, les réactions de transfert d'électron au sein des metalloprotéines jouent un rôle critique dans de nombreux processus biologiques fondamentaux. Cependant, ces réactions restent mal comprises car elles dépendent de nombreux facteurs, tels que les cinétiques de formation et de dissociation des complexes, les propriétés électroniques des centres redox, la distance et le type de chemin du transfert d'électron et de l'énergie de réorganisation³⁰. Comme nous l'avons précisé, la cytochrome *c* peroxydase forme un radical tryptophanyle essentiel pour l'oxydation du

ferrocytochrome *c*. Il a été également démontré que la peroxydase de lignine forme un radical tryptophanyle près de la surface nécessaire à l'oxydation de l'alcool vératrylique³¹. Des radicaux tyrosyles ont également été mis en évidence chez d'autres peroxydases^{33,34} et chez les catalases³² (voir chapitre précédent).

La formation de tels radicaux, sur des résidus tyrosine et/ou tryptophane spécifiques, semble indiquer qu'ils ont un rôle à jouer dans le cycle catalytique des protéines en tant que sites d'oxydation alternatifs à l'hème.

Toutefois dans le cas des catalase-peroxydases, la nature et la localisation exactes des radicaux protéiques sont peu connues. En 2000, Hillar et *coll.*³⁵ ont attribué le signal observé en RPE à 9 GHz de la HPI (ou EcKatG) à un composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}] tandis que Chouchane et *coll.*³⁶, dans leur étude sur MtKatG, ont attribué le signal observé en RPE à un radical tyrosyle, dont la localisation reste en débat actuellement¹⁴. La formation du radical porphyrinique cationique ainsi que celle d'un radical tyrosyle et d'un radical tryptophanyle a été mise en évidence chez la catalase-peroxydase de *Synechocystis* par notre équipe^{14,15}. Notre groupe, a d'autre part démontré que le cas de la catalase-peroxydase de *M. tuberculosis* était beaucoup plus complexe que le modèle qui en a été proposé. En effet, contrairement à ce qui a été précédemment décrit, nous avons démontré que trois intermédiaires radicalaires protéiques sont formés³⁷.

IV. OBJECTIFS.

Contrairement aux catalases et aux peroxydases monofonctionnelles, peu de choses sont connues sur les catalase-peroxydases et en particulier le mécanisme de la réaction type peroxydasique.

Si on se réfère aux peroxydases monofonctionnelles, il apparaît que la connaissance du site de fixation des substrats n'est pas suffisante pour expliquer la spécificité des protéines vis-à-vis des substrats mais que la nature chimique des intermédiaires formés est en relation avec cette spécificité. En effet, pour ces enzymes, le site de fixation des composés aromatiques est localisé près de l'hème. Pourtant, dans le cas la peroxydase de lignine, un radical tryptophanyle, formé à la surface de la protéine, est le site d'oxydation d'un substrat spécifique, l'alcool vératrylique. Tandis que dans le cas de la CcP, bien qu'un composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}] de courte durée de vie soit formé, le site d'oxydation du cytochrome *c* est le radical tryptophanyle formé sur le résidu Trp191.

D'après la littérature, la nature et la localisation des intermédiaires radicalaires protéiques formés chez les catalase-peroxydases diffèrent selon l'enzyme et celles-ci ne possèdent pas la même activité peroxydasique vis-à-vis des différents substrats testés. Dans le but de comprendre s'il existait une corrélation entre les intermédiaires radicalaires protéiques formés et l'activité peroxydasique et si un schéma général de mécanisme réactionnel pouvait s'appliquer aux catalase-peroxydases, j'ai réalisé, dans le cadre de mon travail de thèse, une étude comparative de six catalase-peroxydases.

B. CARACTERISATION DES RADICAUX FORMES CHEZ LES KATGS PAR RPE MULTIFREQUENCE ET MUTAGENESE DIRIGEE.

Les caractéristiques des six catalase-peroxydases de notre étude comparative, provenant de différents organismes, sont rassemblées dans le tableau 4-1.

Source	Abréviation	MW (par sous unité)	Hème, Structure	Observation(s)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AfKatG	84 863	Hème <i>b</i> , homodimère	Archaeobactérie thermophile Pas de structure
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	BsKatG ou PerA	82 974	Hème <i>b</i> , homodimère	Bactérie Gram-positif Pas de structure
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	BpKatG	79 198	Hème <i>b</i> , homodimère	Bactérie Gram-négative Structure 1mwv ⁶
<i>Escherichia coli</i>	EcKatG ou HPI	80 033	Hème <i>b</i> , mélange dimère /tétramère	Bactérie Gram-négative Structure de la partie C-term 1u2k ⁹
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MtKatG	80 038	Hème <i>b</i> , dimère	Mycobactérie Structure 1sj2 ⁸ , 2cca ³⁸
<i>Synechocystis</i> PCC6803	SyKatG	84 455	Hème <i>b</i> , homodimère	Cyanobactérie Pas de structure
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	RcKatG	77 858	Hème <i>b</i> , tétramère	Bactérie photosynthétique Pas de structure

Tableau 4- 1 : Caractéristiques des catalase-peroxydases étudiées dans ce travail de thèse.

I. CARACTERISATION PAR RPE DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES DE BpKATG.

I.1-ETUDE DE LA REACTION DE BpKATG AVEC L'ACIDE PERACETIQUE.

Les spectres de l'enzyme natif, enregistrés en fonction du pH, ont été présentés dans la première partie du chapitre (figure 4-6). Dans la suite de ce chapitre, nous allons donc exposer les résultats concernant les intermédiaires radicalaires formés par BpKatG.

Pour le sauvage, après traitement par l'acide peracétique, l'intensité du signal ferrique, par rapport au contrôle, est diminuée de 80 % et un signal large de 400 G, centré à $g=2$, est observé (figure 4-9).

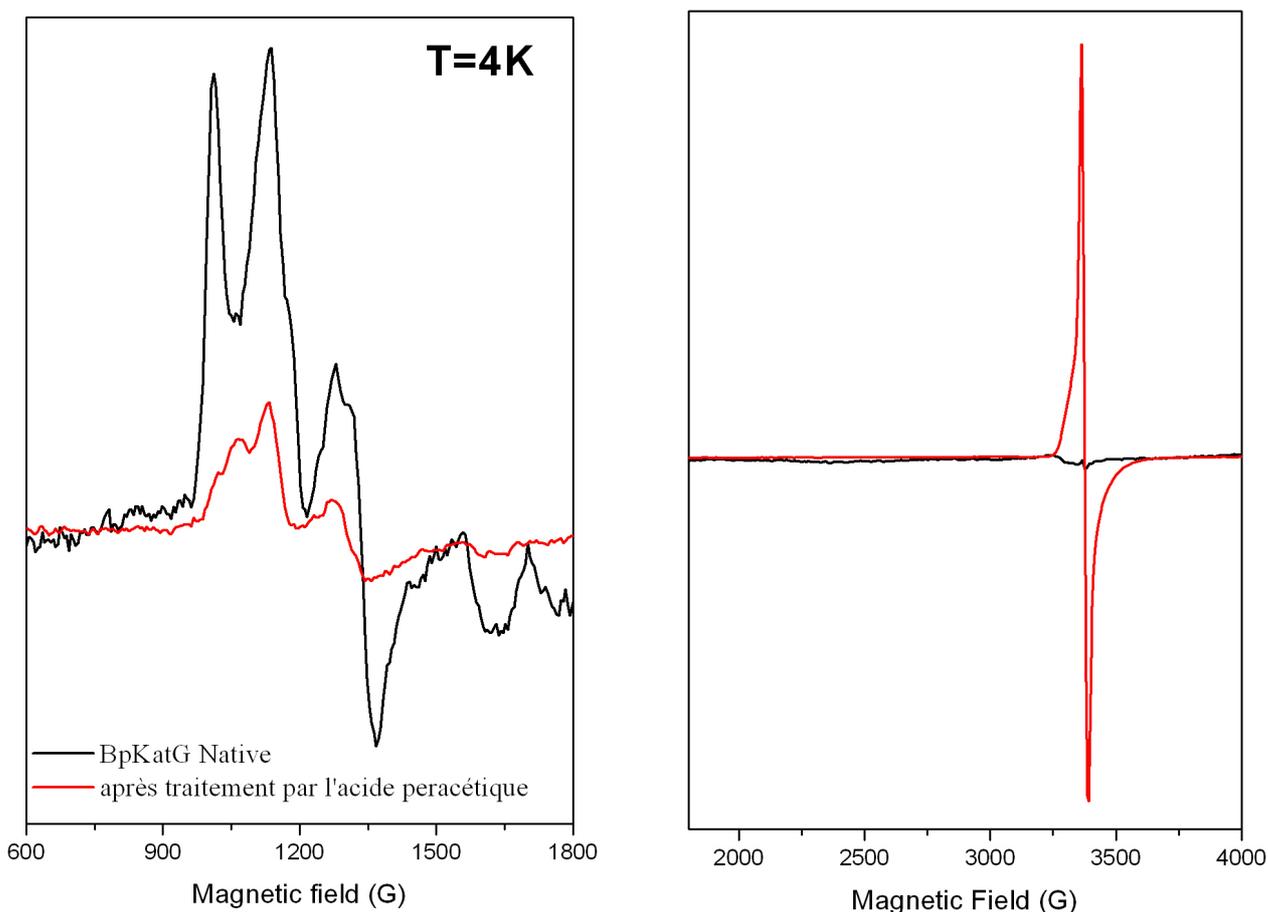


Figure 4- 9 Spectres RPE à 9 GHz enregistrés à 4K de BpKatG native et après réaction avec l'acide peracétique. A gauche : la partie du spectre correspondant au signal ferrique et à droite la partie à $g=2$ du signal. Les spectres ont été obtenus en utilisant les conditions suivantes : $T=4K$; 4 G de modulation d'amplitude, puissance des micro-ondes 1 mW, modulation de fréquence 100 kHz.

L'intensité du signal centré à $g=2$ dépend énormément de la température d'enregistrement du spectre, et en particulier les ailes de part et d'autre de $g=2$, disparaissent

au-dessus de 30K. Ce comportement, comme nous l'avons décrit dans le chapitre II, correspond à une espèce en interaction magnétique avec l'atome de fer. Le spectre RPE du composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ de SyKatG, des catalases et des peroxydases, enregistré dans les mêmes conditions que celles décrites pour la figure 4-9, est constitué d'un signal large de 2000 G avec une partie étroite à $g=2$. Dans le cas de BpKatG, la largeur spectrale est de 400 G et le signal est similaire au spectre de l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Trp}_{191}^{\bullet+}]$ formée par la CcP. Afin de déterminer l'espèce formée avec BpKatG, nous avons réalisé la même expérience avec les mutants W330F, W111F et W95F (figure 4-10).

Les mutants W111F et W95F présentent également des spectres larges à 4K. Cependant, la forme du signal, surtout avec W111F, est différente de celle du sauvage. Cette différence pourrait être expliquée par des changements géométriques de l'hème induits par la mutation dans ces deux protéines, tout comme cela a été observé dans les mutants de la CcP^{39,40}. Par contre, pour le mutant W330F (figure 4-10 spectre bleu), le spectre devient étroit (largeur pic à pic de 24 G) et est compatible avec un radical organique. Ceci laisse supposer que l'espèce en interaction magnétique avec l'atome de fer, formée dans le sauvage, correspondrait à une espèce $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$. Le résidu Trp330 semble être un bon candidat pour former ce radical. En effet, ce dernier est positionné de la même façon que le Trp191 de la CcP et le spectre RPE révèle qu'aucune espèce en interaction magnétique avec l'atome de fer n'est formée chez le mutant W330F. Dans la structure de BpKatG, les deux résidus tryptophanes, Trp111 et Trp330, sont assez proches du fer pour que le signal RPE du radical formé soit élargi par interaction magnétique.

Les spectres des signaux ferriques avant toute réaction, avec les mutants W330F et W111F confirment que la mutation du Trp111 induit des changements géométriques dans l'environnement de l'hème, puisque contrairement au sauvage, le signal ferrique ne dépend plus du pH et reste toujours très axial (figure 4-10, haut). Dans le cas de W330F, le signal correspond à la superposition de deux signaux dont les contributions varient en fonction du pH, comme dans le cas de l'enzyme sauvage. La partie à haut champ du signal ferrique ($g=2$) révèle que la mutation du Trp111 n'implique pas la formation de fer spin faible, alors que dans le cas du mutant W330F, la proportion de fer spin faible est supérieure à celle observée dans le sauvage à bas pH. La mutation du Trp330 modifie donc moins la géométrie de la partie distale du site actif que celle du Trp111. Ce changement de géométrie explique donc le changement de la forme du signal radicalaire de la figure 4-10.

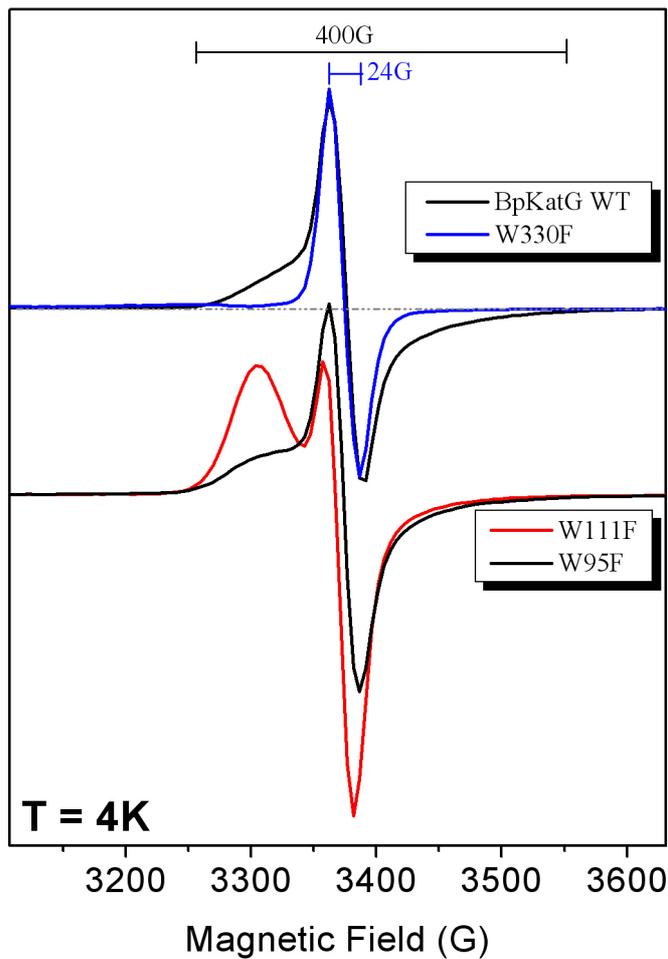
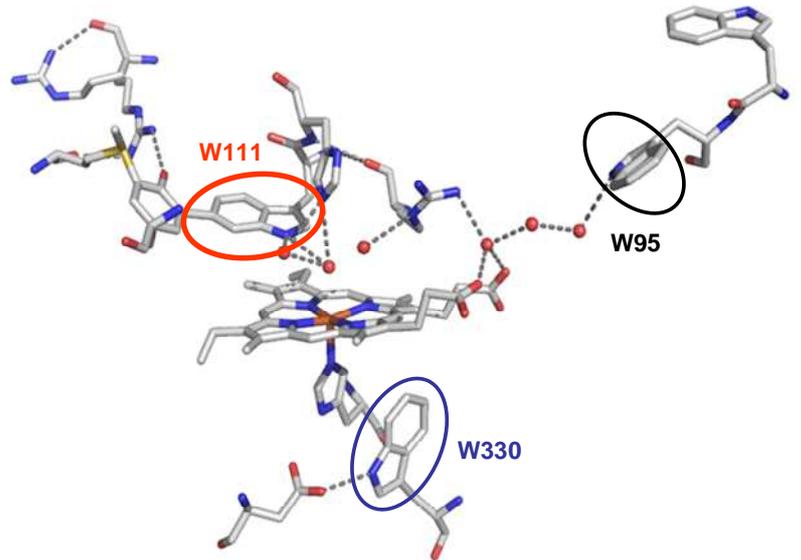
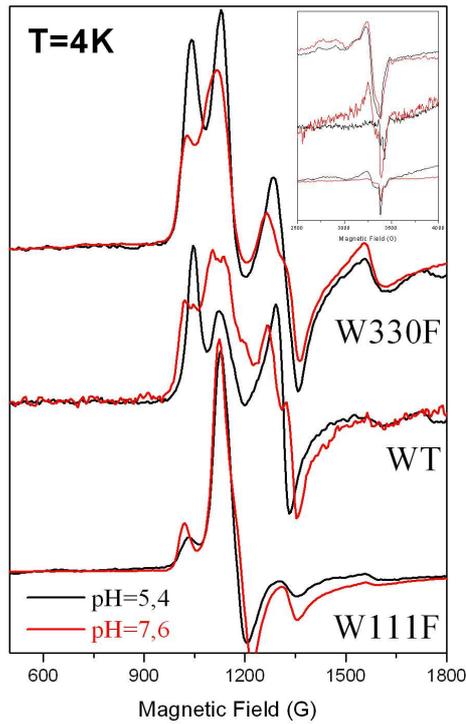


Figure 4- 10 : Haut : Spectres RPE à 9 GHz enregistrés à T=4K de BpKatG native et des mutants W330F et W111F. Est également représentée la structure du site actif de BpKatG. Les résidus tryptophanes d'intérêts sont mis en évidence par des cercles de couleurs. Numéro PDB : 1MWV

Bas : Spectres RPE à 9 GHz enregistrés à 4K des radicaux formés par BpKatG par réaction avec l'acide peracétique. Le spectre du sauvage (spectre noir) est indiqué avec des spectres de mutants d'intérêts. En bleu, il s'agit du spectre du mutant du tryptophane proximal, en rouge du spectre du mutant du tryptophane distal et en noir le mutant du Trp95, site de formation du radical tryptophanyle chez SyKatG. Les spectres ont été obtenus en utilisant les conditions suivantes : T=4K ; 4 G de modulation d'amplitude, puissance des micro-ondes 1mW, modulation de fréquence 100 kHz.

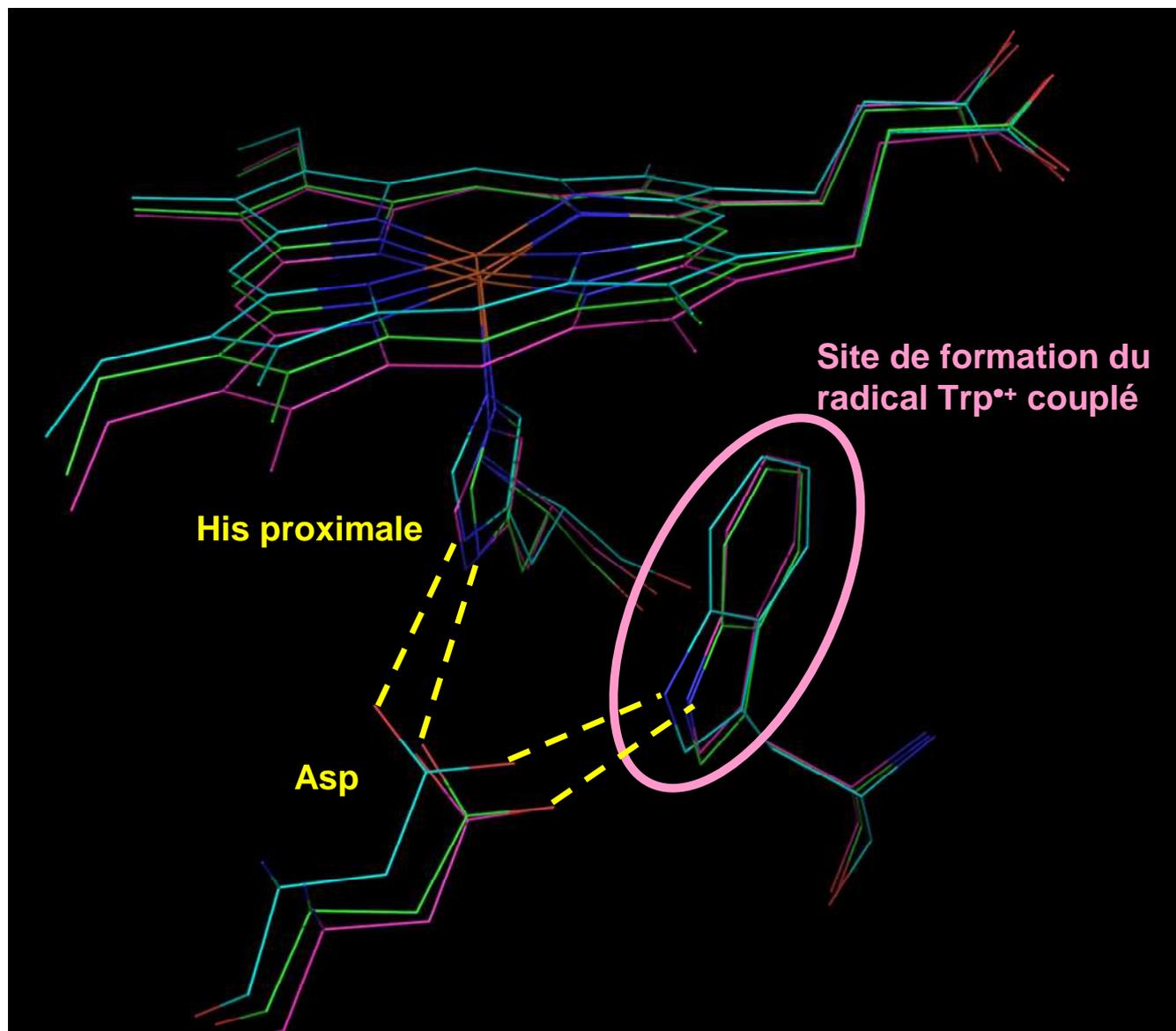


Figure 4- 11 : Superposition de la partie proximale de la cytochrome c peroxydase (en bleu), de BpKatG (en vert) et de MtKatG (en magenta). Le site de formation du radical tryptophanyle en interaction avec l'atome de fer est mis évidence par un cercle rose. Sont également représenté l'histidine et l'aspartate proximaux. Les structures utilisées sont 1zby pour la CcP, 1mwv pour BpKatG et 2ccA pour MtKatG.

Si l'on compare le spectre de l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$ de la CcP, de MtKatG et de BpKatG, les formes des signaux sont différentes. Le couplage entre le résidu tryptophane et l'atome de fer héminique est faible pour les trois protéines mais dans la CcP le couplage est différent de celui observé chez MtKatG et BpKatG, qui entre eux sont similaires. Pourtant, pour ces trois protéines le site de formation du radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ est le même. D'après les structures de ces trois protéines (figure 4-11), il apparaît que le microenvironnement du tryptophane n'est pas exactement le même. En effet dans le cas de la CcP, la distance entre le fer héminique et l'atome d'azote du groupe indole du tryptophane est de 6,8 Å, alors qu'elle s'élève à 6,7 Å dans le cas de MtKatG et à 7,00 Å dans le cas de BpKatG. Plus important encore est la triade His-Asp-Trp proximale. En effet, dans le cas de la CcP, Fishel et *coll.*³⁹ ont démontré que lorsque l'aspartate est remplacé par une asparagine, le radical tryptophanyle n'est pas détecté. Cette mutation supprime les liaisons hydrogène entre l'aspartate et l'histidine, d'une part, et entre l'aspartate et le tryptophane proximal d'autre part. Cela a pour conséquence la déstabilisation du radical $\text{Trp}^{\bullet+}$. De la même façon, Goodin et *coll.*⁴⁰ ont montré que la mutation de l'aspartate en glutamate, qui forme des liaisons hydrogène avec l'histidine et le tryptophane mais dont les forces sont modifiées par rapport au sauvage, entraîne un changement de couplage entre le Trp191 et l'atome de fer et la forme du signal se rapproche de celle observée dans les KatGs. Dans les structures de MtKatG et BpKatG, la distance entre le groupe carboxylique de l'aspartate et l'atome d'azote du groupe indole du tryptophane est de 2,6 Å et 2,7 Å respectivement. Elle est de 2,8 Å dans le cas de la CcP. La distance entre l'atome d'azote du groupe imidazole de l'histidine proximale et le groupe carboxylique de l'aspartate est de 2,81 Å dans MtKatG, contre 2,85 Å pour BpKatG et 2,83 Å pour la CcP. Ce sont ces changements subtils au niveau de l'environnement héminique, notamment des changements au niveau de l'arrangement de la triade His-Asp-Trp, qui pourraient induire des différences sur le spectre RPE de l'espèce $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$.

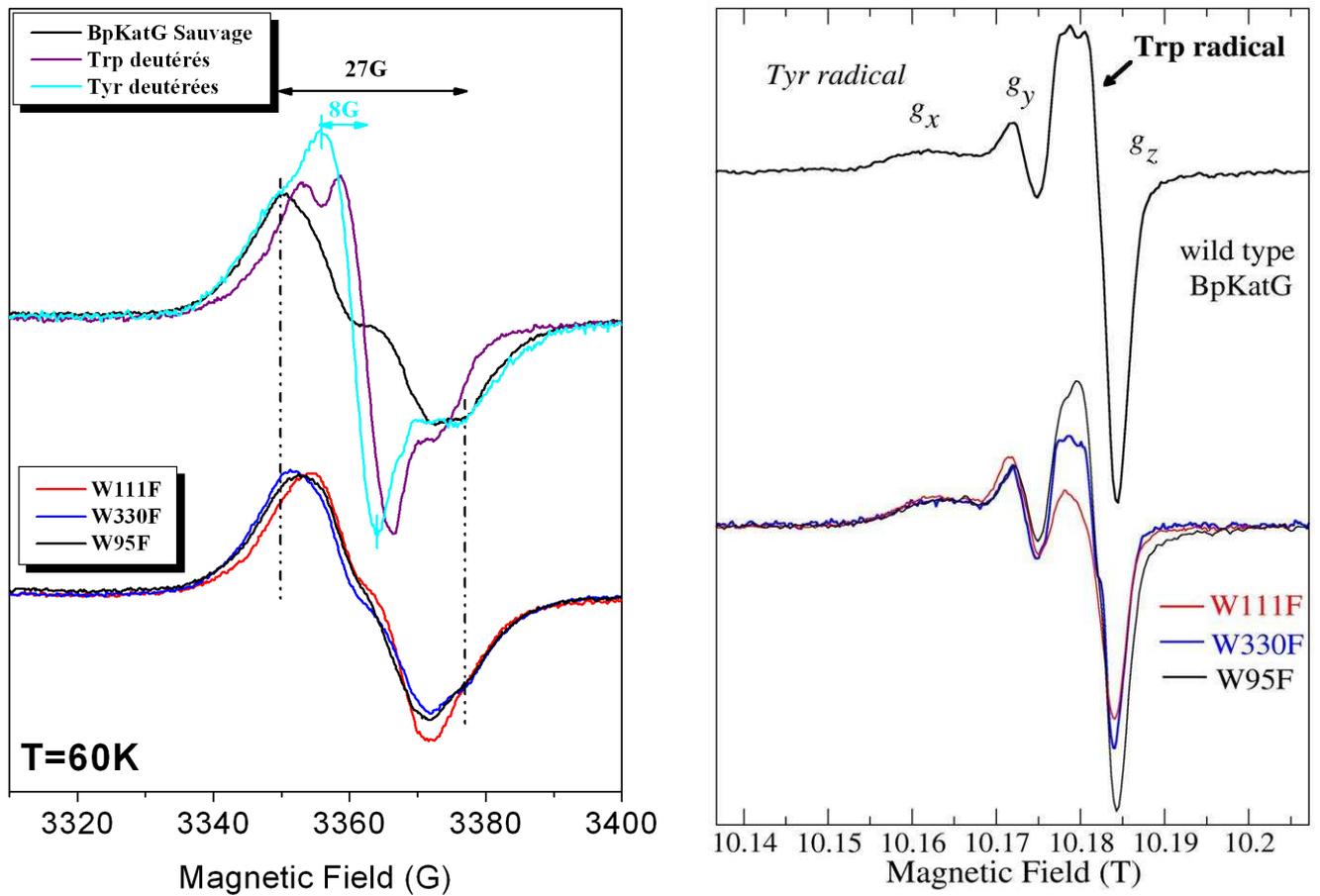


Figure 4- 12 : Gauche : Spectres à 9 GHz enregistrés à 60K des intermédiaires radicalaires organiques formés chez BpKatG et dans les mutants sélectionnés. Haut : en noir spectre du sauvage. Sont superposés les spectres des échantillons deutérés. En violet pour les résidus tryptophanes deutérés et en cyan pour les tyrosines deutérées. Puis les spectres des mutants tryptophanes W330F, W111F et W95F sont représentés respectivement en bleu, rouge et noir, pour comparaison. Tous les spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions : T=60K ; 1,5 G de modulation d'amplitude, puissance des micro-ondes 50 μ W, modulation de fréquence 100 kHz. Droite : Spectres RPE à champ intense (10T) et haute fréquence (285 GHz) des radicaux protéiques formés chez le sauvage de BpKatG (noir en haut) et des mutants sélectionnés.

Les spectres RPE à 9 GHz pour BpKatG et ses mutants après ajout d'acide peracétique enregistrés à 60K sont présentés sur la figure 4-12. Le spectre de l'enzyme sauvage (spectre noir en haut) est en accord avec la formation d'un ou plusieurs radicaux organiques avec une valeur de g effective de $g_{\text{iso}}^{\text{eff}}=2,004$. La largeur pic à pic est de 24 G et la largeur totale de 80 G. Afin de déterminer la nature chimique des espèces formées, nous avons utilisé la même approche que pour les autres catalase-peroxydases étudiées par notre groupe, *Synechocystis* et *M. tuberculosis*^{14,37}. Cette approche combine deutération et RPE multifréquences.

Les spectres des échantillons deutérés de la souche sauvage sont présentés sur la figure 4-12. Des changements dans les spectres RPE des protéines deutérées sont attendus si les radicaux sont formés sur un résidu tryptophane ou un résidu tyrosine, car les atomes d'hydrogène et de deutérium ne possèdent pas le même rapport gyromagnétique⁴¹⁻⁴². Pour BpKatG, la deutération des tryptophanes et des tyrosines entraîne une modification du spectre RPE. Le spectre, pour des tyrosines deutérées, est plus étroit que celui du sauvage, la largeur pic à pic à est de 8 G dans l'échantillon deutéré contre 27 G pour le sauvage. Pour les tryptophanes deutérés, l'enveloppe du spectre est également modifiée.

Les spectres RPE à champ intense sont représentés sur la figure 4-12 droite. Le spectre RPE à champ intense du sauvage (spectre noir en haut) révèle la contribution de deux radicaux organiques. Ces résultats confirment les conclusions déduites des expériences de deutération : il y a formation d'un radical tyrosyle (repéré par g_x , g_y et g_z sur la figure 4-12) et d'un radical tryptophanyle (repéré par la flèche). Cependant, dans le cas de BpKatG, le rapport entre le signal des radicaux tyrosyle et tryptophanyle est différent de celui observé chez d'autres catalase-peroxydases telles que SyKatG¹⁴ et MtKatG³⁷, où la proportion de radical tryptophanyle est plus faible.

Sur la figure 4-12 sont également représentés les spectres RPE à 9 GHz enregistrés à 60K des mutants W330F, W111F et W95F. Seul le spectre du mutant W111F, plus étroit (17,5 G) est différent du sauvage. Pour W111F, la proportion de radical tryptophanyle détectée est très inférieure à celle observée dans le sauvage (figure 4-12, spectre à champ intense). Or, c'est le spectre du radical tryptophanyle qui contribue majoritairement à l'enveloppe du spectre à 9 GHz. La différence de proportion entre le radical tryptophanyle et tyrosyle expliquerait donc ce changement observé dans le spectre RPE à 9 GHz de W111F.

Pareillement à MtKatG, trois espèces radicalaires protéiques sont formées chez BpKatG : une espèce en interaction magnétique avec le fer hémunique, $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O Trp}_{330}^{\bullet+}]$ et

deux radicaux protéiques isolés, un radical tyrosyle et un radical tryptophanyle, qui ne se forme pas sur le Trp95 site de formation de cette espèce chez SyKatG¹⁵.

Actuellement, les résultats, dont nous disposons, ne nous permettent pas de proposer un candidat unique pour le site de formation de ce deuxième radical tryptophanyle.

La séquence de BpKatG contient 23 résidus tryptophane (figure 4-13). D'après nos résultats de spectroscopie RPE à champ intense nous savons que la mutation du Trp111 influence la stabilisation du radical tryptophanyle. Le résidu responsable du signal RPE serait donc relativement proche dans l'espace du Trp111. Il peut donc s'agir des résidus Trp420, situé dans le canal d'accès, ou Trp139.

Si on suppose que la formation du radical tryptophanyle est réalisée *via* un transfert d'électron impliquant le Trp330, le site de formation de ce radical doit être proche spatialement du Trp330. Dans ce cas, deux candidats sont possibles les Trp350 et 362.

Il a été mis en évidence dans le cas de la peroxydase de lignine (LiP) la formation d'un radical tryptophanyle sur le résidu 171^{43,44}. Ce résidu est dans un environnement spécifique, c'est à dire qu'il forme des liaisons hydrogène avec un résidu aspartate et un résidu glutamate. Dans la structure de BpKatG seuls deux résidus tryptophane possèdent un tel environnement, Trp195 et Trp165.

Afin de déterminer le site de formation du radical tryptophanyle autre que le Trp330^{•+}, nous sommes en train d'étudier les mutants proposés.

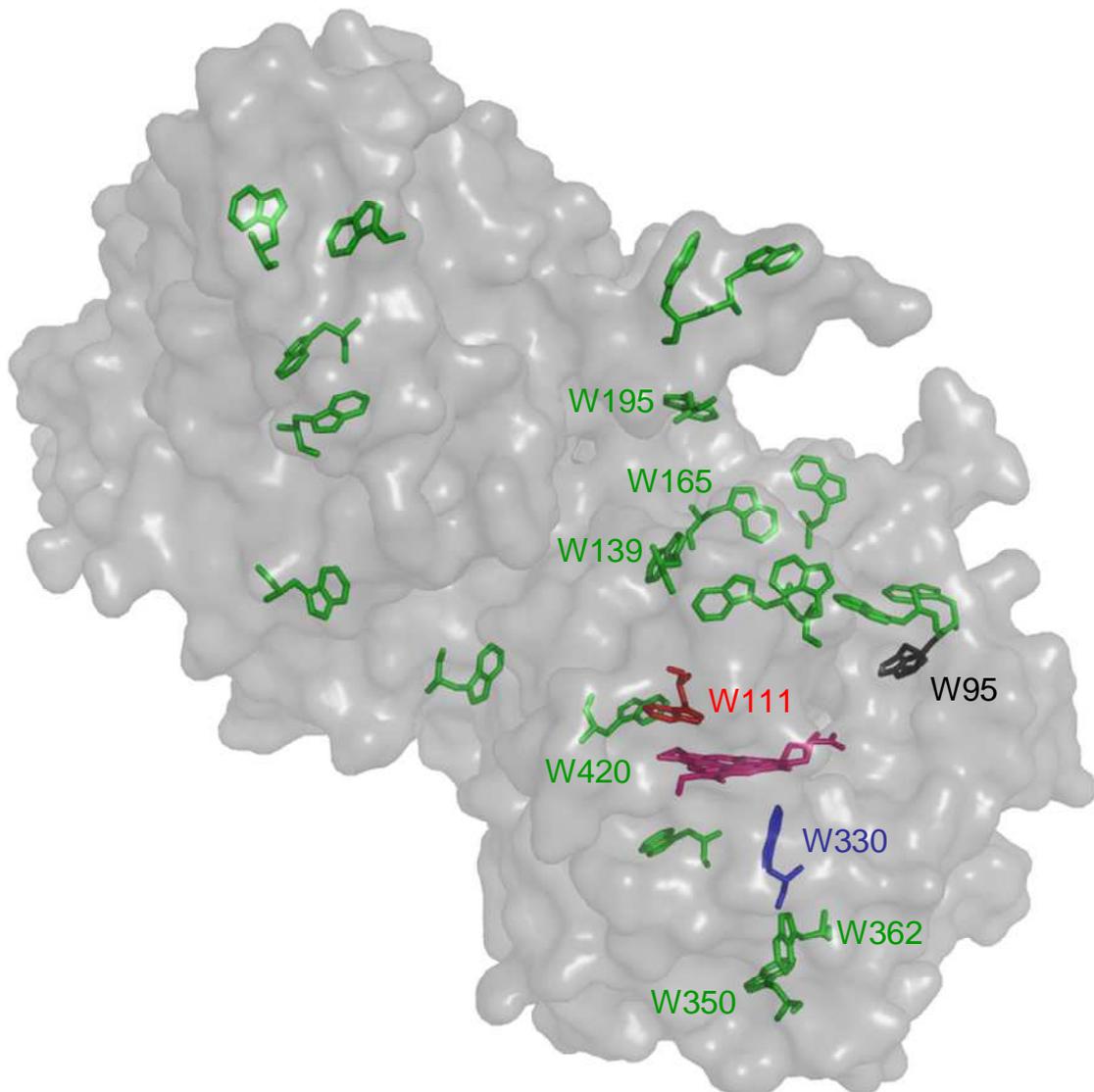


Figure 4- 13 : Structure de BpKatG et localisation des différents résidus tryptophanes. En magenta est représenté l'hème, en rouge le Trp111, en bleu le Trp330 et en noir le Trp95. En vert sont représentés tous les autres résidus tryptophane de la protéine. Les résidus qui portent un label correspondent aux candidats envisagés. Numéro PDB : 1MWV

I.2-LE CYCLE CATALYTIQUE DE BpKATG EN ABSENCE DE SUBSTRAT.

D'après nos résultats de spectroscopie RPE, trois radicaux organiques sont formés par réaction entre l'acide peracétique et BpKatG en l'absence de substrat, donneur d'un électron. Il s'agit du $\text{Trp}_{330}^{\bullet+}$, d'un radical tryptophanyle et d'un radical tyrosyle. Ces résultats permettent d'avancer le cycle catalytique suivant pour BpKatG :

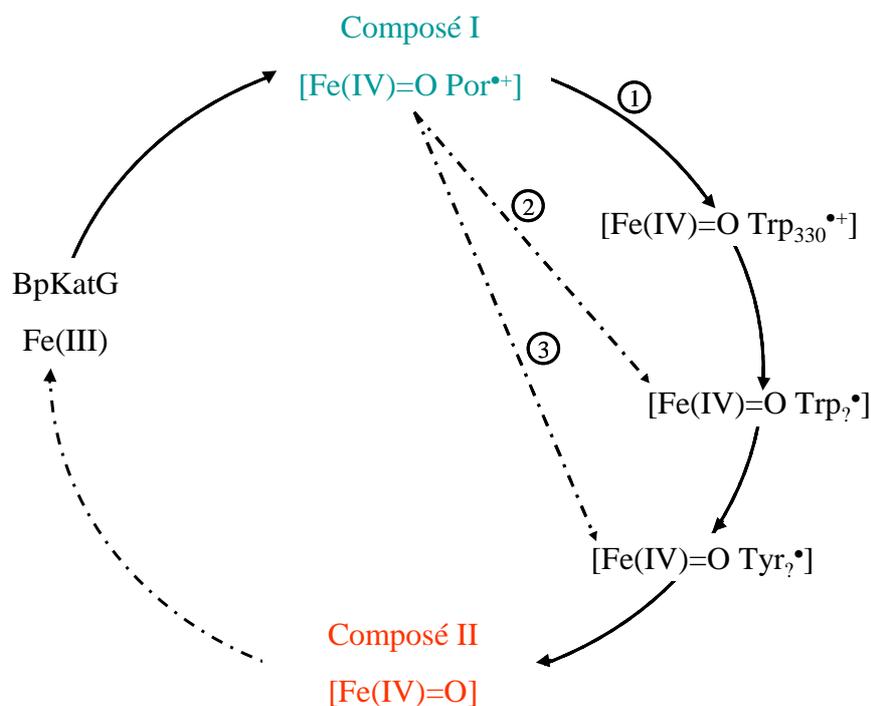


Schéma 4- 1 : Cycle catalytique de BpKatG, en l'absence de substrat, déterminé par spectroscopie RPE. Toutes les espèces ont été directement observées par RPE à l'exception des composés I (en bleu) et II (en rouge). Le premier à un temps de vie trop court pour être détecté en mélange manuel et le second est silencieux en RPE. Les numéros correspondent aux différentes possibilités pour les transferts d'électron intramoléculaires.

Dans cette représentation nous avons supposé que BpKatG formait en premier lieu un radical porphyrinique cationique, ce qui n'a pas été directement mis en évidence par spectroscopie RPE. Cette hypothèse repose sur des observations faites dans le cas de la catalase-peroxydase de *Synechocystis*. En effet, notre équipe¹⁴ a mis en évidence que chez SyKatG, enzyme ne formant/stabilisant pas le radical tryptophanyle sur le résidu proximal, le radical porphyrinique cationique est relativement stable, puisqu'il est toujours détecté après 10s de réaction avec l'acide peracétique. Grâce à cet exemple, et par analogie aux cas connus chez les catalases et les peroxydases monofonctionnelles, nous pouvons supposer que BpKatG forme également cet intermédiaire. Cependant celui-ci se transformerait trop rapidement pour être observé à l'échelle de la seconde. Pour confirmer cette hypothèse, des expériences de freeze-quench devront être réalisées pour atteindre des temps de l'échelle de la milliseconde.

La formation de l'espèce oxoferryle, [Fe(IV)=O], est déduite par comparaison de la conversion du signal ferrique à la quantité d'espèces radicalaires formées.

Dans la représentation schématique du cycle de BpKatG trois hypothèses peuvent être émises quant au transfert d'électron intramoléculaire entre les intermédiaires :

① La formation des intermédiaires est séquentielle selon $\text{Trp}^{\bullet+} \rightarrow \text{Trp}^{\bullet} \rightarrow \text{Tyr}^{\bullet}$. Cette hypothèse est fortement étayée par les résultats obtenus par notre équipe sur la catalase-peroxydase de MtKatG en présence de substrats. En effet, en présence d'INH les espèces réactives sont des radicaux isolés et que cette réaction est très rapide. Simultanément, la proportion de $\text{Trp}_{321}^{\bullet+}$ augmente. Si la formation des intermédiaires n'était pas séquentielle, on ne devrait pas voir de modification du rendement en radical $\text{Trp}_{321}^{\bullet+}$. Avec le mutant W321F (qui correspond au mutant W330F chez BpKatG), l'espèce accumulée est l'espèce [Fe(IV)=O Por^{•+}], c'est à dire l'intermédiaire qui précède la formation des radicaux protéiques isolés dans ce mutant.

② La formation des radicaux isolés n'est pas liée à la formation du $\text{Trp}_{330}^{\bullet+}$. Il y aurait alors deux chemins électroniques différents. En effet, SyKatG ne forme pas le radical sur le tryptophane proximal mais, au contraire, les deux autres radicaux y sont détectés¹⁴. De même, dans le cas du mutant W330F de BpKatG, le signal large caractéristique de l'espèce $\text{Trp}^{\bullet+}$ n'est plus observé mais les deux autres radicaux, eux, sont détectés.

③ Les trois radicaux se forment de façon concomitante. Toutefois, notre équipe a démontré que dans le cas de SyKatG, la formation du radical sur le tryptophane ou sur la tyrosine est séquentielle⁴⁵. Il est fortement probable qu'il en est de même avec BpKatG et rend cette troisième hypothèse moins vraisemblable.

Les comparaisons avec les protéines étudiées dans la littérature nous permettent de supposer que pour BpKatG, la formation des intermédiaires radicalaires serait séquentielle. Cependant, pour confirmer cette hypothèse des expériences de combinaison de substrats sont en cours.

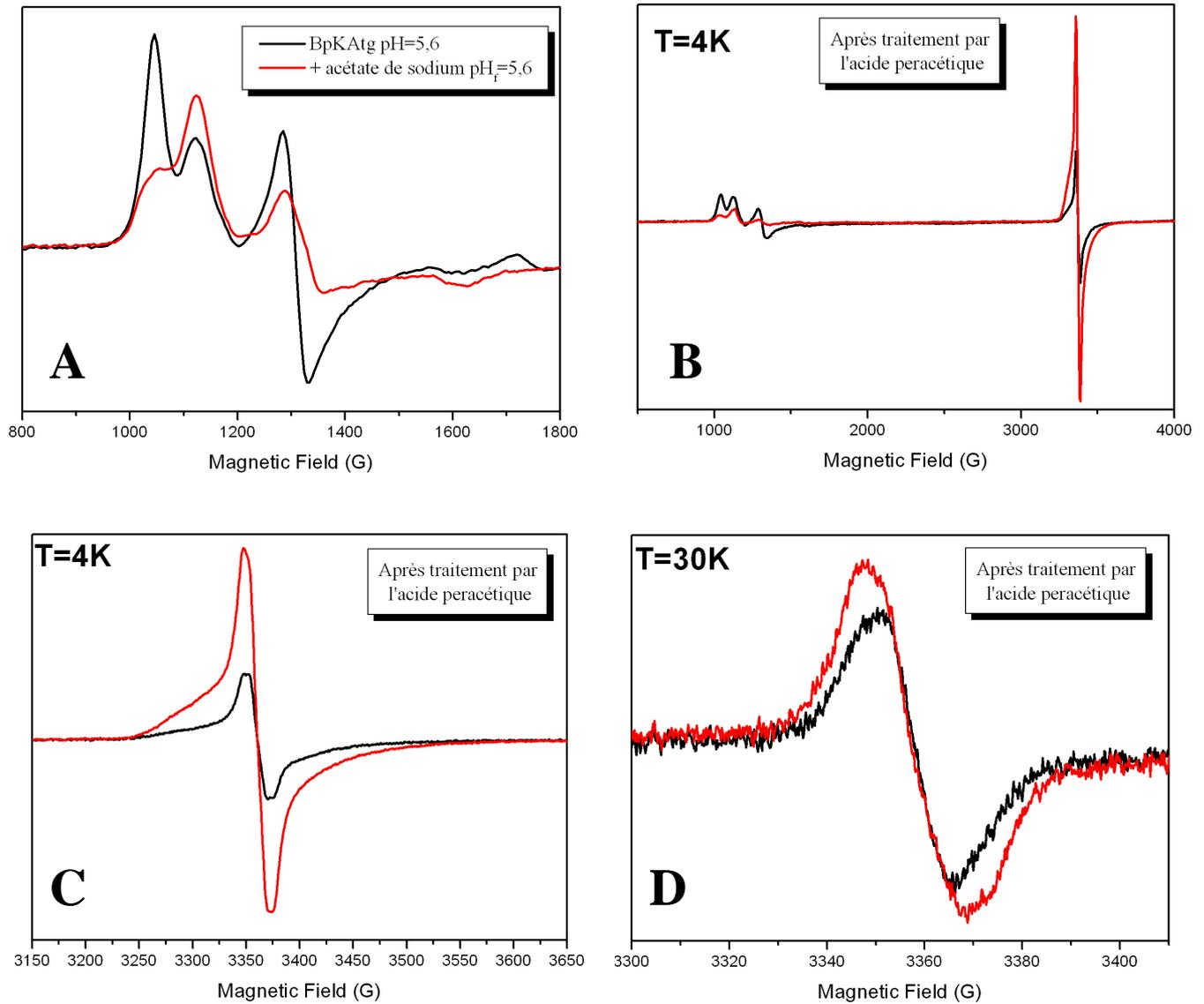


Figure 4- 14 : Effet de l'acétate sur le spectre RPE de BpKatG. (A) : effet sur le spectre ferrique ; (B) : Effet sur la conversion du signal ferrique en radicaux protéiques. (C) : Effet sur la formation des espèces radicalaires. (D) : Effet sur la formation des radicaux isolés. Conditions d'enregistrement : (A), (B) : T=4K, Modulation d'amplitude 4 G, Puissance des micro-ondes 1 mW, Modulation de fréquence 100 kHz. (C) : T=4K, Modulation d'amplitude 2 G, Puissance des micro-ondes : 1 mW, Modulation de fréquence 100 kHz ; (D) T=30K, Modulation d'amplitude 2 G, Puissance des micro-ondes 50 μ W, Modulation de fréquence 100 kHz.

I.3-EFFET DE L'ACETATE DE SODIUM.

Après incubation de l'enzyme ferrique avec l'acétate de sodium, en excès (30 fois) pendant 5 min à température ambiante, des changements spectraux sont observés (figure 4-14 A). Le rapport entre la contribution du signal rhombique et celle du signal axial est différent en présence d'acétate, comme ceux induits par le pH (figure 4-6) ou par des mutations (figure 4-10 haut). Il faut remarquer que dans le cas de l'ajout d'acétate aucun changement de pH n'a lieu. Nous avons donc attribué ce changement du signal à des modifications du microenvironnement de l'hème par analogie avec les résultats obtenus avec les mutants, en particulier ceux qui affectent le réseau de liaisons hydrogène^{27,26}.

Pour les catalases, nous avons observé que l'acétate en excès (80 fois) entraîne une modification du signal ferrique et inhibe ensuite la réaction avec l'acide peracétique (voir figure 3-15). Au contraire, BpKatG pré-incubée avec un excès d'acétate de sodium, réagit facilement avec l'acide peracétique (figures 4-14 B, C, D). L'intensité du signal large de 400G, détecté à 4K est multipliée par 2,8 par rapport à celui de l'échantillon contrôle. L'intensité du signal ferrique, observé après la réaction avec l'acide peracétique, est 2,7 fois plus faible en présence d'acétate que dans le contrôle. Il est intéressant de noter que la conversion du signal et la formation en espèces radicalaires sont les mêmes pour le contrôle lorsque qu'on utilise 10s de mélange (contre 2s dans ces expériences). Nos expériences en spectroscopie d'absorption UV-visible à mélange rapide ('stopped flow') montrent que le premier intermédiaire détecté, dans la réaction entre BpKatG et l'acide peracétique, correspond à une espèce où une molécule d'acide peracétique est liée à la partie distale de l'hème. Un second intermédiaire est observé et les changements dans le spectre d'absorption sont en accord avec la formation d'un intermédiaire oxoferryle-radical. A notre avis, les deux molécules d'acide peracétique sont nécessaires pour former l'intermédiaire de type oxoferryle $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$ détecté en RPE. Nos travaux en cours consistent à modéliser la fixation de deux molécules d'acide peracétique dans le site distal et d'envisager un schéma de la réaction, en utilisant la structure cristallographique de BpKatG. Pris dans leur ensemble, nos résultats d'absorption UV-visible à mélange rapide et de spectroscopie RPE renforcent le modèle dans lequel les deux molécules d'acide peracétique sont nécessaires pour la réaction. Ceci implique une différence mécanistique par rapport aux peroxydases monofonctionnelles.

I.4-REACTION DE BpKATG AVEC D'AUTRES OXYDANTS.

Pour les catalases et les catalase-peroxydases, l'acide peracétique permet de ralentir la réaction de catalyse et de détecter les intermédiaires radicalaires formés.

Afin de comparer la réactivité de BpKatG avec d'autres oxydants, nous avons réalisé le traitement de BpKatG avec l'acide *m*-chloroperoxybenzoïque (*m*CPBA) et le *tert*-butylhydroperoxyde (*t*BHP), dont les formules semi-développées sont présentées ci-dessous :

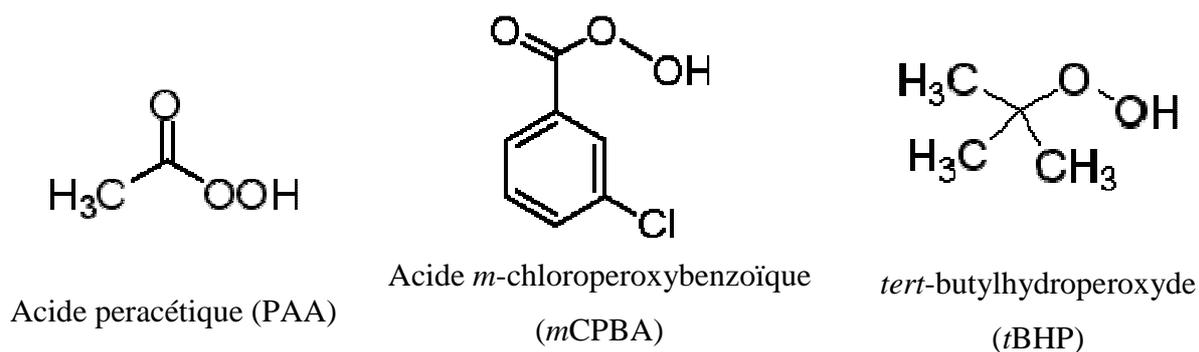


Schéma 4- 2 : Formules semi-développées des oxydants utilisés.

Nous avons choisi ces molécules en raison de leurs différences d'encombrements stériques et de pouvoir oxydant. La différence de potentiel provient, chez *m*CPBA de l'effet inductif attracteur du chlore qui facilite la formation de la forme carboxylate. Cependant, le paramètre le plus important est l'encombrement stérique, car comme le canal d'accès des KatGs est relativement étroit, il se peut que cela ait un effet sur la réactivité de BpKatG. Les spectres RPE à 9 GHz obtenus après réaction avec ces trois molécules sont représentés sur la figure 4-15.

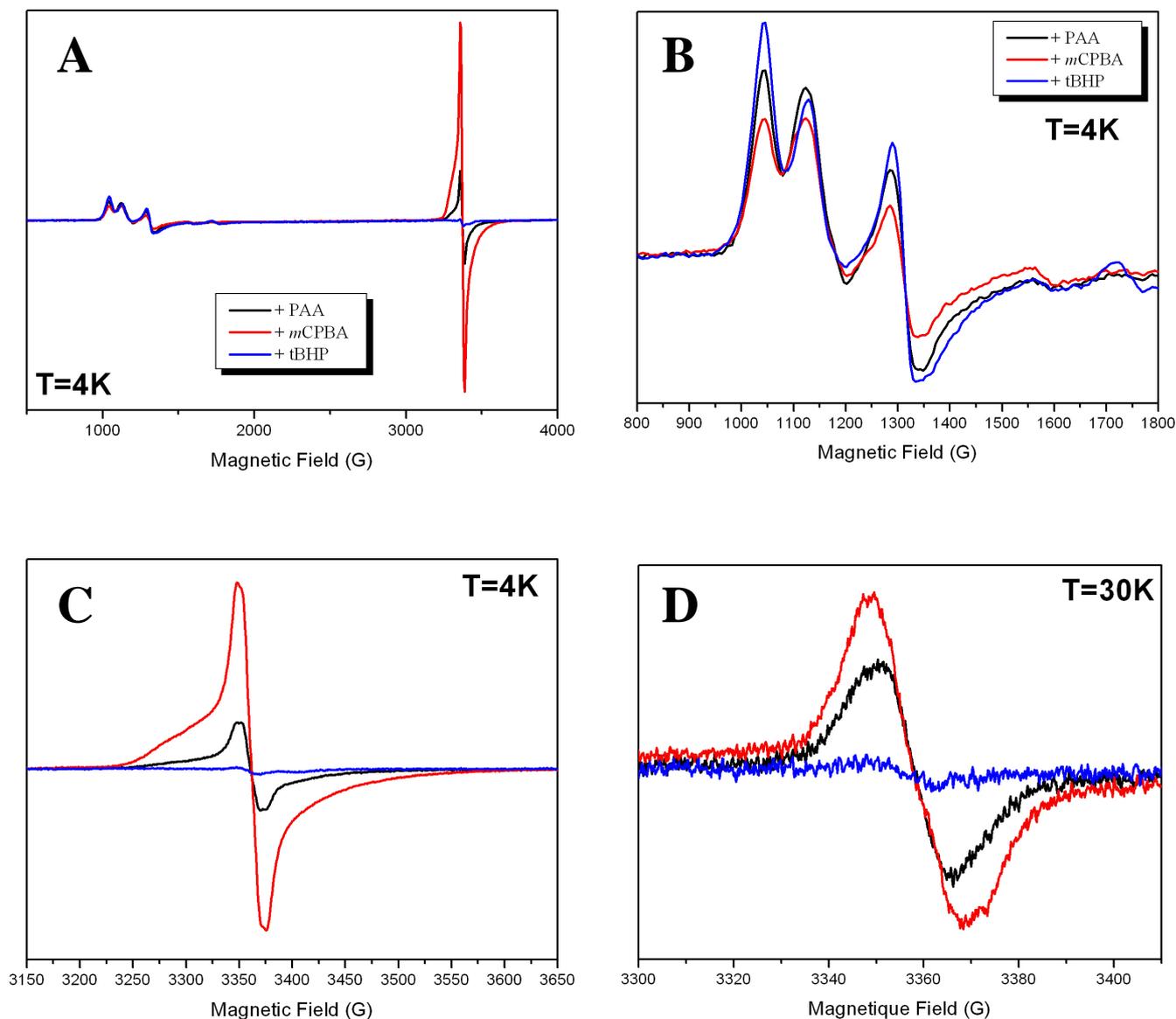
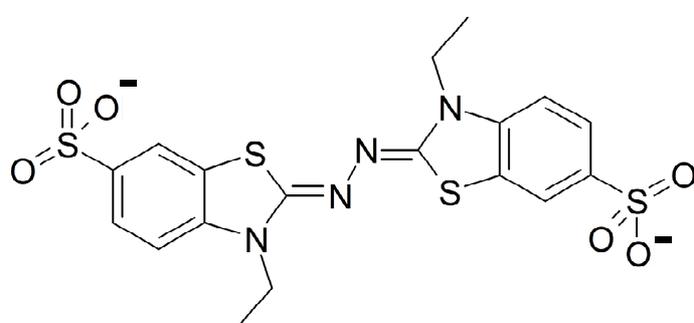


Figure 4- 15 : Effet des oxydants sur la réactivité de BpKatG. (A) : le spectre noir correspond à l'expérience 30 μ L BpKatG ($C=300\mu$ M) + acide peracétique en excès de 10 fois, mélangé pendant 2s dans la glace. **Spectre Rouge** : mêmes conditions expérimentales sauf que l'oxydant utilisé est l'acide *m*-chloroperoxybenzoïque, **Spectre bleu** : l'excès utilisé est de 100 fois et l'oxydant est le *tert*-butylhydroperoxyde. Le code couleur est le même pour toutes les figures. Les conditions d'enregistrement des spectres sont identiques à celles indiquées sur la figure 4-7, respectivement pour (A), (B) et (C). Les figures (B) et (C) sont des agrandissements du signal ferrique et du signal des espèces radicalaires de la figure (A), respectivement. (D) Spectres RPE à 9 GHz enregistrés à 30K des mêmes échantillons que pour (A).

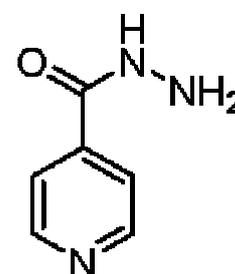
Il est remarquable qu'avec le *t*BHP aucun radical ne soit détecté, à 4K comme à 30K (figure 4-15 spectre bleu), bien que le signal ferrique disparaît quand même. L'interprétation la plus probable est qu'il se forme une espèce oxoferryle [Fe(IV)=O] silencieuse en RPE. Cependant, aucune formation de composé II n'a été observée en spectroscopie d'absorption UV-visible, mais comme nous l'avons vu avec les catalases, un effet de concentration de l'enzyme pourrait expliquer ce phénomène (voir chapitre précédent). Dans le cas de l'expérience RPE le mélange a lieu dans la glace pendant 2s. Il est possible que la réaction avec le *t*BHP soit réalisée à l'échelle de la milliseconde et donc, qu'au cours de nos mesures de RPE dont le temps caractéristique est de l'ordre de la seconde aucun intermédiaire radicalaire ne puisse être détecté. Pour vérifier cette possibilité, il faudrait réaliser des expériences de freeze-quench avec cet oxydant.

Dans le cas de l'acide *m*-chloroperoxybenzoïque, un signal large de 400 G centré à $g=2$ identique à celui du témoin (réalisé avec l'acide peracétique) est observé, mais d'intensité quatre fois plus grande à 4K. Ce signal étant attribué à l'intermédiaire [Fe(IV)=O Trp^{•+}], celui-ci serait donc plus stable avec le *m*CPBA. A 30K, le signal du radical n'est que 1,6 fois plus intense que celui du témoin. D'après ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que le(s) site(s) de fixation du *m*CPBA est (sont) différent(s) de celui de l'acide peracétique et/ou que la réaction entre BpKAtG et le *m*CPBA est différente de celle entre l'enzyme et l'acide peracétique. Des études de stopped-flow et de modélisation avec ces deux oxydants sont en cours pour tenter de répondre à ces questions.

1.5-REACTIVITE DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES VIS-A-VIS DES SUBSTRATS DANS LA REACTION DE TYPE PEROXYDASE.



ABTS



INH

Schéma 4- 3 : Formules semi-développées des substrats ABTS et INH

Nous avons démontré que la catalase peroxydase de *B. pseudomallei* forme, en plus du composé I, [Fe(IV)=O Por^{•+}], trois intermédiaires radicalaires protéiques, deux étant identifiés comme des radicaux tryptophanyles, l'un formé sur le Trp330, et le dernier identifié comme un radical tyrosyle. Afin d'évaluer le(s) possible(s) rôle(s) de ces intermédiaires dans le cycle catalytique de BpKatG, nous avons testé la réactivité de ces radicaux vis-à-vis de substrats.

Pour cela, nous avons choisi d'étudier deux substrats de tailles très différentes l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (ABTS) et l'isoniazide (INH) dont les formules sont représentées sur le schéma 4-3.

Ces deux molécules ont été sélectionnées car l'ABTS est un substrat couramment utilisé pour étudier l'activité des peroxydases monofonctionnelles et l'INH est l'un des quatre antibiotiques administrés dans le traitement de la tuberculose et nécessite la présence de la catalase-peroxydase de *M. tuberculosis* pour être activé.

Notre hypothèse de travail est que chaque intermédiaire radicalaire possède au moins un substrat spécifique et qu'en présence de celui-ci sa réaction sera favorisée ou du moins en compétition avec le transfert d'électron intramoléculaire à l'origine de la formation des trois espèces radicalaires protéiques dans BpKatG.

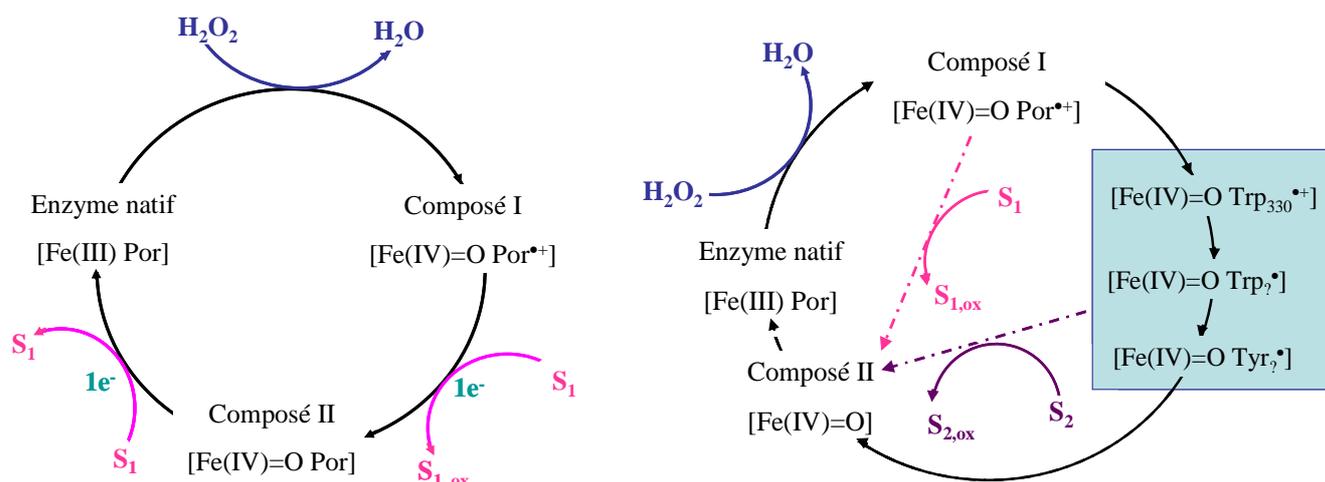


Schéma 4- 4 : Cycles catalytiques possibles en présence de substrats, donneurs d'un électron.

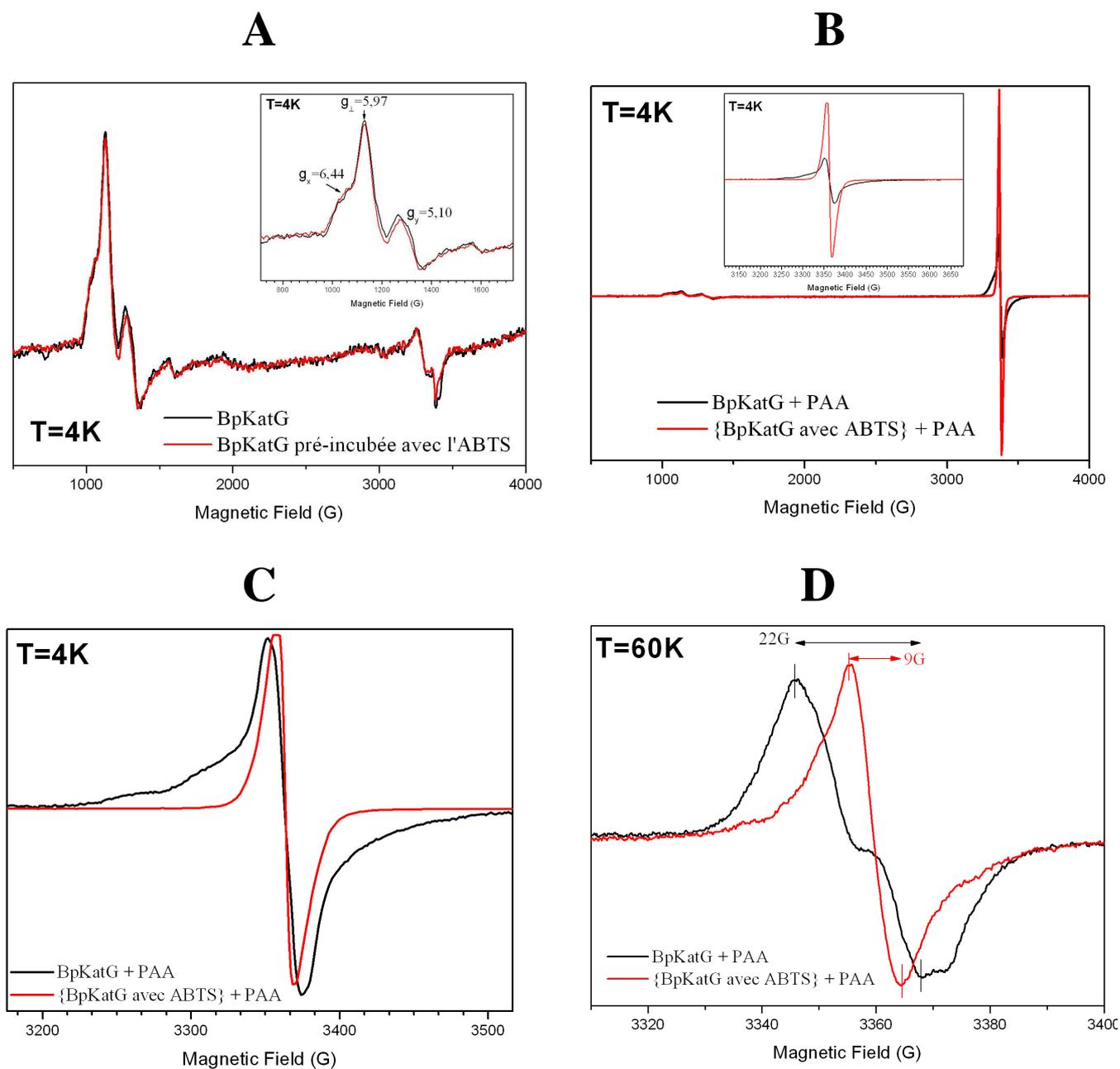


Figure 4- 16 : Spectres RPE à 9 GHz de la réaction de BpKatG avec l'ABTS (rouge) et de son contrôle (noir) à différentes températures d'enregistrement. Les spectres des figures C et D ont été normalisés en prenant comme référence l'intensité du signal des espèces radicalaires formés dans le contrôle. Les figures 4-16 B et 4-16 C montrent les spectres RPE à 9 GHz enregistrés à 4K après la réaction avec l'ABTS en excès de deux fois et l'acide peracétique en excès de cinq fois, la réaction étant stoppée par immersion dans l'azote liquide après 2s à 0°C

I.5-1 Réaction entre BpKatG et l'ABTS.

Lorsqu'on pré-incube BpKatG avec l'ABTS, aucun changement dans les valeurs du tenseur g du signal ferrique n'est observé (figure 4-16 A) contrairement à ce qu'on a observé avec l'acétate de sodium (voir paragraphe précédent). Il semble donc que l'ABTS ne se fixe pas à proximité de l'hème.

En présence d'ABTS et après réaction avec l'acide peracétique, il apparaît dans le spectre RPE de BpKatG (figure 4-16 B et 4-16 C) un signal à $g=2$ intense (3 fois plus intense que le contrôle) tandis que l'intensité du signal ferrique est identique à celle du contrôle. Le signal du radical large observé dans le contrôle, attribué au radical formé sur le Trp330 n'est plus détecté en présence d'ABTS, par contre, un autre signal radicalaire plus étroit est détecté (figure 4-16 C). Le spectre à 60K (figure 4-16 D) de l'échantillon avec l'ABTS confirme la présence d'un signal plus étroit (largeur pic à pic de 9 G) que celui des radicaux tryptophanyles et tyrosyles (largeur pic à pic de 22 G). Le signal étroit détecté correspond au signal du radical ABTS⁴⁶. Contrairement au cas de la BLC, aucun autre signal de radical organique n'est détecté.

Le spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon RPE contenant l'ABTS présente les bandes caractéristiques attendues pour le radical ABTS mais également celles de l'espèce oxoferryle.

Même le premier radical alternatif, dans l'ordre séquentiel proposé n'est pas observé. Il semblerait donc que l'ABTS réagisse directement avec le composé I [$\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}$].

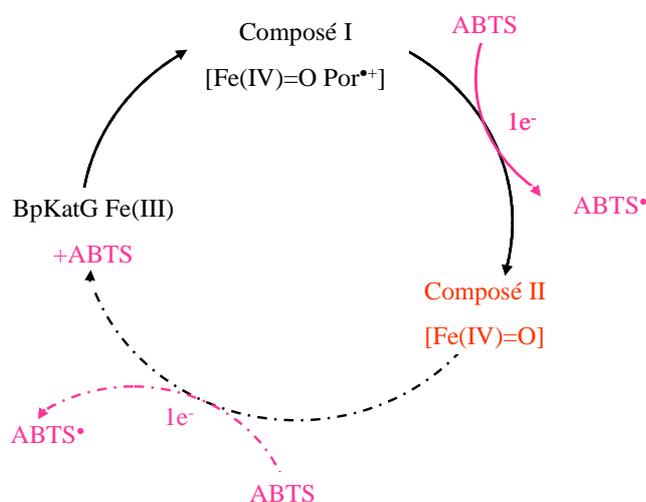
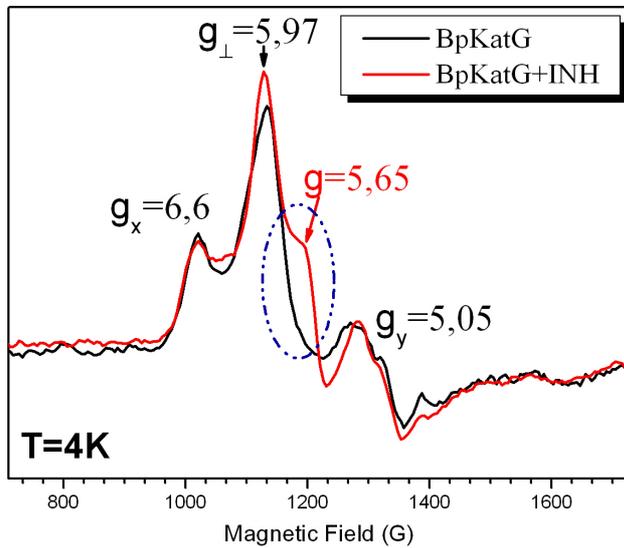
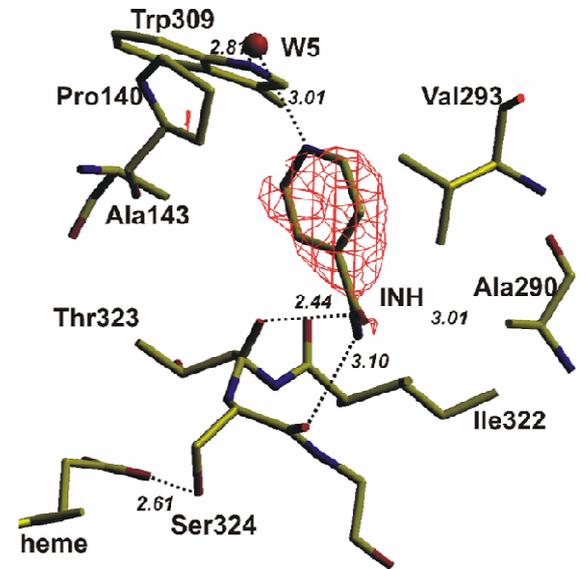
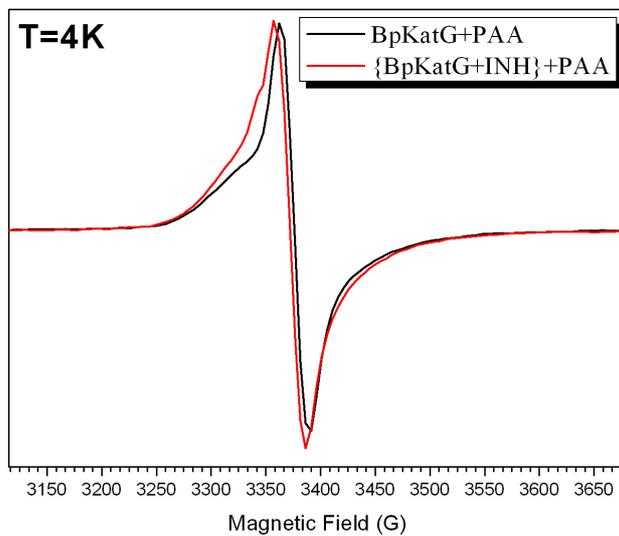


Schéma 4- 5 : Cycle catalytique de BpKatG en présence d'ABTS.



C



D

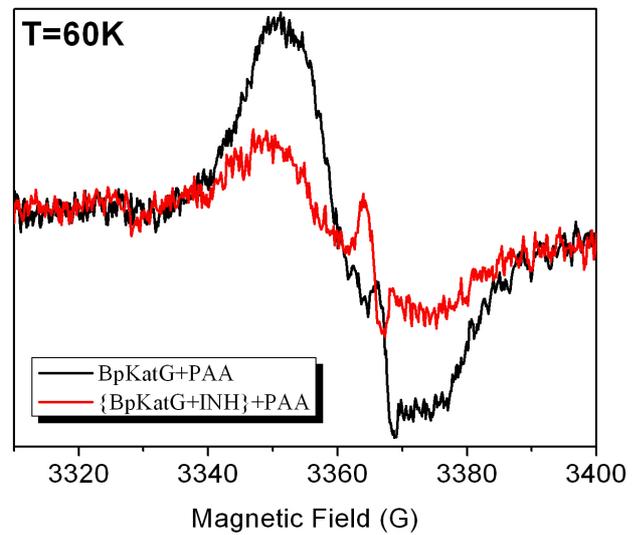


Figure 4- 17 : Réaction entre BpKatG et l'isoniazide suivie par spectroscopie RPE à 9 GHz. En noir sur (A), (C) et (D) est représenté le spectre du contrôle (*i. e.* sans INH) et en rouge en présence d'INH. (B) Représentation du site de fixation possible pour l'INH. D'après Carpena et coll.⁶

I.5-2 Réaction entre BpKatG et l'isoniazide.

Lorsque l'on pré-incube BpKatG avec l'INH, un changement de couleur de l'échantillon est observé, il passe du brun au rouge sang. Cette observation indique que l'INH doit se fixer près de l'hème (puisque s'il y a un changement de couleur cela signifie que les bandes d'absorption du fer héminique sont modifiées). Cette hypothèse est confirmée par le spectre RPE du signal ferrique de l'enzyme (figure 4-17 A). En effet, l'incubation de l'INH induit de légers changements au niveau du signal axial du spectre. Il apparaît un épaulement en $g=5,65$ (repéré par un cercle bleu sur la figure). Vraisemblablement, l'INH se fixe de façon telle qu'il perturbe le réseau de liaisons hydrogène du site distal de l'hème, mais il n'est pas ligand, contrairement à l'acétate, qui peut l'être, et qui induit de réels changements sur le signal ferrique (figure 4-14).

En 2003, nos collaborateurs⁶ ont proposé un site de fixation de l'INH chez BpKatG représenté sur la figure 4-17 B. Dans ce modèle, l'INH serait connecté à ce dernier *via* un réseau de liaisons hydrogène qui font intervenir le résidu Ser324. Il est intéressant de noter que dans les cas de résistance à l'INH, la majorité des mutations spontanées observées chez les patients concernent cette sérine (qui est localisée au même endroit chez MtKatG). Il est envisageable que la mutation de ce résidu détruit le site de fixation de l'INH et rende ainsi le traitement inefficace.

Après traitement de ces deux échantillons par l'acide peracétique, les spectres RPE à 9 GHz ont été enregistrés à $T=4K$ (figure 4-17 C) et à $T=60K$ (figure 4-17 D). A 4K, pour les deux échantillons le signal large est détecté. Par contre à 60K, l'intensité du signal du contrôle est trois fois plus importante que celle de l'échantillon avec l'INH. Même si l'INH et l'acide peracétique sont introduits en conditions stœchiométriques, la vitesse de réaction entre l'INH et BpKatG est sans doute plus lente que celle du transfert d'électron intramoléculaire entre le deuxième site radicalaire tryptophane isolé et le Trp330, d'où le signal radicalaire observé en RPE à 60K.

D'après ces résultats, il apparaît que l'intermédiaire $[Fe(IV)=O \text{ Trp}_{330}^{\bullet+}]$ ne réagit pas avec l'INH. Il semble donc que l'espèce réactive en présence d'INH soit l'un des deux radicaux isolés. Ces résultats sont similaires à ceux observés avec la catalase-peroxydase de *M. tuberculosis*, bien qu'avec cette dernière aucun signal ne soit détecté à 60K³⁷. En particulier, les études dans notre laboratoire³⁷ ont montré que chez MtKatG, l'INH réagirait avec le deuxième radical tryptophanyle plutôt qu'avec le radical tyrosyle. Toutefois, les résultats ne sont pas directement transposables d'un enzyme à l'autre, comme l'ont montré

des études de spectrophotométrie d'absorption UV-visible à mélange rapide (stopped-flow) qui attestent d'une réactivité différente pour BpKatG et MtKatG⁴⁷.

Nos expériences, jusqu'à présent, ne nous permettent pas de conclure de manière définitive sur la réactivité sélective des radicaux protéiques. Pour pouvoir trancher, la mutagenèse dirigée sur des résidus tryptophanes et tyrosines est en cours, afin de déterminer le site de formation des radicaux protéiques isolés, ce qui nous permettrait le cas échéant de déterminer avec exactitude l'intermédiaire réactif en présence d'INH. De plus, pour connaître le site de fixation de l'INH, nous avons entamé une collaboration afin de faire des études de spectroscopie ENDOR avec l'INH marqué à l'azote 15, dont j'ai réalisé la synthèse (voir annexe).

En tant qu'ancêtre commun des catalases et des peroxydases monofonctionnelles, les catalase-peroxydases forment une famille importante qu'il faut mieux connaître pour appréhender les différences de réactivité des catalases et des peroxydases vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. C'est pourquoi, nous avons réalisé une étude comparative de ces protéines.

II. CARACTERISATION ET COMPARAISON DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES FORMES PAR LES KATGS.

II.1-DEPENDANCE EN PH DU SIGNAL RPE A 9 GHZ DES KATGS NATIVES..

Comme nous l'avons montré dans le cas de BpKatG, le pH de la solution peut engendrer des modifications structurales du site actif comme la modification perhydroxy du Trp111 ou le changement de conformation de l'Arg426, qui sont corrélées aux différentes activités catalytiques des catalase-peroxydases. Afin de vérifier si les autres catalase-peroxydases présentaient ces mêmes caractéristiques, nous avons réalisé une étude en pH du signal ferrique pour chaque catalase-peroxydase. Les spectres obtenus en RPE à 9 GHz et enregistrés à T=4K sont présentés sur la figure 4-18.

Comme on pouvait s'y attendre les spectres RPE à 9 GHz des KatGs dans leur état natif sont caractéristiques d'un Fe(III), spin fort, pentacoordiné, avec deux résonances principales en $g \approx 6$ et $g \approx 2$. Pour toutes ces KatGs, les spectres correspondent à la contribution de deux signaux, un signal axial (g_{AL} , $g_{A//}$) et un signal rhombique (g_{Bx} , g_{By} et g_{Bz}). Les proportions relatives de ces deux signaux varient avec le pH pour chaque KatGs et ces

variations sont spécifiques à chaque enzyme. Les valeurs des composantes du tenseur g du signal axial et du signal rhombique (selon le pH) sont résumées dans le tableau 4-2.

KatG	Tenseur g du signal axial	Tenseur g du signal rhombique à pH=5	Tenseur g du signal rhombique à pH=8
MtKatG	$g_{A1}=5,90$	$g_{Bx}=6,50$	$g_{Bx}=6,63$
	$g_{A2}=1,99$	$g_{By}=5,10$	$g_{By}=5,01$
		$g_{Bz}=1,97$	$g_{Bz}=1,98$
BsKatG	$g_{A1}=5,98$	$g_{Bx}=6,29$	$g_{Bx}=6,38$
	$g_{A2}=1,99$	$g_{By}=5,18$	$g_{By}=5,26$
		$g_{Bz}=1,98$	$g_{Bz}=1,98$
SyKatG	$g_{A1}=5,90$	$g_{Bx}=6,50$	$g_{Bx}=6,62$
	$g_{A2}=1,99$	$g_{By}=5,10$	$g_{By}=5,01$
		$g_{Bz}=1,97$	$g_{Bz}=1,98$
RcKatG	$g_{A1}=5,97$	$g_{Bx}=6,57$	$g_{Bx}=6,57$
	$g_{A2}=1,99$	$g_{By}=5,06$	$g_{By}=5,07$
		$g_{Bz}=1,97$	$g_{Bz}=1,97$
EcKatG	$g_{A1}=5,97$	$g_{Bx}=6,65$	$g_{Bx}=6,66$
	$g_{A2}=1,99$	$g_{By}=5,07$	$g_{By}=5,07$
		$g_{Bz}=1,96$	$g_{Bz}=1,96$
BpKatG	$g_{A1}=5,94$	$g_{Bx}=6,44$	$g_{Bx}=6,59$
	$g_{A2}=1,99$	$g_{By}=5,11$	$g_{By}=5,03$
		$g_{Bz}=1,97$	$g_{Bz}=1,96$
AfKatG	$g_{A1}=6,04$	$g_{Bx}=6,44$	$g_{Bx}=6,60$
	$g_{A2}=1,99$	$g_{By}=5,26$	$g_{By}=5,16$
		$g_{Bz}=1,97$	$g_{Bz}=1,97$

Tableau 4- 2 : Caractéristiques des spectres RPE à 9 GHz du signal ferrique des catalase-peroxydases enregistrés à T=4K.

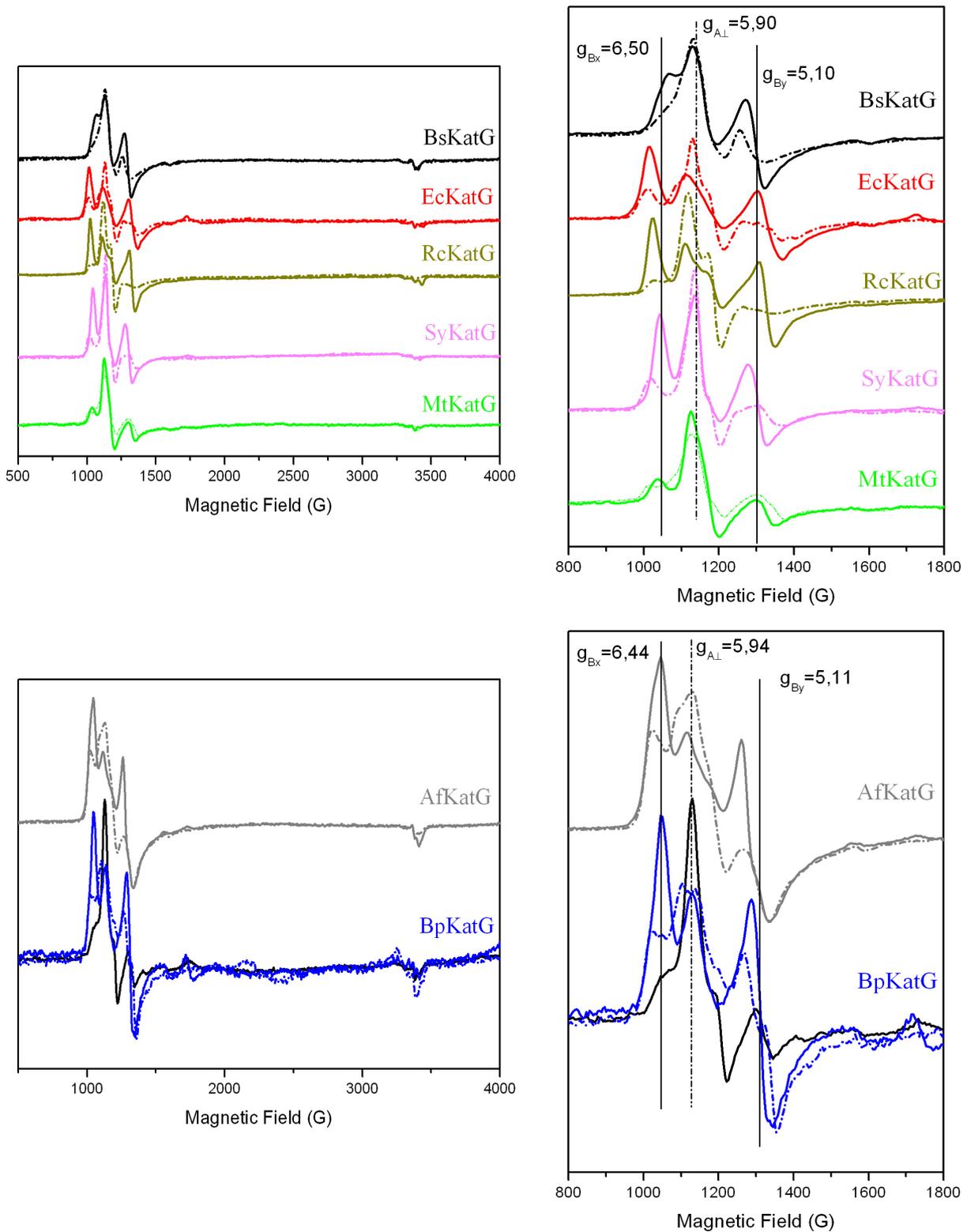


Figure 4- 18 : Dépendance du signal ferrique selon le pH des différentes KatGs enregistrés à T=4K. Les conditions d'enregistrement sont identiques à celles de la figure 4-1 gauche. En trait plein, le spectre correspond au pH acide (pH=5,3) et en pointillés au pH basique (pH=8,2). Pour BpKatG, le spectre noir correspond au pH=4,5.

Nous avons déjà démontré que des changements de pH induit des changements de proportion de signal rhombique sur le spectre de l'enzyme natif de BpKatG. En particulier, l'absence de signal axial à pH basique a été attribuée à des changements géométriques induits par la modification perhydroxyle du Trp111²⁷.

Comme SyKatG, les autres KatGs ne possèdent pas d'activité NADH-oxydase et la contribution du signal axial est plus importante que celle du signal rhombique à pH basique. Seule AfKatG se distingue et se comporte comme BpKatG à pH basique mais elle ne possède pas d'activité NADH-oxydase, activité qui nécessite la modification du tryptophane distal. Les changements dans le signal RPE ferrique d'AfKatG résulterait plutôt de la protonation ou de la déprotonation d'un résidu. La partie distale du site actif d'AfKatG est donc vraisemblablement différente de celui des autres enzymes, du point de vue acido-basique notamment.

II.2-INTERMÉDIAIRES RADICALAIRES FORMES PAR LES KATGS.

Nous avons démontré que BpKatG et MtKatG forment un intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ de courte durée de vie, un intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$ sur le Trp330/Trp321 (BpKatG/MtKatG) ainsi qu'un autre radical tryptophanyle et un radical tyrosyle. SyKatG forme un radical $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ stable ainsi qu'un radical tryptophanyle sur le Trp106 et un radical tyrosyle. Par contre, aucun radical n'est formé sur le tryptophane proximal.

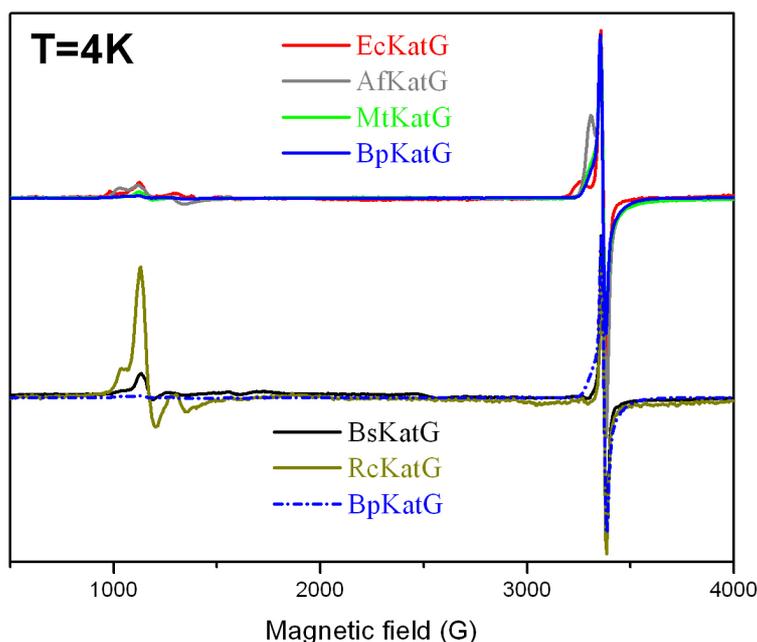


Figure 4- 19 : Comparaison des intermédiaires formés par les catalase-peroxydases après réaction avec l'acide peracétique.

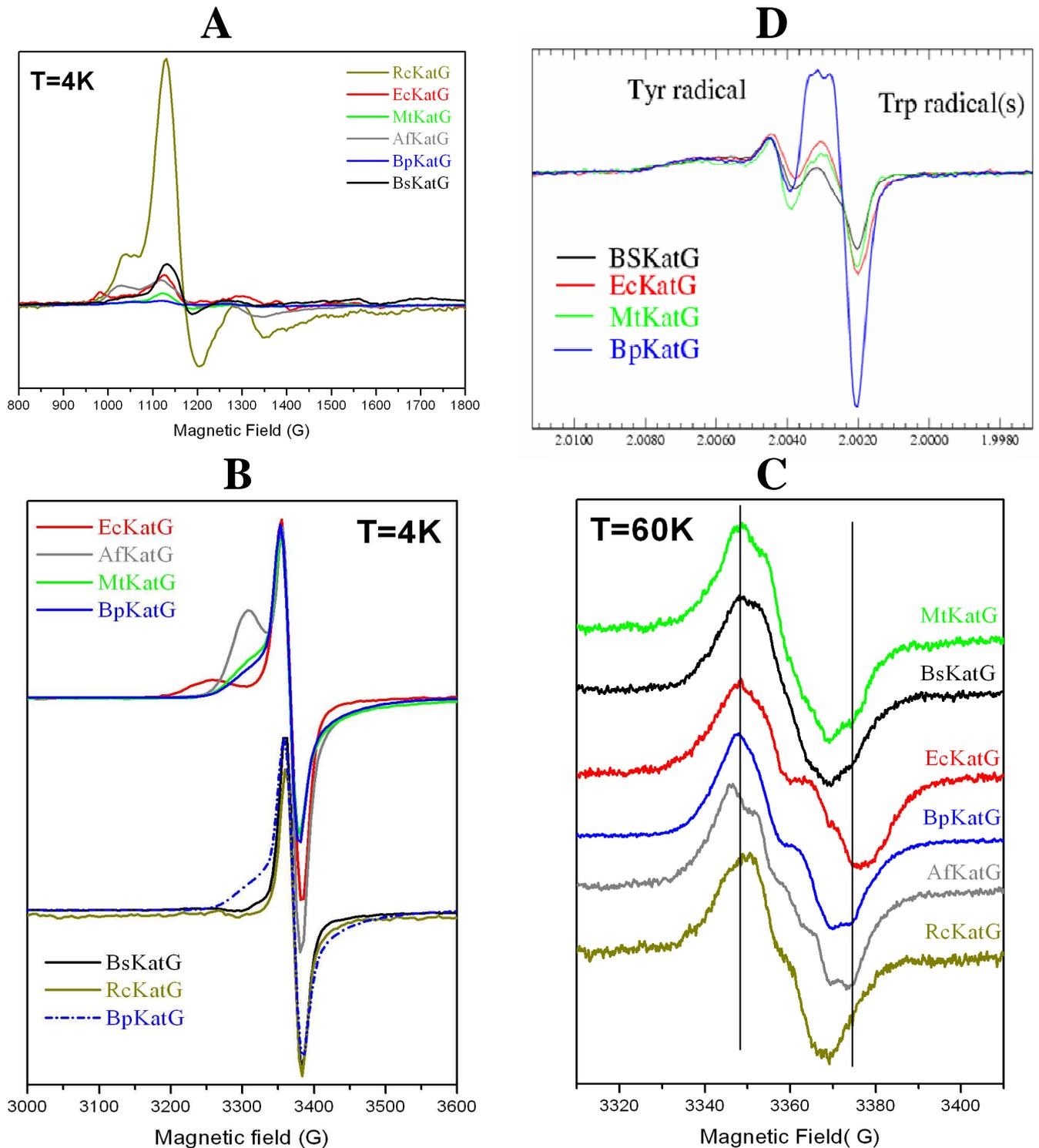


Figure 4- 20 : (A) Agrandissement du spectre figure 4-19 de la partie du spectre correspondant au signal ferrique après réaction avec l'acide peracétique et les KatGs (B) : Agrandissement du spectre de la figure 4-19 de la partie du spectre correspondant au signal des espèces radicalaires après réaction avec l'acide peracétique et les KatGs. Les conditions d'enregistrement sont T=4K, Modulation d'amplitude 4 G, Puissance des micro-ondes P=1 mW, Modulation de fréquence 100 kHz. (C) : Spectres RPE à 9 GHz, enregistrés à T=40K. Conditions d'enregistrement : T=40K, Modulation d'amplitude 0,5 G, Puissance des micro-ondes 60 μ W, modulation de fréquence 100 kHz. (D) : Spectres RPE enregistrés à champ intense (10 T) et haute fréquence (285 GHz) des radicaux protéiques formés par les catalase-peroxydases. Conditions d'enregistrement : T=10K, Modulation de fréquence 3KHz modulation du champ 10 G. Pour chaque enzyme, les conditions utilisées sont celles pour lesquelles le rendement en espèces radicalaires est maximal.

Nous avons cherché à identifier les intermédiaires radicalaires pour les autres catalase-peroxydases (figure 4-19). Les figures 4-20 A et B sont des agrandissements de la partie ferrique et de la partie radicalaire respectivement du spectre de la figure 4-19. Après traitement avec l'acide peracétique, hormis ceux de RcKatG et BsKatG, les spectres des KatGs présentent un signal large de 400 G centré à $g=2$. Par comparaison avec ceux de BpKatG et de MtKatG, les formes de ces signaux larges sont différentes, rappelant ce que nous avons observé avec les mutants de BpKatG. En particulier, le signal obtenu avec AfKatG est similaire à celui du mutant W111F de BpKatG (figure 4-20 B). Comme pour l'étude de la dépendance en pH du signal ferrique, nous pouvons en conclure que la partie distale de l'hème dans AfKatG est différente de celles des autres KatGs. Pour BsKatG et RcKatG, le signal large n'est pas détecté mais un signal plus étroit de 24 G centré à $g=2$ est détecté. Cependant, le composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ n'est peut-être pas détecté à cause de la faible concentration des échantillons.

La conversion du signal ferrique est également variable selon les KatGs. Il faut préciser que les conditions utilisées pour chaque enzyme correspondent à celles pour lesquelles le maximum de signal radicalaire en $g=2$ est obtenu. Sur la figure 4-20 A, on observe, après normalisation que la conversion du signal ferrique de RcKatG est inférieure à celle des autres KatGs. Comme précédemment une absence de réaction aussi bien qu'une réaction trop rapide peuvent interpréter cette diminution. On ne peut également exclure la formation de composé II, $[\text{Fe(IV)=O}]$ avec cet enzyme. Pour les autres KatGs, la conversion du signal est d'environ 80 % et le maximum est obtenu avec BpKatG.

La figure 4-20 C présente les spectres RPE des mêmes échantillons enregistrés à 40K. Les spectres obtenus possèdent une largeur pic à pic d'environ 25 G. Les allures des spectres sont différentes, ce qui peut s'interpréter par des rapports quantitatifs entre les radicaux tryptophanyles et radical tyrosyle différents, ou par des sites de formation de ces intermédiaires différents. Seul RcKatG se distingue, car son signal est légèrement plus étroit (19 G) de forme est similaire à celle du radical tyrosyle de la catalase de foie de bœuf. Un spectre RPE à champ intense aurait pu éventuellement approfondir l'investigation mais le rendement en radical avec RcKatG est trop faible ($\leq 30\%$) pour réaliser cette expérience.

Les spectres RPE à champ intense confirment les informations déduites des spectres à 9 GHz. En effet, il apparaît clairement sur cette figure que la proportion de radical

tryptophanyle est la plus importante chez BpKatG même si toutes les catalase-peroxydases forment les deux radicaux.

SyKatG est donc la seule KatG de cette étude qui forme un composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ assez stable pour être détecté à l'échelle de la seconde. Dans BsKatG et RcKatG aucun signal dû à un radical formé sur le tryptophane proximal n'est détecté. Le signal large (400 G) de ce radical a la même forme dans BpKatG et MtKatG mais pas dans AfKatG et EcKatG. Deux interprétations sont possibles. Soit, chez ces deux dernières catalase-peroxydases, le site de formation du radical tryptophanyle n'est pas le tryptophane proximal mais le tryptophane distal, soit l'environnement distal de ces deux protéines est différent de celui de BpKatG et MtKatG et ce changement de géométrie entraîne un changement de la forme du signal, comme nous l'avons vu pour les mutants de BpKatG.

II.3-INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE MELANGE SUR LA FORMATION DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES DES KATGS.

Dans le cas des catalases monofonctionnelles, nous avons vu que la diminution de la température favorise la formation d'une espèce radicalaire protéique, alternative au composé I. Parmi les catalase-peroxydases étudiées, AfKatG provient d'une bactérie thermophile. Il est donc intéressant de connaître l'effet de la température sur le signal RPE des espèces radicalaires formées par cette dernière. Nous avons choisi de comparer l'effet de la température sur AfKatG à celui sur MtKatG, car c'est une des catalase-peroxydases les mieux connues. Nous avons donc réalisé la réaction de mélange entre les enzymes et l'acide peracétique à 0°C, 10°C, 25°C et 50°C, toutes les autres conditions expérimentales étant identiques.

Dans le cas d'AfKatG, les spectres RPE à 9 GHz révèlent que le maximum de conversion du signal ferrique est obtenu lorsque la température de mélange est de 25°C (figure 4-21 A). Ce maximum de conversion du signal ferrique correspond au maximum d'intensité de la partie étroite du signal centré à $g=2$, attribuée aux radicaux organiques. Le minimum de conversion est obtenu lorsque la température de mélange est de 50°C. En outre, l'intensité du signal ferrique à $T=25^\circ\text{C}$ est 1,7 fois plus importante qu'à 50°C. Le rapport des intensités dues aux radicaux protéiques indique également une plus grande conversion à 25°C, mais il est, à cette température, de quatre (au lieu de 1,7). Cela indique qu'une augmentation de température favorise la formation de composé II, $[\text{Fe(IV)=O}]$.

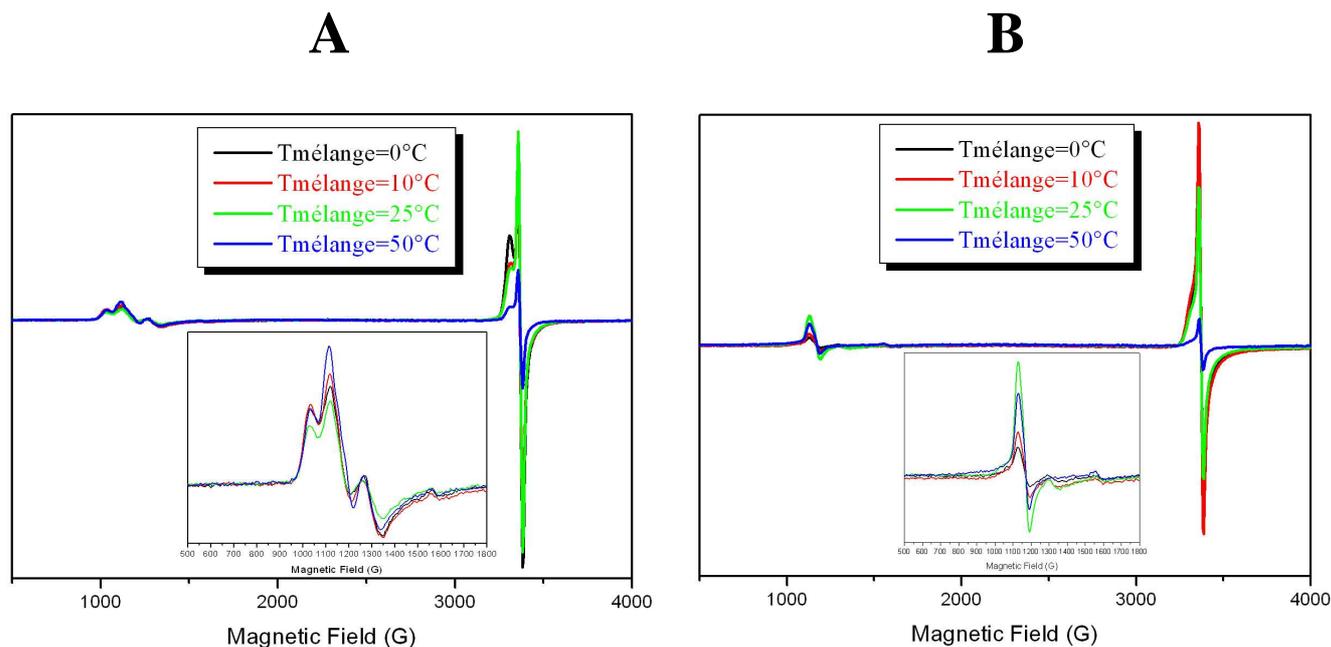


Figure 4- 21 : Spectres à 9 GHz enregistrés à 9 GHz d’AfKatG traitée par l’acide peracétique selon la température de mélange. Tous les spectres ont été obtenus avec des échantillons de même concentration en enzyme ; pour tous les échantillons l’acide peracétique est utilisé 20 fois en excès et le temps de réaction est de 2s.

Pour MtKatG (figure 4-21 B), dans les mêmes conditions, le maximum de conversion du signal ferrique est obtenu avec la température de mélange de 25°C et le minimum pour T=50°C. Le maximum de signal radicalaire est obtenu pour une température de mélange de 25°C alors que le minimum est obtenu à 50°C. Le rapport d’intensité du signal ferrique entre T=25°C et T=50°C est de 1,5 alors qu’il est de 6 pour les signaux des radicaux organiques. Comme précédemment la formation de composé II, que l’on ne peut mesurer directement par spectroscopie RPE, permet d’expliquer la non-proportionnalité des rapports d’intensité.

Pour être plus précis dans notre étude de l’influence de la température sur les intermédiaires radicalaires, nous devons distinguer le spectre large observé à 4K et le signal enregistré à 40K, puisque ces deux signaux correspondent à des espèces différentes. La figure 4-22 représente les spectres RPE enregistrés aux deux températures (4K et 40K) pour les deux catalase-peroxydases.

AfKatG

MtKatG

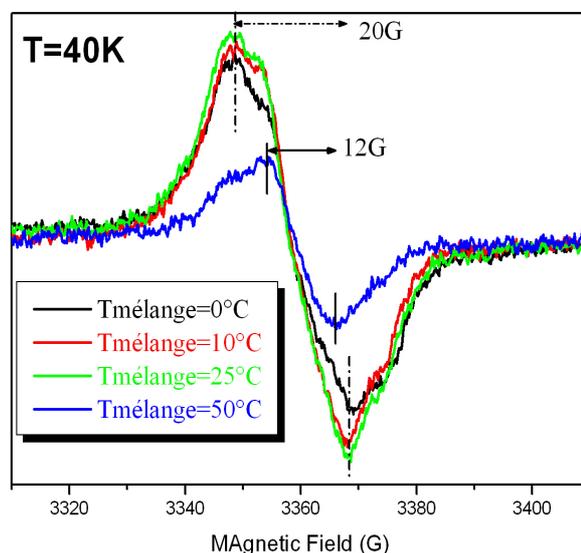
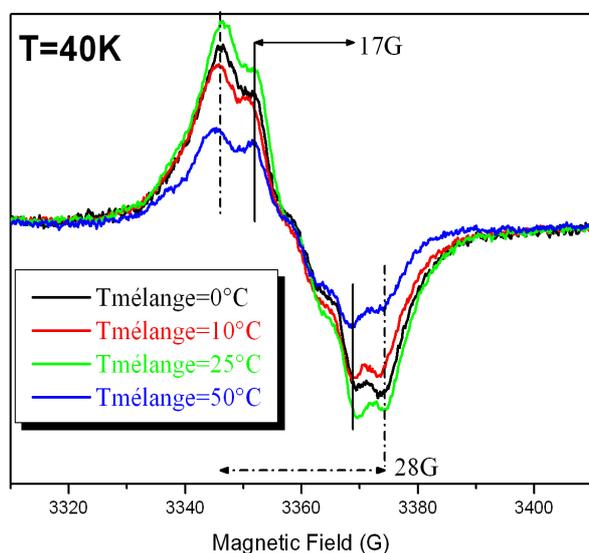
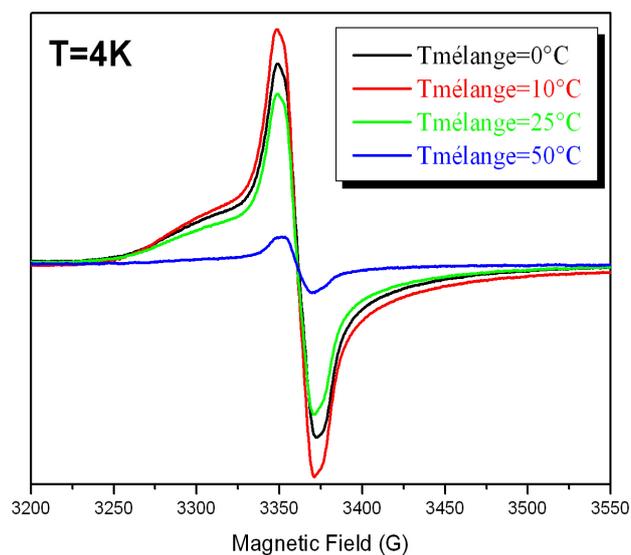
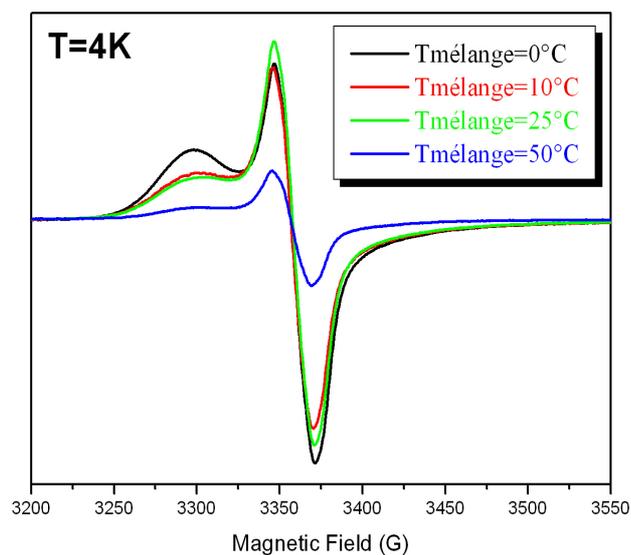


Figure 4- 22 : Influence de la température de mélange sur le rendement et sur la nature des intermédiaires radicalaires formés par AfKatG (gauche) et MtKatG (droite). En haut : Spectre RPE à 9 GHz enregistrés à T=4K ; En bas : Spectres RPE à 9 GHz enregistrés à T=40K. Pour les deux protéines les conditions de mélange et d'enregistrement des spectres sont strictement identiques. Les conditions d'enregistrement sont identiques à celles des figures 4-12 A et 4-12 C respectivement pour T=4K et T=40K.

Le signal large d'AfKatG est plus sensible à l'effet de la température que le signal de MtKatG. En effet entre 0°C et 25°C, l'intensité du signal large d'AfKatG est divisée par 1,5 alors qu'il n'est divisé que par 1,2 pour MtKatG. Par contre entre 25°C et 50°C, le signal large d'AfKatG diminue moins que celui de MtKatG, puisque le rapport est de 5 pour AfKatG et de 6 pour MtKatG.

L'intensité du signal enregistré à 40K n'est pratiquement pas modifiée entre T=0°C et T=25°C chez MtKatG et AfKatG. Par contre entre T=25°C et T=50°C, l'intensité du signal est divisée par 2 pour AfKatG et par 2,5 pour MtKatG.

MtKatG est donc plus sensible à l'effet de la température, lorsqu'elle est supérieure à 25°C. Ceci est en accord avec les mesures de l'activité catalytique. Après 60s à 60°C, MtKatG perd 50 % de son activité catalase alors que celle d'AfKatG ne diminue que de 10 %.

D'après ces résultats il est important de souligner que non seulement l'activité des catalase-peroxydases est liée à la nature des radicaux formés, mais également leurs proportions respectives.

II.4-DETERMINATION DU ROLE DES INTERMEDIAIRES RADICALAIRES : TESTS AVEC LES SUBSTRATS.

Nous avons démontré que seule SyKatG forme un radical porphyrinique cationique stable. De plus, avec cet enzyme, comme BsKatG et RcKatG, le tryptophane proximal n'est *a priori* pas le site de formation d'un intermédiaire radicalaire. Il l'est en revanche avec BpKatG et MtKatG³⁷. Avec AfKatG et EcKatG un signal large est également détecté, mais nos résultats ne nous ont pas permis de déterminer le résidu responsable de ce signal.

Afin déterminer la réactivité de ces espèces vis-à-vis de substrats, nous avons comparé la réactivité d'AfKatG et de RcKatG.

II.4-1 Réaction avec l'ABTS.

Le spectre RPE de l'enzyme ferrique pré-incubé avec l'ABTS en excès (5 fois) pendant cinq minutes à température ambiante est identique au spectre ferrique de l'enzyme seul (figure 4-23).

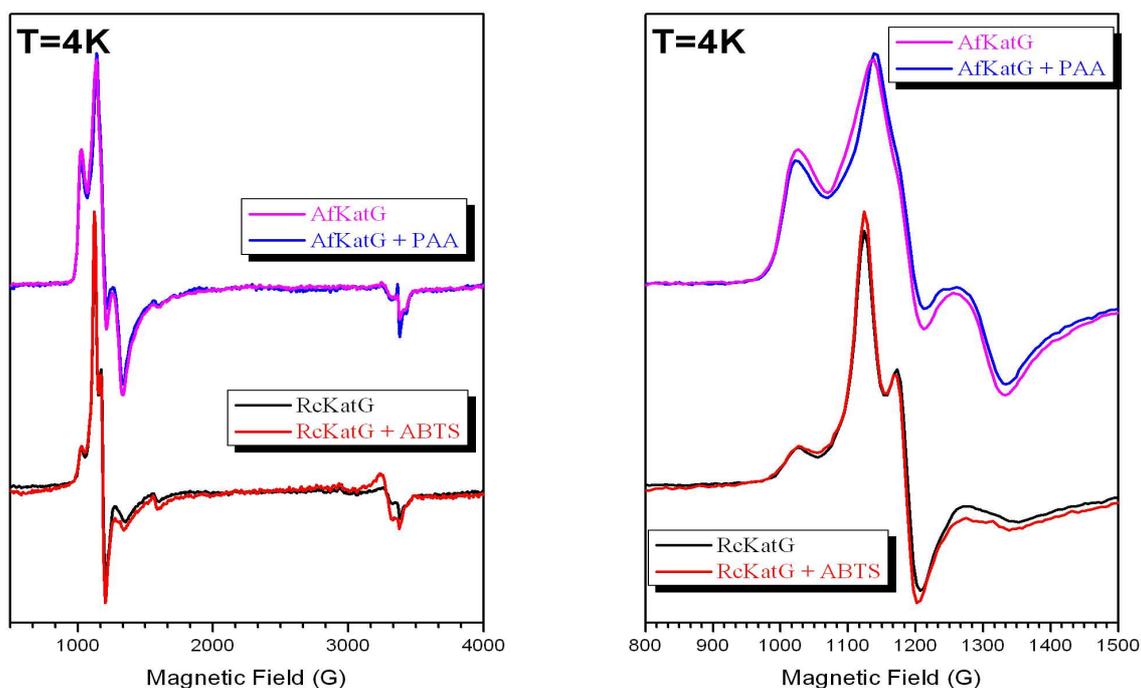


Figure 4- 23 : Spectre 9 GHz des enzymes sous forme ferrique pré-incubés ou non avec l'ABTS. A gauche : Spectre entier ; A droite : agrandissement du signal ferrique.

Pour les deux protéines, l'incubation n'implique aucun changement dans le spectre natif.

Lorsque l'on fait réagir RcKatG avec l'acide peracétique, un signal centré à $g=2$ est observé dans le contrôle mais le rendement de la réaction est faible (18 %). Par contre, quand l'enzyme est pré-incubé avec l'ABTS, après ajout d'acide peracétique un signal étroit centré à $g=2$ très intense (55 fois plus intense que celui détecté dans le contrôle) est observé (figure 4-24 A et C).

Le signal ferrique après réaction avec l'acide peracétique (figure 4-24 B), est le même pour les deux échantillons, avec ou sans ABTS. L'ABTS ne réagit donc pas avec le composé II pour régénérer l'enzyme natif et le cycle catalytique est bloqué au stade du composé II.

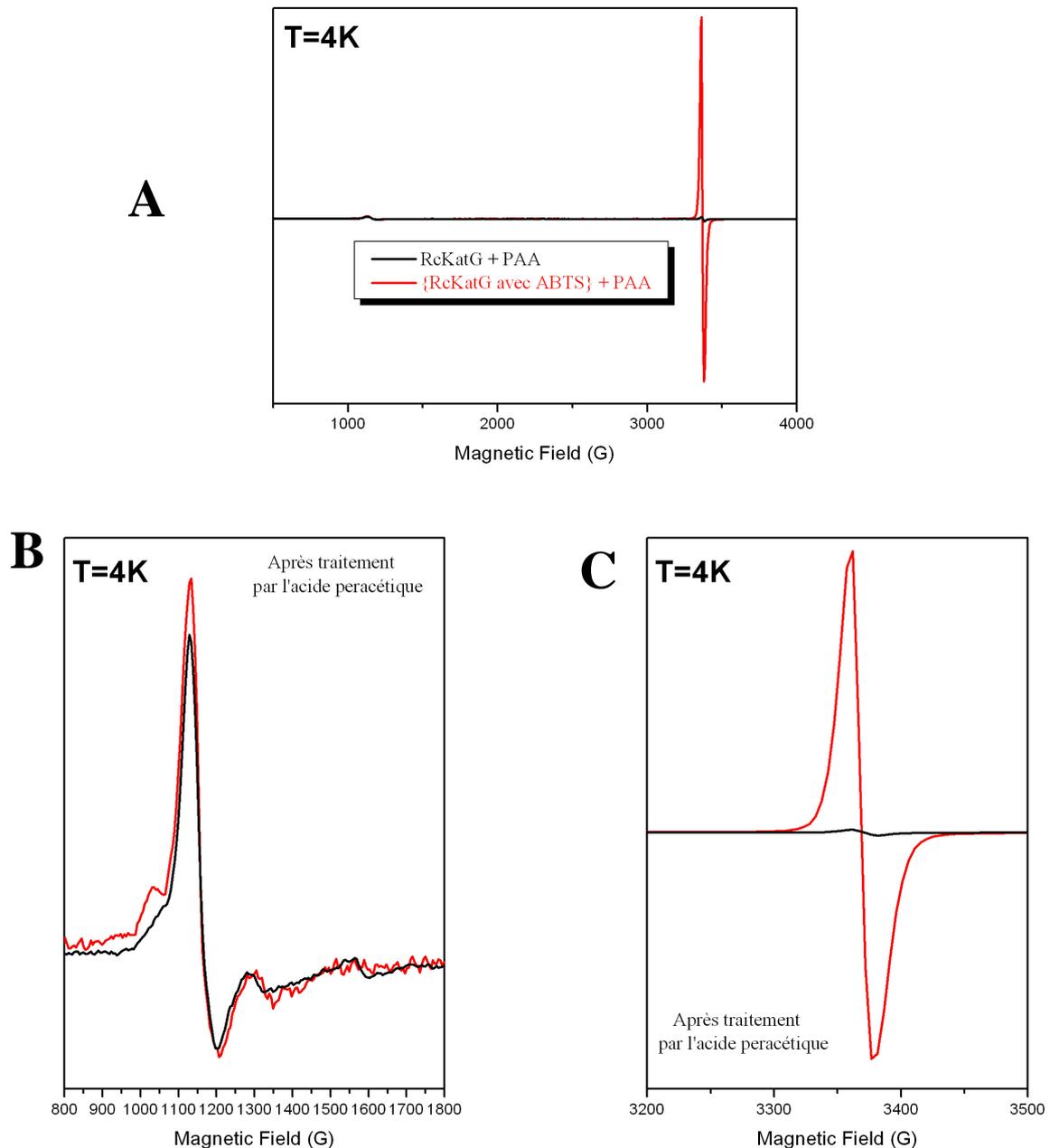


Figure 4- 24 : Spectres RPE à 9 GHz enregistrés à T=4K de RcKatG pré-incubée (**spectres rouges**) ou non (**spectres noirs**) avec l'ABTS 5 fois en excès puis traitée par l'acide peracétique 20 fois en excès. (A) Spectres de 500 G à 4000 G. (B) : Agrandissement du signal ferrique (de 800 à 1800 G). (C) : agrandissement de la région en g=2 (de 3200 à 3500 G). Les spectres en présence d'ABTS ont été enregistrés dans les mêmes conditions ; T=4K ; Puissance des micro-ondes 1mW, Modulation d'amplitude 4 G, Modulation de fréquence 100 kHz et le Gain de $5 \cdot 10^3$. Dans le cas du contrôle, le gain lors de l'accumulation était dix fois plus important ($5 \cdot 10^4$). Sur les figures, les spectres ont été normalisés, d'où la différence de signal sur bruit dans l'agrandissement du signal ferrique.

A 40K, le signal du radical organique en présence d'ABTS (largeur pic à pic 9 G) centré à $g=2$ est différent de celui des radicaux protéiques et notamment de celui observé pour le contrôle (*i.e.* en absence d'ABTS) dont largeur pic à pic est de 22 G. Ce signal peut donc être attribué à un radical ABTS. Il est important de noter ici que les conditions d'enregistrement du spectre à 40K du contrôle sont différentes de celles utilisées pour enregistrer le spectre du radical ABTS, car le rendement en radical avec le contrôle est trop faible pour utiliser les mêmes conditions.

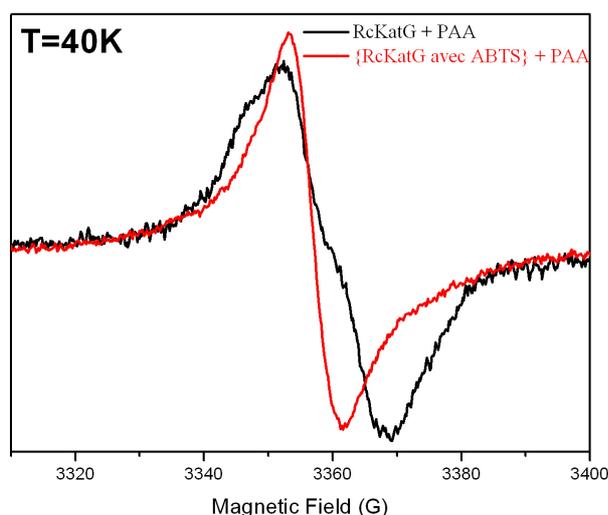


Figure 4- 25 : Spectres RPE normalisés en intensité des radicaux formés par RcKatG en présence (spectre rouge) ou non (spectre noir) d'ABTS. Les conditions d'enregistrement des deux spectres sont différentes : **Spectre Rouge** : T=40K, 1 scan, Gain $1,25 \cdot 10^4$, Puissance des micro-ondes : 0,5 mW, Modulation d'amplitude : 0,5 G, Modulation de fréquence : 100 kHz. **Spectre Noir** : T=40K, 12 scan, Gain $1,25 \cdot 10^6$, Puissance des micro-ondes : 1 mW, Modulation d'amplitude : 1,5 G, Modulation de fréquence : 100 kHz. Les deux spectres ont ensuite été normalisés.

En absence d'ABTS (*i.e.* contrôle), RcKatG forme très peu de radical protéique. Il est donc très peu probable que ces radicaux réagissent avec l'ABTS, puisque la quantité de radical ABTS formée est très importante. Vraisemblablement, l'ABTS réagit avec le radical porphyrinique cationique. Si celui-ci n'est pas détecté en absence d'ABTS c'est sans doute parce qu'il a une durée de vie trop courte.

Pour AfKatG, en absence d'ABTS, après réaction avec l'acide peracétique un signal large de 400 G est détecté et la conversion du signal ferrique est d'environ 60 %, donc bien supérieur à celle de RcKatG. En présence d'ABTS, le signal large est remplacé par un signal étroit et intense (8 fois plus intense que le contrôle) (figure 4-26 A, B et C). En outre, le signal ferrique est 1,7 fois plus intense en présence d'ABTS que dans le cas du contrôle.

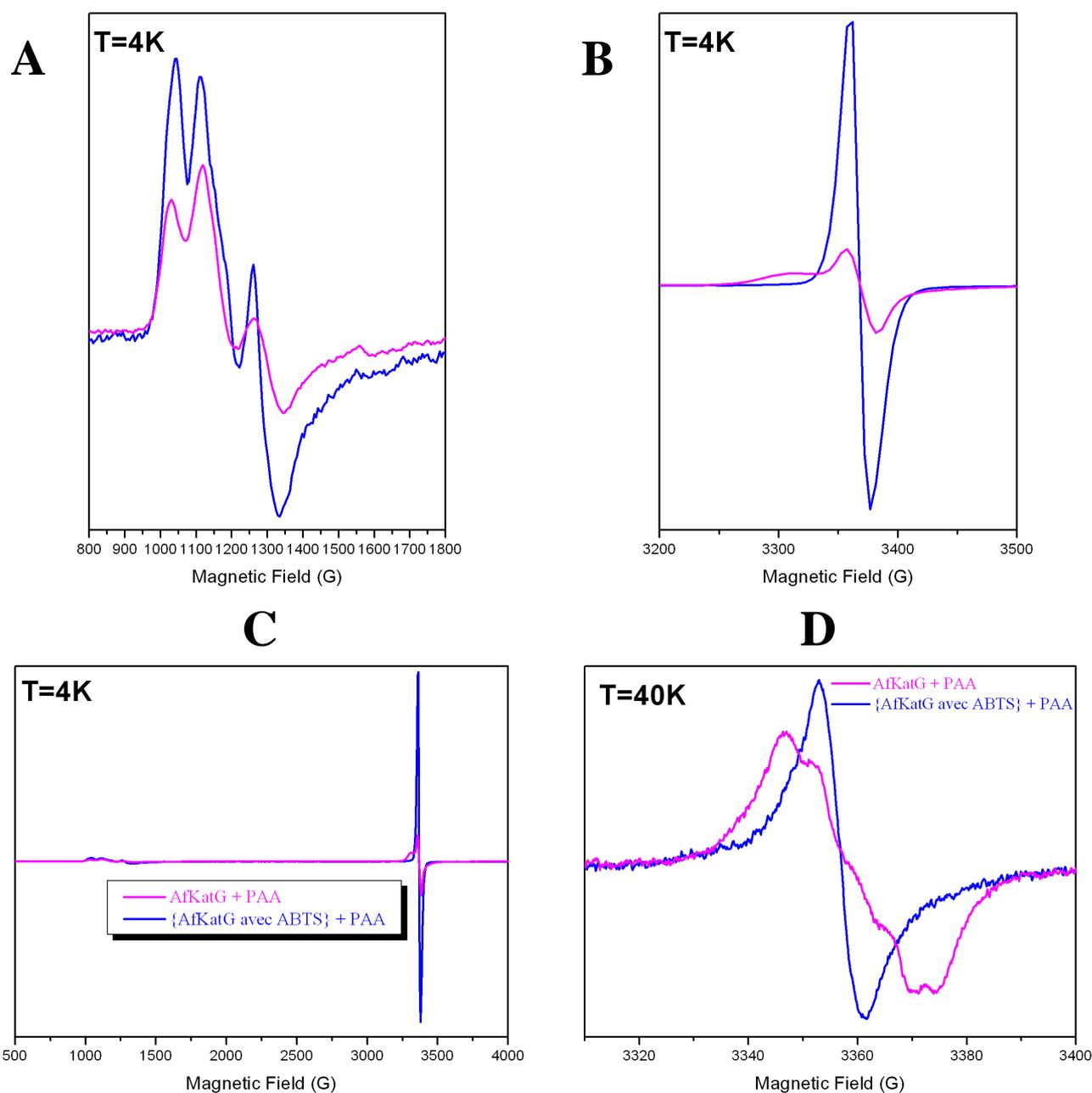


Figure 4- 26 : Spectres RPE à 9 GHz de AfKatG pré-incubée (spectres bleus) ou non (spectres magenta) avec l'ABTS 5 fois en excès puis traitée par l'acide peracétique 20 fois en excès. (C) Spectres de 500 G à 4000 G. (A) : Agrandissement du signal ferrique (de 800 à 1800 G). (B) : Agrandissement de la région en $g=2$ (de 3200 à 3500 G). Les spectres en présence d'ABTS ont été enregistrés dans les mêmes conditions ; T=4K ; Puissance des micro-ondes 1 mW, Modulation d'amplitude 4 G, Modulation de fréquence 100 kHz et le Gain de $5 \cdot 10^3$. Dans le cas du contrôle, le gain lors de l'accumulation était dix fois plus important ($5 \cdot 10^4$). Sur les figures, les spectres ont été normalisés, d'où la différence de signal sur bruit dans l'agrandissement du signal ferrique. (D) Spectres enregistrés à 40K normalisés en intensité. Les conditions d'enregistrement des deux spectres sont différentes : Spectre Bleu : T=40K, 1 scan, Gain $1,25 \cdot 10^4$, Puissance des micro-ondes : 0,5 mW, Modulation d'amplitude : 0,5 G, Modulation de fréquence : 100 kHz. Spectre Magenta : T=40K, 6 scan, Gain $1,25 \cdot 10^6$, Puissance des micro-ondes : 1 mW, Modulation d'amplitude : 1,5 G, Modulation de fréquence : 100kHz. Les deux spectres ont ensuite été normalisés.

Comme pour RcKatG, la forme du signal à 40K en présence d'ABTS est beaucoup plus étroite (9 G) que celle du contrôle. L'ABTS réagirait donc de la même façon qu'avec RcKatG, c'est-à-dire avec le composé I. D'autre part, comme l'intensité du signal ferrique après la réaction avec l'acide peracétique est 1,7 fois plus grande que dans le contrôle, il semble que dans le cas d'AfKatG et contrairement à RcKatG, l'ABTS réagisse avec le composé II.

Les signaux enregistrés à 4K et 40K des radicaux ABTS obtenus avec AfKatG et RcKatG dans les mêmes conditions expérimentales sont comparés dans la figure 4-27.

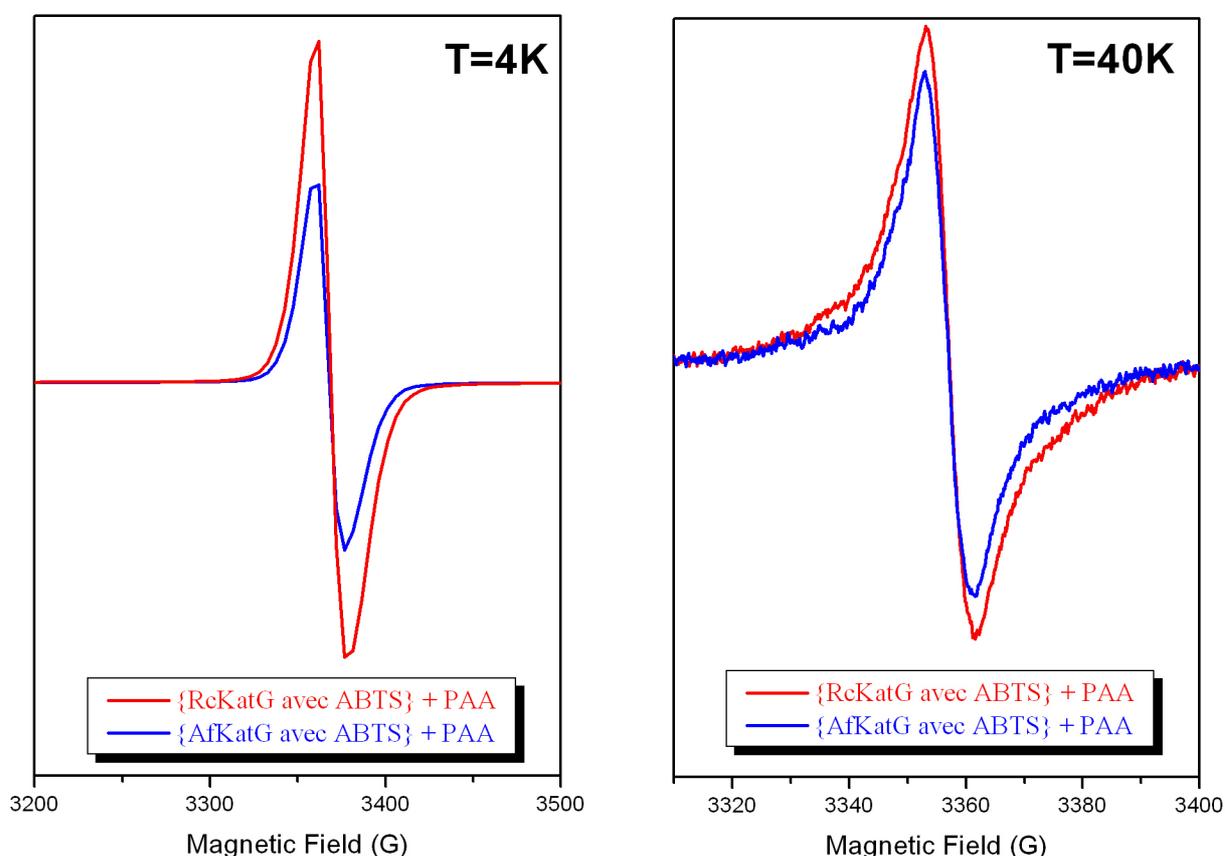


Figure 4- 27 : Spectres des radicaux ABTS obtenus avec AfKatG (bleu) et RcKatG (rouge). A gauche enregistrés à 4K et à droite enregistrés à 40K. Pour chaque température, les conditions d'enregistrement sont les mêmes avec les deux enzymes.

Pour les deux enzymes, la forme du signal est identique aux deux températures. Par contre, les rapports d'intensité sont différents. A 4K, le signal obtenu avec RcKatG est 1,8 fois plus intense que celui obtenu avec AfKatG et ce même rapport est de 1,2 à 40K. Ces différences d'intensités peuvent être expliquées en considérant que ces deux radicaux ont des propriétés de relaxation différentes, qui sont dues à l'influence du métal. Les puissances de

saturation du radical ABTS étant différentes (à 4K $P_{1/2} = 24\mu\text{W}$ avec AfKatG et $P_{1/2} = 98\mu\text{W}$ avec RcKatG), l'intensité plus faible du radical ABTS d'AfKatG pourrait avoir son origine dans des effets de saturation. Un modèle envisageable est que le site de fixation de l'ABTS, serait plus proche de l'hème dans le cas de RcKatG. Il est intéressant de noter, que l'activité spécifique de RcKatG vis-à-vis de l'ABTS est environ deux fois plus élevée que celle d'AfKatG (respectivement de $3,0 \pm 0,02 \text{ mM ABTS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M hème}^{-1}$ et $1,7 \pm 0,02 \text{ mM ABTS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M hème}^{-1}$). La fixation du substrat sur un site plus éloigné pourrait impliquer un transfert d'électron ralenti pour l'oxydation de l'ABTS par le composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ et expliquer la plus faible activité d'AfKatG.

II.4-2 Réaction avec l'INH.

Les résultats obtenus en spectroscopie RPE à 9 GHz avec l'INH sont représentés sur la figure 4-28. Sur la figure A sont représentés les spectres RPE à 4K du signal ferrique de RcKatG et AfKatG avant et après incubation avec l'INH. Contrairement à BpKatG, en absence d'oxydant les signaux ferriques ne sont pas modifiés par la présence de l'INH. Une interprétation est que le site de fixation de l'INH dans AfKatG et RcKatG n'est pas identique à celui de BpKatG. Dans AfKatG et RcKatG, ce site de fixation ne doit pas interférer dans le réseau de liaisons hydrogène de la partie distale. Ni les structures de RcKatG et d'AfKatG, ni celle d'un complexe KatG-INH ne sont actuellement disponibles. Nous ne sommes donc pas en mesure de localiser le site de fixation de l'INH dans ces enzymes.

Après ajout de l'oxydant et pour les deux enzymes (figure 4-28 B et C), il apparaît nettement que la présence d'INH implique une diminution drastique de l'intensité du signal des radicaux protéiques. Pour RcKatG, aucun signal correspondant à un radical organique n'est détecté. En l'occurrence, contrairement à l'ABTS, le produit de l'oxydation de l'INH n'est pas détecté. L'enzyme n'est toutefois pas inactive vis-à-vis de l'INH car la conversion du signal ferrique est légèrement supérieure à celle du contrôle. Comme aucun radical n'est détecté deux hypothèses sont possibles : INH réagit avec le radical porphyrinique cationique et empêche le transfert d'électron entre la tyrosine et la porphyrine d'avoir lieu ou INH réagit avec le radical tyrosyle.

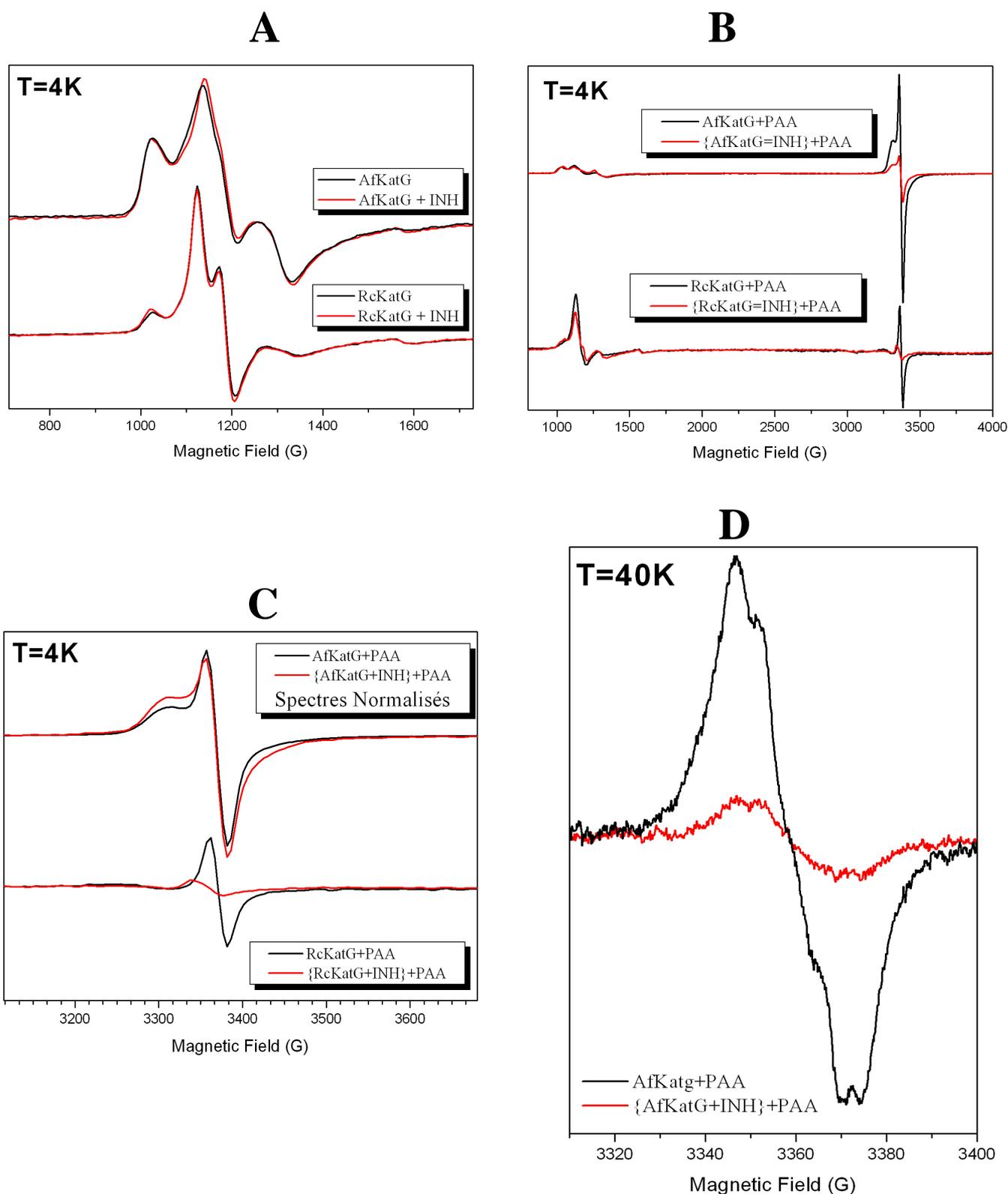


Figure 4- 28 : Effet de l'INH sur la formation des radicaux protéiques chez AfKatG et RcKatG. (A) Influence de la fixation de l'INH sur le signal ferrique enregistrée à T=4K et 9 GHz. (B) Influence sur la formation des radicaux protéiques. (C) : Agrandissement du signal des radicaux protéiques, les spectres pour AfKatG étant normalisés. (D) Influence sur la formation des radicaux protéiques enregistrée à T=40K et 9 GHz. Les conditions d'enregistrement : pour (A) et (B) elles correspondent à celles de Figure 4-13 A et pour (C) à celles de figure 4-12 D. L'INH est utilisé deux fois en excès et l'acide peracétique est utilisé 20 fois en excès (les excès sont toujours calculés par rapport à l'hème). Le temps de réaction est de 2s et la température de réaction 0°C.

Pour AfKatG, en présence d'INH, l'intensité du signal des intermédiaires protéiques est divisée par 3,5 par rapport à celle du contrôle à 4K. Si on réalise cette même comparaison avec les spectres enregistrés à 40K (figure 4-28 D), le signal du contrôle est divisé par 7. Tout comme nous l'avons démontré pour BpKatG, il semble que le composé $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$ ne réagisse pas avec l'INH et donc ce dernier réagirait avec l'un ou les deux radicaux isolés.

Dans le cas de MtKatG, le signal de $[\text{Fe(IV)=O Trp}_{321}^{\bullet+}]$ est deux fois plus intense lorsque l'enzyme est pré-incubé avec l'INH, avant la réaction avec l'acide peracétique³⁷. Or ce phénomène n'est pas observé avec AfKatG et RcKatG. En considérant que le site de fixation est différent dans MtKatG, dans AfKatG et RcKatG, il est possible que l'espèce réactive par rapport à l'INH avec les deux dernières KatGs soit le $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, comme dans le cas de la HRP.

CONCLUSIONS

Les sept catalase-peroxydases étudiées au cours de ce travail de thèse possèdent une similarité dans leurs séquences allant de 50 à 70 %. Les quatre structures cristallographiques disponibles^{7,11,6,8} révèlent un haut degré de similitude, en particulier dans l'environnement de l'hème. Les résidus du site actif sont conservés, et les superpositions des structures montrent un parfait alignement. Seules quelques différences structurales dans l'arrangement en tridimensionnel de la chaîne polypeptidique sont observées. En particulier, la modification covalente entre les résidus Trp111-Tyr238-Met264 de la partie distale (numérotation de BpKatG), qui est conservée parmi toutes les catalase-peroxydases étudiées, joue un rôle essentiel dans la modulation de l'activité catalase de ces hémoprotéines^{21,22}. Malgré ces apparentes similarités structurales, cette étude démontre qu'il existe des différences au niveau des intermédiaires catalytiques formés au sein des catalase-peroxydases. Notre étude par spectroscopie RPE montre que trois sous-groupes de KatGs peuvent être distingués selon les espèces radicalaires formées par réaction avec l'acide peracétique:

- BpKatG, MtKatG, AfKatG et EcKatG forment trois espèces radicalaires alternatives, dont une se forme sur un tryptophane proche de l'atome de fer. Pour BpKatG et MtKatG, le radical se forme sur le tryptophane proximal. Les deux autres radicaux se forment sur un autre tryptophane et une tyrosine.

- BsKatG et SyKatG forment un radical tryptophanyle, situé sur le Trp106 chez SyKatG, et un radical tyrosyle.

- RcKatG forme une seule espèce alternative et ce sur une tyrosine.

Dans tous les cas, à l'exception de SyKatG, l'espèce $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O} \text{Por}^{\bullet+}]$ n'est pas détectée à l'échelle de la seconde, c'est-à-dire à l'échelle de temps utilisée pour nos expériences RPE. Nous pouvons donc supposé que cet intermédiaire est de courte durée de vie. Cependant des preuves de sa formation ont été obtenues avec nos expériences de stopped flow avec MtKatG et BpKatG. Une preuve indirecte de sa formation dans RcKatG est fournie par les expériences en présence d'ABTS.

Nous avons également pu démontrer que le site de formation du radical tryptophanyle isolé (sans interaction magnétique avec le fer) n'est pas localisé sur le même résidu dans BpKatG et SyKatG. Ces différences au niveau des intermédiaires formés pourraient expliquer les différences observées dans la réactivité des catalase-peroxydases, notamment avec les deux substrats que nous avons testés ainsi que celles observées dans l'efficacité des réactions d'oxydation.

Bien que le substrat *in vivo* des catalase-peroxydases soit toujours inconnu, nous avons utilisés l'ABTS dans nos tests *in vitro*. D'après les spectres RPE, la fixation de l'ABTS n'induit pas de changement dans la géométrie du site actif. D'après nos résultats de spectroscopie RPE, il est possible que les sites de fixation de l'ABTS soient différents pour chaque catalase-peroxydase.

D'après notre étude, l'ABTS réagirait avec l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$. Si l'ABTS se fixe à la surface de la protéine, cela signifierait qu'il existe donc un chemin de transfert d'électron entre l'ABTS et l'hème. Cependant dans le cas des catalase-peroxydases, il est possible que les radicaux protéiques observés participent à cette chaîne de transfert d'électron, mais que la présence de l'ABTS accélérerait ce transfert, d'où l'absence de signal en RPE. On peut également envisager que le transfert d'électron utiliserait un chemin différent et que la réaction entre l'ABTS et les catalase-peroxydases devienne prioritaire par rapport aux transferts d'électron intramoléculaires lorsqu'il est présent.

Dans le cas de l'INH, il a été démontré que l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$ n'est pas une espèce impliquée dans la réaction avec la prodrogue. Nous avons donc conclu que ce dernier devait réagir avec l'un des résidus isolés ou avec le composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$. Cependant, les résultats de notre groupe³⁷ avec MtKatG étayent l'idée que le radical tryptophanyle serait nécessaire à l'activité. Toutefois, on ne peut pas déduire de nos expériences si la formation du radical tryptophanyle précède celle du radical tyrosyle, puisque ces deux espèces contribuent simultanément au spectre RPE obtenu par mélange manuel. Le fait que l'activation de l'INH ne soit pas réalisée *via* l'hème indique que le site de fixation de l'INH n'est pas le même que celui des substrats aromatiques chez les peroxydases, telle que la peroxydase de raifort⁴⁸. Toutefois, Metcalfe et coll.⁴⁹ ont publié récemment les structures de la CcP et l'APX co-cristallisées avec l'INH. Il apparaît que dans ces deux protéines l'INH se fixe près de l'hème.

La localisation du site de fixation de l'INH dans les catalase-peroxydases est encore actuellement en débat. La structure de BpKatG présente une densité électronique non identifiée juste avant le rétrécissement du canal d'accès, à 10 Å de l'hème et à proximité de la Ser324 (figure 4-29 A). La même densité électronique a été observée chez MtKatG par Bertrand et coll.⁸ mais ceux-ci ont argumenté que cette région est trop petite pour permettre la fixation d'une molécule de type pyridine et suggèrent qu'une molécule de solvant est localisée à cet emplacement. Selon, Bertrand et coll. le site de fixation des composés aromatiques est localisé près de l'hème, comme c'est le cas chez les peroxydases monofonctionnelles (figure 4-29 B).

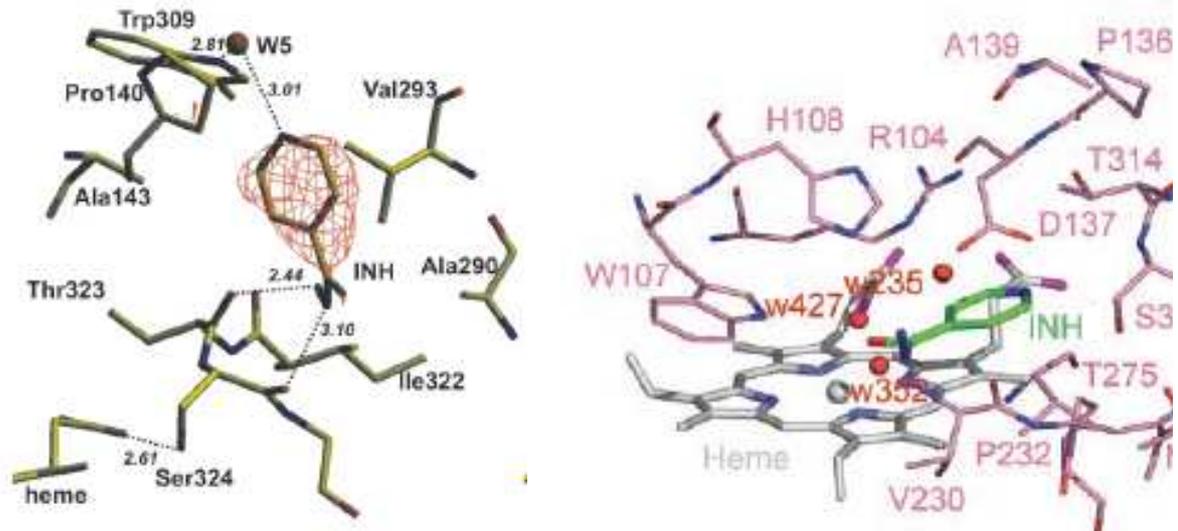


Figure 4- 29 : Site de fixation de l'INH (A) proposé par Carpena et coll⁶ d'après la structure de BpKatG (résolution de 1,7 Å). (B) Site proposé par Bertrand et coll.⁸ d'après la structure de MtKatG (résolution de 2,4 Å).

Le site actif des catalase-peroxydases est plus encombré que celui des peroxydases notamment par la présence de la boucle LL1 (voir introduction). De plus, la présence du réseau de liaisons hydrogène dans la partie distale du site actif des catalase-peroxydases serait modifiée par la fixation de l'INH près de l'hème, ce qui se traduirait par des changements significatifs sur le spectre RPE de la partie ferrique en présence d'INH, tels que ceux observés chez les mutants des résidus de la partie distale. Or nous avons vu que ce n'était pas le cas ni chez BpKatG, ni chez RcKatG ni chez AfKatG.

L'identification du site de formation du radical tryptophanyle et du radical tyrosyle serait d'une aide précieuse pour déterminer le site de fixation de l'INH dans les catalase-peroxydases ainsi que le mécanisme de réaction, qui est encore mal compris à ce jour.

Comme nous l'avons démontré pour BpKatG, le mécanisme de la réaction de type catalase n'est pas identique à celui des catalases à hème monofonctionnelles, tandis que celui de la réaction type peroxydase n'est pas celui des peroxydases monofonctionnelles.

Bien que les sites de formation des radicaux isolés ne soient pas encore déterminés au sein des catalase-peroxydases, une conclusion importante se dégage de nos résultats : les radicaux protéiques formés par transfert d'électron intramoléculaire dans les catalase-peroxydases ne sont pas issus de réactions parasites mais ils constituent des sites alternatifs d'oxydation des substrats. Ces sites de formation de radicaux protéiques sont d'autant plus importants qu'ils sont uniques. Dans le cas de SyKatG¹⁵, le radical tryptophanyle se forme uniquement sur le Trp106.

Tout comme dans le cas des peroxydases monofonctionnelles, il apparaît que les catalase-peroxydases présentent une diversité au niveau des intermédiaires radicalaires formés tant dans leur nature que dans leur localisation. Les signaux ferriques des enzymes natifs sont différents et présentent des dépendances en pH différentes, ce qui indique que l'environnement de l'hème n'est pas exactement identique parmi les catalase-peroxydases. Ces subtils changements peuvent être associés à des spécificités de substrats. Comme nous l'avons démontré, MtKatG réagit de façon très efficace avec l'INH ce qui n'est pas le cas pour les autres catalase-peroxydases, pour lesquelles on observe toujours une compétition entre la réaction d'oxydation de l'INH et le transfert d'électron intramoléculaire. Ces protéines semblent donc s'être adaptées et spécialisées en fonction de leur niche environnementale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. Y. Zhang, B. Heym, B. Allen, D. Young, and S. Cole, The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nature*, **1992**, 358, 591-593.
2. A. Claiborne, and I. Fridovich, Purification of the o-dianistidine peroxidase from *Escherichia coli*. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalatic and peroxidatic activities, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 4245-4252.
3. B. L. Triggs-Raine, B. W. Doble, M. R. Mulvey, P. A. Sorby, and P. C. Loewen, Nucleotide sequence of katG, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **1988**, 170, 4415-4419.
4. Y. Yamada, S. Sato, N. Igarashi, H. Usui, T. Fujiwara, and N. Tanaka, Crystallization and preliminary X-ray analysis of catalase-peroxydase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.*, **2001**, 57, 1157-1158.
5. X. Carpena, J. Switala, S. Loprasert, S. Mongkolsuk, I. Fita, and P. C. Loewen, Crystallization and preliminary X-Ray analysis of the catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei*, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.*, **2002**, 58, 2184-2186.
6. X. Carpena, S. Loprasert, S. Mongkolsuk, J. Switala, P. C. Loewen, and I. Fita, Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7Å° resolution., *J. Mol. Biol.*, **2003**, 327, 475-489.
7. Y. Yamada, T. Fujiwara, S. Sato, N. Igarashi, and N. Tanaka, The 2Å° crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*, *Nature Struc. Biol.*, **2002**, 9, 691-695.
8. T. Bertrand, N. A. J. Eady, J. N. Jones, N. J. M. Jesmin, B. Jamart-Gregoire, E. L. Raven, and K. A. Brown, Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 38991-38999.
9. X. Carpena, W. Melik-Adamyan, P. C. Loewen, and I. Fita, Structure of the C-terminal domain of the catalase-peroxidase KatG from *Escherichia coli*, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.*, **2004**, 60, 1824-1832.
10. K. G. Welinder, Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily, *Biochem. Biophys. Acta*, **1991**, 1080, 215-220.
11. K. Wada, T. Tada, Y. Nakamura, T. Kinoshita, M. Tamoi, S. Shigeoka, and K. Nishimura, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of catalase-peroxidase from *Synechococcus* PCC7942, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.*, **2002**, 58, 157-159.
12. B. C. Finzel, T. L. Poulos, and J. Kraut, Crystal structure of yeast cytochrome *c* peroxidase refined at 1.7-Å resolution., *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 13027-13036.
13. W. R. Patterson, T. L. Poulos, and D. B. Goodin, Identification of a Porphyrin π -Cation Radical in Ascorbate Peroxidase Compound I, *Biochemistry*, **1995**, 34, 4342-4345.
14. A. Ivancich, C. Jakopitsch, M. Auer, S. Un, and C. Obinger, Protein-Based Radicals in the Catalase-Peroxidase of *Synechocystis* PCC6803: A Multifrequency EPR Investigation of Wild-Type and Variants on the Environment of the Heme Active Site, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14093-14102.
15. C. Jakopitsch, C. Obinger, S. Un, and A. Ivancich, Identification of Trp106 as the Tryptophanyl Radical Intermediate in *Synechocystis* PCCC6803 Catalase-Peroxidase by Multifrequency EPR Spectroscopy, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 1091-1099.
16. M. Zamocky, G. Regelsberger, C. Jakopitsch, and C. Obinger, The molecular peculiarities of catalase-peroxidases, *FEBS lett.*, **2001**, 492, 177-182.

17. C. Ostenmeier, A. Harrenga, U. Ermler, and H. Michel, Structure at 2,7Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody FV fragment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**, *94*, 10547-10553.
18. S. Yoshikawa, Beef heart cytochrome *c* oxidase, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1997**, *7*, 574-579.
19. G. Buse, T. Soulimane, M. Dewor, H. E. Meyer, and M. Bluggel, Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome *c* oxidase, *Protein Sci.*, **1999**, *8*, 985-990.
20. N. Ito, S. E. Phillips, K. D. Yadav, and P. F. Knowles, Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase, *J. Mol. Biol.*, **1994**, *238*, 794-814.
21. L. J. Donald, O. V. Krokhin, H. W. Duckworth, B. Wiseman, T. Deemagran, R. Singh, J. Switala, X. Carpena, I. Fita, and P. C. Loewen, Characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* by mass spectrometry., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 35687-35692.
22. C. Jakopitsch, M. Auer, A. Ivancich, F. Ruker, P. G. Furtmuller, and C. Obinger, Total conversion of bifunctional catalase-peroxidase (KatG) to monofunctional peroxidase by exchange of a conserved distal side tyrosine., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 20185-20191.
23. R. A. Ghiladi, K. F. Medzihradzky, and P. R. Ortiz de Montellano, Role of the Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG as revealed by KatG(M255I). *Biochemistry*, **2005**, *44*, 15093-13442.
24. R. A. Ghiladi, G. M. Knudsen, K. F. Medzihradzky, and P. R. Ortiz de Montellano, The Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG): autocatalytic formation and the effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties., *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 22651-22663.
25. E. Santoni, C. Jakopitsch, C. Obinger, and G. Smulevich, Manipulating the covalent link between distal side tryptophan, tyrosine, and methionine in catalase-peroxidase: an electronic absorption and resonance Raman study, *Biopolymers*, **2004**, *74*, 46-50.
26. X. Carpena, B. Wiseman, T. Deemagran, R. Singh, J. Switala, A. Ivancich, I. Fita, and P. C. Loewen, A molecular switch and electronic circuit modulate catalase activity in catalase-peroxidase, *EMBO Rep.*, **2005**, *6*, 1156-1162.
27. X. Carpena, B. Wiseman, T. Deemagran, B. Herguedas, A. Ivancich, R. Singh, P. C. Loewen, and I. Fita, Roles for Arg426 and Trp111 in the modulation of NADH oxidase activity of catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* inferred from pH induced structural changes., *Biochemistry*, **2006**, *45*, 5171-5179.
28. T. Deemagran, X. Carpena, R. Singh, B. Wiseman, I. Fita, and P. C. Loewen, Structural characterization of the Ser324Thr Variant of the Catalase-peroxidase (KatG) from *Burkholderia pseudomallei*., *J. Mol. Biol.*, **2005**, *2005*, 21-28.
29. R. Singh, B. Wiseman, T. Deemagran, L. J. Donald, H. W. Duckworth, X. Carpena, I. Fita, and P. C. Loewen, Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 43098-43106.
30. F. Miller, M. A. Miller, L. Geren, and B. Durham, Electron transfer between cytochrome *c* and cytochrome *c* peroxidase, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **1995**, *27*, 341-351.
31. A. T. Smith, and N. C. Veith, Substrate binding and catalysis in heme peroxidases, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, 269-278.
32. A. Ivancich, H.-M. Jouve, B. Sartor, and J. Gaillard, EPR investigation of Compound I in *Proteus mirabilis* and Bovine liver catalase: Formation of Porphyrin and Tyrosyl Radical Intermediates, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 9356-9364.
33. A. Ivancich, G. Mazza, and A. Desbois, Comparative Electron Paramagnetic Resonance Study of Radical Intermediates in Turnip Peroxidase Isozymes, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 6860-6866.

34. A. Ivancich, P. Dorlet, D. B. Goodin, and S. Un, Multifrequency High-Field EPR Study of the Tryptophanyl and Tyrosyl Radical Intermediates in Wild-Type and the W191G Mutant of Cytochrome *c* Peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5050-5058.
35. A. Hillar, B. Peter, R. Pauls, A. Loboda, H. Zhang, A. G. Mauk, and P. C. Loewen, Modulation of the activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 5868-5875.
36. S. Chouchane, S. Giroto, S. Yu, and R. S. Magliozzo, Identification and characterization of Tyrosyl radical formation in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG), *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 42633-42638.
37. R. Singh, J. Switala, P. C. Loewen, and A. Ivancich, Two [Fe(IV)=O Trp^o] intermediates in *M. tuberculosis* catalase-peroxidase discriminated by multifrequency (9-285-GHz) EPR spectroscopy: reactivity towards isoniazid, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, Sous presse.
38. X. Zhao, H. Yu, S. Yu, F. Wang, J. C. Sacchettini, and R. S. Magliozzo, Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 4131-4140.
39. L. A. Fishel, F. M. Farnum, J. M. Mauro, M. A. Miller, and J. Kraut, Compound I radical in site-directed mutants of Cytochrome *c* Peroxidase as probed by Electron Paramagnetic Resonance and Electron-Nuclear Double Resonance, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 1986-1996.
40. D. B. Goodin, and D. E. McRee, The Asp-His-Fe triad of cytochrome *c* peroxidase controls the reduction potential, electronic structure and coupling of the tryptophan free radical to the heme, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 3313-3324.
41. C. Tommos, X.-S. Tang, K. Wamcke, C. W. Hoganson, S. Styring, J. McCracjen, B. A. Diner, and G. T. Babcock, Spin-density Distribution, Conformation, and Hydrogen Bonding of the Redox-Active Tyrosine Yz in Photosystem II from Multiple Electron Magnetic-Resonance Spectroscopies: Implication for Photosynthetic Oxygen Evolution, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 10325-10335.
42. B. A. Barry, and G. T. Babcock, Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen evolving system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987**, *84*, 7099-70103.
43. W. Blodig, A. T. Smith, K. Winterhalter, and K. Pionetek, Evidence from spin-trapping for a transient radical on tryptophan residue 171 of lignin peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, *370*, 86-92.
44. M. D. S. Gelpke, J. Lee, and M. H. Gold, Lignin peroxidase oxidation of veratryl alcohol: effects of the mutants H82A, Q222A, W171A and F267L, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3498-3506.
45. C. Jakopitsch, A. Ivancich, F. Schmuckenschlager, A. Wanasinghe, G. Poltl, P. G. Furtmuller, F. Ruker, and C. Obinger, Influence of the Unusual Covalent Adduct on the Kinetics and formation of Radical Intermediates in Synechocystis Catalase Peroxidase: a stopped-flow and EPR Characterization of the Met275 Tyr249 and Arg439 Variants, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 46082-46095.
46. S. L. Scott, W.-J. Chen, A. Bakac, and J. H. Espenson, Spectroscopic Parameters, Electrode Potentials, Acid Ionization Constants, and Electron Exchange Rates of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) Radicals and Ions., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *97*, 6710-6714.
47. C. Jakopitsch, J. Vlasits, B. Wiseman, P. C. Loewen, and C. Obinger, Redox Intermediates in the Catalase Cycle of Catalase-Peroxydases from *Synechocystis* PCC 6803, *Burkholderia pseudomallei*, and *Mycobacterium tuberculosis*., *Biochemistry*, **2007**, *46*, 1183-1193.
48. R. Pierattelli, L. Banci, N. A. J. Eady, J. Bodiguel, J. N. Jones, P. C. E. Moody, E. L. Raven, B. Jamart-Gregoire, and K. A. Brown, Enzyme-catalyzed Mechanism of Isoniazid Activation in Class I and Class III peroxidases., *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 39000-39009.
49. C. L. Metcalfe, I. K. MacDonald, E. J. Murphy, K. A. Brown, E. L. Raven, and P. C. E. Moody, The tuberculosis pro-drug isoniazid bound to activating peroxidases, *J. Biol. Chem.*, **2007**, Sous presse.

CHAPITRE 5

VERS LA COMPREHENSION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DETERMINANT LA STABILISATION DES INTERMEDIAIRES TRYPTOPHANYLES ET TYROSYLES

INTRODUCTION

Comme nous l'avons démontré dans ce travail, la formation de radicaux tyrosyles ou/et tryptophanyles, issus du transfert d'électron intramoléculaire vers l'hème, apparaît comme une caractéristique commune de certaines catalases (chapitre III) et catalase-peroxydases ou peroxydases bifonctionnelles (chapitre IV). Ces résultats permettent de généraliser les cas déjà connus de la cytochrome *c* peroxydase, de la peroxydase de lignine ou de la Prostaglandine H Synthase^{1,2,3,4,5,6}. Dans ce chapitre notre objectif est de comprendre les propriétés physico-chimiques permettant et favorisant la formation des radicaux protéiques en tant qu'intermédiaires alternatifs à l'intermédiaire typique des hémoprotéines, le composé $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$. Parmi les différentes stratégies possibles, telles que l'utilisation de systèmes modèles comme la microperoxydase ou l'ingénierie des sites de formation des radicaux protéiques, nous avons choisi d'étudier une peroxydase de raifort reconstituée dans laquelle l'hème, avant d'être remplacé dans la protéine, a été modifié par liaison covalente avec un résidu tyrosine ou tryptophane. La peroxydase ainsi reconstituée a été étudiée par spectroscopie RPE et par spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible, afin de détecter d'éventuels radicaux tyrosyles ou tryptophanyles.

Dans la première partie de ce chapitre, nous rappellerons les propriétés de la peroxydase de raifort. Puis dans une deuxième partie, nous présenterons les résultats obtenus avec la peroxydase reconstituée.

A. LA PEROXYDASE DE RAIFORT.

La peroxydase de raifort (HRP) est une hémoprotéine qui utilise le peroxyde d'hydrogène pour oxyder une grande variété de substrats. Les racines de plantes contiennent plusieurs isoformes de peroxydases (30 dans le cas de *Armorique rusticage*) et l'isoforme C est le plus abondant dans celle du raifort. La production de l'enzyme recombinant⁷ a permis des avancées majeures dans la compréhension de la structure et de la fonction de la HRP. En 1997, la structure cristallographique de la HRP C a été obtenue⁸ (figure 5-1) et plus récemment, les structures à haute résolution des intermédiaires catalytiques⁹. Plusieurs rôles physiologiques ont été attribués à la peroxydase de raifort, notamment le métabolisme de l'acide indole 3-acétique et la lignification.

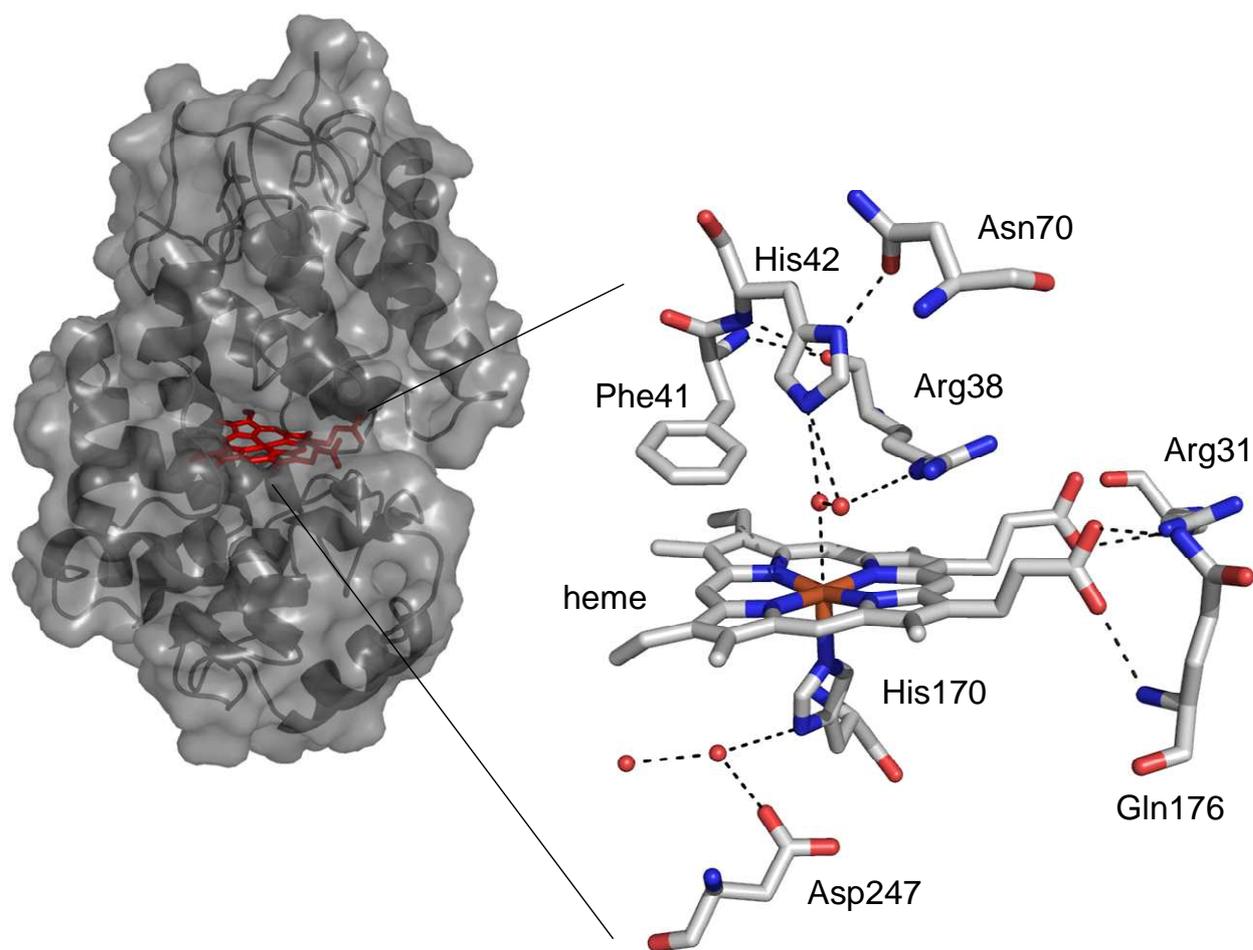


Figure 5- 1 : Structure tridimensionnelle de l'isoforme C de la peroxydase de raifort à gauche. L'hème est représenté en rouge, il est localisé entre les parties distale et proximale, chacune contenant un atome de calcium. A droite est représenté l'environnement de l'hème. D'après Gajhede 1997⁸. Numéro PDB : 1ATJ

I. GENERALITES ET STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

L'isoforme C de la peroxydase de raifort est constitué d'une chaîne polypeptidique de 308 résidus, dont la séquence a été déterminée par Linder en 1976¹⁰. Le site actif est constitué d'un hème (protoporphyrine IX à Fe(III)) et deux atomes de calcium, l'un nécessaire pour l'activité enzymatique, l'autre pour maintenir l'intégrité structurale⁷. Le ligand axial de l'hème est l'histidine 170 tandis que la sixième position de coordination est vacante dans l'enzyme natif et reste disponible pour le peroxyde d'hydrogène pendant la catalyse. Le monoxyde de carbone, le cyanure, le fluorure et l'azoture (N_3^-), peuvent se lier à l'atome de fer dans cette position distale, formant ainsi des complexes hexacoordinés.

Les deux sites de fixation des atomes de calcium sont localisés du côté distal et proximal par rapport au plan de l'hème et restent en contact avec la région héminique par un réseau de liaisons hydrogène. Sept ligands entourent chaque atome de calcium : des carboxylates (Asp), des groupes hydroxyles (Ser, Thr), le squelette carboné et une molécule d'eau structurale (dans le site distal uniquement). La perte d'un atome de calcium se traduit par une diminution de l'activité enzymatique, par une diminution de la stabilité thermique¹¹ mais également par de faibles réarrangements dans l'environnement de l'hème, qui peuvent être détectés par spectroscopie RPE¹².

L'enzyme est essentiellement constitué d'hélices α . La partie proximale et la partie distale de la protéine forment deux domaines distincts. Ces deux domaines sont probablement le résultat d'une duplication de gène. Cette proposition est étayée, notamment par la présence des sites de fixation du calcium. En tant que peroxydase de classe III de la superfamille des peroxydases¹³, la HRP contient trois hélices α supplémentaires par rapport aux autres peroxydases. Une de ces hélices fait partie du canal d'accès à l'hème. Selon certains auteurs cette insertion explique la stabilité des espèces radicalaires produites au cours de son cycle catalytique⁸.

II. MECANISME CATALYTIQUE

Les réactions catalysées par la HRP, peuvent être résumées par l'équation suivante :



AH₂ représente le substrat et AH[•] son radical.

Les substrats les plus courants sont des phénols aromatiques, des acides phénoliques, l'indole et ses dérivés, des amines et des sulfonates.

La HRP catalyse le couplage oxydant de composés phénoliques en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme oxydant. La réaction est divisée en trois étapes principales.

- Premièrement, l'enzyme est oxydée par le peroxyde d'hydrogène (oxydation à deux électrons)
- Par deux réactions successives de réduction à un électron par deux molécules de substrat, l'enzyme est régénéré dans son état initial.
- Les radicaux issus de la réaction avec la HRP peuvent dimériser, notamment si le substrat est un dérivé phénolique. Le produit final dépend de la nature chimique du radical formé, de l'environnement et de l'isoforme utilisé¹⁴.

La formation de produits radicalaires par la HRP donne des indications sur la fonction *in vivo* de la protéine. La HRP pourrait, ainsi, être impliquée dans la polymérisation des précurseurs de la lignine.

La réaction catalytique de la peroxydase de raifort, et en particulier de l'isoforme C, a été largement étudié^{15,16}. Les principales étapes de ce cycle catalytique sont représentées sur le schéma 5-1.

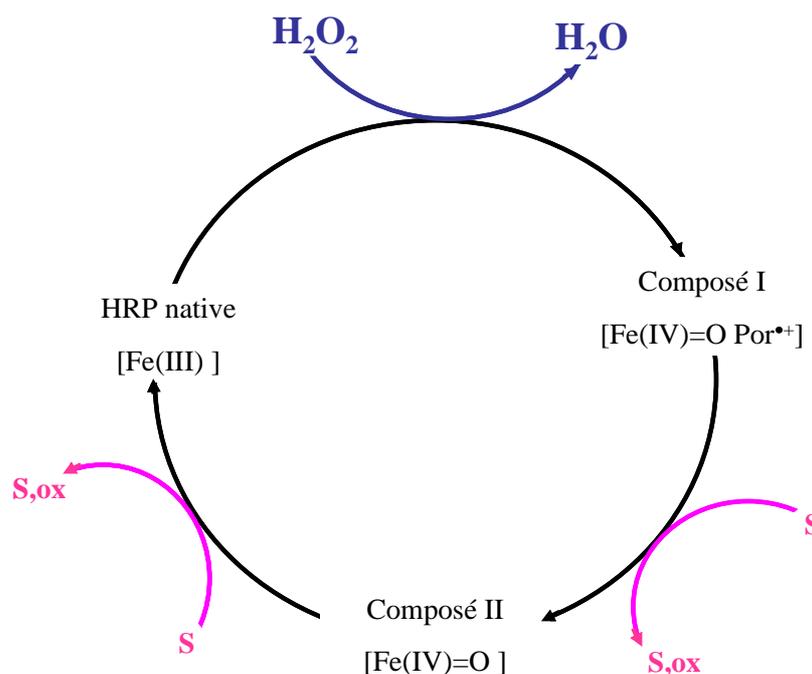


Schéma 5- 1 : Cycle catalytique de la peroxydase de raifort. S représente le substrat.

La première étape du cycle catalytique est la réaction entre le Fe(III) de l'enzyme natif et le peroxyde d'hydrogène pour former le composé I, $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, qui est un oxydant très puissant. La réduction à un électron de cette espèce nécessite la participation d'un substrat et conduit à la formation du composé II, une autre espèce oxoferryle $[\text{Fe(IV)=O}]$. Le composé II est encore une espèce très oxydante. Il peut donc réagir avec une autre molécule de substrat, à nouveau par réduction à un électron, pour régénérer la forme native de l'enzyme.

D'après le mécanisme établi par Poulos et Kraut¹⁷, la réaction de formation du composé I débute dès l'entrée du peroxyde d'hydrogène dans la cavité distale de l'hème. Un intermédiaire transitoire est obtenu avec l'ion H-O-O^- , conjugué du peroxyde d'hydrogène, coordinant l'ion Fe(III) tandis que le proton acide a été transféré à l'histidine distale¹⁸. Au cours de l'étape suivante, la liaison O-O se rompt hétérolytiquement. Dans l'état de transition, la charge négative portée par l'atome d'oxygène non lié au fer est stabilisée par l'His42 et l'Arg38 *via* des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques. L'implication de l'arginine distale dans la formation du composé I de la CcP a été démontré grâce à la structure de la CcP sous sa forme oxy (Fe(II)-O_2)¹⁹. La structure cristallographique de la HRP-C confirme le rôle essentiel des résidus histidine et arginine de la partie distale⁹ dans la formation du composé I.

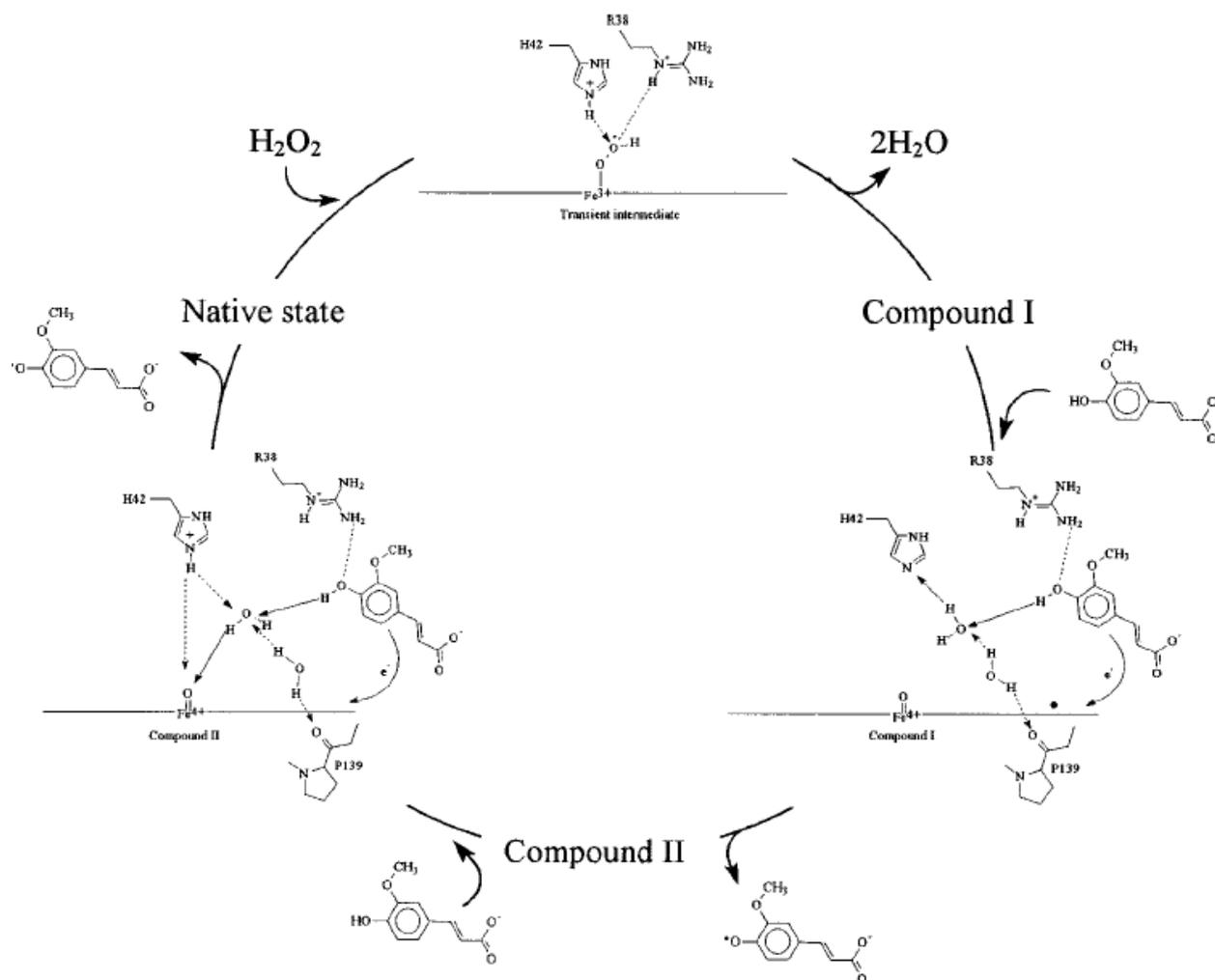


Figure 5- 2 : Cycle catalytique proposé pour les peroxydases de plantes avec de petits substrats phénoliques. La première étape est la formation du composé I, dont le mécanisme a été établi par Poulos et coll.¹⁷. Puis, l'arginine38 établit une liaison hydrogène avec l'oxygène phénolique du substrat. Cette liaison hydrogène assiste le transfert de proton de l'oxygène phénolique à l'histidine42, grâce à une molécule d'eau, présente dans le site actif, maintenue en position par la proline139. L'électron est transféré du substrat à l'hème. Le composé II ainsi formé est à son tour réduit par le même processus. Un proton peut être transféré à l'oxoferryle grâce à une molécule d'eau, située à équidistance de l'histidine 42 et de la position attendue pour l'oxygène du composé II permettant le retour à l'enzyme natif. D'après Galjhede²⁰.

Le site de fixation des substrats aromatiques est localisé près de l'hème, permettant ainsi la réaction par déprotonation du substrat. Le site de fixation de l'acide férulique a été mis en évidence par des cristaux de l'enzyme rendu inactif par complexation du fer par un ion cyanure²¹. Un mécanisme de réduction des composés I et II en a été déduit. L'oxydation des molécules de substrat par les peroxydases de plantes, s'accompagne d'un transfert de proton depuis le phénol jusqu'à l'histidine distale ou l'oxygène de l'oxoferryle. Le départ de ce proton est favorisé par la liaison hydrogène qu'il établit avec l'Arg38. Dans le cas de la réduction du composé I, l'accepteur final du proton est l'histidine distale. Un électron est transféré du phénolate au cycle porphyrine et le radical ainsi obtenu peut se dissocier de l'enzyme. Dans le cas de la réduction du composé II, le proton, d'une seconde molécule de substrat, est transféré à la partie oxoferryle et l'électron à l'atome de fer. L'implication d'une molécule d'eau est supposée dans les deux transferts et celle-ci serait à équidistance de l'His42 et de l'oxygène des espèces oxoferryles.

L'oxydation des substrats par la HRP a lieu à proximité de la partie de l'hème accessible, c'est à dire entre le groupement méthyle du carbone C18 et les protons *méso* du carbone C20 (schéma 5-2). Ce site d'interaction, entre l'enzyme et les différents substrats, a été identifié avec des hydrazines et l'azoture de sodium, entre autres²².

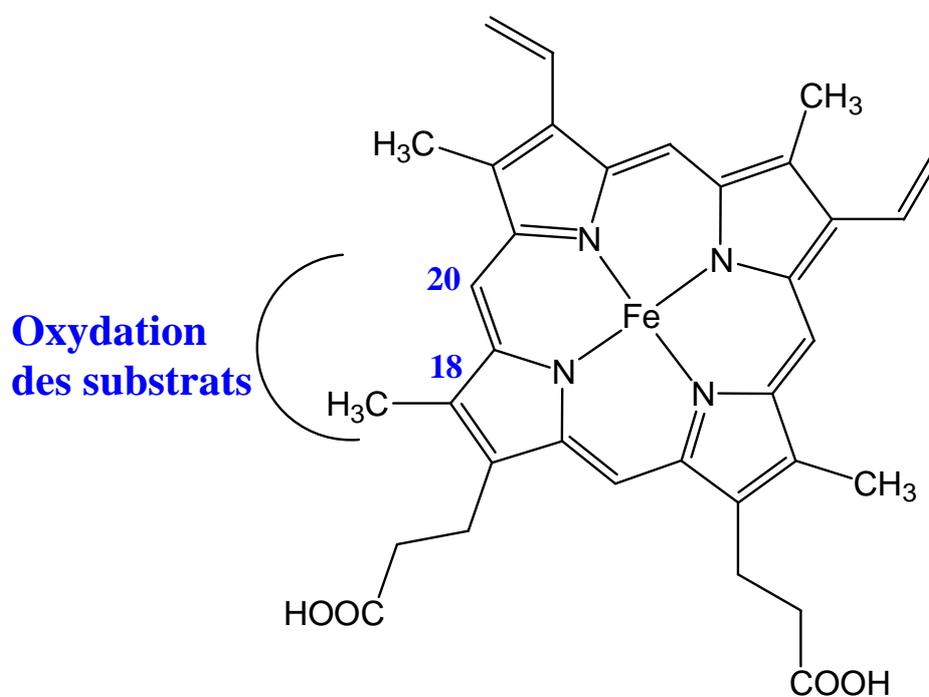


Schéma 5- 2 : Structure de l'hème de la HRP. Le site l'oxydation des substrats est souligné en bleu dans le schéma.

III. CARACTERISATION PAR SPECTROSCOPIES D'ABSORPTION UV-VISIBLE ET DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE.

Les spectres d'absorption électronique UV-visible de la HRP-C native, du composé I et du composé II, espèces caractéristiques du cycle catalytique de l'enzyme (figure 5-3). Le spectre de l'enzyme natif présente une bande de Soret à 404 nm et des bandes de transfert de charge à 500 et 640 nm. La bande de Soret présente un épaulement à 380 nm. Cet épaulement a été attribué à la forme pentacoordiné de l'hème.

Après ajout du peroxyde d'hydrogène, (figure 5-3 spectre vert), la diminution de la bande de Soret et l'apparition de la bande de transfert de charge à 648 nm ont été corrélées à la formation de l'intermédiaire oxoferryle radical porphyrinique cationique (composé I). Avec la formation du composé II (figure 5-3 spectre rouge), l'intensité initiale de la bande de Soret est retrouvée mais elle est déplacée à 420 nm et deux nouvelles bandes apparaissent à 427 et 554 nm, signature de l'oxoferryle.

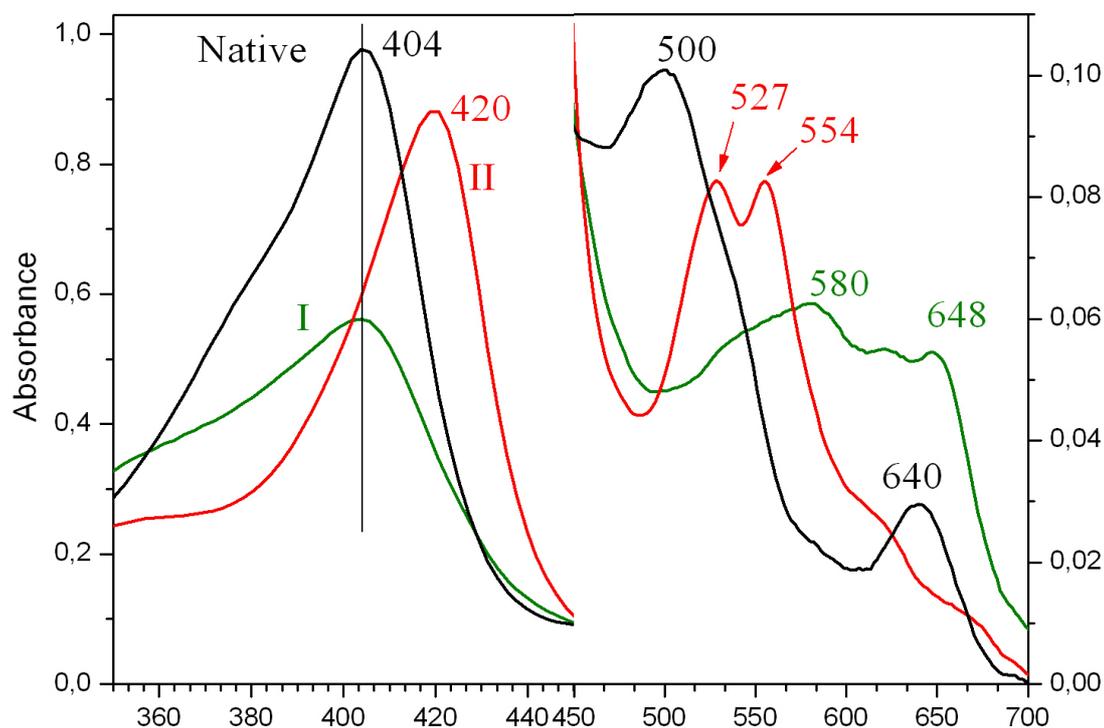


Figure 5- 3 : Spectres d'absorption UV-visible de la peroxydase de Raifort sous sa forme native (noir) et de ces composé I (vert) et II (rouge).

Comme décrit dans les chapitres précédents, l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O}]$ est silencieuse en RPE tandis que le spectre de l'enzyme natif est caractéristique d'une espèce Fe(III) spin fort, avec deux résonances majeures en $g \approx 6$ et $g \approx 2$ (figure 5-4, spectre noir). Par combinaison des spectroscopies RPE et Mössbauer, le spectre large (2000 G) centré à $g=2$ (figure 5-4 spectre vert) a été attribué à l'intermédiaire oxoferryle radical porphyrinique cationique ou Composé I²³.

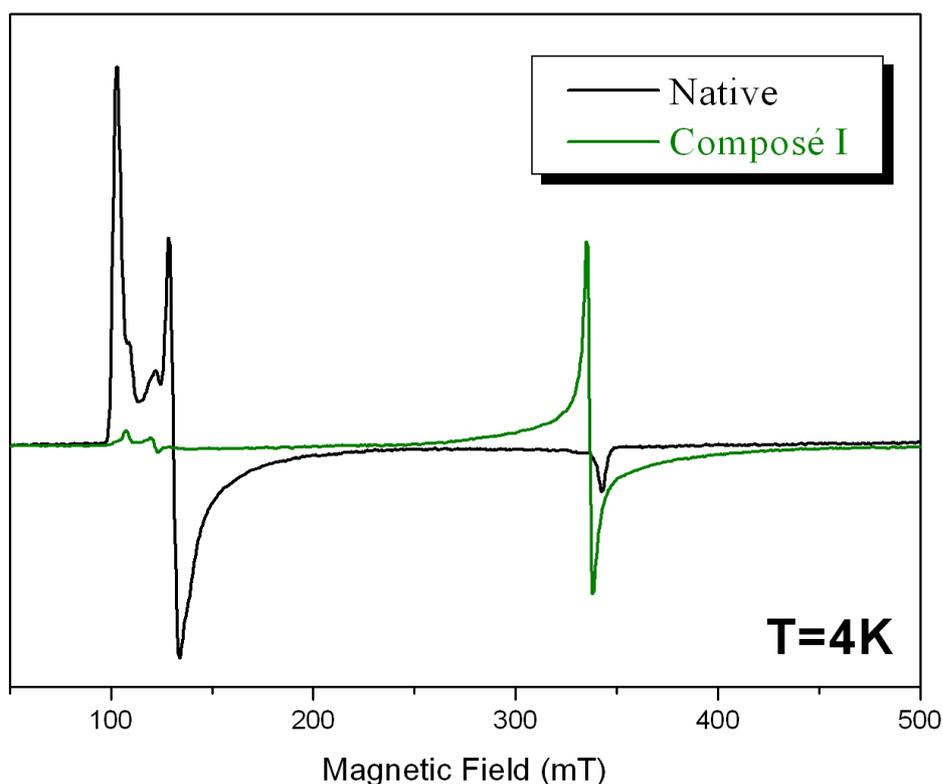


Figure 5- 4 : Spectre RPE à 9 GHz de la peroxydase de raifort native (spectre noir) et du composé I (spectre vert). Les deux spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions : $T=4\text{K}$, modulation d'amplitude 1,6G, Puissance des micro-ondes 1mW, Modulation de fréquence 100kHz.

B. LA PEROXYDASE DE RAIFORT MODIFIEE.

La peroxydase de raifort est une des peroxydases les mieux caractérisées. Les structures de la forme ferrique ainsi que de ses intermédiaires, le composé I et le composé II, sont disponibles et ces trois espèces sont également caractérisées par spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique et par spectrophotométrie d'absorption UV-visible. Pour notre étude, cette protéine est particulièrement intéressante parce qu'elle ne forme pas de radicaux issus de l'oxydation d'acides aminés.

Nous avons modifié la structure chimique de l'hème présent au sein de cet enzyme en le reliant à une tyrosine ou un tryptophane, susceptibles de stabiliser un radical et de pouvoir. Ainsi

nous pourrions déterminer les contraintes structurales permettant l'équilibre entre les deux formes radicalaires ($[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ et $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$ ou $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet}]$).

Dans l'hème modifié, l'acide aminé supplémentaire est relié à l'une des fonctions propionates de l'hème : directement dans le cas de la tyrosine et espacé par une glycine additionnelle dans le cas du tryptophane.

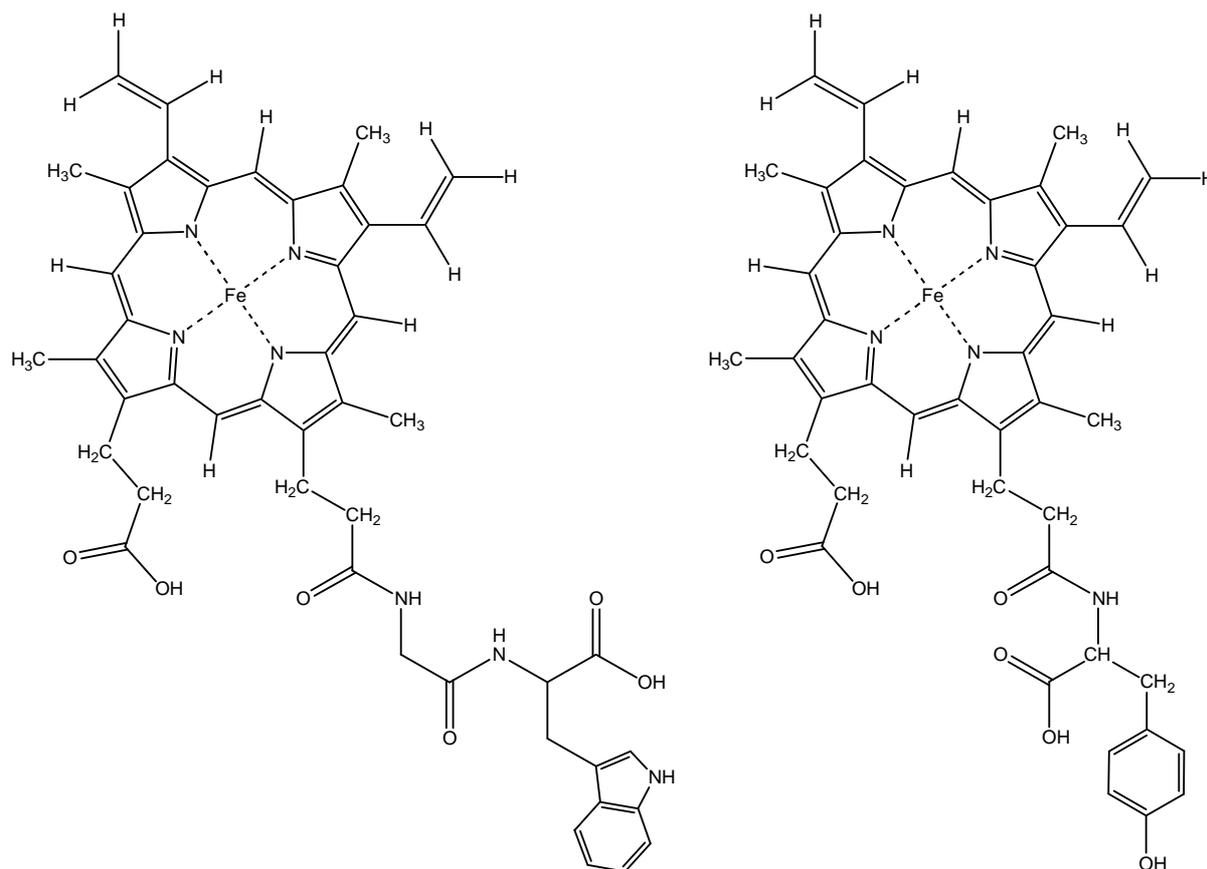


Schéma 5- 3: Représentation des protoporphyrines (IX) modifiées, utilisées dans les expériences de reconstitution de la peroxydase de raifort.

Afin de n'obtenir spécifiquement qu'un seul type de liaison peptidique, la fonction carboxylique du groupe propionique de l'hème est activé par estérification avec le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) et le *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU)²⁴, tandis que celle de la tyrosine ou du dipeptide Gly-Trp est protégée par formation de l'ester de méthyle correspondant (très peu réactif) (schéma 5-3). En appliquant une telle procédure à la protoporphyrine (IX), on obtient un mélange des produits de mono- et bis-condensation, sur les deux groupes propionates de l'hème. Ces deux produits sont séparés sur colonne chromatographique puis purifiés par HPLC. Les produits désirés, la Protohème-Tyr et la Protohème-Gly-Trp, ont été caractérisés par RMN, spectroscopie de masse et par spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible. Une des difficultés

majeures dans la synthèse du composé protohème-Tyr est la déprotection de la tyrosine. En effet, pour éviter les produits secondaires, dans le cas de la tyrosine, il faut protéger non seulement son groupe carboxylique mais également son groupe hydroxyle. Cette réaction de déprotection, réalisée dans des conditions très dures, implique une diminution importante du rendement. Le composé protohème-Gly-Trp a donc été plus largement utilisé dans les essais de reconstitution de la peroxydase de raifort.

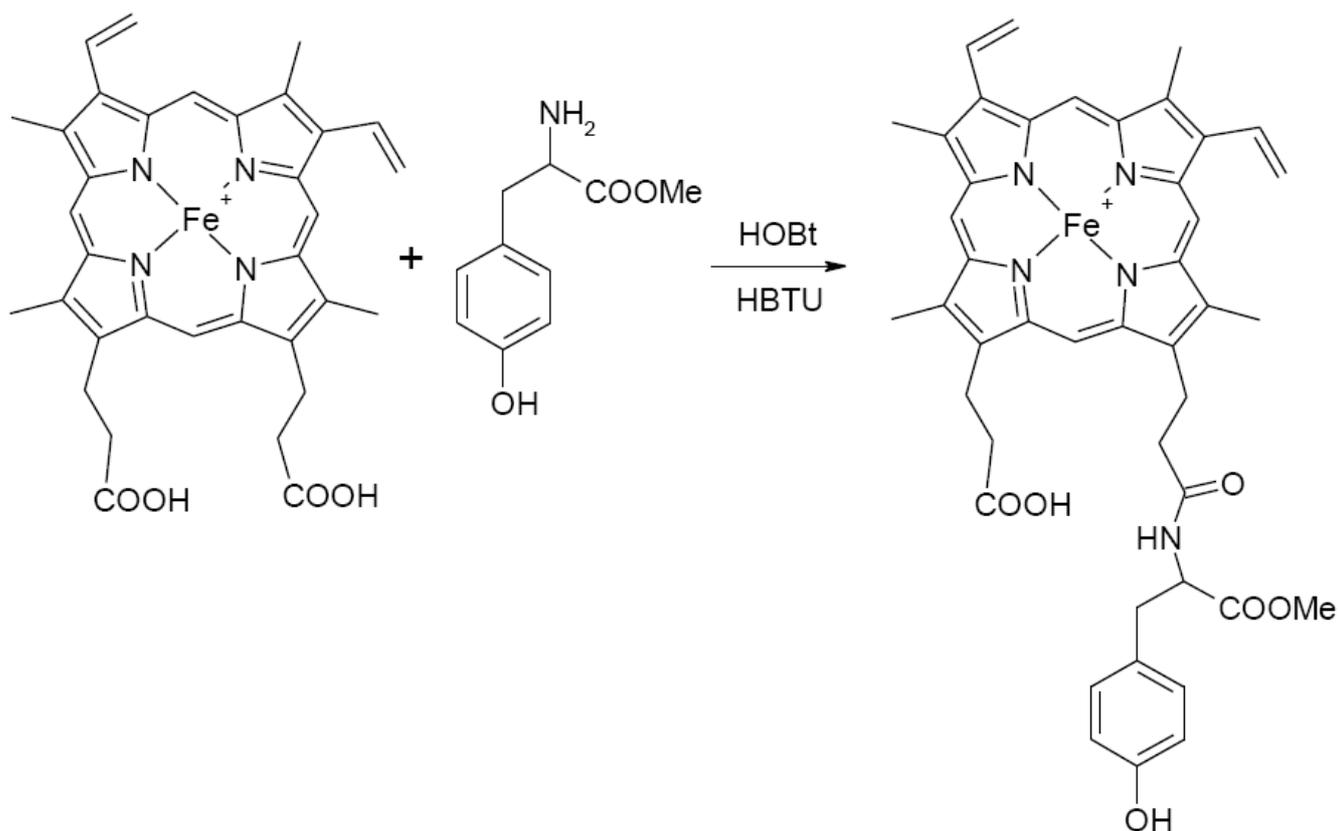


Schéma 5- 4 : Représentation schématique de la synthèse du composé Protohème-6-(7)-L-méthylester de la tyrosine

I. RECONSTITUTION DE LA PEROXYDASE DE RAIFORT.

Une fois modifié, l'hème doit être réintroduit au sein de l'apoprotéine, pour tenir compte également du rôle de l'environnement protéique dans la formation du radical. La procédure de reconstitution de la protéine, à partir de la peroxydase de raifort native, est la suivante²⁵ :

1°) Préparation de l'apoprotéine : la peroxydase de raifort native est traitée à un pH très acide (pH=2) pour permettre la libération de son hème. La porphyrine libre est alors extraite par de la 2-butanone.

Après purification (dialyse), la concentration de l'apo-HRP ainsi obtenue est évaluée par spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible, en mesurant l'absorbance à 280 nm (coefficient d'extinction molaire $\epsilon=3500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2) Insertion de l'hème modifié dans l'apo-HRP : l'hème modifié est dissout dans le méthanol et est ajouté à la solution d'apo-HRP. Pour permettre l'insertion de celui-ci, le mélange est incubé pendant une heure à 4°C puis dialysé dans un tampon phosphaté à pH=8.

3) Restructuration de l'enzyme : la structure tridimensionnelle de l'enzyme se reforme lentement autour de l'hème. Après plusieurs jours, la protéine reconstituée est séparée de l'apoprotéine et de l'hème modifié seul par chromatographie.

II. CARACTERISATION DE LA PEROXYDASE DE RAIFORT MODIFIEE.

Le spectre RPE de l'enzyme native est dominé par le signal rhombique avec des valeurs de g_x , g_y et g_z de 6,47 ; 5,05 ; 1,97 à pH 7,2 et 6,56 ; 5,16 ; 1,96 à pH 5,2, respectivement. Le spectre de l'enzyme reconstitué montre la contribution d'un signal axial et d'une proportion du Fe(III) à l'état spin faible (étoile bleue sur la figure 5-5).

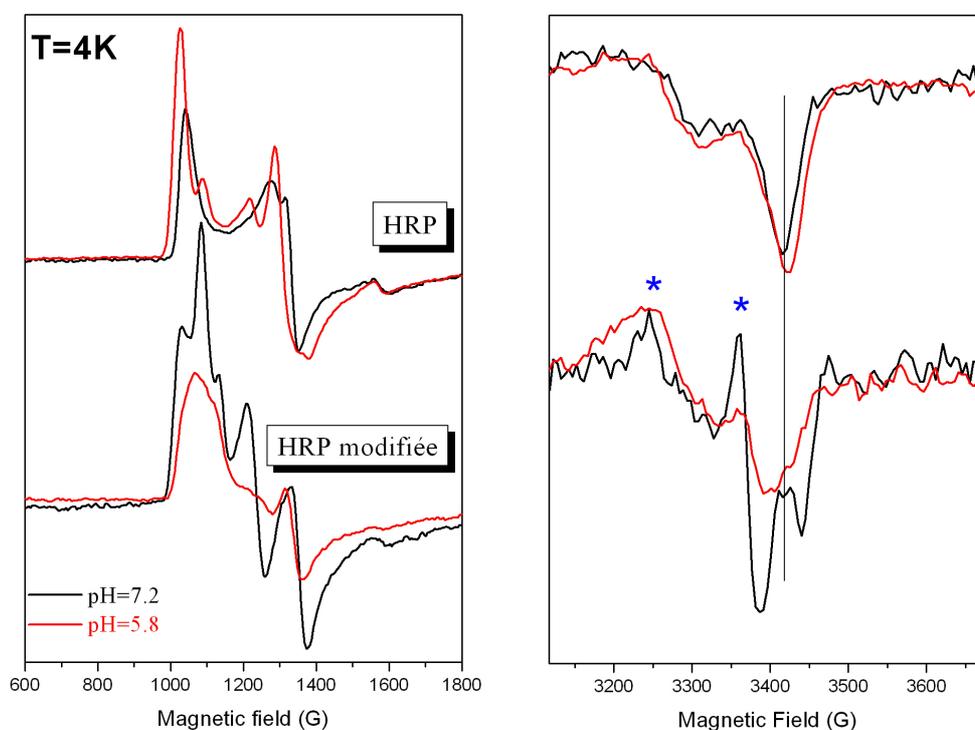


Figure 5- 5 : Spectre RPE de l'état ferrique de la peroxydase de raifort (haut) et de la peroxydase de raifort modifiée (bas). A gauche est représenté la région à $g \approx 6$ et à droite la région à $g \approx 2$. Les conditions d'enregistrement des spectres sont identiques à celles de la figure 5-4.

Ces différences notables, entre le signal de l'enzyme natif et de l'enzyme modifié, sont attribuées aux modifications de l'environnement de l'hème, induites par un possible changement d'orientation de celui-ci après insertion dans la poche protéique (figure 5-6).

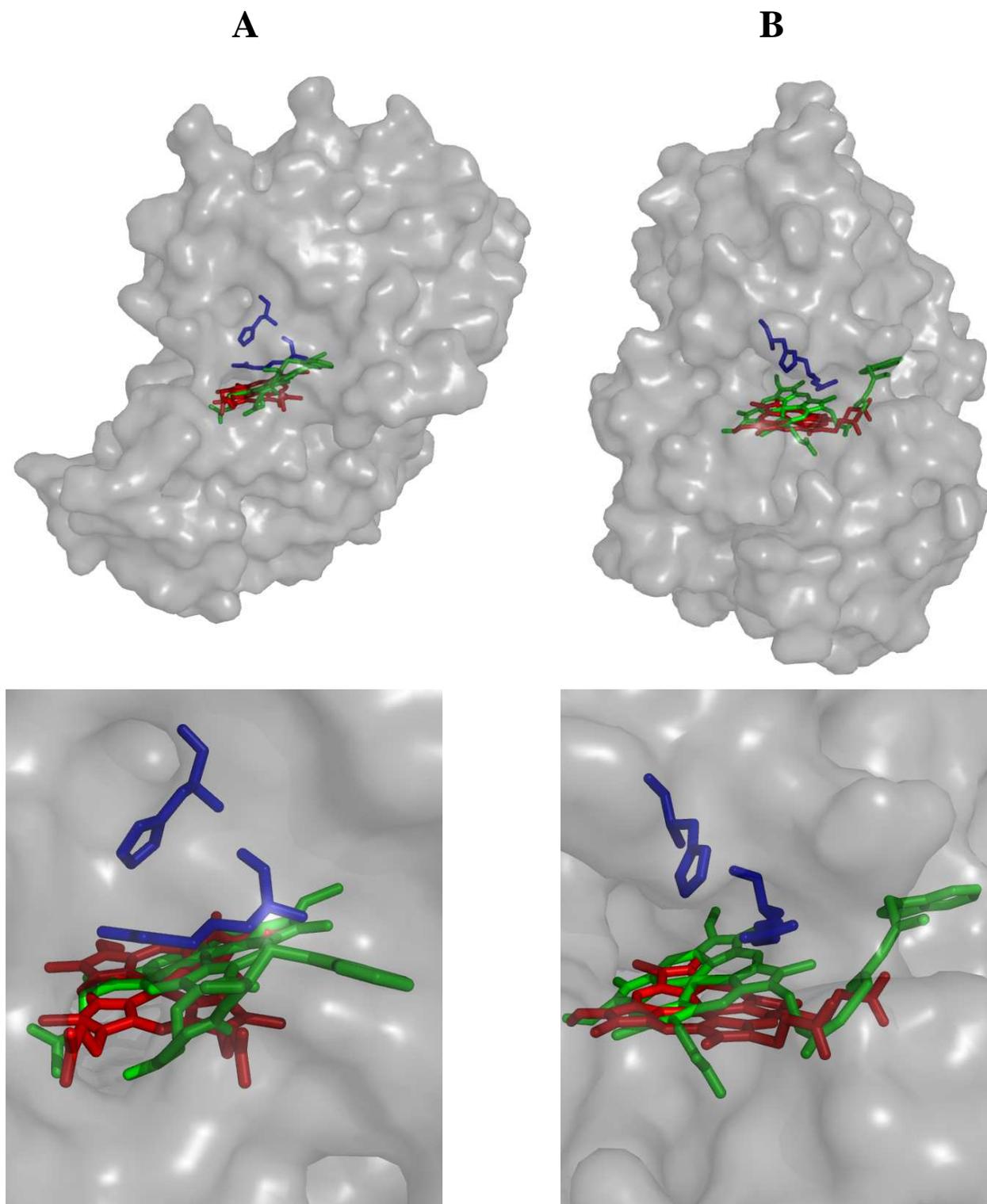


Figure 5- 6 : Structure de la peroxydase de raifort superposé avec la structure de l'hème modifié (en vert). En rouge est représenté l'hème de l'enzyme natif et en bleu les résidus aminés essentiels pour la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène. La figure B représente une vue tournée de 90° par rapport à la figure A. Les figures du bas représentent un agrandissement de l'accès à l'hème selon les deux canaux présents dans la HRP native. L'ajout du dipeptide Gly-Trp ne semble pas bloquer l'accès à l'hème au peroxyde d'hydrogène.

Nous avons testé la réactivité de l'HRP modifiée avec le peroxyde d'hydrogène (figure 5-7). A différence de l'enzyme native, le signal du Composé I n'est pas détecté pour l'enzyme reconstitué bien que l'on puisse observer le changement de couleur de l'échantillon. De plus, la disparition du signal ferrique à $g=6$ et à $g=2$ suggère que l'intermédiaire formé est silencieux en RPE. Aucun signal de radical protéique n'est détecté.

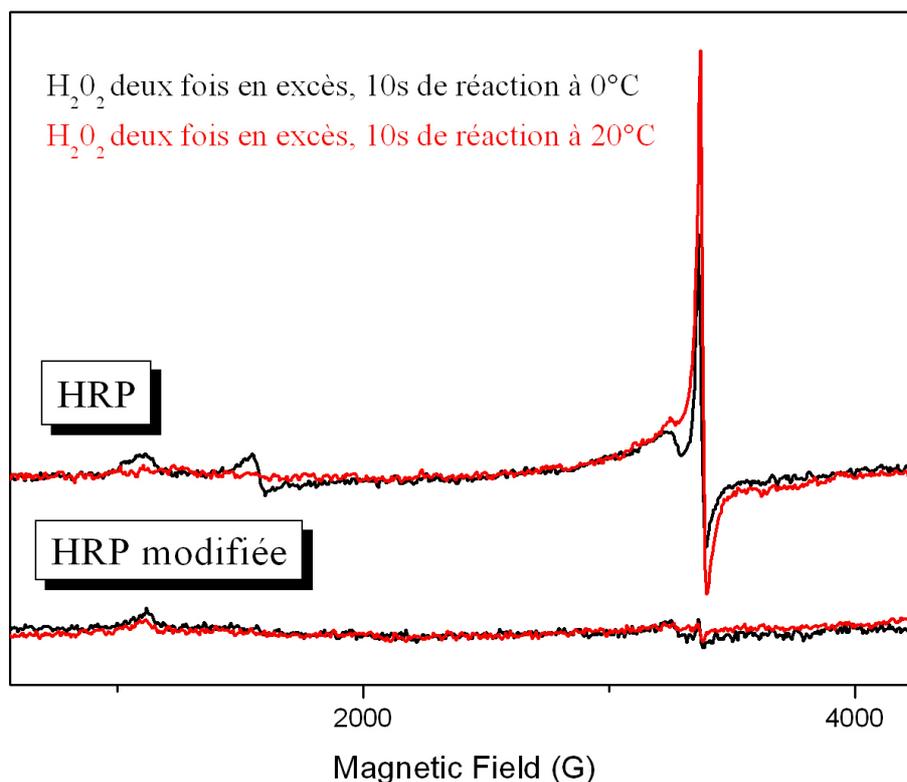


Figure 5- 7 : Spectres RPE de la peroxydase de raifort (haut) et de la protéine modifiée (bas) traitées par le peroxyde d'hydrogène deux fois en excès. Le temps de mélange est de 10s et la réaction est réalisée dans la glace. Les conditions d'enregistrements des spectres sont les mêmes que pour la figure précédente.

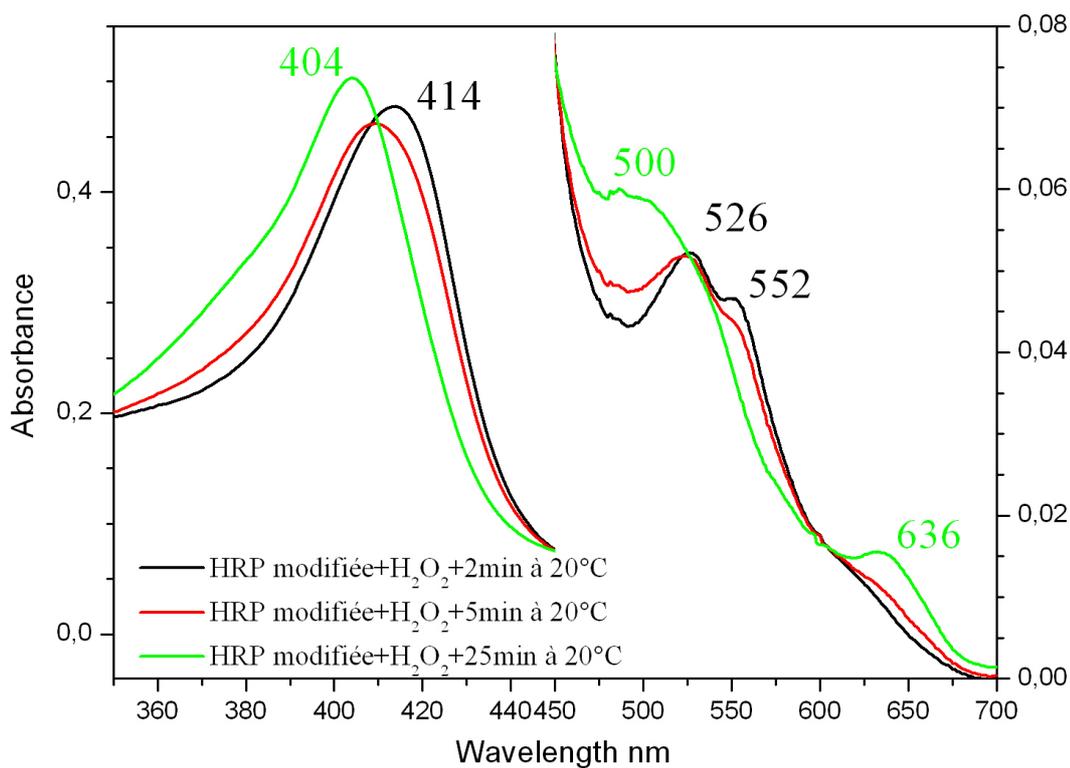
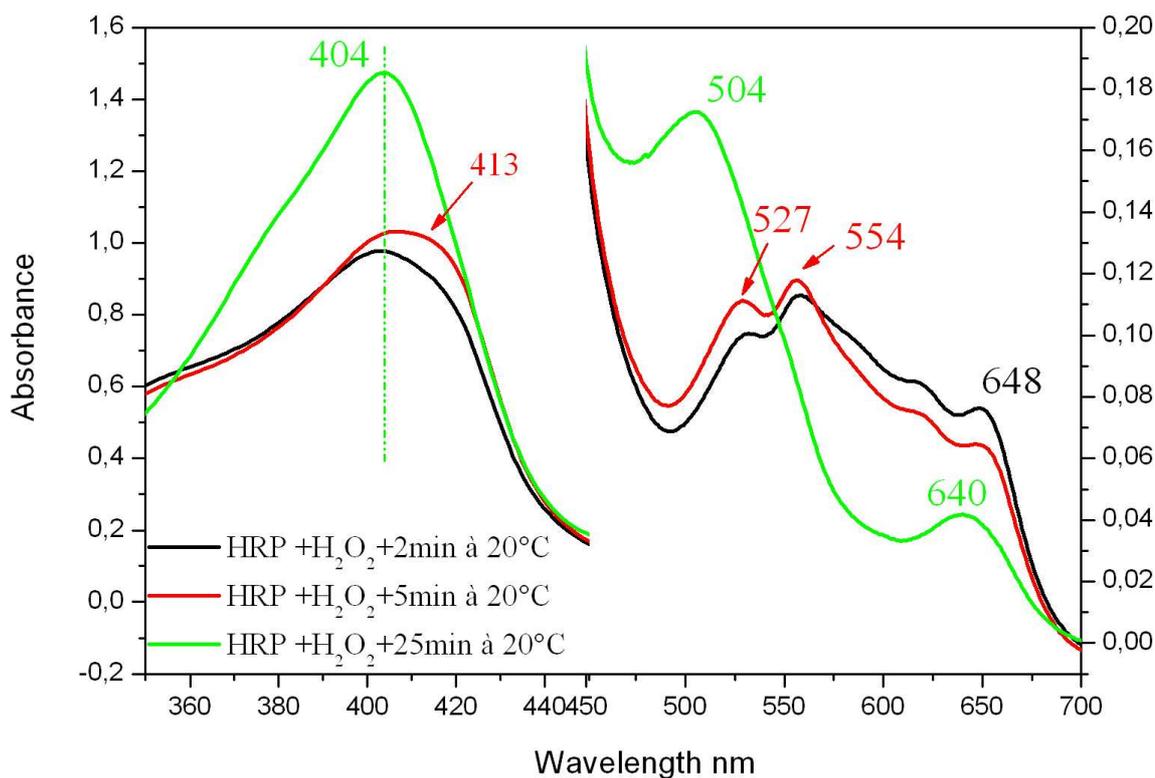


Figure 5- 8 : Spectres d'absorption UV-visible des échantillons RPE décongelés dans le cas du contrôle (haut) et dans le cas de la protéine modifiée (bas).

Le spectre d'absorption UV-visible (figure 5-8 bas) de ce même échantillon présente les bandes caractéristiques de l'espèce oxoferryle [Fe(IV)=O] à savoir la bande de Soret à 414 nm et deux bandes de transfert de charge à 526 et 552 nm. Ces résultats indiquent que l'introduction de la protoporphyrine-Gly-Trp dans la peroxydase de raifort favorise la réaction de formation du composé II et déstabilise le composé I. En effet, bien qu'il ne soit pas détecté, il est tout à fait vraisemblable que le composé I se forme également avec l'enzyme modifié mais qu'il évolue très rapidement vers le composé II. Par comparaison, dans l'enzyme natif (figure 5-8 haut) les bandes d'absorption du composé I sont encore observées après 5 min de réaction à 0°C. Dans les deux cas, après 25 min de réaction à température ambiante, le signal ferrique est retrouvé.

Nous pouvons conclure que la modification sur l'hème induit des changements dans la structure électronique de l'hème ayant comme résultat la déstabilisation de l'intermédiaire [Fe(IV)=O Por^{•+}], comme nous l'avons observé pour certaines catalases (voir Chapitre 3). Il est possible que l'intermédiaire [Fe(IV)=O Trp[•]] soit formé mais de durée de vie très courte, contrairement à la CcP ou à la peroxyde de lignine.

Un des inconvénients, avec la peroxydase de raifort commerciale de chez Sigma, est que lorsqu'on réalise les expériences de spectroscopie RPE à pH neutre une grande quantité de fer spin faible est formée. Afin d'éviter ce phénomène, nous avons utilisé dans la suite de l'étude une peroxydase commerciale de chez Biozyme.

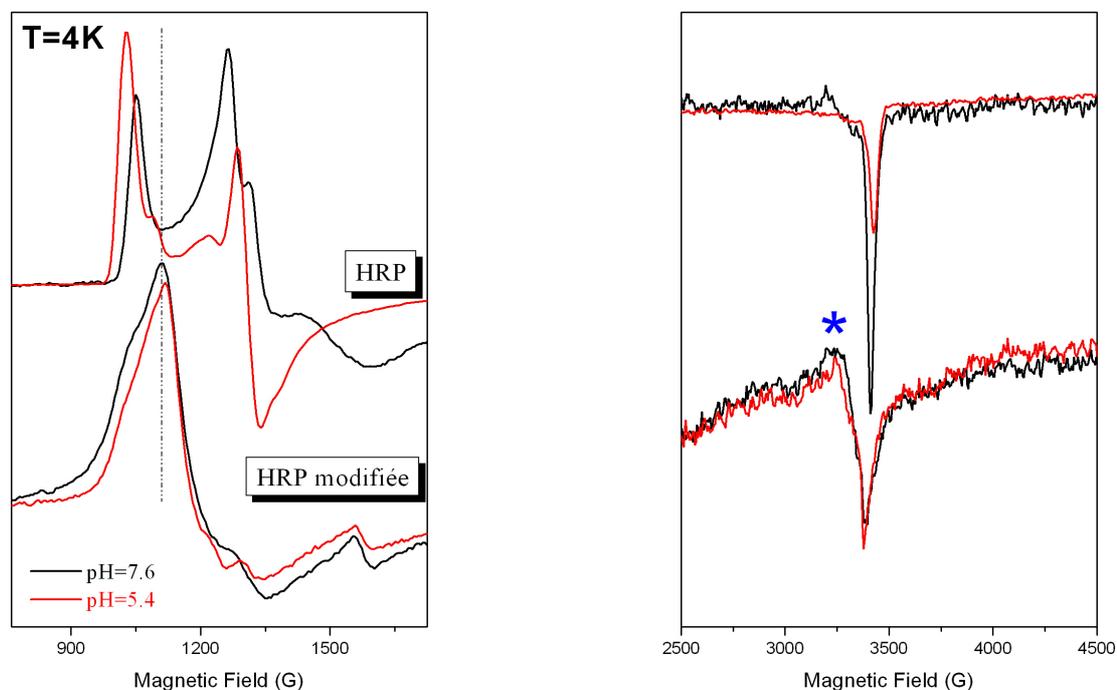


Figure 5- 9 : Spectre RPE à 9 GHz de la peroxydase de raifort de chez Biozyme sous forme ferrique (haut) et de l'enzyme modifiée de chez Biozyme (bas). A gauche est représentée la région autour de $g=6$ et a droite la région autour de $g=2$. Les spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions que sur la figure 5-7. Etoile bleue : faible quantité de Fe(III) spin faible.

L'influence de la modification sur l'hème apparaît encore plus clairement avec cette protéine. Le signal rhombique de l'hème dans le contrôle (HRP native) devient complètement axial après reconstitution, avec $g_{\perp}=6,07$ et $g_{//}=1,99$. Il y a toujours un peu de fer sous la forme spin faible (étoile bleue).

Comme nous l'avons vu pour les catalases, les conditions expérimentales telles que la température ou l'excès d'oxydant peuvent favoriser la formation du radical protéique. Se pourrait-il qu'en jouant sur ces facteurs on puisse forcer la protéine modifiée à former un radical sur l'acide aminé tryptophane ?

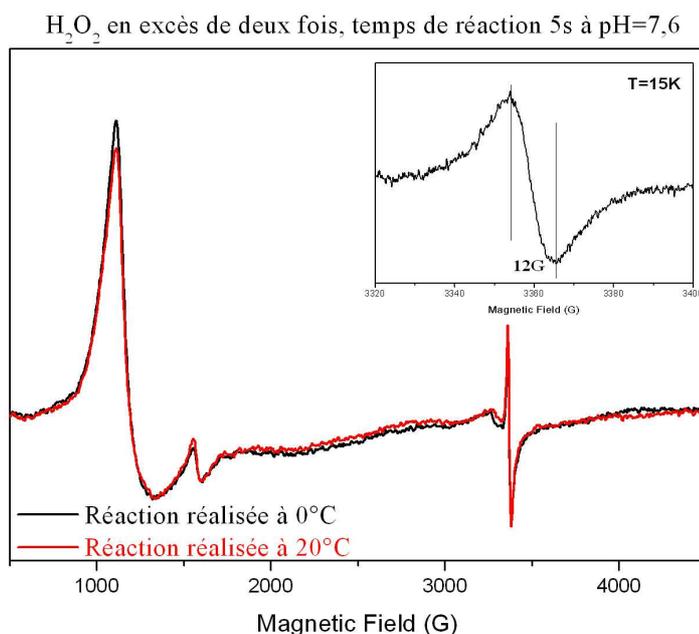


Figure 5- 10 : Spectres RPE à 9 GHz de la peroxydase de raifort modifiée traitée par le peroxyde d'hydrogène en excès de deux fois à différentes températures de mélange. Encadré : Spectre RPE enregistré à 15K du signal centré en $g=2$.

Après réaction avec le peroxyde d'hydrogène, le spectre RPE de l'enzyme modifié montre la conversion du Fe(III) en Fe(IV)=O et d'un radical organique à $g=2$, mais avec un rendement très faible. La faible concentration de l'échantillon ne permet pas de déterminer la nature chimique du radical ni une possible interaction magnétique avec le fer. En augmentant l'excès de peroxyde d'hydrogène, la diminution de l'intensité du signal ferrique est plus importante, indiquant que l'hème est réactif mais il forme toujours l'intermédiaire [Fe(IV)=O] (Figure 5-11).

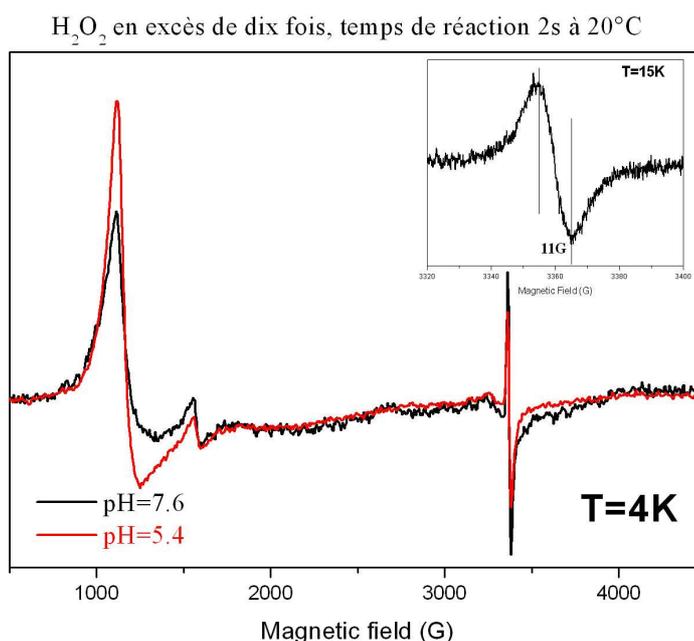


Figure 5- 11 : Spectres RPE à 9 GHz de la peroxydase de raifort modifiée avec le peroxyde d'hydrogène en excès de dix fois. Encadré : Spectre RPE de l'espèce observée en $g=2$ enregistré à 15K.

CONCLUSIONS

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de lier par liaison covalente un résidu tryptophane ou un résidu tyrosine sur une des fonctions propionate d'une protoporphyrine IX. Durant la synthèse de ces composés, de nombreuses difficultés sont survenues notamment avec le dérivé contenant la tyrosine. Il nous a été impossible de l'obtenir en quantité assez importante pour pouvoir l'incorporer dans la peroxydase de raifort. Le composé contenant un tryptophane, lui, a pu être incorporé dans cette protéine.

Les résultats montrent que l'hème modifié induit la déstabilisation de l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ et induit une réaction plus rapide vers le $[\text{Fe(IV)=O}]$. La suite des expériences nécessite l'utilisation de l'appareil de congélation à mélange rapide (freeze-quench) pour préparer les échantillons RPE et vérifier si un intermédiaire de type $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}]$ transitoire est formé, comme dans le cas du radical tyrosyle dans la CcP⁵.

De plus, il est possible que l'insertion d'une chaîne polypeptidique plus longue entre l'atome de fer et le résidu tryptophane soit plus adaptée pour une meilleure incorporation de l'hème dans la poche. Cet allongement de la chaîne pourrait ralentir la réaction et permettre de stabiliser la formation d'un radical tryptophanyle. Il est aussi possible que l'environnement du tryptophane ne soit pas adapté pour permettre la stabilisation du radical, comme cela est observé dans le cas des KatGs. En particulier, nous avons démontré que la formation du radical tryptophanyle (unique) de SyKatG nécessite la présence d'une liaison hydrogène²⁶.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. M. Sivaraja, D. B. Goodin, M. Smith, and B. M. Hoffman, Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome *c* peroxidase compound ES, *Science*, **1989**, *245*, 738-740.
2. A. T. Smith, and N. C. Veith, Substrate binding and catalysis in heme peroxidases, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, 269-278.
3. M. D. S. Gelpke, J. Lee, and M. H. Gold, Lignin Peroxidase Oxidation of Veratryl Alcohol: Effects of the Mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3498-3506.
4. A. Ivancich, H.-M. Jouve, B. Sartor, and J. Gaillard, EPR Investigation of Compound I in *Proteus mirabilis* and Bovine Liver Catalases: Formation of Porphyrin and Tyrosyl Radical Intermediates, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 9356-9364.
5. A. Ivancich, P. Dorlet, D. B. Goodin, and S. Un, Multifrequency High-Field EPR Study of the Tryptophanyl and Tyrosyl Radical Intermediates in Wild-Type and the W191G Mutant of Cytochrome *c* Peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5050-5058.
6. A. Ivancich, G. Mazza, and A. Desbois, Electron Paramagnetic Resonance Study of Radical Intermediates in Turnip Peroxidase Isozymes, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 6860-6866.
7. A. T. Smith, N. Santama, S. Dacey, M. Edwards, R. C. Bray, R. N. F. Thorneley, and J. F. Burke, Expression of a synthetic Gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 13335-13343.
8. M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, and T. L. Poulos, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15Å resolution, *Nature Struc. Biol.*, **1997**, *4*, 1032-1038.
9. G. I. Berglund, G. H. Carisson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, and J. Hajdu, The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature*, **2002**, *417*, 463-468.
10. K. G. Welinder, Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase, *FEBS Lett.*, **1976**, *72*, 19-23.
11. R. H. Haschke, and J. M. Friedhoff, Calcium-related properties of horseradish peroxidase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1978**, *80*, 1039-1042.
12. B. D. Howes, A. Feis, L. Raimondi, C. Indiani, and G. Schmulevich, The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 35005-35011.
13. K. G. Welinder, Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1992**, *2*, 388-393.
14. I. Frias, J. M. Siverio, C. Gonzales, J. M. Trujillo, and J. A. Perez, Purification of a new peroxidase catalysing the formation of the lignan-type compounds, *Biochem. J.*, **1991**, *273*, 109-113.
15. B. H. Dunford, Heme peroxidases, **1999**, Wiley, New York.
16. N. Veitch, and A. T. Smith, Horseradish peroxidase, *Adv. Inorg. Chem.*, **2000**, *51*, 107-162.
17. T. L. Poulos, and J. Kraut, A hypothetical Model of the Cytochrome *c* peroxidase- Cytochrome *c* Electron transfer, *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 10322-10330.
18. V. Thanabal, J. S. de Ropp, and G. N. La Mar, Proton NMR Characterization of the catalytically relevant proximal and distal hydrogen-bonding networks in ligated resting state horseradish peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 3027-3035.

19. M. A. Miller, A. Shaw, and J. Kraut, 2.2A° structure of oxy-peroxidase as a model for the transient enzyme: peroxide complex, *Nature Struct. Biol.*, **1994**, *1*, 524-531.
20. M. Gajhede, Protein engineering of Peroxidase and Cytochrome P450, *Biochem. Soc. Trans.*, **2001**, *29*, 91-98.
21. A. Henriksen, A. T. Smith, and M. Gajhede, The structure of the horseradish peroxidase C-ferrulic acid Complex and the ternary complex with Cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 35005-35011.
22. P. R. Ortiz de Montellano, Catalytic sites of hemoprotein peroxidases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1992**, *32*, 89-107.
23. C. E. Schulz, P. W. Devaney, H. Winkler, P. G. Debrunner, N. Doan, R. Chiang, R. Rutter, and L. P. Hager, Horseradish peroxidase compound I: evidence for spin coupling between the heme iron and a 'free' radical, *FEBS Lett.*, **1979**, *103*, 102-105.
24. E. Monzani, G. Alzuet, L. Casella, C. Redaelli, C. Bassani, A. M. Sanangelantoni, M. Gullotti, L. De Gioia, L. Santagostini, and F. Chillemi, Properties and reactivity of Myoglobin Reconstituted with Chemically modified Protohemin Complexes, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 9571-9582.
25. L. Huang, G. Wojciechowski, and P. R. Ortiz de Montellano, Prosthetic heme modification during halide ion oxidation demonstration of chloride oxidation by horseradish peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 5345-5353.
26. A. Ivancich, C. Jakopitsch, M. Auer, S. Un, and C. Obinger, Protein-based radicals in the catalase-peroxidase of *Synechocystis* PCC6803: a multifrequency EPR investigation of wild-type and variants on the environment of the heme active site, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14093-14102.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Tout au long de ce travail, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence et à la caractérisation des intermédiaires réactionnels issus de l'oxydation de tyrosines et/ou de tryptophanes dans deux familles d'hémoprotéines : les catalases et les catalase-peroxydases (peroxydases bifonctionnelles). Nous avons pu démontrer que ces protéines sont capables de former des radicaux protéiques comme intermédiaires alternatifs au composé I [Fe(IV)=O Por^{•+}]. La prise en compte de la formation de tels radicaux nous a amené à réexaminer le mécanisme réactionnel classique des catalases et des peroxydases, jusqu'alors centré uniquement sur l'oxydo-réduction de l'hème. La détermination précise de la nature chimique et l'identification du (des) site(s) de formation de ces intermédiaires sont nécessaires pour mieux comprendre les différences fonctionnelles de ces enzymes. L'approche multidisciplinaire (spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible par stopped-flow, Biochimie et Biologie Moléculaire (en collaboration)) s'avère essentielle pour progresser dans la compréhension du rôle des radicaux protéiques dans la catalyse enzymatique.

J'ai réalisé une étude comparative de catalases provenant de souches bactériennes différentes et de mammifères. Afin de déterminer le type d'intermédiaire(s) radicalaire(s), [Fe(IV)=O Por^{•+}] ou [Fe(IV)=O Tyr[•]], formé(s) par ces catalases, j'ai utilisé comme techniques de caractérisation la spectroscopie RPE et la spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible. La RPE à 9 et 285 GHz nous a permis de détecter et de caractériser directement ces deux espèces paramagnétiques. Parallèlement, en utilisant la spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible, nous avons caractérisé les changements d'états d'oxydation de l'hème. J'ai ainsi démontré que la température de mélange, le pH final de la solution ainsi que l'excès d'acide peracétique favorisent la formation de l'intermédiaire [Fe(IV)=O Tyr[•]] dans les catalases de foie de bœuf, d'érythrocytes humains, mais aussi de *B. abortus* et de *M. lysodeikticus*, par transfert intramoléculaire d'électron depuis la tyrosine vers la porphyrine. La formation d'un radical tyrosyle généralise le cas déjà mis en évidence auparavant par notre équipe de la catalase de foie de bœuf. En particulier, la température de mélange a une grande influence sur la stabilité et/ou l'équilibre entre les intermédiaires [Fe(IV)=O Por^{•+}] et [Fe(IV)=O Tyr[•]]. L'espèce prédominante à température ambiante est l'espèce [Fe(IV)=O Por^{•+}]. Ceci explique pourquoi les études cinétiques de la littérature, pour lesquelles seule l'absorption électronique UV-visible à température ambiante est utilisée, n'avaient pas permis de mettre en évidence la formation du radical tyrosyle.

Afin de corréler de façon précise les résultats obtenus par spectroscopie avec les mesures d'activité enzymatique (en collaboration avec l'équipe du Prof. Peter Loewen, University of Manitoba, Winnipeg, CANADA), nous avons réalisé les mesures d'activité spécifique à 10°C avec différents excès de peroxyde d'hydrogène, c'est-à-dire dans des conditions tout à fait différentes des conditions usuelles pour les mesures d'activité (température de 37°C avec un excès de mille fois en peroxyde d'hydrogène) mais similaires à celles utilisées pour les expériences de spectroscopie RPE. Les résultats de notre étude confirment notre hypothèse de travail : le transfert spontané d'électron entre la tyrosine et la porphyrine, favorisé dans certaines catalases, serait en compétition avec la réaction de réduction du peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ (deuxième partie de la dismutation). Ceci expliquerait les différences d'efficacité de la réaction avec le peroxyde d'hydrogène, pour les catalases étudiées. Jusqu'à présent, la grande homologie structurale de ces protéines, en particulier au niveau du site actif et du canal d'accès pour le peroxyde d'hydrogène ou l'acide peracétique, ne permettait pas d'expliquer les différences d'activité spécifique au sein des catalases.

Nos résultats mettent également en évidence que les catalases pourraient être potentiellement des enzymes 'bifonctionnelles' grâce à un mécanisme de réduction à un électron de type peroxydase. En particulier, la catalase de foie de bœuf est capable de réagir avec l'ABTS, donneur d'un électron. Cependant, nos résultats ont démontré que l'intermédiaire réactif vis-à-vis de ce substrat est le radical porphyrinique cationique et non le radical tyrosyle.

Dans le cadre de mes études spécifiques sur les peroxydases bifonctionnelles ou catalase-peroxydases (KatGs), j'ai utilisé la KatG de *B. pseudomallei* comme cas d'étude, puisque sur celle-ci nous pouvons réaliser des mutations spécifiques ou obtenir des structures cristallographiques grâce à notre collaboration avec le laboratoire canadien du Prof. Peter Loewen. Chez BpKatG, nous avons ainsi pu mettre en évidence la formation d'un radical tyrosyle mais également de deux intermédiaires tryptophanyles, l'un étant formé sur le Trp330 du côté proximal de l'hème, équivalent au site du radical tryptophanyle de la cytochrome *c* peroxydase. Ces radicaux ont été détectés en utilisant la spectroscopie RPE multifréquences combinée avec le marquage isotopique spécifique des résidus tryptophane et tyrosine et la mutagenèse dirigée. Tout comme dans le cas de la cytochrome *c* peroxydase, l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ a un temps de vie trop court pour être détecté, même avec des expériences de stopped-flow (échelle de la milliseconde). Nos études en cours sur des

mutants de résidus tryptophane sélectionnés pourraient permettre de localiser le deuxième site de formation du radical tryptophanyle.

Bien que le substrat physiologique des catalase-peroxydases reste indéterminé à ce jour, j'ai démontré que BpKatG réagit *in vitro* avec deux substrats donneurs d'électrons, l'ABTS et l'isoniazide (INH, antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose). En particulier, nous avons démontré que l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ réagit avec l'ABTS et que le $[\text{Fe(IV)=O Trp}_{330}^{\bullet+}]$ n'est pas l'intermédiaire réactif vis-à-vis de l'isoniazide.

L'étude comparative de sept catalase-peroxydases, nous a permis de démontrer que les intermédiaires tryptophanyles ont pour chaque enzyme un site de formation unique, mais ceux-ci ne sont pas identiques pour les différentes catalase-peroxydases, et ceci malgré l'homologie de séquences de ces dernières. Ceci expliquerait en partie leurs différences de réactivité vis-à-vis de l'ABTS et de l'INH.

Nous avons aussi démontré que le mécanisme de la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène dans les catalase-peroxydases est différent de celui des catalases monofonctionnelles et que certaines particularités structurales, ont un rôle crucial dans l'activité catalase, notamment l'adduit Trp-Tyr-Met, absent chez les catalases monofonctionnelles. Il est également intéressant de noter que les KatGs, en tant qu'ancêtres des peroxydases monofonctionnelles, possèdent plus de sites d'oxydation alternatifs que ces dernières, peut-être pour contrebalancer l'inaccessibilité de l'hème ou l'absence de site de fixation des substrats aromatiques près de l'hème. D'un point de vue évolutif, il semblerait que les peroxydases monofonctionnelles sont devenues des enzymes plus spécialisées que les catalase-peroxydases et que leurs structures se soient simplifiées. En effet, la partie distale du site actif des peroxydases monofonctionnelles est moins encombrée que celle des catalase-peroxydases. Cette complexité du site actif empêche d'ailleurs la fixation des composés aromatiques près de l'hème dans le cas des catalase-peroxydases. Celles-ci possèdent dans leur structure, comme nous l'avons décrit dans le chapitre IV, un 'short stretch' et trois insertions supplémentaires et elles possèdent toutes une vingtaine de résidus tryptophanes. Chez ces enzymes, un radical tryptophanyle peut se former sur le tryptophane proximal (en liaison hydrogène avec l'histidine axiale *via* un aspartate) ainsi qu'un deuxième radical tryptophanyle et un radical tyrosyle. Notons que la cytochrome *c* peroxydase qui possède le début de ce 'short stretch' et sept résidus tryptophanes forme également un radical sur tryptophane proximal. Parallèlement, la peroxydase de raifort, elle, ne possède pas de 'short stretch' ni de boucle dans sa structure, et un seul résidu tryptophane qui ne forme pas de radical protéique. Il semble donc, qu'avec l'évolution, la complexité des catalase-peroxydases

ait disparue pour que ces dernières soient plus performantes dans leurs réactions spécifiques avec des substrats.

A la suite de ces résultats, plusieurs perspectives de recherche se dégagent. L'utilisation de la mutagenèse dirigée va permettre d'approfondir la recherche du site de formation du radical tyrosyle chez les catalases de souches bactériennes. En ce qui concerne la catalase de foie de bœuf, des études de spectroscopie de masse sont en cours afin de localiser le site de formation du radical. Ceci nous permettra alors de mieux comprendre le rôle *a priori* essentiel de l'environnement du résidu dans la formation d'espèces radicalaires.

Dans le cas du projet sur les catalase-peroxydases, l'étude d'autres mutants de résidus tryptophanes de BpKatG, qui d'après nos résultats de spectroscopie RPE sont de bons candidats pour le site de formation du radical tryptophanyle est en cours. Toujours sur la base de nos résultats de spectroscopie RPE, des mutants de résidus tyrosines sont actuellement synthétisés par nos collaborateurs. Afin de déterminer la séquence de formation des espèces radicalaires, des études de réaction de compétition de substrats (sensés réagir avec des intermédiaires radicalaires différents) vont être réalisées. D'autres substrats, tels que le cytochrome *c*, vont être testés afin de déterminer s'il existe des substrats spécifiques à chaque intermédiaire radicalaire protéique observé.

Etant donné la courte durée de vie de certains intermédiaires $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, des techniques de mélange rapide, telles que le stopped flow ou le freeze-quench, sont nécessaires. Nous avons donc entamé des études combinant ces deux techniques et la spectroscopie RPE. Pour pouvoir établir une corrélation entre les résultats obtenus avec ces différentes techniques, nous sommes en train d'établir un protocole expérimental qui permettra d'attribuer les spectres d'absorption aux intermédiaires radicalaires. Par exemple, dans le cas de BpKatG, les trois espèces ($[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet+}_{330}]$, $[\text{Fe(IV)=O Trp}^{\bullet}]$ et $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$) présentent un spectre d'absorption électronique UV-visible de type 'oxoferryle'. En travaillant avec les différents mutants de BpKatG, nous espérons pouvoir attribuer un spectre UV-visible spécifique à chaque intermédiaire.

Des mutants de BpKatG (sur les résidus la Tyr238 ou le Trp111 notamment), qui ne possèdent pas d'activité catalase, vont également être étudiés afin de déterminer s'il existe une corrélation entre activité catalase, activité peroxydase et intermédiaires radicalaires protéiques formés.

ANNEXES

I. SPECIFICATIONS ET PREPARATIONS.

I.1-INSTRUMENTATION

RPE à 9 GHz	Spectromètre Bruker ES-300 avec une cavité standard TE102 équipé d'un cryostat Oxford Instrument à hélium liquide, d'un fréquencemètre Hewlett Packard modèle 5350B. Le traitement des données est réalisé avec le logicielle WINEPR de Brucker et le logiciel ORIGIN.
RPE à champ intense	Spectromètre construit par Dr. Sun UN. La source de micro-ondes est un synthétiseur (ELVA-1, Saint-Pétersbourg, Russie) de 95 GHz. Cette fréquence peut être multipliée en utilisant un doubleur ou un tripleur de fréquence (Radiometric Physics, Menkenheim, Allemagne), les fréquences de 190 et 285 GHz peuvent ainsi être atteintes. La puissance maximale de sortie est alors de 3 à 4 mW. La puissance micro-onde absorbée par l'échantillon est mesurée au moyen d'un bolomètre (QMC Instruments Ltd., Royaume-Uni). L'acquisition du signal se fait par ordinateur.
Absorption UV-visible	Spectromètre Uvikon 922. Les spectres sont mesurés sur la plage 200-700 nm, à la vitesse de 1000 nm.s ⁻¹ , à 10°C (bain thermostaté)
Stopped-flow	Spectrophotomètre SX20 d'Applied PhotoPhysics équipé d'un détecteur à diode array, connecté à un bain thermostaté pour réguler la température des seringues et de la cellule. Les analyses ont été effectuées grâce au programme Pro-K Global Analysis programm d'Applied PhotoPhysics.

I.2-ENZYMES.

Toutes les protéines dans ce travail de thèse ont été surexprimées et purifiées par le laboratoire de notre collaborateur Prof. Peter Loewen, Université de Manitoba, Winnipeg

Canada, à l'exception des enzymes ci-dessous, qui ont été achetés. La catalase de foie de bœuf provient de chez Boehringer et la catalase d'érythrocytes humains de chez Calbiochem. Pour la peroxydase de raifort, plusieurs lots ont été utilisés provenant de chez deux fournisseurs : Sigma-Aldrich et Biozyme. Hormis la catalase de foie de bœuf, les protéines commerciales ont été utilisées sans purification supplémentaire, mais des changements de tampon par centrifugation ont été réalisés.

1.3-PURIFICATION DE LA CATALASE DE FOIE DE BŒUF.

La purification de la catalase de foie de bœuf (BLC) a été réalisée en suivant la procédure décrite par Ivancich et *coll.*¹

La BLC est dialysée une première fois contre 1L de tampon Tris-HCL 25mM pour enlever le tampon initial. Le tampon est changé plusieurs fois puis la solution est dialysée sous agitation pendant toute la nuit. L'enzyme lavé est concentré par centrifugation, dans des centricones de 15mL.

L'enzyme est ensuite purifié par colonne échangeuse d'ions à 4°C. Le gel utilisé pour effectuer la séparation est du gel Whatman DE52.

On analyse chaque fraction en mesurant son spectre d'absorption électronique UV-visible. L'éluant est le tampon Tris 25mM, NaCl 50mM et dès que la bande d'absorption à 405 nm apparaît on augmente la proportion de sel de l'éluant pour atteindre, en fin de colonne Tris 25 mM, 120 mM en NaCl.

Les fractions récoltées sont regroupées selon leurs puretés et sont dialysées contre du tampon TRIS 25 mM. Après dialyse, les échantillons sont concentrés (centricones 100 puis 10).

1.4-MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LES EXPERIENCES RPE.

Dans ces expériences, les échantillons sont préparés à partir de protéine native. La concentration en hème est mesurée par spectrophotométrie d'absorption UV-visible en utilisant $\epsilon_{403}=100 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Le tampon utilisé est le Tris-maléate 50mM à différents pH allant de pH=5,2 à pH=8,2. La solution mère à 42 mM d'acide peracétique est préparée par dilution d'une solution d'acide

peracétique commerciale à 4,2M (32 %, Merck) dans du tampon Tris 0,1 M. Puis les dilutions successives sont effectuées avec du tampon Tris 50mM, pH=6.

Catalases.

Des expériences précédentes avec la catalase de foie de bœuf ont permis de mettre au point les conditions de réaction afin d'optimiser la quantité de radical tyrosyle formé : nombre d'équivalent d'acide peracétique ajoutés 30 par rapport à la BLC et le volume d'enzyme est 2,4 fois plus important que celui de l'oxydant.

Pour les autres catalases, les proportions volumiques ont été conservées et différents excès d'acide peracétique, temps de mélange, pH et température de réaction ont été testés.

Pour chaque catalase, la combinaison optimale n'est pas identique. Cependant, l'ajout d'acide peracétique 30 fois et 130 fois en excès permet de mettre en évidence les différents comportements pour chaque catalase sans que les protéines ne précipitent. La quantité de radical avec ces deux excès est suffisante pour enregistrer les spectres à 40K.

La préparation des échantillons RPE est réalisée de la façon suivante : la catalase est placée directement dans le tube RPE dans la glace. On ajoute ensuite l'acide peracétique directement dans le tube et on mélange pendant quelques secondes. Ensuite le tube RPE contenant la solution est congelé dans un mélange éthanol/carboglace puis plongé dans l'azote liquide.

L'échantillon ainsi obtenu est analysé par spectroscopie RPE. Un spectre à 4K et à 40K est enregistré.

Catalase-peroxydases.

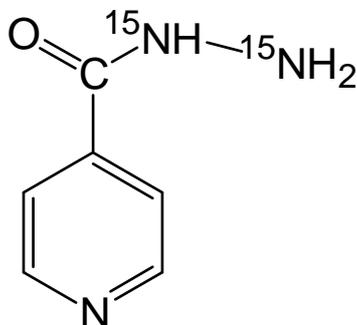
Pour les catalase-peroxydases, le meilleur rendement en radical est obtenu lorsque l'enzyme et l'acide peracétique sont mélangés en condition équivalente. Comme pour les catalases, différentes conditions de mélange ont été testées afin de déterminer les conditions optimales pour chaque enzyme.

Peroxydases.

Pour la peroxydase de raifort, l'oxydant utilisé est le peroxyde d'hydrogène qui est ajouté dans les proportions stœchiométriques, les volumes des deux réactifs étant identiques. La suite de la procédure est la même que celle utilisée pour les catalases.

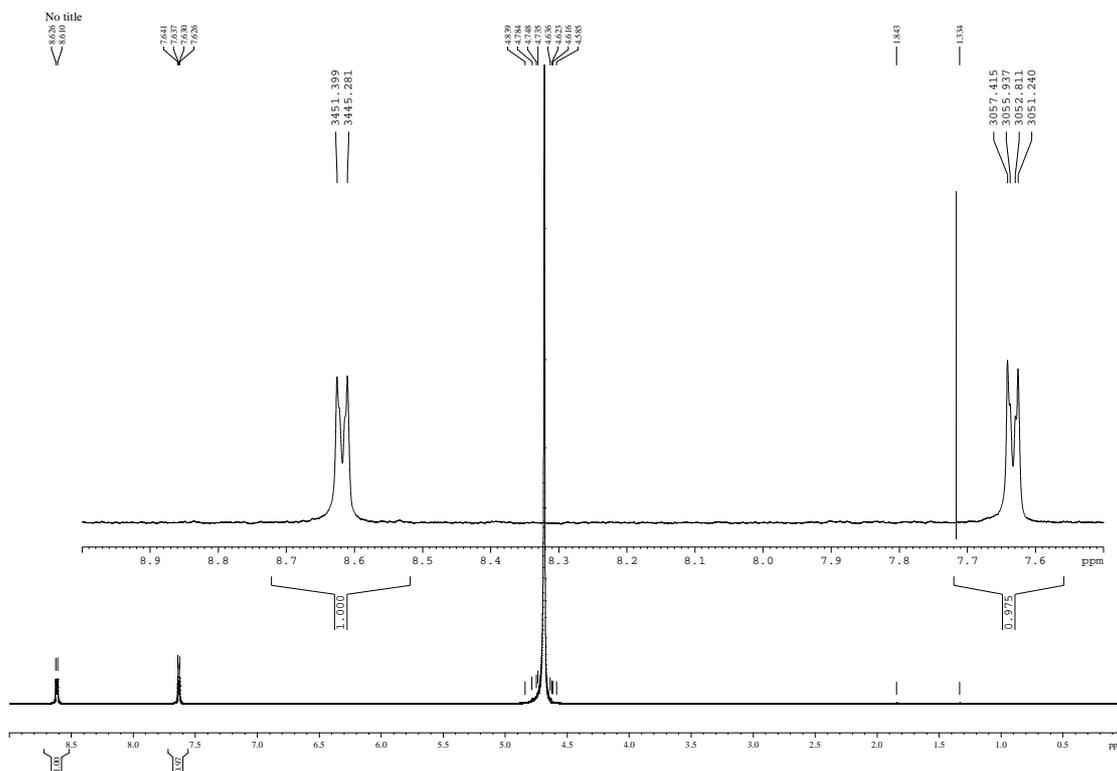
II. PROCEDURES EXPERIMENTALES DE CHIMIE ORGANIQUE

II.1-SYNTHESE DE L'ISONIAZIDE MARQUE A L'AZOTE 15



Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, sont placés l'hydrazine marquée à l'azote 15 (100mg, 1,93 mmol), l'isonicotinate d'éthyle (265 μ L, 1,75 mmol) et l'eau (300 μ L). Le mélange est chauffé à 70°C pendant trois heures. Il est ensuite refroidi pendant une heure dans un bain de glace jusqu'à apparition de cristaux blancs. La solution est alors filtrée sur filtre Büchner et les cristaux sont lavés trois fois avec du méthanol.

La formation de l'isoniazide a été vérifiée par spectroscopie RMN du proton.

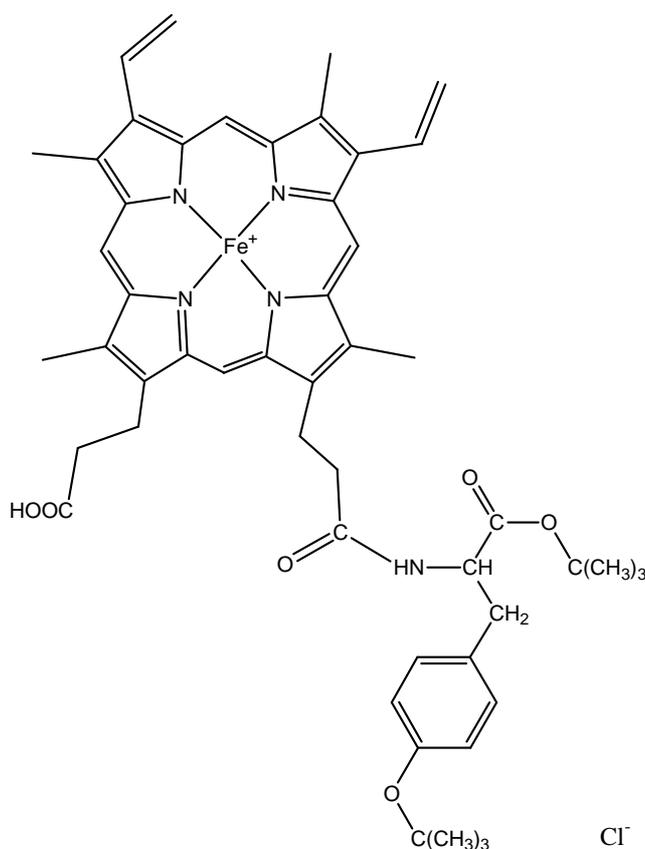


Formule Brute : $C_6H_7N^{15}N_2O$

Masse molaire : $139,13 \text{ g.mol}^{-1}$

Rendement : 87 %

II.2- SYNTHÈSE DU COMPOSE PROTOHEMINE-6-(7)-L-METHYL-ESTER DE LA TYROSINE



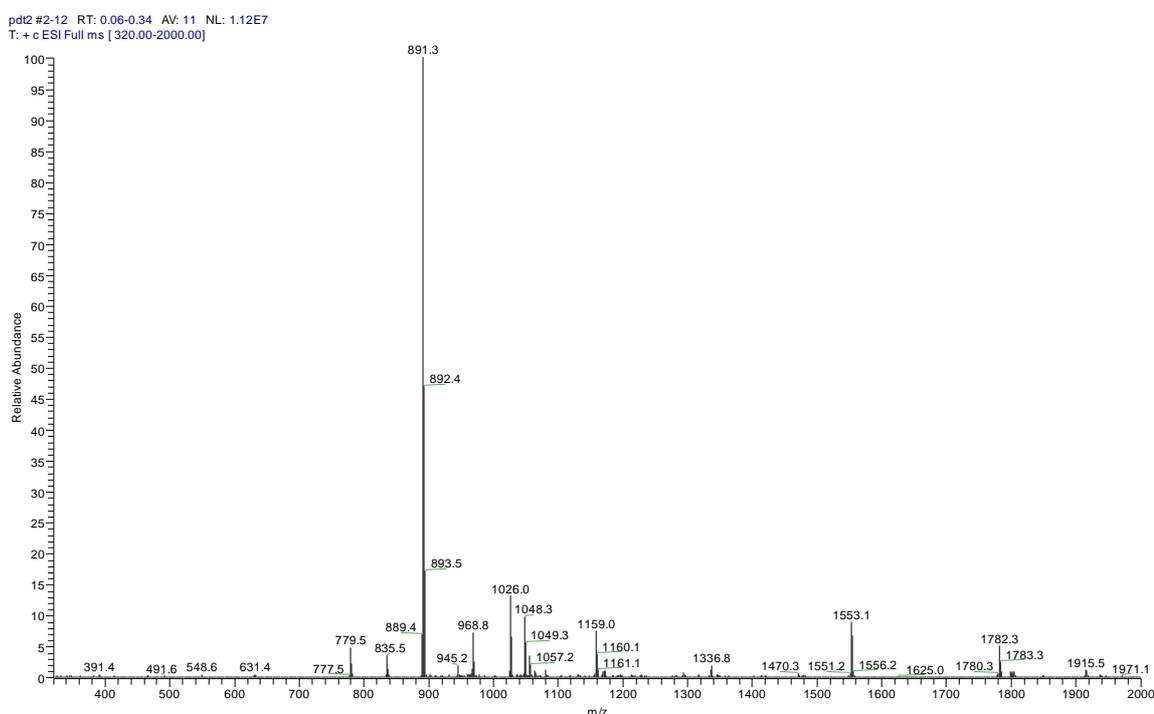
La condensation entre le chlorure de la protoporphyrine IX de fer et le dérivé de la tyrosine a été réalisée en suivant le protocole suivant^{2,3,4}:

Une solution contenant du chlorure de protoporphyrine IX de fer (300 mg; 0,46 mmol), les agents d'activation 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, 62,2 mg; 0,46 mmol), *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU, 174,5 mg; 0,46 mmol) ainsi que de la triéthylamine (255 μL) dans du DMF fraîchement distillé (10 mL) est agitée pendant 20 minutes à température ambiante.

Ensuite la tyrosine, protégée par deux fonctions tert-butyl (136,4 mg; 0,414 mmol), est ajoutée au milieu réactionnel. Le mélange est agité pendant deux heures à température ambiante, à l'abri de la lumière.

L'ajout d'eau (5 μ L) entraîne la précipitation du dérivé héminique. Le mélange est ensuite centrifugé et la phase solide est récupérée. Puis le mélange est lavé plusieurs fois par l'éther diéthylique afin d'éliminer les traces de solvant organique.

Le produit de mono-condensation est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant méthanol:dichlorométhane 1:9, v/v). Les solvants des fractions d'intérêt sont évaporés sous pression réduite. L'obtention du composé de mono-couplé a été confirmé par spectrométrie de masse ESI-MS avec un pic parent à m/z 891,2.

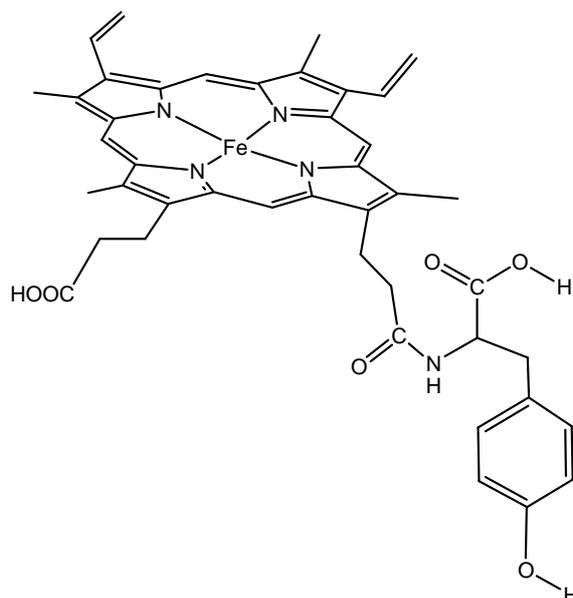


Formule brute : $C_{51}H_{57}ClFeN_5O_6/C_{51}H_{57}FeN_5O_6^+$

Masse molaire : 927,3 g.mol⁻¹/891,3 g.mol⁻¹

Rendement : 67 %

II.3- DEPROTECTION DE LA TYROSINE



La déprotection de la tyrosine a été réalisée selon le protocole suivant⁴:

La Protohème-6-(7)-L-méthyl-ester de la tyrosine tert-butylée est dissoute dans un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA, 475 μ L) et d'eau (25 μ L). La solution est agitée à température ambiante pendant trois heures à l'abri de la lumière. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. L'huile obtenue est lavée plusieurs fois par l'éther diéthylique, qui est éliminé par décantation puis filtration.

Formule brute : C₄₃H₄₁FeN₅O₆

Masse molaire : 779,24 g.mol⁻¹

Rendement : 12 %

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. A. Ivancich, H.-M. Jouve, B. Sartor, and J. Gaillard, EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: Formation of Porphyrin and tyrosyl Radical Intermediates, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 9356-9364.
2. L. Casella, E. Monzani, P. Fantucci, M. Gullotti, L. De Gioia, A. Strini, and F. Chillemi, Distortion Effects on the Catalytic and Binding Properties of Chelated Deuterohemim Complexes, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 439-444.
3. L. Casella, L. De Gioia, G. F. Silvestry, E. Monzani, C. Redaelli, R. Roncone, and L. Santagostini, Covalently modified microperoxidases as heme-peptide models for peroxidases, *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, *79*, 31-40.
4. E. Monzani, L. Linato, L. Casella, L. De Gioia, M. Favretto, M. Gullotti, and F. Chillemi, Synthesis, characterization and stereoselective catalytic oxidations of chelated deuterohaemin-glycyl-L-histidine complexes, *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, *273*, 339-345.

RESUME.

Les catalases, les peroxydases et les catalase-peroxydases sont des hémoprotéines, dont l'activité enzymatique essentielle est la régulation de la concentration cellulaire du peroxyde d'hydrogène. Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence et caractérisé, dans ces protéines, des intermédiaires réactionnels issus de l'oxydation de tyrosines et/ou de tryptophanes, alternatifs au composé I, $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$. La prise en compte de la formation de tels radicaux protéiques nous a amené à réexaminer le mécanisme des catalases et des peroxydases, jusque là centré sur l'oxydo-réduction de l'hème. Pour déterminer les structures électroniques et la réactivité des intermédiaires réactionnels, nous avons utilisé une approche multidisciplinaire combinant les spectroscopies de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) multifréquences (9-285 GHz), d'absorption électronique UV-visible par stopped-flow, ainsi que la mutagenèse dirigée et le marquage isotopique.

L'étude comparative de huit catalases, provenant de souches bactériennes et de mammifères, nous a permis de démontrer que la température de réaction, le pH et l'excès d'oxydant favorisent la formation de l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^{\bullet}]$, résultant du transfert d'électron intramoléculaire entre la tyrosine et la porphyrine dans les catalases de foie de bœuf, d'érythrocytes humains, de *B. abortus* et de *M. lysodeikticus*. Nos études ont montré que l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ est prédominant à $T \geq 20^\circ\text{C}$. Ceci explique pourquoi les études cinétiques de la littérature, pour lesquelles seule l'absorption UV-visible à température ambiante a été utilisée, n'avaient pas permis de mettre en évidence la formation du radical tyrosyle. Nos résultats expliqueraient aussi les différences d'efficacité de dismutation du peroxyde d'hydrogène de ces catalases. En effet, le transfert spontané d'électron entre la tyrosine et la porphyrine, favorisé dans certaines catalases, serait en compétition avec la réaction entre l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ et le peroxyde d'hydrogène.

Dans le cadre d'études spécifiques sur les catalase-peroxydases (KatGs) et en utilisant la catalase-peroxydase de *B. pseudomallei* comme cas d'étude, nous avons pu mettre en évidence la formation d'un radical tyrosyle et de deux intermédiaires tryptophanyles, dont l'un est formé sur le Trp330, équivalent au site radicalaire de la cytochrome *c* peroxydase. Nous avons démontré que l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$ réagit avec l'ABTS et que le $[\text{Fe(IV)=O Trp}_{330}^{\bullet+}]$ n'est pas l'intermédiaire réactif vis-à-vis de l'isoniazide (antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose). Notre étude comparative de sept catalase-peroxydases a démontré que le site de formation du radical tryptophanyle est unique pour chaque enzyme, mais peut différer entre deux protéines, ce qui expliquerait en partie leurs différences de réactivité vis-à-vis de l'ABTS et de l'isoniazide. Nous avons montré que dans les catalase-peroxydases, les radicaux protéiques peuvent jouer le rôle de cofacteurs dans l'oxydation des substrats et que le mécanisme de la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène diffère de celui des catalases monofonctionnelles.

Afin de comprendre les propriétés physico-chimiques permettant et favorisant la formation des radicaux protéiques, en tant qu'intermédiaires alternatifs à l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Por}^{\bullet+}]$, nous avons caractérisé une peroxydase de raifort reconstituée, dans laquelle l'hème a été remplacé par un hème lié par liaison covalente à une tyrosine ou à un tryptophane.