



HAL
open science

Etude du mécanisme d'activation de l'oxygène par les NO-Synthases

Albane Brunel

► **To cite this version:**

Albane Brunel. Etude du mécanisme d'activation de l'oxygène par les NO-Synthases. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112290 . tel-00795237

HAL Id: tel-00795237

<https://theses.hal.science/tel-00795237>

Submitted on 27 Feb 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

Ecole Doctorale de Chimie, ED 470
Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication
Discipline : Biochimie

THESE de DOCTORAT
présentée en vue de l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS SUD

Soutenue le 30 novembre 2012
Par

Albane BRUNEL

**Etude du mécanisme d'activation de l'oxygène
par les NO-Synthases.**

Directeur de thèse : Dr Pierre DORLET

Chercheur CNRS CR2 (CEA Saclay)

Composition du jury :

Président :

Pr Frédéric BANSE

Professeur (Université.Paris-Sud)

Rapporteurs :

Dr Jean-Luc BOUCHER

Chercheur CNRS DR2 (Université Paris Descartes)

Pr Bruno GUIGLIARELLI

Professeur (Université. Aix-Marseille)

Examineurs :

Dr Gilles TRUAN

Chercheur CNRS CR2 (INSA de Toulouse)

Dr Jérôme SANTOLINI

Chercheur CEA (CEA Saclay)

L'ensemble de ce travail a été réalisé sous la direction de Pierre DORLET et sous l'encadrement de Pierre DORLET et Jérôme SANTOLINI au :

Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication
UMR 8221
iBiTec-S, SB2SM
Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay
91191 Gif-sur-Yvette Cedex

en collaboration avec Cécile ROSELLI-SICARD et Sophie BERNAD au :

Laboratoire de Chimie Physique
UMR 8000
Université Paris-Sud
91405 Orsay Cedex

et en collaboration avec Manon COUTURE et Jérôme LANG au :

Département de biochimie, de microbiologie et de bioinformatique
PROTEO et IBIS
Université Laval,
Québec, Canada G1V 0A6

Résumé

Mots clefs :

NO-Synthases, Activation de l'oxygène, Tetrahydrobioptérine, Raman de résonance, Résonance paramagnétique électronique, Analyses en flux continu, *Stopped-flow*, *Freeze-quench*, Cryo-réduction.

Résumé :

Le monoxyde d'azote est exclusivement synthétisé chez les mammifères par une famille d'hémoprotéines, les **NO-Synthases**. Le cœur de l'activité des NO-Synthases est **l'activation de l'oxygène** c'est-à-dire l'activation de l'intermédiaire réactionnel $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Cette étape est contrôlée par la réactivité intrinsèque du fer, par les transferts de proton et les transferts d'électron. Elle doit être parfaitement maîtrisée car elle contrôle le chemin catalytique emprunté et la nature du produit final. Comprendre l'étape d'activation de l'oxygène est essentiel à la compréhension du rôle biologique et/ou pathologique de la NO-Synthase de mammifère. Cette question s'étend aux NO-Synthases bactériennes pour lesquelles on ne connaît ni le mécanisme moléculaire ni la fonction biologique.

Ce manuscrit propose une analyse approfondie de l'étape d'activation de l'oxygène de la NO-Synthase.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de l'environnement proximal sur la réactivité intrinsèque du fer et l'activation de l'oxygène. Nous avons généré des protéines mutées qui modifient les propriétés électroniques de la liaison proximale de l'hème. Ces protéines mutées ont été caractérisées par différentes spectroscopies (**résonance paramagnétique électronique, Raman de résonance**). Dans un second temps nous avons directement étudié le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, en présence d'analogues de substrat, grâce à des **analyses de cinétique rapide en flux continu** et en flux arrêté (*stopped-flow*). Dans un troisième temps, le rôle du cofacteur **tetrahydrobioptérine** dans le transfert de proton et d'électron a été étudié par une méthode de piégeage à des temps très courts : **le freeze-quench**. L'ensemble de nos résultats montrent que l'activation de l'oxygène est régulée par les propriétés électro-donneuses du ligand proximal et par le réseau de liaisons H distal. Nous mettons en évidence des différences dans le rôle redox du cofacteur tetrahydrobioptérine entre la NO-Synthase de mammifère et la NO-Synthase bactérienne.

La difficulté majeure pour comprendre l'étape d'activation de l'oxygène de la NO-Synthase réside dans la complexité et la rapidité de la réaction catalytique. Dans ce contexte, nous avons cherché à adapter une méthodologie qui a prouvé son efficacité dans le cas des cytochromes P450 : **la cryo-réduction** couplée à des sauts en température.

Summary

Key words :

NO-Synthases, Oxygen activation, Tetrahydrobiopterin, Resonance Raman, Electronic paramagnetic resonance, Continuous flow analysis, Stopped-flow, Freeze-quench, Cryo-reduction.

Abstract :

Nitric oxide is exclusively synthesized by **NO-Synthases** in mammals. The heart of the NO-synthase activity is **oxygen activation**, which corresponds to the activation of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ intermediate. This step depends on the heme electronic properties and on the electron and proton transfers. Oxygen activation has to be well mastered to control exactly the nature of the end-product. Understanding the oxygen activation step is necessary to better understand the biological/pathological role of the mammalian NO-Synthases. Furthermore, bacterial NO-Synthases function and oxygen activation mechanism are unknown.

This PhD work proposes a deep analysis of the oxygen activation step in NO-Synthases.

First, proximal environment has been studied with mutated proteins. These mutations impact the electronic properties of the heme proximal bond. Spectroscopic analyses of these mutants have been done by **electron paramagnetic resonance** and **resonance Raman**. Then, we have studied the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ intermediate with substrate analogs which has necessitated **continuous flow** and **stopped-flow analyses**. Finally, the role of the **tetrahydrobiopterin** cofactor in the electron and proton transfer has been studied and clarified thanks to a very fast trapping method : the **freeze-quench**. Our results show that the oxygen activation step is elaborately controlled by the proximal bond electron donation and the distal H bond network. At the same time we show some differences between mammalian and bacterial NO-Synthases concerning the redox role of the tetrahydrobiopterin cofactor.

The major obstacle to understand the oxygen activation step resides in the complexity of the active site chemistry and the rate of catalytic reactions. For this reason, we propose to adapt an already successful protocol to trap some intermediates in the cytochromes P450 mechanism : **cryo-reduction** coupled with temperature jumps.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury : **Messieurs Jean-Luc Boucher, Bruno Guigliarelli, Frédéric Banse, Gilles Truan.** Merci de me faire l'honneur de juger mon travail. Je vous en suis reconnaissante et vous souhaite une agréable lecture.

Merci à ceux qui m'ont donné envie de me lancer dans cette aventure et dans la recherche d'une manière plus générale : **Cécile Danel, Claude Vaccher et Arlette Baillet.**

Merci au CEA, à la DSV, à l'iBiTec-S, au SB2SM, au LSOD et plus spécifiquement au **programme IRTELIS** d'avoir cru en moi pour ce projet de thèse.

Merci à mon directeur de thèse **Pierre Dorlet**, toujours attentif, disponible. Merci pour ton expertise scientifique d'excellence, tes relectures patientes et efficaces. Je ne pouvais pas rêver mieux comme directeur de thèse. Merci de m'avoir tout appris sur le monde de la résonance paramagnétique électronique.

Je souhaite particulièrement adresser ma reconnaissance à **Jérôme Santolini** pour son encadrement. Merci de m'avoir toujours emmenée dans des directions fructueuses pour mes résultats scientifiques mais aussi pour moi. Merci pour la liberté que tu m'as laissée dans la gestion de mon quotidien, et pour toutes nos discussions enrichissantes. Merci de m'avoir tout appris sur les NO-Synthases et leurs doubles jeux.

Merci à nos collaborateurs, acteurs essentiels pour la réalisation de cette thèse : **Cécile Roselli-Sicard et Sophie Bernad** du LCP d'Orsay (pour la cryo-réduction), **Manon Couture et Jérôme Lang** de l'Université de Laval au Québec (pour les analyses en flux continu), **Jean-Luc Boucher** de l'Université Paris V (pour la synthèse des analogues d'arginine).

Même si je ne vous ai jamais rencontrés, Merci à vous **thésards** qui m'ont précédés au laboratoire, vos travaux ont été plus qu'un soutien pour mes expériences et ma réflexion autour de la NO-Synthase (et un merci tout particulier pour le parfait cahier de laboratoire d'Amandine)

Merci à tout le SB2SM et plus spécialement à **Hervé Bottin** pour le prêt de la boîte à gant, à **Adjélé Wilson** pour son encadrement en biologie moléculaire et **Sun Un** pour sa participation aux analyses RPE haut champ.

Merci à ceux qui ont partagé mon bureau et ont rendu ces trois années plus que joyeuses et agréables : **Isabelle, Yohan, Sané, Floriane, Mehdi, Laura, Noelia, Jérôme G, Ludovic.**

Merci à ma co-thèse préférée, **Sané** pour ces 2 années passées ensemble. Merci pour ta présence, pour nos discussions et nos recherches "google" atypiques... Bon courage pour ta troisième année... Merci de m'avoir fait découvrir la Tunisie et ta culture. Tu vas me manquer.

Pour tous les moments de discussions, les rotondes, les anniversaires, les réunions de laboratoire bimensuelles, je remercie tous les membres du LSOD : **Annie, François, Marcel, Stéphane, Alain, Anis, Kevin, Anaïs, Lionel, Angélique, Laura, Cécile, Pierre, Jérôme, Sané, Mehdi, Jérôme G., Isabelle, Bosco.**

Merci à tous les étudiants du bâtiment 532 pour tous les bons moments passés ensemble : **Amin, Tiona, Areski, Denise, Maria, Elisabeth, Michal, Denis, Qian, Margaux, Stéphanie et Paul.**

Je remercie mes meilleurs amis du monde, **Claire et Benjamin** (et Castille), **Manon et François-Xavier** (et Léopold et ...), **Hélène et Nicolas** (et Ombeline et Jacques), **Elise et François** (et Etienne et ...), **Inès et Louis, Domitille et Loïc, Cécile et Nicolas, Jean-Benoît, Sané**, pour tous les moments passés ensemble, pour votre soutien, votre amitié et votre fidélité plus que précieuse.

Un petit clin d'œil plus spécial à mes trois fidèles compagnones de routes : **Domitille** (et nos 9 années de colocations...), **Manon** (et notre incroyable virée péruvienne...), **Claire** (et notre aventure à Malaga...)

Merci à ma famille, à **mes parents** (les meilleurs du monde), à mes frères : **Quentin, Etienne et Clément** (les meilleurs du monde aussi), à ma cousine **Emmanuelle**, pour votre présence et votre soutien indéfectible dans les moments les plus importants de ma vie.

Merci à **Gatien** d'avoir vécu cette thèse avec moi, de m'avoir soutenue, d'avoir partagé avec moi les bons (et parfois aussi les mauvais...) moments. Merci pour ta patience ces derniers mois, et pour ton aide précieuse concernant la superbe mise en page Word de cette thèse.

Merci à **Constance** et **Ana** de m'inspirer autant pour mon nouveau projet professionnel.

Liste des abréviations

4-amino-BH ₄	4-aminotetrahydrobioptérine
4-CF ₃ phgua	4-trifluorophénylguanidine
4-Clphgua	4-chlorophénylguanidine
4-Fphgua	4-fluorophénylguanidine
4-MeOphgua	4-méthoxyphénylguanidine
5-Me-BH ₄	5-méthyl-tetrahydrobioptérine
A ou Ala	Alanine
Arg	L-Arginine
ADN	L'acide désoxyribonucléique
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	L'acide ribonucléique
ATP	L'adénosine tri-phosphate
ATR-FTIR	<i>Attenuated Total Reflection – Fourier Transformed InfraRed Spectroscopy</i>
baNOS	NO-synthase isolée de <i>Bacillus anthracis</i>
BH ₂	7,8-dihydro-L-bioptérine ou dihydrobioptérine
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-bioptérine ou tetrahydrobioptérine
BS	Bas spin
BSA	Albumine de sérum bovin
bsNOS	NO-synthase isolée de <i>Bacillus subtilis</i>
CaM	Calmoduline
Cit	L-Citrulline
CO	Monoxyde de carbone
cpI	<i>Compound I</i>
Cys	Cystéine
δ-ala	Acide δ-amino-lévulinique
DO	Densité optique
drNOS	NO-synthase isolée de <i>Deinococcus radiodurans</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
eNOS ou NOS 3	NO-synthase endothéliale
F ou Phe	Phénylalanine
Fe ^{II}	Fer ferreux

Fe ^{III}	Fer ferrique
Fe ^{IV}	Fer ferryl
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GC	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
gsNOS	NO-synthase isolée de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
H ou His	Histidine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
Hb	Hémoglobine
HS	Haut spin
IMDZ	Imidazole
iNOS ou NOS 2	NO-synthase inductible
iNOSoxy	Domaine oxygénase de NO-synthase inductible
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
KPi	Phosphate inorganique de potassium
MCAC	<i>Metal Chelate Affinity Chromatography</i>
L ou Lys	Lysine
Liaison H	Liaison hydrogène
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NED	N-éthylènediamine
NMDR	Récepteur du N-Méthyl-D-Aspartate
nNOS ou NOS 1	NO-synthase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NO [•]	Nitroxyle
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
NOHA	N ^ω -hydroxy-L-arginine
NOS	NO-synthase
NOSoxy	Domaine oxygénase de NO-synthase
NOSred	Domaine réductase de NO-synthase
NR	NADPH-nitrate réductase
O ₂ ^{•-}	Superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
P450	Cytochromes P540

PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyle
RNOS	Espèces réactives dérivées de l'azote et de l'oxygène
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RR	Raman de résonance
saNOS	NO-synthase isolée de <i>Staphylococcus aureus</i>
scNOS	NO-synthase isolée de <i>Sorangium cellulosum</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
stNOS	NO-synthase isolée de <i>Streptomyces turgidiscabies</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
THF	Tétrahydrofolate
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
W ou Trp	Tryptophane
WT	Protéine sauvage (<i>Wild Type</i>)
Y ou Tyr	Tyrosine
ZFS	<i>Zero Field Splitting</i>

Sommaire

Résumé	5
Summary	7
Remerciements	9
Liste des abréviations	13
Sommaire	17
Introduction	21
CHAPITRE 1 Le monoxyde d'azote et les NO-Synthases	25
1. Le Monoxyde d'azote et les NO-Synthases de mammifères.....	27
1.1. Rôle du monoxyde d'azote dans la signalisation cellulaire.....	27
1.2. Rôle du monoxyde d'azote et de ses dérivés dans la cytotoxicité.....	29
1.2.1. Processus biologiques liés à la cytotoxicité du monoxyde d'azote et de ses dérivés.....	30
1.2.2. Processus pathologiques liés à la cytotoxicité du monoxyde d'azote et de ses dérivés.	31
2. Le monoxyde d'azote et les NO-Synthases bactériennes	34
3. Structure des NO-Synthases	37
3.1. Structure du monomère	37
3.2. Formation et structure des dimères	40
3.3. Structure du site actif.....	43
4. Mécanisme moléculaire des NO-Synthases	46
4.1. Etape 1 : hydroxylation de l'arginine.....	46
4.1.1. Initiation de la réaction	46
4.1.2. Activation de l'oxygène.....	47
4.1.3. Nature des intermédiaires réactionnels.....	48
4.1.4. Rôle du cofacteur dans le processus de transfert d'électrons	52
4.1.5. Processus de transfert de protons	54
4.1.6. Rôle de l'environnement proximal dans la première étape	56
4.2. Etape 2 : oxydation de la N ^ω -hydroxy-arginine.....	57
4.2.1. Initiation de la réaction et activation de l'oxygène	57
4.2.2. Nature des intermédiaires réactionnels.....	58
4.2.3. Rôle du cofacteur dans le processus de transfert d'électrons	61
4.2.4. Processus de transfert de protons	62
4.2.5. Rôle de l'environnement proximal dans la seconde étape	63
5. Objectifs des études réalisées pendant la thèse.....	64

CHAPITRE 2 Matériels et méthodes	67
1. Expression et purification des NO-Synthases	69
1.1. Expression et purification de la NO-Synthase inductible sauvage	69
1.2. Expression et purification de la NO-Synthase de <i>Bacillus subtilis</i> sauvage.....	71
1.3. Expression et purification des mutants de la NO-Synthase de <i>Bacillus subtilis</i>	71
2. Test d'activité enzymatique : le test de Griess	72
3. Préparation des différents complexes héminiques de NOS	74
3.1. Préparation de la NO-Synthase à l'état Fe ^{III}	74
3.2. Réduction du fer.....	75
3.3. Fixation de ligands distaux.....	76
4. Techniques spectroscopiques utilisées pour l'étude des différents complexes de NOS	77
4.1. La spectroscopie UV-visible	77
4.2. La spectroscopie de Raman de résonance	80
4.2.1. Quelques généralités sur la spectroscopie de Raman de résonance.....	80
4.2.2. La spectroscopie de Raman de résonance pour l'étude des complexes héminiques des NO-Synthases.....	82
4.3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)	84
4.3.1. Quelques généralités sur l'ATR-FTIR.....	84
4.3.2. L'ATR-FTIR pour l'étude du complexe Fe ^{II} CO des NO-Synthases	85
4.4. La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)	86
4.4.1. Quelques généralités sur la spectroscopie RPE	86
4.4.2. La spectroscopie RPE pour l'étude des complexes héminiques des NO-Synthases	90
5. Cinétiques rapides pour étudier l'étape d'activation de l'oxygène	92
5.1. Cinétique d'activation de l'oxygène : principe du <i>stopped-flow</i>	92
5.2. Piégeage de l'état radicalaire du cofacteur : principe du <i>freeze-quench</i>	95
5.3. Etude du complexe Fe ^{II} O ₂ par Raman de résonance : cinétiques en flux continu.....	99
6. Nouvelle approche méthodologique pour l'étude des NO-Synthases : Etudes cryogéniques.....	101
CHAPITRE 3 Activation de l'oxygène	103
1. Influence de l'environnement proximal sur l'activation de l'oxygène : étude de la mutation du tryptophane Trp 66 de <i>Bacillus subtilis</i>.....	105
1.1. Introduction	105
1.2. Effet de la mutation sur l'équilibre haut spin – bas spin	107
1.3. Effet de la mutation sur l'effet <i>push</i>	111
1.4. Effet de la mutation sur la stabilité de la liaison fer-soufre.....	119
1.5. Effet de la mutation sur la production catalytique de bsNOS	124

1.6. Conclusion	127
2. Influence de l'environnement distal sur le complexe Fe^{II}O₂ : étude d'analogues de substrats	129
2.1. Introduction.....	129
2.2. Etudes des cinétiques de formation et de disparition de l'espèce Fe ^{II} O ₂	134
2.3. Etudes des propriétés électroniques de la liaison O-O	142
2.4. Conclusion	148
3. Rôle du cofacteur dans le processus de transfert d'électron et de proton.....	151
3.1. Introduction.....	151
3.2. Rôle du cofacteur BH ₄ dans l'étape d'oxydation de l'arginine par la NO-Synthase inductible	153
3.3. Rôle du cofacteur BH ₄ et de THF dans l'étape d'oxydation de l'arginine par la NOS de <i>Bacillus subtilis</i>	160
3.4. Rôle du cofacteur BH ₄ dans l'étape d'oxydation du NOHA par la NO-Synthase inductible	168
3.5. Rôle du cofacteur BH ₄ et THF dans l'étape d'oxydation du NOHA par la NOS de <i>Bacillus subtilis</i>	178
3.6. Conclusion	183
CHAPITRE 4 Nouvelle approche cinétique pour l'étude du mécanisme moléculaire des NO-Synthases	185
1. Introduction	187
2. La cryo-réduction du fer par irradiation gamma	190
2.1. Intégrité fonctionnelle et structurale des NO-Synthases	190
2.1.1. Intégrité des propriétés électroniques du site actif	190
2.1.2. Intégrité fonctionnelle du site actif de iNOSoxy et bsNOS	194
2.2. Evaluation de l'efficacité de l'irradiation gamma pour initier la réaction	197
2.2.1. Etude de la réduction du fer de l'hème	197
2.2.2. Effet de la dose d'irradiation sur le rendement de réduction.....	200
2.2.3. Effet du substrat, du cofacteur et des conditions d'aérobicité sur le rendement de réduction.	202
2.3. Conclusion	207
3. Sauts en température pour observer la fixation des gaz CO ou O₂ sur le fer	208
3.1. Introduction.....	208
3.2. Etude de la fixation du ligand CO sur le fer	208
3.3. Sauts en température en présence de dioxygène : études préliminaires.....	221
3.4. Conclusion et perspectives	223
Conclusion	225

Bibliographie	229
Annexes.....	243
<i>Annexe 1 : The Proximal Hydrogen Bond Network Modulates Bacillus subtilis Nitric-oxide Synthase Electronic and Structural Properties</i>	<i>245</i>
<i>Annexe 2 : Electron Paramagnetic Resonance Characterization of Tetrahydrobiopterin Radical Formation in Bacterial Nitric Oxide Synthase Compared to Mammalian Nitric Oxide Synthase.....</i>	<i>263</i>
<i>Annexe 3 : A Novel Cryo-Reduction Method to Investigate the Molecular Mechanism of Nitric Oxide Synthases</i>	<i>281</i>
<i>Annexe 4 : Valeurs des modes vibrationnels et valeurs de g des complexes héminiques des NO-Synthases caractérisées par spectroscopie Raman de résonance et par spectroscopie RPE.</i>	<i>299</i>

Introduction

La première découverte du rôle biologique du **monoxyde d'azote** (NO) date de 1976 [1]. Depuis cette date, les recherches sur la biochimie de NO ont abouti à la publication de plus de 200 000 articles scientifiques. Le NO a été élu molécule de l'année par le magazine Science en 1991 et en 1998 le **prix Nobel de médecine** est remis à trois chercheurs américains (R. Furchgott, L. Ignarro, et F. Murad) pour leurs travaux sur NO comme molécule de signalisation dans le système cardiovasculaire. Depuis cette découverte plusieurs autres fonctions de NO ont été identifiées [2]. Il exerce un rôle majeur dans la **signalisation** intercellulaire au premier rang desquels la neurotransmission.

Cependant, NO est au cœur d'un **paradoxe**. En tant que radical, il est susceptible de réagir avec les métaux de transition, les radicaux libres, les acides gras insaturés et les groupements thiols et va avoir un effet sur l'activité, la structure et la fonction de ces molécules [3, 4]. Ceci confère au NO une fonction **cytotoxique** retrouvée dans la réponse immunitaire non spécifique [5-7] mais aussi dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires ou les maladies auto-immunes [4].

L'unique source enzymatique de NO chez les **mammifères** sont les **NO-Synthases** (NOS). La compréhension du mécanisme de ces NOS est un défi majeur. Cela permettrait de mieux appréhender leurs rôles dans la signalisation cellulaire, leurs fonctions cytotoxiques et l'équilibre entre ces deux activités biologiques contradictoires. Outre ce paradoxe, une autre source d'interrogation concerne les **NOS bactériennes**. Elles sont couramment utilisées comme modèles alors que leurs rôles et mécanismes sont, certes, débattus mais encore très peu élucidés.

Plusieurs modèles pour le **mécanisme moléculaire** ont été proposés par analogie à celui des cytochromes P450 mais il reste majoritairement non résolu à ce jour. Ce manuscrit résume l'ensemble des expérimentations réalisées pendant mes 3 années de thèse pour mieux comprendre une étape clé de ce mécanisme moléculaire : **l'activation de l'oxygène**.

Dans un premier temps, nous avons voulu approfondir le rôle et l'importance de **l'environnement proximal** de l'hème sur la réactivité du fer et l'activation de l'oxygène. Pour sonder cet environnement des **mutations spécifiques** ont permis de modifier le réseau de liaisons hydrogènes (liaison H) proximal. Les mutants ont ensuite été caractérisés par diverses spectroscopies (la spectroscopie UV-Visible, la **résonance paramagnétique électronique**, le **Raman de résonance**) ([8], Annexe 1).

Dans une seconde partie nous avons étudié le réseau de liaisons H de l'environnement distal de l'hème. Des **analogues de substrats** nous ont permis de modifier ce réseau de liaisons H et l'effet de ces modifications sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ a pu être étudié par des méthodes de cinétique rapides en **flux arrêté (stopped-flow)** et en **flux continu** (réalisées à l'université de Laval, Québec).

Dans un troisième temps, nous avons étudié le rôle du **cofacteur tetrahydrobioptérine** (BH_4) dans le transfert de proton(s) et d'électron nécessaires à l'activation de l'oxygène. Nous avons piégé le cofacteur à l'état radicalaire en stoppant la réaction par congélation rapide (le **freeze-quench**) et nous avons analysé son rôle dans le cas de la NOS de mammifère et dans le cas de la NOS bactérienne ([9], Annexe 2).

L'ensemble de mes travaux de thèse mettent en évidence la limite des méthodes de cinétique classiques pour répondre à toutes les interrogations subsistantes sur le mécanisme moléculaire de la NOS. C'est pour cela que nous proposons une **nouvelle approche méthodologique** pour l'exploration de ce mécanisme. Cette méthode est développée dans le Chapitre 4 de cette thèse et implique **l'irradiation** d'échantillons congelés couplée à des **sauts en température** ([10], Annexe 3).

CHAPITRE 1

Le monoxyde d'azote et les NO-Synthases

1. Le Monoxyde d'azote et les NO-Synthases de mammifères

1.1. Rôle du monoxyde d'azote dans la signalisation cellulaire

L'unique source de monoxyde d'azote (NO) chez les mammifères est la protéine NO-Synthase (NOS). NO a une 1/2 vie d'une seconde environ. C'est une petite molécule radicalaire et hydrophobe ayant une très bonne diffusion à travers les membranes. De ce fait, c'est une molécule de choix pour la signalisation cellulaire.

Activation de la guanylate cyclase :

Parmi ses cibles biologiques on retrouve des hémoprotéines telles que la guanylate cyclase (GC). NO se fixe au fer à l'état Fe^{II} avec une très grande affinité et cela entraîne la rupture de la liaison entre le fer et son ligand proximal : une histidine (His). Ce changement de coordination entraîne une modification de la conformation de la protéine ce qui va ainsi l'activer et induire la synthèse de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) [11]. La GMPc est un médiateur cellulaire qui va activer différentes kinases du tissu cible (les protéines kinases G, les MAP-kinases suivant le contexte) qui régulent le taux de calcium intracellulaire. Ce dernier contrôle de nombreux processus biologiques.

Signalisation NO dans le système vasculaire :

La vasodilatation est un exemple de phénomène biologique issu de la signalisation NO (Figure 1) [12, 13]. Des messagers cellulaires, dépendants des forces hémodynamiques du flux sanguin, vont permettre d'activer la NOS endothéliale (eNOS ou NOS 3) qui est exprimée de manière constitutive dans l'endothélium, l'épithélium et les cardiomyocytes [14, 15]. Le NO libéré va atteindre les cellules musculaires lisses, va activer la GC et permettre la production de GMPc. Cela provoque une cascade de signalisations aboutissant à la diminution de l'affinité de la myosine pour le calcium et entraînant ainsi la relaxation des muscles lisses et la vasodilatation.

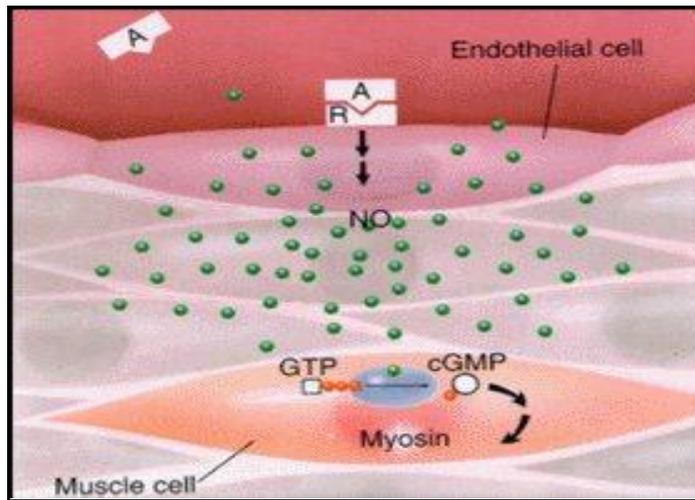


Figure 1 : Représentation de la diffusion de NO des cellules endothéliales vers les cellules musculaires lisses et activation de la GC. Formation de GMPc et cascade de signalisations entraînant la relaxation musculaire. (www.nobelprize.org)

Au niveau cardiovasculaire, la signalisation NO participe également à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la régulation de la contractilité cardiaque, l'angiogénèse, la régulation de la barrière endothéliale, l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles, la perméabilité vasculaire, le contrôle de l'érection. Il a également un rôle anti-apoptotique et antiprolifératif. Chez les souris *knockout* de eNOS on observe une augmentation de la pression sanguine, une accélération du rythme cardiaque, une hypertrophie du ventricule gauche [16].

Signalisation NO dans le système nerveux :

Une autre activité de signalisation via l'activation de la GC est localisée au niveau cérébral (Figure 2). La libération de glutamate par le neurone pré-synaptique va activer le récepteur à la N-Méthyle-D-Aspartate (NMDR). Ce dernier ouvre le canal calcique et permet l'entrée massive de calcium dans le neurone post-synaptique. Les fortes concentrations en calcium activent la NOS neuronale (nNOS ou NOS 1), elle aussi exprimée de manière constitutive. Le NO libéré va diffuser dans la synapse et se propager vers les neurones avoisinants. Il va pouvoir se fixer sur la GC pré-synaptique et cela aura pour effet un rétrocontrôle positif sur la libération de glutamate. Ce phénomène est à l'origine de la potentialisation à long terme (LTP). La LTP persistante est corrélée aux mécanismes de mémorisation, notamment dans l'hippocampe. Ces voies de signalisation et de communication neuronale seraient impliquées dans les processus de mémorisation, d'apprentissage, de plasticité synaptique [17-20].

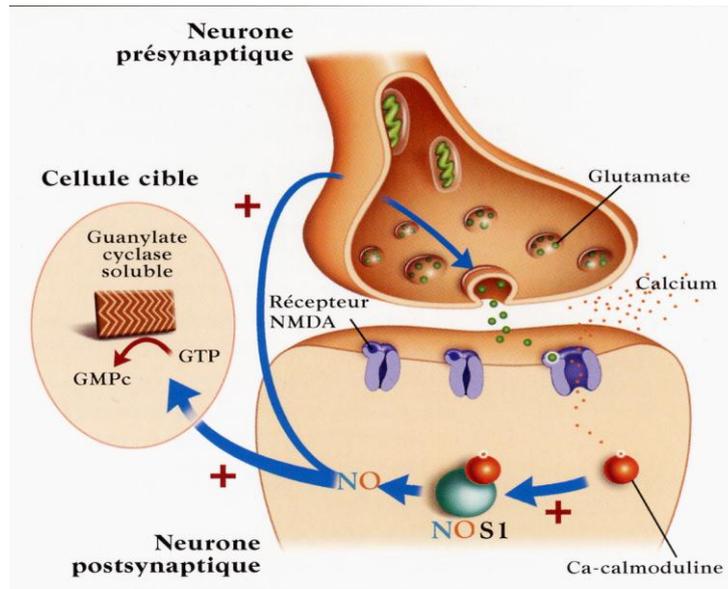


Figure 2 : Représentation de la libération du glutamate par le neurone pré-synaptique, activation du récepteur NMDA post synaptique, ouverture des canaux calciques et activation de nNOS post-synaptique, libération de NO et rôle positif sur le neurone pré-synaptique via l'activation de GC.

NO a de nombreuses autres fonctions sur le système nerveux central et périphérique [20, 21]. Il participe au contrôle de la libération de neurotransmetteurs (dopamine, acétylcholine, noréphédrine, gaba, sérotonine, histamine). Par ce biais, NO est donc un élément important de la régulation neuroendocrinienne (libération de glucocorticoïdes, d'hormones) et de la régulation comportementale (agressivité, dépression, performance, appétit). NO intervient également dans la régulation des mouvements péristaltiques intestinaux.

Autres fonctions de signalisation de NO :

La signalisation NO passe aussi par l'activation ou l'inhibition des protéines de transcriptions (Mn-SOD, IRP-1, PARP, NFκB, p21ras, PKC, IκB) qui participent à la régulation de la respiration mitochondriale, à l'homéostasie du calcium et de l'eau, à la régulation du cycle cellulaire et la défense redox de la cellule [22-25].

1.2. Rôle du monoxyde d'azote et de ses dérivés dans la cytotoxicité

Les espèces réactives dérivées de l'azote et de l'oxygène :

La cytotoxicité de NO est induite par ses produits dérivés : les espèces dérivées de l'azote et de l'oxygène (les RNOS) issues de la réactivité de NO avec les électrons et l'oxygène présents dans la cellule (Figure 3). On retrouve différentes espèces (ONOO^- , NO^- , NO^+ , HNO , NO_2^- , NO_2^+ , NO_2^+ ,

NO_3^- , N_2O_3 et N_2O_4) ayant chacune un degré d'oxydation qui va leur conférer des propriétés réactives différentes [26-28].

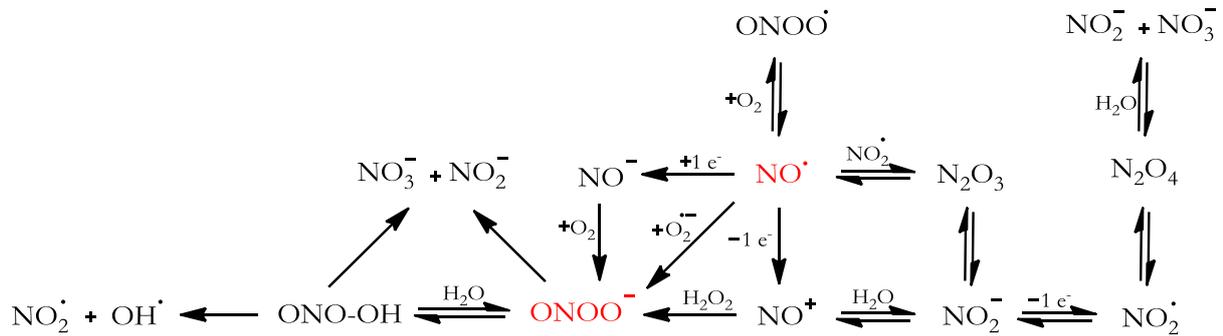


Figure 3 : Formation des espèces réactives dérivées de l'azote et de l'oxygène. Outre la réaction entre NO et le superoxyde, le peroxynitrite peut être aussi produit par la réaction entre NO· et le dioxygène ou NO+ et le peroxyde d'hydrogène.

Parmi ces RNOS, la molécule la plus toxique connue à ce jour est le peroxynitrite (ONOO^-) issu, entre autres, de la réaction de NO avec le superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et la xanthine oxydase sont activées au cours de nombreux processus cellulaires mais génèrent une grande quantité de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Afin d'éviter une accumulation trop importante de cette espèce extrêmement réactive, la superoxyde dismutase (SOD) localisée dans les mitochondries, le cytoplasme et le compartiment extracellulaire élimine cette espèce. Cependant NO et $\text{O}_2^{\cdot-}$ réagissent ensemble de manière extrêmement rapide [29]. Pendant une réaction inflammatoire, la quantité de NO produite est suffisante pour entrer en compétition avec la SOD, réagir avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ et produire ONOO^- .

1.2.1. Processus biologiques liés à la cytotoxicité du monoxyde d'azote et de ses dérivés

NO et les RNOS sont des médiateurs cellulaires qui ont un rôle cytotoxique utilisé au profit de plusieurs processus biologiques notamment pour la réponse immunitaire non spécifique.

La NOS inductible (iNOS ou NOS 2) est la seule des trois NOS de mammifère à ne pas être exprimée constitutivement. Un agent pathogène va déclencher la libération de nombreuses cytokines chez son hôte : l'interleukine 1 (IL1), le *tumor necrosis factor* α (TNF- α), l'interféron γ (IFN- γ) par exemple. L'ensemble de ces cytokines et le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries activent des signaux de transductions (le facteur nucléaire NF- κ B par exemple) qui induisent la transcription d'iNOS dans les macrophages (entre autres) [30-32] et provoque la libération massive de NO [33]. La toxicité de NO sur l'agent pathogène est ensuite induite par les RNOS (Figure 4). NO et ses dérivés vont pouvoir inhiber directement de manière réversible ou irréversible la ribonucléotide

réductase (enzyme responsable de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) [34]). Cela provoque une diminution de la prolifération bactérienne [31, 34, 35].

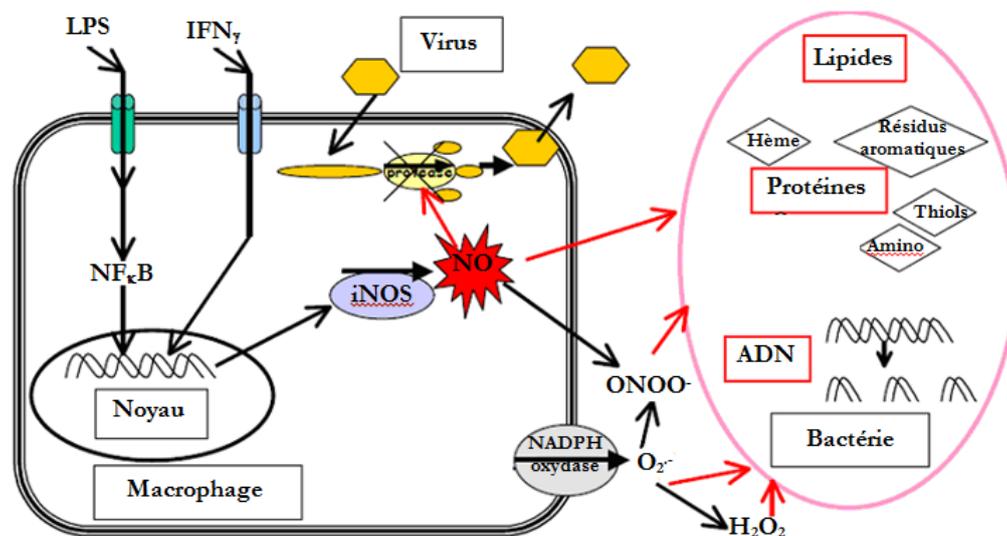


Figure 4 : Représentation de l'induction de iNOS dans le macrophage sous l'action de stimuli tels que le LPS et $IFN\gamma$ et de la réponse immunitaire non spécifique induite par NO qui agit soit seul soit de concert avec le superoxyde sous forme de peroxydite [36].

NO et ses dérivés réagissent également avec les résidus aromatiques, les résidus thiols ou les résidus aminés des protéines bactériennes. Ils provoquent la peroxydation lipidique, interagissent avec les protéines à hème et augmentent globalement le stress oxydant dans le pathogène aboutissant à la formation de lésions dans l'ADN et à la mort de la bactérie. NO est aussi un agent antiviral en nitrosylant des résidus cystéines (Cys) présents dans les protéases virales. Il inhiberait alors l'activité de l'enzyme et interromprait ainsi le cycle vital du virus [31].

Les propriétés cytotoxiques de NO et de ses produits dérivés leur confèrent des rôles majeurs dans la réponse immunitaire non spécifique. Outre son rôle d'agent antimicrobien, il est essentiel aux réponses anti-tumorales, au processus apoptotique, à la défense redox de la cellule.

1.2.2. Processus pathologiques liés à la cytotoxicité du monoxyde d'azote et de ses dérivés.

L'ensemble des RNOS peut aussi générer un stress oxydant dans les cellules de l'hôte. En plus de diminuer la biodisponibilité de NO, $ONOO^-$ est un oxydant très puissant qui réagit avec de nombreux composants de la cellule [37].

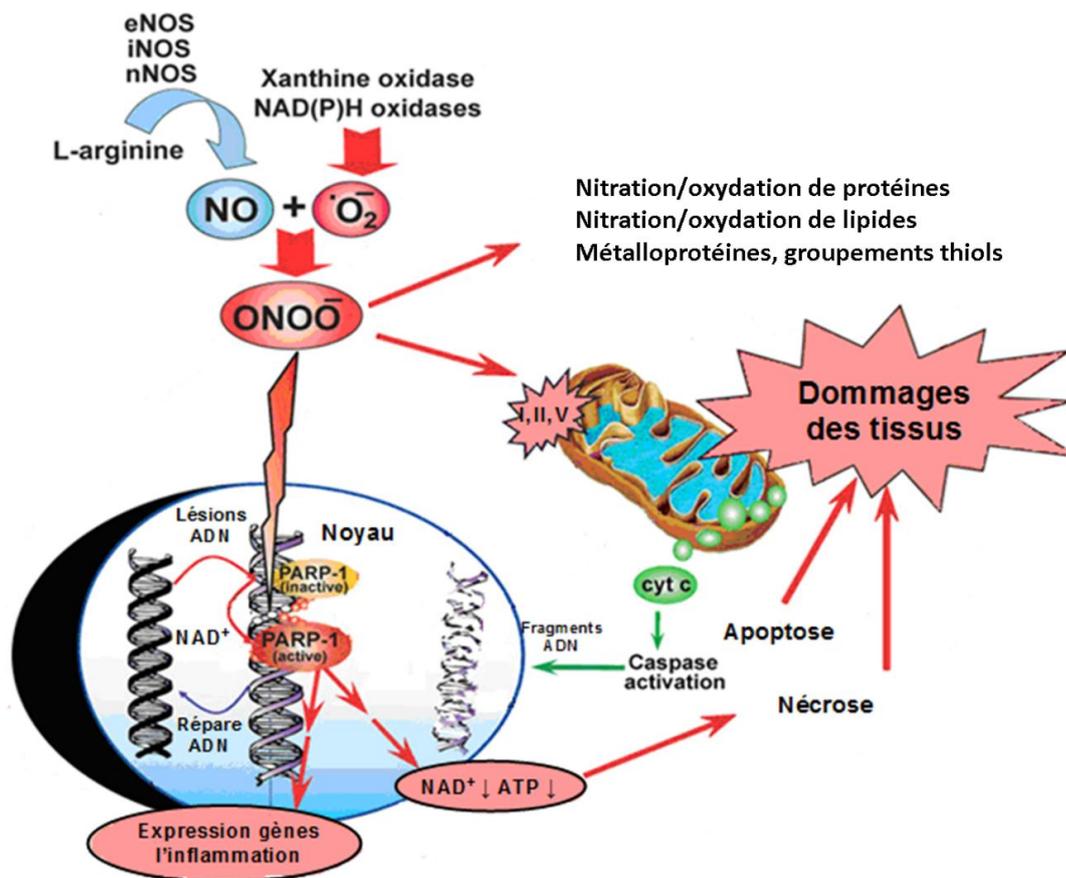


Figure 5 : Représentation de la toxicité du peroxy-nitrite sur les différents composants de la cellule. (Image adaptée de Pacher *et al.* [4])

Le peroxy-nitrite inhibe de manière irréversible des enzymes ayant des métaux de transition dans leurs cycles catalytiques, provoque des lésions de l'ADN, inhibe les complexes I, II et V de la mitochondrie, suractive la poly ADP-ribose polymérase I (PARP I, une enzyme de réparation de l'ADN) qui consomme beaucoup d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) et provoque une déplétion en ATP dans la cellule. L'ensemble de ces dégâts cellulaires peuvent aboutir à la mort non programmée des cellules : la nécrose cellulaire (Figure 5).

De par ces fonctions délétères, la synthèse de NO et de ses produits dérivés est reconnue comme étant un facteur aggravant dans de nombreuses pathologies : athérosclérose, arthrite, rejet de greffes, inflammations chroniques, inflammations aiguës, maladie de Crohn, lupus, psoriasis, chocs septique, asthme, emphysème, bronchiolite, pneumonies, sclérose latérale amyotrophique, épilepsie, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, ischémie cérébrale, promotion de la croissance des tumeurs et des métastases, angiogénèse, hypertension, accident vasculaire cérébral, infarctus, hépatites, diabète, maladies ophtalmiques, anémie falciforme...[4, 37].

Exemple : rôle toxique du peroxy-nitrite dans la maladie de Parkinson

Les réactions de nitration ou nitrosation de protéines réalisées par les RNOS et le ONOO^- plus spécifiquement tiennent un rôle important dans les processus de maladies neurodégénératives

[38-40]. A titre d'exemple la nitration de la protéine α -synucléine participe à la formation des corps d'inclusions retrouvés dans les neurones dopaminergiques de la maladie de Parkinson (Figure 6). En condition physiologique normale, la protéine α -synucléine existe en équilibre entre deux formes. La première est associée à la membrane et la seconde est cytosolique.

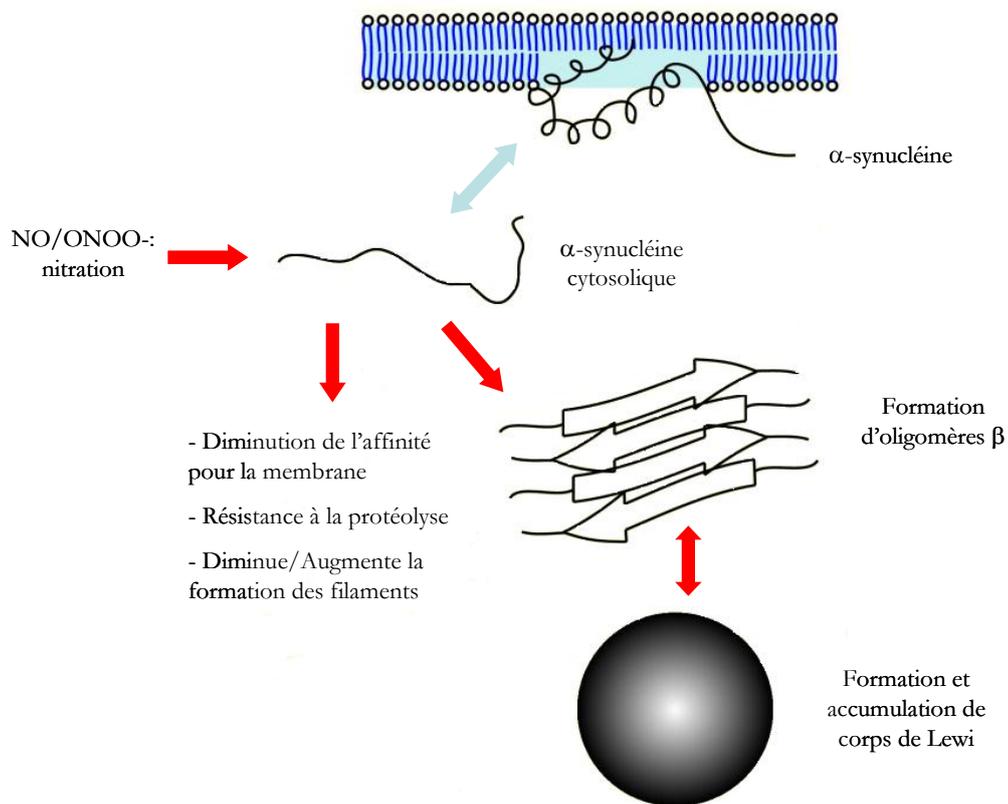


Figure 6 : Implication de NO et des ses dérivés dans la formation des corps d'inclusions présents dans les neurones dopaminergiques de la maladie de Parkinson (adaptée de creativecommons.org).

La nitration de cette protéine va changer plusieurs de ses caractéristiques. Tout d'abord son affinité à la membrane est diminuée. Ensuite, elle résiste mieux à la protéolyse et augmente (à basse concentration) ou diminue (à forte concentration) la formation de filaments (éléments essentiels du cytosquelette). Enfin, cette nitration favorise la conformation en feuillets β de la protéine [41]. Cette dernière est alors favorable à la formation de corps de Lewi qui s'accumulent dans les neurones dopaminergiques lors de la maladie de Parkinson.

NO est donc une molécule polyvalente chez les mammifères. Elle est à la fois essentielle à de nombreux processus biologiques mais participe au développement de certaines pathologies. Dans l'état actuel des connaissances, il est donc primordial d'étudier la source de cette molécule, la NOS. Etudier son mécanisme moléculaire et comprendre les

tenant et aboutissant de la synthèse de NO pourront apporter des éclaircissements sur cette double fonctionnalité et donner de nouvelles pistes pour palier les effets délétères.

2. Le monoxyde d'azote et les NO-Synthases bactériennes

L'activité de synthèse de NO chez les bactéries est le plus souvent associée à des réactions de dénitrification impliquant des enzymes qui ne présentent aucune homologies de séquences avec les NOS de mammifères [42]. Cependant, grâce aux avancées réalisées récemment dans le domaine de la génomique, il est maintenant connu qu'en plus des mammifères, les oiseaux, les insectes, les poissons, les mollusques et certaines bactéries possèdent des gènes homologues à ceux des NOS [43]. Chez les bactéries, les protéines correspondantes à ces gènes ont été baptisées NOS bactériennes. Cependant, *in vivo*, la fonction de ces protéines est encore sujette à débat.

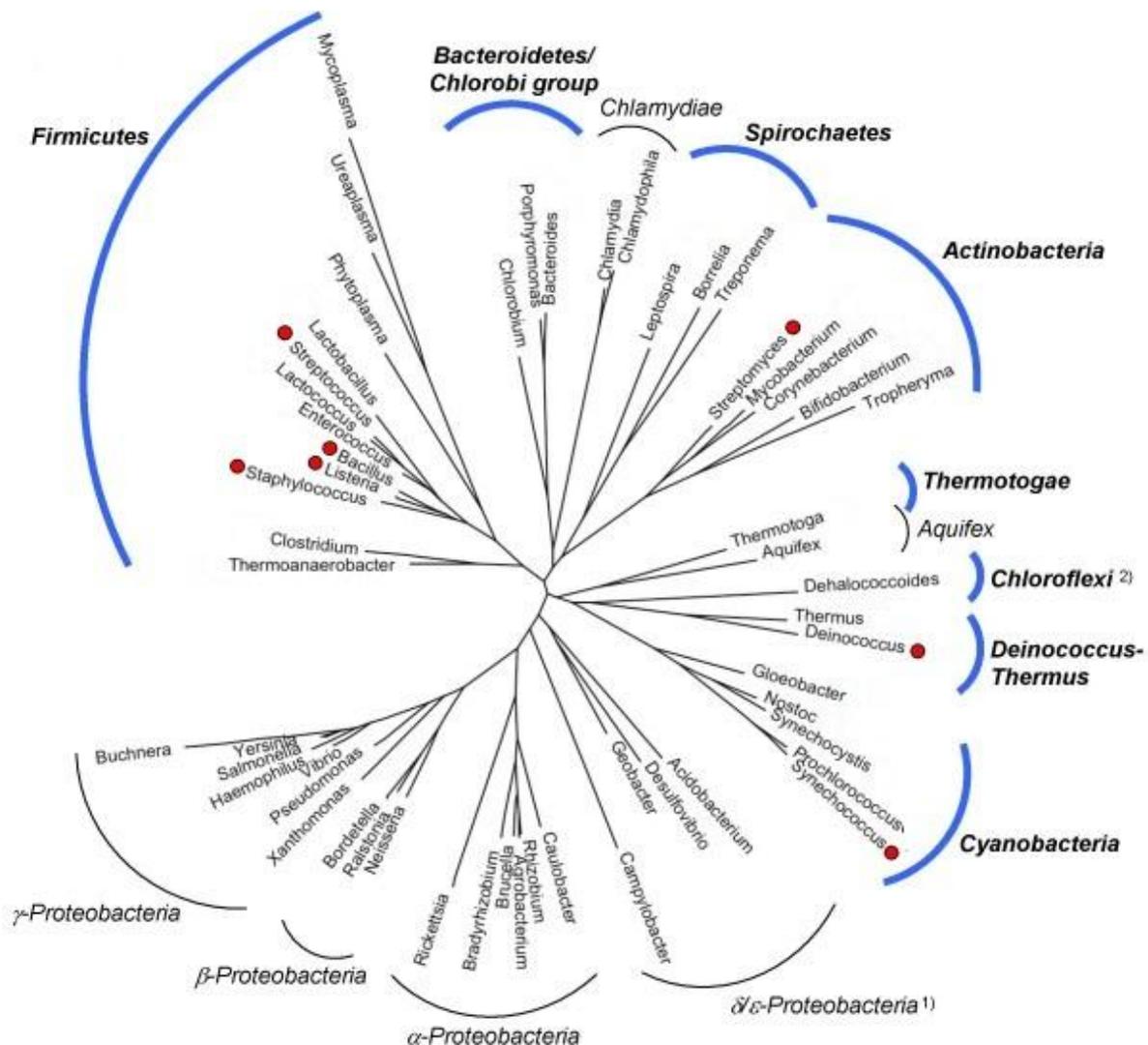


Figure 7 : Arbre phylogénétique et exemple de quelques familles de bactéries possédant le gène de la NO-Synthase (marquées d'un point rouge).

Les bactéries ayant une séquence codant pour la NOS bactérienne sont principalement à Gram positif. Cela inclut notamment l'ordre des firmicutes, des actinobactéries et des deinnocoques (Figure 7). On la retrouve dans une bactérie à gram négatif, une cyanobactérie et un archéon. Plusieurs équipes ont montré que la NOS bactérienne était capable de produire NO *in vivo*. Des résultats semblent indiquer que la formation de ce gaz a bien lieu avec la NOS dans le cas de *Streptomyces turgidiscabies*, *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus anthracis* [44-46].

NOS de *Streptomyces turgidiscabies* :

La production de NO chez *Streptomyces turgidiscabies* par sa NOS (stNOS) a été démontrée par piégeage radicalaire (*spin trapping*) *in situ* sur des cultures bactériennes [45]. Le gène de stNOS est co-localisé avec des gènes responsables de la synthèse de la thaxtomine, une toxine de plante responsable de la gale commune de la pomme de terre [47]. Le NO permettrait la nitration de cette toxine sur un groupement tryptophanyle. Une fois le gène de NOS retiré de la bactérie, elle n'est alors plus capable de synthétiser la thaxtomine. Sa production peut être restaurée par l'ajout de NOS exogène [48]. De plus l'arginine (substrat de la NOS) marquée à l'azote 15 (¹⁵N) permet de montrer que l'azote du groupe NO₂ de la thaxtomine provient bien du groupement guanidinium de l'arginine.

NOS de *Deinococcus radiodurans* :

Dans le cas de *Deinococcus radiodurans*, la nitration d'un acide aminé tryptophane (Trp) d'un ARN de transfert (4-nitro-TrpARNt^{Trp}) a été démontrée *in vitro*. Une interaction protéine-protéine entre drNOS et la Trp-ARNt-synthase permettrait cette nitration dont la fonction exacte n'est pas encore connue [49, 50]. Il a été, également, établi que l'activité NO-synthase de drNOS est impliquée dans les mécanismes de réponse au stress tel que le stress UV. Suite à l'exposition à ce stress l'expression de la NOS est induite. La synthèse de NO va, à son tour, induire l'expression du gène *obgE* qui est un acteur essentiel de la réponse au stress et de la prolifération bactérienne. Ainsi la NOS a un rôle dans la régulation transcriptionnelle de *Deinococcus radiodurans* soumis à un stress [51]. Elle est essentielle aux mécanismes de résiliences de la bactérie.

NOS de *Bacillus subtilis* :

La NOS de *Bacillus subtilis* (bsNOS) serait, quant à elle, impliquée dans la résistance au stress oxydant [46, 52]. NO pourrait activer certains gènes afin de protéger la bactérie d'un stress nitrosant ou oxydant. *Bacillus subtilis*, *knockout* de bsNOS, semble extrêmement sensible au stress oxydant avec la présence de nombreux thiols réduits [46]. Les thiols réduits recyclent le Fe^{II} et favorisent les réactions de Fenton qui génèrent des radicaux hydroxyles. Il est proposé que NO bloque cette voie de recyclage par S-nitrosation des thiols libres (Figure 8).

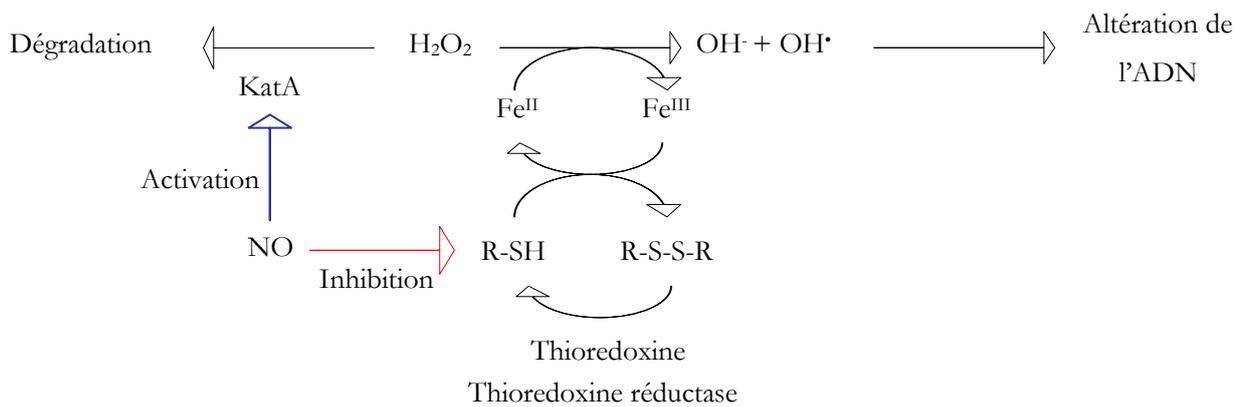


Figure 8 : Mécanisme proposé pour l'activité de protecteur redox de NO dans le cas de *Bacillus subtilis*.

NO pourrait également activer directement la catalase KatA, responsable de la dégradation du peroxyde [44]. NO aurait donc un rôle de cytoprotection dans le cas de *Bacillus subtilis*.

NOS de *Bacillus anthracis* :

La NOS de *Bacillus anthracis* (baNOS) aurait une implication dans la virulence de la bactérie. *Bacillus anthracis knockout* de baNOS perdrait toute sa pathogénécité et aurait une survie beaucoup plus limitée chez son hôte [46]. Le NO, parmi d'autres molécules, pourrait participer au stress oxydant généré au cours d'un contact hôte-pathogène afin de neutraliser/affaiblir l'hôte.

Résistance aux antibiotiques :

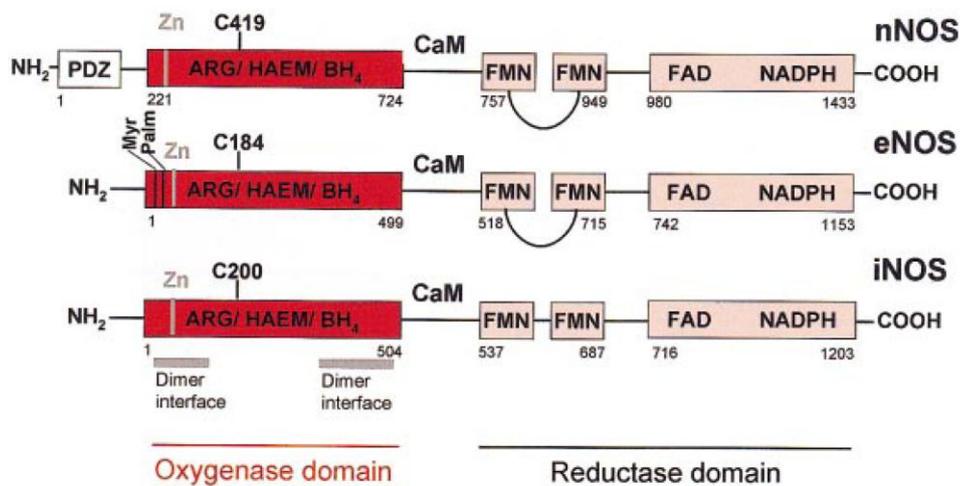
Il a été montré que la NOS bactérienne est une protéine impliquée dans des mécanismes de résistances aux antibiotiques. Cet effet a été observé sur un large panel de bactéries. En présence de la NOS bactérienne l'antibiotique serait moins efficace car il pourrait être chimiquement modifié par des réactions de nitration ou nitrosation [53]. La NOS bactérienne pourrait également participer à la réduction du stress oxydant généré par de nombreux antibiotiques.

Le rôle de la NOS bactérienne est encore peu compris. On remarque que les fonctions qui lui sont attribuées à ce jour sont très variées et parfois contradictoires : cytoprotection pour *Bacillus subtilis*, virulence pour *Streptomyces turgidiscabies* et *Bacillus anthracis*, résistance aux antibiotiques. Mais cela donne un intérêt tout particulier à l'étude des NOS bactériennes car, dans la lutte contre les pathogènes multi-résistants, de nouvelles cibles thérapeutiques doivent être trouvées. Les NOS bactériennes pourraient bien constituer des cibles potentielles pour de futurs antibiotiques.

3. Structure des NO-Synthases

3.1. Structure du monomère

La NOS est une protéine homo-dimérique. La [Figure 9](#) représente une structure schématique des trois monomères de NOS de mammifère. Chacun des monomères contient 2 domaines : un domaine oxygénase (en rouge) et un domaine réductase (en rose).



[Figure 9](#) : Représentation schématique de la structure du monomère de NOS de mammifère. Le domaine oxygénase est en rouge. Le domaine réductase est représenté en rose. La partie N-Terminale diffère selon l'isoforme [54].

Le domaine oxygénase :

C'est dans le domaine oxygénase (en rouge sur la [Figure 9](#)), situé du côté N-terminal qu'a lieu la réaction catalytique. La NOS réalise dans un premier temps l'oxydation de l'arginine en N^o-hydroxy-arginine (NOHA). Dans un second temps le NOHA est oxydé en L-citrulline (Cit) avec production concomitante d'une molécule de NO ([Figure 10](#)).

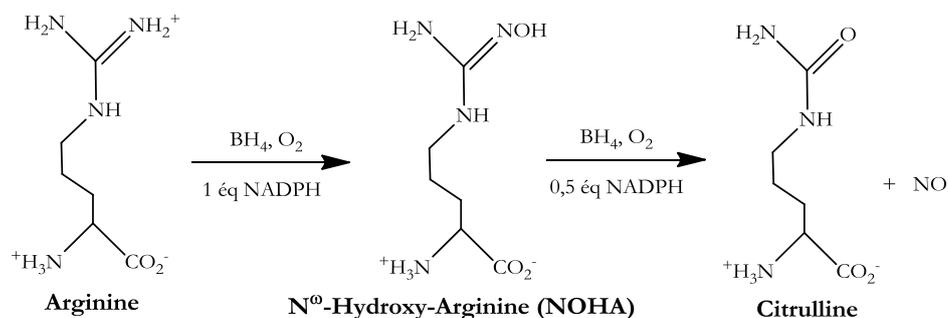


Figure 10 : R\u00e9action en deux \u00e9tapes catalys\u00e9e dans le domaine oxyg\u00e9nase de la NOS. L'arginine est oxyd\u00e9e en NO et citrulline en passant par la formation d'une esp\u00e8ce interm\u00e9diaire : la N^o-hydroxy-arginine [55].

Le domaine oxyg\u00e9nase est constitu\u00e9 des \u00e9l\u00e9ments n\u00e9cessaires \u00e0 la synth\u00e8se de NO c'est \u00e0 dire du site de fixation du substrat (Arg ou NOHA), du site de fixation du cofacteur tetrahydrobiopt\u00e9rine (BH₄) (**Figure 11**), du site de fixation de l'h\u00e8me. L'h\u00e8me, situ\u00e9 au c\u00f4eur du site actif, est une protoporphyrine de fer de type IX (**Figure 11**) et le fer a pour ligand proximal une cyst\u00e9ine (Cys 419 pour nNOS, Cys 184 pour eNOS ou Cys 200 pour iNOS humaines).

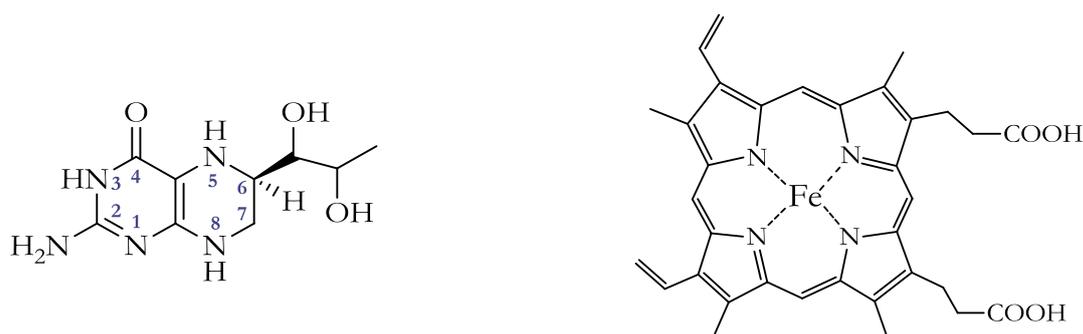


Figure 11 : Repr\u00e9sentation chimique du cofacteur tetrahydrobiopt\u00e9rine et de l'h\u00e8me.

La partie oxyg\u00e9nase est reli\u00e9e au domaine C-terminal par un inter-domaine correspondant au site de reconnaissance de la calmoduline (CaM) qui est un senseur de calcium. Pour les deux NOS constitutives (eNOS et nNOS) la fixation de calcium sur CaM permet d'activer la prot\u00e9ine en favorisant le transfert d'\u00e9lectron du domaine r\u00e9ductase vers le domaine oxyg\u00e9nase [56, 57]. Dans le cas de iNOS, le calcium est toujours fix\u00e9 sur la CaM et iNOS est exprim\u00e9e directement sous forme active.

Le domaine r\u00e9ductase :

Le domaine C-terminal correspond au domaine r\u00e9ductase (en rose sur la **Figure 9**), il contient les sites de fixation de la flavine ad\u00e9nine dinucl\u00e9otide (FAD), de la flavine mononucl\u00e9otide (FMN) et du NADPH [56, 58, 59]. Ce domaine est responsable de l'acheminement des \u00e9lectrons n\u00e9cessaires \u00e0 la r\u00e9duction du fer situ\u00e9 dans le domaine oxyg\u00e9nase. Les transferts d'\u00e9lectrons au sein du domaine

réductase sont soumis à des régulations extrêmement complexes et sont le sujet de plusieurs revues [60-62].

Différences entre les isoformes :

Il y a environ 60 % d'homologie de séquence entre les différentes NOS de mammifères. Les deux NOS constitutives (eNOS et nNOS) ont des séquences supplémentaires nécessaires à leurs localisations cellulaires (Figure 9). La nNOS contient un domaine PDZ en zone N-terminale. Ce domaine est un site de reconnaissance et va permettre à nNOS d'être accolée au récepteur NMDA qui, lui aussi, a un domaine PDZ (voir 1.1.). Les sites de myristoylation (Myr) et palmitoylation (Palm) de eNOS lui permettent d'être ancrée à la membrane plasmique.

Cas des NOS bactériennes :

Les homologies de séquences entre la NOS de mammifère et la NOS bactérienne se limitent au domaine oxygénase et sont d'environ 44 %. Aucune bactérie n'a montré la présence d'une séquence codant pour le domaine réductase directement rattaché au domaine oxygénase à l'exception de *Sorangium cellulosum* [63] et de certaines cyanobactéries [64, 65]. Comme la NOS de mammifère, le domaine oxygénase contient le site de fixation de l'hème et le site de fixation du substrat (Figure 12, partie en rouge). En revanche le site de fixation du cofacteur est modifié par rapport à la NOS de mammifère. La poche de fixation est beaucoup plus ouverte et la nature du cofacteur de la NOS bactérienne n'est pas encore déterminée à ce jour.

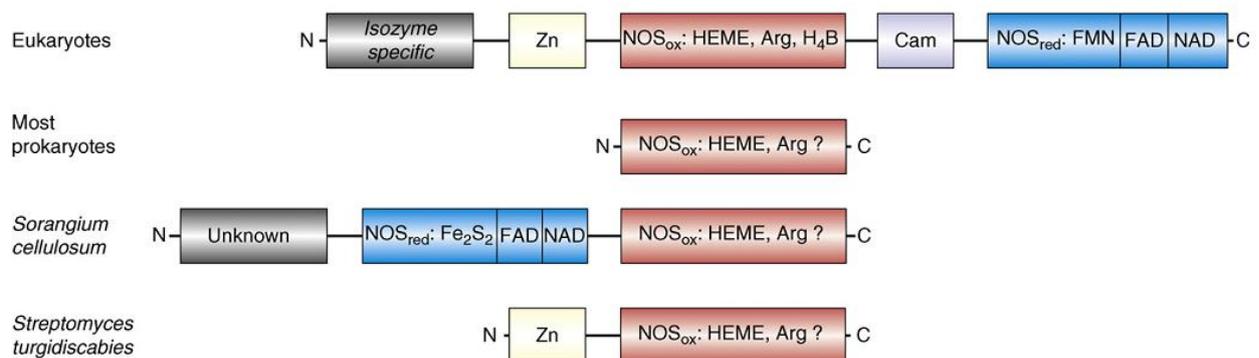


Figure 12 : Représentation schématique de la structure des NOS de procaryotes comparée à celle des eucaryotes [66].

Plusieurs protéines ont été proposées comme jouant le rôle de réductase pour la NOS bactérienne. La flavodoxine dans le cas de bsNOS s'est avérée être un bon donneur d'électron pour la synthèse de NO *in vitro* [67]. D'autres études ont montré que la NOS de *Deinococcus radiodurans* (drNOS) pouvait produire NO quand un domaine réductase de NOS de mammifère lui était apposé [68]. En revanche, des réductases mult flaviniques telles que la sulfite réductase se sont avérées

inefficaces pour remplir le rôle de réductase avec la NOS bactérienne [69]. Enfin, il est proposé que la NOS bactérienne puisse produire NO sans réductase spécifique. Elle pourrait utiliser les partenaires redox disponibles dans la bactérie et de manière non spécifique [52].

Sorangium cellulosum est une bactérie gram négative qui fait exception sur ce point. Sa NOS (scNOS) est composée d'un domaine oxygénase (en position C-terminale) rattaché de manière covalente à un domaine réductase (en position N-terminale) [63] (Figure 12). Le site de fixation de FMN est remplacé par un centre fer-soufre dans le cas de scNOS, capable de réaliser des transferts à 1 électron. Les sites de fixation de FAD et de NAD sont conservés permettant ainsi au NADPH de rester le dernier donneur d'électron (Figure 12) vers le domaine oxygénase.

Le site de fixation du zinc, présent en position N-terminale dans le cas des NOS de mammifère (Figure 9), n'est pas retrouvé dans le cas de la NOS bactérienne à l'exception de *Streptomyces turgidiscabies* (Figure 12). Ce site, important pour la dimérisation de la NOS de mammifère, ne semble pas indispensable à la dimérisation de la NOS bactérienne.

L'absence de réductase et la nature du cofacteur pour les NOS bactériennes sont encore des sujets très controversés et soulignent les différences structurales qui existent entre les NOS de mammifères et les NOS bactériennes mais aussi entre les NOS bactériennes elles mêmes.

3.2. Formation et structure des dimères

Les NOS de mammifères sont des protéines dimériques ayant un poids moléculaire de 131 kDa pour iNOS, 133 kDa pour eNOS et 161 kDa pour nNOS. La forme dimérique est stabilisée par plusieurs éléments. La structure cristallographique a pu mettre en évidence une boucle N-terminale avec une zone en forme de "lasso" et une zone en forme de crochet (Figure 13). La partie lasso interagit avec les cofacteurs de chaque monomère [70]. Le site de fixation du zinc serait situé dans la zone "crochet". Cet atome de zinc aurait un rôle structural permettant la stabilisation du dimère (gain de 8 liaisons hydrogène) et le maintien de l'intégrité de la poche de fixation de BH₄ [71-74] (Figure 13). Toutefois, en son absence, les résidus cystéines sont engagés dans des ponts disulfures qui permettent également la dimérisation [75].

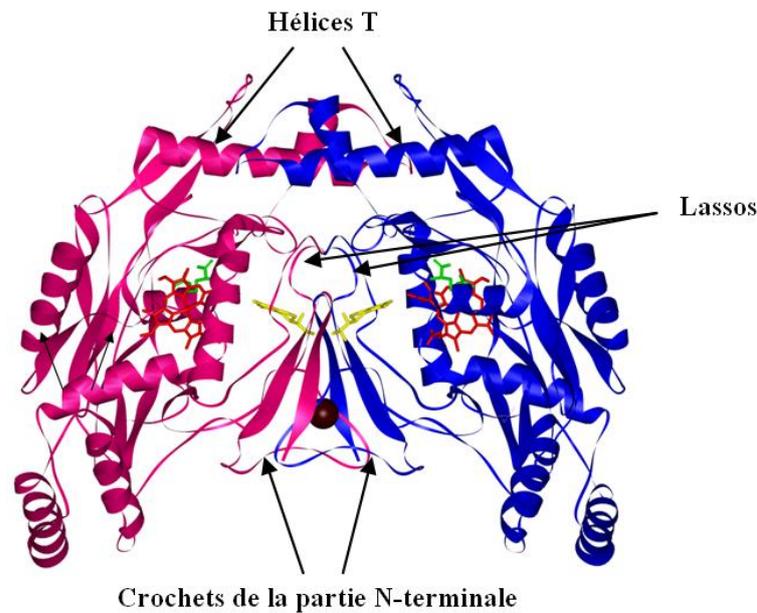


Figure 13 : Représentation de la structure dimérique des domaines oxygénases de iNOS. Les deux monomères sont en rose et bleu, l'hème en rouge, le substrat arginine est en vert, le cofacteur BH₄ et l'atome de zinc respectivement en jaune et marron à l'interface des dimères [73].

Différence entre les isoformes :

La présence de l'hème est nécessaire à la dimérisation pour les trois isoformes mais la stabilité du dimère ainsi formé varie selon l'ordre : eNOS > nNOS > iNOS [76-81]. Le dimère de NOS peut se trouver sous deux configurations différentes. La forme « ouverte » qui est plus instable et sensible à la protéolyse alors que la forme « fermée » est beaucoup plus stable. La présence du cofacteur tient un rôle central dans cet équilibre. Quand il se fixe, il permet la formation de liaisons H et maintient le dimère dans la configuration « fermée » [73]. Cette transition configuration « ouverte » → configuration « fermée » est observée en présence de BH₄ pour les 3 NOS de mammifères mais elle est la plus importante pour iNOS [79]. Il semblerait que pour nNOS et eNOS la dimérisation implique des interactions entre les domaines oxygénases ET réductases alors que pour iNOS seules les interactions entre les deux domaines oxygénases seraient impliquées dans la stabilisation du dimère [56, 81]. Cela serait la raison pour laquelle la configuration « fermée » d'iNOS est plus dépendante de la présence du cofacteur BH₄. Au sein du dimère, le transfert d'électron du domaine réductase vers le domaine oxygénase se fait préférentiellement de manière croisée. Une représentation schématique de ce transfert est présentée en Figure 14 [82-84].

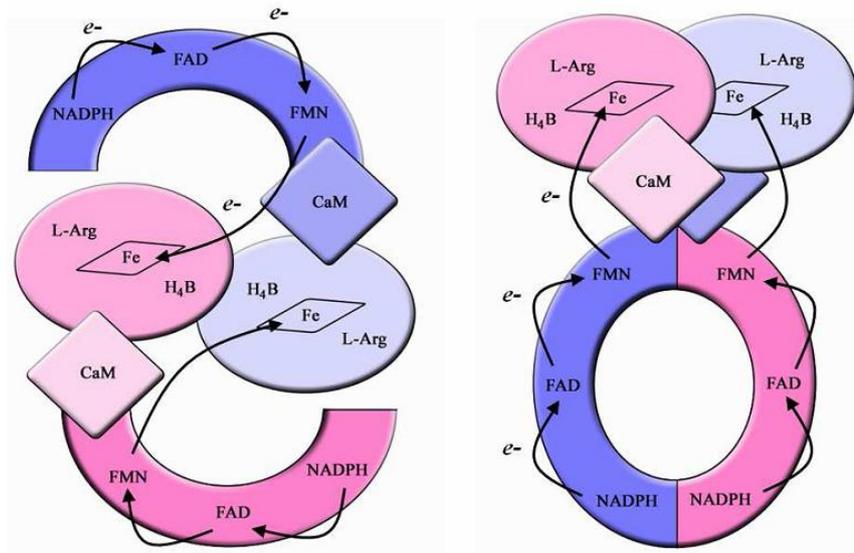


Figure 14 : Représentation schématique du transfert des électrons au sein d'un dimère selon que la dimérisation a lieu entre domaines oxygénases seuls ou à la fois entre les domaines oxygénases et réductases.

Les vitesses de transfert d'électrons du domaine réductase à l'hème sont différentes selon les isoformes avec nNOS (4 s^{-1}) > iNOS ($2,5 \text{ s}^{-1}$) > eNOS ($0,005 \text{ s}^{-1}$) [85-89].

Cas des NOS bactériennes :

La structure obtenue par cristallographie aux rayons X des NOS bactériennes sous forme dimérique (40 kDa) présente de très grandes similitudes avec la structure des domaines oxygénases de NOS de mammifères (Figure 15). C'est pour cette raison que la NOS bactérienne est couramment utilisée comme modèle [90, 91].

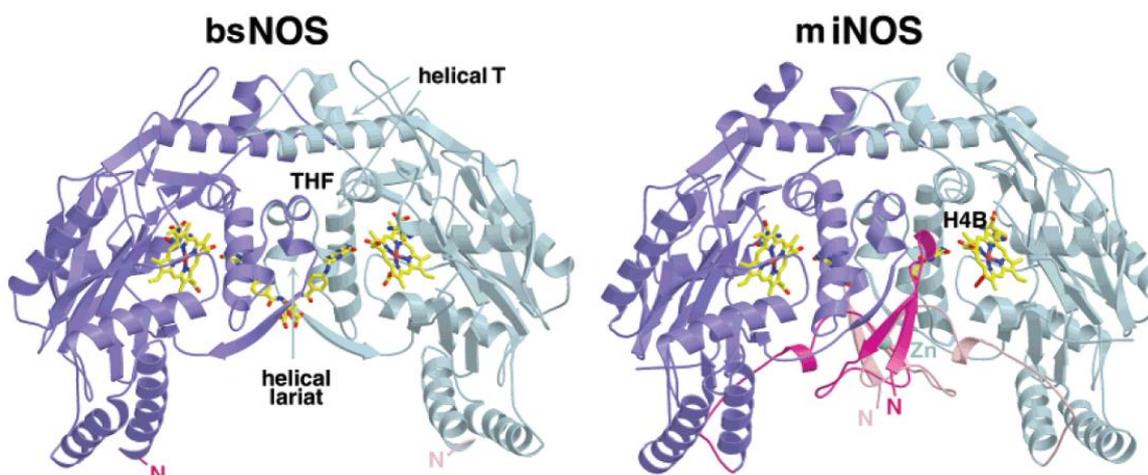


Figure 15 : Comparaison des domaines oxygénases sous forme dimérique de bsNOS et de iNOSoxy. La boucle N-terminale (en rose, à l'interface du dimère de iNOSoxy) n'est pas retrouvée dans le cas de la NOS bactérienne [90].

Cependant, une différence notable par rapport à la NOS de mammifère est l'absence de la boucle N-terminale, l'absence du centre liant le zinc et de ce fait un site de fixation du cofacteur beaucoup plus ouvert. La capacité de la NOS bactérienne à former un dimère stable malgré l'absence de la boucle N-terminale et du cofacteur BH_4 n'est pas complètement comprise. Elle pourrait être expliquée par la substitution de certains résidus à l'interface de ces dimères [92]. Par exemple la Glycine 464 de la NOS inductible (iNOS) est remplacée par une Proline dans le cas de la NOS bactérienne. La proline apporte une interaction hydrophobe supplémentaire à l'interface du dimère qui n'existe pas dans le cas de la NOS de mammifère [90].

3.3. Structure du site actif

La structure cristallographique du domaine oxygénase a pu être obtenue entre autres pour iNOS_{oxy} de souris [93, 94], iNOS humaine [72, 73], eNOS bovine [71], eNOS humaine [71] et nNOS bovine [95, 96].

Positionnement de l'hème :

Le domaine iNOS_{oxy} murin est constitué par les acides aminés 66 à 498 (82 à 508 pour la iNOS humaine). L'hème de iNOS de souris est pris en sandwich entre deux résidus aromatiques : le tryptophane Trp 188 et la phénylalanine Phe 363 (Trp 194 et Phe 369 pour iNOS humaine) situés de part et d'autre de la porphyrine.

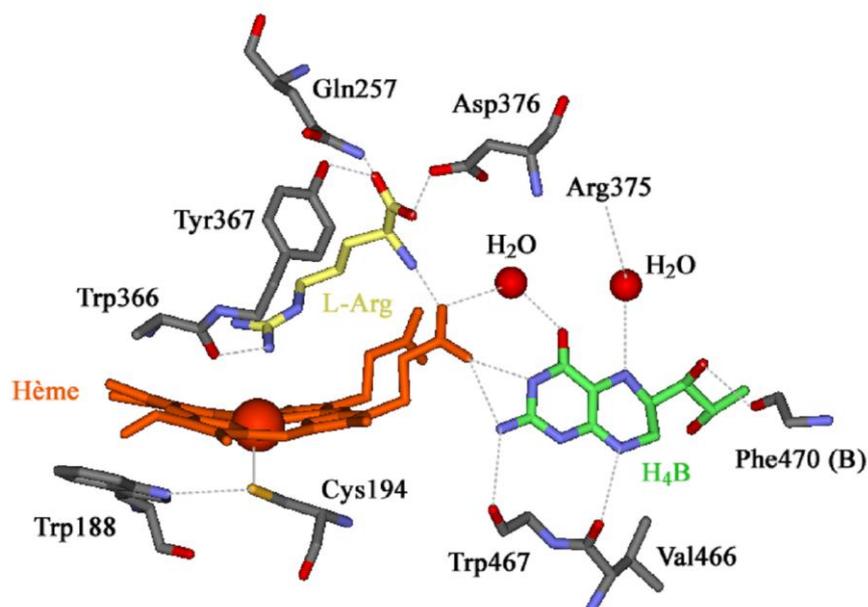


Figure 16 : Structure du site actif de la NOS inductible murine (iNOS). L'hème est en rouge, l'arginine en jaune et le BH_4 en vert.

Le fer de l'hème a pour ligand proximal l'atome de soufre d'une cystéine en position 194 (iNOS murine, [Figure 16](#)). Cette cystéine effectue une liaison H primordiale pour le mécanisme moléculaire de la protéine avec le résidu tryptophane Trp 188 (iNOS murine).

Positionnement du substrat :

La dimérisation permet de créer une cavité pour le site actif de $10 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA}$, au bout d'un canal d'accès de 30 \AA environ [94] qui permet ainsi la diffusion de l'arginine, du NOHA et de la citrulline. Le groupement guanidinium de l'arginine est pointé vers l'hème. Dans le cas de iNOS de souris le groupement guanidinium de l'arginine forme une liaison H avec le tryptophane Trp 366 [94] et avec une molécule d'eau très conservée parmi les différentes structures de NOS. L'extrémité amino-acide de l'arginine est également maintenue rigoureusement par les liaisons H que la partie acide carboxylique établit avec les chaînes latérales des résidus glutamine (Gln 257), tyrosine (Tyr 367) et acide aspartique (Asp 376) ([Figure 16](#)). Le positionnement du NOHA semble impliquer le même type de réseau de liaisons H [97].

Positionnement du cofacteur :

Le BH_4 est fixé grâce à des interactions d'empilement π situés de part et d'autre du noyau ptérine : le cycle aromatique indole d'un tryptophane (Trp 467 dans la numérotation de iNOS de souris) d'un côté et un résidu phénylalanine (Phe 470) de l'autre ([Figure 16](#)). Le groupement amide de BH_4 effectue une liaison H directement avec un groupement propionate de l'hème, cette dernière interaction serait un élément clef pour le rôle redox du cofacteur dans le mécanisme moléculaire de la NOS [97].

Très peu de différences ont été observées concernant la structure du site catalytique entre les différents isoformes [72, 73]. L'ensemble du site actif forme un réseau de liaisons H dense impliquant substrat, hème, cofacteur, résidus de la poche, molécules d'eau [94, 97, 98]. Cela permet de maintenir une certaine rigidité au système, de garantir la spécificité de substrat, de maîtriser les processus de transfert de proton et d'électron. La moindre modification de ce réseau aura des conséquences importantes sur le mécanisme moléculaire de la protéine.

Cas des NOS bactériennes :

Les premières structures cristallographiques de NOS bactériennes furent celles de *Deinococcus radiodurans* [68] et de *Bacillus subtilis* [90] suivies ensuite par la NOS de *Staphylococcus aureus* (saNOS, [91]), stNOS [48] et enfin la NOS de *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS, [99]) et baNOS [100, 101].

Toutes ces protéines ont une structure très similaire et superposable à celle des NOS de mammifère [71, 72, 93, 94]. Le site actif est très conservé.

Comme pour la NOS de mammifère, le fer de l'hème a pour ligand proximal l'atome de soufre d'une cystéine (Cys 72 dans le cas de bsNOS [59]). La liaison H entre la cystéine et le résidu tryptophane est conservée (Trp 66 dans le cas de bsNOS [59]) ainsi que les interactions d'empilement π entre ce tryptophane et la porphyrine. La liaison proximale entre le fer et le soufre est légèrement plus forte chez la NOS bactérienne [102]. Mais les réels effets du renforcement de cette liaison n'ont jamais été approfondis.

Les substrats arginine et NOHA s'orientent avec leurs groupements guanidinium et hydroxy-guanidinium dirigés vers l'hème et stabilisés dans cette position grâce à différentes liaisons H avec les acides aminés de la cavité du substrat.

Les sites actifs des NOS bactériennes diffèrent uniquement des NOS de mammifère sur un acide aminé adjacent à l'atome de fer : une Valine de la NOS de mammifère est remplacée par une Isoleucine dans le cas de la NOS bactérienne [90, 103]. gsNOS, qui a la spécificité d'être thermorésistante, présente une différence supplémentaire : la lysine (Lys 356) de bsNOS est remplacée par une arginine (Arg 365 dans le cas de gsNOS). Cela réorganise subtilement la position des acides aminés de la poche distale et le résidu Isoleucine se retrouve plus proche encore de l'hème. La poche est plus restreinte et cela stabilise les intermédiaires réactionnels et ralentit les réactions de dissociation fer-ligands quelque soit la température [99].

L'absence de la boucle N-Terminale permet la fixation d'un cofacteur de plus grande taille moléculaire [68, 90]. La plupart des eucaryotes qui ont un gène de NOS, détiennent également les gènes nécessaires à la biosynthèse de BH_4 . Chez les procaryotes, seuls les bacilles ont les gènes de la sepiaptérine réductase, enzyme de la dernière étape de la synthèse de BH_4 . Par contre tous ces organismes sont capables de produire le tétrahydrofolate (THF). Le THF est constitué d'un noyau ptérine et d'une chaîne latérale beaucoup plus large que celle de BH_4 ce qui expliquerait que les NOS bactériennes, dont le site de fixation est beaucoup plus ouvert, seraient capables d'utiliser ce cofacteur [68] (Figure 17).

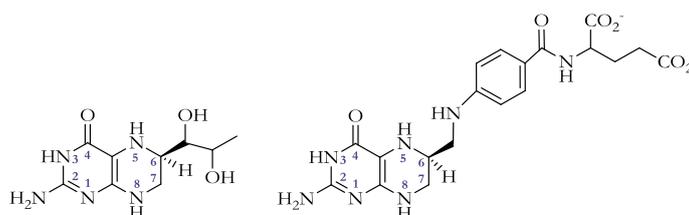


Figure 17 : Formules chimiques des cofacteurs BH_4 et THF.

drNOS produit NO de manière plus efficace en présence de THF que de BH_4 [104]. L'ensemble de ces éléments ont amenés la suggestion que THF est peut être le cofacteur naturel de

drNOS [68, 104] mais pas nécessairement pour bsNOS qui est munie de la sepiaptérine réductase et fixe mieux BH_4 que THF.

Le site catalytique de la NOS bactérienne est très semblable à celui de la NOS de mammifère ce qui justifie que la NOS bactérienne soit un modèle courant pour étudier la NOS de mammifère. En revanche le site de fixation du cofacteur est différent. La NOS bactérienne est capable de fixer les cofacteurs BH_4 et THF. Mais, contrairement aux NOS de mammifères, ceux-ci ne sont pas indispensables à la stabilité du dimère. Bien que la synthèse de NO soit rendue possible en leurs présences, le rôle redox de ces cofacteurs dans le mécanisme moléculaire de la NOS bactérienne n'a jamais été démontré.

4. Mécanisme moléculaire des NO-Synthases

Les NOS produisent NO en deux étapes. L'oxydation de l'arginine est tout d'abord réalisée selon une réaction de mono-oxygénation similaire aux cytochromes P450. Le produit de cette réaction est le NOHA. Dans un second temps le NOHA va être oxydé en citrulline et NO via un mécanisme d'oxydation encore sujet à débat et probablement bien spécifique aux NOS [60, 105-110].

4.1. Etape 1 : hydroxylation de l'arginine

4.1.1. Initiation de la réaction

À l'état natif, l'hème est au degré d'oxydation Fe^{III} et présente un équilibre entre la forme hexacoordonnée (6C) qui comporte une molécule d'eau comme sixième ligand et qui est de spin 1/2 (bas spin, BS) et la forme pentacoordonnée (5C) qui est de spin 5/2 (haut spin, HS). L'équilibre entre les formes HS et BS est déplacé en faveur de la forme HS en présence du cofacteur BH_4 et du substrat arginine [111, 112]. Dans le cas de iNOS, la transition de la forme BS vers la forme HS entraîne une augmentation du potentiel électrochimique de l'hème d'environ 100 mV (-261 mV), qui devient alors suffisamment oxydant pour recevoir un électron du domaine réductase et passer à l'état d'oxydation Fe^{II} [113]. Cela va permettre la fixation du dioxygène et la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (espèce (1), [Figure 18](#)).

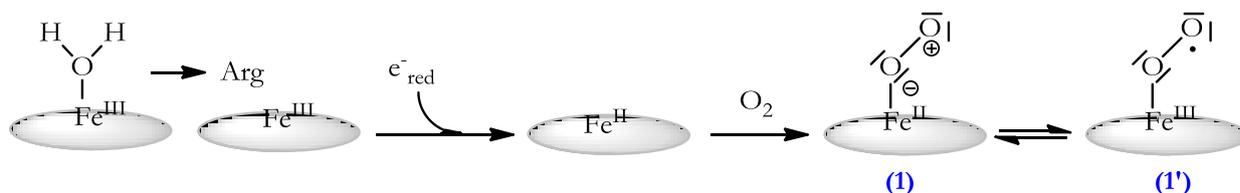


Figure 18 : Initiation de la première étape : fixation du substrat, réduction de l'hème et représentation des deux formes mésomériques en équilibre après la fixation de O₂ sur le fer.

Cette espèce est souvent décrite comme étant en équilibre entre 2 configurations iso-électroniques : Fe^{II}O₂ (1) et Fe^{III}O₂[•] (Fe^{III}-superoxo (1')) [114, 115]. L'espèce (1) est observée en présence de cofacteur et en absence de substrat et l'espèce (1') est observée pour toutes les autres conditions testées [116-118].

Cas des NOS bactériennes :

La grande similitude des sites actifs de la NOS bactérienne et de la NOS de mammifère amène à faire le parallèle entre les deux mécanismes catalytiques et les NOS bactériennes sont des modèles de routine pour étudier les NOS de mammifère [119]. La NOS bactérienne offre certains avantages : la production chez *E. coli* permet d'en obtenir en grande quantité, elle forme un dimère plus stable et elle est de ce fait moins sensible à la protéolyse même en absence de cofacteur. La NOS bactérienne est capable d'oxyder l'arginine en NOHA et dépend de la présence d'un cofacteur BH₄ ou THF et d'une réductase extérieure [67, 120, 121]. Certaines étapes du cycle catalytique seraient plus lentes et faciliteraient l'étude de ce mécanisme.

Les études spectroscopiques UV-Visible de la NOS bactérienne révèlent des différences dans certaines propriétés électroniques de l'hème comparées à celles de la protéine de mammifère. Par exemple, à l'état natif, bsNOS, contrairement à la NOS de mammifère, est quasi-exclusivement sous la forme Fe^{III} HS-5C. Cela est expliqué par sa forme dimérique très stable et peu dépendante de la présence du substrat et du cofacteur. Le potentiel redox de bsNOS en présence de substrat et du cofacteur THF est plus faible de 100 mV par rapport à iNOS ce qui rend le fer plus difficile à réduire.

4.1.2. Activation de l'oxygène

L'activation de l'oxygène est au cœur de la réactivité et du rôle biologique des NOS.

Les transferts d'électrons et de protons doivent être très méticuleusement contrôlés afin d'éviter les réactions d'autoxydation et de découplage. L'ensemble des propriétés du site catalytique vont permettre de maîtriser cette étape.

Selon le modèle communément accepté par analogie aux cytochromes P450, l'activation de l'oxygène dans la première étape, nécessite le transfert d'un électron et de deux protons (Figure 19).

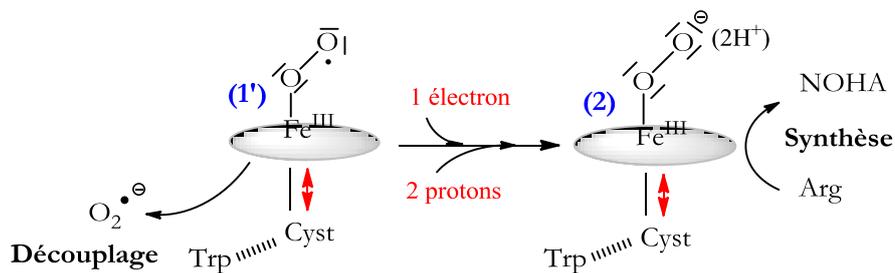


Figure 19 : Etape d'activation de l'oxygène : le transfert d'électron est essentiel afin d'éviter la libération de $O_2^{\bullet-}$. Les transferts de protons permettent la formation des espèces responsable de l'oxydation de l'arginine en NOHA. Les propriétés électroniques du ligand proximal cystéine contrôle la réactivité du fer et la voie moléculaire empruntée.

Le transfert d'électron est effectué par le cofacteur BH_4 et est essentiel pour éviter la libération de l'espèce $O_2^{\bullet-}$ par l'espèce (1'). **Les transferts de protons** sont dépendants du réseau très dense de liaisons H de l'environnement distal de l'hème. Les donneurs de protons ne sont pas connus à ce jour et restent au cœur du débat.

Outre les transferts de protons et d'électrons, l'activation de l'oxygène va être finement maîtrisée par la réactivité intrinsèque du fer et de l'hème. Cette réactivité est essentiellement contrôlée par l'effet *push-pull*. L'effet *pull* correspond aux propriétés d'attraction électronique de l'environnement distal du fer de l'hème et dépend des charges et de la polarité de cet environnement. **Quant à l'effet *push*, il dépend des propriétés d'attractions et/ou de donation électroniques de la cystéine proximale et est déterminant pour la réactivité du fer et le chemin catalytique emprunté.**

4.1.3. Nature des intermédiaires réactionnels

L'espèce $Fe^{II}O_2$ (1) :

Dans le cas des cytochromes P450, le complexe $Fe^{II}O_2$ est relativement stable et donc facilement observable. L'électron nécessaire à réduire le complexe $Fe^{II}O_2$ provient du domaine réductase. Dans le cas des NOS, cet intermédiaire est le dernier observé dans la première étape du cycle catalytique. Il est beaucoup moins stable que dans le cas des cytochromes P450 et peut se dissocier et libérer du superoxyde ($O_2^{\bullet-}$, Figure 19). Le complexe $Fe^{II}O_2$ a été observé en *stopped-flow* et suite à une approche cryogénique [117, 122-124]. Il a une vitesse d'autoxydation extrêmement rapide mais qui varie d'un isoforme à un autre et qui est très sensible à la présence ou l'absence de substrat et/ou de cofacteur. [125-127].

L'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2) :

Afin d'éviter le processus d'autoxydation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et la formation de superoxyde, l'étape de transfert d'électron doit être beaucoup plus rapide que celui réalisé par le domaine réductase comme dans le cas du cytochrome P450. C'est le cofacteur BH_4 , dans le cas de la NOS qui fournit l'électron nécessaire à la réduction de l'espèce (1') pour former l'intermédiaire Fe^{III} -peroxo ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ ou espèce (2), Figure 20) [123, 124, 128-132]. Le cofacteur est alors oxydé sous forme radicalaire.

L'espèce (2) a été observée en condition cryogénique : la cryo-réduction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (1') de la NOS endothéliale (eNOS) en présence de 4-amino- BH_4 (un analogue inactif de BH_4) permet la formation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2).

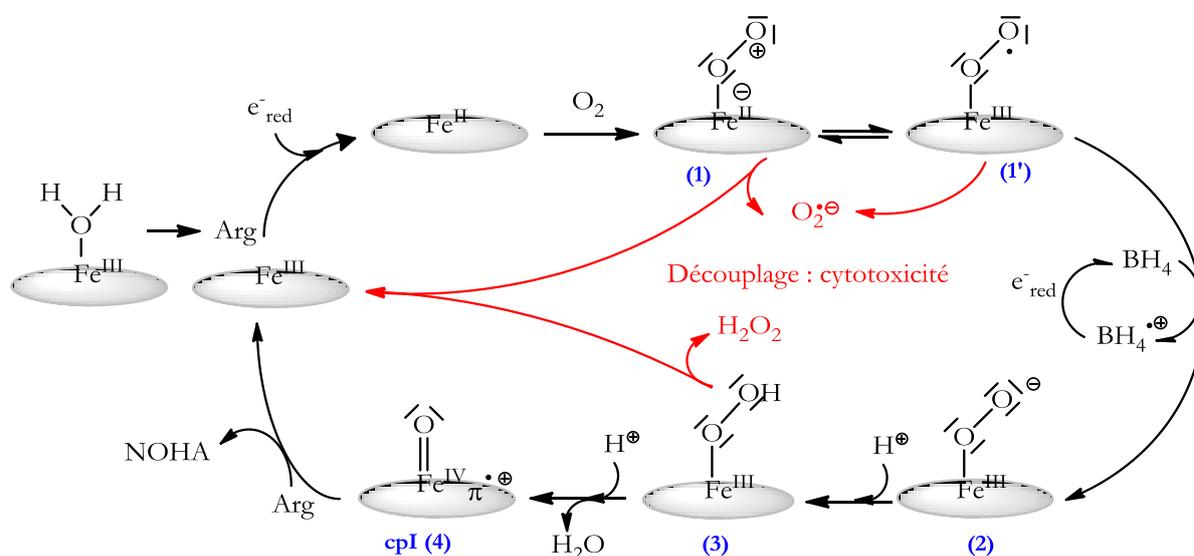


Figure 20 : Schéma récapitulatif des étapes du mécanisme de la première étape : oxydation de l'arginine en NOHA basée sur le mécanisme des cytochromes P450.

Les espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) et cpI (4) :

A ce stade un transfert de proton permettrait la formation du complexe Fe^{III} -hydroperoxo ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ ou espèce (3), Figure 20). Ce dernier reçoit un deuxième proton, ce qui conduit à la formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}_2^+$ qui, par rupture hétérolytique de la liaison O-O, perd une molécule d'eau et permet la formation du *compound I* (cpI, hème $\pi^+\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ou espèce (4)) [105]. Cette étape doit être extrêmement contrôlée afin d'éviter la libération de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Hydroxylation de l'arginine :

On suppose ensuite que c'est l'espèce (4) qui réalise l'hydroxylation du groupe guanidinium de l'arginine par un mécanisme radicalaire de type *radical rebound* pour former le N^{O} -hydroxy-arginine

[54] en passant par la formation de l'espèce (6) (Figure 21) où le NOHA serait coordonné au fer par l'atome d'oxygène de la fonction hydroxyle. Le fer est régénéré sous sa forme Fe^{III} (Figure 21).

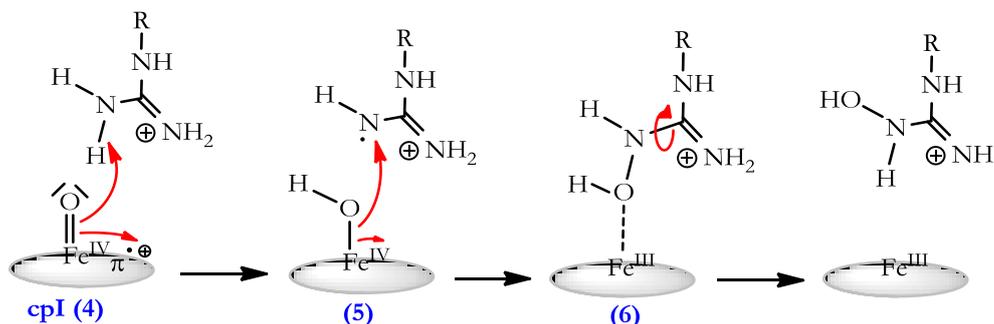


Figure 21 : Mécanisme proposé pour l'oxydation de l'arginine en NOHA par le cpI [54].

Les travaux de cryo-réduction ont montré qu'en remontant la température, on observe un complexe qui pourrait être le Fe^{III}-NOHA (espèce 6) [133]. Lorsque la température remonte encore, le NOHA se repositionnerait ensuite dans le site actif, avec le groupe hydroxyle pointé vers un résidu du site actif à l'opposé du fer [96, 134].

Cas des NOS bactériennes :

Les NOS bactériennes forment un complexe Fe^{II}O₂ très stable comparé aux NOS d'eucaryotes [99]. La vitesse de disparition de cette espèce est de 3,9 s⁻¹ pour drNOS [120], 5,4 s⁻¹ pour bsNOS [120] alors que cette vitesse s'élève jusqu'à 20 s⁻¹ pour nNOS [135] à 10°C. Dans le cas de la NOS de mammifère la vitesse de disparition du complexe Fe^{II}O₂, associée au transfert d'un électron provenant du cofacteur, est 60 à 120 fois plus rapide qu'en absence du cofacteur, selon l'isoforme [120, 136, 137]. Dans le cas de la NOS bactérienne, les cofacteurs BH₄ ou THF accélèrent la vitesse de disparition du complexe Fe^{II}O₂ seulement de 5 à 15 fois [68, 104, 120] et cet effet n'a jamais été directement corrélé à un effet redox du cofacteur.

L'étude comparative du complexe Fe^{II}CO, mime de l'espèce Fe^{II}O₂, en spectroscopie Raman de résonance [102] montre une similarité entre la NOS de *Bacillus subtilis* (bsNOS) et la NOS neuronale (nNOS) : le substrat arginine a de plus faibles interactions électrostatiques avec le ligand CO que dans le cas de iNOS et eNOS. Cette observation est confirmée par l'étude de la structure 3D du site actif des NOS avec un ligand NO et en présence de l'arginine [95, 134].

Du fait de la faible vitesse de disparition du complexe Fe^{II}O₂ observé avec gsNOS (0,4 s⁻¹ à 4°C, [99]) en absence de cofacteur, la cryo-réduction de cette espèce couplée à des sauts en température a permis d'observer des intermédiaires réactionnels [138]. La cryo-réduction du complexe Fe^{II}O₂ n'aboutit pas à la formation de l'espèce Fe^{III}OO[•] (2) (observé avec eNOS [133]) mais aboutit directement à la formation de l'intermédiaire Fe^{III}OOH (3) à 77 K. A cette température la mobilité de l'eau et des protons est extrêmement restreinte. Cela sous-entend la présence d'un

donneur de proton local qui pourrait être le solvant ou la protéine. Cette même technique n'a jamais permis de mettre en évidence cette espèce (3) pour la NOS de mammifère en présence du cofacteur inactif 4-amino-BH₄ [133]. Cela met en lumière une différence notable dans le mécanisme de transfert de proton de la première étape entre la NOS de mammifère et la NOS bactérienne. Les travaux de cryo-réduction ont également montré qu'en remontant la température, on observe un complexe qui pourrait être le Fe^{III}-NOHA (6) [138] et soutient l'hypothèse du mécanisme de type P450 passant par l'espèce cpI (4) comme pour les NOS de mammifères.

La NOS bactérienne est un modèle de routine pour l'étude du mécanisme catalytique des NOS. Les études réalisées sur la première étape suggère un mécanisme de type P450 comme la NOS de mammifère. Cependant des différences sont mises en avant : le potentiel redox de l'hème est plus faible, le transfert de proton ne semble pas strictement identique, le rôle redox du cofacteur n'a jamais été démontré dans cette étape. L'ensemble de ces différences questionnent la pertinence d'utiliser cette protéine comme modèle pour le mécanisme moléculaire de la NOS de mammifère et montre la nécessité de faire des études comparatives.

Formation du cpI ?

Ce mécanisme ([Figure 20](#)), proposé par de nombreuses équipes [54, 139-142] et basé sur le mécanisme des cytochromes P450, n'est qu'un modèle hypothétique souvent remis en cause [143].

Le cpI (4) n'a jamais été observé dans le cas de la NOS, il est proposé comme étant l'intermédiaire oxydant de la première étape uniquement par analogie avec un mécanisme de type P450. Dans le cas des NOS de mammifère les intermédiaires Fe^{III}OOH (3) et cpI (4) n'ont jamais été piégés. Bien que certains calculs QM/MM soient en faveur d'un cpI (4) comme intermédiaire oxydant dans l'étape 1 du cycle catalytique [144, 145], plusieurs études mettent en lumière des différences notoires entre les mécanismes des NOS et des cytochromes P450. Par exemple, dans le cas des cytochromes P450, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en fournissant l'ensemble des protons et des électrons nécessaires à la catalyse, permet de réaliser des réactions de mono-oxydation qui impliquent la formation du cpI (4). Contrairement aux cytochromes P450 ce test du peroxyde, chez la NOS, ne permet pas l'hydroxylation de l'arginine en NOHA [146-148]. D'autre part l'iodosobenzène s'est montré capable de remplacer NADPH, O₂ et le proton nécessaires aux réactions de mono-oxydation des cytochromes P450. Alors que la réaction d'oxydation de l'arginine en NOHA n'est pas observée avec l'iodosobenzène dans le cas de la NOS [148].

Le mécanisme de type P450 est un modèle couramment utilisé pour expliquer l'oxydation de l'arginine en NOHA. Cependant, l'extrême rapidité des mécanismes

moléculaires chez la NOS n'a jamais permis d'observer/piéger les intermédiaires $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) et cpI (4) et laisse ouvert le débat quant à la nature exacte des espèces oxydantes.

4.1.4. Rôle du cofacteur dans le processus de transfert d'électrons

Le rôle redox du BH_4 est discuté depuis qu'est observée une accélération de la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (1') en présence du cofacteur [123]. Il a été ensuite montré que la production de NOHA à partir du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (1') était observée uniquement en présence de BH_4 . Cela suggérait le rôle de donneur d'électron du cofacteur pour permettre l'activation de l'oxygène. [124, 128]. Des expériences de *freeze-quench* couplées à des analyses spectroscopiques en résonance paramagnétique électronique (RPE) ont permis de piéger et caractériser le cofacteur à l'état radicalaire [130, 131, 135, 149]. La formation du radical est cinétiquement couplée à la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et à la vitesse de formation du NOHA [131]. Le radical a ensuite été caractérisé par spectroscopie RPE à champ intense et s'est avéré être sous la forme protonée $\text{BH}_4^{+\cdot}$ [150] avec une densité de spin essentiellement localisée sur N^5 [149]. La vitesse d'activation de l'oxygène par le cofacteur se révèle différente entre les isoformes : 7 s^{-1} pour eNOS, 13 s^{-1} pour iNOS et 24 s^{-1} pour nNOS à 10°C [135]. Ces différences restent inexplicables car les sites actifs des trois isoformes sont hautement similaires d'un point de vue structural.

Importance du réseau de liaisons H pour l'activité redox du cofacteur :

Le BH_4 en solution a une chimie à deux électrons, il est rapidement oxydé en BH_2 qui lui, est inactif chez la NOS. L'environnement électrostatique du BH_4 et le réseau de liaisons H autour du cofacteur ([Figure 22](#)) joue un rôle central sur le contrôle de l'état de protonation du cofacteur et la maîtrise de son activité.

Par exemple, le BH_2 modifie significativement l'environnement du carbone C^6 et lui confère une géométrie trigonale (alors que le carbone C^6 de BH_4 est tétragonal). La suppression des protons en position 5 et 6 rompt toute interaction possible avec l'environnement de l'azote N^5 et du carbone C^6 . De ce fait le BH_2 est inapte à transférer un électron et à réaliser l'oxydation de l'arginine [113].

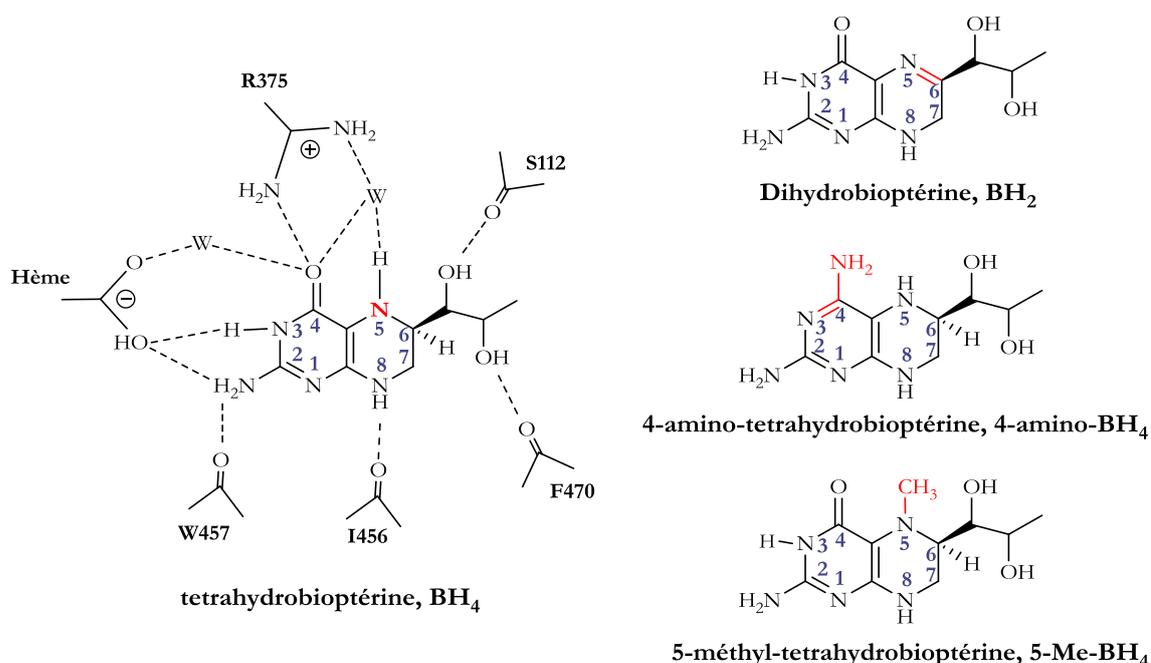


Figure 22 : Formule chimique du BH₄ et de ses analogues : le BH₂, le 4-amino-BH₄, le 5-Me-BH₄.

Le 4-amino-BH₄ est également un analogue inactif de BH₄ dans la première étape du cycle catalytique alors que la structure du domaine oxygénase de la NOS inductible (iNOS) en présence de cet analogue ne présente pas de différences significatives par rapport au BH₄ [97]. Cependant, le groupement amino en position 4 occupe une place stratégique. Il modifie probablement le réseau de liaisons H impliquées avec le propionate de l'hème [151] et inhibe complètement le transfert d'électron du cofacteur vers l'espèce Fe^{II}O₂ de la première étape.

Quand le proton de l'azote N⁵ est remplacé par un groupement méthyle (le 5-Me-BH₄ Figure 22), le transfert d'électron et l'oxydation de l'arginine sont cinq fois plus rapides qu'avec le BH₄ non substitué en azote N⁵ [130]. La structure cristallographique, en présence de cet analogue [130] montre que le groupement méthyle n'a que très peu d'impact sur l'orientation du noyau ptérine mais que le réseau de liaisons H est probablement modifié.

La stabilité du radical dépend également des interactions d'empilement π provenant du tryptophane voisin comme le montre les études réalisées avec un mutant de la NOS inductible (iNOS) de souris. Les mutations phénylalanine (F) ou alanine (A) sur le tryptophane (W) Trp 457 (W457F ou W457A) ralentissent la formation du radical et l'oxydation de l'arginine [152]. La structure de ces mutants est très proche de la protéine sauvage [153] mais les interactions d'empilement π sont modifiées et les mutants W457F ou W457A sont moins aptes à stabiliser le radical ptérine.

A la fin de la première étape du cycle catalytique, la régénération du radical $\text{BH}_4^{+\bullet}$ c'est-à-dire son retour à l'état neutre BH_4 nécessite une étape de réduction. L'électron nécessaire à cette réduction provient du domaine réductase [154].

Le rôle redox du cofacteur est formellement établi dans la première étape du cycle catalytique depuis une dizaine d'années. Cependant, on remarque que des analogues ayant des caractéristiques physicochimiques extrêmement proche du BH_4 modifient de manière significative le transfert d'électron, et parfois de manière encore inexplicée. L'ensemble des éléments contrôlant la formation du radical sont donc encore à discerner. De plus, au vu du réseau de liaisons H qui l'entoure, le cofacteur est un donneur potentiel de proton. Cela souligne l'intérêt d'étudier sa capacité à réaliser un transfert couplé électron/proton (PCET).

4.1.5. Processus de transfert de protons

Le cofacteur BH_4 :

Le BH_4 est un donneur potentiel de proton car il a de nombreux protons échangeables. La structure cristallographique de iNOSoxy suggère que ce proton pourrait être transféré via l'azote N^3 et son interaction avec les propionates [97]. L'incapacité du 4-amino- BH_4 [155] à oxyder l'arginine pourrait être attribuée à la rupture d'une liaison H de l'azote N^3 avec les propionates. L'activité du BH_4 dans la première étape serait alors liée à sa capacité à réaliser un transfert couplé électron et proton. Cette analyse semble confirmée par des calculs DFT [156].

Le radical BH_4 a été caractérisé comme étant le cofacteur protoné $\text{BH}_4^{+\bullet}$, ce qui impliquerait un simple transfert d'électron sans proton [150]. Cependant, l'état initial de la ptérine n'étant pas formellement déterminé, le transfert de proton provenant du cofacteur ne peut pas être totalement exclu. L'espèce de départ pourrait être l'espèce BH_5^+ (Figure 23). Enfin, la formation de BH_3^\bullet à partir de BH_4 pourrait être suivie d'une reprotonation rapide ne permettant pas, ainsi, de piéger l'état BH_3^\bullet .

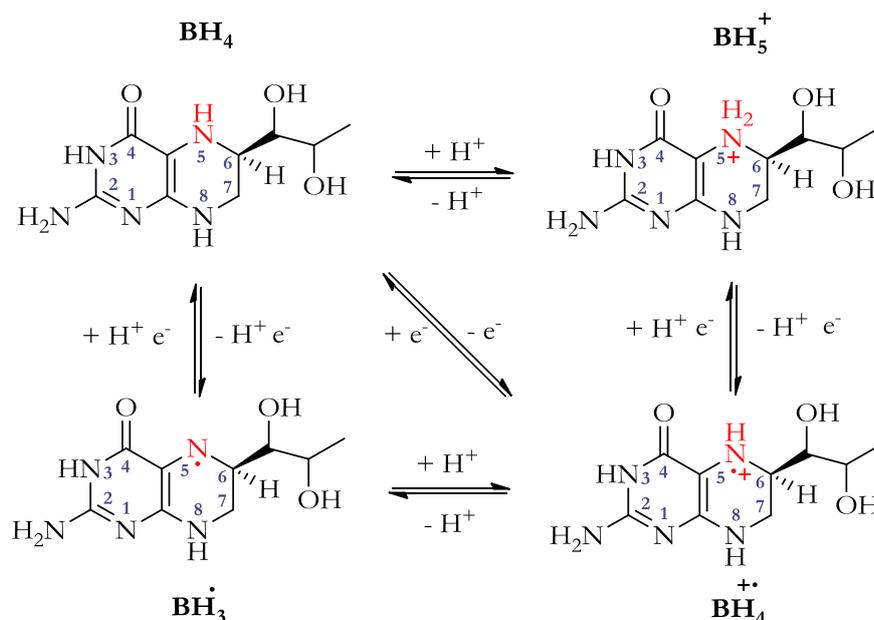


Figure 23 : Différents états possibles d'oxydation et de protonation du cofacteur BH_4 [54].

A ce jour, il n'est pas possible de conclure formellement quant au rôle de BH_4 dans le transfert de proton.

Le substrat arginine :

Un deuxième candidat pour le transfert de proton est le groupement guanidinium de l'arginine qui se situe à moins de 5 Å du fer [94]. Les calculs DFT indiquent que l'espèce cpI (4) serait capable d'oxyder l'arginine uniquement si elle est sous forme protonée [157]. L'arginine devrait alors absolument transférer un proton aux complexes (2) ou (3) (Figure 20). Cette hypothèse est également soutenue par les résultats du test au peroxyde d'hydrogène qui montre l'inaptitude de ce dernier à réaliser l'oxydation de l'arginine [143]. Comme le peroxyde d'hydrogène fournit l'ensemble des protons nécessaires à la catalyse, l'arginine resterait protonée et ne serait pas, à cause de cela, oxydée en NOHA par le cpI (4) [144, 157].

La molécule d'eau :

Les études cristallographiques [95, 134, 158] et en spectroscopie Raman de résonance (RR) [159-161] montrent la présence d'une molécule d'eau à proximité du guanidinium et du fer. Cette molécule aurait une importance majeure dans les propriétés électroniques et structurales du complexe $Fe^{II}O_2$ et pourrait être un des deux donneurs de proton nécessaire à la première étape du fait de sa proximité immédiate des espèces (2) et (3) [95]. La suppression de cette molécule d'eau empêche l'hydroxylation de l'arginine [162]. De plus, les études avec des analogues de substrats aryl- ou alkyl- guanidines ont permis de montrer une corrélation directe entre le pKa du guanidinium, la présence/absence de la molécule d'eau et le taux de guanidinium hydroxylé [163]. Des études de

cryo-réduction confirment les résultats précédents. L'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2) formée en condition cryogénique serait impliquée dans une liaison H et le second proton ne proviendrait pas directement du guanidinium mais d'une coopération entre ce guanidinium et la molécule d'eau [133]. C'est pour cela qu'un modèle a été proposé avec un mécanisme impliquant deux protons qui proviennent soit de la molécule d'eau soit de l'arginine [161].

Autres possibilités :

Outre le cofacteur, le substrat ou la molécule d'eau, une quatrième possibilité a été proposée. Les calculs QM/MM évaluant les différentes voies possibles de transfert d'électron montrent que le transfert d'un électron du BH_4 est très défavorisé si un proton provient de l'arginine, de la molécule d'eau ou du BH_4 lui-même et propose que les deux protons proviennent de voies extérieures à la poche de l'hème [145].

La source des protons nécessaires à la formation des espèces oxydantes de la première étape n'est pas complètement identifiée. Le réseau de liaisons H complexe et la multiplicité des candidats rendent ce point extrêmement ardu. Le groupement guanidinium de l'arginine reste une des hypothèses les plus fiables à ce jour pour le transfert d'un des deux protons nécessaire à la catalyse de la première étape.

4.1.6. Rôle de l'environnement proximal dans la première étape

Le découplage et les réactions d'autoxydation sont évités par la maîtrise des transferts d'électrons et de protons mais également par la maîtrise des donations/attractions électroniques du ligand proximal vers le fer. Comme les cytochromes P450, le fer de l'hème a pour ligand proximal l'atome de soufre d'une cystéine [72, 94]. Cette similarité avec les cytochromes P450 corrobore l'hypothèse selon laquelle les deux protéines pourraient avoir le même type de chimie oxydante et le même mécanisme d'activation de l'oxygène. Cependant, une des différences majeures entre les deux familles de protéine est la présence de la liaison H entre le thiolate de la cystéine et l'atome d'azote du groupement indole d'un acide aminé tryptophane (Trp 409 pour nNOS, Trp 188 pour iNOS, Trp 180 pour eNOS) [164]. La modification de cette liaison H par des mutations sur le tryptophane Trp 409 de nNOS [141, 165] et le tryptophane Trp 188 de iNOS [166] a montré qu'elle régule les propriétés de donation ou attraction électronique (effet *push*) du ligand cystéine vers l'hème. Ces études soulignent l'importance de cette liaison H pour la régulation de la réactivité du fer, pour la vitesse d'autoxydation des espèces intermédiaires, pour la maîtrise de la chimie oxydante et pour le chemin catalytique emprunté (découplage *versus* oxydation de l'arginine). Le tryptophane muté par une histidine dans le cas de iNOSoxy permet de renforcer cette liaison H, de diminuer l'effet *push* du

ligand proximal et de stabiliser les complexes fer-oxygène du cycle moléculaire de la première étape [166]. Le potentiel redox de l'hème est augmenté de +88 mV par rapport à la protéine sauvage et la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, pendant l'étape d'oxydation de l'arginine, est six fois plus lente que dans le cas de la protéine native.

La liaison H entre le tryptophane et la cystéine proximale différencie les NOS des cytochromes P450 et leur confère une chimie oxydante unique basée sur une régulation de l'effet *push-pull*.

Cas de la NOS bactérienne :

Tout comme la NOS de mammifère, la liaison fer-soufre est essentielle à la réactivité du fer et influence fortement la voie catalytique empruntée. La liaison H entre le résidu tryptophane et le thiolate proximal est très conservé entre les NOS : il s'agit du tryptophane Trp 56 pour saNOS et du tryptophane Trp 66 pour bsNOS. La mutation de ce tryptophane par un résidu tyrosine ou phénylalanine dans le cas de saNOS augmente l'effet *push* du ligand proximal et la vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est quatre fois plus rapide. Pour la mutation histidine l'effet *push* du ligand proximal est diminué et l'activation de l'oxygène est six fois plus lente [167].

Bien que la liaison fer-soufre proximale de la NOS bactérienne soit plus forte que celle observée dans le cas de la NOS de mammifère [102], la liaison H entre le thiolate et le tryptophane semble réguler l'effet *push* de la même manière que dans le cas de la NOS de mammifère.

4.2. Etape 2 : oxydation de la N^{O} -hydroxy-arginine

4.2.1. Initiation de la réaction et activation de l'oxygène

A la fin de la première étape le fer est dans un état Fe^{III} , l'arginine est oxydée en NOHA, et celui-ci occupe la cavité du substrat. Le début de la seconde étape est similaire à la première étape. Le fer est réduit à l'état Fe^{II} par un électron provenant du domaine réductase et il y a fixation du dioxygène. Comme pour l'oxydation de l'arginine, l'étape d'oxydation du NOHA dépend essentiellement du mécanisme d'activation de l'oxygène. Le contrôle de cette étape impliquait un électron et deux protons pour l'oxydation de l'arginine. Il est manifeste que le chemin réactionnel emprunté au cours de la deuxième étape du cycle catalytique des NOS est différent de celui emprunté lors de la première. Les étapes de transfert de proton vers le complexe hème-dioxygène sont donc vraisemblablement différentes (Figure 24) ce qui conduit à des espèces oxydantes différentes pour chacune des étapes du cycle catalytique.

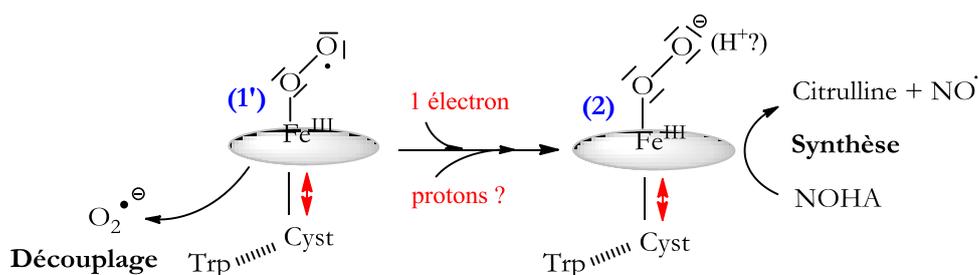


Figure 24 : Activation de l'oxygène pendant l'oxydation du NOHA. Le transfert d'électron permet d'éviter la libération de O₂^{•-}. Le nombre de protons qui permet la formation des espèces responsables de l'oxydation du NOHA en citrulline et NO n'est pas connu. Les propriétés électroniques de la liaison proximale régulent la réactivité du fer.

4.2.2. Nature des intermédiaires réactionnels

L'espèce Fe^{II}O₂ (1) :

Des études de cinétiques en flux arrêté (le *stopped-flow*) montrent que, pendant l'oxydation du NOHA, le Fe^{II}O₂ est facilement observable en début de cycle catalytique [168, 169].

Un mécanisme assez généralement accepté fait intervenir le cofacteur BH₄ dans l'oxydation de NOHA de la même manière que dans la première étape du cycle catalytique, c'est-à-dire en tant que source d'électron auxiliaire capable de réduire le complexe Fe^{II}O₂ plus vite qu'il ne s'autoxyde [128, 132, 141, 151, 168, 170, 171].

Les espèces Fe^{III}OO⁻ (2) et/ou Fe^{III}OOH (3) :

L'activation de l'oxygène par le cofacteur permettrait alors la formation du complexe Fe^{III}OO⁻ (2) ou Fe^{III}OOH (3) (Figure 25). Les études de cryo-réduction du Fe^{II}O₂ (1') d'eNOS sur cette deuxième étape permettent de piéger la même espèce que dans la première étape : le Fe^{III}OO⁻ (2) [133]. Par la suite, les espèces (2) ou (3) seraient suffisamment réactives pour réaliser l'oxydation du NOHA en citrulline, sans qu'il ne soit nécessaire de passer par un composé de type cpI (4). L'hypothèse la plus souvent citée pour la transformation de NOHA considère que le complexe (2) ou (3) réaliserait une attaque nucléophile directement sur l'hydroxy-guanidinium du NOHA [92, 172, 173].

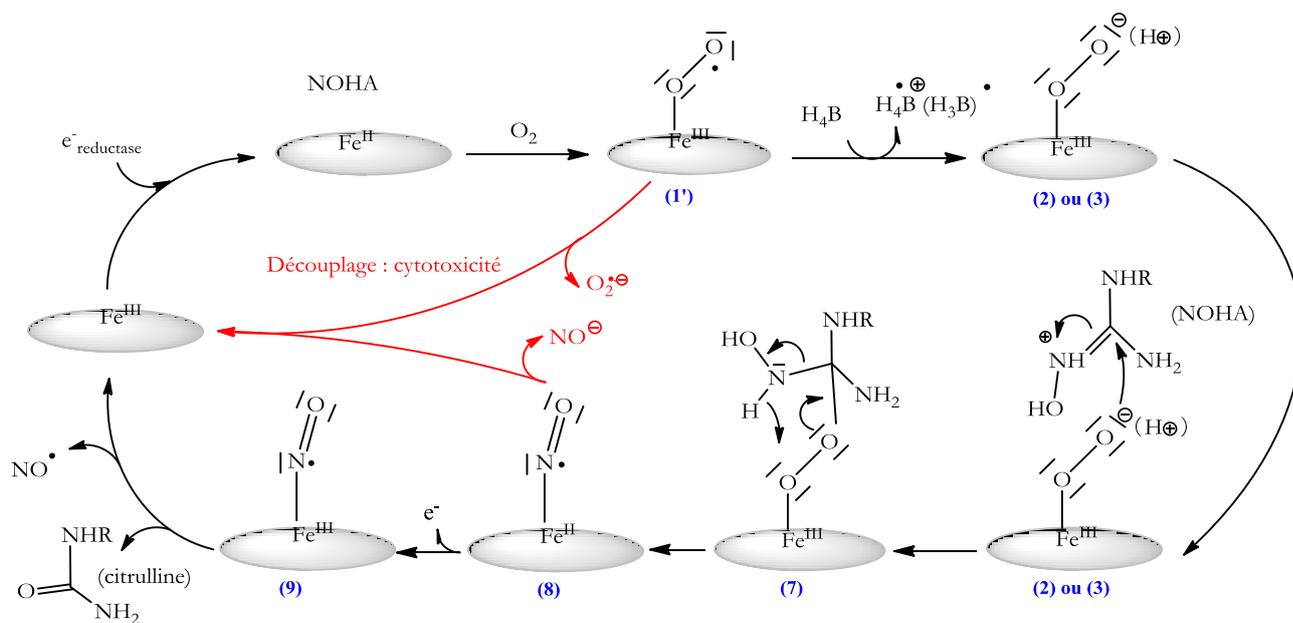


Figure 25 : Schéma récapitulatif, hypothétique, des étapes du mécanisme de la deuxième étape : oxydation du NOHA en citrulline et NO.

Complexe tétraédrique (7) et formation des espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (8) et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ (9) :

L'attaque nucléophile conduirait à la formation d'un complexe tétraédrique (espèce (7)) [173]. Le réarrangement de cette espèce aboutirait à la libération de la citrulline et la formation d'un intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (espèce (8)). L'oxydation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (8) permettrait alors la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ (espèce (9)), seule espèce caractérisée de manière formelle en fin de cycle moléculaire [168, 169]. Suivant l'isoforme considéré et les paramètres cinétiques qui lui sont intrinsèquement associés, le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ peut soit se dissocier et libérer NO^{\bullet} soit être de nouveau réduit en espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ par le domaine réductase et entrer dans un nouveau cycle réactionnel futile avec une molécule de dioxygène pouvant conduire à la formation de NO^{\ominus} ou de RNOS [88, 89, 174].

Absence de cpI (4) ?

La réaction d'oxydation du NOHA, catalysée par le peroxyde d'hydrogène (qui fournit l'ensemble des protons et des électrons nécessaires à la réaction), permet d'emprunter deux chemins catalytiques. La première réaction est catalysée par un fer-hydroperoxyde ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{H}_2\text{O}_2$) et permet directement l'oxydation du NOHA en citrulline et NO^{\ominus} . Le second chemin catalytique permet la transformation du fer-hydroperoxyde en cpI (4). Le cpI oxyde alors le NOHA en cyano-ornithine et NO^{\ominus} [175, 176]. Ce résultat tend à soutenir l'hypothèse selon laquelle l'oxydation du NOHA par la NOS ne passerait pas par la formation du cpI (4), car le produit final serait alors la cyano-ornithine.

Autres propositions :

Des calculs DFT sont en désaccord avec le modèle proposé précédemment et propose un mécanisme d'activation de l'oxygène sans transfert d'électron provenant de BH_4 , avec le transfert de deux protons et la formation d'un cpI [177, 178]. Cependant aucune donnée expérimentale ne soutient cette hypothèse.

Le mécanisme moléculaire proposé pour la seconde étape est différent de la première étape et plus complexe que celui-ci. Les données expérimentales n'apportent, pour le moment, que peu d'éléments de réponse à ce modèle.

Cas de la NOS bactérienne :

La NOS bactérienne est capable de synthétiser NO quand on lui fournit le substrat (NOHA), le cofacteur (BH_4), l'oxygène et les électrons nécessaires à cette synthèse [68, 120, 121]. **Cependant, la bactérie n'a pas de cofacteur BH_4 dans son environnement naturel et il n'a jamais été prouvé que celui-ci soit capable d'exercer le même rôle redox que dans le cas de la NOS de mammifère.**

Les études cristallographiques du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de la NOS bactérienne en présence d'arginine et de NOHA montrent que la deuxième étape va préférentiellement stabiliser l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3). Alors que l'arginine interagit plus fortement avec l'oxygène terminal, le NOHA montre une interaction plus importante avec l'azote proximal [134]. Les substrats semblent interagir de la même manière avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Des études en spectroscopie Raman de résonance sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de saNOS viennent souligner la différence de liaison H exercée sur l'oxygène proximal ou distal avec ces deux substrats [159-161]. Cela expliquerait que l'étape 1 faciliterait un transfert de proton vers l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) et la formation du cpI (4) alors que l'étape 2 stabiliserait l'état $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) et favoriserait l'attaque nucléophile de cette espèce sur le groupement hydroxy-guanidinium.

Les études de cryo-réduction de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de gsNOS [138], en absence de cofacteur, mettent en évidence pour la deuxième étape l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2) à 77 K. Ce dernier se convertit en complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) à 160 K. Les études de cryo-réduction sur la deuxième étape de eNOS ne permettent jamais l'observation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) à 77 K ni au cours des étapes de saut en température [133]. Seul le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2) est observé. Cela signifie probablement que le réseau de liaisons H permettant le transfert du proton nécessaire à la formation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ est différent entre gsNOS et la NOS de mammifère eNOS. Les sauts en température réalisés sur les échantillons contenant l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ permettent de piéger le complexe tétraédrique (7) et l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (8) avec gsNOS [138]. Les études de *stopped-flow* permettent, quant à elles, d'identifier l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$. La vitesse de dissociation de NO à partir du complexe

$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ est de 4 à 25 fois plus lente pour la NOS bactérienne [103, 120] que pour la NOS de mammifère [50, 99, 146]. La durée de vie de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ étant plus longue dans le cas de la NOS bactérienne, elle favoriserait sa réduction en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, la libération de NO^- et la voie du cycle futile [88, 89].

L'ensemble des données expérimentales pose la question du rôle biologique réel de la NOS bactérienne *in vivo* (production de NO^- versus NO) et sur sa capacité réelle à reproduire à l'identique le mécanisme moléculaire de la NOS de mammifère *in vitro*.

4.2.3. Rôle du cofacteur dans le processus de transfert d'électrons

Electrons nécessaires pour oxyder le NOHA :

L'étape 2 nécessite le transfert d'un premier électron provenant du domaine réductase pour réduire l'espèce Fe^{III} en espèce Fe^{II} . Contrairement à la première étape, ce seul électron pourrait suffire à réaliser l'oxydation du NOHA [123, 143]. Mais une étude montre qu'un radical BH_4 est formé dans cette deuxième étape [130]. Tout comme la première étape l'activité redox du BH_4 est cinétiquement liée à l'activation de l'oxygène et ainsi permet d'éviter la libération de O_2^- . Cependant, le transfert d'un électron supplémentaire dans la seconde étape aboutit à la formation, non pas de NO , mais d'une espèce HNO/NO^- [146, 175, 179]. Le cofacteur BH_4 pourrait avoir un double rôle inédit dans cette deuxième étape. Il aurait d'abord un rôle de réducteur pour activer rapidement l'oxygène en début de cycle puis un rôle oxydant en fin de cycle moléculaire afin d'obtenir NO comme produit final.

Rôle unique du cofacteur dans la deuxième étape :

Le radical BH_4 , dans la deuxième étape, a mis longtemps à être piégé et identifié puisque un seul électron suffisait, en théorie, à réaliser l'oxydation de NOHA. De plus, la vitesse de disparition du radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$ est 10 fois supérieure à celle de la première étape [129, 154] ce qui rend son piégeage plus complexe. Cette vitesse de disparition est trop rapide pour que l'électron nécessaire à la régénération du radical en espèce neutre provienne du domaine réductase (comme dans la première étape). Le cofacteur, sous la forme radicalaire $\text{BH}_4^{+\cdot}$, pourrait être réduit par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ formé juste après l'oxydation du NOHA en citrulline (Figure 26) [141]. Cela permettrait la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et sa dissociation en Fe^{III} et NO [171, 176].

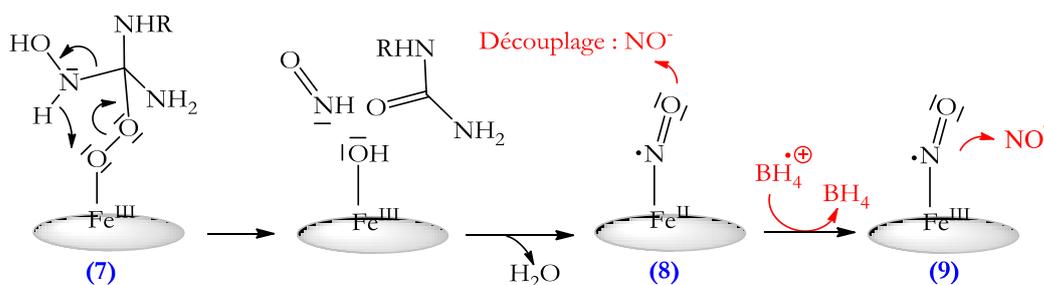


Figure 26 : Mécanisme proposé pour la réduction du cofacteur en fin de cycle catalytique.

Le radical BH_4^{\bullet} oxyde l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$.

Plusieurs éléments vont à l'encontre de ce modèle. L'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ n'a jamais été piégé en présence de radical BH_4^{\bullet} . La vitesse de disparition du radical BH_4^{\bullet} et la vitesse de formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ devraient être cinétiquement couplées selon ce modèle. Or, la vitesse de disparition du radical BH_4^{\bullet} est plus lente que la vitesse de formation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$: $8,3 \text{ s}^{-1}$ versus $36,7 \text{ s}^{-1}$. Cela ne confirme pas le rôle du radical BH_4^{\bullet} comme étant l'oxydant nécessaire à l'oxydation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$. De plus, les calculs DFT indiquent qu'un transfert d'électron, couplé ou non à un proton, provenant de BH_4 serait énergétiquement moins favorable qu'un transfert d'électron provenant directement du NOHA [177, 178, 180]. Certaines équipes proposent donc que le BH_4 ne soit pas du tout un intervenant redox de la seconde étape du cycle catalytique.

L'ensemble de ces données questionnent le rôle de BH_4 dans l'étape d'oxydation du NOHA. Le BH_4 pourrait avoir à la fois un rôle de réducteur et d'oxydant. Cela souligne une différence majeure par rapport au mécanisme proposé dans la première étape. De plus, BH_4 pourrait être un potentiel donneur de proton mais son état de protonation n'a jamais été déterminé dans cette étape.

4.2.4. Processus de transfert de protons

D'après le modèle proposé (voir 4.2.2.), la seconde étape impliquerait non pas le cpI (4) comme intermédiaire oxydant mais les espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2) et/ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3). Dans cette optique, un seul proton suffirait. Les hypothèses quant à l'origine de ce proton proposent comme candidat, comme dans la première étape, soit le cofacteur BH_4 soit le groupement guanidinium du substrat soit la molécule d'eau.

Le substrat NOHA :

Les différentes structures de NOS obtenues par diffraction des rayons X en présence du cofacteur BH_4 et de NOHA montrent que le groupe hydroxyle de NOHA établit une liaison H avec

le résidu Gly 365 (numérotation iNOS de souris) et qu'il serait mal orienté pour entrer en interaction directe avec le ligand fixé sur le fer [96, 97]. En revanche, le proton porté directement par l'azote N^ω lié au groupe hydroxyle de NOHA est situé à bonne distance d'interaction du fer et dans une géométrie qui lui permettrait d'interagir à la fois avec l'atome proximal et l'atome distal du ligand fixé au fer.

La molécule d'eau :

Les études avec les analogues d'arginine et de NOHA montrent que la modification du positionnement de la molécule d'eau qui perturbait l'oxydation de l'arginine, ne perturbe pas celle du NOHA [163]. Cela suggère que cette molécule d'eau est indispensable dans le transfert de proton de la première étape mais pas impliquée dans la seconde étape [162].

Transfert de deux protons :

Quelques études supportent une catalyse à deux protons dans la seconde étape. Des calculs DFT rejettent l'hypothèse selon laquelle la deuxième étape passerait par l'attaque nucléophile du guanidinium par les espèces (2) et (3) [178]. Il est proposé un mécanisme impliquant la formation d'un cpI et qui exclut totalement le BH₄ du cycle catalytique de la seconde étape [180].

Le nombre de proton et la nature du donneur de proton sont encore sujets à débat dans la deuxième étape. L'état de protonation du cofacteur BH₄ n'a jamais été étudié pendant l'oxydation du NOHA.

4.2.5. Rôle de l'environnement proximal dans la seconde étape

Tout comme la première étape, l'utilisation de mutants permet de clarifier le rôle du ligand proximal dans le mécanisme d'activation de l'oxygène. Les mutations phénylalanine et tyrosine sur le tryptophane Trp 409 de la NOS neuronale (nNOS) abolissent la liaison H avec le thiolate de la cystéine. Cela augmente l'effet *push* de la liaison fer-soufre. En fin de cycle catalytique, cela se traduit par des vitesses d'oxydation du complexe Fe^{III}NO de 7 à 8 fois plus rapide [146, 165, 181] dans le cas des mutants. Le mutant histidine (W409H pour nNOS), qui diminue l'effet *push*, présente des complexes hémiques plus stables et les vitesses de libération de NO en fin de cycle catalytique sont plus faibles [182].

Comme pour la première étape, l'effet électro-donneur (l'effet *push*) du ligand proximal est primordial pour réguler la réactivité du fer et les vitesses de libération du NO.

5. Objectifs des études réalisées pendant la thèse

La partie précédente expose l'importance de l'activation de l'oxygène et montre que le contrôle de cette étape est au cœur de l'activité des NOS. A l'instar du NO, on peut assister à un relargage des espèces $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO^{\cdot} ou $ONOO^{\cdot-}$ qui participent alors aux mécanismes de cytotoxicité évoqués en partie 1.2.2. Ce chapitre met également en lumière l'aspect multifactoriel de la maîtrise de cette étape : **transfert de proton, transfert d'électron, propriétés électroniques de l'hème**. Tous ces paramètres contrôlent le chemin catalytique emprunté et la nature du produit final. Enfin, la NOS bactérienne est un modèle couramment utilisé pour étudier la NOS de mammifère alors que certains résultats expérimentaux remettent en question la pertinence de ce modèle.

Dans ce contexte mes travaux de thèse proposent une analyse approfondie des différents paramètres qui contrôlent l'étape d'activation de l'oxygène (effet *push*, réseau de liaisons H distal, transfert d'électron) et une analyse comparative de la NOS bactérienne bsNOS et de la NOS de mammifère iNOS.

La première partie du chapitre 3 est centrée sur l'importance de l'effet *push* sur le mécanisme d'activation de l'oxygène. La liaison H présente entre le thiolate proximal et le résidu tryptophane voisin est essentiel dans le mécanisme d'activation de l'oxygène de la NOS de mammifère (Figure 27). Nous avons réalisé une étude complète sur cinq protéines mutées sur le tryptophane Trp 66 de la NOS de *Bacillus subtilis*.

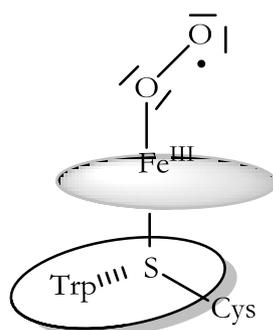


Figure 27 : Représentation de la liaison H entre le Trp et la Cys proximale.

Ces mutations ont permis de moduler la force de la liaison H exercée sur la cystéine et les conséquences de cette modification sur l'activation de l'oxygène ont été étudiées grâce à la caractérisation de différents complexes hémiques ([8], Annexe 1) par spectroscopie UV-visible, RPE et Raman de résonance. Nous comparons nos résultats à ceux obtenus précédemment avec la NOS bactérienne saNOS [167] et avec les NOS de mammifère eNOS [167], nNOS [165] et iNOS [166].

La deuxième partie du chapitre 3 s'intéresse à l'environnement distal de l'hème et traite du transfert de proton. Plus spécifiquement, nous avons voulu étudier l'impact du réseau de liaisons H de l'environnement distal sur la structure de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (1). Des analogues d'arginine ont déjà été utilisés pour sonder l'environnement du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et montrent que le pKa du guanidinium a un effet direct et significatif sur le positionnement de la molécule d'eau à proximité de l'hème (Figure 28) et le réseau de liaisons H distal [122, 163].

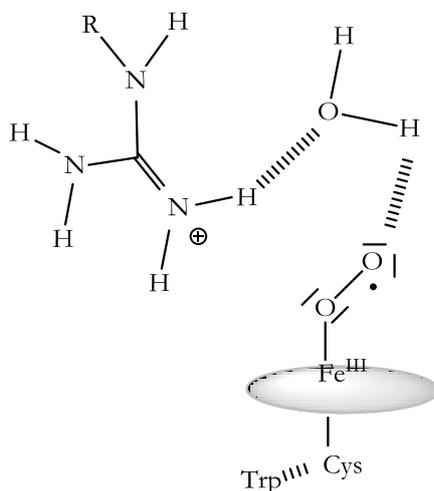


Figure 28 : Représentation des liaisons H distales impliquant l'arginine, une molécule d'eau et l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

Nous avons analysé directement l'effet de ces analogues sur la structure de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Pour cela nous avons utilisé différentes méthodes cinétiques qui permettent d'étudier les réactions à des temps courts. Le *stopped-flow* permet un suivi en spectroscopie UV-visible de la réaction. Nous avons également utilisé la spectroscopie Raman de résonance sur des temps de réaction très courts afin de définir les modes vibrationnels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Ces mesures ont été faites en collaboration avec le groupe du Professeur Manon Couture au sein du laboratoire de biochimie et microbiologie de l'Université de Laval à Québec, qui possède le dispositif en flux continu adapté à la spectroscopie Raman de résonance résolue en temps.

La troisième partie du chapitre 3 est centrée sur le cofacteur BH_4 et son rôle dans le transfert de proton et d'électron. Il est maintenant clair que le cofacteur transfère un électron dans les deux étapes de la NOS de mammifère. Il est probable qu'il ne transfère pas de proton dans la première étape mais son rôle quant à ce transfert n'est pas défini dans la deuxième étape. Enfin son rôle redox ou celui du THF n'ont jamais été approfondis dans le cas de la NOS bactérienne.

Notre étude consiste à clarifier le rôle de BH_4 dans l'étape d'activation de l'oxygène : caractériser sa capacité à transférer un proton, comparer son action entre les deux étapes, étudier son rôle redox dans le cas de la NOS bactérienne. Le *freeze-quench* et la spectroscopie RPE ont été des méthodes de choix pour piéger et analyser le cofacteur à l'état radicalaire ([9], Annexe 2).

Le chapitre 4 est centré sur la méthodologie que nous mettons au point au laboratoire afin de mieux étudier les intermédiaires du cycle catalytique de la NOS. L'observation directe des espèces formées après l'activation de l'oxygène n'est pas possible dans l'état actuel de nos moyens technologiques. Il est donc nécessaire de concevoir des outils qui permettent d'étudier précisément les intermédiaires qui se forment au sein du site actif de l'enzyme. Cela permettrait d'obtenir des données permettant de mieux comprendre le déroulement des étapes de transfert de protons et d'électron qui mènent à la formation des espèces oxydantes. La **cryo-réduction** du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ suivie de **sauts en température** s'est avérée être un outil idéal pour mieux comprendre les différentes étapes du cycle catalytique des cytochromes P450 et de certaines NOS [133, 138, 183, 184]. Un critère essentiel au succès de cette méthode est la bonne stabilité de l'espèce de départ $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Une grande majorité des NOS ne remplit pas ce critère en présence du cofacteur naturel BH_4 et nous proposons une nouvelle adaptation de ce protocole ([10], Annexe 3).

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

1. Expression et purification des NO-Synthases

1.1. Expression et purification de la NO-Synthase inductible sauvage

iNOSoxy sauvage de souris, constituée uniquement de la partie oxygénase de la protéine (les acides aminés 65-498) a été produite par *E. coli* selon un protocole mis au point au sein du laboratoire de D. J. Stuehr [70, 123]. La souche *E. coli* BL21 utilisée contient un vecteur d'expression (pcWORI) contenant la séquence du domaine oxygénase d'iNOS. L'expression d'iNOSoxy est sous le contrôle du promoteur de la β -galactosidase. La souche bactérienne surexprime iNOSoxy supplémentée d'une étiquette de 6 histidines en position C-terminale et contient un gène de résistance à l'ampicilline. Les solutions et verreries utilisées sont toutes stérilisées au préalable par autoclavage.

Culture et induction :

La bactérie transformée est inoculée dans 5 mL de culture *Terrific Broth* (Sigma) contenant 10 % de glycérol dans un tube stérile. 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'ampicilline sont ajoutés au milieu de culture pendant toute la phase de croissance et d'induction afin d'éliminer toute autre bactérie contaminante. Le tube stérile est maintenu à 37°C sous agitation (150 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$). Au bout de 6-7 heures, le milieu est ré-inoculé dans 400 mL de milieu TB. La culture est de nouveau maintenue à 37°C sous agitation (150 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$) pendant toute la nuit. Le lendemain les 400 mL de pré-culture sont répartis dans 8 erlenmeyers de 2,5 L avec chacun 450 mL de milieu TB et sont maintenus à 37°C sous agitation (150 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$). La densité optique (DO), mesurée régulièrement, doit atteindre la valeur de 1 à 600 nm, qui indique que l'on est dans une phase de croissance optimale pour induire l'expression de la protéine. 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) permet d'induire l'expression du gène de la NOS. L'expression de l'hème est, quant à lui, sous le contrôle de l'acide δ -amino-lévulinique (δ -ala, 400 μM). Cette étape d'induction dure 72 heures à 20°C.

Lyse cellulaire :

Une centrifugation permet de rassembler les bactéries. Elles sont re-suspendues dans un tampon de lyse (un tampon phosphate (KPi) 100 mM pH 7,4 contenant 10 % de glycérol, 250 mM de NaCl, 1 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'aprotinine (antiprotéase), 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de leupeptine (antiprotéase), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepstatine A (antiprotéase), 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lysozyme, 1 mM de fluorure de phenylméthanesulfonyle (PMSF) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (antiprotéase), 50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DNase). L'action combinée du lysozyme et

de la pression osmotique permet la rupture de la membrane des bactéries. La lyse est accentuée par un double passage des bactéries dans un disrupteur (*Constants Systems Disruption Systems, Northants, UK*) exerçant une pression de 1 bar.

Séparation et purification des protéines :

Après la lyse bactérienne, une centrifugation est nécessaire pour séparer l'extrait soluble, qui contient la fraction protéique, des résidus membranaires qui précipitent. Les protéines, contenues dans le surnageant, sont récupérées par précipitation au sulfate d'ammonium $0,291 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ajouté pendant $\frac{1}{2}$ heure à 4°C . La solution est ensuite maintenue sous agitation pendant 30 min à 4°C . Après centrifugation, le culot contenant le précipité protéique est solubilisé dans un tampon de re-suspension MCAC (*Metal Chelate Affinity Chromatography* : un tampon TRIS 100 mM pH 7,4 contenant 10 % de glycérol, 250 mM de NaCl, 1 mM de PMSF dans de l'éthanol) avec 5 mM d'imidazole. Une dernière centrifugation permet d'éliminer les éventuels débris cellulaires résiduels avant l'étape de purification par chromatographie d'affinité sur colonne de résine chargée en nickel (His-Bind®, Novagen).

La colonne, stockée dans 50 % d'eau et 50 % d'éthanol, est rincée extensivement à l'eau. Elle est ensuite conditionnée dans le tampon MCAC contenant 5 mM d'imidazole afin d'occuper les sites de fixation non spécifiques. La colonne est maintenue à 8°C pendant toute la phase de purification (en chambre froide). La solution de protéine est chargée sur la colonne et deux cycles de lavage sont réalisés avec du tampon MCAC contenant 5 mM imidazole puis 60 mM imidazole. A ce stade, les protéines retenues sur la résine sont majoritairement iNOSoxy qui se fixe spécifiquement aux sites à nickel grâce à son étiquette histidine. L'élution est effectuée avec du tampon MCAC contenant 160 mM d'imidazole.

Une étape finale de dialyse de deux fois 24 heures est nécessaire afin d'éliminer l'imidazole et de conditionner la protéine dans un tampon KPi 100 mM pH 7,4 contenant 10 % de glycérol, 250 mM de NaCl, 1 mM de PMSF.

Enfin, la solution de iNOSoxy obtenue, est congelée dans de l'azote liquide et conservée à -80°C .

Deux types de préparations de iNOSoxy ont été réalisés suivant ce protocole : en absence de substrat et de cofacteur BH_4 ou alors en présence uniquement du cofacteur BH_4 . Pour cette condition, le BH_4 est alors ajouté au milieu de culture, aux tampons de lyse, de re-suspension et de dialyse avec une concentration finale de $50 \mu\text{M}$. Le dithiothréitol (DTT 3mM) est également ajouté afin de protéger le BH_4 de son oxydation en BH_2 . Ce protocole de purification nous permet d'obtenir jusqu'à 200 mg de iNOSoxy par préparation.

1.2. Expression et purification de la NO-Synthase de *Bacillus subtilis* sauvage

bsNOS sauvage a été surexprimée dans *E. coli* selon le même protocole que iNOSoxy à l'exception de quelques adaptations [68, 70, 123]. *E. coli* BL21 est transformée avec le plasmide pET15B contenant la séquence codante pour bsNOS et contient un gène de résistance à l'ampicilline. bsNOS est supplémentée d'une étiquette de 6 histidines en position N-terminale (au lieu de C-terminale pour iNOSoxy). L'induction de l'expression se fait sur une nuit (*versus* 72 heures pour iNOSoxy). bsNOS a une plus faible affinité pour la colonne de nickel que dans le cas de iNOSoxy. C'est pour cette raison que les concentrations en imidazole sont diminuées pour éviter l'éluion de la protéine pendant les phases de lavage (30 mM d'imidazole au lieu de 60 mM pour iNOSoxy). bsNOS est toujours exprimée en absence de substrat et de cofacteur BH₄.

1.3. Expression et purification des mutants de la NO-Synthase de *Bacillus subtilis*

La mutation sur le tryptophane Trp 66 (W66) de bsNOS a été effectuée au laboratoire avant ma venue grâce à un kit de mutagenèse dirigée « Quick Change KL » permettant de remplacer le tryptophane 66 par un autre acide aminé : la phénylalanine (Phe), la tyrosine (Tyr), l'histidine (His), la leucine (Leu) ou l'alanine (Ala) :

- Protéine sauvage (WT) :

TCTGCCGATGCAGCGGT*IGCTGTT***TCTCAA**AGCCATTTTCGCCCCCGTG ;

- Trp 66 → Phe (F) : W66F

TCTGCCGATGCAGCGGT*IGCTGTT***TCTGAA**AGCCATTTTCGCCCCCGTG ;

- Trp 66 → Tyr (Y) : W66Y

TCTGCCGATGCAGCGGT*IGCTGTT***TCTATA**AGCCATTTTCGCCCCCGTG ;

- Trp 66 → His (H) : W66H

TCTGCCGATGCAGCGGT*IGCTGTT***TCTGTG**AGCCATTTTCGCCCCCGTG ;

- Trp 66 → Leu (L) : W66L

TCTGCCGATGCAGCGGT*IGCTGTT***TCTGAG**AGCCATTTTCGCCCCCGTG ;

- Trp 66 → Ala (A) : W66A

TCTGCCGATGCAGCGGT*IGCTGTT***TCTCGC**AGCCATTTTCGCCCCCGTG

Ces mutations ont été vérifiées par séquençage d'ADN.

Le protocole d'expression et de purification des mutants W66F, W66Y, W66H, W66L et W66A a été développé à partir du protocole déjà établi pour bsNOS sauvage. Pour une meilleure stabilité de la protéine mutée, il faut fixer le pH du tampon de lyse, de resuspension, du MCAC et des tampons de dialyse à pH 9 pour les mutants W66F et W66Y et à pH 8 pour les mutants W66H,

W66L et W66A. En raison d'une plus faible affinité des mutants pour la colonne de nickel on procède à un seul lavage à 10 mM d'imidazole (au lieu de 30 mM pour bsNOS sauvage).

2. Test d'activité enzymatique : le test de Griess

Afin de vérifier que l'enzyme obtenue après surexpression et purification est bien active, on réalise l'oxydation de NOHA par le domaine oxygénase de NOS en présence de H_2O_2 . Ce dernier fournit les électrons et les protons nécessaires à la NOS pour oxyder le NOHA [148]. Le détail de la réaction d'oxydation de NOHA dans ces conditions n'est pas exactement connu mais mène à la formation de citrulline, de cyano-ornithine et de NO^- . NO^- réagirait ensuite de nouveau avec l'enzyme pour former, en condition aérobie, un mélange de nitrite NO_2^- et de nitrate NO_3^- . Le test de Griess est une méthode colorimétrique qui permet de doser cette quantité de nitrite formée. Le sulfanilamide réagit de manière stœchiométrique avec les ions nitrites pour donner un composé diazonium, qui réagit lui-même avec le N-(1-naphtyl)éthylènediamine (NED) pour donner un composé diazo de couleur rose vif dont l'absorbance est mesurée à 548 nm (Figure 29). Cette absorbance est convertie en concentration de nitrite grâce à une gamme d'étalonnage de nitrite de sodium.

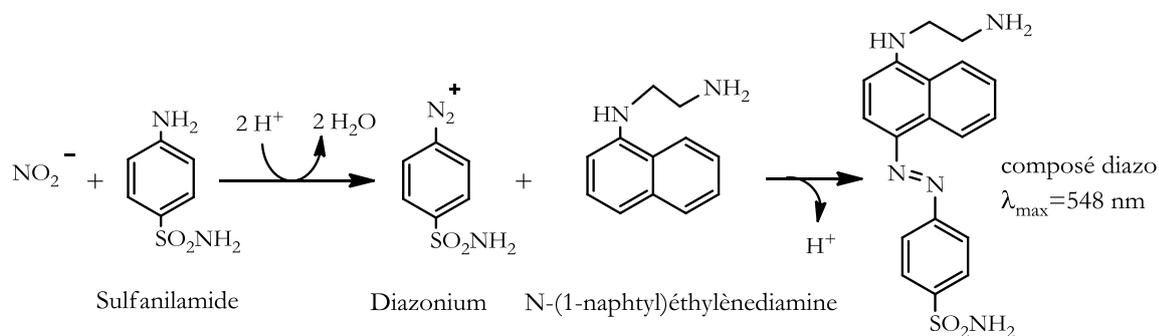


Figure 29 : Réaction de détection des nitrites.

Détails expérimentaux :

La protéine native est conditionnée dans un tampon « oxygénase » (KPi 100 mM pH 7,4 contenant 10 % de glycérol, 0,1 mg.mL⁻¹ de BSA, 1 mM de DTT, 25 U.mL⁻¹ de superoxyde dismutase (SOD)) et a une concentration finale de 300 nM pour iNOSoxy et 2 μM pour bsNOS. La présence de SOD sert à éviter les réactions parasites avec les espèces $O_2^{\cdot-}$. La protéine est incubée 30 min à 30 °C en présence de concentrations croissantes en cofacteur BH_4 (de 0 à 200 μM). BH_4 permet la structuration des monomères de NOS en dimères, alors actifs pour réaliser l'oxydation de NOHA. La réaction est déclenchée par l'addition de 1 mM de substrat NOHA et 30 mM de H_2O_2 ,

puis arrêtée au bout de 10 minutes par l'ajout de 7 mg.L^{-1} de catalase qui va neutraliser l'excès d' H_2O_2 restant. On prélève $500 \mu\text{L}$ de l'échantillon auxquels sont ajoutés $500 \mu\text{L}$ du réactif de Griess (constitué de 50 % de NED-dihydrochloride 1 g.L^{-1} et de 50 % de sulfanilamide 10 g.L^{-1} dans de l'acide chlorhydrique 1 % (HCl)), qui réagit avec les nitrites et forme le composé diazo mesuré par la DO à 548 nm .

Traitement des données :

La production de nitrites par les NOS en fonction de la concentration en BH_4 est simulée par une courbe de saturation hyperbolique dont plusieurs paramètres vont permettre de caractériser l'activité de la protéine (Figure 30). On détermine ainsi la vitesse maximale de formation de nitrites (V_{max} exprimée en moles de nitrites formées par minute et par moles d'enzymes), la constante de dissociation apparente pour BH_4 (k_d , en μM) et V_0 l'activité non spécifique de la protéine. La V_{max} mesurée pour iNOSoxy varie entre 16 et $55 \text{ mol NO}_2^- / \text{min} / \text{mol}$ d'enzyme et le k_d apparent pour BH_4 est compris entre 1,1 et $5,4 \mu\text{M}$. Pour bsNOS la V_{max} mesurée varie entre 0,4 et $2,1 \text{ mol NO}_2^- / \text{min} / \text{mol}$ d'enzyme et le k_d apparent pour BH_4 est compris entre 10 et $20 \mu\text{M}$.

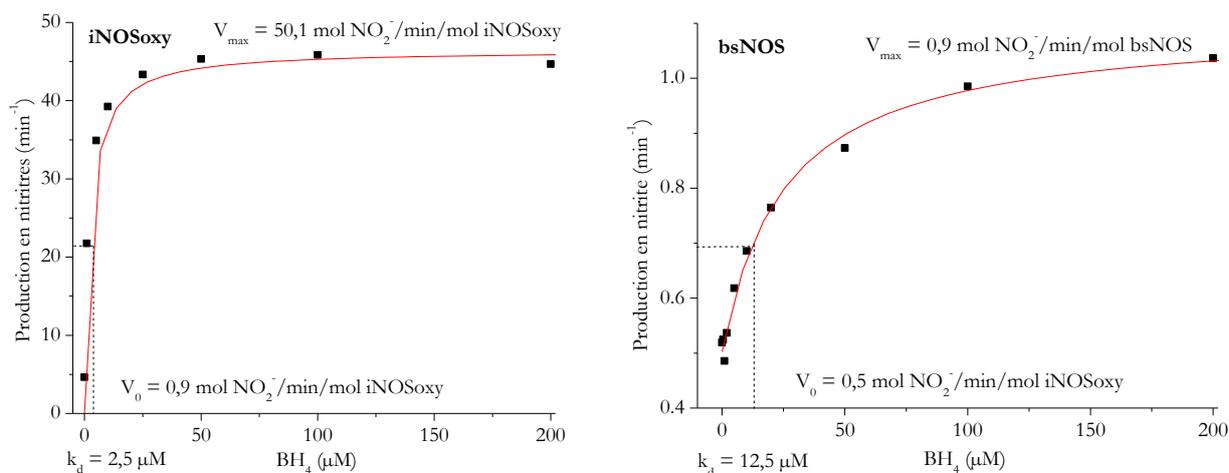


Figure 30 : Courbes issues du test de Griess d'iNOSoxy et bsNOS.

L'oxydation de NOHA en présence d' H_2O_2 aboutit à la formation de l'espèce NO^\cdot qui conduit à un mélange de nitrite NO_2^- et nitrate NO_3^- . Pour estimer l'activité totale de la protéine cette fraction de nitrate formée peut être dosée. Une étape supplémentaire est alors nécessaire avant d'ajouter le réactif de Griess : la réduction du nitrate en nitrite. Les échantillons sont alors incubés 45 min à température ambiante avec la NADPH-nitrate réductase (NR) à 80 U.L^{-1} avec $900 \mu\text{M}$ de glucose-6-phosphate (G6P), 160 U.L^{-1} de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-D) et $1 \mu\text{M}$ NADPH dans un tampon $\text{KPi } 0,1 \text{ M pH } 7,4$. Le G6P et G6P-D permettent de régénérer le NADP^+

qui pourrait interférer avec la réaction de coloration au réactif de Griess [185]. Le réactif de Griess est ensuite ajouté, la DO mesurée à 548 nm et les données traitées comme expliqué précédemment.

3. Préparation des différents complexes héminiques de NOS

3.1. Préparation de la NO-Synthase à l'état Fe^{III}

Dans le cadre de ma thèse, l'espèce Fe^{III} est l'espèce de départ des expériences de cryo-réduction (Chapitre 4). Elle est aussi utilisée pour l'analyse des protéines mutées de bsNOS (Chapitre 3.1.) et comme échantillon de référence pour caractériser les espèces piégées par *freeze-quench* (Chapitre 3.3.) ou pendant les sauts en température (Chapitre 4).

Les échantillons de NOS à l'état Fe^{III} ont été préparés après deux cycles de lavage et de concentration à 5000 tr.min⁻¹ pendant 10 minutes à 4 °C. Ces dernières étapes de lavage permettent à la fois d'éliminer l'imidazole résiduel et de conditionner la protéine avec un tampon KPi pH 7,4 100 mM contenant un substrat et/ou un cofacteur dont les concentrations sont adaptées en fonction des expériences réalisées. Quand l'échantillon est conservé à 77 K, on ajoute 10 % de glycérol qui a un rôle cryo-protecteur.

Pour les analyses spectroscopiques UV-visible ou RPE :

Pour les analyses par spectroscopie UV-visible la protéine est préparée à une concentration de 10 à 80 µM en présence du substrat arginine 5 mM et du cofacteur BH₄ de 40 à 400 µM.

Pour l'étude des protéines mutées (Chapitre 3.1.) et des échantillons de références (Chapitre 3.3.) par spectroscopie RPE, la concentration en protéine est fixée entre 150 et 200 µM. La concentration en substrat est de 5 mM pour l'arginine et de 10 mM pour le NOHA et la concentration en BH₄ est fixée à 400 µM.

Pour les études de cryo-réduction :

Dans le cas des études de cryo-réduction (Chapitre 4), les protéines iNOSoxy et bsNOS ont été préparées avec une concentration de 150 µM et 200 µM respectivement. De nombreuses conditions ont été testées : en présence ou absence d'arginine et de NOHA (5 mM ou 10 mM respectivement) et en présence ou absence de cofacteur BH₄ (800 µM). Le tampon ajouté est soit anaérobie, soit saturé en gaz O₂ ou saturé en gaz CO et contient 50 % de glycérol.

Pour les analyses de cinétique rapide :

Les analyses en flux continu, en *stopped-flow* et en *freeze-quench* nécessitent une espèce de départ à l'état Fe^{II}. Cependant, la protéine est d'abord lavée et conditionnée à l'état Fe^{III} avec un substrat et un cofacteur avant d'être réduite.

Dans le cas des analyses en flux continu et en *stopped-flow*, la protéine est d'abord préparée à l'état Fe^{III} avec une concentration de 80 µM. La concentration en substrat ou analogue de substrat est adaptée en fonction des constantes d'affinité de chacun : 5 mM arginine, 10 mM 4-fluorophénylguanidine (4-Fphgua), 10 mM 4-chlorophénylguanidine (4-Clphgua), 20 mM 4-trifluorophénylguanidine (4-CF₃phgua), 20 mM 4-méthoxyphénylguanidine (4-MeOphgua), 5 mM pentylguanidine (pentylgua) [163]. Les expériences ont été réalisées en présence du cofacteur BH₄ (400 µM) et du cofacteur inactif BH₂ (800 µM). Certaines analyses en flux continu ont nécessité un marquage isotopique à l'oxygène ¹⁸O₂. Dans ce cas la protéine est conditionnée dans un tampon préalablement anaérobisé et saturé en ¹⁸O₂ (Icon Isotopes, Summit, NJ USA). Par la suite l'espèce Fe^{III} ainsi conditionnée est réduite à l'état Fe^{II}.

Dans le cas des expériences de *freeze-quench*, les solutions protéiques iNOSoxy et bsNOS sont préparées avec une concentration comprise entre 300 et 800 µM avec un substrat arginine 5 mM ou NOHA 10 mM et un cofacteur BH₄ 2 mM ou THF 4 mM. Certaines expériences de *freeze-quench* ont été réalisées avec une protéine conditionnée dans un tampon deutéré (Euriso-Top).

3.2. Réduction du fer

L'espèce Fe^{II} de NOS est l'espèce de départ des expériences en flux continu (Chapitre 3.2.), en *stopped-flow* (Chapitre 3.2.) et en *freeze-quench* (Chapitre 3.3.). C'est aussi à partir de celle-ci que seront formés les complexes de référence Fe^{II}NO et Fe^{II}CO.

Les échantillons ferreux sont préparés à partir de la NOS à l'état ferrique décrite précédemment. Ceux-ci sont transférés dans une cuve en quartz ou un tube RPE fermés par un septum. Un dispositif combinant une rampe à gaz et une rampe à vide montées en parallèle permet de chasser le dioxygène de l'échantillon par plusieurs cycles successifs connectant l'échantillon avec le vide et avec l'azote. Quelques mg de dithionite sont conditionnés en atmosphère inerte dans un pilulier en verre scellé avec un septum. Le tampon dégazé KPi 0,1 M pH 7,4 est introduit dans le pilulier, à l'aide d'une seringue anaérobique et étanche aux gaz (Hamilton, Reno, NV, USA), pour solubiliser le dithionite. Une telle solution a été préparée avec une concentration comprise entre 40 mM et 160 mM. Le dithionite nécessaire à la réduction de l'espèce Fe^{III} en espèce Fe^{II} est ajouté à la solution protéique avec les seringues préalablement anaérobisées. Afin d'éviter tout excès de dithionite, la réduction est obtenue par ajout progressif de dithionite dans la cuve en quartz ou le tube RPE.

Les solutions protéiques conditionnées dans tube RPE seront utilisées pour former les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. La réduction ne peut pas être suivie par spectroscopie UV-visible mais d'une manière générale 2,5 équivalents de dithionite par rapport à la NOS sont nécessaires et suffisants pour réduire totalement la NOS.

La protéine est conditionnée dans une cuve en quartz, pour les expériences de *stopped-flow* et de *freeze-quench*. Afin d'éviter tout excès de dithionite, qui pourrait réagir avec les espèces formées pendant la réaction d'oxydation du NOHA ou de l'arginine, l'étape de réduction est titrée et suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible. L'éventuel excès de dithionite encore présent est éliminé en boîte à gants sur une colonne PD10 (Amersham Pharmacia Biotech, Suède) ou des mini-colonnes de désalinisation protéique (Thermo Scientific). La protéine est transférée dans le système de *freeze-quench* ou de *stopped-flow* par une seringue étanche au gaz et anaérobisée.

3.3. Fixation de ligands distaux

Fixation du ligand NO :

Dans le cadre de ma thèse les espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ sont utilisées pour sonder le site actif des mutants de bsNOS (Chapitre 3.1.). L'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ a également été générée dans différentes conditions de saturation en substrat et cofacteur et sert d'échantillons de références (Chapitre 3.3.).

Les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ sont préparés en conditions anaérobiques à partir des espèces Fe^{III} et Fe^{II} décrites précédemment (voir 3.1. et 3.2.). 2 mL d'une solution tampon KPi 0,1 M pH 7,4, préalablement dégazée par bullage d'azote dans un flacon en verre hermétique, est saturée en NO grâce à un bullage continu de gaz NO pendant 10 min. Le gaz NO utilisé est lavé par une solution KOH 0,1 N pour éliminer tout autre oxyde d'azote. Une seringue étanche aux gaz préalablement anaérobisée permet le transfert de la solution saturée en NO dans les échantillons. L'ajout se fait progressivement car un excès local de NO peut endommager la protéine (nitrosation du thiolate proximal, oxydation de l'hème, précipitation de la protéine). Le NO se fixe sur le fer de l'hème pour former les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ ou $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$.

Fixation du ligand CO :

L'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ a été utilisée pour sonder le site actif des mutants de bsNOS (Chapitre 3.1.). Pour générer le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ dans les tubes RPE, l'espèce Fe^{II} est d'abord formée comme décrit précédemment (voir 3.2.). La circulation d'un courant de gaz CO à la surface de l'échantillon pendant 10 minutes permet ensuite de générer le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$.

La concentration en protéine est déterminée par le test P450. Dans ce cas le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ est préparé dans une cuve en quartz. L'espèce Fe^{II} est d'abord produite par ajout d'un excès

de dithionite directement dans la cuve qui contient la protéine à l'état Fe^{III} . L'addition de gaz CO se fait aussi directement dans la cuve et permet de générer le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$.

4. Techniques spectroscopiques utilisées pour l'étude des différents complexes de NOS

4.1. La spectroscopie UV-visible

Caractérisation de l'espèce Fe^{III} :

Après l'expression et la purification d'iNOSoxy sans cofacteur et sans substrat, la protéine est à l'état Fe^{III} bas spin hexacoordonné (Fe^{III} BS-6C) avec une molécule H_2O comme sixième ligand. Le spectre d'absorption UV-visible de ce complexe présente une bande de Soret à 420 nm (Figure 31, spectre bleu). Dans ces conditions, la structure dimérique de NOS est fragile et la proportion monomères / dimères est difficile à estimer. L'ajout du cofacteur BH_4 permet une réorganisation conformationnelle du site actif, l'eau est chassée de la cavité et une partie de la protéine bascule à l'état Fe^{III} haut spin hexacoordonné (Fe^{III} HS-5C). La bande de Soret est décalée vers 400-402 nm (Figure 31, spectre rouge). La bande de transfert de charge, $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$, caractéristique des espèces Fe^{III} HS, apparaît à 650 nm. En présence du cofacteur BH_4 et du substrat arginine, la protéine se retrouve entièrement à l'état Fe^{III} HS-5C caractérisé en UV-Visible par une bande d'absorption à 395 nm (Figure 31, spectre noir).

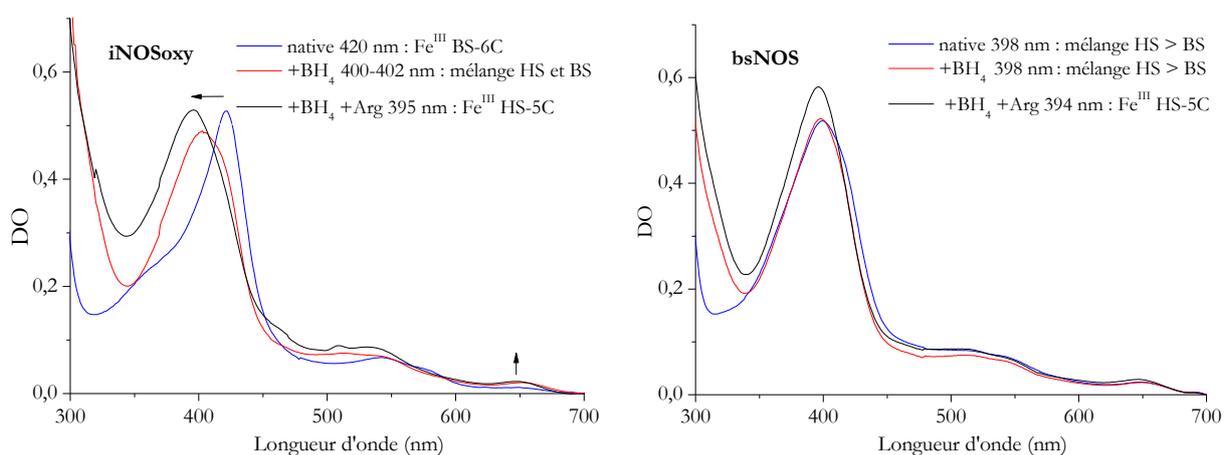


Figure 31 : Spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy et bsNOS à l'état natif (bleu), en présence de cofacteur BH_4 (rouge), en présence d'arginine et de BH_4 (noir).

bsNOS sans cofacteur et sans substrat a une bande de Soret à 398 nm correspondant à un état presque totalement HS-5C (Figure 31, spectre bleu). L'ajout de BH_4 n'entraîne pas de changements significatifs (Figure 31, spectre rouge). Contrairement à iNOSoxy c'est l'ajout du

substrat qui est déterminant pour obtenir 100 % de la protéine à l'état HS-5C (394 nm) (Figure 31, spectre noir).

Caractérisation de l'espèce Fe^{II} :

La formation de l'espèce Fe^{II} est caractérisée en spectroscopie UV-visible par un déplacement de la bande de Soret à 412 nm (Figure 32, spectre rouge) et la disparition de la bande de transfert de charge à 650 nm.

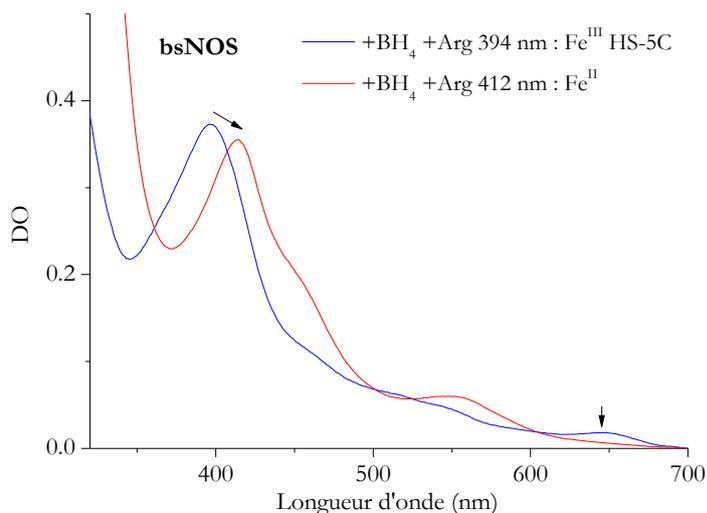


Figure 32 : Spectres d'absorption UV-visible de bsNOS à l'état Fe^{III} en présence du cofacteur BH₄ et du substrat arginine (bleu) et à l'état Fe^{II} dans les mêmes conditions.

Caractérisation des espèces Fe^{II}NO et Fe^{III}NO :

Le complexe Fe^{II}NO est caractérisé en absorption UV-visible par le déplacement de la bande de Soret à 436 nm (Figure 33, spectre rouge) et l'espèce Fe^{III}NO par le déplacement de cette bande à 440 nm (Figure 33, spectre vert).

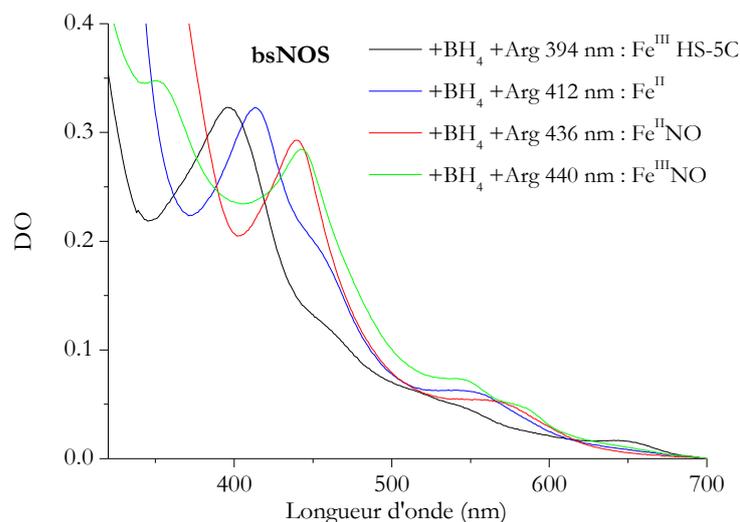


Figure 33 : Spectres d'absorption UV-visible de bsNOS en présence du cofacteur BH_4 et du substrat arginine à l'état Fe^{III} (noir), Fe^{II} (bleu), $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (rouge) et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ (vert).

Caractérisation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et Test P450 :

Le spectre d'absorption UV-visible du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ des hémoprotéines de la famille des cytochromes P450 présente un maximum d'absorption autour de 450 nm correspondant à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du complexe. Dans le cas des NOS, ce maximum se situe plutôt vers 445 nm (**Figure 34**). La concentration d'enzyme fonctionnelle, c'est-à-dire préservant le lien thiolate proximal, est calculée à partir de la différence entre l'absorbance à 445 nm et celle à 500 nm ($\epsilon = 74\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

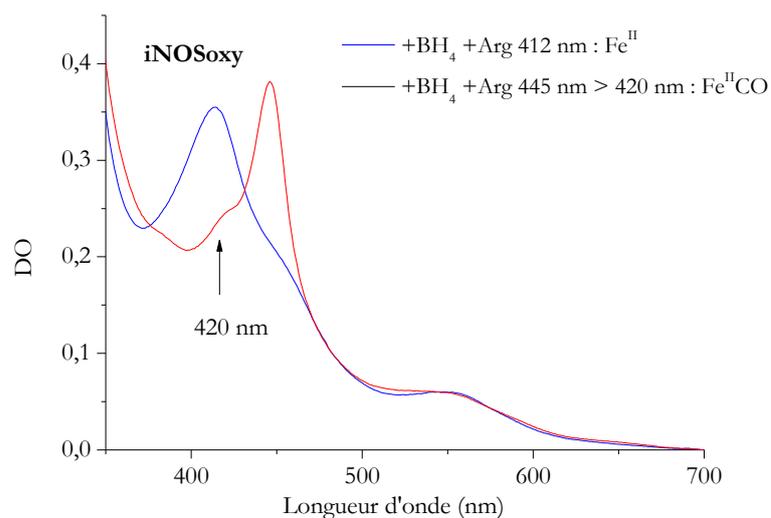


Figure 34 : Test P450 : Spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy en présence du cofacteur BH_4 et du substrat arginine à l'état Fe^{II} (bleu) et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ (rouge).

La présence d'une bande d'absorption à 420 nm correspond à la contribution du complexe Fe^{II}CO ayant la liaison entre le fer et la cystéine proximale dégradée et représente la partie non fonctionnelle de la protéine dans l'échantillon. L'absorption de cet épaulement est plus ou moins intense selon les préparations de NOS et le rapport des absorbances entre 445 nm et 420 nm varie entre 1,5 et 4. Le pic à 420 nm est rarement observé dans le cas de la NOS bactérienne ce qui traduit une meilleure robustesse de la protéine.

Le Tableau 1 répertorie les maximums d'absorption de la bande de Soret pour les différents complexes hémiques de iNOSoxy et bsNOS présentés ci-dessus.

Maximum d'absorption de la bande de Soret (λ_{max} en nm)	iNOSoxy	bsNOS
Fe ^{III} (LS)	420	398
Fe ^{III} +BH ₄ (LS+HS)	400-402	398
Fe ^{III} + BH ₄ + Arg (HS)	395	394
Fe ^{II} + BH ₄ + Arg	412	412
Fe ^{III} NO + BH ₄ + Arg	440	440
Fe ^{II} NO + BH ₄ + Arg	436	436
Fe ^{II} CO + BH ₄ + Arg	445	446

Tableau 1 : Bandes de Soret des différents complexes de iNOSoxy et bsNOS.

4.2. La spectroscopie de Raman de résonance

Dans le cadre de ma thèse la spectroscopie Raman de résonance (RR) a été utilisée pour l'étude des complexes hémiques préparés avec les protéines bsNOS mutées (Chapitre 3.1.). Elle a été utilisée également pour l'analyse des échantillons cryo-réduits (Chapitre 4).

4.2.1. Quelques généralités sur la spectroscopie de Raman de résonance

La diffusion Raman :

Quand un faisceau de lumière traverse un échantillon, elle est propagée, réfléchi, absorbée, transmise, et également diffusée. La diffusion de la lumière se fait majoritairement de manière élastique c'est-à-dire avec une longueur d'onde ν_{diff} du photon diffusé égale à la longueur d'onde ν_0 du photon incident : c'est le phénomène de diffusion Rayleigh ($\nu_{diff} = \nu_0$). Cependant une faible fraction de la lumière est diffusée de manière inélastique ($\nu_{diff} \neq \nu_0$) et contient l'information vibrationnelle caractéristique de l'énergie des sous-niveaux vibrationnels de la molécule (ν_{vib}) : c'est la diffusion Raman.

L'effet de résonance :

La spectroscopie Raman de résonance est un cas particulier de la spectroscopie Raman, qui permet l'étude sélective d'un chromophore. Ce phénomène de résonance se produit lorsque la longueur d'onde d'excitation correspond à une transition électronique permise du chromophore d'intérêt. Il y a alors amplification de l'effet Raman, jusqu'à $\times 10^6$: c'est l'effet Raman de résonance. Les transitions électroniques permises de la molécule sont détectées au moyen du spectre d'absorption UV-visible de la molécule. Expérimentalement, on choisit une longueur d'onde d'excitation proche d'un maximum d'absorption UV-visible de la molécule à étudier.

Vont être observés en spectroscopie Raman de résonance les modes vibrationnels simples dans le plan et les modes de vibrations plus complexes qui se situent en dehors du plan. Dans le plan, on distingue l'élongation (ν) et la déformation angulaire (δ) qui peuvent être symétriques (δ_s et ν_s), ou antisymétriques (δ_{as} et ν_{as}) (Figure 35). Ils se traduisent, respectivement, par des mouvements de cisaillement et de rotation. Hors du plan moléculaire, il s'agit de déformations angulaires symétrique (γ_s) ou antisymétrique (γ_{as}), et qui correspondent à des mouvements de torsion ou de balancement (Figure 35).

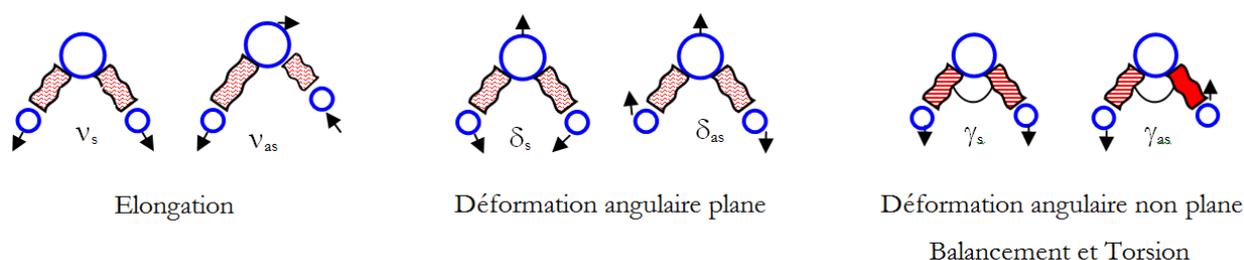


Figure 35 : Représentation des mouvements moléculaires correspondants aux modes de vibrations dans le plan et hors du plan de la molécule. Exemple d'une molécule triatomique non linéaire (H₂O).

Les modes de vibrations peuvent se combiner et donner différentes bandes Raman qui ne correspondent pas à des modes purs. Une vibration est active en Raman seulement si le mouvement vibrationnel s'accompagne d'un changement de la polarisabilité.

Cas des hémoprotéines :

Dans le cas des hémoprotéines, où les transitions électroniques sont bien caractérisées, la longueur d'onde d'excitation choisie correspond le plus souvent au maximum d'absorption UV-visible de la bande de Soret. De cette manière, les modes de vibrations exaltés sont les modes associés à la porphyrine et aux ligands directs du fer. Il est ainsi possible d'observer spécifiquement le comportement vibrationnel de l'hème, d'obtenir des informations structurales sur la nature

chimique du ligand, sa force de liaison au fer, sa conformation ou encore son interaction avec le site actif et son environnement.

4.2.2. La spectroscopie de Raman de résonance pour l'étude des complexes hémiques des NO-Synthases

Montage expérimental :

Deux sources de Laser ont été utilisées pendant ma thèse. La première ayant une longueur d'onde excitatrice de 413,1 nm provient d'un laser à Krypton ionisé (Spectra-Physics 2000). La seconde est un laser à Hélium-cadmium ionisé (Kimmon IK) ayant une longueur d'onde excitatrice de 441,6 nm. Le choix du laser est dépendant du mode de vibration que l'on veut exalter. On utilise une longueur d'onde excitatrice aux alentours de 441,6 nm pour les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ (bande de Soret aux alentours de 440 nm, 436 nm et 445 nm respectivement) et de 413,1 nm pour exalter les modes de vibrations de l'hème à l'état Fe^{II} et Fe^{III} (bande de Soret aux alentours de 412 nm et 394 nm respectivement). Afin d'éviter la photo-oxydation et la dégradation de l'échantillon pendant l'expérience, la puissance du faisceau laser incident est maintenue entre 5 et 10 mW grâce à un filtre placé entre le laser et l'échantillon (Figure 36, en gris).

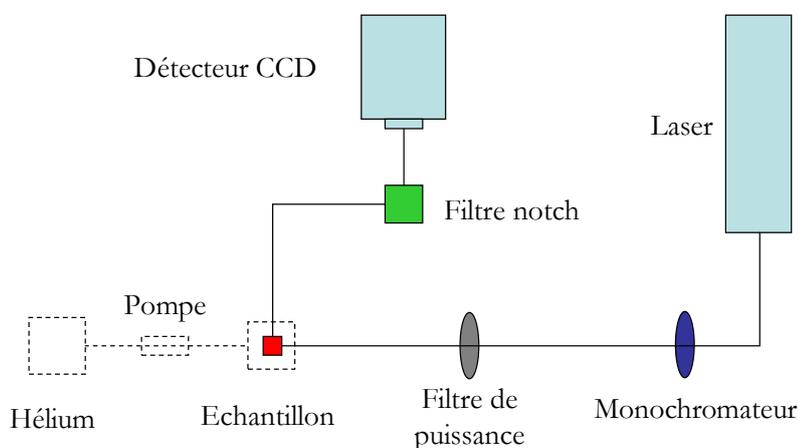


Figure 36 : Représentation du montage et du trajet optique du faisceau laser utilisé au laboratoire.

Pour des mesures à température ambiante, les échantillons sont préparés dans des tubes RPE tronqués. Le porte-échantillon est équipé d'un moteur qui permet la rotation de l'échantillon sur lui-même de manière à ne pas exposer toujours la même partie de l'échantillon à la lumière incidente et prévenir la dégradation de l'enzyme, sensible au rayonnement. Dans le cas des mesures à basse température, nous avons un système adapté pour monter un cryostat refroidi à l'hélium (Figure 36,

en pointillé). Le cryostat utilisé est un cryostat ESR900 (Oxford Instruments, Oxon, Angleterre) qui permet la mesure sur des échantillons contenus dans des tubes RPE ($V = 100 \mu\text{L}$) à 4 K.

Le détecteur, de type CCD (*Charge Coupled Device*) est refroidi par de l'azote liquide. Un filtre (Kaiser Optical Systems) spécifique à la longueur d'onde d'excitation est placé sur le trajet optique juste avant le détecteur afin d'absorber le plus possible la lumière Rayleigh (incidente) ([Figure 36](#), en vert). Les fentes du détecteur sont ouvertes à $100 \mu\text{m}$ permettant une résolution spectrale $\leq 3 \text{ cm}^{-1}$. Le détecteur est relié à un système informatique permettant le pilotage, l'enregistrement et l'accumulation des données par le logiciel Speclab V 3.03 (Jobin Yvon). Le monochromateur du spectromètre est calibré en utilisant la longueur d'onde de la lumière d'excitation comme référence.

Accumulation des spectres :

L'alignement du laser est réalisé dans un premier temps sur un échantillon d'éthanol dont le signal Raman est très intense et permet de trouver une géométrie convenable pour l'acquisition du signal. Ensuite la position du faisceau est ajustée sur l'échantillon protéique pour optimiser le rapport signal/bruit. Suivant la qualité de l'échantillon, la puissance du laser, le degré d'exaltation de l'effet Raman, la qualité du spectre peut varier. Chaque spectre enregistré est le résultat de l'accumulation de 40 à 200 spectres individuels obtenus avec des temps d'accumulation de 20 à 60 secondes pour chacun d'entre eux. Selon la qualité du rapport signal/bruit, on réalise ensuite la moyenne de 5 à 20 de ces spectres afin d'obtenir le spectre moyen final.

Traitement des données :

Le traitement des données réalisé avec le logiciel GRAMS/32 (Galactic Industries Corp., USA) permet de moyenniser les séries de spectres, de soustraire la contribution du tampon de référence, de supprimer des contributions parasites (bruit électronique, pixel défaillant), de corriger la ligne de base afin d'éliminer la contribution de la fluorescence de l'échantillon et de déterminer précisément les fréquences de vibration de l'espèce présente dans l'échantillon. L'identification de la composante spectrale associée à chaque pic est réalisée directement en simulant le pic par une fonction gaussienne. Dans le cas des signaux plus larges et plus complexes, le signal est simulé avec une somme de plusieurs fonctions gaussiennes. Un exemple de spectre Raman de résonance correspondant à l'espèce Fe^{III} HS-5C de iNOSoxy est représenté en [Figure 37](#).

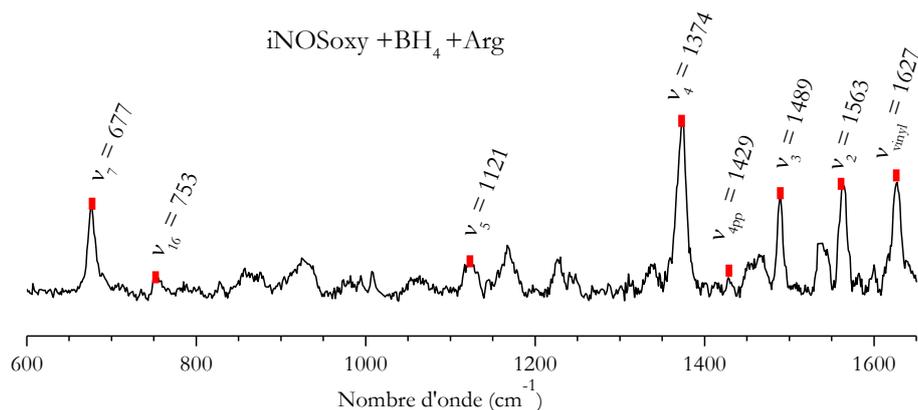


Figure 37 : Exemple de spectre obtenu en Raman de résonance de iNOSoxy en présence du substrat arginine et cofacteur BH_4 : Fe^{III} HS-5C.

Les fréquences de résonance des modes vibrationnels de la porphyrine sont pointées en rouge sur la Figure 37. Les différentes bandes des spectres obtenus en spectroscopie Raman de résonance ont été attribuées par analogie avec les données déjà connues sur iNOS, eNOS, nNOS, saNOS et bsNOS pour les complexes Fe^{III} , Fe^{II} , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de NOS (reportés en Annexe 4 [10, 102, 115, 160, 161, 163, 167, 186-197]).

4.3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)

Dans le cadre de ma thèse la spectroscopie ATR-FTIR a été utilisée uniquement pour l'étude des complexes hémiques $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ préparés avec les protéines de bsNOS mutées (Chapitre 3.2.)

4.3.1. Quelques généralités sur l'ATR-FTIR

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) :

La spectroscopie d'absorption infrarouge implique l'absorption d'une radiation de longueur d'onde variant approximativement de 5000 à 400 cm^{-1} et permet une observation directe des fréquences caractéristiques des modes de vibration d'une molécule. Pour qu'un mode vibrationnel soit actif en IR, il doit y avoir changement du moment dipolaire.

Expérimentalement l'échantillon est placé sur le trajet optique d'un faisceau lumineux infrarouge, et l'examen de la lumière transmise permet de déterminer quelles fréquences ont été absorbées par l'échantillon. La transformée de Fourier du signal obtenu en transmission donne directement le spectre total de l'échantillon.

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) :

Dans nos études, le porte échantillon employé est constitué d'un cristal possédant un indice de réfraction très élevé : ZnSe ($n = 1,24$). L'échantillon est placé sur la surface du cristal à l'intérieur duquel le rayon infrarouge subit de nombreuses réflexions sur les bords du cristal avant de ressortir (Figure 38).

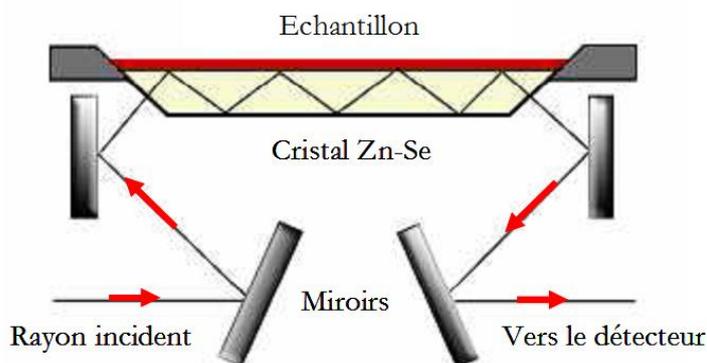


Figure 38 : Représentation schématique de la cellule d'un spectromètre ATR-FTIR.

Au cours du phénomène de réflexion, le rayonnement pénètre légèrement dans le milieu de l'échantillon. Ce rayonnement est appelé onde évanescente. Si l'échantillon absorbe cette onde évanescente, le rayon infrarouge transmis dans le cristal est donc atténué à chaque réflexion sur le bord et sa composition spectrale donne un négatif du spectre d'absorption de l'échantillon. Ce phénomène est connu sous le nom de réflexion totale atténuée (ATR). Le traitement du signal est ensuite réalisé par la méthode à transformée de Fourier. L'*Attenuated Total Reflection – Fourier Transformed InfraRed* (ATR-FTIR) apporte une solution à une très grande variété de problèmes d'échantillonnage. C'est une technique utilisée pour des échantillons trop fins ou qui absorbent trop pour être analysés par spectroscopie de transmission.

4.3.2. L'ATR-FTIR pour l'étude du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ des NO-Synthases

La spectroscopie ATR-FTIR est particulièrement adaptée à l'étude du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ des hémoprotéines dont les échantillons possèdent une absorbance très élevée [193, 198-202]. Le mode de vibration d'élongation de la liaison C–O donne un signal observé entre 1900 et 1970 cm^{-1} environ, c'est-à-dire dans une région du spectre qui ne comporte pratiquement aucun autre signal, ce qui rend le signal d'intérêt facile à observer et à attribuer.

Pour les analyses par spectroscopie ATR-FTIR, l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ est préparée dans une cuvette comme décrit en partie 3.2. De 10 à 15 μL sont prélevés avec une seringue Hamilton[®] et transférés directement dans la chambre ATR du spectromètre. L'échantillon est déposé sous la forme d'une goutte à la surface du cristal. On fait circuler un léger courant de CO gazeux à la surface

de la goutte pendant 15 minutes, ce qui permet à la fois d'assécher, de concentrer l'échantillon et de saturer la chambre du spectromètre en CO. La chambre est ensuite replacée à l'intérieur du spectromètre pour procéder aux mesures.

Accumulation des spectres et traitement des données :

Tous les spectres sont enregistrés à température ambiante avec un spectromètre FTIR Bruker IFS 66/S couplé à une unité ATR (Pike Technologies). Le spectromètre est relié à un système informatique permettant le pilotage, l'enregistrement et l'accumulation des données par le logiciel OPUS (Optics Users Software, Bruker). Chaque spectre enregistré est le résultat de l'accumulation de 20 à 50 interférogrammes, chaque interférogramme étant le résultat de 250 mesures réalisées avec une durée d'exposition de 1 seconde. Selon la qualité du rapport signal/bruit, on réalise ensuite la moyenne de 2 à 6 spectres afin d'obtenir le spectre moyen final. On réalise également un enregistrement de la chambre du spectromètre à vide, ce qui permet d'obtenir le spectre de la vapeur d'eau. Le traitement des données avec le logiciel GRAMS/32 (Galactic Industries Corp., USA) permet de corriger la ligne de base des spectres et d'éliminer la contribution de la vapeur d'eau au signal. Les composantes spectrales des signaux ATR-FTIR ont été déterminées de la même manière que dans le cas des spectres obtenus en spectroscopie Raman de résonance, en utilisant le logiciel Origin 6.0 (OriginLab Corp., USA).

4.4. La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

Dans le cadre de ma thèse, la spectroscopie RPE a été utilisée pour caractériser des complexes héminiques Fe^{III} HS, Fe^{III} BS et Fe^{II}NO formés avec les protéines bsNOS mutées (Chapitre 3.1.). Elle a aussi servi à identifier les espèces présentes dans les échantillons piégés par *freeze-quench* (Chapitre 3.3.). Elle est utilisée également pour suivre l'évolution de l'espèce Fe^{III} pendant les étapes de cryo-réduction et de sauts en température (Chapitre 4).

4.4.1. Quelques généralités sur la spectroscopie RPE

L'effet Zeeman et le facteur g :

La spectroscopie de RPE est une technique qui permet la détection des molécules ou atomes dans un état de spin paramagnétique, c'est-à-dire qui comptent un ou plusieurs électrons célibataires. Cette méthode peut donc s'appliquer à l'étude des radicaux libres et des ions métalliques des métalloprotéines.

Un électron non apparié possède un moment cinétique de spin $S = 1/2$ associé à deux états, $m_s = + 1/2$ ou $- 1/2$. En l'absence de champ magnétique extérieur, les niveaux énergétiques

correspondant à ces deux états de spin sont dégénérés. Une molécule paramagnétique possède un spin électronique S non nul, et ce spin correspond à la somme des spins électroniques individuels des électrons de valence. Pour tout système de nombre de spin demi-entier ($S = \pm x/2$), une dégénérescence au moins double doit subsister en l'absence de champ magnétique (doublets de Kramer). Lorsqu'on applique un champ magnétique extérieur B , on observe une levée de dégénérescence des énergies associées aux états de spin : c'est l'effet Zeeman (Figure 39). La différence d'énergie ΔE entre les deux états de spin est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique appliqué et vérifie la relation : $\Delta E = g\beta B$ où B est la valeur du champ magnétique, β est le magnéton de Bohr électronique ($9,274.10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$), et g est le facteur de Landé caractéristique de l'espèce paramagnétique étudiée (2,0023 pour l'électron libre). Le principe de la spectroscopie RPE consiste à mesurer la différence d'énergie ΔE de manière à déterminer le facteur g associé à l'espèce étudiée.

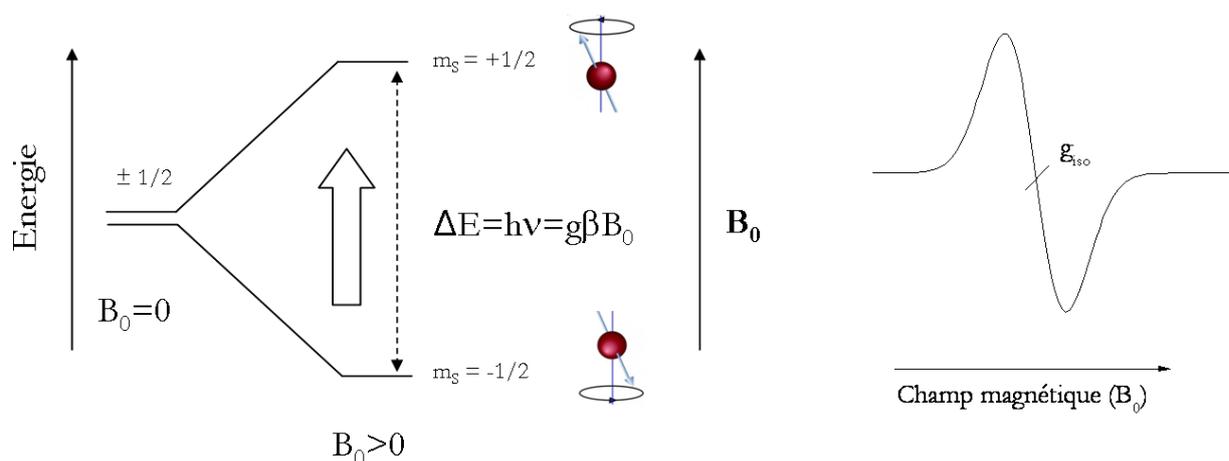


Figure 39 : Représentation schématique de l'effet Zeeman et du signal RPE associé pour un système de spin $S = 1/2$.

Expérimentalement, l'échantillon reçoit une onde électro-magnétique de fréquence ν fixe et on fait varier le champ magnétique B_0 appliqué. L'onde magnétique est absorbée pour des valeurs telles que $B_0 = \Delta E/g\beta$: c'est le phénomène de résonance (Figure 39). Le signal observé correspond à la dérivée du signal d'absorption du fait de l'utilisation de la modulation en champ.

En réalité, le facteur g est une matrice caractérisée par les 3 valeurs principales g_1 , g_2 et g_3 (ou g_x , g_y et g_z). Lorsque le système étudié est isotrope, les valeurs de ces 3 paramètres sont égales ($g_1 = g_2 = g_3$, voir Figure 39 : g_{iso}). Lorsqu'il est axial les valeurs g_1 et g_2 sont égales et la valeur g_3 est différente (Figure 40). Lorsque le système étudié est rhombique les résonances ont 3 valeurs de g différentes $g_1 \neq g_2 \neq g_3$ et, par convention, dans cette thèse, g_1 est la valeur de g la plus élevée et g_3 la plus faible ($g_1 > g_2 > g_3$) (Figure 40)

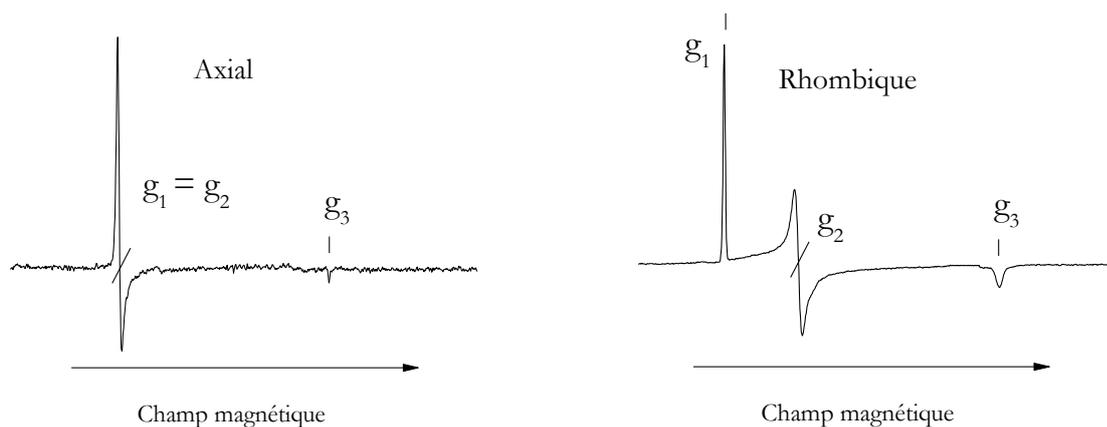


Figure 40 : Représentation des spectres caractéristiques d'une espèce de configuration axiale (l'hémoglobine) ou rhombique (iNOSoxy en présence du cofacteur BH₄ et du substrat Arg).

Couplage Hyperfin :

Lorsque le système paramagnétique a un spin nucléaire I non nul, ce dernier peut interagir avec le spin électronique : c'est le couplage hyperfin caractérisé par le tenseur \mathbf{A} . Chaque valeur de g est éclatée en un nombre $(2I+1)$ raies dont l'espacement caractérise la force du couplage. Par exemple, le couplage hyperfin entre un spin électronique et le spin nucléaire d'un atome d'hydrogène ($I = 1/2$) va donner un éclatement en deux raies du signal dérivé enregistré en RPE (Figure 41). Pour un couplage avec le spin nucléaire d'un azote ^{14}N ($I = 1$), un éclatement en trois raies sera observé. Pour qu'une transition soit permise, elle doit satisfaire la règle de sélection : $\Delta m_s = \pm 1$ et $\Delta m_l = 0$.

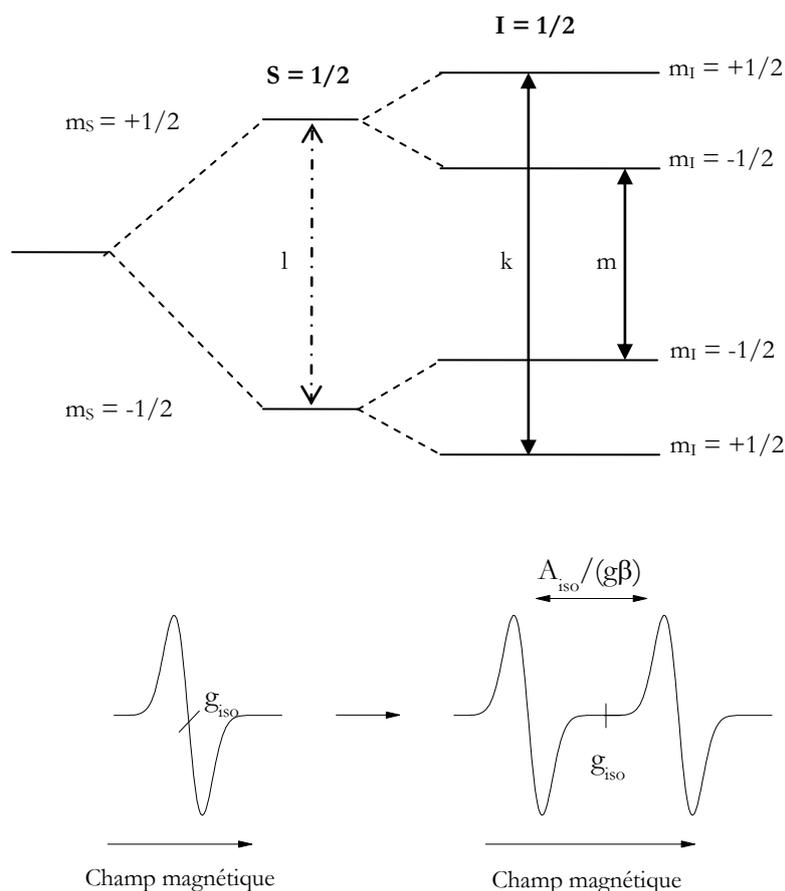


Figure 41 : Représentation des transitions RPE permises au sein d'un système $S=1/2$ en interaction hyperfine avec un spin nucléaire $I=1/2$. Le trait en pointillé (l) représente la transition Zeeman électronique seule. Les traits continus (k, m) représentent les transitions permises avec le couplage hyperfin.

RPE à champ intense :

La spectroscopie RPE à champ intense permet de rendre l'interaction Zeeman et son anisotropie dominantes. Dans ces conditions, on a : $(\Delta_g/g_{iso}) \times B \gg \Delta H_{1/2}$ (où Δ_g est l'anisotropie du facteur g, g_{iso} la moyenne des trois valeurs principales, B l'amplitude du champ externe appliqué et $\Delta H_{1/2}$ la largeur de raie due aux couplages hyperfins non-résolus). L'anisotropie Zeeman, pour 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 sont nécessaires pour que l'anisotropie du facteur g soit résolue. Pratiquement, pour obtenir une bonne résolution expérimentale des valeurs de g sur un spectre, il faut que la différence entre deux valeurs de g consécutives ($g_1 - g_2$ ou $g_2 - g_3$) soit nettement supérieure à l'élargissement de la raie due aux couplages non résolus.

4.4.2. La spectroscopie RPE pour l'étude des complexes hémiques des NO-Syntheses

RPE pour l'étude des hémoprotéines : configuration haut spin et bas spin

Les propriétés magnétiques et électroniques des complexes de fer dépendent de leur état d'oxydation ainsi que de la nature des ligands. Pour décrire les espèces Fe^{II} ($3d^6$) et Fe^{III} ($3d^5$), la théorie du champ de ligand est la plus utilisée. Un champ à symétrie octaédrique lève la dégénérescence des orbitales d du fer en deux groupes séparés par une énergie Δ . Le plus énergétique, noté e_g , inclut deux orbitales $d_{x^2-y^2}$ et d_{z^2} , qui interagissent fortement avec les orbitales des ligands pour former des liaisons de type σ . En raison de leurs orientations spatiales, les trois orbitales d_{xy} , d_{yz} et d_{zx} de plus basse énergie, de symétrie t_{2g} , participent principalement à des interactions de type π avec les orbitales des ligands. Si le champ de ligands est fort, Δ est supérieure à l'énergie d'appariement des électrons et ceux-ci se répartissent dans les sous niveaux de plus faible énergie, donc dans les trois orbitales de symétrie t_{2g} . Le complexe est alors dit à spin faible ($S=0$ pour l'espèce Fe^{II} et $S=1/2$ pour l'espèce Fe^{III}) ou bas spin (BS) (Figure 42). Si le champ de ligands est faible, Δ est inférieure à l'énergie d'appariement des électrons et les électrons de valence se répartissent pour satisfaire la règle de multiplicité de spin de Hund. Le complexe aura alors un spin fort ($S=2$ pour l'espèce Fe^{II} ou $S=5/2$ pour l'espèce Fe^{III}) ou haut spin (HS). Les électrons occuperont les orbitales e_g et t_{2g} (Figure 42).

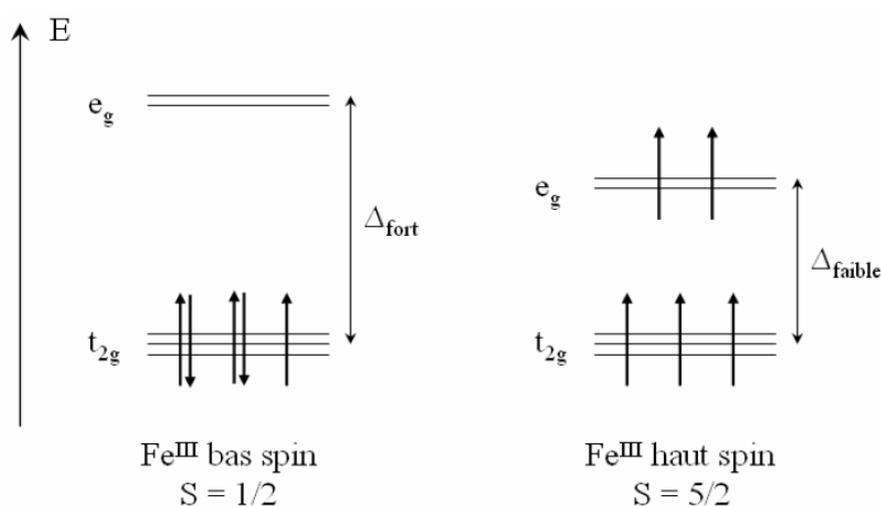


Figure 42 : Configuration électronique des orbitales 3d du fer au degré d'oxydation III en fonction de l'intensité du champ de ligand pour un champ octaédrique.

La configuration bas spin, dans le cas des hémoprotéines, correspond à celle d'un ion ferrique 6C. Un seul doublet de Kramer $m_s = \pm 1/2$ est impliqué dans la transition observée [203]. Comme l'électron n'est pas dans une symétrie isotrope, l'interaction du spin électronique avec le

champ extérieur donne lieu à trois valeurs de g : g_x , g_y et g_z . Par convention, dans le cas des hémoprotéines, les deux valeurs de g qui correspondent au plan de l'hème sont appelées g_x et g_y . La valeur qui correspond à la direction axiale de l'hème est appelée g_z . Les espèces BS des NOS ont des valeurs de g proches de $g_z=2,3$, $g_y=2,2$ et $g_x=1,90$ (Annexe 4).

La configuration haut spin correspond à celle d'un hème Fe^{III} 5C. Les valeurs de m_s possibles sont $\pm 5/2$, $\pm 3/2$ et $\pm 1/2$. Ces six états de spins sont regroupés en trois doublets de Kramer. La différence d'énergie en champ nul (*Zero Field Splitting*, ZFS) entre les doublets de Kramer de la configuration haut spin est très faible. L'effet Zeeman est alors négligeable devant le ZFS et celui-ci contrôle l'allure du spectre RPE. Le ZFS est caractérisé par deux paramètres énergétiques E et D qui correspondent, respectivement, aux paramètres rhombique et axial de l'environnement du fer en champ nul. Le spectre RPE du Fe^{III} haut spin traduit majoritairement les transitions du doublet de Kramer le plus bas en énergie (le doublet 5/2) (Figure 43). Pour un système axial, $E/D = 0$ et on observe deux résonances à des valeurs de g effectifs perpendiculaire $g_{\text{eff}\perp} \sim 6$ et parallèle $g_{\text{eff}\parallel} \sim 2$. Plus le système devient rhombique, plus la première composante se dédouble pour donner un spectre avec $g_{\text{xeff}} \neq g_{\text{yeff}}$ [203] et des valeurs de g proches de g_{xeff} (ou $g_{1\text{eff}} = 7,6$, g_{yeff} (ou $g_{2\text{eff}} = 4$ et g_{zeff} (ou $g_{3\text{eff}} = 1,8$ dans le cas des NOS (Figure 43, [204-207], Annexe 4).

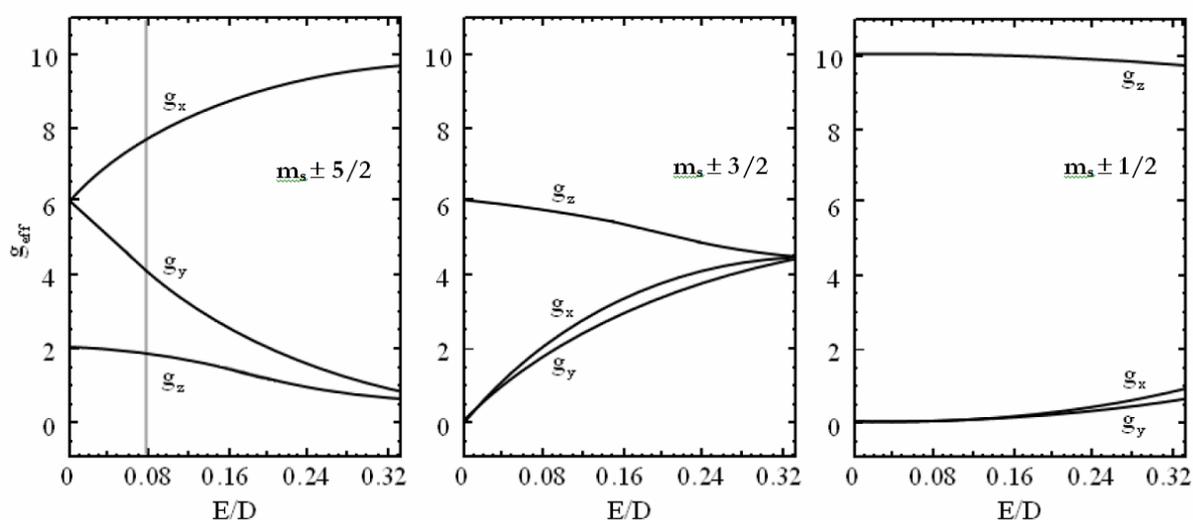


Figure 43 : Séparations des valeurs de g_{eff} des trois doublets de Kramer pour un complexe octaédrique $\text{Fe}^{\text{III}}\text{HS}$. Les valeurs de g_{eff} observées dans le cas des NOS sont indiquées par un trait gris.

Conditions expérimentales :

La spectroscopie RPE à 9,4 GHz (bande X) a été réalisée avec le spectromètre Bruker Eleksys E500 équipé d'une cavité standard TE pour analyser les espèces Fe^{III} , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ et le radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$. La spectroscopie RPE à 285 GHz a été réalisée sur un spectromètre haut champ construit au laboratoire [208] pour déterminer les valeurs de g du radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$. Le champ magnétique a été

calibré avec un échantillon d'oxyde de magnésium (l'erreur absolue sur la valeur de g est de 10^{-4} . Cependant la précision relative de g dans nos conditions expérimentales est de 2×10^{-5}). La température est régulée par un cryostat refroidi par un flux d'hélium (Oxford Instruments) et permet de stabiliser celle-ci à une valeur fixe.

Les conditions d'analyses ont été adaptées à l'espèce que l'on cherche à détecter :

- les espèces haut spin : température fixée à $10 \text{ K} \pm 2 \text{ K}$ avec une puissance micro-onde de 2 ou 4 mW et une amplitude de modulation de 1, 2 ou 2,5 mT.
- les espèces bas spin : température fixée à $10 \text{ K} \pm 2 \text{ K}$ avec une puissance micro-onde de 0,25 mW et une amplitude de modulation de 1 mT.
- les espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$: température fixée à $10 \text{ K} \pm 2 \text{ K}$ avec une puissance micro-onde de 0,001 ou 0,004 mW et une amplitude de modulation de 0,4 ou 0,5 mT.
- l'état radicalaire du cofacteur (BH_4 ou THF) en bande X : la température est d'abord fixée à 10 K avec une puissance micro-onde de 0,25 mW et une amplitude de modulation de 1 mT. Il est ensuite été analysé à 70 K avec une puissance micro-onde de 0,25, 0,06 ou 1 mW et une amplitude de modulation de 0,4 mT. La quantité de radical présent dans les échantillons a pu être déterminée avec une gamme de sulfate de cuivre de concentration connue (de 50 à 300 μM) enregistrée dans les mêmes conditions d'analyse que le radical.
- l'état radicalaire du cofacteur (BH_4) à haut champ : la température est fixée à 4 K, la puissance micro-onde à 0,25 μW et l'amplitude de modulation à 2 mT.

Les simulations des spectres RPE ont été réalisées avec le logiciel Easyspin [209] sous Matlab (The MathWorks) et avec des programmes écrits au laboratoire.

5. Cinétiques rapides pour étudier l'étape d'activation de l'oxygène

5.1. Cinétique d'activation de l'oxygène : principe du *stopped-flow*

Une des principales barrières à la compréhension du mécanisme moléculaire de la NOS est l'extrême rapidité réactionnelle. Le *stopped-flow* permet de réaliser un mélange très rapidement et de suivre une réaction en spectroscopie UV-Visible. Le dispositif permet d'atteindre une résolution temporelle allant jusqu'à la milliseconde. L'objectif des expériences réalisées en *stopped-flow* dans le cadre de ma thèse est de suivre l'étape d'activation de l'oxygène et de déterminer des vitesses de formation et disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ dans différentes conditions de saturation de substrat et de cofacteur (Chapitre 3.2.)

Instrumentation utilisée :

Les expériences de cinétique rapide ont été réalisées sur un instrument Biologic SFM-300 (Bio-Logic Science Instruments SA, France, instrumentation également convertible en *freeze-quench*). Un bain thermostaté avec de l'éthanol permet de réguler la température généralement fixée à 4°C pour nos expériences. L'ensemble du dispositif est piloté par le logiciel Bio-Kine32® (Figure 44).

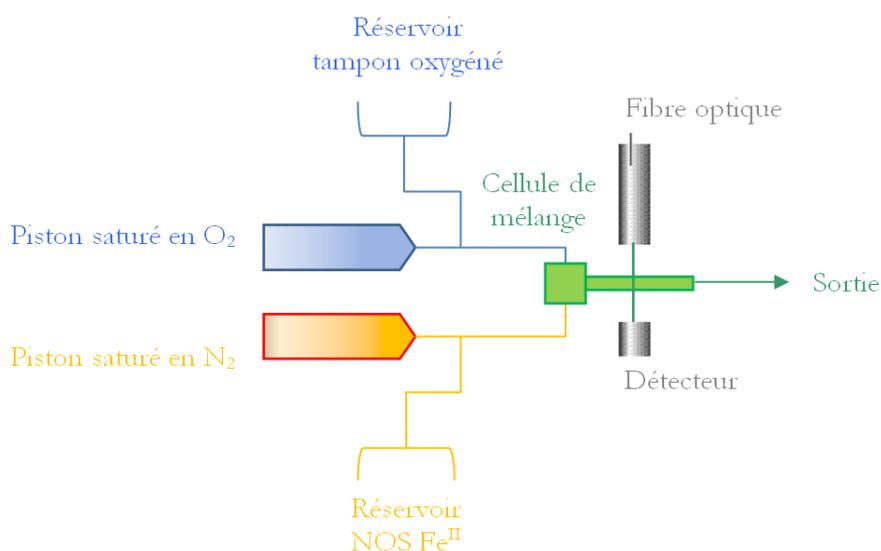


Figure 44 : Représentation schématique du montage Biologic SFM-300 en mode *stopped-flow*.

Deux seringues de 2 mL sont connectées à des réservoirs et ceux-ci sont reliés à la cellule de mélange par des capillaires. Les pistons servent à pousser les solutions des réservoirs dans le circuit. Le mélange a lieu dans la cellule de mélange et la réaction est suivie en spectroscopie UV-visible par un spectromètre à barrette de diode Tidas (World Precision Instruments Inc., USA). Avant toute utilisation l'ensemble des voies est rincé d'abord avec de l'eau ultra-pure puis avec le tampon de référence. Un spectre de ce tampon est enregistré, il sera soustrait aux spectres enregistrés par la suite.

Les capillaires, le piston et le réservoir destinés à recevoir la solution de NOS à l'état Fe^{II} doivent être anaérobiques. Ils sont anaérobisés grâce à un flux d'azote continu. Le capillaire allant du réservoir à la chambre de mélange est abondamment rincé avec du tampon KPi pH 7,4 0,1 M anaérobisé et transféré dans le système avec une seringue étanche aux gaz et anaérobique. Dans la deuxième seringue est ajouté un tampon KPi pH 7,4 0,1 M strictement identique à celui utilisé pour diluer la protéine à l'exception près qu'il contient le dioxygène. Au cours du mélange, le dioxygène va se fixer à l'espèce Fe^{II} et la formation et la disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est suivie en spectroscopie d'absorption UV-Visible.

Analyse des données :

Le système permet l'acquisition de 750 spectres et la séquence de temps est programmée afin de couvrir l'ensemble de la formation et de la disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (de 3 ms à 2200-5000 ms en fonction du cofacteur utilisé). Le temps mort est estimé à 2 ms et l'intervalle de temps minimum entre deux spectres est de 3 ms. L'ensemble des données est enregistré par le logiciel Bio-Kine sous un fichier 3D (longueur d'onde - temps - absorption). Les spectres d'absorption, enregistrés dans le temps et superposés permettent d'observer les transitions et de visualiser la formation et/ou la disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ à 428 nm (Figure 45).

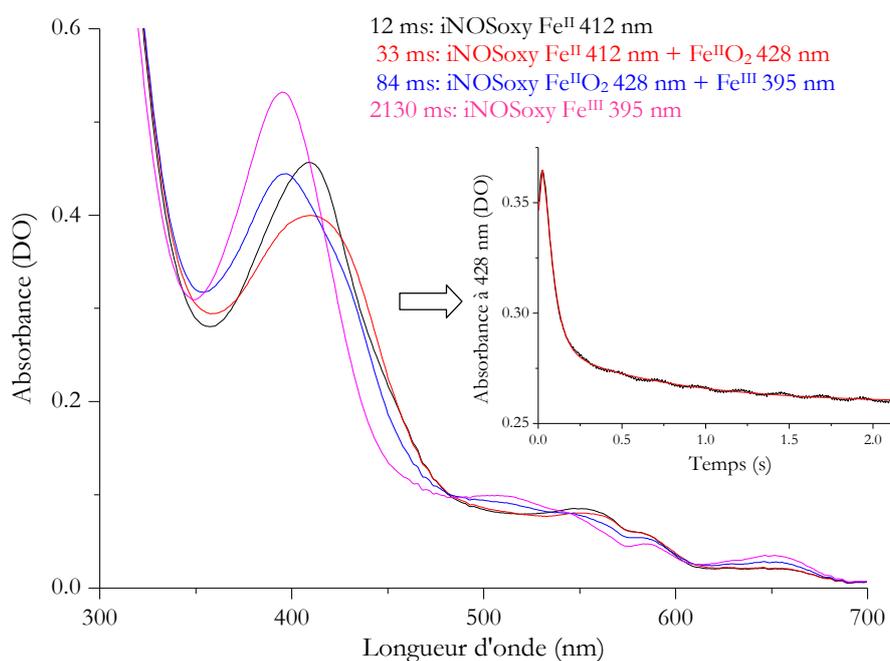


Figure 45 : Exemple de résultats obtenus en *stopped-flow* à 4°C pour iNOSoxy en présence de BH_4 et d'arginine. Vitesse de formation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$: $>50 \text{ s}^{-1}$, vitesse de disparition 19 s^{-1} .

Les traces cinétiques sont extraites à cette longueur d'onde et les cinétiques de formation et de disparition de l'intermédiaire sont traitées par deux méthodes différentes. Dans un premier temps elles sont traitées par des fonctions bi-exponentielles par le logiciel Origin 8.0 qui permet de déterminer les constantes de vitesses de formation et de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (Figure 45). Le logiciel Specfit/32 v3.0 37 (Spectrum associates, USA), utilisé pour réaliser une analyse globale matricielle des données, permet de proposer un schéma cinétique global et donne des informations sur les spectres des espèces de la réaction et les constantes de vitesses.

5.2. Piégeage de l'état radicalaire du cofacteur : principe du *freeze-quench*

Tout comme le *stopped-flow*, le *freeze-quench* permet d'étudier des réactions catalytiques jusqu'à une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. Le *freeze-quench* permet de stopper, par congélation ultra-rapide, une réaction à un temps voulu. Dans le cas de ma thèse, les intermédiaires réactionnels paramagnétiques piégés à ce temps donné peuvent ensuite être étudiés par spectroscopie RPE. Le *freeze-quench* a été utilisé pour piéger le cofacteur BH_4 à l'état radicalaire dans les deux étapes du cycle catalytique de la NOS de mammifère et de la NOS bactérienne. Cela nous a permis de faire une étude comparative du rôle du cofacteur dans le processus d'activation de l'oxygène (Chapitre 3.3).

Instrumentation utilisée :

Les expériences de *freeze-quench* ont été réalisées avec la même instrumentation de base que pour le *stopped-flow* (Biologic SFM-300). Le montage en mode *freeze-quench* permet de faire passer les capillaires dans un « ombilic » thermostaté à 10°C par un circuit d'éthanol. La ligne de retardement finale permet à la fois le mélange des solutions provenant des deux voies et le vieillissement de la réaction étudiée.

Comme pour le *stopped-flow*, l'ensemble de la voie dédiée à la protéine est préalablement anaérobisée à la fois par un flux d'azote continu mais aussi par le rinçage de ces voies avec le tampon KPi pH 7,4 0,1 M préalablement anaérobisé.

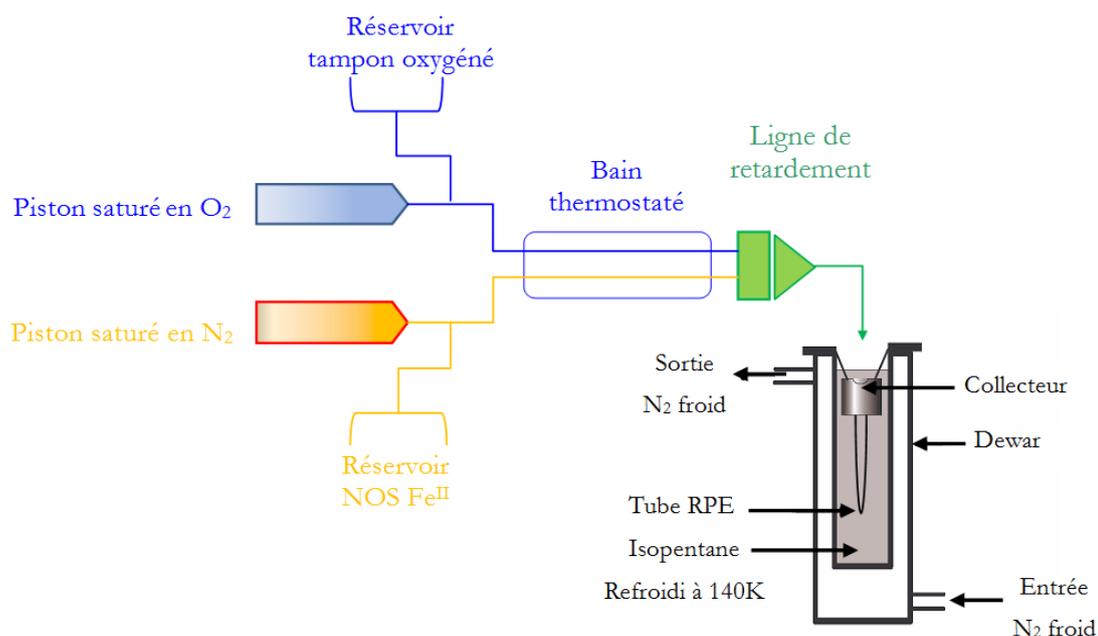


Figure 46 : Représentation schématique du montage Biologic SFM-300 en mode *freeze-quench*.

Le temps de vieillissement de la réaction de la NOS à l'état réduit avec le dioxygène est directement dépendant à la fois du volume de la ligne de retardement et du débit appliqué. A la sortie de la ligne de retardement le mélange est nébulisé en fines gouttelettes et projeté dans un bain d'isopentane refroidi à 140 K, ce qui le congèle instantanément (Figure 46). Deux séquences de tir sont réalisées puis les échantillons sont tassés au fond d'un tube RPE. En tenant compte du facteur de dilution relatif à la séquence de mélange, la protéine récupérée dans le tube RPE aura une concentration finale située entre 150 et 400 μM . Les espèces paramagnétiques présentes au temps de réaction étudié sont analysées par spectroscopie RPE en bande X et spectroscopie RPE à haut champ.

Pour continuer à faire évoluer la réaction stoppée par congélation, des sauts en température ont été effectués. L'évolution des espèces est suivie par spectroscopie RPE. Expérimentalement, les sauts en température sont effectués par pas de 10 K en commençant à la température de 140 K. Un bain d'isopentane est refroidi à la température voulue par ajout d'azote liquide. Les échantillons, stockés à 77 K dans l'azote liquide sont plongés pendant un temps déterminé allant de 1 min à 5 min dans le bain d'isopentane. Ils sont ensuite de nouveau stockés dans l'azote liquide.

Validité des temps de réaction :

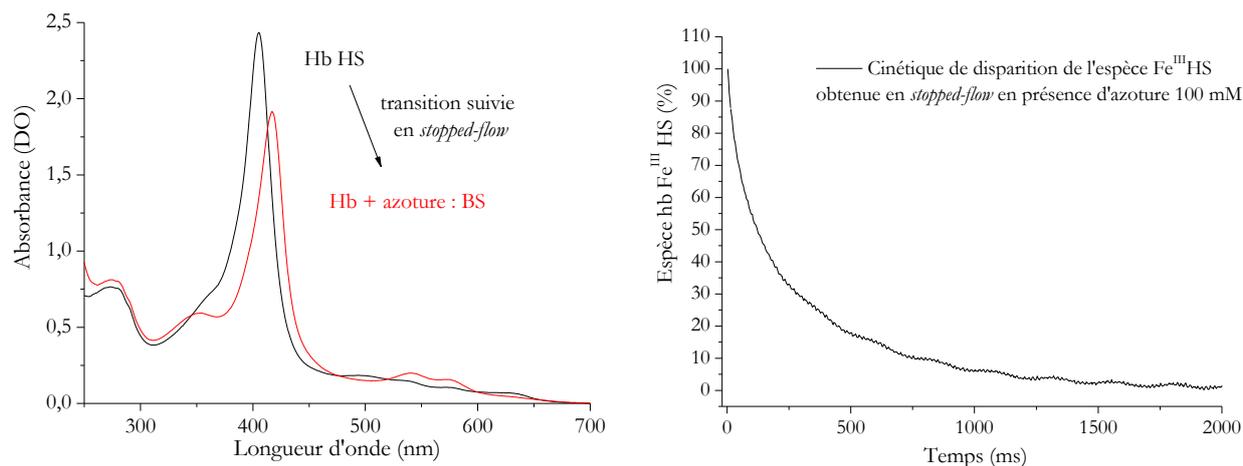
Le temps total de la réaction, au moment de la congélation, est déterminé par le volume de la ligne de retardement, le débit appliqué, mais aussi le temps de vol entre la sortie de la ligne de vieillissement et le collecteur (Tableau 2). Il faudrait ajouter, à cela, le temps de congélation mais la nébulisation de la solution permet de considérer ce temps comme négligeable.

Volume de la ligne de retardement	Débit ($\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$)	Temps de vol (ms) pour $d=10$ cm entre la ligne de retardement et le collecteur	Temps de vieillissement total
41,6 μL	4,00	5	15 ms
41,6 μL	1,80	11	34 ms
41,6 μL	0,90	22	68 ms
93,6 μL	0,63	32	181 ms
189,5 μL	0,40	50	524 ms

Tableau 2 : Volumes de la ligne de retardement, temps de vol et temps de vieillissement total de la réaction étudiée pour différents débits appliqués.

Les temps de piégeage de la réaction doivent être le plus précis possible afin de se situer à proximité des maximums de formation des espèces que l'on cherche à piéger. Pour valider les temps de piégeages estimés en *freeze-quench* nous avons d'abord cinétiquement caractérisé une réaction par *stopped-flow*. Une solution d'azoture est rapidement mélangée avec une solution d'hémoglobine

L'espèce hémoglobine de départ est dans un état haut spin. L'azoture se fixe sur l'hème et permet la transition de l'hémoglobine d'un état HS (bandes d'absorption à 405, 500 et 630 nm en spectroscopie UV-visible) vers un état BS (bandes à 417, 545 et 576 nm, [210], [Figure 47](#)). La cinétique de disparition de l'espèce HS de l'hémoglobine en présence d'azoture 100 mM (concentration finale) a été suivie par spectroscopie UV-Visible ([Figure 47](#)) à 10°C. Les traces cinétiques à 405, 500 et 630 nm permettent de suivre l'évolution de la disparition du signal HS de l'hémoglobine Fe^{III} au cours du temps.



[Figure 47](#) : Cinétique de disparition obtenue en *stopped-flow* de l'espèce Fe^{III} HS d'hémoglobine en présence de 100 mM d'azoture : cinétique déterminée à partir de la disparition de la bande à 630 nm en spectroscopie UV-visible.

Dans un second temps nous avons étudié la même réaction par *freeze-quench*. Un spectre d'hémoglobine est enregistré avant la réaction ($t=0$ ms, spectre bleu sur la [Figure 48](#)). Comme attendu [211], le spectre obtenu correspond à la forme HS de l'hémoglobine dont la signature spectrale est caractéristique d'une espèce axiale. A l'inverse, le spectre correspondant à l'espèce finale après la réaction avec l'azoture (spectre rouge, [Figure 48](#)) est une espèce Fe^{III} BS qui correspond à un complexe 6C avec l'azoture comme sixième ligand.

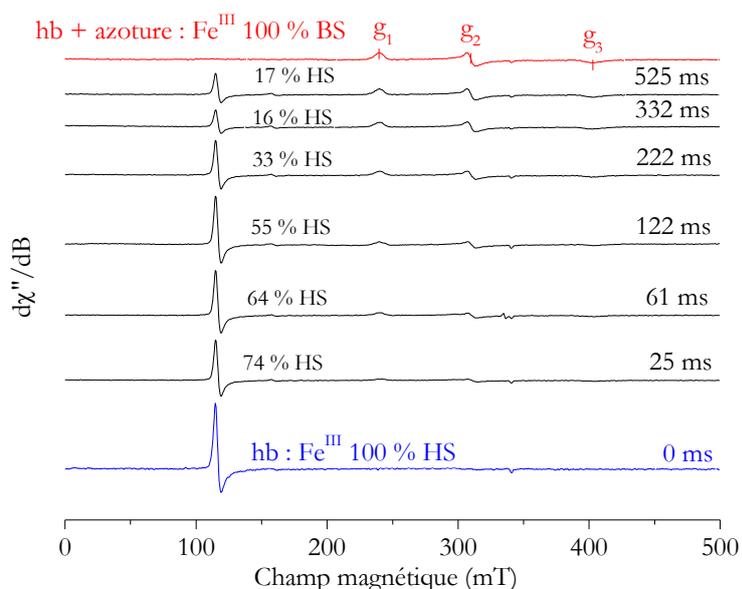


Figure 48 : Analyses RPE des différents temps obtenus par *freeze-quench* de la réaction de l'hémoglobine avec 100 mM d'azoture. Le spectre bleu est l'espèce de départ HS et le spectre rouge, l'espèce finale BS. Analyses RPE en bande X et à 10 K réalisées en condition non saturante.

Le *freeze-quench* permet de bloquer la réaction à des temps intermédiaires (spectre noirs, **Figure 48**). La réaction a été arrêtée à des temps de piégeage allant de 25 ms à 525 ms (estimés comme décrit ci-dessus). L'analyse par spectroscopie RPE de chaque échantillon nous permet de détecter à la fois les espèces HS et BS (**Figure 48**). Nous déterminons alors la proportion d'espèce HS présente dans l'échantillon pour chacun des temps de réaction étudié (points rouges sur la **Figure 49**). Nous observons que la disparition de l'espèce HS au cours du temps, observée par *freeze-quench* est similaire à la cinétique obtenue en *stopped-flow*.

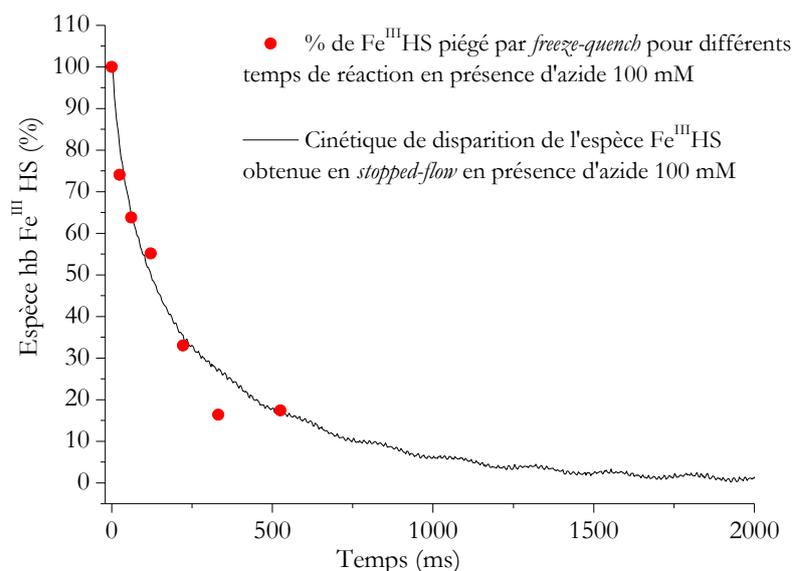


Figure 49 : Cinétique de disparition de l'espèce Fe^{III} HS d'Hb avec 100 mM d'azoture obtenue en *stopped-flow* et comparée à celle observée en *freeze-quench* (points rouges).

Ces résultats indiquent que les temps de vieillissements calculés théoriquement correspondent bien aux temps réels de la réaction et valident notre dispositif expérimental.

5.3. Etude du complexe Fe^{II}O₂ par Raman de résonance : cinétiques en flux continu

La spectroscopie Raman de résonance du complexe Fe^{II}O₂ permet de déterminer la fréquence de résonances des modes vibrationnels ν_{O-O} et δ_{O-O} (Chapitre 3.2.). Le maximum de formation du complexe Fe^{II}O₂ se situe avant 500 ms en présence de cofacteur BH₄. Pour pouvoir accumuler des spectres Raman de résonance à ces temps très courts de réaction il est nécessaire de travailler avec un montage complexe permettant des analyses en flux continu. Les mesures ont été réalisées au laboratoire de biochimie et de microbiologie de l'Université de Laval (Québec, Canada) sur un dispositif avec un mélangeur en "T" (Figure 50, [212]).

Montage expérimental :

Deux seringues de 10 mL sont connectées à des capillaires reliés à un mélangeur en « T » (Custom Precision Technology, Cokato, MN). Un pousse-seringue automatique permet de maîtriser parfaitement le débit de sortie de la seringue (Figure 50). Le mélange commence à l'endroit de l'introduction des solutions dans le capillaire de 250 μ m de large percé dans un tube en quartz de 5 cm de long (Friedrich & Dimmock Inc., Milville, NJ, USA). Le temps de réaction correspond à une distance sur le capillaire et dépend de la vitesse de poussée appliquée sur les seringues. Le laser est focalisé à un endroit très précis du capillaire qui correspondra au temps de réaction que l'on cherche

à détecter. Le positionnement du laser est déterminé par un micromètre numérique d'une résolution d'1 μm et le temps mort du système est estimé à 0,5 ms.

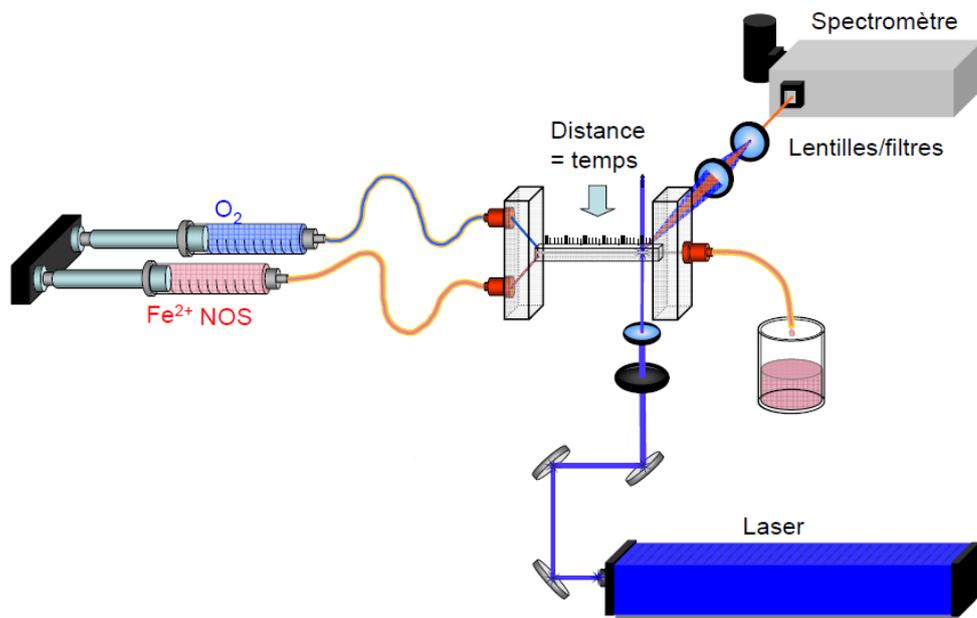


Figure 50 : Montage utilisé pour les expériences en flux continu.

Une solution de riboflavine, très fluorescente, permet d'optimiser facilement l'alignement du laser sur l'échantillon. Le laser à 441,6 nm est un laser à He/Cd (Liconix laser, Melles-Griot, Ottawa, ON, Canada) et celui à 413,1 nm est un laser à ion Kr (Innova 302 Kr, Coherent, Santa Clara, CA). La puissance appliquée est de 10 mW environ. Tous les jours un spectre de myoglobine réduite est enregistré. Les fréquences de résonances sont connues et permettent de calibrer le système et corriger d'éventuels décalages de fréquence d'un jour à l'autre. De même un spectre de tampon de référence (ici le tampon KPi 0,1 M pH 7,4) est enregistré avant chaque expérience afin de le soustraire ensuite à nos acquisitions.

Comme en *stopped-flow* et en *freeze-quench*, la seringue et les capillaires destinés à contenir la NOS à l'état Fe^{II} sont anaérobisés par un lavage abondant avec le tampon KPi 0,1 M pH 7,4 anaérobie. Au moment du mélange avec le tampon oxygéné le dioxygène se fixe sur le fer et le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ peut être observé par Raman de résonance.

Accumulation des spectres et traitement des données :

Le débit choisi pour la poussée des solutions dans les capillaires est de $1,25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Avec ce débit, 1 mm parcouru dans le mélangeur en « T » correspond à 1,25 ms de temps de réaction. Dans le cadre de nos études, le laser a été focalisé à 3,2 mm, 8 mm, 16 mm et 32 mm afin d'accumuler des spectres Raman de résonance respectivement aux temps 4 ms, 10 ms, 20 ms et 40

ms. Dans ces conditions nous pouvons accumuler 6 spectres Raman de résonance de 1,6 minute. Les spectres sont traités par le logiciel GRAMS comme indiqué dans la partie 4.2.2.

6. Nouvelle approche méthodologique pour l'étude des NO-Synthases : Etudes cryogéniques

Réduction de l'hème par irradiation gamma :

La complexité à résoudre le mécanisme de la NO-synthase réside dans la rapidité des réactions moléculaires. Les méthodes cinétiques traditionnelles ont montré leur limite dans la résolution de ce mécanisme et de nouvelles approches se développent. Parmi celles-ci, la cryo-réduction couplée à des sauts en température a prouvé tout son intérêt dans l'étude de certains mécanismes moléculaires [133, 138, 183, 184].

Dans le cadre de ma thèse la cryo-réduction a été utilisée afin d'évaluer la capacité de cette méthode à initier la réaction catalytique de la NOS c'est-à-dire à fournir le premier électron nécessaire à la réduction du Fe^{III} en Fe^{II} (Chapitre 4). Cet électron est fourni par irradiation gamma de l'échantillon à l'état Fe^{III} par une source de cobalt 60 à 77 K. Dans ces conditions standard de température les mouvements moléculaires sont extrêmement limités et diminuent fortement la réactivité du site actif. Cela permettrait ainsi de piéger l'espèce Fe^{II} de départ.

Principe de l'effet Compton :

L'effet Compton s'applique au rayonnement gamma émis par le cobalt 60, c'est-à-dire que l'énergie du rayonnement est supérieure à celle nécessaire pour éjecter un électron du cortège électronique de l'atome. Un électron est éjecté et la différence d'énergie est réémise sous forme d'un photon gamma dans une direction différente de celle du photon d'origine. La réduction du fer pourra être réalisée par deux biais ([Figure 51](#)). L'électron, directement éjecté par le photon γ incident, peut réduire directement l'espèce Fe^{III} en espèce Fe^{II} . Cet électron peut aussi réagir avec le solvant, ici l'eau. La radiolyse de l'eau va aboutir à la production *in situ* d'espèces oxydantes ou réductrices OH^\bullet et H^\bullet qui seront à leur tour des réducteurs potentiels pour le fer.

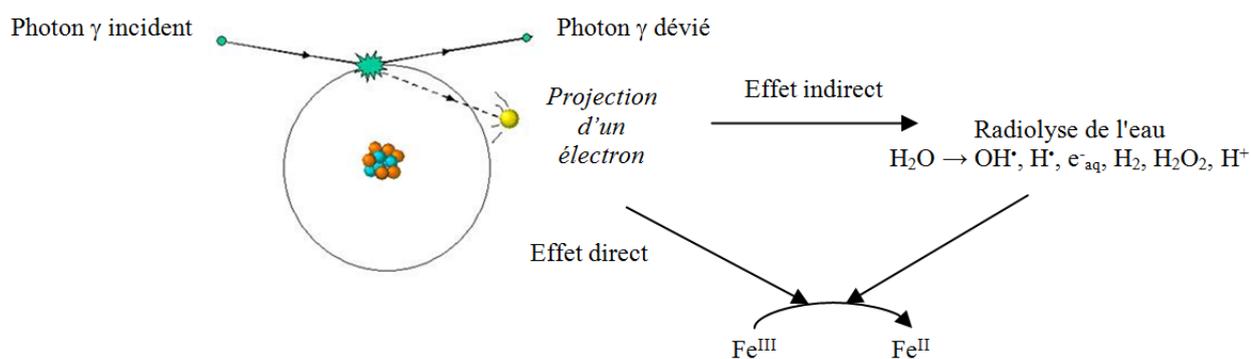


Figure 51 : Irradiation gamma et réduction du fer.

Les échantillons, congelés dans de l'azote liquide, sont irradiés à 77 K au Laboratoire de Chimie Physique d'Orsay par une source panoramique de cobalt 60 (IL 60PL, Cis-Bio International). Les échantillons sont placés de manière à recevoir la même dose pendant l'irradiation et sont irradiés pendant un temps allant de 20 à 50 heures. Le débit de dose est de 20 à 30 Gy.min⁻¹ (déterminé par un dosimètre Fricke). La dose totale reçue varie donc de 24000 Gy à 76500 Gy. Après irradiations, les échantillons sont stockés à 77 K dans de l'azote liquide.

Analyse des échantillons irradiés :

Nous avons étudié l'effet de la dose d'irradiation, de la présence ou absence de substrat, de la présence ou absence de cofacteur, de la présence ou absence de dioxygène. Nous avons analysé les signatures spectrales des espèces présentes après irradiation par spectroscopie Raman de résonance (à 441,6 nm et 413,1 nm) et par spectroscopie RPE avant et après irradiation. En Raman de résonance à 413,1 nm nous suivons l'apparition de fréquence de résonance spécifique au Fe^{II} (Annexe 4). L'analyse du spectre obtenu en Raman de résonance après irradiation est complexe de par la présence d'un mélange d'espèces différentes dans l'échantillon. La spectroscopie RPE nous permet de suivre l'évolution du signal Fe^{III}.

Sauts en température :

Les sauts en température ont été utilisés pour faire évoluer la réaction catalytique pas à pas. Expérimentalement, ils sont effectués comme expliqué en partie 5.2. pour les échantillons piégés par *freeze-quench* et pour chaque saut, les échantillons sont analysés par spectroscopie Raman de résonance et/ou par spectroscopie RPE.

CHAPITRE 3

Activation de l'oxygène

1. Influence de l'environnement proximal sur l'activation de l'oxygène : étude de la mutation du tryptophane Trp 66 de *Bacillus subtilis*.

1.1. Introduction

Effet *push* :

L'activation de l'oxygène dans la première et la deuxième étape est contrôlée par un processus bien connu chez les hémoprotéines : l'effet *push-pull*. L'effet *pull* correspond à l'attraction électronique de l'environnement distal et est contrôlé par le réseau de liaisons H distal. L'effet *push* est, quant à lui, contrôlé par l'environnement proximal de l'hème. Comme les cytochromes P450 la liaison fer-soufre proximale est centrale pour la réactivité du fer [164, 213]. Le ligand cystéine est à l'origine d'une donation électronique vers le fer : la densité électronique sur le fer et l'électronégativité de l'hème augmentent [70, 93]. Ce phénomène participe au clivage hétérolytique de la liaison O-O dans la première étape du cycle catalytique et contrôle la stabilité des intermédiaires réactionnels, c'est l'effet *push*. Une modification de l'environnement de la liaison fer-soufre peut donc avoir des conséquences significatives sur cet effet *push*.

Compétition entre ligand proximal et ligand distal :

Le ligand proximal, en tant que ligand « trans », influence fortement les propriétés des complexes fer-oxygène produits au cours du cycle catalytique. En effet, le ligand proximal et le ligand distal sont en compétition pour établir la liaison σ avec le fer par l'intermédiaire de son orbitale vide d_z : plus le caractère donneur σ du ligand proximal est grand, plus l'interaction du ligand proximal avec l'orbitale d_z du fer et avec les orbitales π de la porphyrine est forte, par conséquent plus la liaison σ entre le fer et le ligand distal est faible. La force de la liaison entre le fer et le soufre proximal est donc considérée comme primordiale pour la régulation de la densité électronique de l'hème et de la force de la liaison entre le fer et le ligand distal.

Liaison H entre le tryptophane et la cystéine proximale :

Contrairement aux cytochromes P450, le soufre de la cystéine proximale (Cys 72 dans le cas de bsNOS) [90, 93, 94] forme une liaison H avec le groupement indole d'un résidu tryptophane Trp 66 pour bsNOS ([Figure 52](#)) (Trp 188 pour iNOS murine, Trp 409 pour nNOS de rat et Trp 180 pour eNOS bovine).

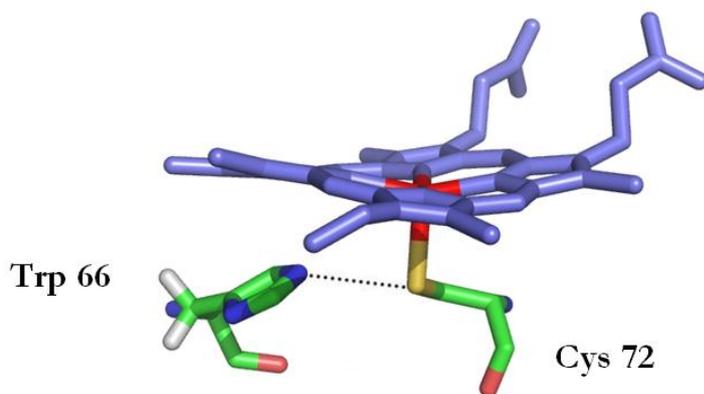


Figure 52 : Représentation de la liaison H entre le tryptophane Trp 66 et la cystéine proximale de *Bacillus subtilis* (Selon la numérotation de Adak *et al.* [68]).

Cette liaison H supplémentaire a un impact sur les propriétés électroniques de la liaison fer-soufre [167], sur l'effet *push* et sur la compétition entre le ligand proximal et le ligand distal sur le fer. En plus de la liaison H, le Trp est impliqué dans des interactions d'empilement π avec la porphyrine [72, 91, 165].

Objectifs de l'étude :

Pour mieux appréhender l'importance de cette liaison H dans le cas des NOS, nous proposons ici une analyse comparative de 5 différents mutants qui vont affecter la liaison H en relation avec le thiolate proximal du fer (Figure 53). Plusieurs mutations ont été envisagées : la mutation histidine (H) qui maintient voire renforce la liaison H [166], les mutations phénylalanine (F) et tyrosine (Y) qui suppriment la liaison H; la mutation leucine (L) qui supprime à la fois la liaison H et les interactions d'empilement π avec la porphyrine mais maintient quelques interactions hydrophobes avec l'hème et le mutant alanine (A) qui supprime l'ensemble des interactions possibles.

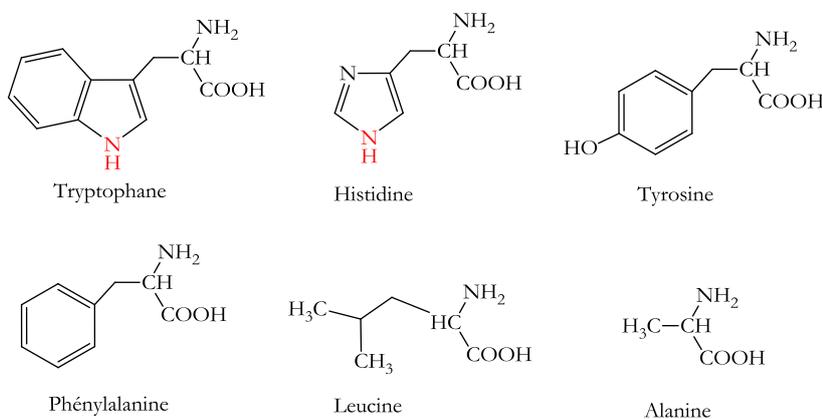


Figure 53 : Formule chimique des acides aminés utilisés pour remplacer le Trp 66.

Les mutations phénylalanine (F) et tyrosine (Y) ont déjà été étudiées dans le cas de nNOS [165] et plus récemment dans le cas de eNOS et saNOS [167]. Le mutant histidine (H) a été étudié avec iNOSoxy (W188H) [166] et le mutant lysine (L) avec nNOS [182]. Les mutations F, Y, H, L et A n'ont jusqu'à présent jamais été obtenues sur la même NO-synthase. En effet, certaines de ces mutations (plus spécialement les mutations L et A) déstabilisent le site actif de manière significative et ne permettent pas d'exprimer et de purifier une protéine stable dans le cas de la NOS de mammifère.

Notre projet était de réaliser une étude complète de ces mutations sur une seule NOS. Afin d'obtenir des mutants plus robustes et plus stables nous avons travaillé sur une NOS bactérienne : la NOS de *Bacillus subtilis*. Nous avons étudié l'effet de toutes ces mutations proximales sur les propriétés électroniques de l'hème et leurs conséquences sur l'activation de l'oxygène. Nous avons, pour cela, étudié différents complexes héminiques et leurs signatures spectrales (spectroscopies UV-visible, RR, ATR-FTIR, RPE). Dans un premier temps, la protéine sauvage (WT) et chaque mutant de bsNOS ont été étudiés à l'état Fe^{III} en présence et en absence de substrat. Dans un second temps les complexes Fe-XO, mimes du complexe Fe^{II}O₂, ont été analysés par spectroscopie RPE, ATR-FTIR et Raman de résonance. Enfin nous avons évalué l'activité de ces mutants en mesurant la production en nitrite et nitrate pour chacun d'eux. L'ensemble des résultats présentés dans cette partie correspond à l'article joint en Annexe 1 [8].

1.2. Effet de la mutation sur l'équilibre haut spin – bas spin

Expression et purification des mutants :

L'expression et la purification des protéines mutantes ont permis d'obtenir de 10 à 20 mg de protéine par litre de culture à l'exception du mutant W66A (voir Chapitre 2, 1.3.). Ce dernier n'a pas pu être purifié en grande quantité et de manière stable prouvant que la mutation alanine déstructure significativement l'environnement proximal du site actif. Elle ne permet plus l'incorporation de l'hème, la dimérisation et altère la stabilité globale de la protéine. Ce mutant n'a donc pas pu être étudié. Cet effet avait déjà été observé dans le cas des mammifères avec les mutants iNOS W188F et nNOS W409L qui se sont avérés également incapables d'incorporer l'hème [182, 196, 214, 215]

Etude de l'espèce Fe^{III} en absence de substrat et de cofacteur :

Afin de connaître l'effet de la mutation sur l'état de coordination du fer, les mutants qui ont pu être purifiés ont d'abord été analysés par spectroscopie UV-Visible et par spectroscopie RPE à l'état Fe^{III} sans substrat ni cofacteur.

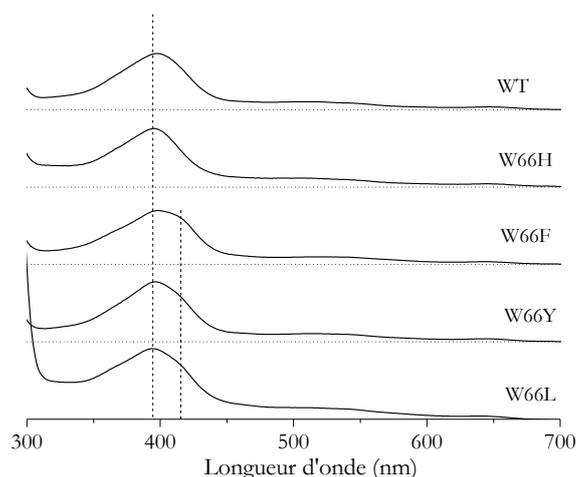
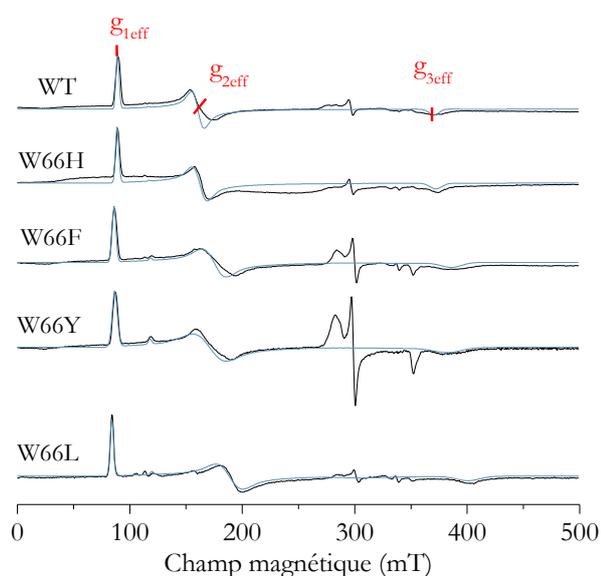


Figure 54 : Spectres UV-Visible de bsNOS sauvage et des mutants W66 H, F, Y et L à l'état Fe^{III} en absence de cofacteur et de substrat.

En absorption électronique (Figure 54), la protéine sauvage et le mutant W66H, sans substrat, ont des spectres caractéristiques d'une protéine presque totalement à l'état Fe^{III} HS-5C (bande de Soret à 396 nm). Les mutants F, Y et L ont tous un spectre ayant un épaulement aux alentours de 417 nm suggérant la présence d'une fraction de protéine à l'état Fe^{III} BS-6C.

En spectroscopie RPE (voir Chapitre 2, 4.4.), la signature spectrale de la protéine bsNOS sauvage sans substrat met en évidence la présence de 2 espèces. La première (majoritaire) correspond à un fer à l'état Fe^{III} HS-5C caractérisé par 3 valeurs de g_{eff} ; la seconde espèce (très minoritaire) est un Fe^{III} BS-6C (Figure 55).



Fe ^{III} HS,					
sans substrat, sans cofacteur					
E/D	E strain (% de E)	$g_{1\text{eff}}$	$g_{2\text{eff}}$	$g_{3\text{eff}}$	
WT	0,074	15	7,59	4,22	1,83
W66H	0,076	18	7,63	4,18	1,82
W66Y	0,088	30	7,84	3,91	1,77
W66F	0,091	21	7,89	3,84	1,75
W66L	0,104	19	8,09	3,57	1,69

Figure 55 : Spectres RPE en bande X à 10 K de bsNOS et des mutants H, F, Y et L à l'état Fe^{III} en absence de cofacteur et de substrat (en noir) et simulations (en bleu).

Tableau 3 : Valeurs de g_{eff} du Fe^{III} HS sans substrat et sans cofacteur.

Tout comme en UV-Visible, les mutants W66F et W66Y montrent une plus grande proportion d'espèces BS contrairement à la protéine sauvage et au mutant W66H. Cette différence suggère que la suppression de la liaison H engendrée par les mutations F et Y, en absence du substrat, a un effet direct sur la coordination et l'état de spin du fer et sur la structuration du site actif. Elle favorise la fixation d'une molécule d'eau sur le fer et l'adoption de la configuration bas spin. De manière surprenante, la mutation qui modifie le plus l'environnement proximal (la mutation L) a une proportion d'espèce BS relativement faible comparée aux autres mutants.

La simulation des signaux Fe^{III} prend en compte l'effet Zeeman et l'éclatement en champ nul caractérisé par les paramètres D et E (voir Chapitre 2, 4.4.2.). En absence de substrat la valeur E/D augmente dans l'ordre $\text{WT} < \text{W66H} < \text{W66Y} < \text{W66F} < \text{W66L}$ et permet de distinguer deux groupes : les signaux RPE du Fe^{III} HS de la protéine sauvage et du mutant W66H sont moins anisotropes que ceux obtenus avec les mutants W66Y, W66F et W66L (Tableau 3).

L'étude de l'espèce minoritaire Fe^{III} BS permet de confirmer la constitution des deux groupes définis d'après l'étude de l'espèce Fe^{III} HS. Les Fe^{III} BS de la protéine sauvage et du W66H sont similaires et les mutants F et Y ont une plus faible anisotropie de g pour cette espèce (Figure 56, Tableau 4).

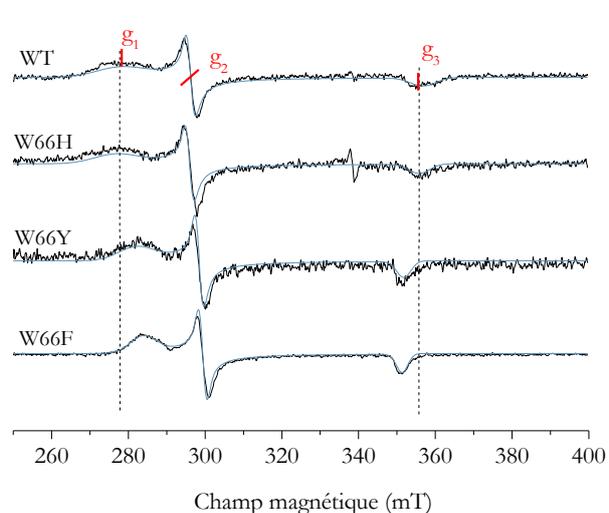


Figure 56 : Spectres RPE en bande X à 10 K du Fe^{III} BS de bsNOS sauvage et des mutants H, F et Y en absence de cofacteur et de substrat (en noir) et simulations (en bleu).

Fe ^{III} BS, sans substrat, sans cofacteur					
	g ₁	g ₂	g ₃	g _{iso}	Δg
	(H strain en MHz)				
WT	2,45 (500)	2,29 (0)	1,90 (200)	2,21	0,55
W66H	2,45 (450)	2,29 (0)	1,90 (157)	2,21	0,55
W66Y	2,41 (360)	2,27 (0)	1,93 (103)	2,20	0,48
W66F	2,39 (260)	2,27 (0)	1,93 (77)	2,20	0,46

Tableau 4 : Valeurs de g du Fe^{III} BS sans substrat et sans cofacteur.

Rôle du substrat sur la transition $\text{Fe}^{\text{III}}\text{BS} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{HS}$:

La structure des NOS bactériennes est peu sensible à la présence ou l'absence de cofacteur. En revanche, la présence du substrat a plus d'effets structuraux. Ainsi, les propriétés électroniques

de l'hème des mutants ont été étudiées par spectroscopie UV-visible et RPE en présence du substrat arginine. Ce dernier a pour effet d'augmenter drastiquement l'homogénéité structurale de la protéine.

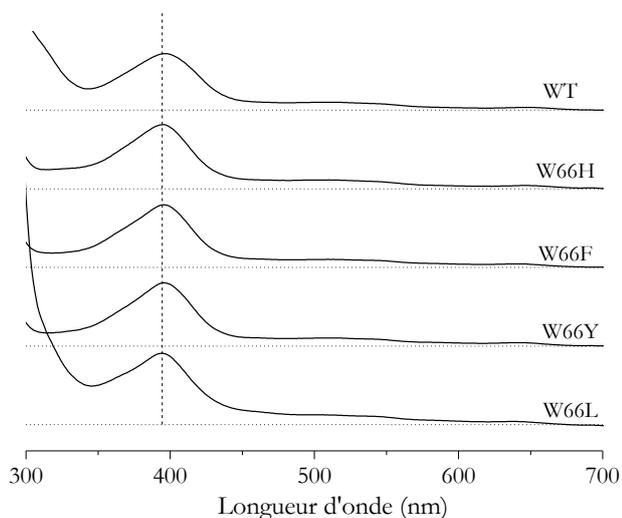


Figure 57 : Spectres UV-Visible de bsNOS sauvage et des mutants H, F, Y et L à l'état Fe^{III} et en présence du cofacteur et du substrat arginine.

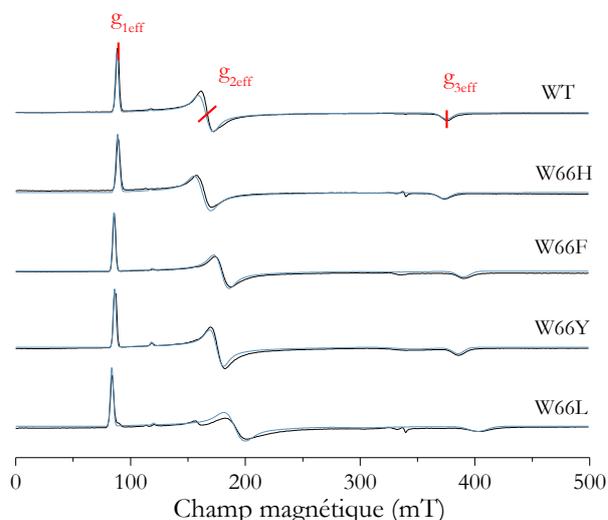


Figure 58 : Spectres RPE en bande X à 10 K de bsNOS sauvage et des mutants H, F, Y et L à l'état Fe^{III} en absence de cofacteur et en présence du substrat arginine (en noir) et simulations (en bleu).

En présence d'arginine les spectres UV-Visible et RPE sont uniquement constitués d'un signal HS-5C et ceci pour tous les mutants (**Figure 57** et **Figure 58**, spectres noirs). L'ajout de l'arginine permet d'obtenir des spectres UV-visible ayant une bande de Soret aux alentours de 396 nm pour les cinq protéines étudiées (**Tableau 5**). En spectroscopie RPE on observe des raies de résonance plus fines et l'anisotropie du signal évolue dans le sens W66H<WT<W66Y<W66F<W66L (**Tableau 5**).

	Soret, avec Arg		RPE Fe ^{III} HS, avec Arg			
	λ_{\max} (nm)	E/D	E strain (% de E)	$g_{1\text{eff}}$	$g_{2\text{eff}}$	$g_{3\text{eff}}$
WT	396	0,080	15	7,70	4,09	1,80
W66H	395	0,077	19	7,65	4,15	1,82
W66Y	396	0,090	11	7,87	3,86	1,75
W66F	396	0,094	12	7,93	3,78	1,74
W66L	396	0,105	14	8,10	3,55	1,68

Tableau 5 : Valeurs de la bande de Soret, valeurs de g_{eff} et rapport E/D du Fe^{III} HS de bsNOS sauvage et des mutants H, F, Y et L en présence de substrat.

Ces résultats montrent que tous les mutants sont capables de fixer le substrat. Celui-ci induit une meilleure structuration du site actif et la configuration Fe^{III} HS-5C est adoptée. Cet effet est exacerbé pour les mutants F et Y qui avaient une plus grande proportion d'espèce BS en absence de substrat.

Conclusion de l'étude de l'espèce Fe^{III} :

En conclusion de l'étude de l'état Fe^{III} de la protéine, nous pouvons noter que les mutants arrivent à incorporer l'hème et à se structurer malgré la modification de l'environnement proximal de l'hème (à l'exception du mutant W66A). Ils sont tous capables de fixer le substrat comme le prouve la transition électronique BS→HS en présence de celui-ci.

Les études en spectroscopie UV-visible et RPE aboutissent à la distinction de deux groupes corrélés à la présence ou non d'une liaison H forte entre le résidu 66 et la cystéine en liaison proximale du fer. **Le mutant histidine, qui maintient la liaison H, garde des propriétés électroniques proches de la protéine sauvage : même état de spin, même coordination, signatures spectrales similaires. Les mutants F, Y et L (qui rompent cette liaison H) induisent des modifications structurales et électroniques plus importantes.**

1.3. Effet de la mutation sur l'effet *push*

Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$:

Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ est couramment utilisé comme modèle pour analyser l'influence de l'environnement hémique sur la structure du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ [159, 163, 192, 216]. Le CO est un ligand à la fois donneur σ et accepteur π . Il se lie au fer de l'hème par une interaction de donation des électrons du carbone vers l'orbitale vide d_{z^2} du fer (liaison σ) et par une interaction de rétro-donation des électrons des orbitales d du fer vers les orbitales antiliantes π^* de CO (Figure 59). L'addition de ces deux effets entraîne une diminution de l'énergie électronique du bloc d du fer, ce qui contribue à la forte stabilité du complexe.

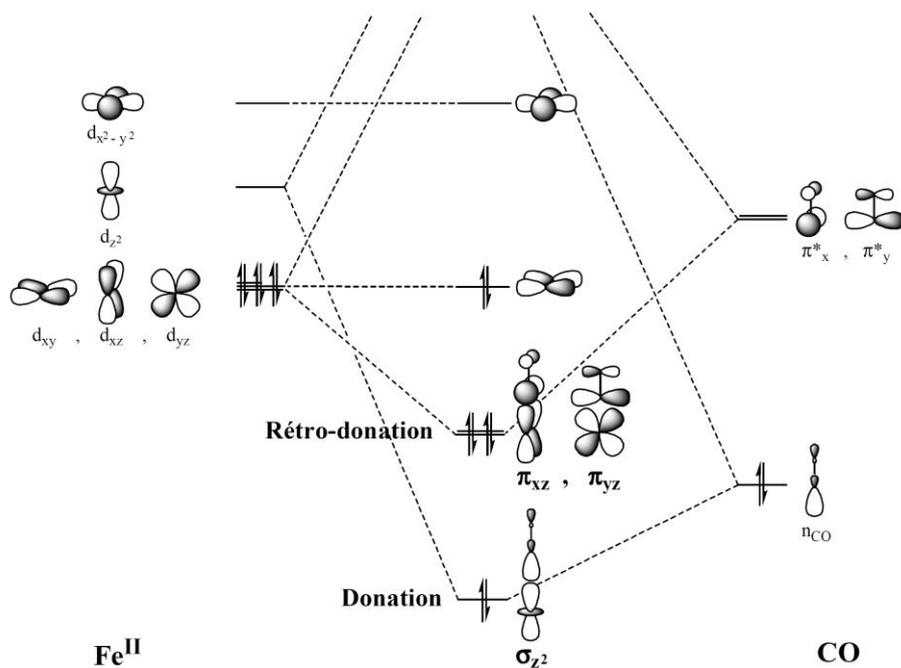


Figure 59 : Structure électronique d'un complexe Fe^{II}CO.

Quand le CO se fixe sur le fer il y a une compétition entre le ligand proximal et le CO pour la liaison σ pour l'orbitale d_{z^2} de l'atome de fer. Les variations des propriétés électroniques du lien thiolate et de l'effet *push* (engendrées par les mutations) vont impacter sur cette compétition, vont modifier la stabilité du complexe et engendrer des modifications sur les signatures spectrales du complexe Fe^{II}CO.

Test P450 et étude de la stabilité du lien fer-soufre :

Pour commencer, le spectre UV-visible du complexe Fe^{II}CO a été enregistré en absence du substrat et du cofacteur (Figure 60, spectres bleus).

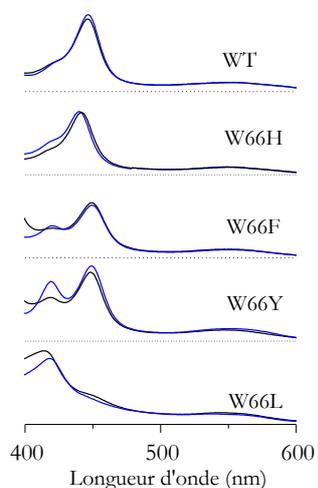


Figure 60 : Spectres UV-Visible du complexe Fe^{II}CO de bsNOS sauvage et des mutants H, F, Y et L en absence (en bleu) ou en présence (en noir) du cofacteur et du substrat.

Sans substrat, la protéine sauvage et le mutant W66H montrent un complexe Fe^{II}CO avec une contribution spectrale P450 majoritaire, reflet d'une espèce hexacoordonnée. En revanche le mutant W66L montre une bande à 420 nm caractéristique d'une espèce ayant subi une altération du ligand proximal : état lié à la diminution de la force de la liaison fer-soufre [113, 187, 217, 218]. Les mutants W66F et W66Y sont plus hétérogènes et montrent un mélange de ces deux espèces.

L'ajout du substrat (Figure 60, spectres noirs) modifie l'équilibre P420/P450 en faveur de la forme P450 ce qui confirme, une fois de plus, que tous les mutants sont aptes à fixer le substrat. La proportion d'espèce P420 suggère que les mutations vont diminuer la stabilité de la liaison proximale dans l'ordre suivant WT/W66H>W66F/W66Y>W66L. Cette instabilité est exacerbée en absence de substrat et de cofacteur (Figure 60, spectres bleus).

Le mutant W66L supprime à la fois la liaison H et les interactions d'empilement π . Il ne permet plus la formation d'un complexe Fe^{II}CO stable. Nous observons une forme presque exclusivement P420 et ce, même en présence de substrat. Cela montre toute l'importance des interactions d'empilement π dans la structuration du site actif.

Par ailleurs des résultats similaires ont été rapportés avec les mutants F et Y de eNOS et confirment l'importance du substrat et du cofacteur pour la stabilité du lien thiolate [167]. Le test P450 de ces mutants montre une grande proportion d'espèce P420 en absence de substrat et de cofacteur : jusqu'à 50 % pour le mutant W180F. En présence de ceux-ci la proportion d'espèce P450 est supérieure à 80 % [167].

Déplacement de la bande de Soret et basicité de la cystéine Cys 72 :

La bande de Soret du complexe Fe^{II}CO est à 446,5 nm pour la protéine sauvage. Pour les mutants F et Y, cette bande de Soret est déplacée vers le rouge (à 449 nm et 448,5 nm) alors que pour le mutant W66H, elle est déplacée vers le bleu (441,5 nm) (Tableau 6). Le déplacement de la bande de Soret à environ 449 nm pour les mutants F et Y suggère que la densité électronique sur le fer est supérieure à celle de la protéine sauvage et indique que la basicité du ligand proximal cystéine est augmentée.

	WT	W66H	W66F	W66Y
Fe ^{II} CO 450 nm	446,5	441,5	449,0	448,5
Fe ^{II} CO 420 nm			420,5	419,5

Tableau 6 : Valeur de la bande de Soret des complexes Fe^{II}CO de bsNOS sauvage et des mutants H, F, et Y.

Cette observation peut être expliquée par la rupture de la liaison H pour les mutants F et Y, ce qui augmente alors les propriétés d'électro-donation de la cystéine vers le fer. A l'inverse, le mutant H renforce la liaison H et aurait pour effet de diminuer la donation électronique de la cystéine vers le fer. Cela expliquerait la diminution de la valeur de la bande de Soret à 441,5 nm dans ce cas.

Le déplacement de la bande de Soret vers le rouge a déjà été observé pour le mutant F de eNOS (445 nm → 448 nm) et les mutants F et Y de saNOS (447 nm → 449 nm) [167, 219]. Cet effet est expliqué par une augmentation de la basicité de la cystéine et une augmentation de la densité électronique sur l'hème dues à la rupture de la liaison H [167, 219]. A l'inverse, en présence de substrat et de cofacteur, la bande de Soret du mutant Y de eNOS ne varie pas par rapport à la protéine sauvage. Il a été proposé que la basicité de la cystéine ne change pas pour ce mutant et que la tyrosine maintienne toujours une liaison H entre son groupement hydroxyle et le soufre de la cystéine [167]. Dans le cas du mutant W66Y de bsNOS, la bande de Soret est déplacée vers le rouge et nos données sont en faveur de la rupture de la liaison H et de l'augmentation de la basicité de la cystéine.

D'une manière globale le test P450 indique un effet opposé des mutations sur la stabilité du ligand proximal. Le mutant W66H (qui renforce la liaison H avec la cystéine) a une liaison fer-soufre proximale plus stable et celle-ci est moins électro-donatrice vers le fer. Les mutants F et Y (qui suppriment la liaison H) ont une liaison fer-soufre proximale plus instable et celle-ci est plus électro-donatrice vers le fer.

Analyse des modes vibrationnels du complexe Fe^{II}CO :

Nous avons approfondi l'analyse du complexe Fe^{II}CO par des analyses en spectroscopie Raman de résonance et ATR-FTIR (voir Chapitre 2, 4.2. et 4.3.) qui ont permis de déterminer la fréquence de la déformation $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ et les fréquences des élongations $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et $\nu_{\text{C-O}}$. Les fréquences de ces modes vibrationnels sont sensibles à la structure électronique du ligand proximal et aux interactions stériques ou polaires de l'environnement distal [192, 216]. Les variations des propriétés électroniques du ligand proximal vont avoir une influence sur la compétition σ entre le ligand proximal et le ligand distal et peuvent engendrer des déplacements des fréquences $\delta_{\text{Fe-C-O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$ et $\nu_{\text{Fe-CO}}$.

Le spectre Raman du complexe Fe^{II}CO a été enregistré pour les différents mutants en présence du substrat et du cofacteur (à l'exception du mutant W66L dont le complexe Fe^{II}CO est instable). La partie du spectre analysée se situe entre 450 et 600 cm⁻¹ où l'on trouve les fréquences de résonance de la déformation Fe-C-O ($\delta_{\text{Fe-C-O}}$) et de l'élongation Fe-CO ($\nu_{\text{Fe-CO}}$) [102, 115, 195]. Les données confirment toutes la présence d'une espèce BS-6C.

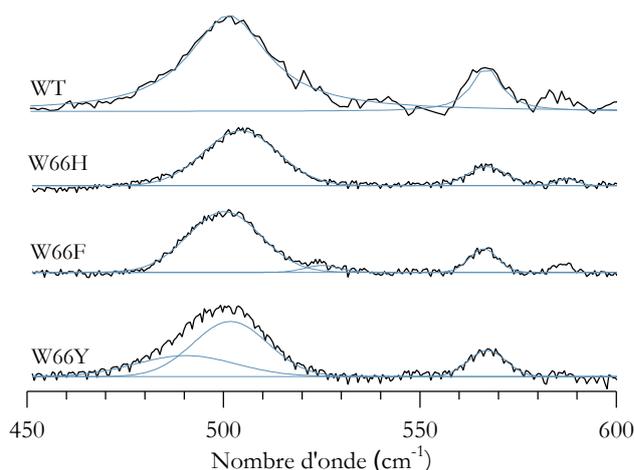


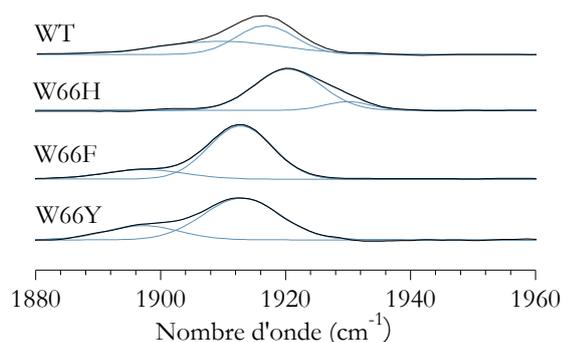
Figure 61 : Spectres RR du complexe Fe^{II}CO de bsNOS sauvage et des mutants H, F et Y en présence de substrat et de cofacteur (en noir) et déconvolution (en bleu).

	WT	W66H	W66F	W66Y
$\nu_{\text{Fe-CO}}$	501,0	504,5	500,0	501,5
$\delta_{\text{Fe-C-O}}$	567,0	567,0	566,0	567,0

Tableau 7 : Valeurs des fréquences de résonance $\delta_{\text{Fe-C-O}}$, $\nu_{\text{Fe-CO}}$ obtenues par spectroscopie RR.

Les spectres ont été simulés par une fonction multi-lorentzienne (en bleu sur la [Figure 61](#)). La fréquence de résonance $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ a été observée aux alentours de 567 cm⁻¹ quel que soit le mutant. L'absence de changement sur le mode de déformation montre que la mutation n'affecte pas la géométrie du complexe Fe^{II}CO [163]. Cela confirme les résultats obtenus précédemment avec les mutants de eNOS (W180F et W180Y) et saNOS (W56F, W56Y et W56H) pour lesquels la fréquence de résonance de la déformation $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ est également inchangée par rapport à la protéine sauvage [167, 219]. Pour la protéine sauvage bsNOS, la fréquence de résonance $\nu_{\text{Fe-CO}}$ est de 501 cm⁻¹. Cette valeur diminue à 500 cm⁻¹ pour le mutant W66F mais est augmentée jusqu'à 504,5 cm⁻¹ pour le mutant W66H ([Tableau 7](#)). Ces résultats indiquent que la liaison Fe-C est plus forte pour le complexe Fe^{II}CO du mutant W66H et plus faible pour les mutants F et Y. Ces déplacements de fréquence sont similaires à ceux décrits dans la littérature pour les mutants de saNOS (W56H : 505 cm⁻¹ > saNOS WT : 502 cm⁻¹ > W56Y et W56F : 500 cm⁻¹) [167].

Pour déterminer la fréquence d'élongation $\nu_{\text{C-O}}$, les mêmes complexes ont été étudiés par ATR-F¹³C TIR ([Figure 62](#)).



	WT	W66H	W66F	W66Y
ν_{C-O} (cm ⁻¹)	1917	1920	1913	1913

Figure 62 : Spectres ATR-FTIR du complexe Fe^{II}CO de bsNOS sauvage et des mutants H, F et Y en présence de substrat et de cofacteur (en noir) et déconvolutions (en bleu).

Tableau 8 : Valeurs des fréquences ν_{C-O} obtenues par ATR-FTIR.

La fréquence d'élongation ν_{C-O} du mutant W66H est déplacée à 1920 cm⁻¹ par rapport à la protéine sauvage qui a une fréquence de 1917 cm⁻¹. Elle est diminuée à 1913 cm⁻¹ pour les mutants F et Y (Tableau 8). Ces résultats indiquent une augmentation de la force de la liaison C-O pour le mutant H et une liaison plus faible pour les mutants F et Y.

Interaction du complexe Fe^{II}CO avec l'environnement distal :

Quand il se lie à l'hème, CO est un ligand donneur σ et accepteur π . De la rétro-donation des orbitales liantes $d \pi$ du fer vers les orbitales π^* antiliantes de CO [220] résulte un renforcement de la liaison Fe-C (augmentation de ν_{Fe-CO}) et un affaiblissement concomitant de la liaison C-O (diminution de ν_{C-O}). Ce phénomène est à l'origine de la corrélation inverse entre les fréquences ν_{Fe-CO} et ν_{C-O} qui a été observée et largement étudiée pour de nombreuses hémoprotéines (myoglobines, cytochromes P450, NOS de mammifères, NOS bactériennes, Figure 63) [192, 193, 198-200, 216, 221]. Dans un environnement distal fortement polaire (en présence de substrat par exemple), l'apparition d'une charge partielle négative sur l'atome d'oxygène du complexe Fe^{II}CO entraîne l'augmentation de ν_{Fe-CO} et la diminution de ν_{C-O} et cela correspond à un point plus à gauche sur la droite de corrélation (plus de rétro-donation).

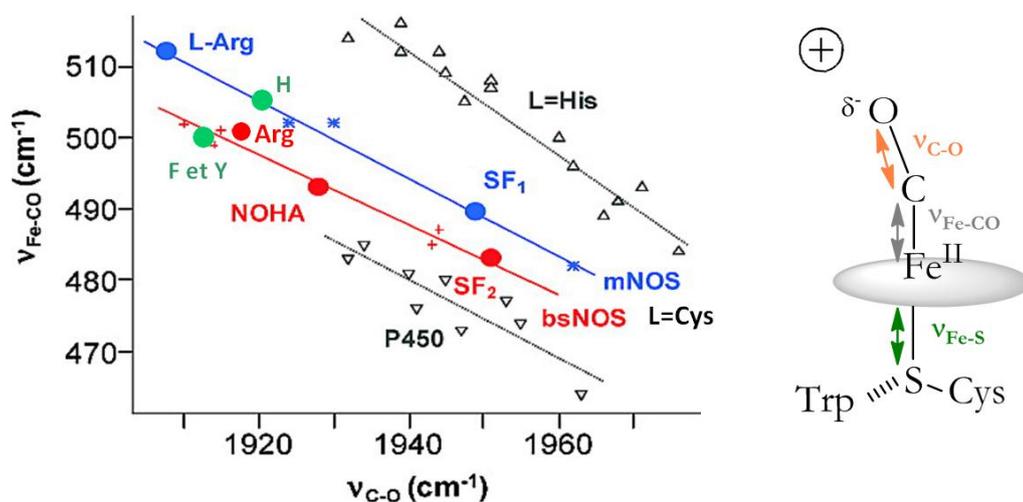


Figure 63 : Corrélation inverse observée pour différentes hémoprotéines entre les fréquences d'élongations $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et $\nu_{\text{C-O}}$ [192, 216, 221]. La droite de corrélation tracée en bleu correspond aux mNOS, celle en rouge à bsNOS. « SF » indique les points qui correspondent à une protéine sans substrat. Les points verts correspondent aux protéines mutées.

Dans le cas des NOS il a été proposé que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ existe sous deux formes mésomériques distinctes [118, 186, 188, 197]. En absence de substrat et de cofacteur (symbolisé par SF_1 et SF_2 sur la Figure 63), la structure de la protéine serait majoritairement relâchée avec un environnement distal de l'hème faiblement électropositif qui correspond à une fréquence de vibration Fe-CO basse et une fréquence de vibration C-O élevée. La fixation du substrat (Arg ou NOHA sur la Figure 63) au niveau du site actif introduit une charge positive à proximité de l'hème. La protéine adopterait majoritairement une conformation plus resserrée ce qui entraînerait une augmentation de la polarité de l'environnement distal de l'hème, une augmentation de la fréquence d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et une diminution de la fréquence de vibration $\nu_{\text{C-O}}$.

Interaction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ avec l'environnement proximal :

L'étude des fréquences associées aux modes de vibration des liaisons Fe-CO et C-O permet également d'obtenir des informations sur la nature du ligand proximal et la force de son caractère donneur σ . Le ligand proximal et le ligand distal sont en compétition pour établir une liaison σ avec le fer par l'intermédiaire de son orbitale vide d_z . Plus le ligand proximal est un bon donneur σ , plus la liaison σ entre le fer et le ligand distal CO est faible. Les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ des hémoprotéines qui possèdent le même ligand proximal, comme la famille des myoglobines (le ligand proximal est une histidine), sont situés sur la même droite de corrélation. Le remplacement du ligand histidine par un ligand meilleur donneur σ , comme dans la famille des cytochromes P450 dont le ligand proximal est une cystéine, entraîne une diminution très importante de la force de la liaison Fe-C ce qui se traduit

par un décalage vers le bas de la courbe de corrélation. On peut remarquer que les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ de la famille des NOS se situent sur une droite de corrélation distincte de celle de la famille des cytochromes P450 bien que ces deux protéines aient une cystéine proximale. L'établissement d'une liaison H entre le tryptophane proximal et le thiolate du fer chez la NOS conduit à l'affaiblissement du caractère donneur σ de la cystéine. Dans le cas des cytochromes P450, ce résidu tryptophane et la liaison H qui lui est attribuée n'existe pas, ce qui explique l'augmentation du caractère donneur σ de la cystéine, et l'affaiblissement de la liaison Fe-C. Les NOS bactériennes se situent sur une droite de corrélation différente des NOS de mammifère. Cela peut être expliqué par la force de liaison fer-soufre qui est plus élevée dans le cas de bsNOS. La fréquence d'élongation $\nu_{\text{Fe-S}}$ a une valeur de 337-338 cm^{-1} dans le cas de la NOS de mammifère [102, 191] et de 342 cm^{-1} dans le cas de bsNOS [102]. Cette différence peut expliquer la diminution de la force de la liaison Fe-CO dans le cas de bsNOS (et expliquerait la diminution de la fréquence d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$) mais est surprenante au vu de la structure du site actif de bsNOS qui est hautement similaire à celui de la NOS de mammifère [90].

L'étude des fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et $\nu_{\text{C-O}}$ du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ permet donc d'obtenir des renseignements sur la force de la liaison entre le fer et son ligand proximal et donc de l'effet électro-donneur du thiolate (effet *push*), qui est un paramètre essentiel au contrôle de la réactivité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ au cours du cycle catalytique des NOS.

Caractère électro-donneur du ligand proximal dans le cas des mutants :

Nous avons positionné nos protéines mutantes sur le graphique de corrélation $\nu_{\text{Fe-CO}} / \nu_{\text{C-O}}$. Les résultats confirment la constitution de deux groupes. D'un côté, le mutant W66H a tendance à augmenter la valeur d'élongations $\nu_{\text{Fe-CO}}$ (501 cm^{-1} pour la protéine sauvage et 504,5 cm^{-1} pour le mutant W66H) et se rapproche de la famille des NOS de mammifère. La liaison H de l'histidine diminue le caractère donneur σ du thiolate vers le fer (par rapport à la protéine sauvage). Il en résulte une diminution de la compétition σ entre ligand proximal et ligand distal et une augmentation de la force de la liaison Fe-C. Cela correspond à un point au-dessus de la droite de corrélation (en vert [Figure 63](#)). De l'autre côté les mutants F et Y qui maintiennent (pour le mutant Y) voire abaissent légèrement (pour le mutant F) la valeur d'élongations $\nu_{\text{Fe-CO}}$ aux alentours de 500-501 cm^{-1} . La suppression de la liaison H, permet d'augmenter le caractère électro-donneur σ du thiolate vers le fer et entraîne une augmentation de la compétition σ avec le ligand distal. Cela a pour conséquence la diminution de la force de liaison Fe-C et cela correspond à un point en dessous de la droite de corrélation (en vert sur la [Figure 63](#)).

Le même genre de résultat avait déjà été observé avec l'étude du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ des mutants F et Y de eNOS (W180F, W180Y) et saNOS (W56F, W56Y) [167, 219]. Les données montrent une diminution de la fréquence d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et confirment un effet *push* exacerbé pour ces mutants. Le mutant W56H de saNOS [219] a pour effet d'augmenter la fréquence d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et confirment la diminution de l'effet *push* via le renforcement de la liaison H pour ce mutant

L'analyse des modes vibrationnels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ apporte de nombreuses informations sur le caractère électro-attracteur de l'environnement distal, le caractère électro-donneur de l'environnement proximal et l'effet *push* de la liaison fer-soufre. Dans le cas de nos protéines de bsNOS mutées, la constitution des deux groupes observée avec la protéine à l'état Fe^{III} est confirmée. **D'un côté le mutant H diminue le caractère électro-donneur de la liaison fer-soufre et par conséquent l'effet *push* alors que les mutations F et Y augmentent cet effet *push*.**

Outre CO, NO est aussi une sonde sensible à la structure électronique de l'hème et à son environnement proximal.

1.4. Effet de la mutation sur la stabilité de la liaison fer-soufre

Etude du complexe Fe-NO par spectroscopie d'absorption UV-Visible :

Le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ est relativement stable aussi bien dans le cas de bsNOS sauvage que pour les mutants en absence (Figure 64 A) ou en présence (Figure 64 B) de substrat et de cofacteur. La mutation n'affecte pas de manière significative l'état de coordination du fer pour le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ qui reste BS-6C. La bande de Soret varie de 433 nm pour le mutant W66H à 440 nm pour la protéine sauvage (Tableau 9) mais n'est absolument pas modifiée par la présence (+/+ dans le Tableau 9) ou absence (-/- dans le Tableau 9) du cofacteur et du substrat. Il n'y a pas d'effet majeur du substrat et du cofacteur sur la structure électronique du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$.

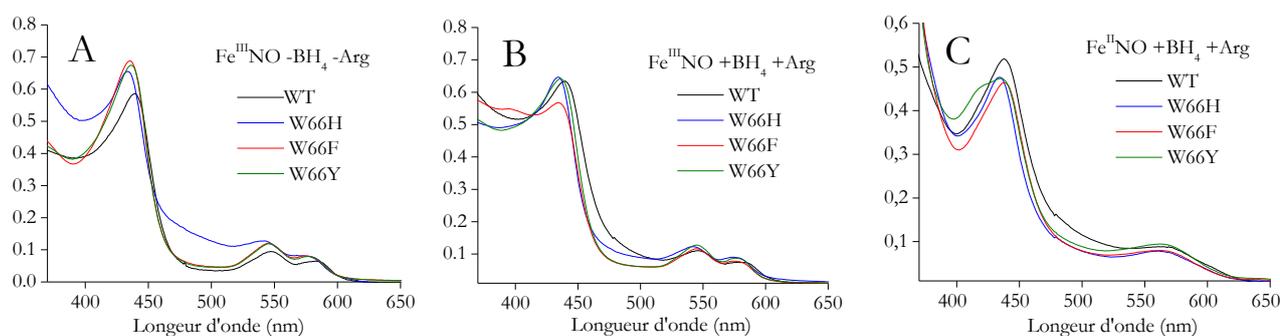


Figure 64 : Spectres UV-Visible de bsNOS sauvage et de 3 mutants des complexes Fe^{III}NO sans substrat et sans cofacteur (A), Fe^{III}NO avec substrat et avec cofacteur (B), Fe^{II}NO avec substrat et avec cofacteur (C).

Les complexes Fe^{II}NO en présence de substrat et de cofacteur présentent une bande de Soret entre 434 nm et 438 nm reflet d'une structure BS-6C ([Figure 64 C](#)). Seul le mutant W66Y a montré un épaulement à 415 nm qui rappelle ce qui a été observé avec les mutants F et Y de nNOS [196, 214] et correspond à une fraction de la protéine ayant un lien thiolate altéré et celui-ci est alors protoné. Dans le cas des mutants F et Y (W409Y et W409F) de nNOS cette forme 5C est largement majoritaire (90 %) et a une signature spectrale aux alentours de 407 nm.

	WT	W66H	W66F	W66Y
Fe ^{II} NO +/+	438,0	434,5	438,0	435,0
Fe ^{III} NO -/-	439,5	433,0	435,5	436,0
Fe ^{III} NO +/+	440,0	434,0	435,0	435,5

Tableau 9 : Valeurs de la bande de Soret (λ_{max} , nm) des complexes Fe^{II}NO avec substrat et avec cofacteur (+/+), Fe^{III}NO sans substrat et sans cofacteur (-/-), Fe^{III}NO avec substrat et avec cofacteur (+/+) de bsNOS sauvage et des mutants H, F, Y.

Les complexes Fe^{II}NO (en présence de substrat et de cofacteur) et Fe^{III}NO (en présence ou en absence de substrat et de cofacteur) montrent tous une structure BS-6C (à l'exception d'une fraction du mutant Y) comme celle attendue avec la protéine sauvage.

Etude de la stabilité du lien fer-soufre des complexes Fe^{II}NO par spectroscopie RPE :

Le complexe Fe^{II}NO est une espèce paramagnétique détectable en spectroscopie RPE. En absence de substrat et de cofacteur le spectre de ce complexe pour la protéine sauvage est caractéristique d'une espèce rhombique avec 3 valeurs de g. Chaque pic présente une structure en triplet due au couplage hyperfin du spin électronique avec le spin nucléaire de l'azote de NO. Ce signal est le reflet d'une espèce hexacoordonnée ([Figure 65](#), espèce A) [222].

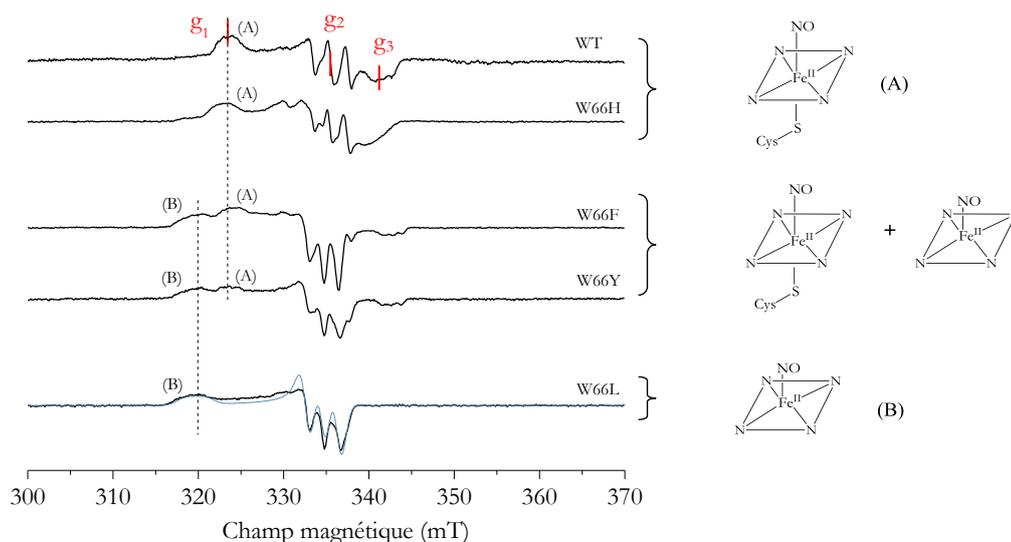


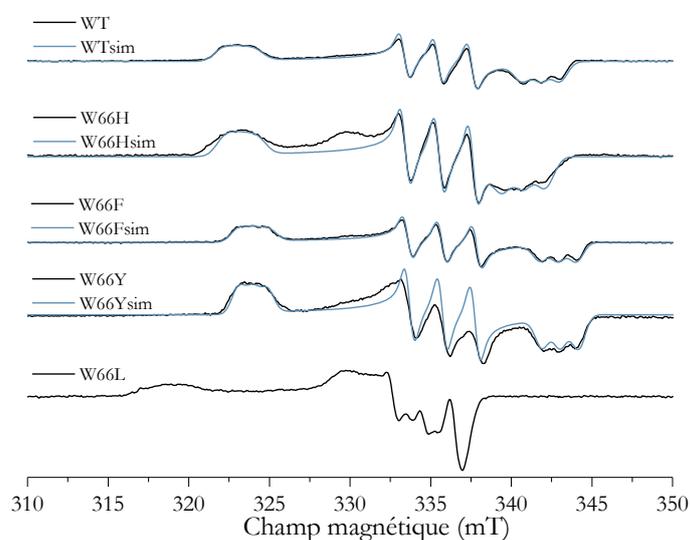
Figure 65 : Spectres RPE en bande X à 10 K des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de bsNOS sauvage et des mutants H, F, Y, L en absence de cofacteur et de substrat (en noir). Représentation des espèces hexacoordonnées (A) et pentacoordonnées (B). La simulation de l'espèce pentacoordonnées (B) est représentée en bleu.

A l'opposé le mutant W66L présente un signal caractéristique d'une espèce axiale avec $g_1 = g_2$ et g_3 , ici reflet de la présence d'une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné (Figure 65, espèce B) avec la perte du lien thiolate proximal. Ce résultat confirme celui obtenu avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$. Pour ce mutant, seule la forme P420 était observée. Le mutant W66H a une signature spectrale majoritairement caractéristique d'une espèce hexacoordonnée, proche de la protéine native. Nous pouvons, cependant, observer la contribution d'une espèce pentacoordonnée mais de manière très minoritaire. Dans le cas des mutants F et Y on obtient un mélange de ces deux espèces. Une certaine proportion de la protéine est à l'état hexacoordonné (A) et une autre partie est à l'état pentacoordonné (B). Cela indique que la rupture de la liaison H dans le cas de ces mutants (mais le maintien des interactions d'empilement π) déstabilise la liaison fer-soufre (espèce pentacoordonnée) mais permet encore la formation d'espèces hexacoordonnées.

La tendance concernant la stabilité du ligand proximal semble concordante avec les résultats obtenus suite aux analyses de la protéine à l'état Fe^{III} et du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$. Le mutant histidine est celui qui affecte le moins la stabilité du lien thiolate. Les mutations F ou Y (qui suppriment la liaison H) déstabilisent ce lien et une certaine proportion de la protéine a une liaison fer-soufre altérée. Enfin le mutant L (qui supprime à la fois la liaison H et les interactions d'empilement π) déstabilise complètement l'environnement proximal et ne permet plus de maintenir le lien fer-soufre pour les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. La stabilité de la liaison fer-soufre respecte l'ordre suivant WT/H>F/Y>L.

Importance du substrat sur la stabilité du lien fer-soufre des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$:

En présence de substrat et de cofacteur les spectres sont nettement plus homogènes ([Figure 66](#)). La protéine sauvage et les mutants W66H, W66F et W66Y ont des signatures spectrales RPE caractéristiques de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ hexacoordonnée. Cela montre, une fois de plus, que le substrat va aider à structurer le site actif des mutants F et Y. Le mutant W66L fait exception, le substrat et le cofacteur ne sont pas déterminants pour la coordination du fer : le signal reste caractéristique d'une espèce ayant perdu le lien thiolate (en cohérence avec le résultat obtenu avec le test P450 pour ce mutant). Cette différence (par rapport aux autres mutants) pourrait être expliquée par la perte d'autres interactions spécifiques (en plus de la rupture de la liaison H), telles que les interactions d'empilement π entre le tryptophane et la porphyrine.



[Figure 66](#) : Spectres RPE en bande X à 10 K des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de bsNOS sauvage et des mutants H, F, Y, L en présence de cofacteur et de substrat (en noir) et leurs simulations (en bleu).

Le caractère homogène des spectres nous a permis de simuler toutes les espèces hexacoordonnées en présence de substrat et de cofacteur et l'espèce pentacoordonnée du mutant W66L (en absence de substrat et de cofacteur, voir [Figure 65](#)). Les interactions Zeeman et le couplage hyperfin au noyau azote du ligand NO ont été pris en compte. Nous avons déterminé les valeurs de g et du couplage hyperfin (A) avec l'atome d'azote ([Tableau 10](#)).

	g ₁ (g strain)	g ₂ (g strain)	g ₃ (g strain)	g _{iso}	Δg	A ₁	A ₂	A ₃	A _{iso}
WT	2,0816 (0,0075)	2,0046 (0,0010)	1,9671 (0,0054)	2,0178	0,1145	28,8	58,9	32,5	40,1
W66H	2,0808 (0,0075)	2,0046 (0,0010)	1,9737 (0,0064)	2,0197	0,1071	32,0	59,0	37,0	42,7
W66Y	2,0771 (0,0062)	2,0043 (0,0010)	1,9615 (0,0047)	2,0143	0,1156	26,0	57,0	31,0	38,0
W66F	2,0760 (0,0050)	2,0037 (0,0010)	1,9610 (0,0045)	2,0146	0,1150	27,6	60,0	31,1	39,6
W66L	2,1040 (0,0010)	2,0094 (0,0030)	2,0094 (0,0030)	2,0409		42,0	50,5	50,5	47,7

Tableau 10 : Valeurs de g des complexes Fe^{II}NO de bsNOS sauvage et des mutants H, Y, F, L en présence de cofacteur et de substrat. A exprimé en MHz.

La comparaison des signatures spectrales RPE pour cette série de mutants indique une contribution significative de la liaison H proximale dans la distribution de la densité électronique au sein du complexe Fe^{II}NO. L'anisotropie de g totale (Δg) augmente dans l'ordre W66H<WT<W66F≈W66Y. De façon similaire, la densité de spin sur l'azote de NO (A_{iso}) semble la plus importante pour le mutant W66H et diminue ensuite dans l'ordre WT>W66F>W66Y en corrélation avec la diminution de la force de la liaison H.

Notre étude du complexe Fe^{II}NO par spectroscopie RPE complète les données publiées avec les mutants F et Y de saNOS et eNOS [167]. Il est montré que la suppression de la liaison H entre le tryptophane et la cystéine diminue la fréquence d'élongation ν_{Fe-NO}. La diminution de la force de la liaison Fe-NO [167] témoigne une fois de plus de l'augmentation de l'effet *push* pour les mutants F et Y.

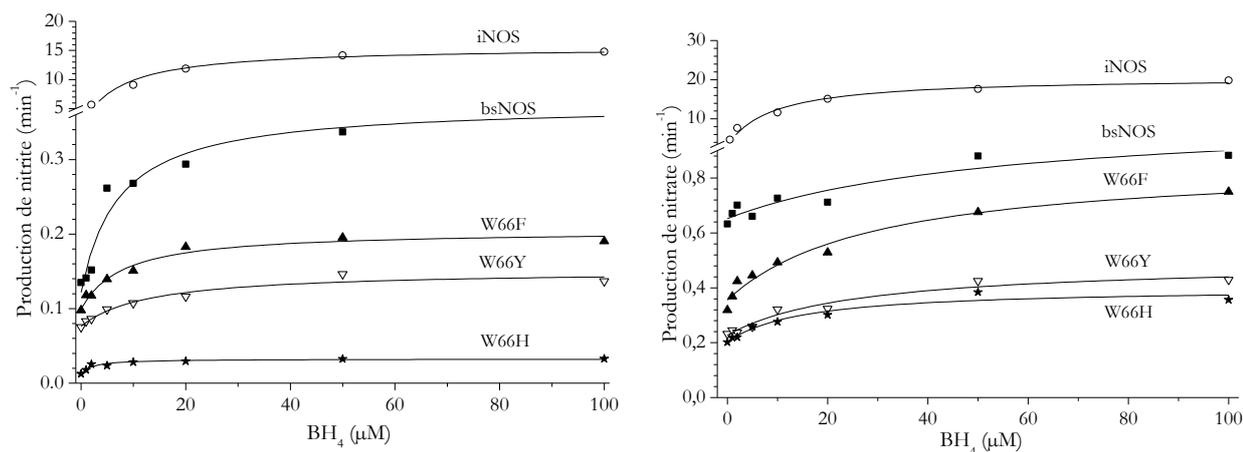
L'étude du complexe Fe^{II}NO corrobore les résultats obtenus avec le complexe Fe^{II}CO : la rupture de la liaison H (mutants F, Y) augmente l'effet *push* et la compétition σ, le renforcement de cette liaison (mutant H) diminue l'effet *push* et la compétition σ.

Les variations des propriétés électroniques et structurales des complexes Fe-XO sont le reflet des effets attendus sur le complexe Fe^{II}O₂. Ces mutations modifient les signatures spectrales, l'environnement électronique et l'effet *push* de ces complexes. Il est donc nécessaire d'étudier l'effet de ces mutations sur le mécanisme d'activation du complexe Fe^{II}O₂ et l'activité de la NOS à proprement parler.

1.5. Effet de la mutation sur la production catalytique de bsNOS

Test de Griess : production en nitrite et nitrate

La vitesse d'autoxydation des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ est augmentée pour les mutants F et Y de nNOS (W409F et W409Y) [141, 165]. Inversement, le renforcement de la liaison H dans le cas du mutant W188H de iNOS ralentit l'autoxydation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et pourrait éventuellement permettre l'observation de nouveaux intermédiaires [166]. La NOS bactérienne pourrait utiliser le même type de régulation [223] pour contrôler sa chimie oxydante. Cela nous pousse à nous intéresser précisément aux conséquences des mutations (et des variations de l'effet électro-donneur) sur la production catalytique. Pour cela nous avons quantifié la production en nitrite et en nitrate de bsNOS sauvage et des protéines mutées en fonction de la concentration en BH_4 : c'est le test de Griess (voir Chapitre 2, 2. et [Figure 67](#)) où le peroxyde d'hydrogène apporte l'ensemble des protons et électrons nécessaires à la réaction.



[Figure 67](#) : Représentation des vitesses de production en nitrite et nitrate (en min^{-1}) en fonction de la concentration en BH_4 de iNOSoxy, bsNOS native et des mutants F, Y et H.

La vitesse de production en nitrite et en nitrate totale (V_{max} totale) de bsNOS est 35 fois plus lente que pour iNOS ($36,40 \text{ min}^{-1} \rightarrow 1,00 \text{ min}^{-1}$: cela correspond à environ 3 % de l'activité de iNOS ([Tableau 11](#))). Ce résultat est du même ordre de grandeur que celui rapporté pour d'autres NOS bactériennes : saNOS ($0,16 \text{ min}^{-1}$, [91]) et drNOS ($2,5 \text{ min}^{-1}$, [50]). Cette différence par rapport aux NOS de mammifère est surprenante aux vues des structures 3D des sites actifs qui sont superposables [90] et interroge quant à la fiabilité de la NOS bactérienne comme modèle catalytique.

	iNOS	bsNOS	W66F	W66Y	W66H
Production en nitrite					
V_0, min^{-1}	0,90	0,10	0,11	0,07	0,013
$V_{\text{max}}, \text{min}^{-1}$	16,30	0,30	0,22	0,12	0,024
Production en nitrate					
V_0, min^{-1}	1,00	0,62	0,34	0,20	0,20
$V_{\text{max}}, \text{min}^{-1}$	20,10	0,70	0,56	0,37	0,22
Production totale					
V_0 Totale	1,90	0,72	0,45	0,27	0,21
V_{max} Totale	36,40	1,00	0,78	0,49	0,24

Tableau 11 : Vitesses de production en nitrite et en nitrate (en min^{-1}) V_0 et V_{max} pour la protéine sauvage et les mutants F, Y et H.

La vitesse de production en nitrite et en nitrate totale (V_{max} totale) de bsNOS et des mutants évolue dans l'ordre suivant WT>W66F>W66Y>W66H. La mutation histidine est celle qui affecte le plus l'activité de la protéine : l'activité de synthèse en nitrite correspond à environ 8 % de l'activité de la bsNOS sauvage ($0,30 \text{ min}^{-1} \rightarrow 0,024 \text{ min}^{-1}$, Tableau 11). **Le renforcement de la liaison H, la diminution du caractère électro-donneur du ligand proximal, et par conséquent la diminution de l'effet *push* aboutit à un manque de réactivité de la part des complexes fer-oxygène [224] et pourrait expliquer la diminution drastique de la vitesse de synthèse de NO pour ce mutant.**

La vitesse totale de production en nitrite et en nitrate est de 1,2 (pour le mutant F) à 2 fois (pour le mutant Y) plus lente comparée à bsNOS sauvage ($1,00 \text{ min}^{-1} \rightarrow 0,78 \text{ min}^{-1} / 0,49 \text{ min}^{-1}$). Ces mutants qui augmentent le caractère électro-donneur du ligand proximal et par conséquent augmentent l'effet *push* devraient logiquement augmenter la réactivité des intermédiaires fer-oxygène et accélérer la synthèse de NO par rapport à la protéine sauvage. Dans le cadre de nos expériences, cet effet n'est pas observé et pourrait être expliqué par des phénomènes de découplage. **L'augmentation de la compétition entre ligand proximal et ligand distal, l'augmentation de l'effet *push* et l'augmentation de la réactivité du fer, tout en maintenant une activité NO-Synthase, aboutirait majoritairement à du découplage (Figure 68).**

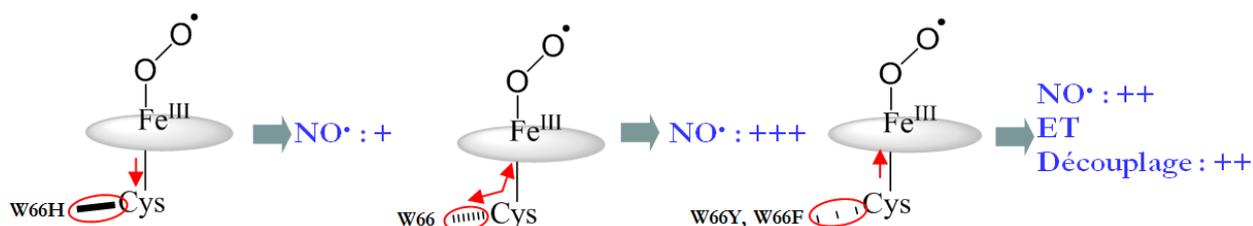


Figure 68 : Représentation des caractères donneurs ou attracteurs des ligands en position proximale et effet sur l'activation de l'oxygène.

Activité non spécifique :

Ces résultats apportent également des informations quant au rôle de BH₄ dans le cas de la NOS bactérienne par rapport aux NOS de mammifères. La vitesse initiale totale (V₀ totale) correspond à l'activité non spécifique de la protéine c'est-à-dire à son activité en absence de cofacteur. Le cofacteur BH₄, par son rôle primordial pour la dimérisation et la structuration du site actif, accélère de plus de 19 fois la vitesse de formation en nitrite et nitrate (V₀ totale *versus* V_{max} totale) dans le cas de la NOS de mammifère. A l'inverse la présence du cofacteur dans le cas de la NOS bactérienne n'a qu'un effet mineur puisqu'il n'accélère la vitesse de formation en nitrite et nitrate (V₀ totale *versus* V_{max} totale) que de 1,5 à 2 fois environ (pour la protéine sauvage, les mutants F et Y). Cela s'explique essentiellement par une structure de la NOS bactérienne déjà dimérique et peu dépendante de la présence du cofacteur. On remarque que le mutant H a une activité entièrement non spécifique puisque V₀ totale = V_{max} totale et confirme que le renforcement de la liaison H inhibe fortement, voire complètement, l'activité de la protéine (pas d'augmentation de la vitesse de production totale en présence du cofacteur).

Apport des études décrites dans la littérature pour l'analyse de l'activité des mutants : potentiel redox et vitesse d'activation du complexe Fe^{II}O₂ des protéines mutées

L'effet des mutations H, F et Y sur l'activation du complexe Fe^{II}O₂ et le potentiel redox de l'hème décrit dans la littérature complètent nos données. En effet, une des conséquences possibles du remplacement du tryptophane par un résidu histidine, phénylalanine ou tyrosine est une modification du potentiel redox de l'hème. Ce dernier a été mesuré sur les mutants W66 par l'équipe de Stuehr *et al.* [121] en présence du cofacteur THF et confirme la constitution des deux groupes. On observe une augmentation de + 59 mV pour le mutant histidine par rapport à la protéine sauvage (-361 mV → -302 mV) et une diminution de - 66 mV pour le mutant phénylalanine (-361 mV → -427 mV) (Tableau 12).

Protéine	Potentiel redox (mV) ($E_0 - E_{0WT}$)	Vitesse d'activation du complexe $Fe^{II}O_2$ (s^{-1}) (Γ en $^{\circ}C$)	Références
bsNOS WT (+Arg+THF)	-361	15,7 (10 $^{\circ}C$)	[121]
W66H (+Arg+THF)	-302 (+59)	2,7 (10 $^{\circ}C$)	[121]
W66F (+Arg+THF)	-427 (-66)	37,0 (10 $^{\circ}C$)	[121]
saNOS sauvage (+Arg+BH ₄)	-334	22,6 (20 $^{\circ}C$)	[219]
W56H (+Arg+BH ₄)	-303 (+31)	4,1 (20 $^{\circ}C$)	[219]
W56F (+Arg+BH ₄)	-419 (-85)	69,7 (20 $^{\circ}C$)	[219]
W56Y (+Arg+BH ₄)	-436 (-102)	87,7 (20 $^{\circ}C$)	[219]
iNOSoxy sauvage (+Arg+BH ₄)	-261	12,5 (10 $^{\circ}C$)	[166]
W188H (+Arg+BH ₄)	-173 (+88)	2,03 (10 $^{\circ}C$)	[166]

Tableau 12 : Potentiel redox du fer et vitesse d'activation de l'oxygène de bsNOS, saNOS et iNOSoxy sauvage et des mutants H, F et Y.

L'effet de la mutation histidine sur le potentiel a été rapportée pour une autre NOS bactérienne : saNOS et montre le même effet des mutations sur le potentiel redox W56H>WT>W56F/W56Y [219], le mutant W188H de iNOS élève la valeur du potentiel redox de + 88 mV par rapport à la protéine sauvage [166]. La mutation H renforce la liaison H, diminue l'effet *push*, diminue la densité électronique sur le fer et est à l'origine de l'élévation du potentiel redox. Les mutations F et Y rompent la liaison H, augmentent l'effet *push* du ligand proximal, augmentent la densité électronique sur le fer et diminuent le potentiel redox. La variation de ces potentiels a été corrélée à l'activation de l'oxygène : l'augmentation du potentiel redox (mutants H) ralentit la disparition du complexe $Fe^{II}O_2$ de 5 à 6 fois alors que la diminution du potentiel redox accélère l'activation de l'oxygène de 2,5 à 4 fois (F et Y) par rapport à la protéine sauvage [121]. Enfin, Hannibal *et al.* montrent que malgré l'accélération de la vitesse d'activation du complexe $Fe^{II}O_2$, la production en NO du mutant F est inférieure à celle de la protéine sauvage, ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle le découplage est très important avec ce mutant [121].

1.6. Conclusion

La distance entre l'azote du groupement indole du tryptophane et l'atome de soufre de la cystéine proximale est de 3,2 à 3,6 Å pour la NOS de mammifère [71, 72, 94, 95, 221] et de 3,3 à 3,8 Å pour la NOS bactérienne [91, 99, 221]. La force de la liaison H est donc un paramètre conservé entre les différents isoformes de NOS.

Nous avons proposé une analyse du rôle de cette liaison H proximale qui contrôle la structure et les propriétés électroniques du site actif de la NOS. Nous avons analysé l'effet de la

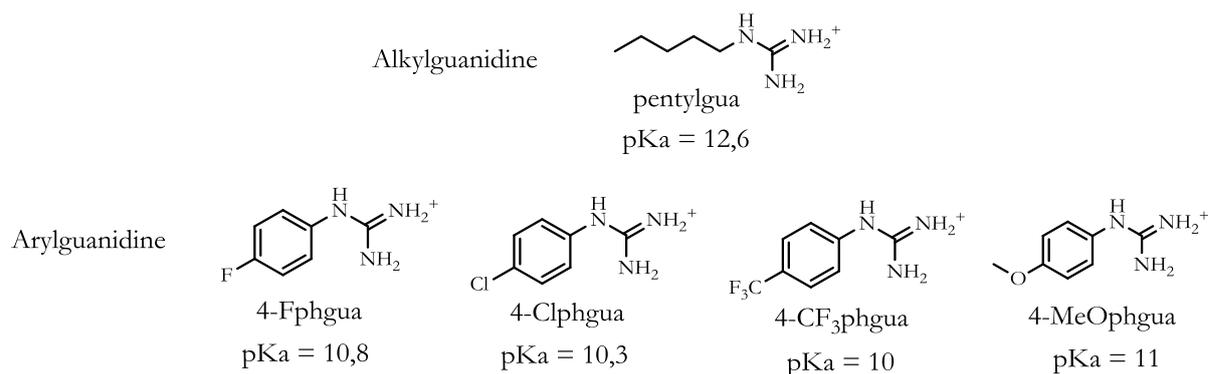
suppression (mutants W66F et W66Y) et du renforcement de cette liaison (mutant W66H) sur les signatures spectrales de l'espèce Fe^{III} et des complexes Fe-XO. Notre travail montre clairement que la liaison H entre le tryptophane et le thiolate proximal contrôle la stabilité des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ mais aussi $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Nous avons pu corréler la liaison H avec les propriétés d'électro-donation du ligand proximal et la stabilité du lien fer-soufre. Nos données indiquent que la suppression de la liaison H augmente les propriétés de donation électronique du ligand proximal, ce qui augmente alors la compétition σ sur les orbitales du fer. Cette compétition aboutit à une augmentation des processus de découplage des espèces Fe-XO. Cet effet est inversé pour la mutation H qui renforce la liaison H et diminue la compétition σ . La réactivité des espèces Fe-XO est alors fortement inhibée pour ce mutant. L'ensemble des résultats de cette partie est en cohérence avec ceux obtenus avec d'autres mutants de NOS bactérienne : saNOS [167, 219] mais aussi de NOS de mammifères : eNOS [167], nNOS [146, 165, 196] et iNOS [166]. Nos résultats suggèrent que les NOS bactériennes sont, tout comme les NOS de mammifères, des oxygénases qui utilisent les propriétés électroniques et l'effet *push* du thiolate proximal pour activer le ligand distal O_2 et maîtriser la nature de ses produits catalytiques. Une modification de la force de la liaison H engagée avec le thiolate peut soit inhiber l'activité de la protéine soit la sur-activer aux bénéfices de la production de RNOS.

L'étude des mutants des NOS bactériennes apportent également une autre information primordiale : **les différences de vitesses de production en NO, de potentiels redox, de force de liaison fer-soufre entre la NOS bactérienne et la NOS de mammifère ne peuvent pas être expliquées par une différence dans le mode de régulation de l'effet *push*.**

2. Influence de l'environnement distal sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$: étude d'analogues de substrats

2.1. Introduction

Un autre paramètre essentiel à l'activation de l'oxygène est le réseau de liaisons H distal. Plusieurs études ont permis de mesurer l'importance du pKa du groupement guanidinium ou de l'hydroxyguanidinium du substrat dans la structuration du réseau de liaisons H entre le ligand distal du fer, l'(hydroxy)guanidinium et une molécule d'eau au niveau du site actif [90, 95, 122, 163, 221]. Des études ont été réalisées avec iNOSoxy et des analogues d'arginine ayant des pKa variant de 10 à 12,6. Parmi elles, on retrouve l'alkylguanidine pentylguanidine (pentylgua) et des arylguanidines dont les pKa sont plus faibles telles la 4-trifluorophénylguanidine (4-CF₃phgua), la 4-chlorophénylguanidine (4-Clphgua), la 4-fluorophénylguanidine (4-Fphgua) et la 4-méthoxyphénylguanidine (4-MeOphgua), [Figure 69](#))).



[Figure 69](#) : Formules chimiques et pKa des analogues de substrat.

L'effet de ces analogues de substrat sur le réseau de liaisons H distal a déjà été sondé via l'étude de la coordination du ligand CO [163].

Etudes du ligand CO :

La conformation adoptée par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ est directement liée aux interactions polaires et électrostatiques réalisées entre le ligand CO et son environnement direct. Un pKa faible, comme dans le cas des arylguanidines, indique une plus grande acidité pour le proton du groupement guanidinium. Ainsi, la liaison H simple et directe entre le ligand CO et le guanidinium ([Figure 70](#)) devrait être plus forte dans le cas des arylguanidines.

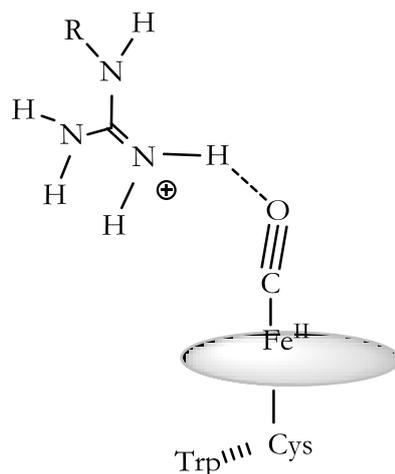


Figure 70 : Représentation de la liaison H hypothétique, réalisée entre le ligand CO et le groupement guanidinium.

Or, les analyses par spectroscopie Raman de résonance et spectroscopie ATR-FTIR montrent qu'en présence des arylguanidines le mode vibrationnel $\nu_{\text{Fe-CO}}$ diminue et le mode vibrationnel $\nu_{\text{C-O}}$ augmente [163]. Contrairement à ce qui est attendu, ce résultat indique un affaiblissement de la liaison H entre le groupement guanidinium et le ligand CO. Il a alors été proposé que la présence d'une molécule d'eau dans le réseau de liaisons H, située entre le ligand du fer et le groupement guanidinium, puisse expliquer ce phénomène. Dans ce cas, trois conformations distinctes ont été avancées pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ de la protéine iNOSoxy : en présence d'arginine ($\nu_{\text{Fe-CO}} = 513 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu_{\text{C-O}} = 1903 \text{ cm}^{-1}$) [163], en présence de NOHA ($\nu_{\text{Fe-CO}} = 499 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu_{\text{C-O}} = 1928 \text{ cm}^{-1}$) [163, 188], et en absence de substrat ($\nu_{\text{Fe-CO}} = 475$ et 492 cm^{-1} et $\nu_{\text{C-O}} = 1949$ et 1963 cm^{-1}) [163].

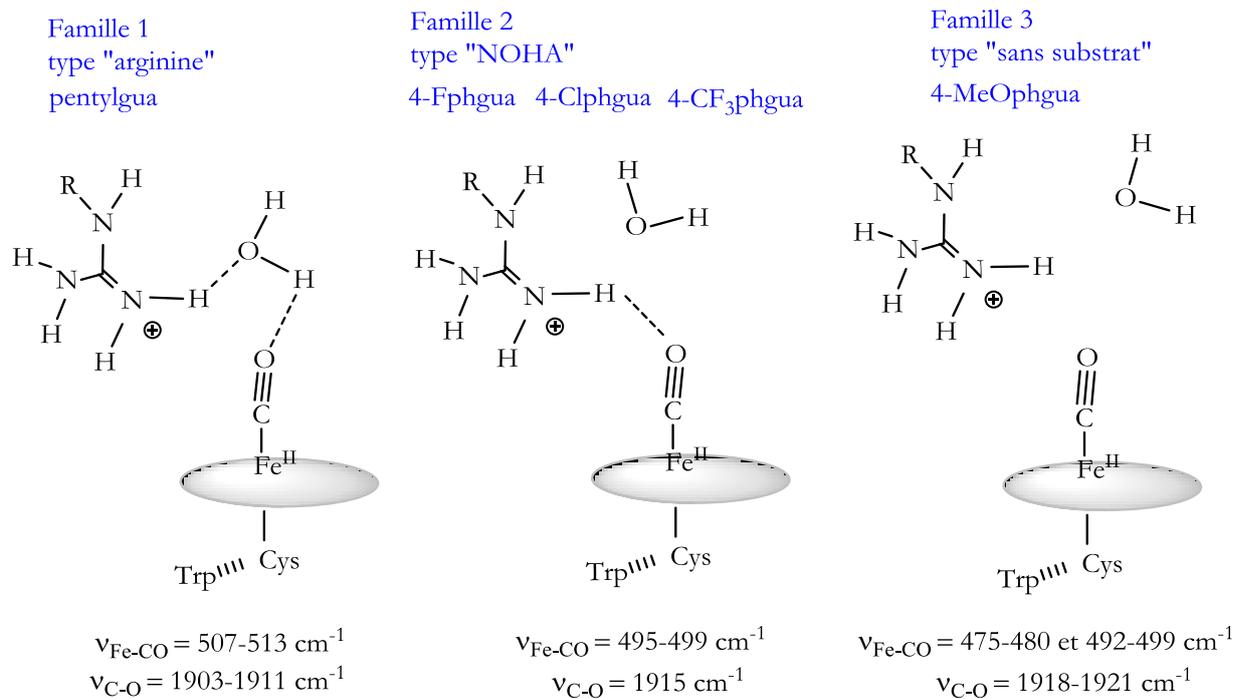


Figure 71 : Représentation de la liaison H impliquant le groupement guanidinium, la molécule d'eau et le ligand CO et représentation des trois familles d'analogues de substrat.

Les analogues de substrats ont été classés en trois familles selon les signatures spectrales obtenues pour le complexe Fe^{II}CO (Figure 71). La pentylgua appartient à la famille 1 dont les signatures spectrales sont similaires à celles observées pour l'arginine. Les arylguanidines 4-Fphgua, 4-Clphgua, 4-CF₃phgua sont regroupées dans la famille 2 car leurs complexes Fe^{II}CO ont des caractéristiques structurales proches de celles observées avec le substrat NOHA. Enfin la 4-MeOphgua appartient à la famille 3 pour laquelle le complexe Fe^{II}CO adopte une conformation proche de celle observée en absence de substrat. **Le caractère acide du groupement guanidinium, plus élevé dans le cas des arylguanidines, renforce la liaison H entre la molécule d'eau et l'analogue de substrat et affaiblit la liaison H entre la molécule d'eau et le ligand CO.**

En outre, les études cristallographiques de différents complexes (CO, NO, O₂) montrent clairement que le réseau de liaisons H n'est pas strictement similaire en présence d'arginine et de NOHA [134]. L'arginine interagit avec l'atome terminal du ligand fixé sur le fer et cela favoriserait la rupture de la liaison O-O et la formation d'une espèce oxydante cpI au cours de la première étape du cycle catalytique (Figure 72). Le substrat NOHA est en interaction avec les deux atomes du ligand fixé sur le fer et, contrairement à l'arginine, permettrait de stabiliser un intermédiaire Fe^{III}OO⁻ ou Fe^{III}OOH. Les analogues de substrat apportent de nouveaux éléments concernant ce modèle. Avec les alkylguanidines de la famille 1, qui conservent le réseau de liaisons H, la synthèse de NO est possible et certaines peuvent avoir jusqu'à 40 % d'activité par rapport à l'arginine [122, 225, 226].

Ainsi, la formation du cpI (l'espèce oxydante de la première étape) est en partie préservée en présence des analogues de la famille 1.

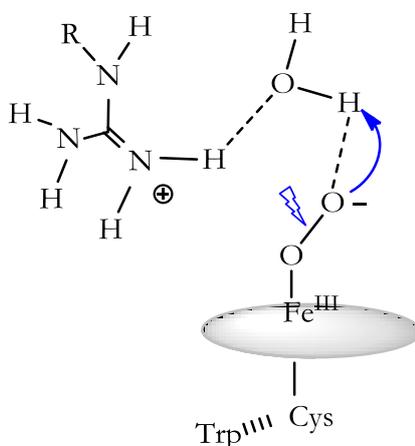


Figure 72 : Proposition de réseau de liaisons H pour les analogues de la famille 1 des guanidines et conséquence sur le mécanisme d'activation de l'oxygène [163].

En revanche, les arylguanidines de la famille 2 ne permettent pas cette synthèse. En effet, le réseau de liaisons H avec ces analogues se rapproche de celui observé avec le NOHA. Le groupement guanidinium serait alors capable d'établir une interaction avec les deux atomes d'oxygène. Cette conformation stabiliserait les espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ et empêcherait la rupture de la liaison O-O et l'espèce cpI ne serait pas formée (Figure 73). Dans ces conditions le groupement guanidinium ne peut pas être oxydé et la réaction aboutirait majoritairement au découplage.

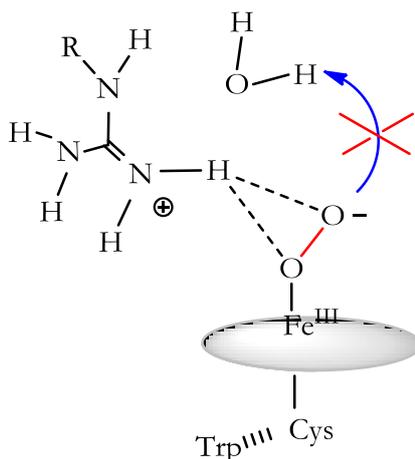


Figure 73 : Proposition de réseau de liaisons H pour les analogues de la famille 2 des guanidines et conséquence sur le mécanisme d'activation de l'oxygène [163].

Dans la seconde étape, il est proposé que l'espèce oxydante ne soit pas l'espèce cpI mais une des deux espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$. L'étude des analogues de NOHA supporte cette

hypothèse. Les aryl-hydroxy-guanidines (tout comme les arylguanidines) sont supposées stabiliser les espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$. A l'inverse de ce qui est observé dans la première étape, l'activité catalytique est en partie préservée avec les substrats de type aryl-hydroxy-guanidines [227] utilisés pour étudier la deuxième étape (l'oxydation du NOHA).

Ces résultats suggèrent que la molécule d'eau, essentielle à l'activité de la première étape, n'est pas indispensable à l'activité catalytique de la deuxième étape et indiquent que les deux étapes du cycle catalytique des NOS se déroulent selon deux mécanismes distincts et que cette différence est en grande partie liée à la structuration du réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif [122, 163].

Objectifs :

Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$, très stable, est couramment utilisé comme modèle du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Cependant, ces deux espèces ont des géométries différentes : le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est plus coudé alors que $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ adopte une conformation plutôt linéaire [118]. De plus leurs structures électroniques sont différentes. Pour analyser l'effet des analogues sur l'activité catalytique des NOS, il est donc nécessaire d'étudier directement le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Nous proposons d'étudier l'effet des analogues de l'arginine directement sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. La difficulté à étudier directement l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ réside dans l'instabilité du complexe et sa durée de vie très courte. Pour cela nous avons utilisé deux techniques différentes et complémentaires.

Dans un premier temps les cinétiques de formation et de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ sont mesurées par la technique de *stopped-flow* (voir Chapitre 2, 5.1.). Nous faisons réagir iNOSoxy dans un état réduit Fe^{II} avec un tampon saturé en dioxygène. La fixation du gaz O_2 sur l'espèce Fe^{II} aboutit à la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ qui a un maximum d'absorption aux environs de 428 nm facilement caractérisable par spectroscopie UV-visible. Un spectre est enregistré toutes les 3 ms jusqu'à 2,15 ou 5 s. L'augmentation puis la diminution de l'absorption à 428 nm permettent de déterminer les vitesses de formation et de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Elles sont d'abord mesurées en présence du substrat naturel arginine. Nous pouvons ensuite calculer ces vitesses en présence des analogues et analyser l'effet de la modification du pKa du guanidinium sur les propriétés cinétiques du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

Dans un second temps, les complexes héminiques formés pendant l'oxydation de l'arginine et de ses analogues sont analysés par la spectroscopie Raman de résonance en flux continu (voir Chapitre 2, 5.3.). Cela permet de déterminer les modes vibrationnels de l'ensemble des espèces présentes dans l'échantillon pour un temps déterminé. Il sera possible de caractériser les modes vibrationnels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et de déterminer la nature des autres espèces éventuellement

formées. Plus particulièrement, il sera possible de caractériser la liaison H entre le groupement guanidinium et l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

2.2. Etudes des cinétiques de formation et de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$

Pour réaliser les analyses en *stopped-flow*, la protéine iNOSoxy est conditionnée dans un état réduit puis mélangée avec un tampon oxygéné. Le mélange, réalisé à une température fixée à 4°C, permet au dioxygène de se fixer sur l'espèce Fe^{II} . La basse température permet de ralentir les vitesses de formation et de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et de faciliter sa caractérisation par spectroscopie UV-visible à 428 nm. Dans un premier temps, les cinétiques sont mesurées en présence du cofacteur inactif BH_2 (sans activité redox). En absence de transfert d'électron en provenance du cofacteur, l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ disparaît de manière plus lente, ainsi sa durée de vie est augmentée. Dans ces conditions la vitesse de disparition du complexe correspond à sa vitesse d'autoxydation. La même expérience est réalisée en présence du cofacteur compétent BH_4 . La vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est alors accélérée et correspond à la vitesse d'activation de l'oxygène par le cofacteur.

En présence du substrat arginine :

La [Figure 74](#) représente les spectres de référence obtenus par *stopped-flow* pour la protéine iNOSoxy en présence du substrat naturel l'arginine et du cofacteur inactif BH_2 . Le spectre noir correspond au spectre UV-visible de l'espèce enregistrée à 12 ms et correspond à l'espèce Fe^{II} de départ avec un maximum pour la bande de Soret à 412 nm. A 351 ms (spectre bleu), le spectre a un maximum d'absorption de la bande de Soret à 428 nm correspondant à l'espèce intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Enfin, en rouge est représenté le spectre enregistré à 5 secondes et correspond à l'espèce finale Fe^{III} avec une bande de Soret à 395 nm.

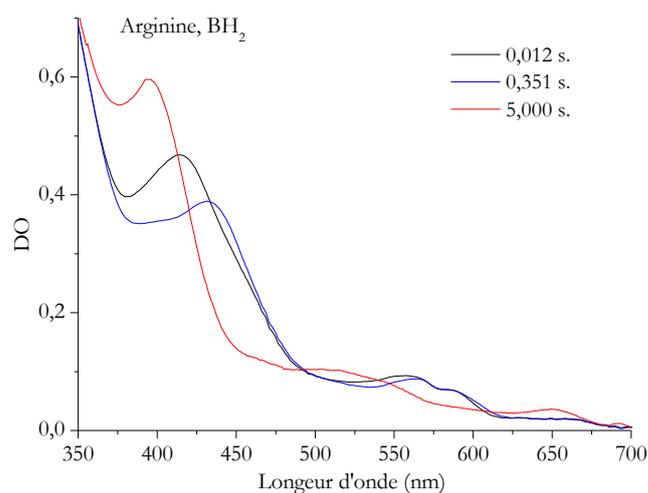


Figure 74 : Sélection de spectres obtenus par *stopped-flow* avec la protéine iNOSoxy en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₂. Les spectres des espèces Fe^{II}, Fe^{II}O₂ et Fe^{III} sont représentés respectivement en noir, bleu et rouge.

Les spectres UV-visible obtenus en présence du cofacteur naturel BH₄ sont représentés sur la **Figure 75**. Le transfert d'électron provenant du cofacteur ptérine accélère la vitesse de disparition de l'espèce Fe^{II}O₂, celle-ci est donc plus difficilement observable. Le spectre noir représente le spectre enregistré à 12 ms et correspond à l'espèce Fe^{II} de départ avec un maximum pour la bande de Soret à 412 nm. A 33 ms (en bleu sur la **Figure 75**) l'absorbance à 412 nm a diminué et l'empreinte présente un épaulement vers 430 nm correspondant à la formation de l'espèce Fe^{II}O₂. Entre 33 ms et 2,13 s, l'absorbance à 395 nm ne fait qu'augmenter et correspond au retour à l'état Fe^{III} final de la protéine (spectre rouge).

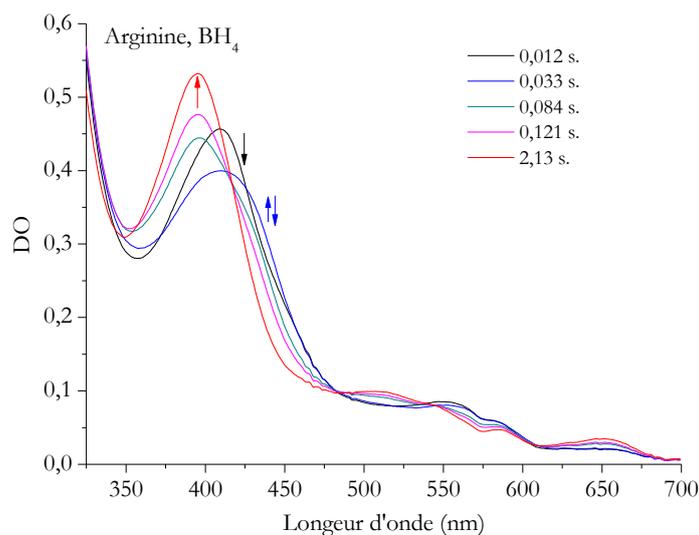


Figure 75 : Sélection de spectres obtenus par *stopped-flow* avec la protéine iNOSoxy en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄. Les spectres des espèces Fe^{II} et Fe^{III} sont représentés respectivement en noir, et rouge. Le spectre contenant l'épaulement à 430 nm (espèce Fe^{II}O₂) est représenté en bleu.

On considère qu'à 428 nm la contribution spectrale est majoritairement due à l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Les traces cinétiques sont extraites à cette longueur d'onde et les cinétiques de formation et de disparition sont simulées par des fonctions bi-exponentielles par le logiciel Origin 8.0. Ces vitesses ont également été déterminées par une analyse globale matricielle avec le logiciel Specfit/32 v3.0 37 (Spectrum associates, USA). Les résultats obtenus entre les deux modes de simulation sont similaires. Pour cette raison, seuls sont présentés dans cette partie les résultats obtenus par la simulation bi-exponentielle de l'absorbance à 428 nm selon le modèle indiqué en [Figure 76](#).



[Figure 76](#) : Modèle cinétique proposé en présence d'arginine ou d'analogues alkylguanidines.

Ainsi la vitesse de formation du complexe (k_1) est supérieure à 50 s^{-1} en présence des cofacteurs BH_2 et BH_4 alors que sa vitesse de disparition est mesurée respectivement à $0,2 \text{ s}^{-1}$ et 19 s^{-1} en cohérence avec les résultats indiqués dans la littérature (obtenus par simulation avec le logiciel Specfit [122, 131]).

En présence des arylguanidines et du cofacteur inactif BH_2 :

De la même façon, les analyses de cinétique rapides sont réalisées avec les analogues de substrats inactifs de la famille des arylguanidines. Dans un premier temps les expériences sont réalisées avec le cofacteur BH_2 à 4°C et sur une gamme de temps allant de 12 ms à 2,20 s. La [Figure 77](#) représente la fenêtre spectrale de 350 à 525 nm enregistrée dans ces conditions et qui permet de suivre l'évolution de la formation et de la disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

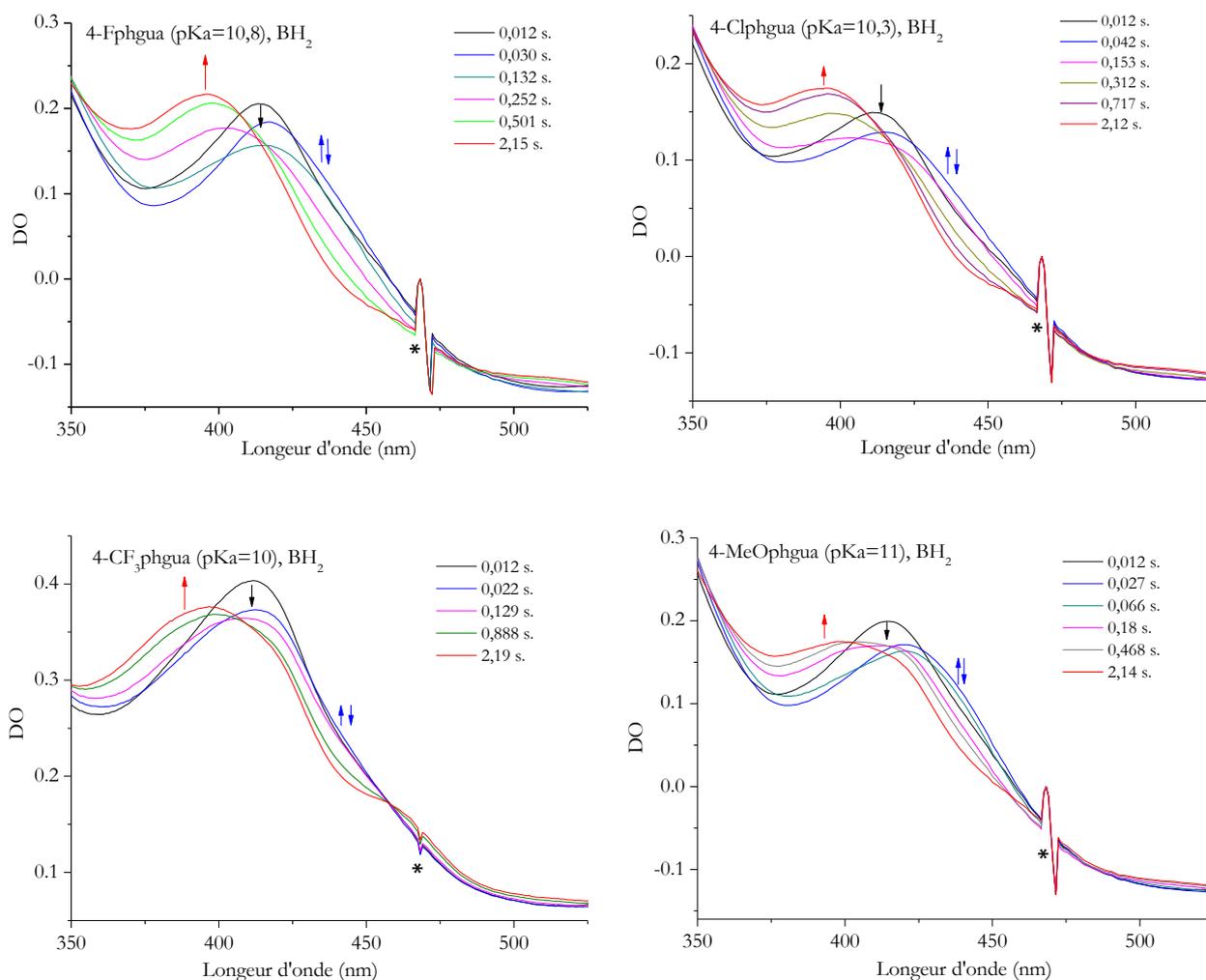


Figure 77 : Sélection de spectres obtenus par *stopped-flow* avec la protéine iNOSoxy en présence de différents analogues de type arylguanidines et du cofacteur BH₂. Les spectres des espèces Fe^{II} et Fe^{III} sont représentés respectivement en noir, et rouge. Le spectre contenant l'épaule à 430 nm (espèce Fe^{II}O₂) est représenté en bleu. (*) : artefact.

Pour tous les analogues étudiés, l'espèce initiale enregistrée à 12 ms correspond à une espèce Fe^{II} dont le maximum d'absorption est situé entre 412 et 414 nm (spectres noirs). Cette bande diminue au cours du temps et laisse place, entre 20 et 45 ms en fonction de l'analogue étudié, à un spectre ayant un épaulement vers 428 nm (spectres bleus) attribué à l'espèce Fe^{II}O₂. En effet, une étude précédente a déjà permis de simuler les spectres intermédiaires de l'espèce Fe^{II}O₂ en présence des arylguanidines et de caractériser la bande de Soret du complexe entre 425 et 428 nm en présence de BH₂ [122]. Enfin entre 20-45 ms et 2,2 s. on observe l'espèce Fe^{III} finale avec une bande de Soret située entre 396-397 nm (spectres rouges). L'espèce Fe^{III}, formée après la disparition de la bande attribuée au Fe^{II}O₂, subit une transition bas-spin → haut-spin. Dans le cas des analogues 4-MeOphgua et 4-CF₃phgua cette transition n'est pas totalement aboutie à 2,2 s et se traduit par un spectre final plus large contenant les signatures spectrales à la fois de l'espèce HS et de l'espèce BS.

L'épaulement à 428 nm représente l'accumulation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Celui-ci est moins intense dans le cas des arylguanidines que celle observée dans le cas de l'arginine en présence du cofacteur BH_2 et suggère que l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ aurait une vitesse d'autoxydation plus rapide. De plus cette vitesse semble varier d'un analogue à un autre : l'épaulement à 428 nm est très faible dans le cas de la 4- CF_3 phgua. Cette suggestion est confirmée par la détermination des vitesses de formation et de disparition du complexe par la simulation bi-exponentielle de l'augmentation puis de la diminution de l'absorbance à 428 nm. Les vitesses ainsi mesurées en présence du cofacteur BH_2 et des différents analogues sont reportées dans le Tableau 13 et sont comparées aux données obtenues précédemment à 10°C [122].

		Arg (pKa=12,5)		Pentyl- (pKa=12,6)	CF ₃ - (pKa=10)	F- (pKa=10,8)	Cl- (pKa=10,3)	MeO- (pKa=11)	
		BH ₂	BH ₄	BH ₂	BH ₂	BH ₂	BH ₂	BH ₂	BH ₂
428 nm, simulation bi-exponentielle, Origin (4°C)	k ₁	>50	>50		>50	24,2	45	>50	>50
	k ₂	0,2	19,0		9,0	6,3	5,9	11,0	16,6
Moreau <i>et al.</i> [122], analyse globale, Specfit (10°C)	k ₁	>50	>50	>50		>50	>50	>50	
	k ₂	0,2	20,5	1,9		12,0	7,3	18,9	

Tableau 13 : Cinétiques de formation et de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (en s^{-1}) en présence des analogues de substrats de type arylguanidines et en présence du cofacteur inactif BH_2 (et BH_4 dans le cas de l'arginine et de la 4-MeOphgua). Comparaison aux données rapportées dans la littérature.

Les vitesses de formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (k_1) sont extrêmement rapides et dans la plupart des cas, elles sont estimées à une valeur supérieure 50 s^{-1} . Dans le cas de la 4-Fphgua et de la 4-Clphgua les vitesses observées sont respectivement de 24,4 et 45 s^{-1} . Le ralentissement de la formation du complexe par rapport à celle rapportée dans la littérature est probablement lié à nos conditions de température plus basse. Les vitesses de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (k_2) sont également ralenties à 4°C. Cependant nous pouvons classer les analogues dans le même ordre que celui observé à 10 °C. La vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est la plus rapide pour l'analogue 4-MeOphgua (Famille 3 des analogues) et diminue ensuite dans l'ordre 4- CF_3 phgua > 4-Fphgua > 4-Clphgua (Famille 2 des analogues).

La vitesse d'autoxydation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence d'arginine est lente (0,2 s^{-1}) et similaire aux vitesses déjà publié [131]. Cette vitesse est environ 10 fois plus rapide en présence de composés de type alkylguanidines (1,9 s^{-1} dans le cas de la pentylgua (Famille 1 des analogues), Tableau 13, [122, 228]). La déstabilisation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est encore accrue en présence des arylguanidines étudiées pour lesquelles la vitesse d'autoxydation peut être multipliée par 50. Ces résultats rejoignent ceux rapportés précédemment [122, 228].

Ainsi, la protéine iNOSoxy est capable de fixer le dioxygène quelle que soit la molécule présente au site actif et la vitesse de fixation de l'oxygène ne semble pas être significativement modifiée par la nature du composé présent dans la cavité du substrat. En revanche la vitesse d'autoxydation est très sensible à l'environnement de la poche héminique. La stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ décroît avec l'abaissement du pKa du guanidinium : Famille 1 > Famille 2 > Famille 3. La molécule d'eau (déplacée par les guanidines à faibles pKa) favorise donc la stabilité de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

En présence des arylguanidines et du cofacteur compétent BH_4 :

Les mêmes séquences de mélange sont réalisées en présence des mêmes analogues arylguanidines et du cofacteur BH_4 . Le transfert d'électron provenant du cofacteur BH_4 doit alors provoquer une accélération de la vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Les résultats enregistrés dans ces conditions sont représentés sur la [Figure 78](#). Comme ce qui a été observé précédemment en présence de BH_2 , l'espèce initiale est un état Fe^{II} avec un spectre ayant un maximum d'absorption à 412-415 nm (spectres noirs) pour tous les analogues étudiés. Au cours du temps, l'absorbance à 412-415 nm diminue et l'absorbance à 395 nm augmente sans que l'épaule à 430 nm (spectre bleu) ne soit observé dans le cas des analogues appartenant à la famille 2 (4-Fphgua, 4- CF_3 phgua et 4-Clphgua).

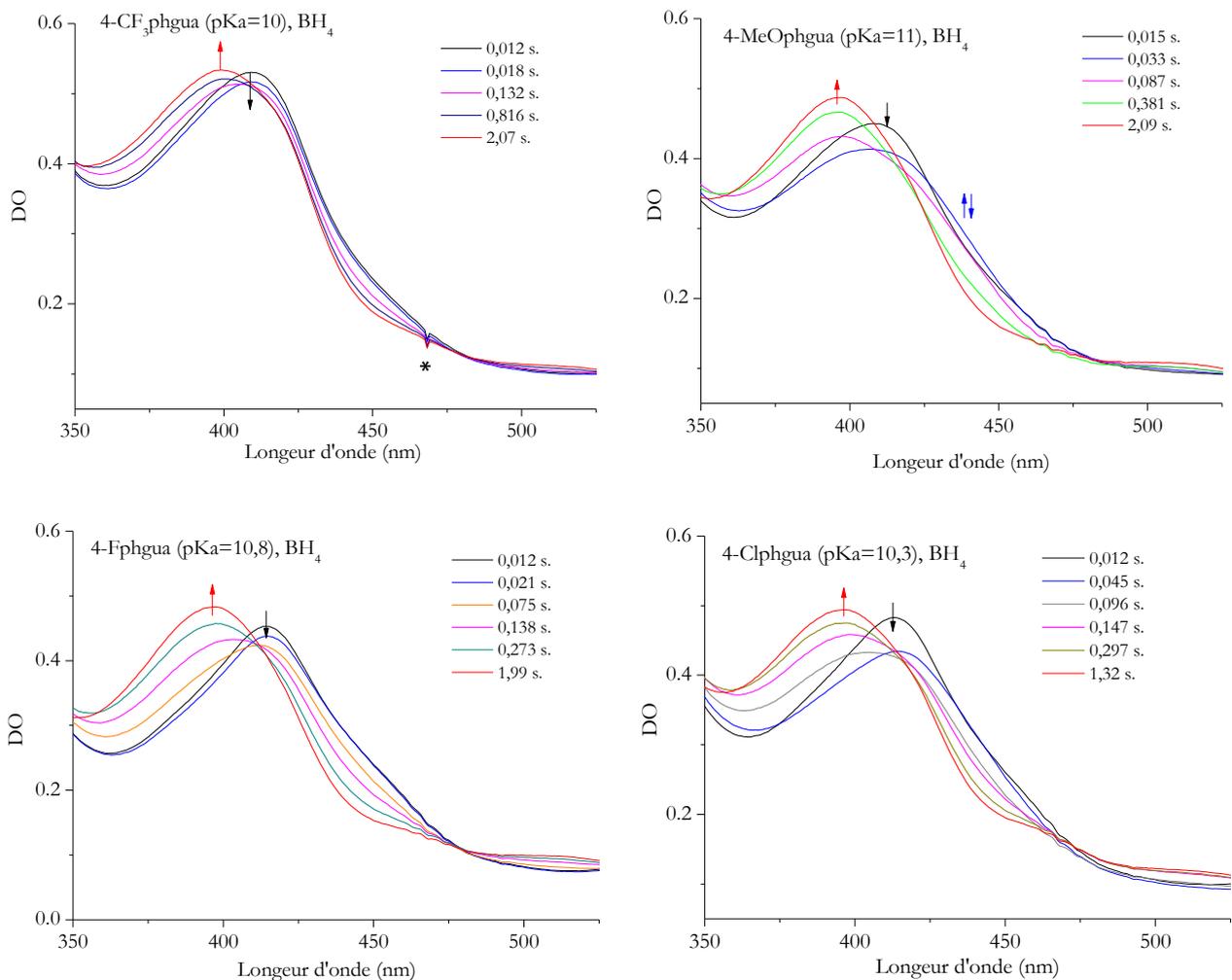


Figure 78 : Sélection de spectres obtenus par *stopped-flow* avec la protéine iNOSoxy en présence de différents analogues de substrat type arylguanidines et du cofacteur BH₄. Les spectres des espèces Fe^{II} et Fe^{III} sont représentées respectivement en noir, et rouge. (*) : artefact.

Dans le cas de l'analogue arylguanidine de la famille 3 (le 4-MeOphgua) l'épaulement à 430 nm est enregistré pour un temps de 33 ms. Pour cet analogue la vitesse de formation et de disparition de l'espèce Fe^{II}O₂ est calculée par la simulation bi-exponentielle de l'absorbance à 428 nm et reportée dans le Tableau 13. Elle est comparée à celles obtenues avec le cofacteur BH₂ et à celles obtenus avec l'arginine.

En présence du substrat arginine, la vitesse d'autoxydation de l'espèce Fe^{II}O₂ (en présence du cofacteur BH₂) est de 0,2 s⁻¹. La vitesse d'activation de cette espèce Fe^{II}O₂ par le cofacteur BH₄ est très élevée et correspond à une vitesse environ 100 fois plus rapide que celle de l'autoxydation du complexe Fe^{II}O₂. Ceci permet de limiter les processus de découplage et la formation de superoxyde. Dans le cas de la 4-MeOphgua la différence entre la vitesse d'autoxydation et vitesse d'activation du dioxygène est très significativement plus faible (×1,5). En outre, les complexes Fe^{II}CO des analogues

de la famille 3 indiquent que le réseau de liaisons H est semblable à celui de la protéine sans substrat. Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est observé au cours de nos expériences mais, probablement, il ne se produit que des réactions de découplage [122, 226].

Dans le cas des analogues de la famille 2 (4-Fphgua, 4- CF_3 phgua et 4-Clphgua), le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ indique que le réseau de liaisons H est semblable à celui observé avec le substrat NOHA. Pour ces analogues, aucune activité de synthèse de NO n'a été mesurée au cours des précédentes études [122, 226] et nos expériences ne permettent pas de mettre en évidence la formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence du cofacteur BH_4 . Cela pourrait être dû à un transfert d'électron extrêmement rapide de la part de la ptérine et l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ ne pourrait pas être accumulée. Comme la vitesse de fixation du dioxygène est supérieure à 50 s^{-1} , l'absence d'accumulation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ indique une vitesse de disparition supérieure à 50 s^{-1} . Ainsi il a été proposé la formation rapide d'une autre espèce intermédiaire non détectée par spectroscopie UV-visible. La transition entre cette espèce et l'état Fe^{III} serait l'étape limitante de la réaction (Figure 79).



Figure 79 : Modèle cinétique proposé en présence des analogues de substrat de type arylguanidines.

Le Tableau 14 rassemble les constantes de vitesses k_2 calculées par la simulation mono-exponentielle de l'absorbance à 395 nm. Elles correspondent à la vitesse de formation de l'espèce finale Fe^{III} .

		BH_4		
		CF_3^-	F-	Cl-
428 nm, simulation bi-exponentielle, Origin (4°C)	k_2	18,4	7,1	8,9
Moreau <i>et al.</i> [122], analyse globale, Specfit (10°C)	k_2		9,0	12,3

Tableau 14 : Cinétiques de formation de l'espèce Fe^{III} (en s^{-1}) pour différents analogues de substrats de type arylguanidines en présence du cofacteur BH_4 . Comparaison aux données rapportées dans la littérature.

Les vitesses varient entre 7,1 et 18,4 s^{-1} selon le composé étudié. Comme les arylguanidines aboutissent essentiellement à la formation d'espèces réactives de l'oxygène [122, 226] il a été proposé que l'espèce intermédiaire soit un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{HOOH}$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ [122].

Conclusion :

Dans le cas du substrat arginine, nous mesurons des vitesses de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ 100 fois plus rapide qu'en présence du cofacteur BH_2 et cela confirme les données rapportées dans la littérature. Dans le cas arylguanidine appartenant à la famille 3 (la 4-MeOphgua), la vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est accélérée que de 1,5 fois en présence du cofacteur BH_4 et l'activité associée à cette accélération ne correspond qu'à des réactions de découplage [122, 226]. En outre l'étude du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ classe cet analogue de manière semblable aux complexes obtenus sans substrats.

Le pKa des arylguanidines classées dans la famille 2 (4-Fphgua, 4- CF_3 phgua et 4-Clphgua) est plus faible par rapport à celui de l'arginine. Cela confère au proton du guanidinium un caractère plus acide et modifie le réseau de liaisons H de telle manière que la molécule d'eau n'interagit presque plus avec le ligand fixé sur le fer. En conséquence, nous observons en présence du cofacteur BH_2 , des vitesses d'autoxydation très élevées pour le complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. **En présence du cofacteur BH_4 , le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ n'est pas observé et les analyses cinétiques suggèrent l'existence d'un nouvel intermédiaire.**

2.3. Etudes des propriétés électroniques de la liaison O-O

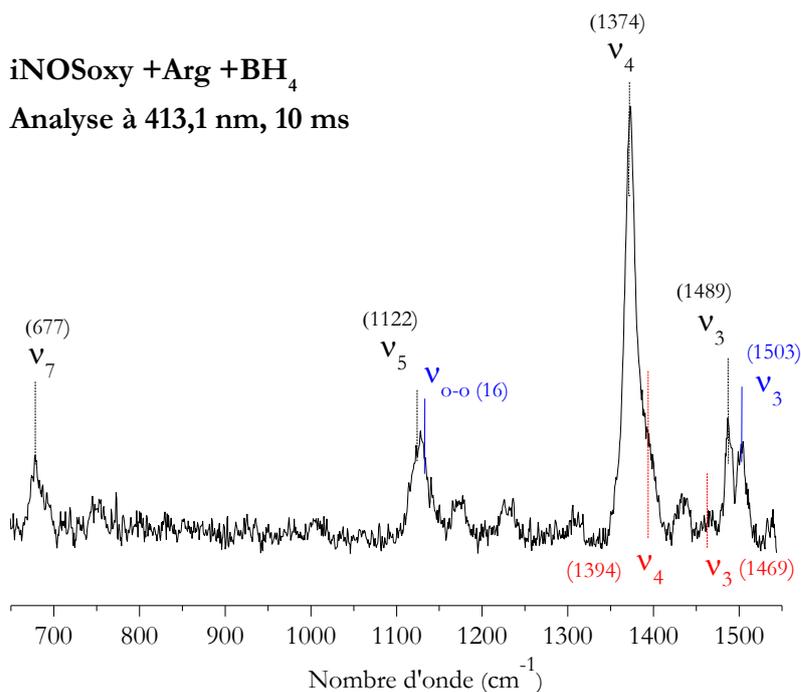
Les analyses en flux continu permettent d'enregistrer des spectres Raman de résonance avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. Ces enregistrements à des temps très courts pourraient permettre soit de caractériser les modes vibrationnels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ que l'on cherche à étudier en présence des différents analogues de substrat soit, éventuellement, de discriminer de nouvelles espèces qui n'avaient pas pu être caractérisées par spectroscopie UV-visible au cours des expériences de *stopped-flow*. Ces analyses nécessitent un montage complexe constitué d'un mélangeur en « T » : les solutions de protéine iNOSoxy dans un état réduit d'un côté et de tampon saturé en dioxygène de l'autre sont poussées en continu dans un capillaire. Le mélange a lieu dans le capillaire et le dioxygène se fixe sur l'espèce Fe^{II} . Les temps de réaction correspondent à une distance sur le capillaire (voir Chapitre 2, 5.3.). Le laser est donc focalisé à un endroit très précis du capillaire qui correspondra aux temps de réaction que l'on cherche à détecter. Les mesures ont été effectuées au sein du laboratoire de biochimie et microbiologie de l'Université de Laval (Québec) en collaboration avec le professeur Manon Couture. Les analyses spectroscopiques vont ainsi permettre de caractériser directement les modes vibrationnels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ que nous pourrons comparer à ceux obtenus avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$. Nous avons d'abord effectué la mesure en présence du substrat arginine puis avec un analogue alkylguanidine de la famille 1 (la pentylgua). Enfin nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux analyses réalisées avec une

arylguanidine de la famille 2 (4-Fphgua) pour laquelle nous pourrions observer l'espèce qui n'avait pas pu être caractérisée par spectroscopie UV-visible en *stopped-flow*.

En présence du substrat naturel arginine et du cofacteur BH_4 :

Afin d'observer et de caractériser les modes vibrationnels de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, il faut réaliser les enregistrements à un temps proche du maximum de formation de cette espèce. Les expériences de *stopped flow* permettent d'estimer un maximum de formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ aux environs de 30 ms à 4°C dans le cas de l'arginine et en présence du cofacteur BH_4 . Cependant, le montage expérimental pour les expériences en flux continu ne dispose pas de régulateur de température et les analyses sont toutes réalisées à température ambiante (entre 20 et 25°C). En raison de la température 5 à 6 fois supérieure par rapport aux conditions d'analyse en *stopped-flow*, nous estimons que le temps optimal d'accumulation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ doit se situer aux environs de 10 ms. Ainsi, le laser est focalisé de manière à détecter les espèces formées à 10 ms (voir Chapitre 2, 5.3.).

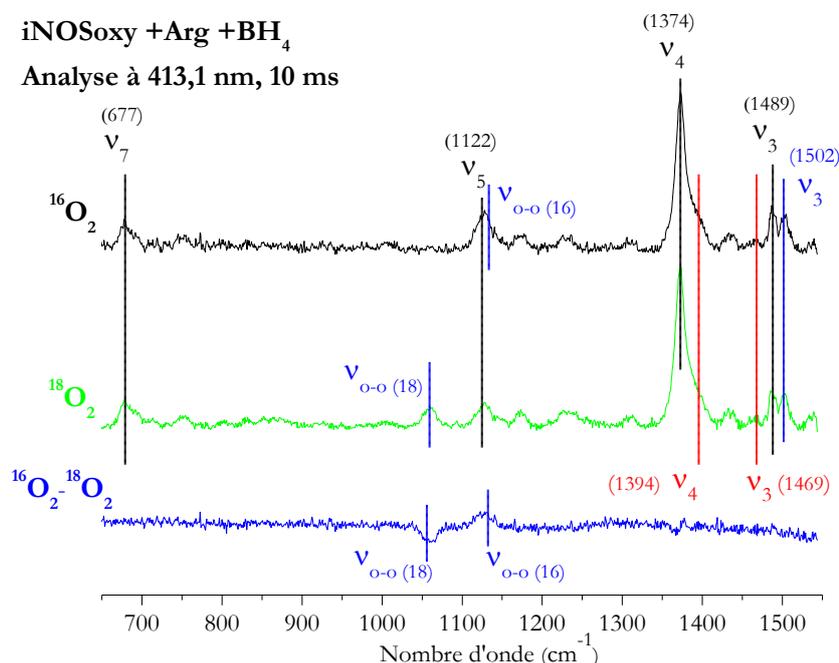
La [Figure 80](#) représente le spectre Raman de résonance accumulé à 413,1 nm au temps $t=10$ ms de la réaction d'oxydation de l'arginine en présence du cofacteur BH_4 .



[Figure 80](#) : Spectres Raman de résonance (laser à 413,1 nm) de la protéine iNOSoxy en présence du substrat arginine et du cofacteur BH_4 après 10 ms de réaction avec un tampon saturé en dioxygène 16. Les modes vibrationnels de l'espèce Fe^{III} sont marqués en noir, ceux de l'espèce Fe^{II} en rouge et ceux de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en bleu.

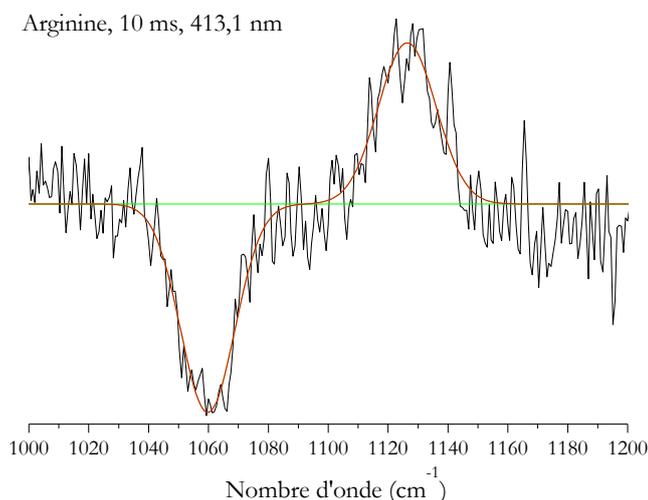
Le spectre rend compte d'un mélange d'espèces. De manière très mineure, nous pouvons observer les modes ν_4 (1394 cm^{-1}) et ν_3 (1469 cm^{-1}) caractéristiques de l'espèce Fe^{II} de départ (en

rouge sur la [Figure 80](#)). Nous observons également les modes vibrationnels ν_7 (677 cm^{-1}), ν_5 (1122 cm^{-1}), ν_4 (1374 cm^{-1}) et ν_3 (1489 cm^{-1}) caractéristiques d'une espèce ferrique (en noir sur la [Figure 80](#)). Ainsi, à 10 ms presque la totalité de l'espèce Fe^{II} a réagit et forme une espèce dont la signature spectrale est typique d'une espèce ferrique. Cette signature spectrale peut être attribuée au mélange de l'espèce Fe^{III} finale et de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ qui, elle aussi, a des modes vibrationnels proche d'une espèce ferrique (en noir sur la [Figure 80](#)). En revanche, le mode vibrationnel ν_3 permet de différencier plus spécifiquement les deux espèces présentes dans l'échantillon. La bande à 1489 cm^{-1} est caractéristique de l'espèce Fe^{III} HS finale alors que la bande observée à 1502 cm^{-1} peut être attribuée au mode vibrationnel ν_3 de la porphyrine du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (en bleu sur la [Figure 80](#)) comme précédemment décrit dans la littérature avec saNOS [159], nNOSoxy [118] et le cytochrome P450. Enfin, le mode vibrationnel $\nu_{\text{O-O}(16)}$ est attendu aux alentours de 1125 cm^{-1} ([161], voir Annexe 4) mais il se trouve dans la mêmes zone de fréquence que la résonance du mode ν_5 (1122 cm^{-1}) de la porphyrine ce qui rend sa caractérisation compliquée. Pour cette raison, la même séquence de mélange est réalisée entre une solution iNOSoxy à l'état Fe^{II} et un tampon saturé en dioxygène $^{18}\text{O}_2$. La variation de masse due au marquage isotopique déplace la fréquence du mode d'élongation O-O aux environs de 1060 cm^{-1} ([Figure 81](#), spectre vert).



[Figure 81](#) : Spectres Raman de résonance (enregistrés à 413,1 nm) de la protéine iNOSoxy en présence du substrat arginine et du cofacteur BH_4 après 10 ms de réaction avec un tampon saturé en dioxygène $^{16}\text{O}_2$ (en noir) ou dioxygène $^{18}\text{O}_2$ (en vert). La différence entre les spectres $^{16}\text{O}_2$ et $^{18}\text{O}_2$ est représentée en bleu. Les modes vibrationnels de l'espèce Fe^{III} sont marqués en noir, ceux de l'espèce Fe^{II} en rouge et ceux de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en bleu.

La différence entre les spectres obtenus avec le dioxygène 16 et le dioxygène 18 permet d'isoler spécifiquement les signaux $\nu_{\text{O-O}}(^{16}\text{O})$ (positif sur le spectre bleu, [Figure 81](#)) et $\nu_{\text{O-O}}(^{18}\text{O})$ (négatif sur le spectre bleu, [Figure 81](#)). La simulation de ces signatures spectrales par une double gaussienne ([Figure 82](#)) nous permet de déterminer les valeurs exactes des modes $\nu_{\text{O-O}}(^{16}\text{O})$ et $\nu_{\text{O-O}}(^{18}\text{O})$ à 1127 cm^{-1} et 1060 cm^{-1} respectivement comme décrits dans la littérature [161].



[Figure 82](#) : Différence entre les spectres obtenus avec $^{16}\text{O}_2$ et $^{18}\text{O}_2$ et simulation des modes $\nu_{\text{O-O}}(^{16}\text{O})$ et $\nu_{\text{O-O}}(^{18}\text{O})$ (en rouge). Laser : 413,1 nm. Protéine : iNOSoxy en présence du substrat arginine et du cofacteur BH_4 . Temps analysé : 10 ms.

Les analyses à 441,6 nm permettent également de caractériser les modes vibrationnels de la liaison O-O mais ne permettent pas d'exalter d'autres espèces que celles observées à 413,1 nm. Ainsi nous caractérisons, à 10 ms, une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ mais aucune autre espèce de type $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^\cdot$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ ou cpI pendant l'étape d'oxydation de l'arginine.

En présence d'une alkylguanidine et du cofacteur naturel BH_4 :

Les mêmes séquences de mélange sont réalisées avec le dioxygène 16 puis le dioxygène 18 en présence du substrat pentylgua qui appartient à la famille 1 des analogues et aurait des caractéristiques proches du substrat arginine. A 10 ms nous détectons encore un mélange d'espèces. D'un côté nous caractérisons l'espèce oxydée de type ferrique : ν_7 (677 cm^{-1}), ν_5 (1122 cm^{-1}), ν_4 (1374 cm^{-1} et 1429 cm^{-1}) et ν_3 (1487 cm^{-1}) et de l'autre nous pouvons attribuer facilement le mode vibrationnel ν_3 de la porphyrine du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ à 1503 cm^{-1} .

La différence entre le spectre obtenu avec le dioxygène 16 et celui obtenu avec le dioxygène 18 ([Figure 83](#)) permet de caractériser les modes $\nu_{\text{O-O}}$ du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence de la

pentylgua. Nous déterminons ainsi des fréquences à 1131 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-O}(16)}$) et 1062 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-O}(18)}$) qui ont des valeurs légèrement supérieures à celles obtenues avec l'arginine.

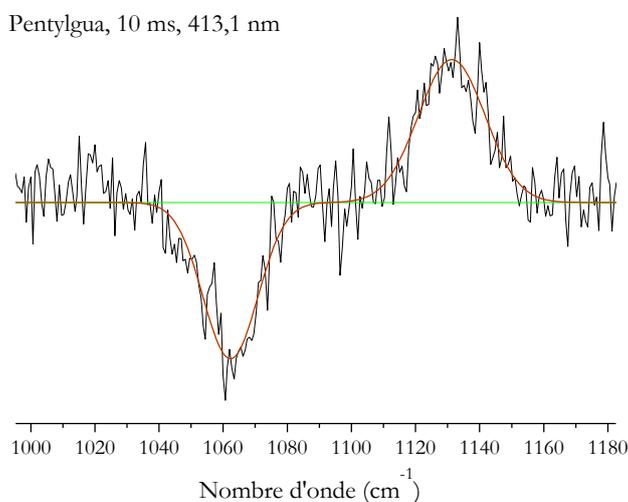


Figure 83 : Différence entre les spectres obtenus avec $^{16}\text{O}_2$ et $^{18}\text{O}_2$ et simulation des modes $\nu_{\text{O-O}(16)}$ et $\nu_{\text{O-O}(18)}$ (en rouge). Laser : 413,1 nm. Protéine : iNOSoxy en présence du substrat pentylgua et du cofacteur BH_4 . Temps analysé : 10 ms.

Les mêmes analyses ont été réalisées à une longueur d'onde d'exaltation de 441,6 nm et à trois temps d'analyse différents (4 ms, 20 ms et 40 ms). Ainsi, si une autre espèce que le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est formée en présence de la pentylgua nous pourrions peut être l'identifier à un autre temps d'analyse que 10 ms. Pour les temps de 4 et 20 ms nous caractérisons toujours une espèce ferrique et la signature spectrale de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ sans identifier de nouvelles espèces. Le signal du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ semble plus intense à 4 ms qu'à 20 ms (**Figure 84**) et nous caractérisons des modes vibrationnels de la liaison O-O similaires à ceux déterminés à 413,1 nm ($\nu_{\text{O-O}(16)} = 1130\text{-}1131\text{ cm}^{-1}$ et $\nu_{\text{O-O}(18)} = 1061\text{ cm}^{-1}$).

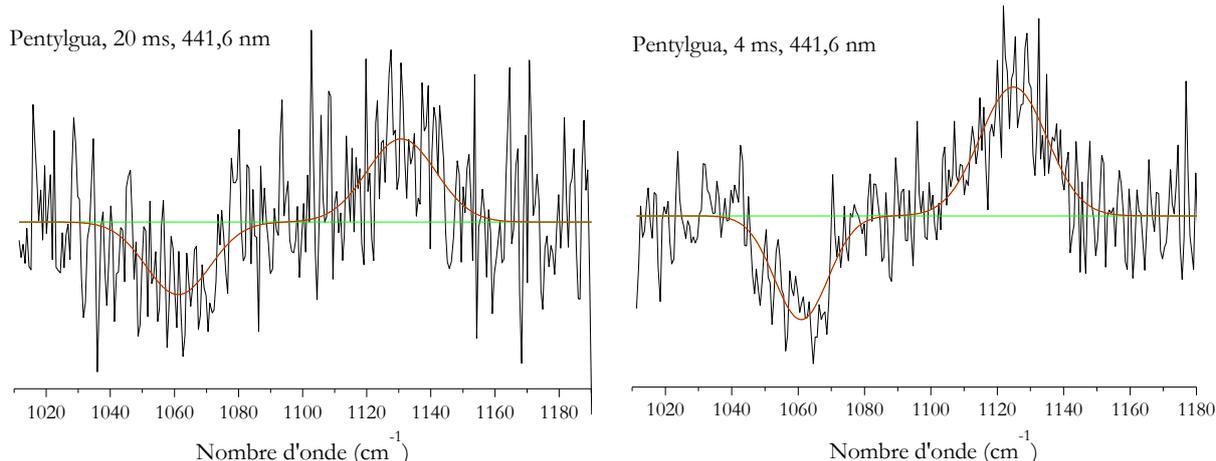


Figure 84 : Différence entre les spectres obtenus avec $^{16}\text{O}_2$ et $^{18}\text{O}_2$ et simulation des modes $\nu_{\text{O-O}}(16)$ et $\nu_{\text{O-O}}(18)$ (en rouge). Laser : 441,6 nm. Protéine : iNOSoxy en présence du substrat pentylgua et du cofacteur BH_4 . Temps analysés : 4 et 20 ms.

En revanche, à 40 ms, l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ n'est plus caractérisée et la signature spectrale correspond uniquement à une espèce Fe^{III} . Ces résultats indiquent que le temps de 10 ms est correctement choisi pour étudier l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. En effet, pour des temps supérieurs la quantité de complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ présent dans l'échantillon semble diminuer. Enfin, nous pouvons conclure que la réaction d'oxydation étudiée avec l'analogue pentylgua, tout comme l'arginine, ne permet pas de caractériser d'autres espèces oxydantes.

En présence d'une arylguanidine et du cofacteur naturel BH_4 :

Dans le cas de l'arginine et de la pentylgua, l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ était déjà caractérisée par spectroscopie UV-visible et donc, il était prévisible de l'observer également par spectroscopie Raman de résonance. Le cas des alkylguanidines de la famille 2 des analogues est particulièrement intéressant à étudier en flux continu. En présence du cofacteur BH_4 l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ n'est pas caractérisée en *stopped-flow* suggérant alors une vitesse de disparition très rapide du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et la formation d'un autre intermédiaire. Celui-ci n'est pas caractérisé par spectroscopie UV-visible. Ainsi, les analyses spectroscopiques par Raman de résonance pourraient apporter des éléments de réponse concernant la nature des espèces générées en présence des alkylguanidines.

Tout comme l'arginine à 10 ms, en présence de l'analogue 4-Fphgua, nous détectons un mélange d'espèces en excitant l'échantillon à 413,1 nm. Nous caractérisons une espèce ferrique : ν_7 (677 cm^{-1}), ν_5 (1122 cm^{-1}), ν_4 (1374 cm^{-1} et 1429 cm^{-1}) et ν_3 (1490 cm^{-1}) et une contribution ν_3 à 1505 cm^{-1} qui pourrait être attribuée à un complexe de type $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. En outre la différence entre le spectre obtenu avec le dioxygène 16 et celui obtenu avec le dioxygène 18 (**Figure 85**) permet de clairement

caractériser l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ avec des fréquences déterminées à 1130 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-O}}^{(16)}$) et 1064 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-O}}^{(18)}$) qui ont des valeurs légèrement supérieures à celles obtenues avec l'alkylguanidine.

De manière inattendue, les analyses à $441,6\text{ nm}$ ne nous permettent pas de caractériser les modes vibrationnels O-O ce qui pourrait indiquer un changement d'absorption de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence de cet analogue.

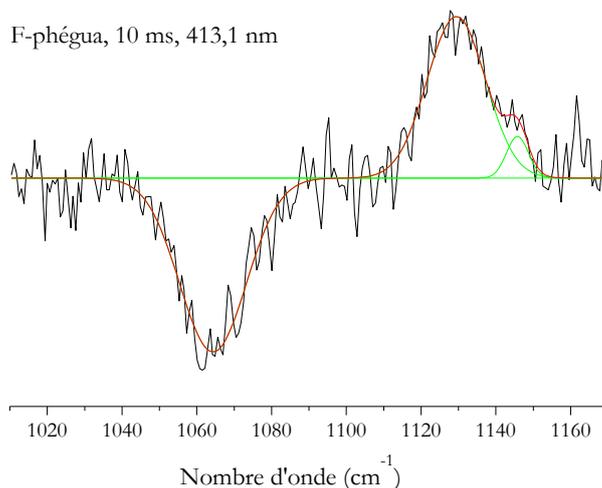


Figure 85 : Différence entre les spectres obtenus avec $^{16}\text{O}_2$ et $^{18}\text{O}_2$ et simulation des modes $\nu_{\text{O-O}}^{(16)}$ et $\nu_{\text{O-O}}^{(18)}$ (en rouge). Laser : $413,1\text{ nm}$. Protéine : iNOSoxy en présence du substrat 4-Fphgua et du cofacteur BH_4 . Temps analysé : 10 ms .

Alors qu'en *stopped-flow* l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ n'était pas détectée en présence de l'arylguanidine 4-Fphgua, la spectroscopie Raman de résonance à 10 ms met en évidence la présence d'une telle espèce sans que ne soit détecté tout autre intermédiaire. Les analyses à $441,6\text{ nm}$ ne permettent pas, non plus, de caractériser d'autres espèces telles les espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{HOOH}$ qui avaient été proposées au départ pour expliquer les cinétiques observées par *stopped-flow*.

2.4. Conclusion

Le suivi de l'absorbance à 428 nm pendant les analyses en *stopped-flow* permet d'estimer des cinétiques de formation et de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ formée pendant la réaction d'oxydation de l'arginine et d'un analogue de la famille 3 (le 4-MeOphgua). Cependant, dans le cas des arylguanidines de la famille 2, l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ n'est pas observée. Les analyses en flux continu sont complémentaires et informent plus précisément sur la nature des espèces présentes dans l'échantillon pour un temps donné de la réaction. Comme attendu, dans le cas de l'arginine et de la pentylgua, nous ne détectons pas d'autres intermédiaires que l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. En revanche, alors que

nous nous attendions à caractériser une nouvelle espèce dans le cas de la 4-Fphgua, seule l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est mise en évidence.

Nous avons pu caractériser le mode vibrationnel $\nu_{\text{O-O}}$ en présence de l'arginine, d'un analogue de la famille 1 (la pentylgua) et d'un analogue de la famille 2 (la 4-Fphgua) (Tableau 15).

	λ_{max} (nm)	Tps (ms)	$\nu_{\text{O-O}}$ (18) (cm^{-1})	$\nu_{\text{O-O}}$ (16) (cm^{-1})
arginine (pKa=12,5)	413,1	10	1060	1127
arginine	441,6	10	1060	1127
pentylgua (pKa=12,6)	413,1	10	1062	1131
pentylgua	441,6	40	-	-
pentylgua	441,6	20	1061	1131
pentylgua	441,6	4	1061	1130
4-Fphgua (pKa=10,8)	413,1	10	1064	1130
4-Fphgua	441,6	10	-	-
4-Fphgua	441,6	4	-	-
NOHA (pKa=8,1) [161]	441,6		1066	1135

Tableau 15 : Récapitulatif des modes $\nu_{\text{O-O}}$ (16) et $\nu_{\text{O-O}}$ (18) du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de la protéine iNOSoxy déterminés en présence des substrats arginine, pentylgua, 4-Fphgua, NOHA et en présence du cofacteur BH_4 .

La pentylgua fait partie de la famille 1 des analogues c'est-à-dire de la famille qui préserve un réseau de liaisons H similaire à celui observé avec le substrat arginine. Cependant, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence de la pentylgua est légèrement différent de celui observé avec l'arginine. Les modes vibrationnels $\nu_{\text{O-O}}$ sont déplacés de 1 à 4 cm^{-1} vers les hautes fréquences. Cela corrobore le résultat obtenu avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ pour lequel le mode $\nu_{\text{C-O}}$ augmente de 4 cm^{-1} [163]. Cette augmentation, caractéristique d'une diminution de la rétro-donation des électrons des orbitales d du fer vers les orbitales du ligand distal (voir partie 1.3. de ce Chapitre), pourrait être en relation avec la diminution de la liaison H établie entre le ligand O_2 et la molécule d'eau distale. Pour cet analogue, l'activité de synthèse de NO est encore observée (11 % de l'activité de l'arginine).

L'analogue 4-Fphgua fait parti des arylguanidines de la famille 2 c'est-à-dire de la famille d'analogues qui modifie le réseau de liaisons H distal de manière similaire à celui observé avec le substrat NOHA. En flux continu, nous caractérisons une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ qui n'était pas observée en *stopped-flow*. Tout comme le mode $\nu_{\text{C-O}}$ (qui augmente de 8 cm^{-1} dans le cas de cet analogue [163]), le mode $\nu_{\text{O-O}}$ (18) est déplacé de 3 cm^{-1} vers les hautes fréquences par rapport à celui observé pour la pentylgua. Cela indique que la diminution de la polarité dans l'environnement du ligand O_2 est

encore exacerbée avec la famille des arylguanidines. De manière surprenante, le mode vibrationnel de l'oxygène 16, attendue vers 1133 cm^{-1} , n'est pas modifié par rapport à celui observé pour la pentylgua (1130 cm^{-1}). Cette observation pourrait être expliquée par un couplage de « fermi » entre le mode de la bande de vibration O-O et le mode porphyrine ν_5 (à 1125 cm^{-1}) car les fréquences sont proches. Ce couplage a pour effet d'augmenter l'intensité du mode porphyrine [188]. La fréquence observée pour le mode vibrationnel O-O est alors dégénérée et décalée vers le mode ν_5 . Le mode vibrationnel O-O observé avec l'oxygène 18 est, quant à lui, plus éloigné du mode ν_5 et ne subit pas l'effet de couplage de « fermi ».

D'une manière générale, nos résultats montrent une bonne corrélation entre l'évolution des modes vibrationnels du ligand CO et du ligand O₂ en fonction de l'environnement distal et de l'intensité de la rétro-donation des électrons des orbitales d du fer vers les orbitales du ligand distal. Ainsi le caractère plus « linéaire » du complexe Fe^{II}CO ne semble pas modifier le réseau de liaisons H distal et d'une certaine manière valide l'utilisation de ce complexe comme mime du complexe Fe^{II}O₂ dans le cas des NOS et en présence des analogues de l'arginine.

L'absence de caractérisation possible du complexe Fe^{II}O₂ en *stopped-flow* dans le cas de l'analogue 4-Fphgua pourrait être lié à l'existence de la forme Oxy 1 décrite dans le cas de eNOSoxy en présence de BH₄, BH₂ et le 4-amino-BH₄ et ayant une absorbance vers 418 nm contrairement à la forme classique Oxy 2 qui absorbe entre 427 et 430 nm [116]. Cela pourrait expliquer la difficulté de caractériser cette espèce par la spectroscopie UV-visible dont la bande de Soret serait très proche alors de celle observée pour l'espèce Fe^{II}. D'autre part, cela pourrait également expliquer la difficulté d'exalter les modes vibrationnels $\nu_{\text{O-O}}$ à 441,6 nm qui serait alors une longueur d'onde très éloignée de la bande de Soret du complexe Oxy 1. Par ailleurs, l'oxydation des analogues arylguanidines de la famille 2 n'est pas réalisée [122, 226].

3. Rôle du cofacteur dans le processus de transfert d'électron et de proton

3.1. Introduction

Le cofacteur BH_4 (Figure 86) a un rôle structural important pour la dimérisation des NOS de mammifère mais aussi un rôle redox dans la première et la deuxième étape catalytique du cycle moléculaire [107, 128, 130-132, 135, 142, 149, 151, 154, 170, 171]. Il transfère un électron au complexe $Fe^{II}O_2$ et permet de former l'espèce $Fe^{III}OO\cdot$. Au cours de l'étape d'oxydation de l'arginine (Etape 1), le radical a été piégé sous la forme $BH_4^{+\cdot}$ [150] avec une densité de spin essentiellement localisée sur l'azote N^5 [149]. Les résultats suggèrent qu'il n'y aurait pas de transfert de proton de la part du cofacteur pendant l'oxydation de l'arginine.

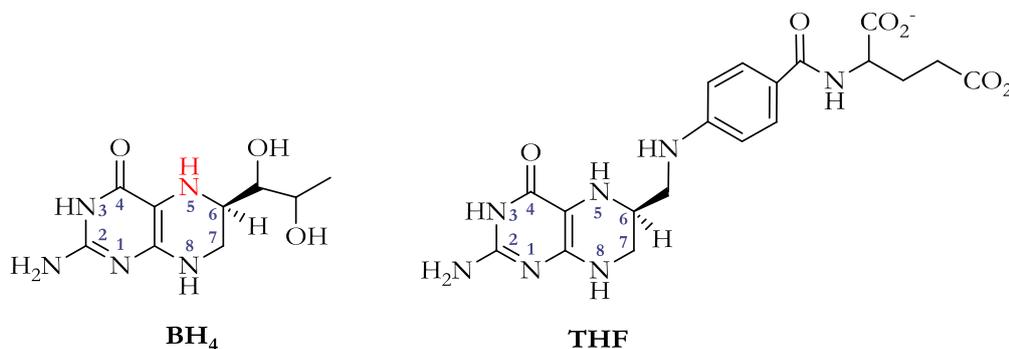


Figure 86 : Formules chimiques des cofacteurs BH_4 et THF.

Pendant l'étape d'oxydation du NOHA (Etape 2), l'activité redox de la ptérine est visiblement différente de celle observée dans l'Etape 1. Le cofacteur pourrait avoir un rôle supplémentaire « d'oxydant » en fin de cycle catalytique [171]. En plus d'activer l'oxygène au début de la réaction d'oxydation du NOHA, il participerait à la formation de l'espèce $Fe^{III}NO$ à la fin du cycle moléculaire. Mais contrairement à l'Etape 1, le rôle du cofacteur dans l'Etape 2 n'a pas été extensivement étudié. La forme radicalaire de la ptérine n'a été piégée qu'une seule fois [171]. De plus l'état de protonation du radical n'a jamais été décrit dans l'Etape 2 et le cofacteur reste potentiellement un donneur de proton.

La NOS bactérienne est un modèle courant pour l'étude du mécanisme moléculaire de la NOS de mammifère mais l'activité redox du cofacteur tant dans l'Etape 1 que dans l'Etape 2 n'a jamais été démontrée. De plus, la plupart des bactéries ne détiennent pas la machinerie nécessaire à la synthèse du cofacteur BH_4 *in vivo* [119] et le cofacteur BH_4 n'a aucun effet structural significatif sur la formation des dimères. Le THF, lui, est présent *in vivo* dans les bactéries. Il est constitué du même noyau ptérine que le BH_4 et dispose d'une chaîne latérale beaucoup plus longue (voir Figure 86). En

absence de ptérine BH₄ dans l'environnement naturel de la bactérie, il est proposé que le THF soit le cofacteur redox de la NOS bactérienne. Sa présence accélère la vitesse de disparition de l'intermédiaire Fe^{II}O₂ bien que son activité redox n'ait jamais été démontrée ni dans l'Etape 1, ni dans l'Etape 2, comme dans le cas du cofacteur BH₄.

Nous proposons dans cette partie une étude comparative de l'activité redox du BH₄ (Tableau 16). Le rôle exercé par le cofacteur dans l'Etape 1 (l'oxydation de l'arginine) est comparée à celui observé dans l'Etape 2 (l'oxydation du NOHA). Nous comparons également l'activité redox du BH₄ entre une NOS de mammifère (iNOSoxy) et une NOS bactérienne (bsNOS).

	Etape 1 (oxydation du substrat arginine)				Etape 2 (oxydation du substrat NOHA)			
	+BH ₄ /+Arg		+THF/+Arg		+BH ₄ /+NOHA		+THF/+NOHA	
Transfert	électron	proton	électron	proton	électron	proton	électron	proton
iNOSoxy	oui	non	×	×	oui	?	×	×
bsNOS	?	?	?	?	?	?	?	?

Tableau 16 : Tableau récapitulatif de l'activité du BH₄ et/ou du THF dans les deux étapes d'oxydation de la NOS bactérienne et de la NOS de mammifère et questions étudiées (?) dans cette partie de la thèse.

La réaction d'oxydation du substrat (arginine ou NOHA) a été stoppée par *freeze-quench* (voir Chapitre 2, 5.2.) et les espèces piégées ont été étudiées par spectroscopie RPE. Les résultats présentés ici correspondent, en partie, à la publication jointe en Annexe 2.

Pour la première étape, la vitesse de disparition du radical est relativement lente (Figure 87). A 10 °C, le laps de temps pendant lequel le pourcentage de radical est supérieur à 70 % de la quantité d'hème dans l'échantillon est supérieur à 400 ms (de 120 ms à 550 ms, [131]). Les temps choisis pour piéger le radical dans la première étape se situent donc dans cette marge de temps. Dans le cas de la deuxième étape, la vitesse de formation et de disparition du radical est beaucoup plus rapide [171] et le pourcentage de radical n'exécède pas 35 % de la quantité d'hème présent dans l'échantillon. Le temps choisi pour piéger le radical dans la deuxième étape se situe donc précisément au maximum de formation du radical : à 60 ms. Il a également été piégé à des temps plus court et l'évolution du radical a ensuite été suivie avec des étapes de sauts en température.

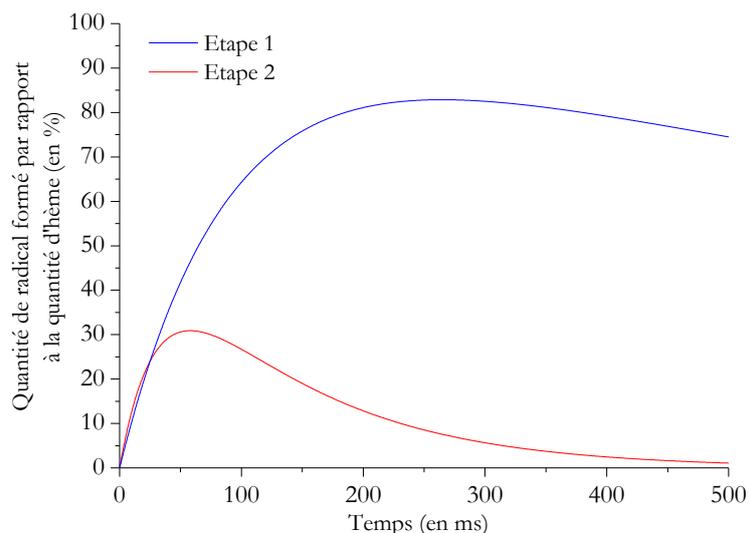


Figure 87 : Cinétiques de formation et de disparition théoriques du radical BH_4 pendant l'étape d'oxydation de l'arginine (bleu) et l'étape d'oxydation du NOHA (rouge) [171].

Pour bsNOS, ne disposant pas d'information quant au rôle redox du BH_4 ou du THF dans la littérature, une large gamme de temps a été testée pour les deux étapes du cycle catalytique.

Nous avons pu piéger la forme radicalaire du cofacteur dans l'étape d'oxydation de l'arginine avec iNOSoxy et nous avons ensuite comparé nos résultats à ceux obtenus dans la littérature. Les rôles redox de BH_4 et THF ont ensuite été étudiés dans l'Etape 1 de bsNOS et nous les avons comparés à celui observé avec iNOSoxy. Nous avons également étudié le rôle du cofacteur pendant d'oxydation du NOHA. Dans le cas de iNOSoxy nous avons comparé l'état de protonation du radical à celui obtenu dans l'Etape 1. Nous verrons que les résultats obtenus avec l'Etape 2 de bsNOS sont surprenants et illustrent bien l'intérêt des études comparatives et la nécessité d'approfondir le mécanisme moléculaire et la fonction biologique des NOS bactériennes.

3.2. Rôle du cofacteur BH_4 dans l'étape d'oxydation de l'arginine par la NO-Synthase inducible

Pour piéger le radical formé lors de l'Etape 1, nous avons déclenché la réaction d'oxydation de l'arginine en mélangeant la protéine iNOSoxy à l'état Fe^{II} et en présence du cofacteur BH_4 avec un tampon saturé en dioxygène. Des temps de piégeage supérieurs à 120 ms ont été choisis afin d'obtenir un maximum de formation du radical [131].

Etude de l'espèce héminique :

Les espèces piégées à 120 ms et 170 ms sont analysées par spectroscopie RPE en bande X et sont présentées en [Figure 88](#).

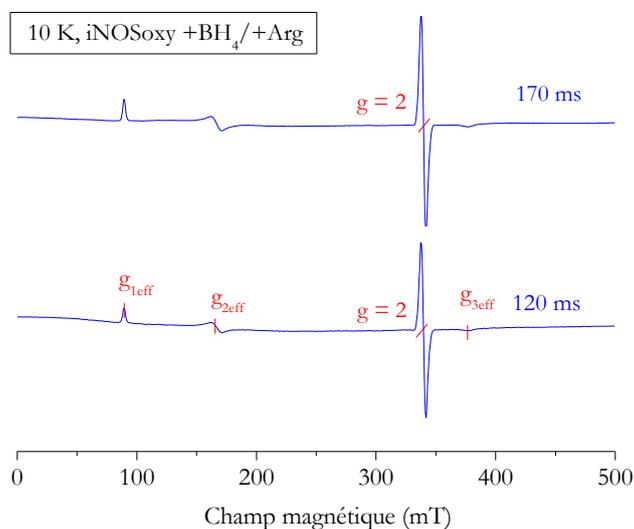


Figure 88 : Spectres RPE en bande X des espèces piégées après 120 ms et 170 ms de temps de réaction dans la première étape de iNOSoxy (en présence d'arginine et de BH₄).

Les signatures spectrales obtenues à 120 ms et 170 ms sont composées de deux signaux. Le premier est un signal caractéristique de l'espèce Fe^{III} HS rhombique avec trois valeurs de g_{eff} . Le second signal se trouve à $g=2$ et traduit la présence d'un radical organique dans l'échantillon. La présence de l'espèce Fe^{III} indique qu'il y a bien eu une réaction d'oxydation de l'espèce Fe^{II} de départ lors du mélange avec le tampon oxygéné. Les valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} piégée à 120 ms ou 170 ms permettent de déterminer la nature du substrat présent dans la cavité [205] par comparaison avec des échantillons de référence ([Tableau 17](#)). L'espèce Fe^{III} piégée est caractérisée par les valeurs $g_{1\text{eff}}=7,63$, $g_{2\text{eff}}=4,05$ et $g_{3\text{eff}}=1,80$ ($g_{1\text{eff}}$ représenté en bleu sur la [Figure 89](#)). Ces valeurs se rapprochent le plus d'une espèce Fe^{III} en présence du substrat NOHA dans la cavité ($g_{1\text{eff}}=7,66$, $g_{2\text{eff}}=4,04$ et $g_{3\text{eff}}=1,80$, $g_{1\text{eff}}$ représenté en noir sur la [Figure 89](#)).

Fe ^{III} HS, iNOSoxy, oxydation de l'arginine	$g_{1\text{eff}}$	$g_{2\text{eff}}$	$g_{3\text{eff}}$	E/D
piégé à 120 ms et 170 ms	7,63	4,05	1,80	0,076
+BH ₄	7,68	3,98	1,79	0,079
+Arg +BH ₄	7,57	4,13	1,81	0,073
+NOHA +BH ₄	7,66	4,04	1,80	0,078

Tableau 17 : Valeurs de g_{eff} et de E/D de l'espèce Fe^{III} piégée à 120 ms et à 170 ms et comparaison à des échantillons de référence.

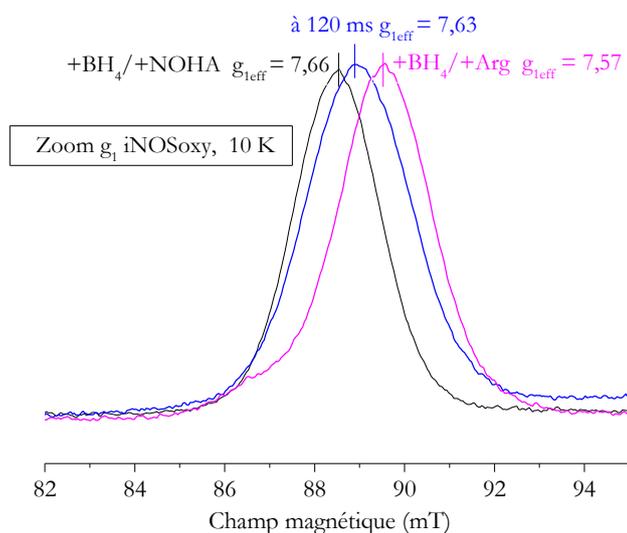


Figure 89 : Zone à $g_{1\text{eff}}$ du signal RPE du Fe^{III} HS piégé à 120 ms pendant l'oxydation de l'arginine (en bleu). Comparaison aux échantillons de références ayant comme substrat le NOHA (en noir) et l'arginine (en rose).

La largeur de la raie $g_{1\text{eff}}$ de l'espèce Fe^{III} HS piégée à 120 ms peut être expliquée par la présence d'un mélange d'espèces dans l'échantillon obtenu par *freeze-quench*. Une fraction de la protéine pourrait encore contenir l'arginine dans la cavité ($g_{1\text{eff}}=7,57$ $g_{2\text{eff}}=4,13$ et $g_{3\text{eff}}=1,81$, $g_{1\text{eff}}$ représenté en rose sur la **Figure 89**). Cela correspondrait à une proportion de protéine qui ne réagirait pas dans nos conditions expérimentales. La largeur de raie pourrait être également attribuée à un mélange de conformations du substrat NOHA dans la cavité : le complexe Fe^{III} HS en présence du substrat NOHA généré à température ambiante puis congelé ($g_{1\text{eff}}=7,66$) pourrait adopter une conformation différente de celle générée par la protéine pendant l'oxydation de l'arginine ($g_{1\text{eff}}=7,63$). **Cependant, la présence de NOHA de manière majoritaire dans la cavité du substrat indique que la réaction d'oxydation de l'arginine a bien eu lieu.**

Quantification du radical piégé à 170 ms :

Nous avons quantifié le radical piégé à 170 ms. La quantification de spin se fait par double intégration du signal à 70 K et est comparée à celle obtenue avec une gamme de concentrations de sulfate de cuivre pour laquelle les spectres RPE sont enregistrés dans les mêmes conditions (non saturantes) que le radical. Nous déterminons ainsi la concentration du radical piégé à 190 μM à 170 ms. **La concentration en radical correspond à 84 % de l'hème présent dans l'échantillon** (concentration de l'hème aux environs de 225 μM pour cet échantillon). Ce résultat confirme celui obtenu par Wei *et al.* [131, 171] qui ont estimé un maximum de formation du radical aux alentours de 75-80 % de la quantité d'hème présent dans l'échantillon.

Caractérisation du radical :

Les signatures spectrales du radical obtenues par spectroscopie RPE en bande X et enregistrées à 10 K et 70 K (Figure 90, spectres bleus) sont identiques à celles décrites dans la littérature pour le radical ptérine [129, 131, 135, 149, 151, 155, 168] et récemment attribuées plus précisément à l'espèce protonée BH_4^{+} [150].

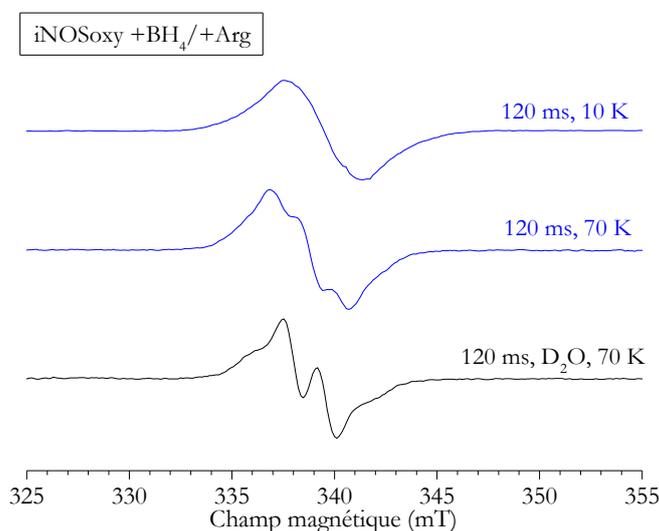


Figure 90 : Spectres RPE en bande X du radical piégé à 120 ms dans un solvant H_2O (spectres bleus) ou un solvant D_2O (spectre noir). Comparaison de l'enregistrement à 10 K et à 70 K.

Les raies du spectre RPE obtenu à basse température sont élargies, ce qui corrobore les données publiées précédemment [129, 131, 135, 149, 151, 155, 168]. Cet élargissement est dû au couplage dipolaire entre le radical et l'espèce Fe^{III} HS située à une distance de 13,6 Å de l'azote N^5 [150]. A plus haute température, la relaxation de spin de l'espèce Fe^{III} est beaucoup plus rapide et cela moyenne l'effet du couplage dipolaire sur l'espèce radicalaire. L'affinement des raies du spectre du radical obtenu avec un solvant D_2O (Figure 90 spectre noir) est dû principalement à l'échange du proton avec un atome de deutérium [149].

Le couplage hyperfin entre le radical et l'azote situé en N^5 a une valeur $A_{zz}=63$ MHz. Les calculs DFT effectués par Stoll *et al.* indiquent que le couplage hyperfin aurait une valeur de 72 MHz si l'azote N^5 n'était pas protoné. **La convergence de nos données avec celles déjà décrites et analysées précédemment [150] confirme que nous caractérisons un radical BH_4^{+} dont la densité de spin est essentiellement localisée sur N^5 [149].**

L'anisotropie de g des radicaux organiques est très faible mais peut être résolue par la spectroscopie RPE à haut champ (voir Chapitre 2, 4.4.). Nous avons comparé le radical piégé pendant l'Etape 1 (l'oxydation de l'arginine) (Figure 91, spectre bleu) avec un radical ptérine obtenu par oxydation chimique en solution (BH_4 oxydé par le peroxyde d'hydrogène dans un solvant

CF₃COOH:MeOH (6:1)) (Figure 91, spectre noir). On peut noter que les raies sont mieux résolues dans le cas du radical généré chimiquement du fait de l'absence d'hème à proximité et donc d'interactions magnétiques.

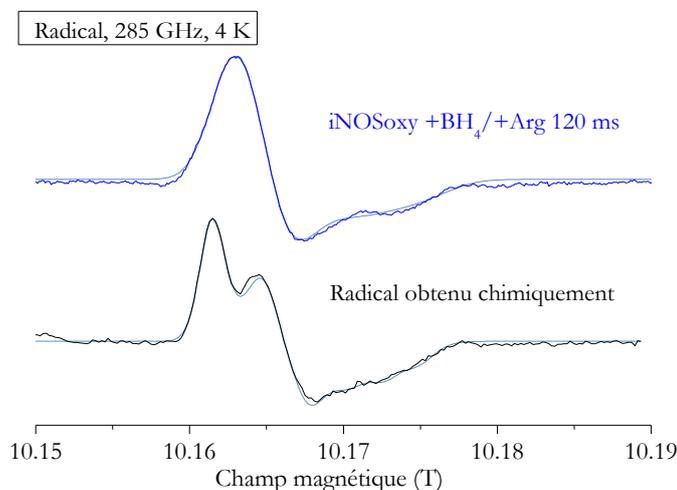


Figure 91 : Spectres RPE à haut champ du radical piégé à 120 ms (en bleu) et du radical généré chimiquement (en noir) ainsi que leurs simulations.

Les spectres obtenus à haut champ ont été simulés avec les paramètres indiqués dans le Tableau 18. La similitude des valeurs de g du radical dans l'enzyme avec le radical ptérine généré par voie chimique confirme que nous avons piégé un radical ptérine dans iNOSoxy pendant l'oxydation de l'arginine. Nous déterminons ainsi les valeurs de g du radical piégé : $g_1=2,0043$ $g_2=2,0038$ $g_3=2,0021$.

Radical BH ₄ , iNOSoxy, oxydation de l'arginine	g_1 (g_1 strain)	g_2 (g_2 strain)	g_3 (g_3 strain)	A_{zz} (N) en MHz
radical piégé à 120 ms	2,0043 (0,00003)	2,0038 (0,00018)	2,0021 (0,00012)	63
BH ₄ oxydé chimiquement	2,0045	2,0036	2,0022	61
radical piégé à 125 ms [150]	2,0043	2,0035	2,0021	63

Tableau 18 : Valeurs de g du radical piégé pendant l'oxydation de l'arginine comparées à celles obtenues dans la littérature et à celles obtenues avec un radical généré chimiquement.

Le radical piégé par Stoll *et al.* présente les valeurs de g suivante : $g_1=2,0043$ $g_2=2,0035$ $g_3=2,0021$ (Tableau 18). Les simulations DFT indiquent qu'il pourrait y avoir une différence selon l'état de protonation du radical. Ainsi, une espèce non protonée en N⁵ (BH₃[•]) aurait des valeurs de g modifiées par rapport au radical protoné sur cet azote ($g_1=2,0045$ $g_2=2,0037$ $g_3=2,0025$).

Les valeurs de g du radical que nous piégeons après 120 ms de réaction et, surtout, le couplage hyperfin observé en bande X, similaires à ceux obtenus par Stoll *et al.*, indiquent que nous piégeons la même espèce protonée BH_4^+ . L'analyse des signaux RPE obtenus en bande X montre la présence du NOHA dans la cavité du substrat et indique que l'étape d'hydroxylation de l'arginine a bien eu lieu.

Sauts en température :

Afin de suivre l'évolution du signal Fe^{III} HS et du radical, nous avons procédé à des sauts en température allant de 140 à 250 K. L'échantillon, stocké à 77 K, est plongé pendant 1 minute dans des bains d'isopentane refroidis à l'azote liquide (voir Chapitre 2, 5.2.). Il est ensuite analysé par spectroscopie RPE. Les sauts en température ne permettent pas de mettre en évidence d'autres espèces paramagnétiques que l'espèce Fe^{III} HS et le radical. Le signal Fe^{III} n'évolue pas avec les sauts en température (Figure 92), il reste caractéristique d'une espèce HS avec, probablement, un substrat NOHA dans la cavité (majoritaire). L'intensité du signal n'augmente pas ce qui indique qu'à 170 ms la réaction d'oxydation de l'arginine est totalement terminée.

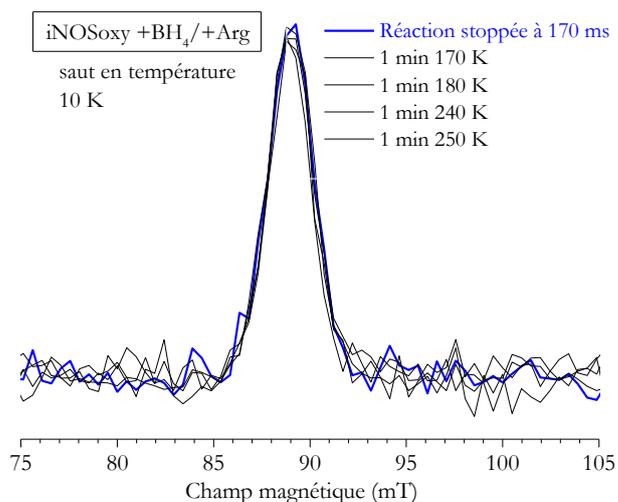


Figure 92 : Effet des sauts en température sur le signal g_{1eff} du Fe^{III} HS d'un échantillon piégé à 170 ms.

Dans le cas du radical, le signal commence à diminuer à partir de 170 K et disparaît complètement à la température de 250 K (Figure 93). L'absence d'augmentation du radical confirme qu'à 170 ms on se trouve au niveau ou après le maximum de formation comme indiqué dans la littérature [149].

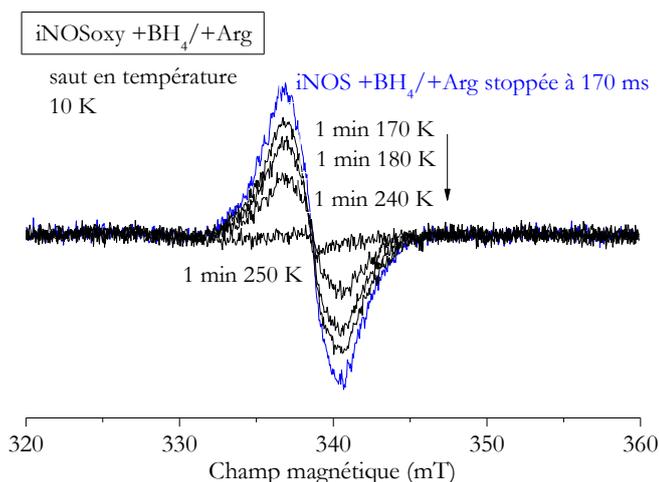


Figure 93 : Effet des sauts en température sur le signal du radical d'un échantillon piégé à 170 ms.

Discussion et conclusion :

Le cofacteur BH_4 exerce un rôle redox dans l'Etape 1 de la NOS de mammifère : le transfert d'un électron sert à activer le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Ce transfert a été montré pour toutes les isoformes de mammifère (Tableau 19). En outre le rôle redox du cofacteur BH_4 a été caractérisé cinétiquement et couplé à la vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ [129, 131, 135, 149, 151, 155, 168].

Etape d'oxydation de l'arginine	iNOSoxy	nNOS	eNOS	Références
Formation $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	52,7 s^{-1}	52,7 s^{-1}	55,6 s^{-1}	[131, 135]
Disparition $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	12,5 s^{-1}	24,2 s^{-1}	6,7 s^{-1}	[131, 135]
Formation NOHA	9,2 s^{-1}	18,2 s^{-1}	5,8 s^{-1}	[131, 135]
Formation Radical	11,1 s^{-1}	20,0 s^{-1}	6,5 s^{-1}	[131, 135]
Disparition Radical	0,7 s^{-1}	0,6 s^{-1}	3,8 s^{-1}	[131, 135]

Tableau 19 : Tableau récapitulatif des vitesses de formation et de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ à 10°C, des vitesses de formation et de disparition du radical et des vitesses de formation du NOHA pour la première étape des NOS de mammifère.

En revanche, la capacité de BH_4 à transférer un proton est encore un sujet de controverse. Le modèle moléculaire théorique de la première étape catalytique, basé sur un mécanisme de type P450, propose que l'espèce oxydante de la première étape catalytique soit une espèce cpI. Dans ce contexte, le transfert de deux protons est nécessaire pour activer l'oxygène. De nombreuses études ont proposé que le cofacteur BH_4 intervienne également comme donneur de proton du fait du réseau très dense de liaison H impliquant le cofacteur avec les propionates de l'hème, les molécules d'eau et les résidus de la cavité [43, 97, 133, 145, 155, 229, 230]. Le radical piégé étant protoné (BH_4^+) cette hypothèse est peu probable comme le discute Stoll *et al.* Cependant nous ne pouvons

pas exclure que le transfert de proton soit ultra-rapide et réversible ne nous permettant pas, ainsi, de piéger l'état BH_3^\cdot dans nos conditions expérimentales. D'autre part, l'état de protonation de départ du cofacteur n'est pas caractérisé et le transfert couplé reste possible dans l'hypothèse où l'espèce de départ serait la forme BH_5^+ . Cependant, plusieurs études montrent qu'à pH physiologique le BH_4 serait plus probablement sous forme neutre [231] : le pKa est de 5,6 pour une double protonation sur l'azote N^5 . Dans ce contexte, le fait de piéger le cofacteur sous la forme $\text{BH}_4^{+\cdot}$ supporte fortement l'hypothèse selon laquelle le cofacteur ne transfère qu'un électron. L'analyse des radicaux piégés pour les autres isoformes de mammifères eNOS et nNOS suggère qu'ils soient également sous forme protonés [129, 135]. Cet état suggère que le cofacteur ne transférerait qu'un électron et n'effectuerait pas, non plus, de transfert couplé avec un proton dans le cas de ces isoformes.

Le cofacteur BH_4 ne transfère pas de proton dans l'étape catalytique d'oxydation de l'arginine (Etape 1) des NOS de mammifère. Les deux protons nécessaires à la formation des espèces oxydantes de la première étape catalytique pourraient provenir du guanidinium de l'arginine et d'une molécule d'eau [94, 138, 144, 157, 232] (voir Chapitre 1, 4.1.5.)

3.3. Rôle du cofacteur BH_4 et de THF dans l'étape d'oxydation de l'arginine par la NOS de *Bacillus subtilis*

L'activité redox du cofacteur BH_4 (ou THF) n'a jamais été mise en évidence dans le cas de la NOS bactérienne. Nous avons étudié la réaction d'oxydation de l'arginine par la protéine bsNOS. Celle-ci est conditionnée à l'état Fe^{II} en présence du substrat arginine et du cofacteur BH_4 (ou THF). La solution protéique à l'état ferreux est mélangée avec un tampon saturé en dioxygène. Les temps de piégeage de la réaction ont été choisis pour couvrir une gamme de temps assez large.

Etude de l'espèce Fe^{III} :

Les spectres RPE obtenus en bande X des espèces piégées en présence du cofacteur BH_4 sont représentés sur la Figure 94.

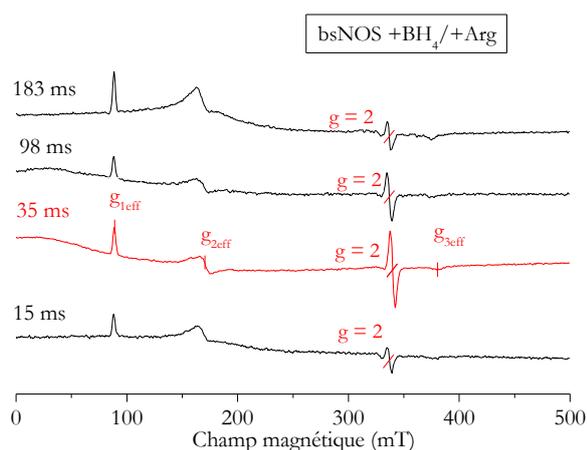


Figure 94 : Spectres RPE en bande X et à 10 K des espèces piégées durant l'étape d'oxydation de l'arginine par bsNOS entre 15 ms et 183 ms en présence de BH₄.

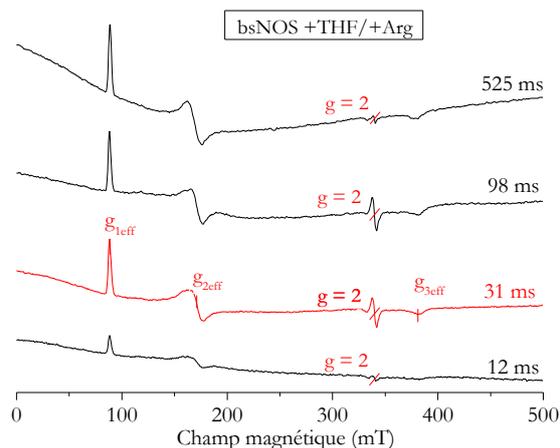


Figure 95 : Spectres RPE en bande X et à 10 K des espèces piégées dans la première étape de bsNOS (pendant l'oxydation de l'arginine) : entre 15 ms et 525 ms en présence de THF.

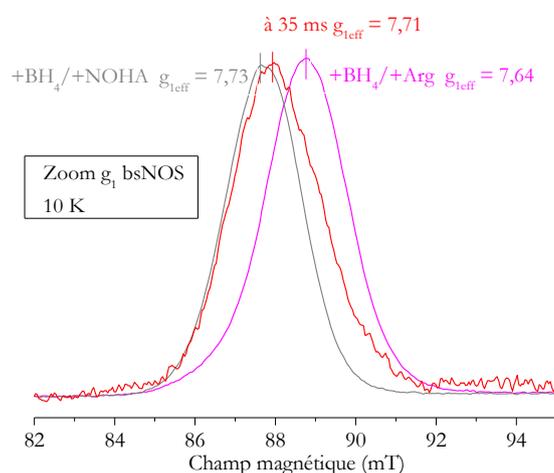
Les signatures spectrales RPE obtenues avec le cofacteur BH₄ sont toutes composées majoritairement de deux signaux. Comme pour la première étape catalytique de iNOSoxy, le premier est un signal caractéristique d'une espèce Fe^{III} HS avec trois valeurs de g_{eff} et le second signal situé à $g=2$ indique la présence d'un radical organique. L'échantillon contenant la plus grande quantité de radical (temps de réaction de 35 ms, spectre rouge) a été utilisé pour sa caractérisation. Les signatures spectrales RPE obtenues avec le cofacteur THF sont également composées de deux signaux : l'espèce Fe^{III} HS et un signal à $g=2$ (Figure 95). A 12 ms, la quantité de radical est encore trop faible pour être détectée. A 525 ms la réaction est probablement terminée et le radical n'est plus détecté. L'échantillon avec un temps de réaction de 31 ms (spectre rouge) a permis de caractériser l'espèce radicalaire et de suivre l'évolution des espèces lors des sauts en température.

La détermination des valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} HS et leurs comparaisons avec des échantillons de références a permis d'identifier la nature du substrat présent dans la cavité (Tableau 20).

Fe ^{III} HS, bsNOS, oxydation de l'arginine	$g_{1\text{eff}}$	$g_{2\text{eff}}$	$g_{3\text{eff}}$	E/D
+BH ₄ piégé de 15 à 183 ms	7,71	3,97	1,79	0,081
+THF piégé de 15 à 525 ms	7,71	3,97	1,79	0,081
+BH ₄	7,69	3,99	1,78	0,080
+Arg +BH ₄	7,64	4,07	1,80	0,077
+NOHA +BH ₄	7,73	3,97	1,78	0,082

Tableau 20 : Valeurs de g_{eff} et de E/D de l'espèce Fe^{III} HS piégée avec le cofacteur BH₄ et avec le cofacteur THF et comparaison à des échantillons de référence.

La présence de l'espèce Fe^{III} HS indique que la réaction d'oxydation de l'espèce Fe^{II} de départ a bien eu lieu aux temps de réaction analysés. Les valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} avec BH_4 et avec THF sont identiques : $g_{1\text{eff}}=7,71$ $g_{2\text{eff}}=3,97$ et $g_{3\text{eff}}=1,79$ ($g_{1\text{eff}}$ représenté en rouge sur la [Figure 96](#)). Ces valeurs sont très proches d'une espèce Fe^{III} en présence du substrat NOHA dans la cavité : $g_{1\text{eff}}=7,73$ $g_{2\text{eff}}=3,97$ et $g_{3\text{eff}}=1,78$ ($g_{1\text{eff}}$ représenté en gris sur la [Figure 96](#)).



[Figure 96](#) : Zone $g_{1\text{eff}}$ du signal RPE du Fe^{III} HS piégé à 35 ms avec le cofacteur BH_4 pendant l'oxydation de l'arginine (en rouge). Comparaison aux échantillons de référence ayant comme substrat le NOHA (en gris) et l'arginine (en rose).

La présence de NOHA dans la cavité indique que la réaction d'oxydation de l'arginine a bien eu lieu en présence du cofacteur BH_4 mais aussi en présence du cofacteur THF.

Caractérisation du radical :

Les radicaux obtenus pendant l'étape d'oxydation de l'arginine par bsNOS en présence de BH_4 ([Figure 97](#), spectres rouges) et THF ([Figure 97](#), spectre noir) sont analysés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'Etape 1 de iNOSoxy. Ainsi les signatures spectrales peuvent être directement comparées à celles observées précédemment dans le cas de iNOSoxy ([Figure 97](#), spectre bleus).

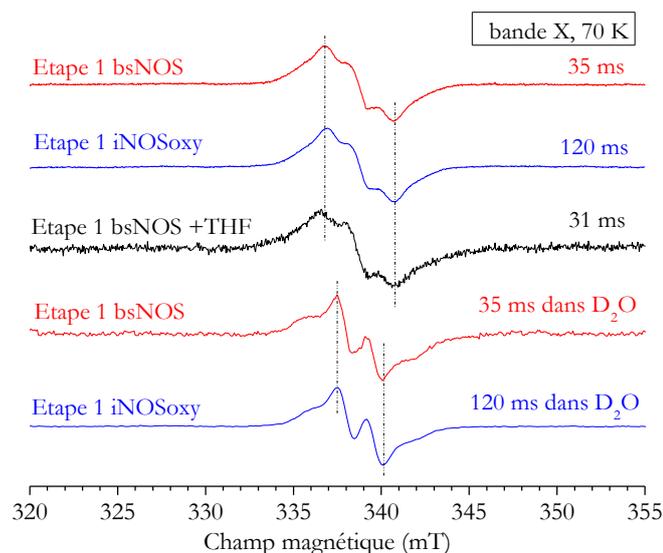


Figure 97 : Spectres RPE du radical BH_4 obtenu dans la première étape de bsNOS dans un solvant H_2O ou D_2O (en rouge) comparés au THF (en noir) et à ceux obtenus avec iNOSoxy (en bleu) dans les mêmes conditions.

La comparaison des spectres rouges (radical BH_4 obtenu avec bsNOS dans H_2O et D_2O) et des spectres bleus (radical BH_4 obtenu avec iNOSoxy dans H_2O et D_2O) montre que le couplage hyperfin du radical piégé avec bsNOS est identique à celui piégé dans la première étape catalytique de iNOSoxy. Cela suggère que le radical observé pendant l'oxydation de l'arginine par bsNOS est dans le même état de protonation que celui observé pour iNOSoxy : l'état protoné $BH_4^{+\bullet}$. De même, le radical THF obtenu avec bsNOS dans H_2O (spectre noir) a un couplage hyperfin similaire à celui obtenu avec BH_4 et suggère que le THF est probablement dans le même état de protonation que le $BH_4^{+\bullet}$ piégé. **Le couplage hyperfin des espèces piégées avec bsNOS à 35 ms et 31 ms pendant la réaction d'oxydation de l'arginine sont similaires à ceux obtenus pendant la première étape catalytique de iNOSoxy et indiquent que nous piégeons le même radical protoné $BH_4^{+\bullet}$ ou $THF^{+\bullet}$.**

La Figure 98 représente l'analyse par spectroscopie RPE à haut champ du radical $BH_4^{+\bullet}$ piégé pendant l'oxydation de l'arginine avec bsNOS (en rouge) et iNOS (en bleu). La signature spectrale du radical THF à haut champ n'a pas pu être enregistrée du fait de la plus faible quantité de radical obtenu.

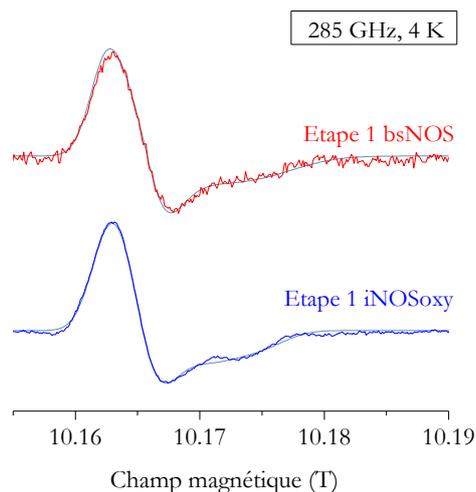


Figure 98 : Spectre RPE haut champ du radical BH_4 obtenu pour l'Etape 1 de bsNOS (en rouge) comparé à celui obtenu pour la NOS de mammifère iNOSoxy (en bleu) et leurs simulations.

Les spectres ont été simulés avec les paramètres indiqués dans le [Tableau 21](#) et la simulation obtenue est représentée en bleu sur la [Figure 98](#).

Radical BH_4, bsNOS, oxydation de l'arginine	g_1 (g_1 strain)	g_2 (g_2 strain)	g_3 (g_3 strain)	A_{zz} (N) en MHz
+Arg + BH_4 , radical piégé à 35 ms	2,0043 (0,00003)	2,0036 (0,00018)	2,0021 (0,00012)	66
iNOSoxy +Arg + BH_4 , radical piégé à 120 ms	2,0043 (0,00003)	2,0038 (0,00018)	2,0021 (0,00012)	63

Tableau 21 : Valeurs de g du radical piégé pendant l'oxydation de l'arginine de bsNOS comparées à celles obtenues avec la NOS de mammifère et détails des paramètres de simulations.

Les valeurs de g du radical piégé pendant l'oxydation de l'arginine par bsNOS ($g_1=2,0043$ $g_2=2,0036$ $g_3=2,0021$) confirment que nous piégeons le même radical ($\text{BH}_4^{+\bullet}$) que celui obtenu dans l'Etape 1 de iNOSoxy ($g_1=2,0043$ $g_2=2,0038$ $g_3=2,0021$).

Sauts en température avec le cofacteur THF :

Au cours des sauts en température réalisés avec l'échantillon piégé à 31 ms en présence de THF ([Figure 99](#), spectre rouge), le signal RPE du Fe^{III} HS augmente en intensité de 170 K jusqu'à la température ambiante ([Figure 99](#), spectres bleus). Cela signifie qu'à 31 ms la réaction d'oxydation de l'arginine n'est pas terminée et qu'il reste une certaine proportion d'espèce Fe^{II} qui s'oxyde pendant les sauts en température.

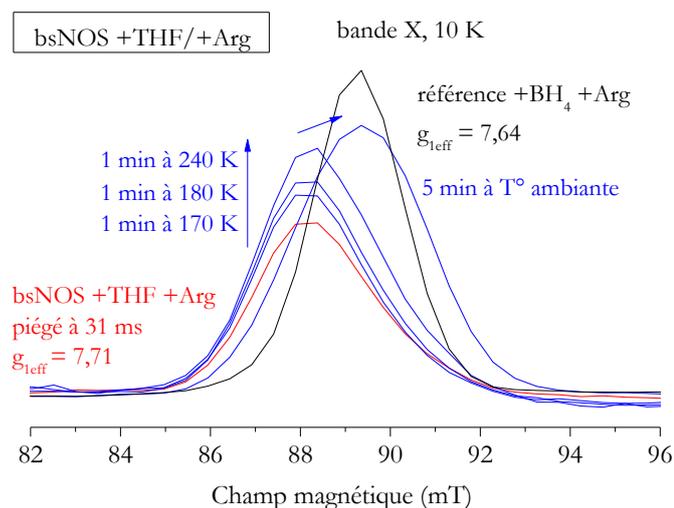


Figure 99 : Effet des sauts en température sur le signal RPE à g_{eff} du Fe^{III} HS d'un échantillon piégé à 31 ms avec le THF.

De 170 K à 240 K la valeur de g_{eff} ne change pas : elle reste proche des caractéristiques d'une espèce HS avec un substrat NOHA dans la cavité. En revanche, après décongélation (5 minutes à température ambiante), le signal g_{eff} de l'espèce Fe^{III} est décalé vers une valeur caractéristique d'une espèce HS avec un substrat arginine (Figure 99, spectre noir). Les sauts en température montrent que, pendant l'expérience de *freeze-quench*, l'arginine est oxydée en NOHA (comme l'indique la présence de NOHA dans la cavité de 170 à 240 K). Quand l'échantillon est réchauffé 5 minutes à température ambiante, le décalage de la valeur de g_{eff} peut être attribué à un échange entre le NOHA présent dans la cavité du substrat et l'arginine restante en solution. Cette observation suggère que l'étape de lavage sur les mini-colonnes de désalinisation protéique n'a pas éliminé entièrement l'excès de substrat (voir Chapitre 2, 3.2.). **L'ensemble de ces résultats indiquent que l'oxydation du substrat arginine en NOHA est réalisée *in situ* et de manière spécifique.** Le substrat NOHA est chassé de la cavité uniquement après la décongélation de l'échantillon.

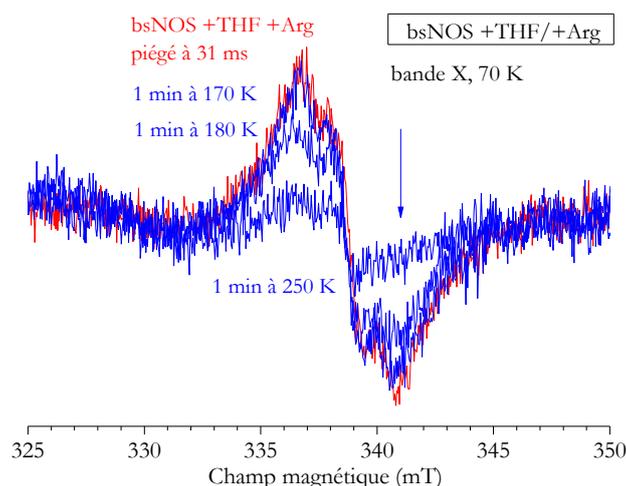


Figure 100 : Effet des sauts en température sur le signal du radical d'un échantillon piégé à 31 ms avec le THF.

Au cours des sauts en température le signal RPE du radical THF ne change pas d'intensité jusqu'à 170 K (Figure 100) et disparaît progressivement entre la température de 180 K et 250 K. A aucun moment nous n'observons une augmentation de l'intensité du radical; cela suggère que le radical THF a été piégé en aval de son temps optimal de formation.

Les sauts en température ne permettent pas de mettre en évidence d'autres espèces paramagnétiques que le $\text{Fe}^{\text{III}}\text{HS}$ et le radical ptérine.

Discussion et conclusion :

Les NOS bactériennes sont couramment utilisées comme modèle pour expliquer le mécanisme moléculaire des NOS de mammifère [107, 119] mais il n'a jamais été prouvé qu'elles partageaient exactement le même mécanisme d'activation de l'oxygène. La présence du cofacteur accélère la vitesse de disparition de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de 13 fois dans le cas de bsNOS [120]. Mais cet effet est très inférieur à celui observé dans le cas de iNOSoxy pour lequel la présence du cofacteur accélère la vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de 100 fois [131] (Tableau 22). De plus, l'effet observé chez bsNOS n'a jamais été corrélé à un rôle redox de la part du cofacteur. Quant au THF, la vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est accélérée de seulement 3 à 5 fois en sa présence [104], ce qui questionne la pertinence de THF comme cofacteur redox naturel de la NOS bactérienne.

Disparition du Fe ^{II} O ₂	+Arg	+BH ₄ +Arg	+THF +Arg	Références
iNOSoxy	0,2 s ⁻¹	12,5 ou 20,7 s ⁻¹ (×64 ou 114)		[122, 131, 171, 233]
eNOS		5,4 s ⁻¹		[137]
nNOSoxy	0,14 s ⁻¹	10,0 s ⁻¹ (×71)		[68, 135]
gsNOS	0,04 s ⁻¹	1,4 s ⁻¹ (×35)		[99]
drNOS	1,4 s ⁻¹	3,9 s ⁻¹ (×2,8)	4,2 s ⁻¹ (×3)	[68, 120]
bsNOS	0,4 s ⁻¹	5,4 s ⁻¹ (×13)	1,8 s ⁻¹ (×4,5)	[120]

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des vitesses de disparition du complexe Fe^{II}O₂ (en s⁻¹) à 10°C pour la première étape des NOS bactériennes en présence ou absence de BH₄ et/ou THF et comparaison aux NOS de mammifères. Entre parenthèse est indiqué l'effet du BH₄ et/ou THF sur la vitesse.

Pour la première fois nous démontrons ici que les radicaux BH₄ et THF sont formés pendant l'oxydation de l'arginine par bsNOS. L'analyse des signaux RPE obtenus en bande X montre que la formation du radical BH₄^{•+} et du radical THF est corrélée à la formation de NOHA *in situ* dans la cavité du substrat. **Même si le cofacteur naturel de la NOS bactérienne *in vivo* n'est pas formellement identifié à ce jour, nous montrons ici que le BH₄ et le THF sont capables de transférer un électron au complexe Fe^{II}O₂ et sont donc aptes à remplir ce rôle pendant l'Etape 1 catalytique (étape d'oxydation de l'arginine).**

Le couplage hyperfin et les valeurs de g sont les mêmes que ceux attribués à l'espèce BH₄^{•+} dans la première étape catalytique de iNOSoxy. Le rôle redox des cofacteurs BH₄ et THF dans l'Etape 1 de la NOS bactérienne semble donc identique à celle de iNOSoxy : le transfert d'un électron sans transfert de proton. Les deux protons nécessaires à l'activation de l'oxygène peuvent provenir, comme pour iNOSoxy, du guanidinium de l'arginine, du solvant ou de la molécule d'eau, comme expliqué plus haut [94, 138, 144, 157, 232]. **Nos résultats montrent que iNOSoxy et bsNOS semblent partager le même type de séquence de transfert d'électron pendant l'étape d'oxydation du substrat arginine.** La NOS bactérienne pourrait être un bon modèle pour étudier la séquence de transfert de proton et d'électron pendant l'Etape 1 du cycle moléculaire.

Le radical n'a pas été quantifié dans cette étape mais il est clair au vu des spectres RPE en bande X que les espèces radicalaires sont produites avec un rendement radicalaire inférieur à 80 % dans nos conditions expérimentales. De plus, le maximum de formation du radical se situerait entre 15 et 35 ms, soit plus de 100 ms plus tôt que dans le cas de la NOS de mammifère [131]. Cette constatation met en évidence des différences dans la vitesse de formation et de disparition de l'espèce radicalaire entre les NOS de bactéries et les NOS de mammifères.

Le transfert d'électron provenant du cofacteur sert à activer l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ ce qui signifie que la vitesse d'apparition du radical peut être assimilée à la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Dans cette optique la vitesse de formation du radical $\text{BH}_4^{+\bullet}$ est 2 à 3 fois plus lente dans le cas de la NOS bactérienne (voir [Tableau 22](#) [68, 120]) par rapport à la NOS de mammifère et expliquerait la moindre accumulation de l'espèce radicalaire $\text{BH}_4^{+\bullet}$ ou $\text{THF}^{+\bullet}$. D'autre part la poche de fixation du radical est beaucoup plus ouverte dans le cas de la NOS bactérienne et la vitesse de disparition du radical pourrait être accélérée par le caractère plus accessible de la poche du cofacteur par le solvant. Le ralentissement de la vitesse de formation du radical concomitant à l'accélération de sa vitesse de disparition pourrait aisément expliquer les différences cinétiques observées pour la formation du radical entre iNOSoxy et bsNOS dans la première étape catalytique du cycle moléculaire.

3.4. Rôle du cofacteur BH_4 dans l'étape d'oxydation du NOHA par la NO-Synthase inducible

Pour piéger le radical formé dans l'Etape 2 du cycle moléculaire, nous déclenchons la réaction d'oxydation de NOHA, par le mélange de la protéine iNOSoxy à l'état Fe^{II} (en présence du substrat NOHA et du cofacteur BH_4) avec un tampon saturé en dioxygène. Dans l'Etape 2 catalytique, le cofacteur n'a été piégé qu'une seule fois sous forme radicalaire mais n'a pas été particulièrement caractérisé [171]. En outre l'état de protonation du radical n'a jamais été étudié. Les temps de piégeage choisis pour étudier la réaction d'oxydation du NOHA sont de 15 ms et 60 ms [171].

Etude de l'espèce Fe^{III} :

Les spectres RPE enregistrés en bande X sont représentés sur la [Figure 101](#). Les signatures spectrales RPE obtenues à 15 ms et 60 ms sont similaires à celles observées pour l'Etape 1 de iNOSoxy et correspondent au mélange de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{HS}$ avec un radical organique à $g=2$.

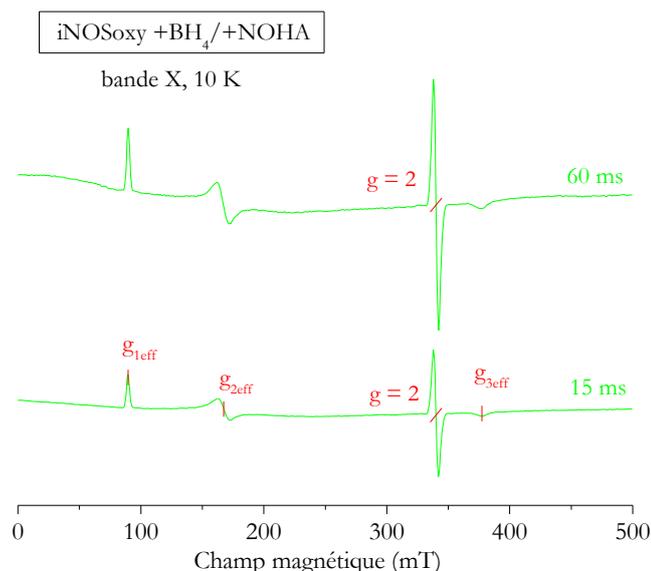


Figure 101 : Spectres RPE en bande X et à 10 K des espèces piégées dans la deuxième étape catalytique de iNOSoxy (l'oxydation de NOHA) : à 15 ms et à 60 ms en présence du cofacteur BH₄.

Les valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} HS ont été déterminées par simulation et comparées à des échantillons de références (**Tableau 23**).

Fe^{III} HS, iNOSoxy, oxydation du NOHA	$g_{1\text{eff}}$	$g_{2\text{eff}}$	$g_{3\text{eff}}$	E/D
+NOHA +BH ₄ piégé à 15 ou 60 ms	7,66	4,05	1,80	0,078
piégé dans Etape 1	7,63	4,05	1,80	0,076
+BH ₄	7,68	3,98	1,79	0,079
+Arg +BH ₄	7,57	4,13	1,81	0,073
+NOHA +BH ₄	7,66	4,04	1,80	0,078

Tableau 23 : Valeurs de g_{eff} et de E/D de l'espèce Fe^{III} HS piégée à 15 ou 60 ms avec le cofacteur BH₄ et comparaison à celui observé dans la première étape et à des échantillons de référence.

L'analyse des valeurs de g_{eff} de l'espèce piégée à 15 et 60 ms ($g_{1\text{eff}}=7,66$ $g_{2\text{eff}}=4,05$ et $g_{3\text{eff}}=1,80$) ne permet pas de conclure très précisément sur la présence ou l'absence de substrat dans la cavité. Le signal $g_{1\text{eff}}$ de l'espèce piégée à 60 ms est représenté en vert sur la **Figure 102**. Les signaux attendus en présence de NOHA ou en absence de substrat sont respectivement représentés en gris et en bleu.

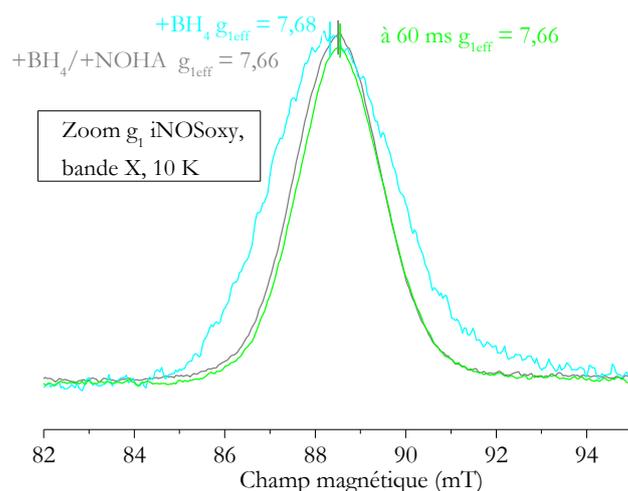


Figure 102 : Zone à g_{eff} du signal RPE du Fe^{III} HS piégé à 60 ms pendant l'oxydation du NOHA (en vert). Comparaison aux échantillons de références : sans substrat (bleu), avec NOHA (en gris).

Dans la deuxième étape catalytique, le NOHA s'oxyde en citrulline. L'espèce Fe^{III} formée avec la citrulline dans la cavité du substrat adopte une configuration BS avec une valeur de g_1 aux environs de 2,46 [234]. Cette espèce n'est pas observée dans nos conditions expérimentales. La présence de NOHA dans la cavité pourrait suggérer que la réaction d'oxydation du NOHA n'a pas encore eu lieu à 15 et 60 ms. Cependant, nous avons vu, avec les étapes de saut en température réalisées sur la première étape catalytique de bsNOS, que l'excès de substrat initial n'est pas complètement éliminé après la désalinisation de l'échantillon. La présence du NOHA dans la cavité du substrat à 15 ou 60 ms pourrait être expliquée par un relargage rapide de la citrulline produite et la re-fixation du NOHA encore présent dans l'échantillon ($k_{\text{on}} \text{NOHA} = 12000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [228] *versus* $k_{\text{off}} \text{citrulline} = 17 \text{ s}^{-1}$ [88]). La valeur de g_{eff} est également compatible avec l'absence de substrat et pourrait, quant à elle, correspondre à une espèce finale de la réaction c'est-à-dire au stade où la citrulline est relarguée de la cavité du substrat. Ainsi, nous caractérisons probablement un mélange d'espèces, la première correspondrait à une forme ayant relargué le substrat final citrulline et la seconde pourrait être celle obtenue après une re-fixation rapide du substrat NOHA.

Caractérisation du radical :

La caractérisation du signal à $g=2$ par spectroscopie RPE en bande X met en évidence une signature spectrale différente de celle obtenue pendant l'étape d'oxydation de l'arginine (Figure 103, spectres gris). L'empreinte spectrale semble correspondre au mélange de deux espèces différentes : probablement une fraction de radical $\text{BH}_4^{+\bullet}$ mais aussi une contribution spectrale qui rappelle celles observées avec les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de NOS. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons généré plusieurs types de complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. Celui généré en présence de NOHA et du cofacteur BH_4 a

une signature spectrale qui correspond à celle observée dans le mélange d'espèces piégées à 15 ou 60 ms (Figure 103, spectres roses) et la contribution relative de cette espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ semble plus importante à 60 ms qu'à 15 ms.

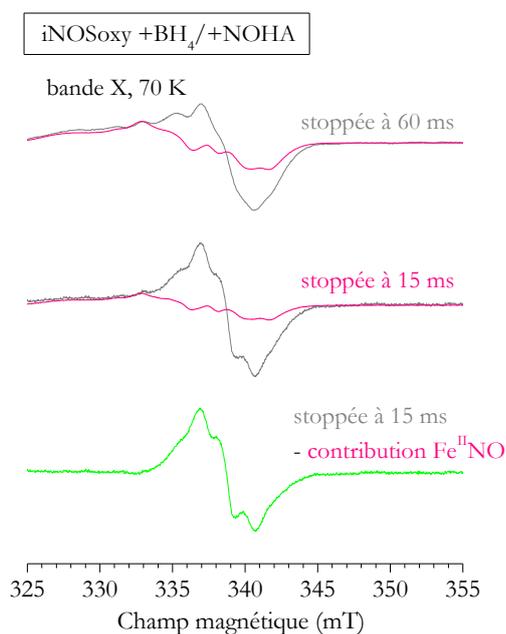


Figure 103 : Spectres RPE des espèces à $g=2$ dans la deuxième étape de iNOSoxy (en gris) et représentation de la contribution spectrale d'une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (en rose). En vert est représenté le signal du radical après soustraction de la contribution $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$.

Ainsi, pendant la réaction d'oxydation du NOHA, le signal RPE enregistré aux temps 15 et 60 ms (Figure 103, en gris) semble correspondre au mélange d'un radical ptérine avec un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (Figure 103, en rose). La soustraction de la contribution du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ permet d'isoler le signal du radical (Figure 103, en vert).

La comparaison de ce spectre obtenu à 60 ms pendant l'oxydation du NOHA dans un solvant aqueux ou deutéré (Figure 104, spectres verts) avec ceux obtenus pendant l'oxydation de l'arginine (Figure 104, spectres bleus) montre que la contribution du couplage hyperfin est identique dans les deux cas. **Pour iNOSoxy, le radical piégé pendant la deuxième étape catalytique est identique à celui piégé pendant la première : le radical protoné $\text{BH}_4^{+\bullet}$.**

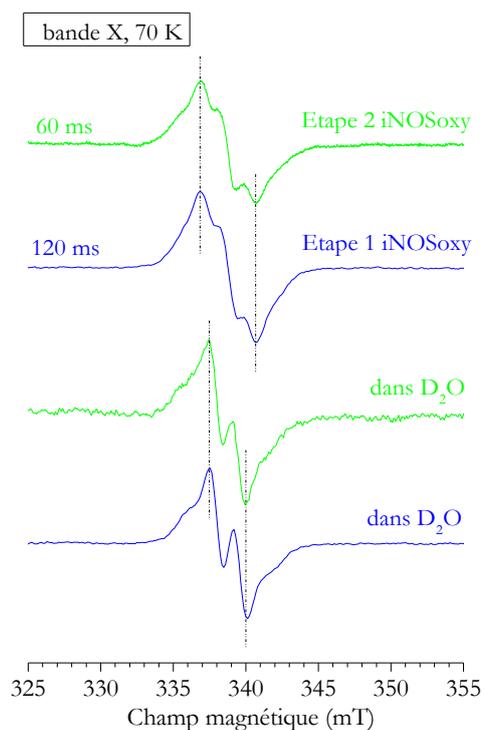


Figure 104 : Spectres RPE du radical BH_4 obtenus pour la deuxième étape de iNOSoxy dans un solvant H_2O ou D_2O (en vert) comparés et à ceux obtenus dans la première étape (en bleu).

Les valeurs de g sont déterminées par la spectroscopie RPE à haut champ (Figure 105, spectre vert) et comparées à celles obtenues avec iNOSoxy dans la première étape catalytique (Figure 105, spectre bleu). Les paramètres des simulations (en bleu sur la Figure 105) sont indiqués dans le Tableau 24.

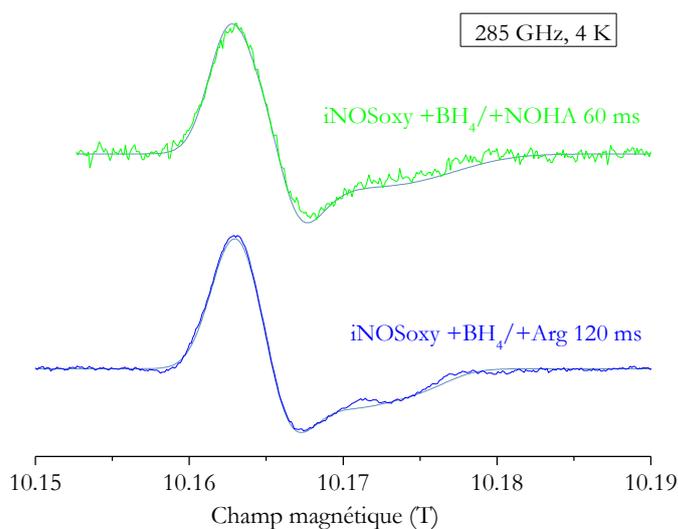


Figure 105 : Spectre RPE haut champ du radical BH_4 obtenu avec iNOSoxy (en vert) dans la deuxième étape et comparé à celui obtenu dans la première étape (en bleu). Les simulations sont également représentées en bleu.

Les valeurs de g obtenues ($g_1=2,0042$ $g_2=2,0036$ $g_3=2,0021$) confirment que nous piégeons, pendant l'oxydation du NOHA, un radical similaire à celui observé lors de la première étape catalytique d'oxydation de l'arginine (Tableau 24).

Radical BH ₄ , iNOSoxy, oxydation du NOHA	g_1 (g_1 strain)	g_2 (g_2 strain)	g_3 (g_3 strain)	A_{zz} (MHz)
+NOHA +BH ₄ , radical piégé à 60 ms	2,0042 (0,00003)	2,0036 (0,00018)	2,0021 (0,00012)	63
iNOSoxy +Arg +BH ₄ , radical piégé à 120 ms	2,0043 (0,00003)	2,0038 (0,00018)	2,0021 (0,00012)	63

Tableau 24 : Valeurs de g du radical piégé pendant l'oxydation du NOHA par iNOSoxy comparées à celles obtenues dans la première étape et détails des paramètres de simulations.

Présence d'une espèce Fe^{II}NO :

Afin d'étudier plus précisément l'espèce Fe^{II}NO présente de manière concomitante au radical, nous avons soustrait, au spectre global, la contribution spectrale du radical BH₄⁺ obtenu dans la première étape (Figure 106, spectre bleu) à la signature spectrale du signal à $g=2$ de la deuxième étape (Figure 106, spectre gris). Le spectre Fe^{II}NO ainsi obtenu est représenté en rose sur la Figure 106.

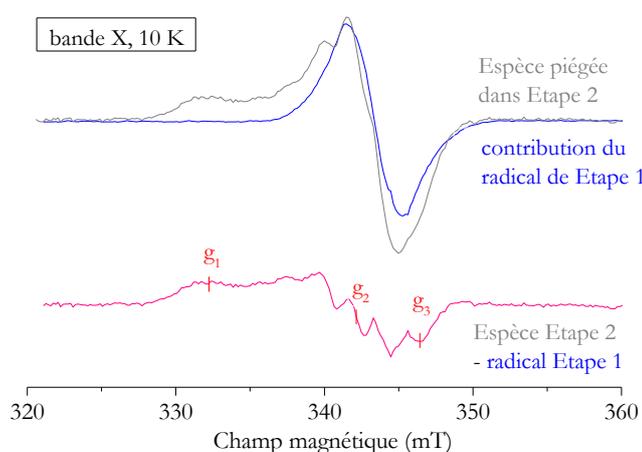


Figure 106 : Différence entre l'espèce piégée dans la deuxième étape de iNOSoxy à 60 ms (en gris) et la contribution spectrale du radical (en bleu) de la première étape : mise en évidence d'une espèce Fe^{II}NO (en rose).

L'espèce Fe^{II}NO est caractérisée par trois valeurs de g et un couplage hyperfin avec l'azote de l'espèce NO. Afin de mieux identifier ce complexe Fe^{II}NO, nous l'avons comparé à des échantillons de référence en absence ou en présence de différents substrats : arginine, NOHA, citrulline (Figure 107, spectres noirs).

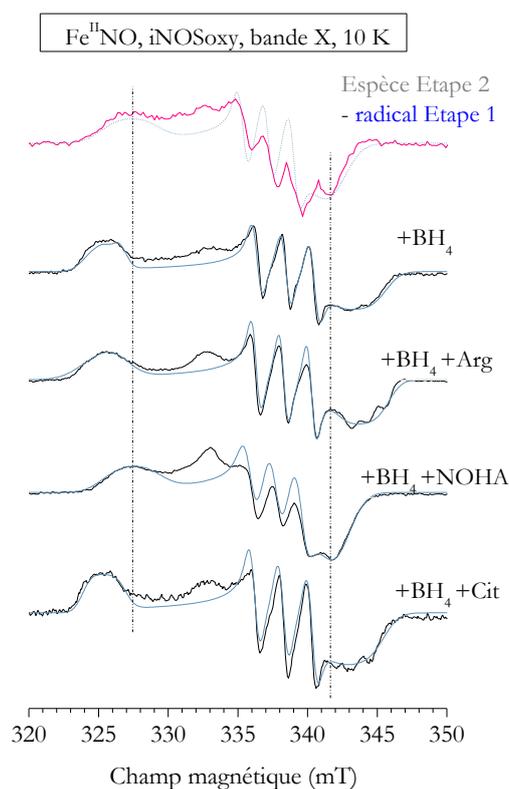


Figure 107 : Spectre RPE de des espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de références (en noir) et leurs simulations (en bleu) et comparaison au $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ piégé dans la deuxième étape de iNOSoxy (en rose).

Les simulations des spectres avec les paramètres indiqués dans le [Tableau 25](#) sont représentées en bleu sur la [Figure 107](#). Elles permettent de déterminer les valeurs de g des espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ ([Tableau 25](#)).

$\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ iNOSoxy	g_1 (g_1 strain)	g_2 (g_2 strain)	g_3 (g_3 strain)	Λ_1	Λ_2	Λ_3
+NOHA + BH_4 , piégé à 60 ms	2,070 (0,0160)	2,009 (0,0032)	1,984 (0,0140)	40	52	14
+NOHA + BH_4	2,073 (0,0160)	2,009 (0,0032)	1,984 (0,0140)	40	52	14
+Arg + BH_4	2,084 (0,0180)	2,005 (0,0000)	1,972 (0,0108)	30	56	34
+Cit + BH_4	2,084 (0,0080)	2,005 (0,0000)	1,974 (0,0122)	30	57	37
+ BH_4	2,084 (0,0080)	2,005 (0,0000)	1,974 (0,0117)	30	58	36

Tableau 25 : Valeurs de g de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ piégée dans la deuxième étape de iNOSoxy et comparaison à des espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de référence dans différentes conditions de saturation de cofacteur et de substrat. Détails des paramètres de simulation. Λ exprimé en MHz.

La simulation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, piégée à 60 ms pendant l'étape d'oxydation du NOHA, est compliquée puisque le spectre simulé est obtenu par la différence entre deux espèces (en bleu pointillé sur la [Figure 107](#)). Cependant l'alignement des spectres sur la même figure et l'estimation des valeurs de g indiquent clairement que l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ piégée est très semblable à celle obtenue

en présence du substrat NOHA. En fin de cycle catalytique, l'espèce attendue devrait être une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence de citrulline. La présence du NOHA dans la cavité du substrat pourrait être expliquée par les mêmes raisons que celles avancées lors de l'analyse de l'espèce Fe^{III} , et sera discutée dans la partie conclusion.

Sauts en température :

Au cours des sauts en température de 180 K à 240 K (Figure 108, spectres noirs), réalisés avec un échantillon piégé après 15 ms (Figure 108, spectre vert), le signal $g_{1\text{eff}}$ du signal Fe^{III} HS augmente en intensité.

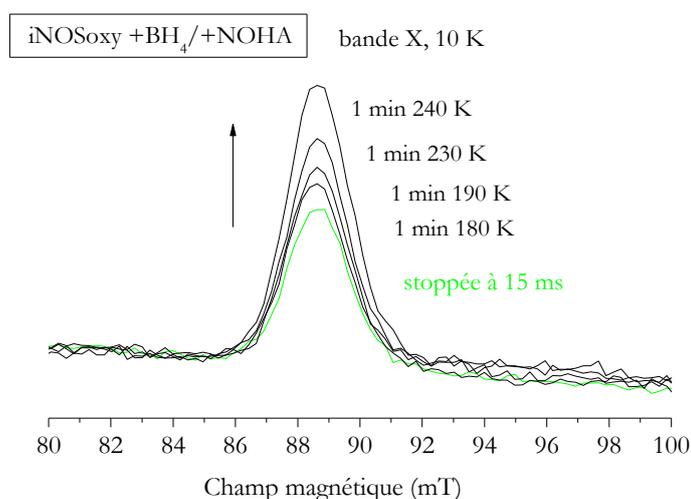


Figure 108 : Effet des sauts en température sur le signal à $g_{1\text{eff}}$ du Fe^{III} HS d'un échantillon piégé à 15 ms dans la deuxième étape de iNOSoxy.

La réaction d'oxydation du fer n'est pas terminée à 15 ms et il reste une certaine proportion d'espèce Fe^{II} ou $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ qui s'oxyde pendant les sauts en température. La valeur de $g_{1\text{eff}}$ ne change pas lors des sauts en température; elle est compatible avec une espèce sans substrat ou avec le substrat NOHA dans la cavité. En revanche, l'intensité du signal du radical augmente jusqu'à 190 K pour diminuer dans un second temps (Figure 109, en noir). L'augmentation du signal du radical, concomitante à l'augmentation du signal de l'espèce Fe^{III} indique que la réaction n'est pas terminée à 15 ms et que ce temps ne correspond pas au maximum de formation du radical. A 240 K, le signal du radical a complètement disparu il ne reste qu'une très faible signature attribuée à l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. Le devenir de ces deux espèces semble donc indépendant.

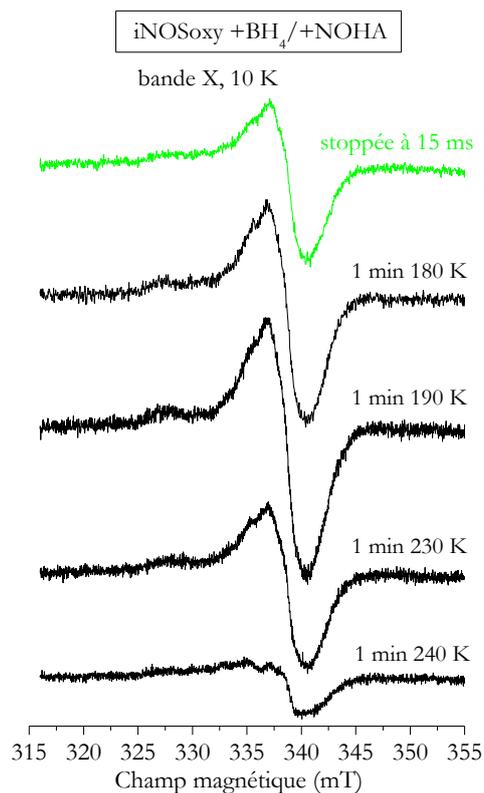


Figure 109 : Effet des sauts en température sur le signal du radical piégé à 15 ms (en vert) dans la deuxième étape de iNOSoxy.

A la fin des expériences de saut en température, l'échantillon est totalement décongelé et la quantité de nitrite et de nitrate produits est mesurée. Nous obtenons une concentration totale d'espèce (nitrite + nitrate) aux environs de 185 μM pour une concentration finale de protéine iNOSoxy de 220 μM ; soit un rapport de 0,8 par rapport à la quantité d'hème présent dans l'échantillon. Ce résultat indique que le transfert d'électron en provenance du cofacteur BH_4 est bien couplé à la réaction de synthèse de l'espèce NO ou NO^\cdot .

Discussion et conclusion :

La séquence de transfert de proton et d'électron proposée pour la deuxième étape catalytique est différente de la première. L'étape d'oxydation de l'arginine nécessite le transfert de deux protons alors que l'étape d'oxydation du NOHA n'en utilise au mieux qu'un seul. Ainsi le réseau de liaisons H ne serait pas strictement identique pour les deux étapes catalytiques. Dans ce contexte, le rôle du cofacteur concernant le transfert de proton pourrait être différent dans la deuxième étape catalytique. L'état radicalaire du cofacteur n'avait été piégé qu'une seule fois lors de la deuxième étape catalytique de iNOSoxy [171] et informe que le cofacteur BH_4 a le même rôle redox que dans la première étape catalytique : le transfert d'un électron rapide pour activer l'oxygène. En revanche, son état de protonation n'avait jamais été déterminé pendant l'oxydation du NOHA par iNOSoxy.

Notre étude, notamment la comparaison des spectres RPE obtenus pour les deux étapes indique que nous piégeons un radical protoné $\text{BH}_4^{+\cdot}$. **Le cofacteur ptérine semble donc transférer un seul électron et pas de proton lors de l'étape d'oxydation du NOHA.** En outre, la modification du réseau de liaisons H (eau-guanidinium- $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$) [95, 134, 160] en présence de NOHA réduit les donneurs de protons potentiels pour la deuxième étape catalytique. Ces données invalident le transfert de deux protons pour cette étape et tendent à soutenir un chemin catalytique n'impliquant pas la coupure hétérolytique O-O comme dans la première étape catalytique. Nos résultats sont plus en accord avec un mécanisme impliquant une attaque nucléophile de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (pas de transfert de proton) ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (transfert d'un seul proton) directement sur le groupement guanidinium du substrat NOHA. [92, 172, 173, 175, 176].

Comparée à la première étape catalytique la vitesse de réduction du radical est nettement accélérée pendant l'oxydation du NOHA ($0,71 \text{ s}^{-1}$ *versus* $8,3 \text{ s}^{-1}$, Tableau 26, [135, 171]). Un des mécanismes de régénération du radical dans la deuxième étape catalytique propose que le $\text{BH}_4^{+\cdot}$ oxyde l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ en fin de cycle catalytique permettant ainsi la libération de NO [171, 235]. Avec ce modèle, le cofacteur $\text{BH}_4^{+\cdot}$ doit coexister avec l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ et, en outre, les vitesses de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ et du radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$ doivent être identiques et liées à la vitesse de formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$. La formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ a déjà été détectée de manière concomitante au radical de l'analogue 4-amino- BH_4 [155] mais n'a jamais été observée de manière concomitante au radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$. Dans nos conditions expérimentales nous piégeons un radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$ en mélange avec une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. En revanche, les vitesses de disparition du radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$ ($8,3 \text{ s}^{-1}$) et de formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ ($36,7 \text{ s}^{-1}$) ont été rapportées mais ne semblent pas cinétiquement couplées (Tableau 26).

iNOSoxy	+Arg	+ NOHA	Références
% BH_4 réduit	37%	80 %	[171]
Formation $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$52,7 \text{ s}^{-1}$	$47,3 \text{ s}^{-1}$	[233]
Disparition $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$12,5 \text{ s}^{-1}$	$36,7 \text{ s}^{-1}$	[233]
Formation $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$		$36,7 \text{ s}^{-1}$	[171]
Formation Radical	$11,1 \text{ s}^{-1}$	$31,0 \text{ s}^{-1}$	[171]
Disparition Radical	$0,7 \text{ s}^{-1}$	$8,3 \text{ s}^{-1}$	[135, 171]

Tableau 26 : Tableau récapitulatif des vitesses de formation et de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ à 10°C , des vitesses de formation et de disparition du radical et de la vitesse de formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ dans la première et la deuxième étape de iNOSoxy.

De la même façon les expériences de saut en température que nous avons effectuées montrent que **la disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ n'est pas couplée cinétiquement à la disparition du radical $\text{BH}_4^{+\cdot}$.** De plus le rapport entre la quantité de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ et la quantité

de radical est non reproductible d'un échantillon à un autre et suggère que les paramètres cinétiques de ces deux espèces ne sont pas corrélés. Ce résultat suggère que le cofacteur n'intervient pas dans l'oxydation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ et inversement que l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ ne semble pas être l'espèce nécessaire à la réduction de BH_4^{++} en BH_4 neutre à la fin de la deuxième étape catalytique du cycle catalytique comme ce qui a été proposé [171, 235].

Pour l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ piégée, le substrat NOHA est présent dans la cavité. Or, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ attendu devrait être en présence de citrulline ou éventuellement en absence de substrat si la citrulline était libérée rapidement de la cavité ($k_{\text{off}} \text{ citrulline} = 17 \text{ s}^{-1} \text{ nNOSoxy}$ [88]). Un échange rapide entre la citrulline formée et le substrat NOHA résiduel dans l'échantillon ne peut pas être exclu ($k_{\text{on}} \text{ NOHA} = 12000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ iNOSoxy}$ [228]). La formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}/\text{NOHA}$ pourrait être expliquée, également, par des réactions secondaires, par exemple par la migration de NO produit sur un des monomères vers l'autre. L'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ ainsi piégée ne serait pas un intermédiaire issu de la réaction moléculaire attendue mais un produit secondaire de la réaction.

3.5. Rôle du cofacteur BH_4 et THF dans l'étape d'oxydation du NOHA par la NOS de *Bacillus subtilis*

L'activité redox du cofacteur BH_4 ou THF n'a jamais été étudiée non plus pour l'étape d'oxydation du NOHA par les NOS bactériennes. Pour étudier cette deuxième étape catalytique, nous avons déclenché la réaction d'oxydation du NOHA par la protéine bsNOS en présence des cofacteurs BH_4 ou THF. En absence de données cinétiques permettant le calcul du maximum de formation de l'espèce radicalaire, les temps de piégeage pour étudier la réaction ont été choisis pour couvrir une large gamme de temps.

Etude de l'espèce Fe^{III} :

Les spectres RPE en bande X des espèces piégées sont représentés sur la [Figure 110](#). Quel que soit le temps de vieillissement et le cofacteur utilisé, le signal est caractéristique d'une espèce $\text{Fe}^{\text{III}} \text{HS}$. Contrairement à toutes les autres étapes étudiées (première et deuxième étape catalytique de iNOSoxy, première étape catalytique bsNOS) les spectres en bande X ne mettent pas en évidence la présence d'un radical organique à $g=2$.

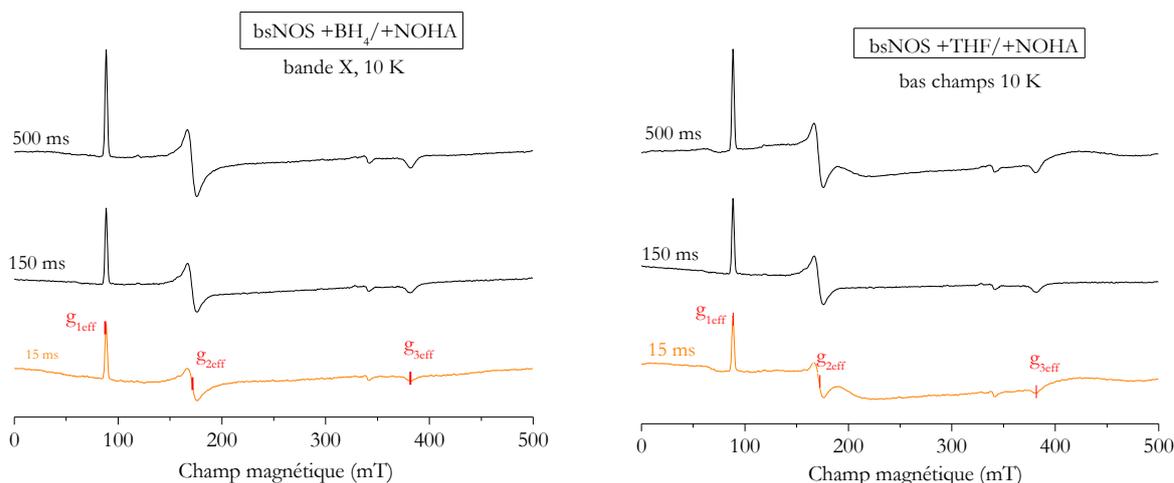


Figure 110 : Spectres RPE des espèces piégées dans la deuxième étape de bsNOS (pendant l'oxydation du NOHA) : entre 15 ms et 500 ms en présence des cofacteurs BH₄ et THF.

Les valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} HS ont été mesurées et comparées à des échantillons de références (Tableau 27).

Fe^{III} HS, bsNOS, oxydation du NOHA	$g_{1\text{eff}}$	$g_{2\text{eff}}$	$g_{3\text{eff}}$	E/D
+NOHA +BH ₄ piégé à 15 ms	7,72	3,97	1,79	0,081
+NOHA +THF piégé à 15 ms	7,72	3,97	1,79	0,081
+BH ₄	7,69	3,99	1,78	0,080
+Arg +BH ₄	7,64	4,07	1,80	0,077
+NOHA +BH ₄	7,73	3,97	1,78	0,082

Tableau 27 : Valeurs de g_{eff} et de E/D de l'espèce Fe^{III} HS piégée à 15 ms avec le cofacteur BH₄ et THF et comparaison à des échantillons de référence.

Comme pour la deuxième étape catalytique de iNOSoxy, les valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} piégée entre 15 et 500 ms suggère la présence de NOHA dans la cavité du substrat : $g_{1\text{eff}}=7,72$, $g_{2\text{eff}}=3,97$ et $g_{3\text{eff}}=1,79$ ($g_{1\text{eff}}$ représenté en orange sur la Figure 111, $g_{1\text{eff}}$ en présence de NOHA est représenté en gris et en absence de substrat en bleu).

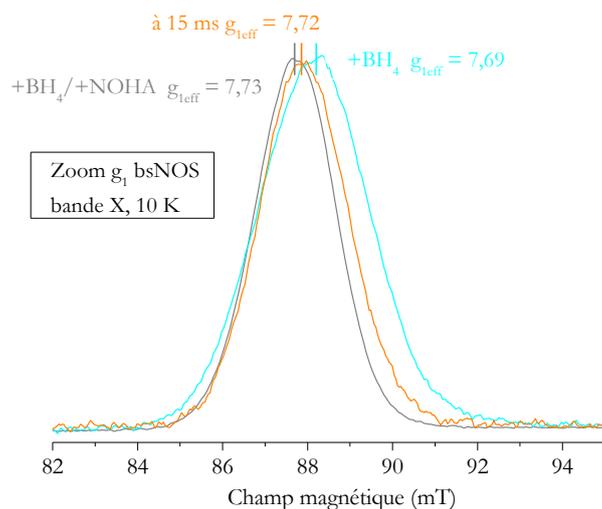


Figure 111 : Zone à g_{eff} du signal RPE du Fe^{III} HS piégé à 15 ms avec le BH_4 pendant l'oxydation du NOHA (en orange). Comparaison aux échantillons de références sans (en bleu) et avec le NOHA (en gris).

Détection d'une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$:

L'analyse en bande X de la zone à $g=2$ confirme bien l'absence de radical quel que soit le temps étudié. A la place, on observe un très faible signal d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (Figure 112, spectres orange).

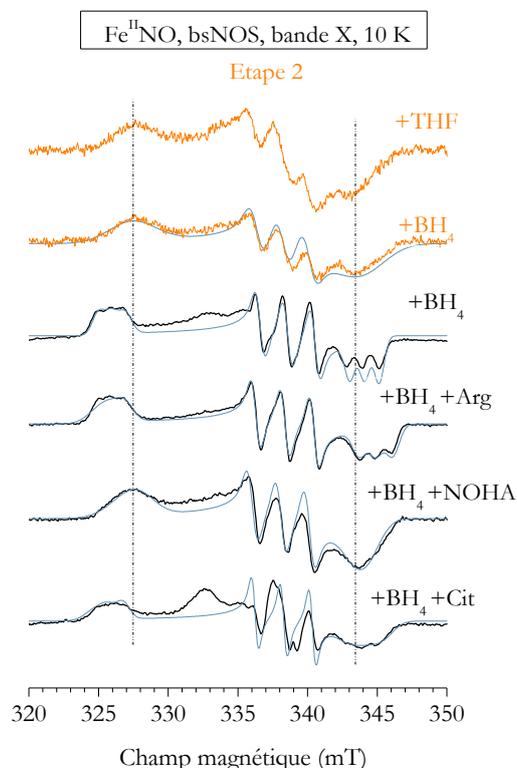


Figure 112 : Spectres RPE des espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de référence (en noir) et leurs simulations (en bleu) et comparaison au $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ piégé dans la deuxième étape de bsNOS (en orange) avec BH_4 ou THF.

L'espèce Fe^{II}NO piégée à 15 ms ([Figure 112](#), en bleu) a été simulée et nous déterminons les valeurs de g du complexe : g₁=2,073 g₂=2,006 g₃=1,974 ([Tableau 28](#)).

Fe ^{II} NO bsNOS	g ₁ (g ₁ strain)	g ₂ (g ₂ strain)	g ₃ (g ₃ strain)	A ₁ (MHz)	A ₂ (MHz)	A ₃ (MHz)
+NOHA +BH ₄ , piégé à 15 ms	2,073 (0,0180)	2,006 (0,0000)	1,974 (0,0117)	22	53	25
+NOHA +BH ₄	2,073 (0,0180)	2,007 (0,0000)	1,974 (0,0117)	22	58	20
+Arg +BH ₄	2,082 (0,0075)	2,005 (0,0010)	1,967 (0,0054)	29	59	33
+Cit +BH ₄	2,083 (0,0080)	2,005 (0,0000)	1,971 (0,0100)	30	58	35
+BH ₄	2,082 (0,0050)	2,004 (0,0000)	1,972 (0,0025)	28	55	29

[Tableau 28](#) : Paramètres de simulations des spectres RPE des espèces Fe^{II}NO de référence et piégées dans la deuxième étape de bsNOS.

La comparaison de ces valeurs à celles des complexes Fe^{II}NO de référence ([Figure 112](#) en noir) indique clairement que l'espèce piégée correspond à un Fe^{II}NO avec NOHA dans la cavité du substrat. ([Tableau 28](#)).

Discussion et conclusion :

Les études concernant le rôle redox du cofacteur BH₄ dans la deuxième étape catalytique de la NOS bactérienne sont très peu nombreuses. Nous savons que la vitesse d'activation de l'espèce Fe^{II}O₂ est beaucoup plus lente dans le cas de la seconde étape de bsNOS comparée à celle de iNOSoxy ([Tableau 29](#)) et elle n'a jamais été couplée à une activité redox de la part du cofacteur BH₄.

	bsNOS NOHA +BH ₄	bsNOS NOHA +THF	iNOSoxy NOHA +BH ₄	Références
Formation Fe ^{II} O ₂	29,0 s ⁻¹	25,0 s ⁻¹	47,3 s ⁻¹	[120, 121, 171]
Disparition Fe^{II}O₂	7,5 s⁻¹	4,3 s⁻¹	36,7 s⁻¹	[120, 121, 171]
Formation BH ₄ ⁺			31,0 s ⁻¹	[171]
Disparition BH ₄ ⁺			8,3 s ⁻¹	[171]
Formation Fe ^{III} NO			36,7 s ⁻¹	[171]
Disparition Fe^{III}NO	0,23 s⁻¹	0,19	2,3 s⁻¹	[103, 120, 121]

[Tableau 29](#) : Tableau récapitulatif des vitesses de formation et de disparition des complexes Fe^{II}O₂, Fe^{III}NO et du radical BH₄ à 10°C dans la deuxième étape de bsNOS (en présence de BH₄ ou THF) et la deuxième étape de iNOSoxy.

Nos expériences de *freeze-quench* ne permettent pas de piéger un radical ptérine et **nous ne pouvons pas associer l'activation de l'oxygène au transfert d'un électron provenant du cofacteur BH₄ ou THF**. L'absence de radical pourrait être expliquée par l'absence de réaction catalytique dans nos conditions expérimentales. Les valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} sont compatibles avec la présence de NOHA dans la cavité et pourrait indiquer une absence d'oxydation de celui-ci. Dans la seconde étape l'espèce finale attendue est la citrulline mais l'affinité de celle-ci pour bsNOS est très inférieure à celle du NOHA. Il est possible qu'une fois formée, la citrulline soit rapidement échangée avec le NOHA résiduel dans l'échantillon. Comme pour la seconde étape catalytique de iNOSoxy, le Fe^{II}NO piégé est compatible avec la présence de NOHA dans la cavité du substrat et pourrait provenir de réactions secondaires entre d'un côté le NO produit par l'oxydation du NOHA et de l'autre l'espèce Fe^{II} résiduelle ayant encore le NOHA comme substrat. En effet, la protéine bsNOS a un site actif plus accessible et pourrait permettre de telles réactions. Cette hypothèse impliquerait la formation de NO et laisserait supposer que la réaction d'oxydation du NOHA a bien eu lieu. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié les nitrites et les nitrates formés à la fin de l'expérience de *freeze-quench*. Les résultats obtenus indiquent que nous formons 170 μM de nitrite et nitrate pour une concentration en protéine de 200 μM ; soit un rapport de 0,85 par rapport à la quantité d'hème présent dans l'échantillon. Ce résultat indique que, malgré la non observation de radical BH₄^{••} dans nos conditions expérimentales, la réaction de synthèse de l'espèce NO ou NO⁻ a bien eu lieu.

Le fait de ne pas piéger le radical ne signifie pas qu'il ne se forme pas : sa cinétique de disparition pourrait être extrêmement rapide. En théorie, la vitesse de formation du radical devrait être identique à la vitesse de disparition du complexe Fe^{II}O₂ : 7,5 s⁻¹. En se basant sur une vitesse de disparition du radical identique à celle observée avec iNOSoxy ($\approx 8 \text{ s}^{-1}$) dans la seconde étape, la quantité de radical BH₄^{••} (s'il était formé) devrait atteindre environ 35 % de la quantité d'hème à 120 ms et serait détectable dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'absence de signal attribuable au radical BH₄^{••} pourrait être expliqué par une vitesse de disparition très rapide (8 à 10 fois supérieure à celle mesurée pendant l'oxydation du NOHA par iNOSoxy). Le maximum de formation du radical serait alors trop faible pour être détecté.

L'absence de radical peut signifier que la NOS bactérienne n'utilise pas d'électron provenant du cofacteur pour activer l'oxygène dans la seconde étape. Il a été suggéré qu'un seul électron (provenant du domaine réductase) était suffisant pour produire NO [54, 143]. Certains mécanismes proposent un transfert couplé électron et proton (H⁺) provenant directement du substrat NOHA et excluent totalement un rôle redox du cofacteur dans la seconde étape [178, 180]. Ces mécanismes, souvent écartés dans le cas de la NOS inductible du fait de la présence du radical BH₄ dans la deuxième étape catalytique, pourraient être envisagés pour expliquer le mécanisme moléculaire de la NOS bactérienne.

Si le radical est formé dans la deuxième étape catalytique de bsNOS, les cinétiques de formation et de disparition ainsi que le mécanisme de transfert de l'électron et la régénération du radical sont clairement différents de ceux proposés et/ou observés dans le cas de iNOSoxy. Ces informations permettent de supposer que le mécanisme moléculaire de la NOS bactérienne dans la seconde étape n'est pas directement comparable à celui observé pour les NOS de mammifères.

Le cofacteur naturel de la NOS bactérienne n'est pas connu, la vitesse de dissociation de l'espèce finale $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ est environ 10 à 15 fois plus lente (voir Tableau 29) et son activité de production en NO représente seulement de 4 à 8 % de l'activité de la NOS de mammifère. Quelque soit la raison pour laquelle nous ne piégeons pas le radical (différences cinétiques ou absence d'activité redox) nos travaux mettent en lumière des différences importantes dans le mécanisme de transfert d'électron de la deuxième étape catalytique de la NOS bactérienne. **La pertinence de la NOS bactérienne comme modèle catalytique de la deuxième étape doit être remise en cause.**

3.6. Conclusion

Le rôle redox du cofacteur BH_4 a été étudié pour la première étape catalytique de iNOSoxy. Le radical du cofacteur piégé est sous la forme $\text{BH}_4^{+\cdot}$; **il transfère un électron et ne semble pas participer aux transferts de protons nécessaires à l'oxydation de l'arginine** et laisse le débat ouvert quant à la nature des donneurs de protons.

Le rôle redox du cofacteur BH_4 a aussi été étudié pour la deuxième étape catalytique de iNOSoxy. Pour la première fois nous montrons que **le transfert d'électron nécessaire en provenance du cofacteur n'est pas associé à un transfert de proton de sa part pendant l'oxydation du NOHA**. De plus, nos résultats suggèrent que la re-réduction de $\text{BH}_4^{+\cdot}$ en espèce BH_4 neutre n'est pas couplée au devenir de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ à la fin de l'Etape 2. Nous n'observons pas d'ailleurs de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ catalytique.

Le rôle redox du cofacteur BH_4 et THF a été étudié dans la première étape catalytique de bsNOS et **pour la première fois nous montrons leur capacité à exercer la même fonction redox de transfert d'électron que celle observée avec les NOS de mammifère**. D'une certaine manière, ce résultat valide leur utilisation comme modèle de la première étape catalytique des NOS de mammifère.

Enfin, le rôle redox des cofacteurs BH_4 et THF a été étudié dans la deuxième étape catalytique de bsNOS. Nos résultats ne permettent pas de conclure formellement quant au rôle de ces cofacteurs dans le mécanisme d'activation de l'oxygène pendant l'oxydation du NOHA. En

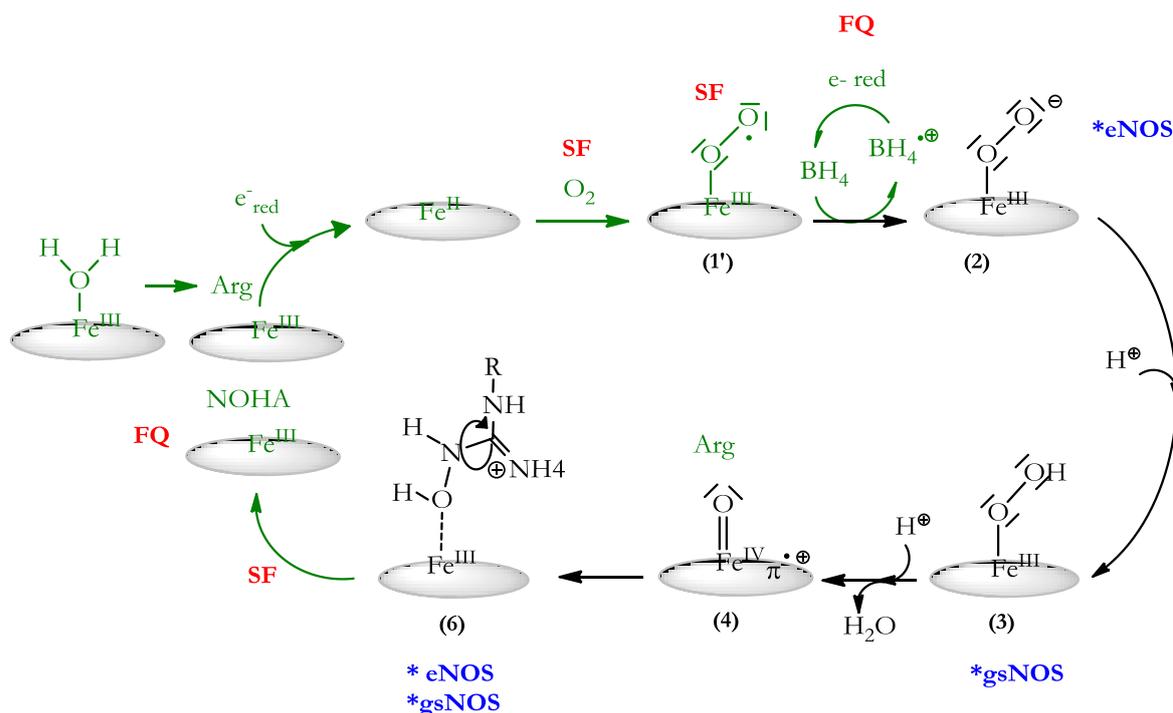
revanche l'étude de cette étape démontre clairement que **la NOS bactérienne n'a pas un mécanisme moléculaire directement comparable à celui de la NOS de mammifère dans cette étape et relance le débat quant à la réelle fonction biologique de la NOS bactérienne.**

CHAPITRE 4

**Nouvelle approche cinétique pour l'étude du
mécanisme moléculaire des NO-Synthases**

1. Introduction

Les méthodes de cinétique rapide classiques ne permettent pas d'identifier ni de caractériser les différents intermédiaires réactionnels du cycle catalytique des NOS. Le *stopped-flow* permet d'observer uniquement les transitions $\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ dans l'étape d'oxydation de l'arginine (indiquées par SF sur la [Figure 113](#)) [122, 131, 135] et $\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{NO} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ ([Figure 114](#)) dans l'étape d'oxydation du NOHA [171].



[Figure 113](#) : Représentation du cycle catalytique de l'oxydation de l'arginine. En vert sont représentées les espèces caractérisées soit par spectroscopie UV-visible, soit par *stopped-flow* (SF), soit par *freeze-quench* (FQ). Les étoiles bleues indiquent les espèces piégées avec la méthode de cryo-réduction couplée à des sauts en température.

L'étude de mutants n'a pas permis, à ce jour, de ralentir suffisamment la réaction et d'identifier de nouveaux intermédiaires [8, 121, 166, 167, 219]. Le *freeze-quench* a permis de piéger le radical du cofacteur et l'espèce Fe^{III} finale (indiquées par FQ sur la [Figure 113](#) et [Figure 114](#), [9, 131, 135, 149, 150]) mais aucune autre espèce telle que les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^{\cdot}$ (2) ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) n'a été détectée.

générée à température ambiante en présence du substrat NOHA ou arginine et absence ou en présence de cofacteur BH_4 . Afin de former le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, la diffusion du gaz O_2 est réalisée à une température plus basse que celle des cytochromes P450 : -30°C . Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ ainsi formé est ensuite figé à la température de 77 K. Comme les cytochromes P450, l'électron nécessaire à l'activation de l'oxygène est alors fourni par l'irradiation gamma de l'échantillon. Une telle technique, testée sur gsNOS en absence de cofacteur, permet d'identifier les espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3) et le NOHA fixé sur le fer (6) dans la première étape (indiquées par les étoiles bleues sur la [Figure 113](#) [138]). Dans la seconde étape sont observés les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (3), le complexe tétraédrique (7) et l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (8) (indiquées par les étoiles bleues sur la [Figure 114](#) [138]). En présence du cofacteur BH_4 les résultats obtenus sont similaires.

Cette même technique a été testée avec eNOS (la NOS de mammifère dont la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est la plus lente) en présence du cofacteur inactif 4-amino- BH_4 . Ce dernier a pour but d'inhiber le transfert d'électron en provenance du cofacteur et permet de ralentir significativement la vitesse de disparition de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de départ. Les sauts en température permettent d'identifier deux espèces BS au cours des sauts en température : un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2) et un complexe correspondant au NOHA fixé au fer (6) dans la première étape du cycle catalytique (indiqués par les étoiles bleues sur la [Figure 113](#), [133]). Dans la seconde étape, les espèces BS étudiées sont attribuées à une espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$ (2) et au complexe tétraédrique (7) (indiqués par les étoiles bleues sur la [Figure 114](#) [133]). Ainsi, les séquences d'espèces identifiées avec la NOS bactérienne gsNOS ne sont pas identiques à celles piégées avec la NOS de mammifère eNOS tant dans la première étape que dans la deuxième étape.

La cryo-réduction couplée aux sauts en température s'avère être pertinente pour l'identification de certaines espèces du cycle catalytique mais nécessite d'être adaptée aux particularités des NOS de mammifère. Elle a été testée avec le cofacteur inactif 4-amino- BH_4 qui modifie alors le réseau de liaisons H et ne respecte pas les conditions catalytiques normales. Elle n'a jamais été testée en présence du cofacteur BH_4 qui, accélérerait alors fortement la vitesse de disparition de l'espèce de départ $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (jusqu'à 25 s^{-1} à 10°C). Nous proposons, dans ce chapitre, une nouvelle approche. La protéine, congelée à l'état Fe^{III} en présence du substrat arginine ou NOHA et du cofacteur naturel BH_4 , est irradiée par une source de cobalt 60 à 77 K (voir Chapitre 2, 6.). Ainsi l'irradiation ne fournit plus l'électron nécessaire à l'activation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ mais l'électron nécessaire à la réduction du fer. Les sauts en température permettraient ensuite d'observer la fixation du dioxygène présent dans l'échantillon sur l'espèce Fe^{II} , le rôle redox du cofacteur ainsi que le réseau de liaisons H seraient préservés et il serait possible de détecter de nouvelles espèces.

La première partie de ce chapitre est centrée sur l'étude de la réduction du fer par irradiation gamma : résistance de la protéine vis-à-vis de l'irradiation, réduction, effet de la dose d'irradiation, effet de la présence ou de l'absence de dioxygène, de substrat et/ou de cofacteur et comparaison de

ces différents paramètres entre iNOSoxy et bsNOS. Les spectroscopies utilisées sont la RPE et le Raman de résonance. Les résultats correspondants à cette première partie de chapitre sont publiés dans l'article joint en Annexe 3.

La seconde partie de ce chapitre concerne l'étude de la fixation des gaz CO ou O₂ sur le fer au cours des sauts en température, l'objectif principal étant de trouver les meilleures conditions de températures permettant l'accumulation de l'espèce Fe^{II}O₂.

2. La cryo-réduction du fer par irradiation gamma

2.1. Intégrité fonctionnelle et structurale des NO-Synthases

2.1.1. Intégrité des propriétés électroniques du site actif

Les expériences de cryo-réduction impliquent des conditions extrêmes pour la protéine : congélation à 77 K, exposition à des doses d'irradiations gamma allant jusqu'à 76,5 kGy, analyses spectroscopiques RPE ou Raman de résonance à 10 K, l'utilisation d'un cryoprotectant (50 % de glycérol, [133, 138, 183, 184, 238] et pour les analyses en spectroscopie Raman de résonance, l'exposition de la protéine à un rayonnement laser. Or pour l'activité de la NOS, les transferts d'électrons et de protons sont très dépendants et sensibles à la structure du site actif. Il est donc essentiel de vérifier, en amont, l'intégrité structurale et fonctionnelle des NOS étudiées dans nos conditions expérimentales.

Analyse des protéines iNOSoxy et bsNOS avant l'étape d'irradiation :

Les protéines sont préparées à l'état Fe^{III} et conditionnées, dans un premier temps, dans un tampon anaérobie contenant 50 % de glycérol, le cofacteur BH₄ et le substrat arginine en concentrations saturantes. Les échantillons, stockés à 77 K, sont analysés à 10 K par spectroscopie RPE et spectroscopie Raman de résonance avant l'irradiation gamma.

En spectroscopie RPE, on observe l'espèce Fe^{III} HS-5C caractéristique de la présence du cofacteur et du substrat arginine ($g_{1\text{eff}}=7,64$ $g_{2\text{eff}}=4,07$ $g_{3\text{eff}}=1,80$ pour bsNOS et $g_{1\text{eff}}=7,57$ $g_{2\text{eff}}=4,07$ $g_{3\text{eff}}=1,80$ pour iNOSoxy [Figure 115](#), [8, 205]).

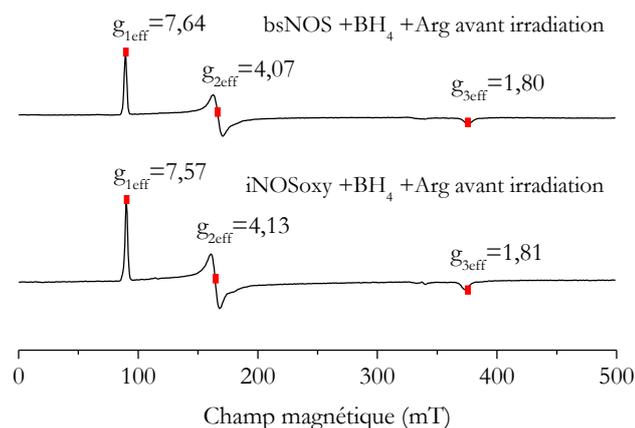


Figure 115 : Spectres RPE des protéines iNOSoxy et bsNOS en présence du substrat arginine et cofacteur BH₄ avant l'étape d'irradiation des échantillons : Fe^{III} HS-5C.

La Figure 116 représente le spectre obtenu en spectroscopie Raman de résonance de la protéine iNOSoxy avant irradiation. Le spectre est dominé par les modes vibrationnels ν_4 (1374 cm⁻¹), ν_3 (1489 cm⁻¹), ν_2 (1563 cm⁻¹), ν_{vinyl} (1627 cm⁻¹) et ν_5 (1122 cm⁻¹) (Figure 116). Ce sont les modes vibrationnels d'élongation symétrique dans le plan des atomes d'azote et de carbone de la porphyrine qui informent sur l'état d'oxydation, de spin et de coordination du fer [239, 240]. Les basses fréquences ν_7 (677 cm⁻¹) et ν_{16} (754 cm⁻¹) sont les modes vibrationnels associés à la déformation de la porphyrine dans le plan. L'ensemble de ces modes vibrationnels confirment qu'en présence de substrat et de cofacteur, l'espèce Fe^{III}, avant irradiation est dans un état HS-5C [93, 102, 115, 186, 197].

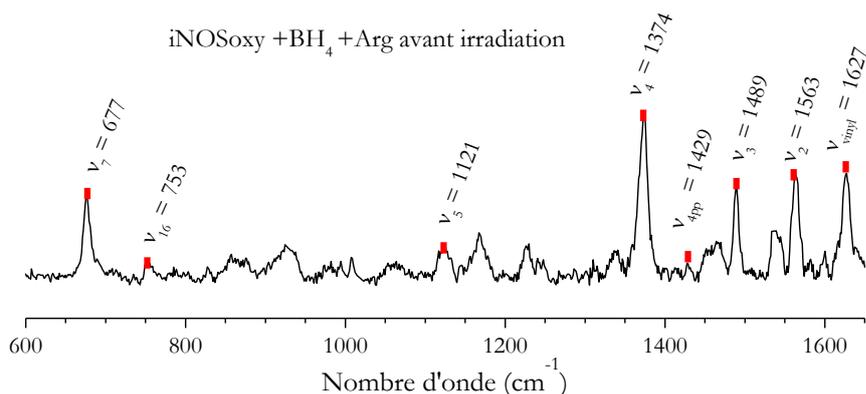


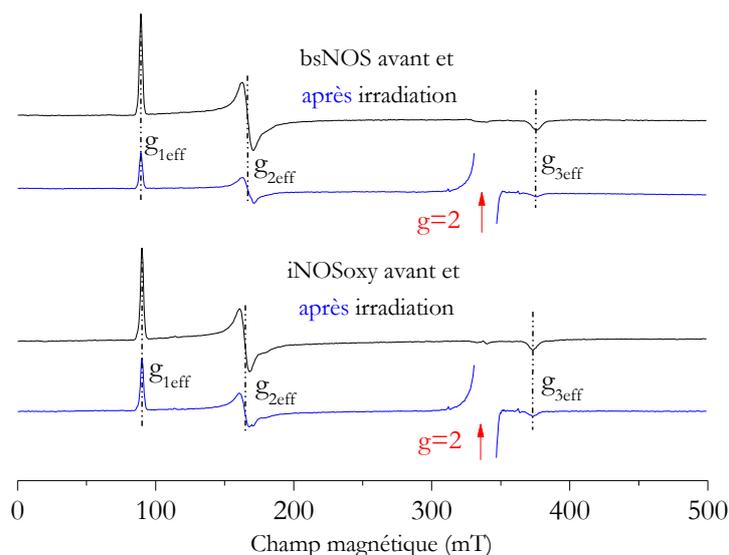
Figure 116 : Spectres obtenu par Raman de résonance pour iNOSoxy en présence du substrat arginine et cofacteur BH₄ avant l'étape d'irradiation : Fe^{III} HS-5C.

Les spectres RPE et Raman de résonance indiquent que l'espèce Fe^{III} analysée est bien celle attendue c'est-à-dire une espèce HS-5C caractéristique de la présence du substrat et du cofacteur.

Cela indique que la forte concentration en glycérol et l'étape de congélation ne perturbe ni la coordination, ni l'état de spin, ni la structure quaternaire de la protéine.

Analyse des protéines iNOSoxy et bsNOS après l'étape d'irradiation :

Les échantillons sont irradiés à 77 K dans l'azote liquide avec un débit de dose de 20-30 Gy par minute. La [Figure 117](#) représente les spectres RPE des protéines bsNOS et iNOSoxy avant irradiation (en noir) et ayant reçu une dose totale de 76,5 kGy (en bleu).



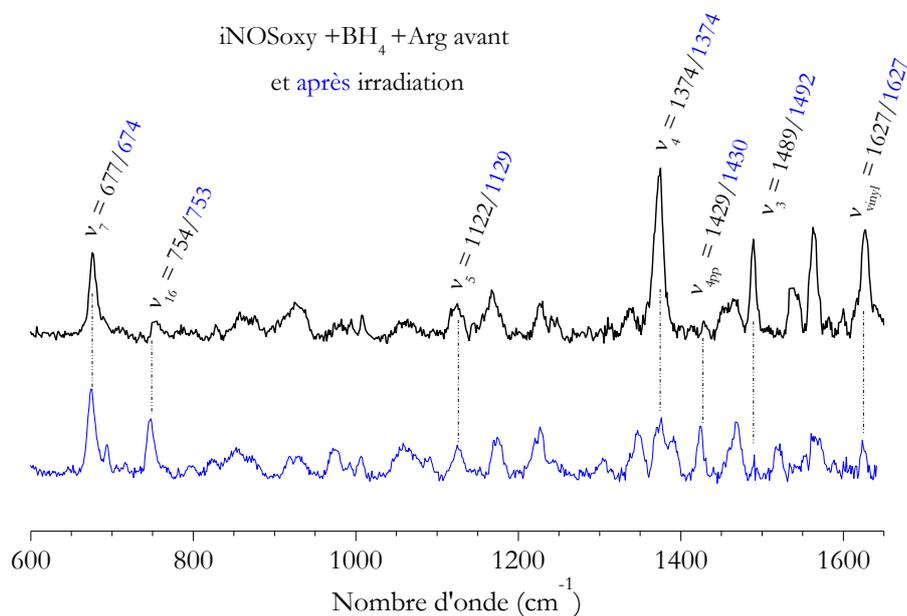
[Figure 117](#) : Spectres RPE de iNOSoxy et bsNOS en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄ avant l'étape d'irradiation (en noir) et après irradiation (en bleu) d'une dose de 76,5 kGy.

La partie des spectres RPE à $g=2$ a été tronquée du fait de la présence d'un signal RPE très intense correspondant aux radicaux générés en très grande quantité par l'irradiation gamma. Les valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} avant et après irradiation sont identiques tant pour bsNOS que pour iNOSoxy ([Tableau 30](#)).

		$g_{1\text{eff}}$	$g_{2\text{eff}}$	$g_{3\text{eff}}$
bsNOS +BH ₄ +Arg	Avant irradiation	7,64	4,07	1,80
	Après 76,5 kGy	7,64	4,07	1,80
iNOSoxy +BH ₄ +Arg	Avant irradiation	7,57	4,13	1,81
	Après 76,5 kGy	7,57	4,13	1,81

[Tableau 30](#) : Valeurs de g_{eff} de l'espèce Fe^{III} HS-5C de iNOSoxy et bsNOS en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄ avant et après l'étape d'irradiation d'une dose de 76,5 kGy.

L'analyse de iNOSoxy par spectroscopie Raman de résonance après irradiation (dose totale de 36,2 kGy, [Figure 118](#), spectre bleu) met en évidence l'apparition de nouvelles contributions spectrales qui seront discutées en partie 2.2.



[Figure 118](#) : Spectres obtenus en Raman de résonance de la protéine iNOSoxy en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄ avant l'étape d'irradiation (en noir) et après irradiation (en bleu) d'une dose de 36,2 kGy en condition anaérobique.

Nous pouvons, par ailleurs, comparer les signatures spectrales ν_4 , ν_3 , ν_{vinyl} , ν_5 , ν_7 et ν_{16} de l'espèce Fe^{III} HS-5C avant ([Figure 118](#), en noir) et après irradiation ([Figure 118](#), en bleu). Les valeurs des fréquences de résonance des modes vibrationnels de l'espèce Fe^{III} après irradiation sont très similaires à celles observées avant irradiation (ν_4 1374 cm⁻¹→1374 cm⁻¹, ν_3 1489 cm⁻¹→1492 cm⁻¹, ν_{vinyl} 1627 cm⁻¹→1627 cm⁻¹, ν_5 1122 cm⁻¹→ 1129 cm⁻¹, ν_7 677 cm⁻¹→674 cm⁻¹, et ν_{16} 754 cm⁻¹→753 cm⁻¹) et suggèrent ainsi la bonne conservation des propriétés électroniques de l'espèce Fe^{III} pendant l'étape d'irradiation. Les résultats présentés ci-dessus correspondent à une protéine saturée en substrat arginine et cofacteur BH₄ et en absence de dioxygène. Nous avons testé d'autres conditions, notamment en absence de substrat et de cofacteur et en présence de dioxygène. Les fréquences de résonance de l'espèce Fe^{III} HS-5C avant et après irradiation pour chacune de ces conditions sont reportées dans le [Tableau 31](#) et indiquent une bonne conservation du site catalytique durant l'étape d'irradiation.

iNOSoxy, espèce Fe ^{III} HS		V ₅	V ₇	V ₁₆	V ₄	V ₃	V _{viny}	V _{4pp}
	Avant irradiation	1129,1	677,0	753,5	1374,2	1503,3	1627,3	N.D.
-BH ₄ -Arg	Après irradiation, anaérobique	1130,7	676,0	751,1	1376,0	1506,8	N.D.	N.D.
	Après irradiation, aérobique	1131,9	675,0	751,0	1374,8	1502,1	N.D.	N.D.
	Avant irradiation	1121,6	676,9	753,9	1373,8	1489,3	1627,4	1429,3
+BH ₄ +Arg	Après irradiation, anaérobique	1129,0	674,0	753,0	1373,7	1491,6	1627,1	1429,7
	Après irradiation, aérobique	1119,0	675,0	ND	1372,5	1490,5	1626,0	N.D.

Tableau 31 : Valeurs des modes vibrationnels (en cm⁻¹) de l'espèce Fe^{III} HS-5C de iNOSoxy en présence ou absence du substrat arginine, du cofacteur BH₄ ou du dioxygène, avant et après l'étape irradiation d'une dose de 36,2 kGy.

L'irradiation gamma génère de nombreux radicaux dans le solvant aqueux (voir Chapitre 2, 6.). Ces espèces réactives pourraient réagir avec les résidus acides aminés du site actif, le substrat arginine ou le cofacteur BH₄. La comparaison des valeurs de g et des modes vibrationnels de la porphyrine avant et après irradiation indique l'absence de modifications structurales des sites catalytiques de iNOSoxy et bsNOS. Aucune oxydation ou réduction du macrocycle de la porphyrine n'est détectée. La même comparaison, avec les échantillons contenant le dioxygène, indique l'absence de réactions oxydantes, à proximité du site catalytique, liées à la présence particulière du dioxygène. Ces analyses comparatives indiquent que **l'ensemble de la procédure expérimentale (forte concentration en glycérol, exposition à une forte dose d'irradiation gamma, analyses en conditions cryogéniques) n'affecte pas de manière significative les signatures spectrales obtenues par spectroscopies RPE et Raman de résonance et préserve les propriétés électroniques du site catalytique.**

2.1.2. Intégrité fonctionnelle du site actif de iNOSoxy et bsNOS

Nous avons également mesuré l'impact de ce protocole de cryo-réduction sur la fonction de synthèse de NO de la protéine. Les échantillons sont totalement décongelés après irradiation et nous avons, dans un premier temps, analysé le complexe Fe^{II}CO par spectroscopie UV-visible et, dans un second temps, mesuré l'activité d'oxydation du NOHA.

Test P450 des protéines iNOSoxy et bsNOS après l'étape d'irradiation :

La [Figure 119](#) représente les spectres UV-visible des complexes Fe^{II}CO de iNOSoxy ([Figure 119 A](#) et [Figure 119 B](#)) et bsNOS ([Figure 119 C](#) et [Figure 119 D](#)) en présence du substrat arginine ou du cofacteur BH₄. Les spectres noirs représentent les signatures spectrales des espèces Fe^{II}CO

formées avec la protéine avant son irradiation et les spectres bleus celles obtenues après la congélation de l'échantillon à 77 K, son irradiation (dose de 76,5 kGy) et sa décongélation. En vert sont représentées les déconvolutions gaussiennes du spectre après irradiation. Elles permettent de déterminer la proportion d'espèce adoptant soit une conformation 6C (absorption à 450 nm) soit une conformation présentant une altération de lien proximal (absorption à 420 nm). Cette dernière conformation correspond à une forme non fonctionnelle des NOS [187, 218]. Dans le cas de iNOSoxy, la proportion d'espèce P420 en présence d'arginine, avant la séquence d'irradiation, est de 25 %. Après irradiation de l'échantillon, cette proportion n'augmente pas et même diminue à 15 %. Cela pourrait être expliqué par un temps d'incubation plus long en présence du substrat arginine pour l'échantillon irradié. Ainsi la transition de l'hème de la configuration BS-6C vers la configuration HS-5C est plus aboutie que pour l'échantillon étudié avant le processus d'irradiation. En présence du cofacteur BH₄ la proportion d'espèce P420 après le processus d'irradiation est de 12 % et reste donc négligeable.

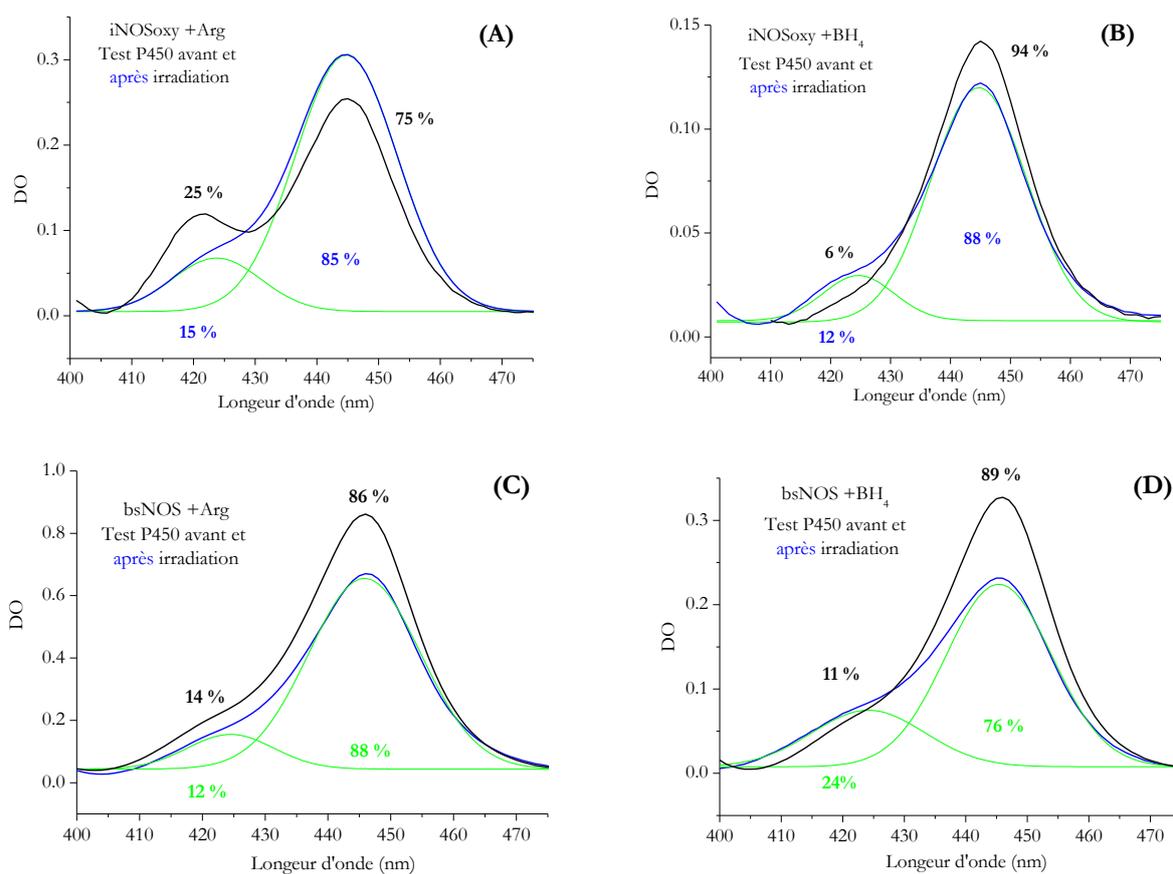


Figure 119 : Test P450 : spectres UV-visible des complexes Fe^{II}CO de iNOSoxy et bsNOS en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄ avant (en noir) et après (en bleu) l'irradiation d'une dose de 76,5 kGy.

Dans le cas de bsNOS les proportions d'espèces P420 mesurées après irradiation des échantillons sont dans les mêmes ordres de grandeur que celles constatées pour iNOSoxy.

Ainsi, la proportion d'espèce P420 se situe entre 5 et 25 % avant irradiation et entre 10 et 25 % après irradiation. Ces résultats indiquent que la stabilité du lien thiolate et la force de liaison fer-soufre de iNOSoxy et bsNOS n'est pas perturbée de manière significative par la séquence de congélation, irradiation, décongélation des échantillons.

Analyse fonctionnelle des protéines iNOSoxy et bsNOS après l'étape d'irradiation :

Afin de mesurer les conséquences de l'irradiation sur le site catalytique et l'intégrité fonctionnelle de la protéine, nous avons vérifié la capacité de iNOSoxy à catalyser l'oxydation du substrat NOHA en nitrite (test de Griess, voir Chapitre 2, 2. [241]) après la séquence de congélation et d'irradiation. Nous avons mesuré la production en nitrite des deux échantillons utilisés ci-dessus pour le test P450 (avec le substrat arginine (Figure 120 A) ou avec le cofacteur BH₄ (Figure 120 B) pour différentes concentration en BH₄ avant (Figure 120, en noir) et après irradiation (Figure 120, spectres bleus).

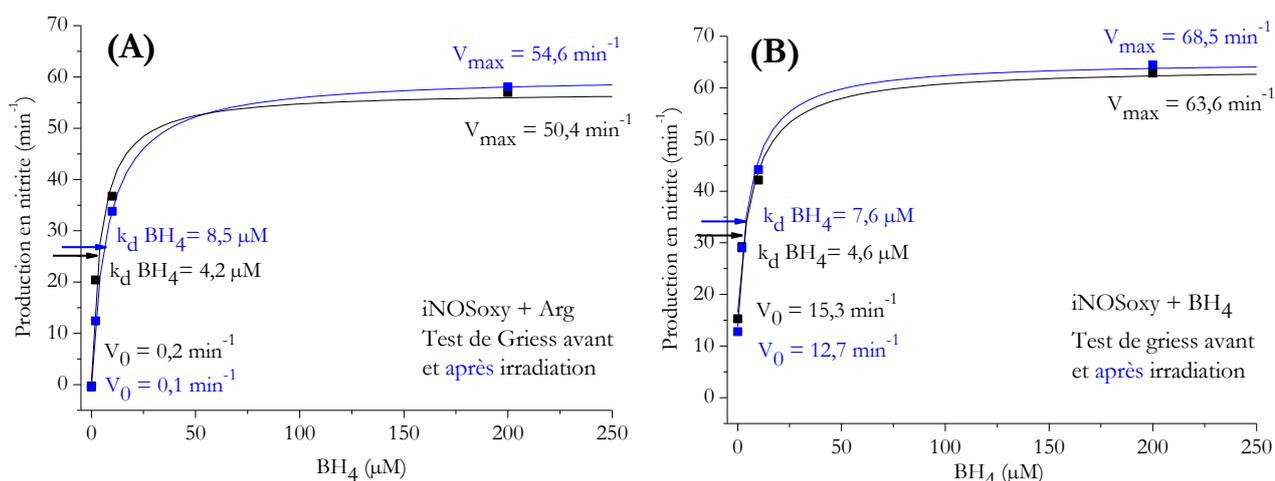


Figure 120 : Test de Griess : production en nitrites pour différentes concentrations en cofacteur BH₄. Test réalisé sur iNOSoxy préparé soit en présence du substrat arginine (A) ou du cofacteur BH₄ (B) avant (en noir) et après (en bleu) l'irradiation d'une dose de 76,5 kGy.

La différence de V₀ (vitesse de production en absence du cofacteur) entre les deux échantillons est expliquée par la présence, au préalable, de cofacteur BH₄ pour l'échantillon B. Ainsi la V₀ mesurée n'est pas la V₀ réelle pour cet échantillon en particulier. Pour les deux conditions testées, les vitesses de formation maximales de nitrite après irradiation (55 min⁻¹ - 69 min⁻¹) sont très proches de celles mesurée avant l'irradiation (51 min⁻¹ - 64 min⁻¹) et indique que nos conditions opératoires (congélation et irradiation) n'altèrent pas la fonctionnalité du site catalytique. D'autre part, la valeur k_d du cofacteur BH₄ (aux environs de 5 μM pour les quatre courbes étudiées) est très

proche de celle rapportée dans la littérature [113, 242]. Cela indique que nos conditions n'interfèrent pas avec la fixation du cofacteur BH_4 et préservent ainsi son rôle crucial dans la catalyse.

La comparaison des signatures spectrales, de la stabilité du lien thiolate, de l'activité enzymatique de iNOSoxy et bsNOS, avant et après irradiation, indique que nos conditions expérimentales n'affectent ni la structure, ni les propriétés électroniques ni l'activité du site catalytique.

2.2. Evaluation de l'efficacité de l'irradiation gamma pour initier la réaction

2.2.1. Etude de la réduction du fer de l'hème

Par spectroscopie Raman de résonance :

La [Figure 121](#) représente, en noir, le spectre Raman de résonance de l'espèce de départ Fe^{III} de iNOSoxy en présence de substrat arginine, du cofacteur BH_4 et en absence de dioxygène. Les modes vibrationnels caractéristiques de l'espèce Fe^{III} sont détaillés en partie 2.1.1. La signature spectrale représentée en rouge est obtenue après réduction de l'espèce Fe^{III} par ajout de dithionite et présente des modes vibrationnels caractéristiques de l'espèce Fe^{II} . Dans la zone des hautes fréquences l'intensité du marqueur ν_4 à 1374 cm^{-1} est très atténuée au profit d'une bande à 1349 cm^{-1} caractéristique de l'espèce réduite tout comme l'apparitions de bandes ν_4 dépolarisées à $1367, 1394 \text{ cm}^{-1}$ et ν_{4pp} à 1423 cm^{-1} [102, 243]. La bande ν_3 est décalée de 1489 à 1469 cm^{-1} ce qui est typique d'une espèce HS-5C à l'état réduit [186]. Dans la zone des basses fréquences la bande ν_{16} est décalée vers 748 cm^{-1} et son intensité est significativement augmentée.

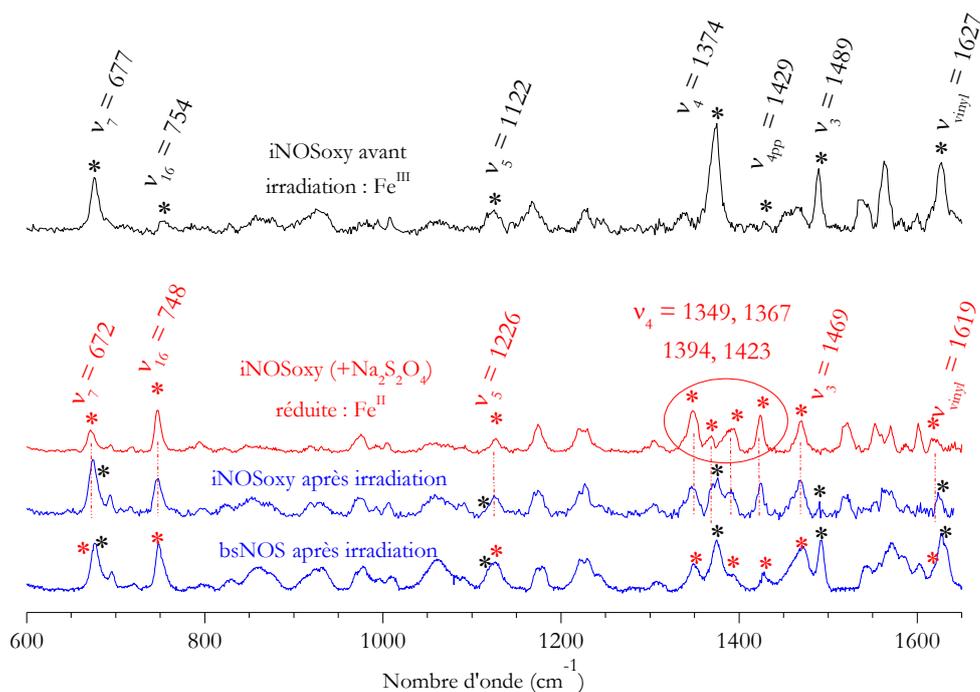


Figure 121 : Spectres obtenus en Raman de résonance pour la protéine iNOSoxy en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄ avant l'étape d'irradiation (en noir). Spectre de iNOSoxy obtenu après réduction par ajout de dithionite (en rouge) et spectre de iNOSoxy et bsNOS après irradiation (en bleu) d'une dose de 36,2 kGy. Les marques noires représentent les contributions spectrales de l'espèce Fe^{III} HS-5C et les marques rouges les contributions de l'espèce Fe^{II}.

Les spectres de iNOSoxy et bsNOS après irradiation sont représentés en bleu sur la **Figure 121** (dose de 36,2 kGy). Nous retrouvons les contributions spectrales caractéristiques de l'espèce Fe^{III} (marques noires), mais également l'apparition de nouvelles contributions spectrales similaires à celles obtenues après réduction par le dithionite (donc caractéristiques de l'espèce Fe^{II}) : v₄ : 1349 cm⁻¹, v₄ dépolarisé : 1392 cm⁻¹ et v_{4pp} 1425 cm⁻¹, v₃ : 1469 cm⁻¹ v₁₆ : 748 cm⁻¹ dans le cas de iNOSoxy (**Tableau 32**). Dans le cas de bsNOS les modes vibrationnels de l'espèce Fe^{II} ont les valeurs suivantes : v₂ : 1572 cm⁻¹ v₄ : 1348 cm⁻¹, v₃ : 1467 cm⁻¹, v₇ : 677 cm⁻¹, v₁₀ : 1602 cm⁻¹ et v₁₆ : 748 cm⁻¹ similaires à celles rapportées dans la littérature pour cette espèce Fe^{II} [102, 195]. Ces résultats indiquent que la radiolyse de l'eau induite par l'irradiation gamma de l'échantillon en condition cryogénique est efficace pour réduire l'espèce Fe^{III} en espèce Fe^{II}. Les résultats présentés ci-dessus correspondent à une protéine conditionnée avec le substrat arginine et le cofacteur BH₄ en absence de dioxygène. Nous avons testé d'autres conditions, notamment l'absence de substrat et de cofacteur et la présence de dioxygène. Pour toutes les conditions testées, nous observons, après l'irradiation, l'apparition des modes vibrationnels caractéristiques de l'espèce Fe^{II} (reportées dans le **Tableau 32**).

espèce Fe ^{II}		v ₅	v ₇	v ₁₆	v ₄	v ₃	v ₁₀ / v _{vinyl}	v _{4pp}
					1348,9			
	iNOSoxy , Na ₂ S ₂ O ₄	1131,2	674,6	746,7	1368,2	1467,8	-/1619,5	1424,8
-BH ₄					1391,9			
-Arg	iNOSoxy , Après irradiation, anaérobie	N.D.	676,4	N.D.	1351,5	1471,8	N.D.	1426,2
					1391,2			
	iNOSoxy , Après irradiation, aérobie	1127,5	675,2	N.D.	1350,3	1470,6	N.D.	1425,1
					1391,2			
					1349,1			
	iNOSoxy , Na ₂ S ₂ O ₄	1126,0	671,7	747,6	1366,6	1469,4	-/1619,0	1423,1
					1393,5			
+BH ₄	iNOSoxy , Après irradiation, anaérobie	1126,0	674,0	747,6	1349,1	1469,4	-/1620,0	1425,1
+Arg					1392,3			
	iNOSoxy , Après irradiation, aérobie	1127,2	675,2	747,6	1349,1	1470,6	-/1619,0	1425,1
					1391,2			
	bsNOS , Après irradiation, anaérobie	N.D.	677,0	748,0	1348,0	1467,0	1602,0/-	N.D.

Tableau 32 : Valeurs (cm⁻¹) des modes vibrationnels de l'espèce Fe^{II} obtenue par réduction avec le dithionite (iNOSoxy) et par irradiation de l'échantillon d'une dose de 36,2 kGy (iNOSoxy et bsNOS) en présence ou absence du substrat arginine, du cofacteur BH₄ ou du dioxygène.

La similarité des valeurs des modes vibrationnels de l'espèce Fe^{II} obtenue soit par réduction chimique avec le dithionite soit par irradiation gamma confirment une bonne conservation du site catalytique pendant l'étape d'irradiation.

Afin de quantifier le rendement de réduction nous avons mesuré le rapport des intensités des bandes de vibration v_{4pp} à 1425 cm⁻¹ (contribution de l'espèce Fe^{II}) et v₇ à 675 cm⁻¹ (contribution majoritaire de l'espèce Fe^{III}) : I(v_{4pp})/I(v₇). Ainsi, nous déterminons un rendement de réduction de 35 % pour une irradiation de 36,2 kGy.

Le principal avantage de la spectroscopie par Raman de résonance est qu'elle informe sur l'ensemble des espèces présentes dans l'échantillon, sur l'état de spin et de coordination du fer. L'inconvénient majeur de cette spectroscopie, dans nos conditions opératoires, est le temps d'accumulation des spectres et parfois, la complexité d'analyse des modes vibrationnels en présence d'un mélange d'espèces.

Par spectroscopie RPE :

La spectroscopie RPE est complémentaire de la spectroscopie Raman de résonance. Elle permet d'analyser sélectivement l'espèce Fe^{III} paramagnétique et l'acquisition du spectre est

extrêmement rapide. La [Figure 122](#) représente les spectres RPE des protéines iNOSoxy et bsNOS en présence du substrat arginine, du cofacteur BH₄, en absence de dioxygène avant irradiation (en noir) et après irradiation d'une dose de 36,2 kGy (en bleu).

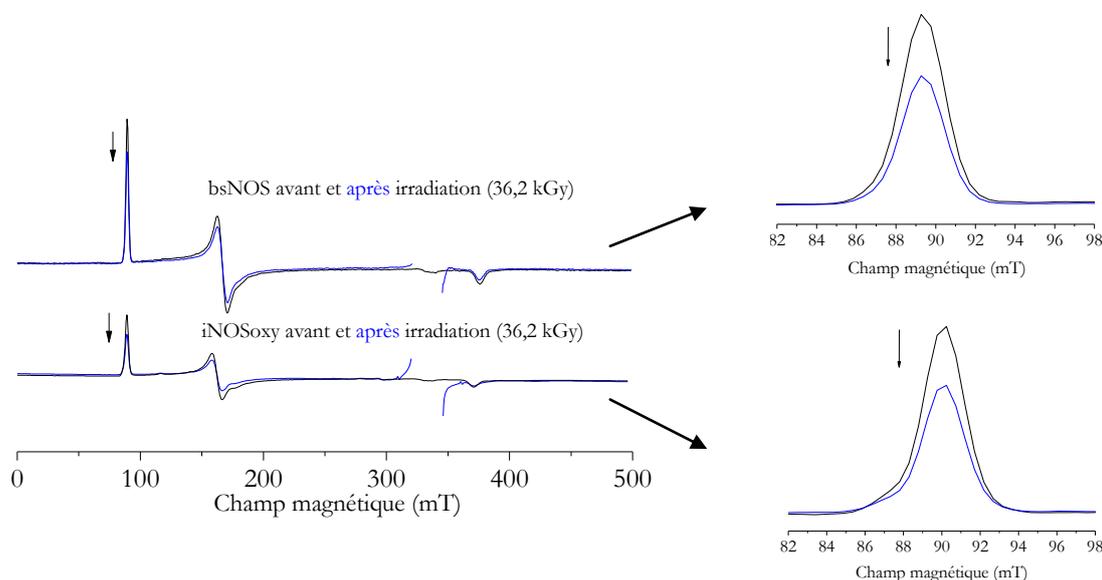


Figure 122 : Spectres RPE de iNOSoxy et bsNOS en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄ avant l'étape d'irradiation (en noir) et après irradiation (en bleu) d'une dose de 36,2 kGy et zoom sur la partie de spectre à $g_{1\text{eff}}$.

Après l'irradiation, l'intensité du signal RPE de l'espèce Fe^{III} a diminué. Le rapport des intensités ou de la double intégration du signal à $g_{1\text{eff}}$ de l'espèce Fe^{III} avant et après irradiation permet d'estimer la proportion d'espèce qui a été réduite à l'état Fe^{II}. De cette façon nous déterminons un rendement de réduction de 34 % pour une irradiation de 36,2 kGy dans le cas de iNOSoxy. **Nous observons une bonne cohérence concernant la mesure du rendement de réduction entre les deux techniques spectroscopiques étudiées : 34 % avec la spectroscopie RPE versus 35 % avec la spectroscopie Raman de résonance.**

2.2.2. Effet de la dose d'irradiation sur le rendement de réduction

Les parties précédentes montrent que l'irradiation n'altère pas les propriétés électroniques de l'hème même pour de fortes doses d'irradiation (76,5 kGy). Nous montrons également que l'irradiation permet de réduire le fer jusqu' à 35 % environ pour une dose de 36,2 kGy. Nous avons cherché à optimiser cette étape de réduction en étudiant l'effet de la dose d'irradiation sur le rendement de réduction. Nous choisissons d'utiliser la spectroscopie RPE pour mesurer ces rendements. La [Figure 123](#) représente la partie $g_{1\text{eff}}$ du signal de l'espèce Fe^{III} de bsNOS et iNOSoxy

en présence (aérobie) ou absence (anaérobie) de dioxygène pour différentes doses d'irradiation : 22,2 kGy, 51,0 kGy et 76,5 kGy.

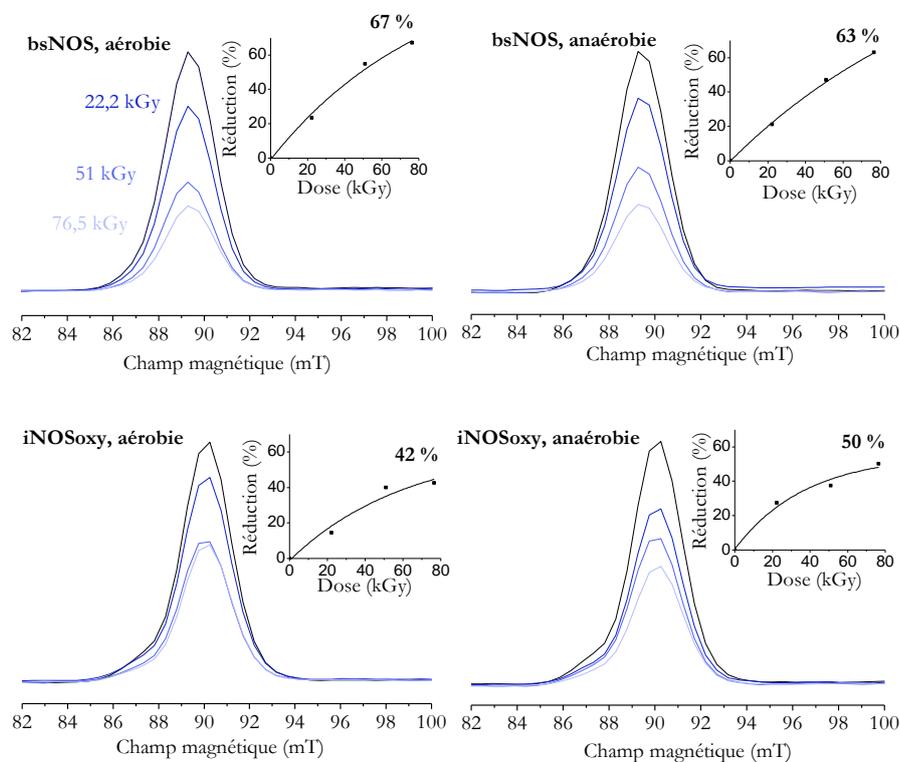


Figure 123 : Zone g_{eff} des spectres RPE de iNOSoxy et bsNOS en présence du substrat arginine et du cofacteur BH_4 et en présence ou absence de dioxygène avant l'étape d'irradiation (en noir) et après irradiation des doses de 22,2 kGy, 51,0 kGy et 76,5 kGy (différents teintes de bleus).

Nous observons une diminution progressive du signal Fe^{III} corrélée à l'augmentation de la dose d'irradiation pour les quatre conditions présentées. **La réduction du fer augmente avec la dose irradiation jusqu'à atteindre un plateau aux alentours de 60 %** de réduction ce qui est relativement proche des taux observés avec la myoglobine (aux environs de 75 % [244]). La différence entre les deux types de protéines (60 % pour la NOS *versus* 75 % pour la myoglobine) pourrait être expliquée par la différence de pourcentage de glycérol dans l'échantillon (50 % pour la NOS *versus* 65 % pour la myoglobine) ou la différence dans le débit de dose d'irradiation (20 à 30 Gy par minute pour la NOS *versus* 200 Gy par minute pour la myoglobine). Afin de se rapprocher au maximum du taux idéal de 100 % de réduction, la concentration en protéine pourrait être diminuée. Les résultats présentés concernent des échantillons protéiques ayant une concentration comprise entre 150 à 200 μM . Diminuer la concentration aux environs de 75-100 μM permettrait probablement d'améliorer le rendement de réduction tout en restant dans des gammes détectables par spectroscopie RPE ou Raman de résonance.

Nous observons que le rendement de réduction varie de 42 % pour iNOSoxy en condition aérobie, en présence du substrat et du cofacteur jusqu'à 67 % pour bsNOS dans les mêmes conditions. La partie suivante traite de ce point et du caractère significatif (ou pas) de ces variations de rendement de réduction.

2.2.3. Effet du substrat, du cofacteur et des conditions d'aérobicité sur le rendement de réduction.

L'effet de la dose d'irradiation a été testé sur un panel d'échantillons différents. Les protéines bsNOS et iNOSoxy ont été conditionnées avec ou sans le cofacteur BH_4 , avec le substrat arginine, le substrat NOHA ou sans substrat et en présence ou en absence de dioxygène (20 conditions différentes en trois exemplaires).

La Figure 124 représente le signal g_{eff} observé en spectroscopie RPE de l'espèce Fe^{III} de la protéine bsNOS pour différentes conditions de saturation de substrat et/ou de cofacteur et en présence de dioxygène. Dans ces conditions, le rendement de réduction pour la dose maximale d'irradiation de 76,5 kGy varie de 28 % (en présence du substrat NOHA et du cofacteur BH_4) à 67 % (en présence du substrat arginine et du cofacteur BH_4).

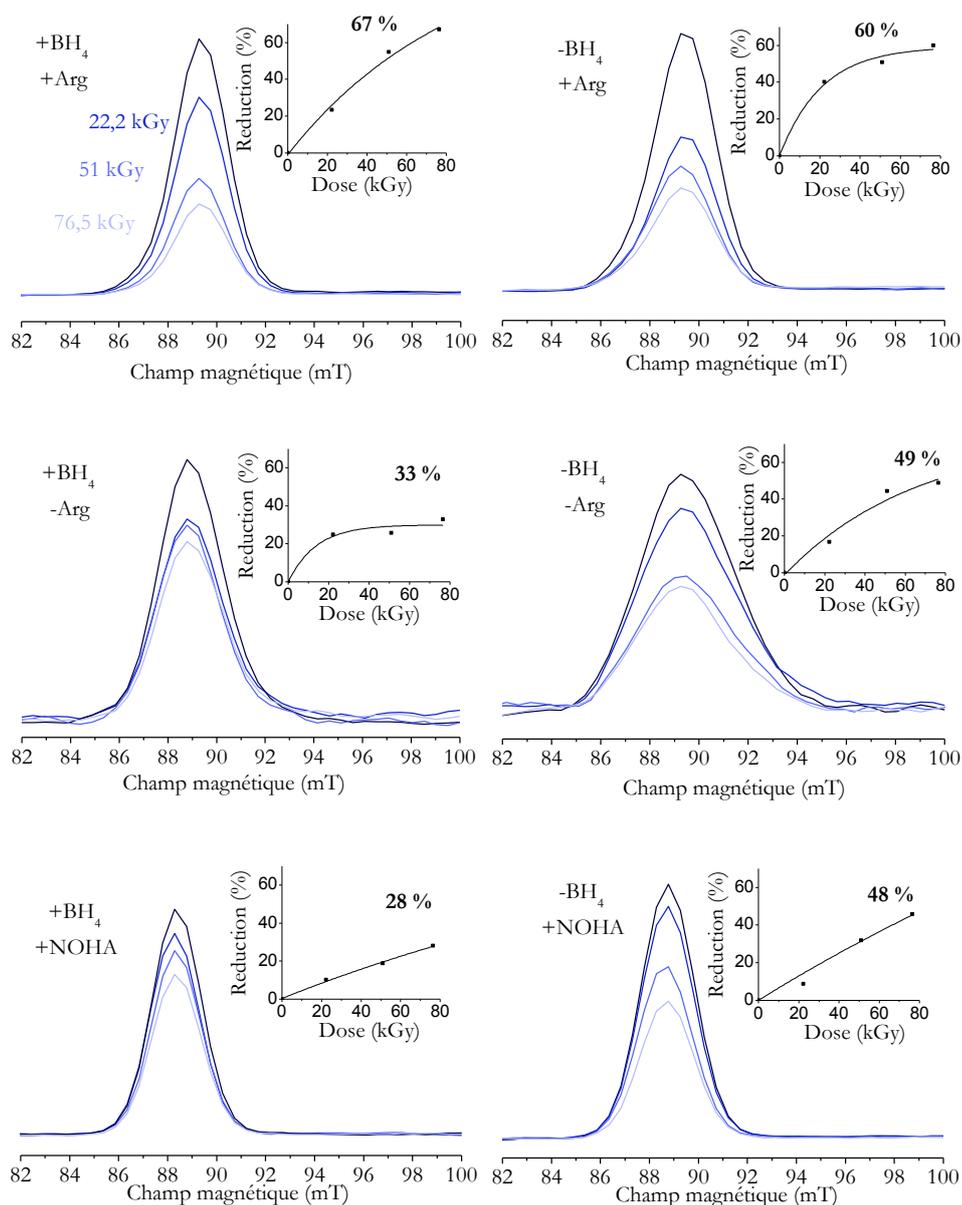


Figure 124 : Zone $g_{1\text{eff}}$ des spectres RPE de bsNOS pour différentes conditions de saturation en substrat et cofacteur, en présence de dioxygène avant l'étape d'irradiation (en noir) et après irradiation des doses de 22,2 kGy, 51,0 kGy et 76,5 kGy (différents teintes de bleus).

Les résultats obtenus pour les autres conditions étudiées (bsNOS en condition anaérobie et iNOSoxy) sont reportés dans le [Tableau 33](#). Dans le cas de iNOSoxy, le plus faible rendement de réduction est observé en présence du substrat arginine et du cofacteur BH₄ en condition aérobie (42 %) et le meilleur rendement de réduction est observé sans substrat et en absence du cofacteur BH₄ en condition anaérobie (74 %).

			Rendement de réduction (%)		
			22,2 kGy	51,0 kGy	76,5 kGy
iNOSoxy	-Arg -BH ₄	Aérobique	19	62	64
	-Arg -BH ₄	Anaérobique	51	64	74
	+Arg +BH ₄	Aérobique	15	40	42
	+Arg +BH ₄	Anaérobique	27	38	50
	+Arg	Aérobique	17	43	61
	+Arg	Anaérobique	25	N.D.	62
	+BH ₄	Aérobique	27	45	58
	+BH ₄	Anaérobique	29	43	57
	+NOHA +BH ₄	Aérobique	25	49	61
	+NOHA	Aérobique	15	25	70
bsNOS	-Arg -BH ₄	Aérobique	17	44	49
	-Arg -BH ₄	Anaérobique	26	N.D.	60
	+Arg +BH ₄	Aérobique	23	55	67
	+Arg +BH ₄	Anaérobique	21	47	63
	+Arg	Aérobique	40	51	60
	+Arg	Anaérobique	22	41	55
	+BH ₄	Aérobique	25	26	33
	+BH ₄	Anaérobique	20	42	57
	+NOHA +BH ₄	Aérobique	10	19	28
+NOHA	Aérobique	9	32	46	

Tableau 33 : Rendements de réduction (en %) calculés pour iNOSoxy et bsNOS dans différentes conditions de saturation en substrat, en cofacteur et en dioxygène après irradiation des doses de 22,2 kGy, 51,0 kGy et 76,5 kGy. Les rendements minimums et maximums pour chacune des protéines sont indiqués en gras.

Afin d'étudier les différents paramètres (condition de saturation en substrat et cofacteur, présence ou absence de dioxygène et nature de la protéine étudiée) nous avons réalisé une analyse statistique de nos données.

Effet de la présence de dioxygène :

La présence de dioxygène dans l'échantillon pourrait interférer avec le processus de réduction. Les électrons éjectés et les radicaux formés par radiolyse de l'eau pourraient réagir préférentiellement avec le dioxygène et entrer en compétition avec la réduction du fer. Sur la Figure 125 est représentée l'analyse statistique des échantillons contenant (en rouge) ou ne contenant pas (en noir) de dioxygène pour une dose d'irradiation de 76,5 kGy. Les rendements de réduction maximums et minimums sont annotés par un point en forme d'étoile. Les points en forme de carrés

correspondent à la moyenne de ce rendement, le trait horizontal à la médiane et les « boîtes » rectangulaires à l'erreur standard.

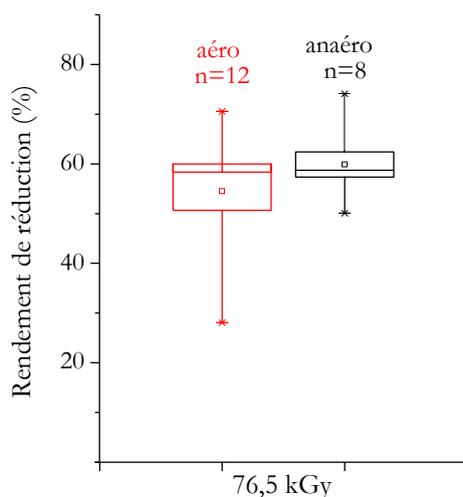


Figure 125 : Analyse statistique de l'effet de la présence ou de l'absence de dioxygène sur le rendement de réduction.

Le chevauchement des « boîtes » correspondant aux erreurs standards entre les échantillons contenant du dioxygène et ceux n'en contenant pas, indique que les différences observées entre les deux groupes ne sont pas significatives. Cela laisse supposer que **la présence de dioxygène n'interfère pas de manière significative avec le processus de réduction.**

Effet de la présence du substrat ou du cofacteur :

La présence de cofacteur et du substrat permet une meilleure structuration de la protéine et le site actif adopte une configuration plus « fermée ». Ainsi leur présence pourrait diminuer la concentration des espèces réductrices à proximité du site actif. La même analyse statistique a été réalisée pour l'effet de la présence du substrat (Figure 126 A) ou du cofacteur (Figure 126 B) sur le rendement de réduction.

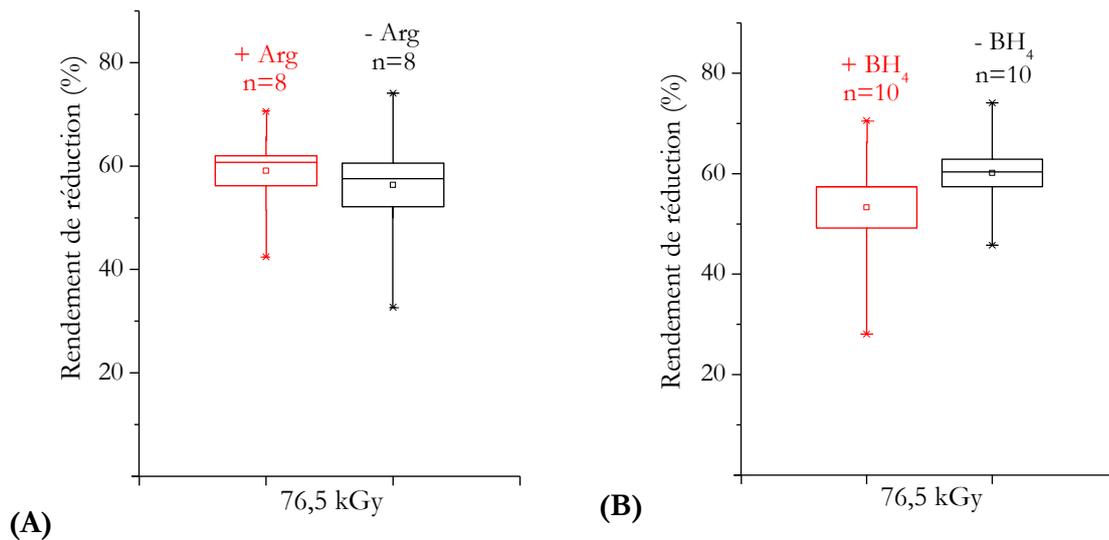


Figure 126 : Analyse statistique de l'effet de la présence ou de l'absence du substrat arginine ou du cofacteur BH₄ sur le rendement de réduction du fer.

Les erreurs standards des échantillons contenant le substrat arginine ou le cofacteur BH₄ (en rouge) chevauchent les erreurs standards des échantillons ne contenant pas le substrat ou le cofacteur (en noir). Ainsi nous concluons que, malgré des variations *a priori* importantes, **ni le substrat ni le cofacteur ne semblent impacter significativement le rendement de réduction.**

Effet du type de protéine étudié :

Enfin, nous avons comparé les rendements de réduction obtenus avec iNOSoxy (Figure 127 en noir) et bsNOS (Figure 127 en rouge).

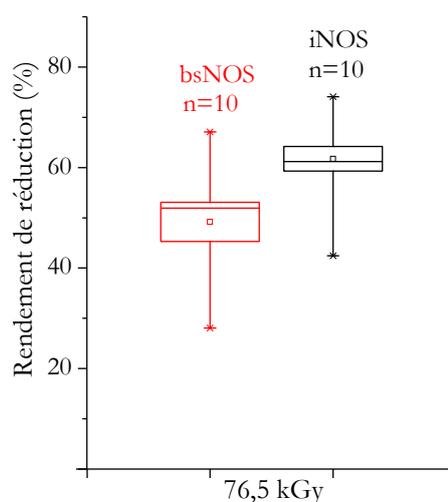


Figure 127 : Analyse statistique de l'effet de la protéine étudiée sur le rendement de réduction du fer.

Dans le cas de la dose la plus élevée (76,5 kGy) l'erreur standard mesurée sur les échantillons de NOS bactérienne ne chevauche pas celle obtenue avec iNOSoxy. Ainsi la différence de rendement de réduction (plus faible dans le cas de bsNOS) est considérée comme significative. Les échantillons contenant la protéine bsNOS ont été préparés avec une concentration plus élevée (200 μM) que pour iNOSoxy (plutôt 150 μM) et pourrait justifier alors la difficulté à atteindre des rendements de réduction élevés dans le cas de bsNOS.

D'une manière générale, les rendements de réduction observés sont assez variables (28 % à 74 %) mais ne peuvent pas être reliés de manière significative à la présence ou absence de substrat et la présence ou absence de dioxygène. Nous pensons que ces variations sont probablement dues aux erreurs spécifiques à nos conditions expérimentales : erreur sur la concentration en protéine, détermination de la dose d'irradiation (positionnement de l'échantillon par rapport à la source), erreur sur l'analyse spectroscopique.

2.3. Conclusion

L'analyse des échantillons irradiés de NOS à l'état Fe^{III} en condition cryogénique montrent que l'intégrité structurale et électronique du site actif est préservée dans nos conditions expérimentales. Nous observons des rendements de réduction aux environs de 60 % en moyenne et pouvant aller jusqu'à 74 %. Une diminution des concentrations en protéine pourrait encore améliorer ce taux. Il n'y a pas de variations significatives entre la configuration du dimère « ouvert » (iNOSoxy sans substrat et sans cofacteur [79, 113], la configuration du dimère « fermé » (iNOSoxy en présence de substrat et de cofacteur [94, 111] ou bsNOS).

La présence ou l'absence de substrat, de cofacteur ou de dioxygène n'induisent pas de compétition avec le processus de réduction du fer de l'hème. Cela permet ainsi de travailler en présence des substrats arginine et NOHA, du cofacteur naturel BH_4 et du dioxygène, soit les conditions nécessaires pour étudier le cycle catalytique des NOS. La réduction est observée tant pour iNOSoxy que pour bsNOS et semble efficace pour initier la réaction dans des conditions à peu près quantitatives. Cela doit permettre de comparer les mécanismes catalytiques de iNOSoxy et bsNOS.

A la fin des expériences de réduction, le large panel d'échantillons de NOS à l'état Fe^{II} , en présence ou absence de dioxygène, de substrat et de cofacteur est conservé à 77 K. Nous pouvons alors procéder aux sauts en température qui ont pour but de déterminer le seuil thermique à partir duquel le gaz O_2 sera capable de se fixer au fer à l'état réduit et former l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ attendue dans le cycle catalytique.

3. Sauts en température pour observer la fixation des gaz CO ou O₂ sur le fer

3.1. Introduction

Les sauts en température devraient permettre de faire évoluer la réaction par étapes et ainsi de piéger des intermédiaires réactionnels. Comme la réduction du fer de l'hème à 77 K est induite par irradiation gamma en présence de dioxygène *in situ*, la première espèce attendue après les sauts en température devrait être le complexe Fe^{II}O₂. Notre premier objectif a été de déterminer, par spectroscopie Raman de résonance, les seuils de température à partir desquels le dioxygène pourra diffuser et se fixer sur le fer. L'espèce Fe^{II}O₂ est caractérisée par spectroscopie Raman de résonance par des fréquences de résonances des élongations O-O aux environs de 1126-1133 cm⁻¹, en fonction de l'isoforme étudié et des conditions de saturation en substrat et cofacteur ([115, 118, 159-161], voir Annexe 4)). La caractérisation de cette signature spectrale est proche de la fréquence de résonance du mode vibrationnel ν_3 des espèces Fe^{II} et Fe^{III} comprise entre 1122 cm⁻¹ et 1129 cm⁻¹. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'espèce Fe^{II}O₂ pourrait être formée sans être facilement détectée. Pour pallier ce problème, nous avons d'abord étudié des échantillons conditionnés dans des tampons saturés en gaz CO. Le complexe Fe^{II}CO est une espèce extrêmement stable et conduit la réaction dans une impasse. Ainsi, piéger une grande quantité de l'espèce Fe^{II}CO semble plus aisé, *a priori*, que de piéger l'espèce Fe^{II}O₂, beaucoup plus instable et réactive. De plus, les fréquences de résonance des modes vibrationnels de la déformation Fe-C-O et de l'élongation Fe-CO sont bien distinctes de celles des espèces Fe^{II} et Fe^{III} ce qui facilite la caractérisation du complexe Fe^{II}CO.

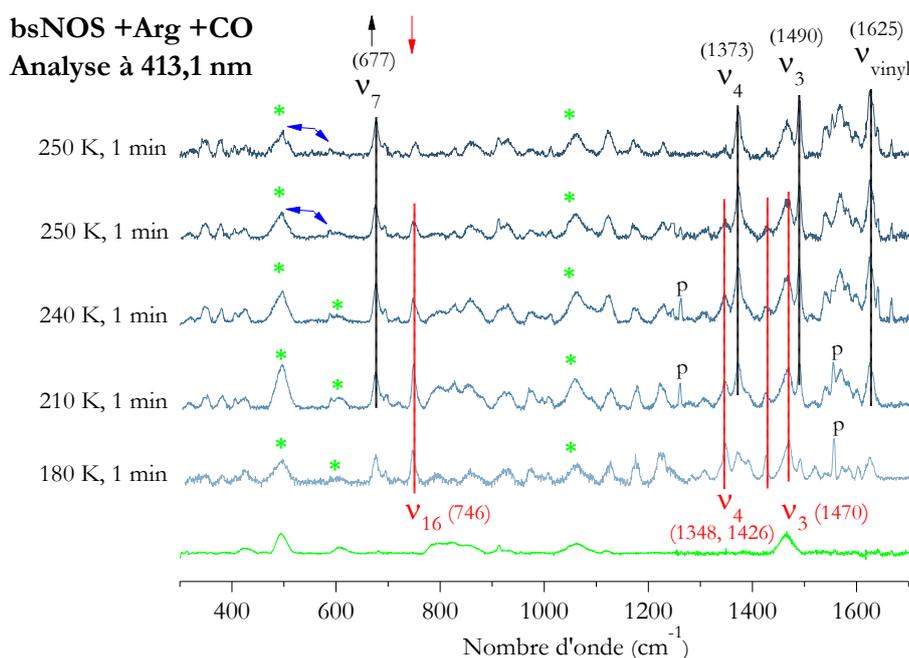
3.2. Etude de la fixation du ligand CO sur le fer

En présence du substrat arginine :

La fixation du ligand CO a d'abord été étudiée en présence de concentrations saturantes en substrats et en absence de cofacteur BH₄. Quand le substrat arginine ou NOHA est en concentration saturante avec bsNOS, la protéine adopte totalement la configuration HS-5C ce qui correspond à la configuration la plus repliée de la protéine pour laquelle le site actif est le moins accessible.

L'échantillon est irradié avec une dose de 76,5 kGy et analysé par spectroscopie Raman de résonance. Le rayonnement laser à 413,1 nm a été utilisé pour exalter les espèces Fe^{II} et Fe^{III} alors que l'espèce Fe^{II}CO sera plus facilement exaltée par un rayonnement à 441,6 nm (absorbance UV-visible à 445 nm). La [Figure 128](#) représente les spectres Raman de résonance obtenus à 413,1 nm

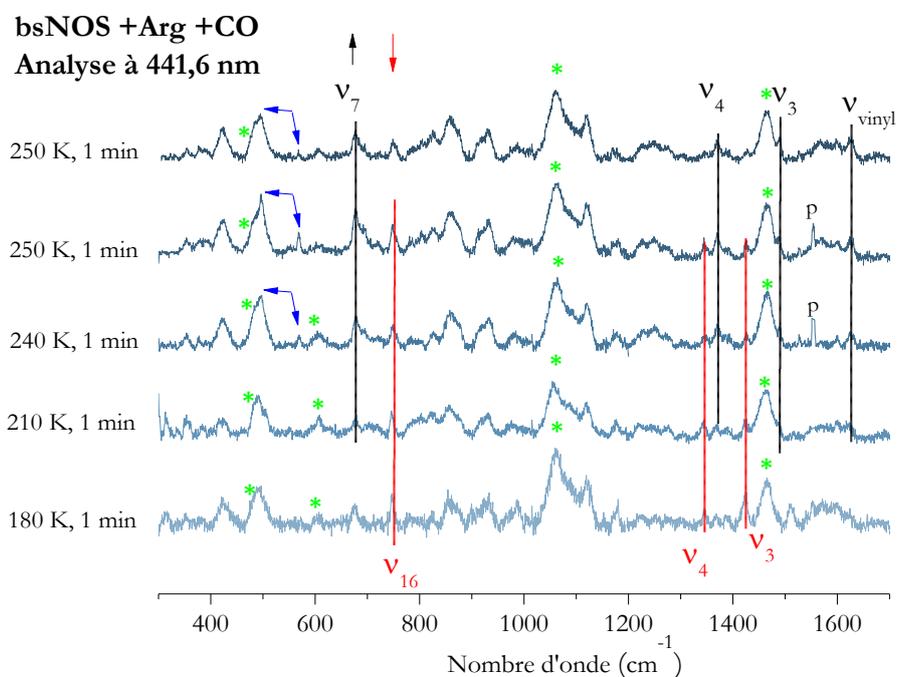
avec un échantillon de protéine bsNOS conditionnée avec le substrat arginine et un tampon saturé en gaz CO. Les sauts en température entre 180 K et 250 K permettent de suivre l'évolution des espèces Fe^{II} et Fe^{III} . Le tampon contenant 50 % de glycérol a été enregistré seul (en vert sur la [Figure 128](#)) et permet de repérer les zones de spectres contenant la signature spectrale du tampon pendant les sauts en température (marques vertes). Après irradiation et un saut en température de 1 minute à 180 K l'espèce majoritaire dans l'échantillon est une espèce réduite Fe^{II} . Nous pouvons identifier différentes fréquences caractéristiques de cette espèce (en rouge sur la [Figure 128](#)) : ν_{16} (746 cm^{-1}), ν_4 (1348 et 1426 cm^{-1}) et ν_3 (1470 cm^{-1}) similaires à celles décrites dans la littérature ([102], Annexe 4).



[Figure 128](#) : Spectres Raman de résonance à 413,1 nm de bsNOS (+arginine) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Le spectre vert est le spectre du tampon seul. (p) : artefact.

Au cours des sauts en température, la proportion d'espèce Fe^{II} diminue progressivement en particulier pour les températures au-dessus de 210 K. En parallèle la proportion d'espèce Fe^{III} avec des modes de résonance ν_{16} (677 cm^{-1}), ν_4 (1373), ν_3 (1490 cm^{-1}) et ν_{vinyl} (1625 cm^{-1}) (en noires sur la [Figure 128](#)) augmente dans la même gamme de température. La disparition de l'espèce Fe^{II} devrait conduire à la formation d'une autre espèce et le gaz CO présent dans l'échantillon pourrait se fixer sur l'espèce Fe^{II} . Dans ces conditions, l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$, très stable, pourrait être accumulée et observée par spectroscopie Raman de résonance. Les signatures spectrales des modes vibrationnels de l'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et de la déformation $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ de ce complexe sont attendues à 502 cm^{-1} et 568 cm^{-1} (flèche bleu sur la [Figure 128](#), [102]).

Afin de mieux étudier la présence ou l'absence de ce complexe dans l'échantillon, nous utilisons un rayonnement laser incident à 441,6 nm plus adapté pour exalter l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$. La [Figure 129](#) représente les spectres obtenus à 441,6 nm pour le même échantillon que celui présenté en [Figure 128](#) (bsNOS en présence d'arginine et gaz CO).



[Figure 129](#) : Spectres Raman de résonance à 441,6 nm de bsNOS (+arginine) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Les marques vertes représentent la contribution du tampon. Les flèches bleues indiquent les signatures spectrales du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$. (p) : artefact.

D'une manière générale, les spectres obtenus à 441,6 nm, dans nos conditions expérimentales sont très bruités. Les espèces Fe^{II} et Fe^{III} sont moins exaltées, par conséquent, leurs signaux sont beaucoup moins intenses. De plus la proportion de glycérol (50 %) présent dans l'échantillon confère à celui-ci un caractère très fluorescent, ce qui génère un rapport signal sur bruit plus faible et complique fortement le traitement des données. Cependant, nous caractérisons les mêmes fréquences de résonance que celles obtenues à 413,1 nm pour les espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir). Dans la zone correspondant aux basses fréquences, nous révélons de nouvelles contributions spectrales pour les températures supérieures à 210 K. Le mode vibrationnel aux environs de 500 cm^{-1} est superposé à la contribution spectrale du tampon. Afin de mieux étudier ces nouvelles signatures spectrales, nous proposons une analyse spécifique du spectre situé entre 480 et 580 cm^{-1} .

La [Figure 130](#) représente un zoom du spectre sur les basses fréquences; les raies sont simulées par des fonctions gaussiennes.

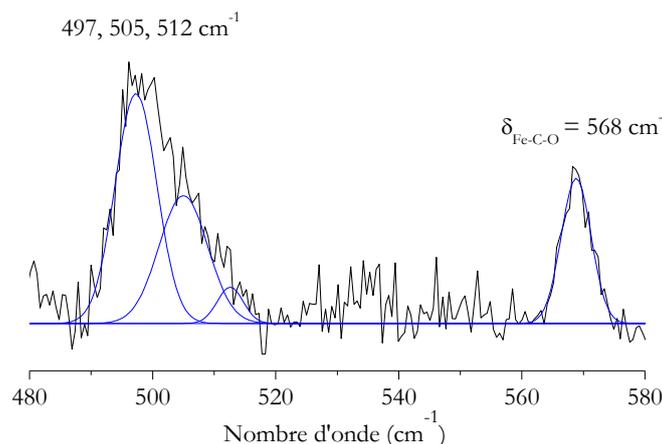


Figure 130 : Basses fréquences du spectre Raman de résonance à 441,6 nm de bsNOS (+arginine) dans un tampon saturé en gaz CO. Les simulations gaussiennes des raies sont représentées en bleu.

Les modes vibrationnels relevés sur cette zone de fréquence permettent de caractériser les fréquences de résonances suivantes : 497, 505, 512 et 568 cm^{-1} . Les fréquences observées à 505 cm^{-1} et 568 cm^{-1} sont très similaires aux modes vibrationnels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ de bsNOS en présence du substrat arginine précédemment déterminés à 502 cm^{-1} pour $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et 568 cm^{-1} pour $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ [102]. Le mode observé à 497 cm^{-1} pourrait correspondre à une contribution résiduelle du tampon ou au mode γ_{12} de la porphyrine [102]. Le mode de résonance à 512 cm^{-1} peut être attribué à un mode porphyrine. Il y a couplage de fermi entre ce mode et la bande de vibration de Fe-CO car les fréquences de résonances sont proches et cela a pour effet d'augmenter l'intensité de ce mode porphyrine [188] et de décaler le mode $\nu_{\text{Fe-CO}}$ vers une plus haute fréquence que celle attendue (502 $\text{cm}^{-1} \rightarrow 505 \text{ cm}^{-1}$).

Ainsi, nous concluons que l'espèce Fe^{II} commence à s'oxyder dès 210 K et que la fixation du gaz CO semble possible dans la même gamme de température. Cependant, au vu du signal enregistré, la proportion de complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ est extrêmement faible. Le spectre Raman de résonance est majoritairement composé des signaux caractéristiques des espèces Fe^{II} de départ et Fe^{III} finales.

Afin d'améliorer la proportion d'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ formée, nous avons cherché à optimiser les étapes de sauts en température. Nous réalisons la même séquence d'analyse que précédemment mais avec des sauts plus progressifs ciblés entre 200 et 220 K (**Figure 131**). L'analyse des spectres Raman de ce second échantillon permet de caractériser les mêmes modes vibrationnels que précédemment : l'espèce Fe^{II} (en rouge) pour les basses températures, un mélange d'espèces Fe^{II} et

Fe^{III} pour les températures intermédiaires et une espèce Fe^{III} à la fin du processus de saut en température (en noir).

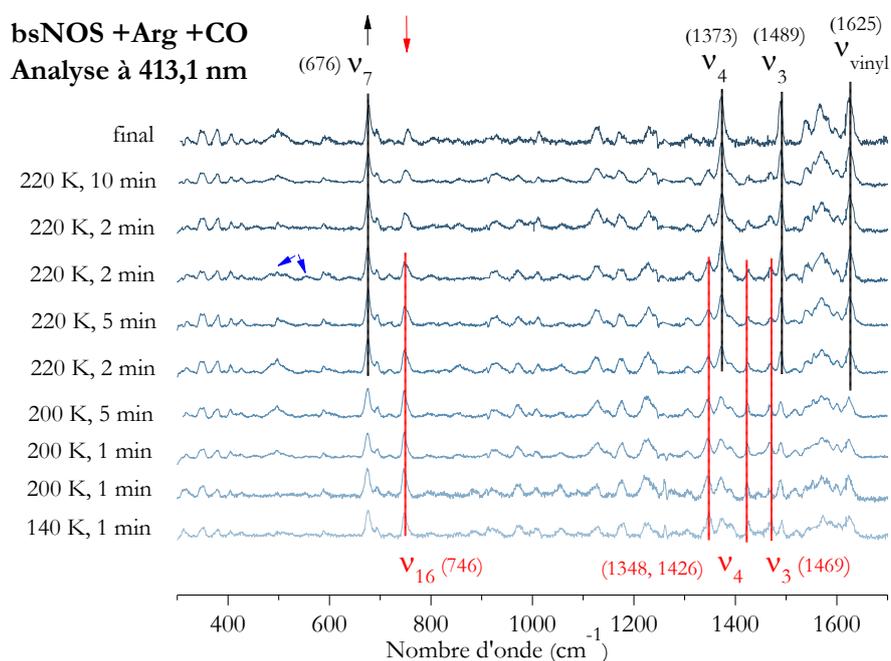


Figure 131 : Spectres Raman de résonance à 413,1 nm de bsNOS (+arginine) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Les flèches bleues indiquent les signatures spectrales attendues du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$.

Nous montrons que la disparition du signal attribué à l'espèce Fe^{II} et l'augmentation de celui attribué à l'espèce Fe^{III} ne progressent pas pendant les sauts en température réalisés jusqu'à 200 K mais évoluent progressivement pendant le saut en température réalisé à 220 K. Afin de caractériser la présence ou l'absence du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ pour les sauts en température réalisés à 220 K, l'échantillon a été analysé avec un laser à 441,6 nm (**Figure 132**).

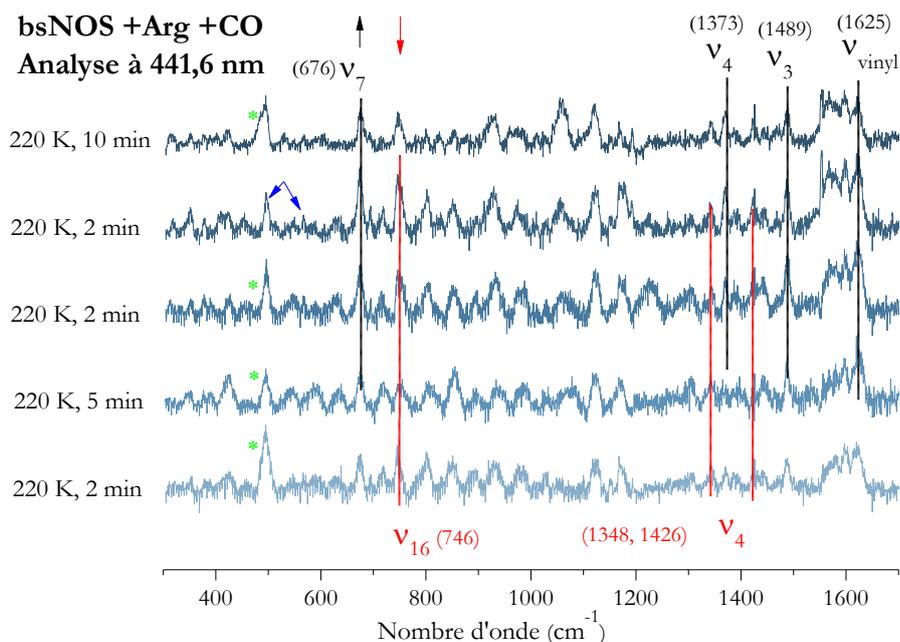


Figure 132 : Spectres Raman de résonance à 441,6 nm de bsNOS (+arginine) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Les marques vertes représentent la contribution du tampon. Les flèches bleues indiquent les signatures spectrales du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$.

Nous pointons sur le spectre les mêmes espèces Fe^{II} et Fe^{III} que celles analysées à 413,1 nm. Les résultats présentés correspondent aux spectres pour lesquels la contribution du tampon est soustraite. Il reste cependant une petite contribution du tampon aux environs de 500 cm^{-1} (marque verte sur la [Figure 132](#)), là où est attendue la fréquence de résonance du mode vibrationnel de l'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$. Les basses fréquences du spectre le plus exempt de contributions du tampon sont représentées en [Figure 133](#).

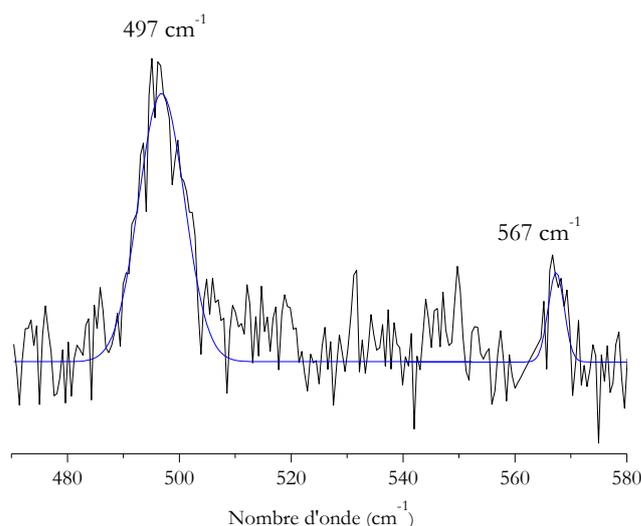


Figure 133 : Basses fréquences du spectre Raman de résonance à 441,6 nm de bsNOS (+arginine) dans un tampon saturé en gaz CO. La simulation gaussienne des raies est représentée en bleu.

Le rapport signal sur bruit est médiocre et la simulation gaussienne des pics (en bleu) ne permet pas de caractériser le mode vibrationnel $\nu_{\text{Fe-CO}}$. Le mode enregistré à 497 cm^{-1} est attribué à la contribution du tampon. Le mode observé à 567 cm^{-1} pourrait être attribué à la vibration $\nu_{\text{Fe-C-O}}$ mais reste très bruité. Nos conditions de sauts en température ne permettent pas d'observer le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ en grande quantité.

En présence du substrat NOHA :

La fixation du ligand CO a également été étudiée en présence du substrat NOHA. Comme en présence d'arginine, à 413,1 nm les espèces détectées sont une espèce Fe^{II} majoritaire au départ, qui s'oxyde au cours des sauts en température en espèce Fe^{III} (Figure 134). Les fréquences de résonance déterminées sur le spectre sont très proches de celles obtenues en présence d'arginine.

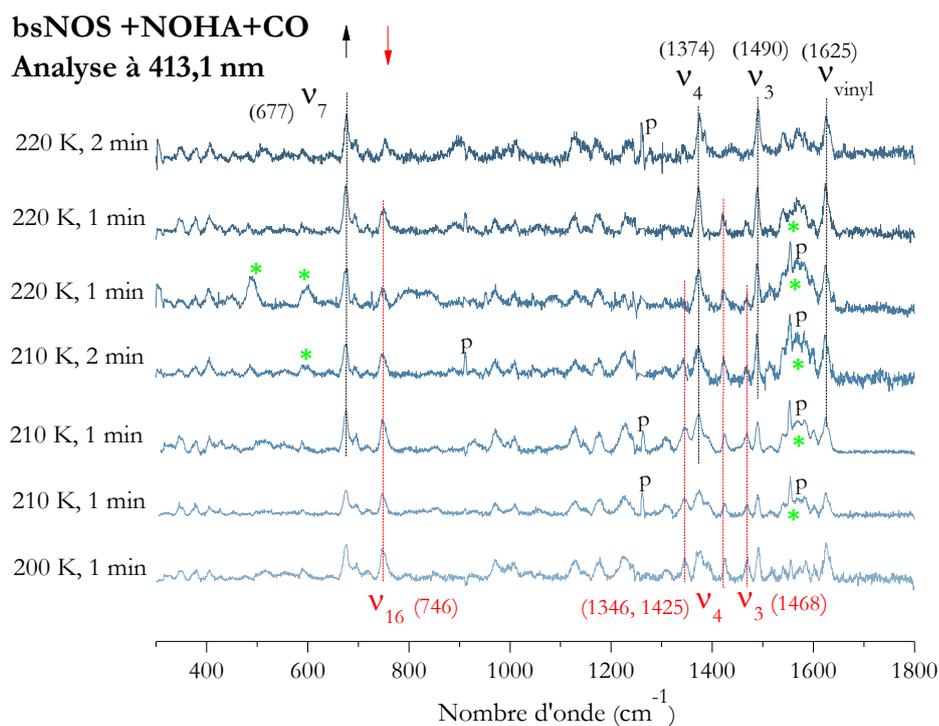


Figure 134 : Spectres Raman de résonance à 413,1 nm de bsNOS (+NOHA) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Les marques vertes correspondent à la contribution du tampon. (p) : artefact.

Les modes vibrationnels des espèces Fe^{II} et Fe^{III} de bsNOS en présence de NOHA ne sont pas rapportés dans la littérature. Nous déterminons ici des fréquences de résonance dans ces conditions expérimentales particulières et elles sont très proches de celles observées en présence d'arginine. Cependant, l'analyse des spectres est extrêmement complexe. Certains modes vibrationnels des espèces Fe^{II} , Fe^{III} (et éventuellement $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$) résonnent dans les mêmes zones de fréquence. Les raies observées sont alors dégénérées c'est-à-dire composées des modes vibrationnels de plusieurs espèces. Ainsi les modes vibrationnels de la porphyrine relevés pour l'espèce Fe^{II} et Fe^{III} en présence du substrat NOHA ne correspondent pas forcément aux modes vibrationnels purs pour cette espèce.

Les analyses obtenues à 441,6 nm permettent d'identifier les mêmes modes de vibration pour les espèces Fe^{II} et Fe^{III} que ceux déterminés à 413,1 nm (Figure 135). L'analyse des spectres entre 450 et 550 cm^{-1} ne permet pas de mettre en évidence la formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ au cours des sauts en température.

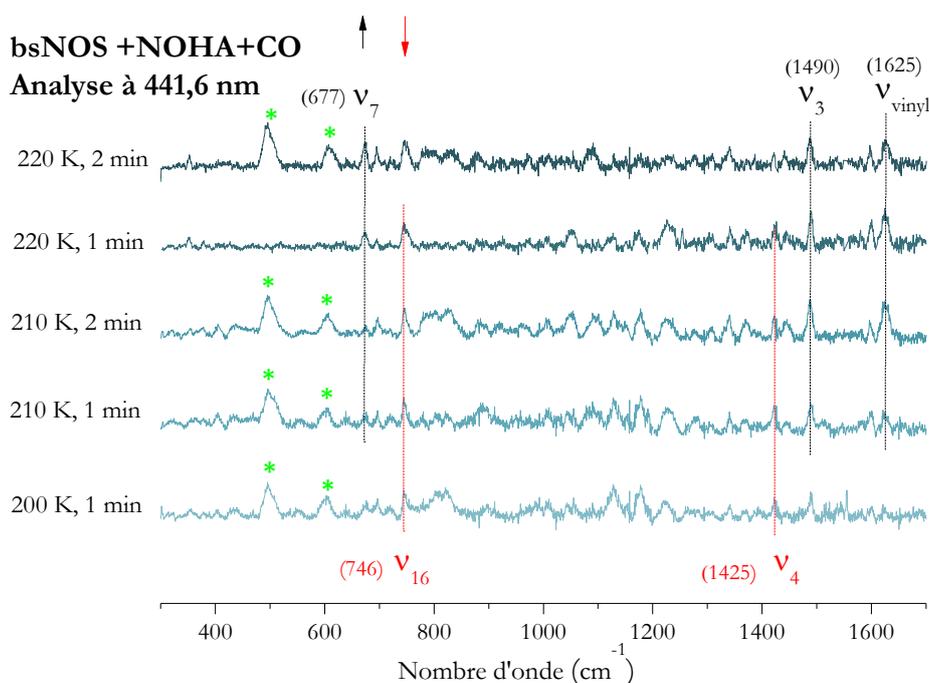


Figure 135 : Spectres Raman de résonance à 441,6 nm de bsNOS (+NOHA) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Les marques vertes correspondent à la contribution du tampon.

Ainsi le complexe Fe^{II}CO, caractérisé de manière minoritaire en présence du substrat arginine, n'est pas du tout détecté en présence du substrat NOHA.

Conclusion de l'étude de la fixation du ligand CO en présence d'un substrat :

Les analyses à 413,1 nm de la protéine bsNOS en présence du substrat arginine ou NOHA et du tampon saturé en gaz CO permettent de caractériser les températures pour lesquelles le signal attribué à l'espèce Fe^{II} diminue (> 210 K). **La diminution du signal de l'espèce Fe^{II} pourrait être associée à la formation d'une espèce Fe^{II}CO.**

En outre, l'analyse des sauts en température à 441,6 nm avec le substrat arginine indique que la fixation du gaz CO sur l'espèce Fe^{II} semble être possible pour des températures égales ou supérieures à 220 K. **Cela suggère que la température minimale pour laquelle le gaz CO, et par analogie le gaz O₂, pourrait diffuser et se fixer sur l'espèce Fe^{II} serait située autour de 220 K. Cependant l'espèce Fe^{II}CO est piégée en très faible quantité en présence d'arginine et même pas du tout en présence de NOHA. Cela indique que la disparition du signal Fe^{II} est associée à la formation d'une autre espèce que le complexe Fe^{II}CO.**

Les analyses à 413,1 nm informent également quant à l'évolution de l'espèce Fe^{III}. **Quelque soit le substrat, alors que le signal de l'espèce Fe^{II} diminue progressivement pour les températures supérieures à 210 K, le signal de l'espèce Fe^{III} augmente et pourrait suggérer que l'espèce Fe^{II} s'oxyde en Fe^{III}. Cette oxydation pourrait provenir de la diffusion du gaz O₂ de**

l'atmosphère présent à la surface de l'échantillon. Le dioxygène pourrait alors entrer en compétition avec le gaz CO pour se fixer sur l'espèce Fe^{II} . Dans ce cas de figure, l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ serait formée. Les analyses à 441,6 nm, plus proche de la bande de Soret de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (428 nm) devrait permettre de caractériser cette espèce. La fréquence de résonance O-O du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, retrouvée vers 1126 cm^{-1} pourrait être en mélange avec la fréquence du mode ν_5 de la porphyrine et serait alors difficilement caractérisée. Cependant le mode vibrationnel O-O ne semble pas être mis en évidence au cours de nos analyses à 441,6 nm. Cela indique que si l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est formée, sa vitesse de disparition, au-dessus des températures de 200 K, est déjà trop rapide pour permettre son accumulation et sa caractérisation.

En présence du cofacteur BH_4 :

Outre l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, l'autre espèce du cycle catalytique observée par spectroscopie UV-visible, en présence du cofacteur BH_4 , est l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ pendant l'oxydation du substrat NOHA. Dans le cas de iNOSoxy le temps de vie de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ est beaucoup plus important que l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (vitesse de disparition de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2=12,5-36,7\text{ s}^{-1}$ *versus* $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}=2,3\text{ s}^{-1}$ [103, 171]. Ainsi, si le dioxygène diffuse dans l'échantillon et entre en compétition avec le gaz CO pour la fixation sur l'espèce Fe^{II} , l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ serait plus facilement détectée au cours des sauts en température que l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

Nous avons donc procédé à des sauts en température pour une protéine iNOSoxy en présence du substrat NOHA, du cofacteur BH_4 et d'un tampon saturé en gaz CO. Les résultats obtenus à 413,1 nm sont exposés en [Figure 136](#).

iNOSoxy + BH₄ + NOHA + CO

Analyse à 413,1 nm

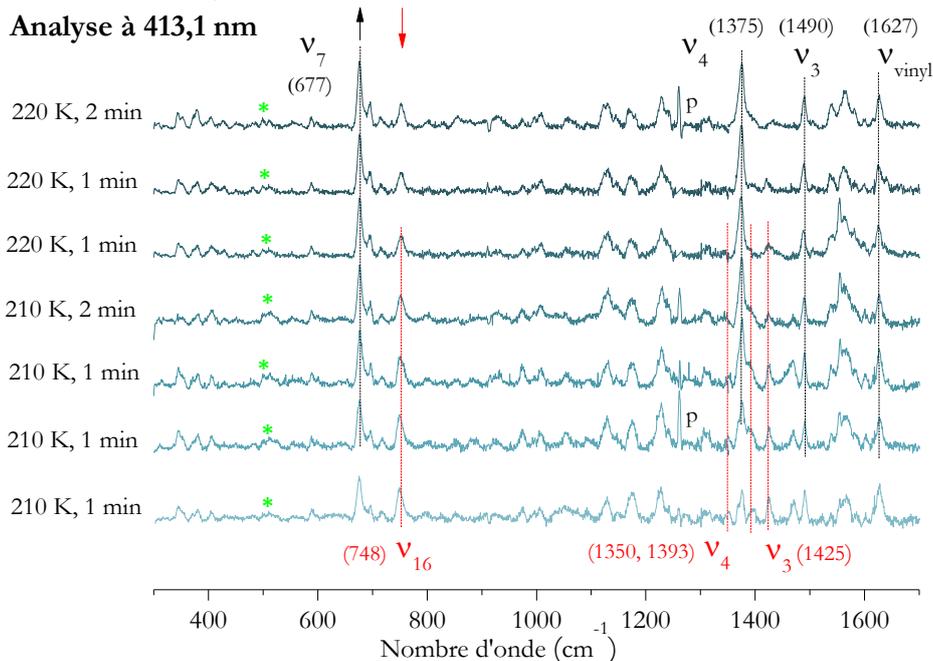


Figure 136 : Spectres Raman de résonance à 413,1 nm de iNOSoxy (+BH₄+NOHA) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Les marques vertes correspondent à la contribution du tampon. (p) : artefact.

L'espèce de départ est un mélange d'espèces Fe^{II} et Fe^{III} sur lequel nous pouvons caractériser les fréquences de résonance de l'espèce Fe^{II} en présence du cofacteur BH₄ et du substrat NOHA : ν_{16} (748 cm⁻¹), ν_4 (1350 et 1393 cm⁻¹) et ν_3 (1425 cm⁻¹). Les sauts en température permettent d'observer la diminution de la contribution spectrale de l'espèce Fe^{II}. Les raies correspondant à l'espèce Fe^{III} augmentent et nous caractérisons les modes vibrationnels suivant : ν_7 (677 cm⁻¹), ν_4 (1375 cm⁻¹), ν_3 (1490 cm⁻¹) et ν_{vinyl} (1627 cm⁻¹).

Les spectres Raman à 441,6 nm, mesurés pour les températures de 210 K et 220 K sont représentés en Figure 137. On retrouve les signatures spectrales des espèces Fe^{II} et Fe^{III} sans que la contribution spectrale du complexe Fe^{II}CO ne soit détectée.

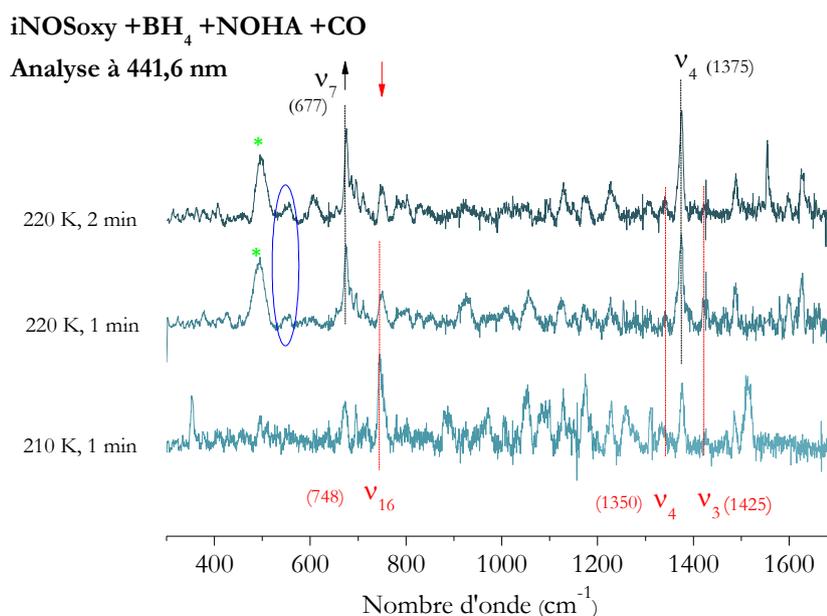


Figure 137 : Spectres Raman de résonance à 441,6 nm de iNOSoxy (+BH₄ +NOHA) dans un tampon saturé en gaz CO. Evolution des espèces Fe^{II} (en rouge) et Fe^{III} (en noir) au cours des sauts en température. Les marques vertes correspondent à la contribution du tampon.

Les analyses à 441,6 nm, plus proche de la bande de Soret des espèces Fe^{III}OO⁻ ou Fe^{III}OOH [245], permettraient de caractériser ces espèces si elles étaient formées suite à la diffusion du gaz O₂ et suite au transfert d'un électron provenant du cofacteur BH₄. La cryo-réduction du complexe Fe^{II}O₂ du CYP 101 étudiée par spectroscopie Raman de résonance a mis en évidence une nouvelle espèce ayant un mode vibrationnel ν_{O-O} avec une fréquence de résonance 799 cm⁻¹ [246] attribuée au complexe Fe^{III}OOH [247, 248]. C'est aussi dans cette zone de fréquence que sont attendus les modes de résonance de l'espèce cpI [249, 250]. Or aucune de nos analyses à 441,6 nm n'a permis de mettre en évidence de telles espèces. Cela suggère que, si le dioxygène diffuse dans l'échantillon et se fixe à l'espèce Fe^{II} à des températures supérieures à 200 K, on se situe déjà dans une gamme de température suffisamment élevée pour que les intermédiaires Fe^{III}OO⁻ et Fe^{III}OOH réagissent. Ainsi leur vitesse de disparition, à de telles températures, est trop importante pour permettre leur accumulation. En effet les complexes Fe^{III}OO⁻ et Fe^{III}OOH ont déjà été observés en condition cryogénique mais uniquement pour des conditions de températures inférieures à 200 K [138].

Les modes vibrationnels de la déformation δ_{Fe-N-O} de l'espèce Fe^{III}NO est normalement caractérisée vers 540 cm⁻¹ (en bleu, [Figure 138](#)), une zone de spectre exempt de modes vibrationnels des espèces Fe^{II} ou Fe^{III}. Nous avons analysé cette zone de spectre, très bruitée, et nous déterminons deux signatures spectrales : à 547 cm⁻¹ et à 557 cm⁻¹.

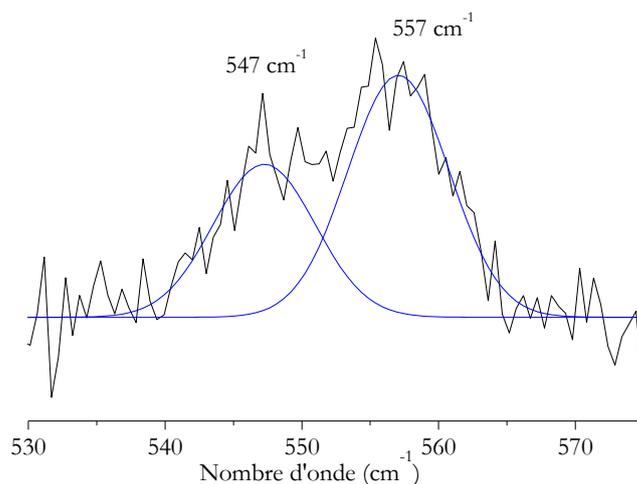


Figure 138 : Basses fréquences du spectre Raman de résonance à 441,6 nm de iNOSoxy (+NOHA +BH₄) dans un tampon saturé en gaz CO. Les simulations gaussiennes des raies sont représentées en bleu.

Dans le cas de iNOSoxy, les modes vibrationnels $\nu_{\text{Fe-NO}}$ et $\delta_{\text{Fe-N-O}}$ de l'espèce Fe^{II}NO sont caractérisés entre 537-541 cm⁻¹ et 545-550 cm⁻¹ respectivement en fonction des conditions de saturation en cofacteur et en substrat ([194], voir Annexe 4). Quant aux modes de vibration $\nu_{\text{Fe-NO}}$ de l'espèce Fe^{II}NO, ceux-ci sont retrouvés entre 540-549 cm⁻¹ ([194], voir Annexe 4). Ainsi les fréquences 547 cm⁻¹ et 557 cm⁻¹ pourraient correspondre aux modes vibrationnels d'une espèce Fe^{II}NO ou Fe^{III}NO. Bien que leurs proportions soient minoritaires dans l'échantillon, leur présence indique que le gaz O₂ diffuse probablement dans l'échantillon. La faible intensité du signal indique qu'une faible quantité d'espèce Fe^{II}NO ou Fe^{III}NO est piégée ou que leurs vitesses de disparition sont trop rapides pour permettre une bonne accumulation de celles-ci.

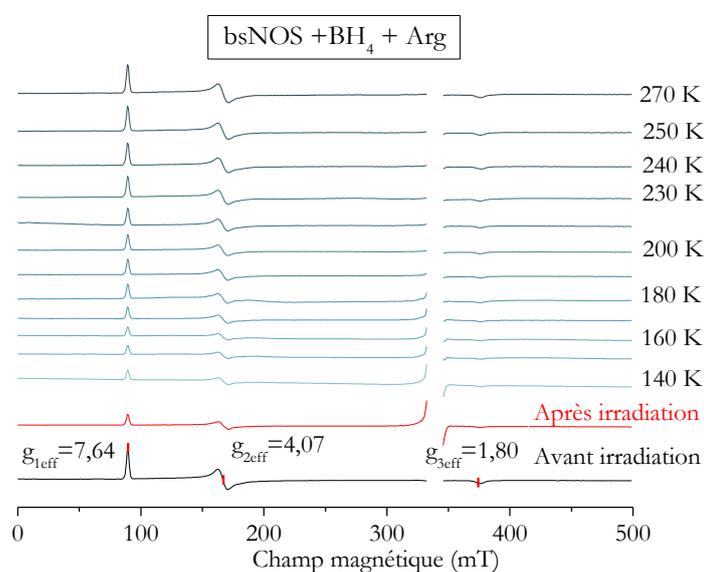
Les analyses en présence du cofacteur BH₄, du substrat NOHA, et de gaz CO ne permettent pas de détecter l'espèce Fe^{II}CO (par diffusion du gaz CO présent dans l'échantillon) ni de détecter l'espèce Fe^{II}O₂ (par diffusion du gaz O₂ présent à la surface de l'échantillon) ni de détecter tout autre complexe oxygéné issu du cycle catalytique. En revanche de nouvelles contributions spectrales peu intenses sont attribuées à une espèce ayant pour ligand le NO. Ceci indique que le dioxygène a pu diffuser dans l'échantillon et a permis à une petite fraction de protéine de produire cette espèce.

3.3. Sauts en température en présence de dioxygène : études préliminaires.

Par spectroscopie RPE :

L'analyse des spectres Raman se révèle extrêmement complexe du fait de la présence de plusieurs espèces dans les échantillons ayant des fréquences de résonance très proches (Annexe 4). Les analyses par spectroscopie RPE pourraient s'avérer plus simples. Les espèces Fe^{II} et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ (pendant l'oxydation du NOHA) ne sont pas détectables. En revanche, les espèces Fe^{III} , $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^-$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ devraient être détectées si elles étaient formées au cours des sauts en température.

La [Figure 139](#) représente les spectres RPE de la protéine bsNOS en présence du substrat arginine, du cofacteur BH_4 et de dioxygène. Le spectre noir, représentant le signal RPE avant irradiation, est caractéristique de l'espèce Fe^{III} HS de la protéine bsNOS en présence du substrat arginine et du cofacteur BH_4 ($g_{1\text{eff}}=7,64$, $g_{2\text{eff}}=4,07$, $g_{3\text{eff}}=1,80$). Le spectre rouge représente l'espèce Fe^{III} après irradiation avec des valeurs de g_{eff} identiques. Les spectres bleus représentent l'évolution du signal Fe^{III} pendant les expériences de sauts en température.



[Figure 139](#) : Spectres RPE de bsNOS (+ BH_4 +Arg) dans un tampon saturé en gaz O_2 . Avant irradiation (en noir) après irradiation (en rouge) et évolution de l'espèce Fe^{III} (en bleu) au cours des sauts en température.

Le signal Fe^{III} augmente progressivement sans que ne soient détectées d'autres espèces paramagnétiques. De plus les valeurs de g_{eff} ne sont pas modifiées et indiquent que l'arginine reste dans la cavité du substrat sans être oxydée. La [Figure 140](#) représente l'évolution de l'intensité du

signal g_{eff} pendant les sauts en température. Pendant les sauts en température entre 140 et 170 K l'intensité du signal diminue légèrement. Cela pourrait être dû à la fin de la relaxation des électrons générés pendant l'irradiation des échantillons. A partir de 180 K le signal RPE de l'espèce Fe^{III} augmente jusqu'à 270 K.

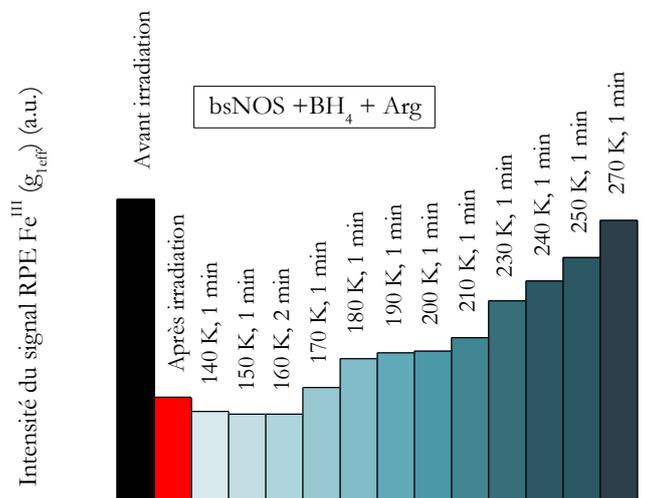


Figure 140 : Intensité du signal g_{eff} de l'espèce Fe^{III} de bsNOS (+BH₄ + Arg) avant irradiation (en noir) après irradiation (en rouge) et au cours des sauts en température (en bleu).

Le même type de résultat est observé pour d'autres conditions testées (bsNOS, en présence de l'arginine seule, iNOSoxy en présence de substrat arginine et du cofacteur BH₄, Figure 141).

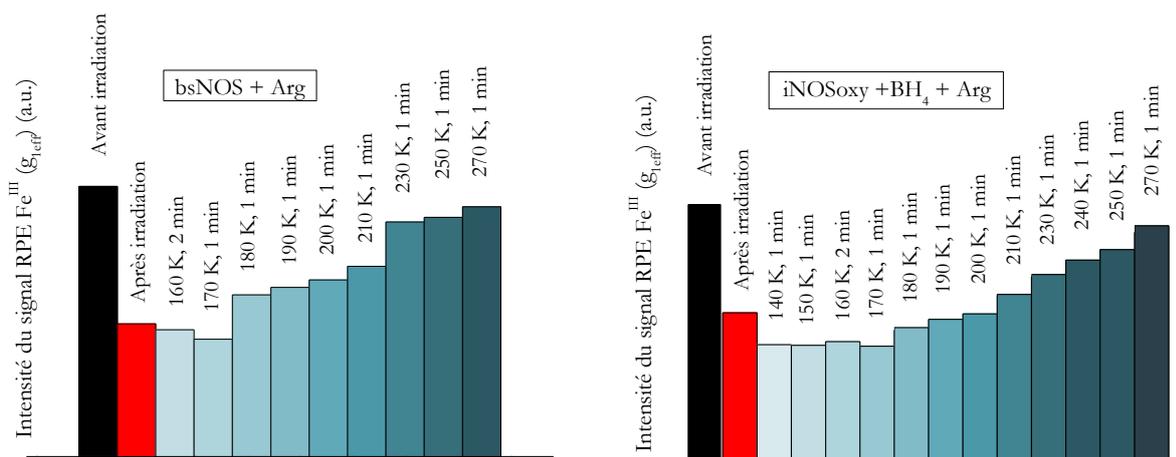


Figure 141 : Intensité du signal g_{eff} de l'espèce Fe^{III} de bsNOS (+Arg) et iNOSoxy (+BH₄ + Arg) avant irradiation (en noir) après irradiation (en rouge) et au cours des sauts en température (en bleu).

Dans tous les cas, en présence de dioxygène, le signal RPE de l'espèce Fe^{III} diminue légèrement puis ré-augmente jusqu'à la température de 270 K. Les valeurs de g_{eff} ne

changent pas et aucune autre espèce paramagnétique n'est détectée. Cela suggère que les sauts en température permettent d'oxyder l'espèce Fe^{II} en espèce Fe^{III} par une voie moléculaire ne permettant pas d'oxyder le substrat arginine dans la cavité.

3.4. Conclusion et perspectives

Les spectres Raman de résonance analysés pendant les sauts en température montrent une grande complexité par la présence d'un mélange d'espèces au départ. Nous pourrions, à l'avenir travailler avec des échantillons ayant une concentration plus faible. Ainsi l'irradiation permettrait d'obtenir peut être 100 % d'espèce Fe^{II} ce qui faciliterait significativement l'interprétation des spectres Raman de résonance.

Les études de sauts en température réalisées en présence du gaz CO ne permettent pas de déterminer l'ensemble des paramètres qui régissent la diffusion et la fixation du gaz CO sur le fer réduit. Nous ne mettons pas en évidence la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ pour tous les échantillons étudiés. La formation du complexe est observée dans une condition : la protéine bsNOS en présence du substrat Arg et pour des sauts en température supérieures à 220 K. Ainsi le gaz CO diffuserait pour des températures supérieures à 220 K (-53°C) et serait capable de se fixer au fer à ce niveau de température. Cependant le rendement de fixation du gaz CO est extrêmement faible.

Les sauts en température montrent que les empreintes spectrales de l'espèce Fe^{II} diminuent et que celles de l'espèce Fe^{III} augmentent suggérant ainsi que l'oxydation de l'espèce Fe^{II} en espèce Fe^{III} a bien lieu. Ainsi on pourrait proposer que le dioxygène de l'atmosphère diffuse dans l'échantillon congelé et entre en compétition avec le gaz CO pour se fixer au fer. Cependant, si le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ était formé, il serait difficile à caractériser, le mode vibrationnel O-O a une fréquence de résonance très proche du mode ν_5 des espèces Fe^{II} et Fe^{III} . Afin de faciliter la caractérisation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, les échantillons pourront être saturés en dioxygène 18 pour lequel les modes de résonance O-O seraient beaucoup plus facilement détectables par spectroscopie Raman de résonance (aux environs de 1055-1060 cm^{-1}). D'autre part, la température pour laquelle le dioxygène diffuse pourrait être suffisamment élevée pour permettre des transferts d'électrons et de protons permettant d'activer l'oxygène. L'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ aurait alors une vitesse de disparition accélérée et ne pourrait pas être accumulée dans nos conditions expérimentales. Il en est de même pour les intermédiaires $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^\cdot$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$, normalement observés pour des températures situées entre 140 K et 200 K [133, 138]. En outre, les analyses par spectroscopie RPE en présence de dioxygène montrent le retour à l'état Fe^{III} sans aucune apparition de nouvelle espèce paramagnétique et sans oxydation de l'arginine.

En revanche, durant l'étape d'oxydation du NOHA, si le dioxygène diffuse et permet la formation des espèces oxydantes, le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ devrait être finalement formé. Etant beaucoup plus stable que les autres intermédiaires réactionnels, il devrait être observable dans nos conditions expérimentales. Nous caractérisons des modes de résonances effectivement attribuables à une espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ mais, encore une fois, avec un rendement extrêmement faible. Il semble que nos conditions expérimentales conduisent essentiellement à des réactions de découplage. Les sauts en température réalisés avec iNOSoxy en présence du substrat arginine, du cofacteur BH_4 et de dioxygène montrent que l'oxydation de l'espèce Fe^{II} en espèce Fe^{III} n'est pas associée à l'oxydation de l'arginine en NOHA. L'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ serait formée mais s'autoxyderait rapidement sans que le transfert d'électron en provenance du cofacteur BH_4 n'ait eu lieu. Le découplage pourrait également avoir lieu après l'activation de l'oxygène par le cofacteur BH_4 .

Les résultats obtenus durant les sauts en température indiquent que, premièrement, les températures pour lesquelles l'oxygène diffuse dans l'échantillon sont trop élevées pour pouvoir stabiliser suffisamment les intermédiaires réactionnels formés, et deuxièmement, que les réactions aboutissent majoritairement à du découplage et ne semblent pas emprunter le chemin catalytique attendu.

Conclusion

L'activation de l'oxygène est une étape clé de la synthèse de NO. La maîtrise de cette étape est essentielle à l'activité biologique même des NOS. En effet, si le processus de transfert d'électron et de proton n'est parfaitement contrôlé à ce stade, on assiste à un relargage des espèces $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO^{\cdot} , $ONOO^-$ qui participent alors aux mécanismes de cytotoxicité évoqués dans le chapitre 1. L'ensemble de mes travaux de thèse sont centrés sur la régulation de cette étape qui dépend de plusieurs facteurs et, de ce fait, pas encore totalement comprise.

Dans la première partie du chapitre 3, nous avons pu corrélérer la force de liaison H entre la cystéine proximale et le tryptophane voisin avec les propriétés d'électro-donation de la cystéine et la stabilité du lien fer-soufre. **Nos résultats suggèrent que les NOS bactériennes sont, tout comme les NOS de mammifères, des oxygénases qui utilisent les propriétés électro-donneurs et l'effet *push* du thiolate proximal pour activer le ligand distal O_2 et maîtriser la nature de ses produits catalytiques ([8], Annexe 1).**

Dans la deuxième partie du chapitre 3 nous étendons les résultats obtenus avec le complexe $Fe^{II}CO$ en présence d'analogues de substrat au complexe $Fe^{II}O_2$ ce qui est nécessaire à la compréhension du transfert de proton. Ainsi nous caractérisons les modes vibrationnels du complexe $Fe^{II}O_2$ en présence d'analogues de substrats qui modifient le réseau de liaisons H distal. La molécule d'eau n'adopte pas tout à fait la même position en fonction du pKa du guanidinium et cette modification est déterminante pour la voie catalytique empruntée et pourrait **être à l'origine des différences moléculaires entre l'étape d'oxydation de l'arginine et l'étape d'oxydation du NOHA.**

La troisième partie du chapitre 3 montre que le cofacteur a bien un rôle redox de donneur d'électron dans les deux étapes du cycle catalytique de iNOSoxy. En revanche **le BH_4 ne semble pas intervenir dans le transfert de proton.** La régénération du cofacteur en espèce neutre à la fin du cycle moléculaire ne semble pas liée à la disparition de l'espèce $Fe^{II}NO$ comme avancé précédemment.

Durant l'oxydation de l'arginine par bsNOS, les cofacteurs BH_4 et THF exercent exactement le même rôle que celui observé pour iNOSoxy. Cela suggère que bsNOS, étudiée avec BH_4 , pourrait être un bon modèle pour la première étape catalytique de la NOS de mammifère. Ces résultats indiquent également que le THF, présent *in vivo* dans la bactérie pourrait être le cofacteur redox naturel de la NOS bactérienne. En revanche durant l'oxydation du NOHA par bsNOS en présence de THF ou BH_4 , aucune forme radicalaire du cofacteur n'est piégée. Cela indique que **la NOS bactérienne n'a probablement pas un mécanisme moléculaire directement comparable à**

celui de la NOS de mammifère dans cette étape et relance le débat quant à la réelle fonction biologique de la NOS bactérienne ([9], Annexe 2).

Le chapitre 4 propose une nouvelle approche méthodologique pour l'étude des NOS. L'irradiation gamma s'est montrée efficace pour initier la réaction catalytique c'est à dire réduire l'espèce Fe^{III} en espèce Fe^{II}. Le rendement de réduction pourrait être encore amélioré en diminuant les concentrations en protéine. En revanche, les résultats obtenus pendant la phase de sauts en température suivant la phase de cryo-réduction sont plus mitigés. Il est probable que l'oxygène diffuse dans l'échantillon et l'oxydation de l'espèce Fe^{II} en espèce Fe^{III} est observée. Cependant aucune nouvelle espèce ne peut être accumulée dans nos conditions d'analyses et le substrat arginine n'est pas oxydé en NOHA. Dans nos conditions expérimentale, des réactions de découplage doivent avoir majoritairement lieu et soulignent l'échec des sauts en température à mimer le cycle moléculaire naturel de la NOS dans nos conditions expérimentales ([10], Annexe 3).

Bibliographie

1. Murad, F., *Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling*. Biosci Rep, 1999. **19**(3): p. 133-54.
2. Bruckdorfer, R., *The basics about nitric oxide*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(1-2): p. 3-31.
3. Miersch, S. and B. Mutus, *Protein S-nitrosation: biochemistry and characterization of protein thiol-NO interactions as cellular signals*. Clin Biochem, 2005. **38**(9): p. 777-91.
4. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
5. Schuman, E.M. and D.V. Madison, *A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1503-6.
6. Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach, *The role of nitric oxide in innate immunity*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 17-26.
7. Ledo, A., et al., *Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(1-2): p. 75-89.
8. Brunel, A., et al., *The proximal hydrogen bond network modulates Bacillus subtilis nitric-oxide synthase electronic and structural properties*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 11997-2005.
9. Brunel, A., J. Santolini, and P. Dorlet, *Electron paramagnetic resonance characterization of tetrahydrobiopterin radical formation in bacterial nitric oxide synthase compared to Mammalian nitric oxide synthase*. Biophys J, 2012. **103**(1): p. 109-17.
10. Bernad, S., et al., *A Novel Cryo-Reduction Method to Investigate the Molecular Mechanism of Nitric Oxide Synthases*. J Phys Chem B, 2012.
11. Zhao, Y., et al., *A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14753-8.
12. Furchgott, R.F., *Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide*. Biosci Rep, 1999. **19**(4): p. 235-51.
13. Ignarro, L.J., et al., *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **34**(6): p. 879-86.
14. Sessa, W.C., *eNOS at a glance*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2427-9.
15. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
16. Barouch, L.A., et al., *Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 337-9.
17. Duncan, A.J. and S.J. Heales, *Nitric oxide and neurological disorders*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(1-2): p. 67-96.
18. Holscher, C., *Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity*. Trends Neurosci, 1997. **20**(7): p. 298-303.
19. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide*. FASEB J, 1995. **9**(13): p. 1319-30.
20. Mungrue, I.N. and D.S. Brecht, *nNOS at a glance: implications for brain and brawn*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2627-9.
21. Brecht, D.S., *Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 1): p. 9-15.
22. Clavreul, N., et al., *S-glutathiolation by peroxynitrite of p21ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells*. FASEB J, 2006. **20**(3): p. 518-20.
23. Marshall, H.E. and J.S. Stamler, *Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation*. Biochemistry, 2001. **40**(6): p. 1688-93.
24. Schulze, P.C., et al., *Nitric oxide-dependent suppression of thioredoxin-interacting protein expression enhances thioredoxin activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2666-72.
25. Sumbayev, V.V. and I.M. Yasinska, *Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species*. Arch Biochem Biophys, 2005. **436**(2): p. 406-12.
26. Fukuto, J.M., et al., *The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): the neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(5): p. 790-801.
27. Fukuto, J.M., et al., *Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 335-55.

28. Fukuto, J.M., A.S. Dutton, and K.N. Houk, *The chemistry and biology of nitroxyl (HNO): a chemically unique species with novel and important biological activity*. *ChemBiochem*, 2005. **6**(4): p. 612-9.
29. Koppenol, W.H., et al., *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. *Chem Res Toxicol*, 1992. **5**(6): p. 834-42.
30. Xie, Q.W., et al., *Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 225-8.
31. Saura, M., et al., *An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease*. *Immunity*, 1999. **10**(1): p. 21-8.
32. Parrella, P., D. Sidransky, and S.L. Merbs, *Allelotype of posterior uveal melanoma: implications for a bifurcated tumor progression pathway*. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3032-7.
33. Vila-del Sol, V., M.D. Diaz-Munoz, and M. Fresno, *Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 272-83.
34. Fang, F.C., *Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(12): p. 2818-25.
35. Zaragoza, C., et al., *The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2469-74.
36. Lowenstein, C.J. and E. Padalko, *iNOS (NOS2) at a glance*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 14): p. 2865-7.
37. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(8): p. 662-80.
38. Reynolds, M.R., R.W. Berry, and L.I. Binder, *Site-specific nitration differentially influences tau assembly in vitro*. *Biochemistry*, 2005. **44**(42): p. 13997-4009.
39. Reynolds, M.R., R.W. Berry, and L.I. Binder, *Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease*. *Biochemistry*, 2005. **44**(5): p. 1690-700.
40. Reynolds, M.R., et al., *Peroxynitrite-mediated tau modifications stabilize preformed filaments and destabilize microtubules through distinct mechanisms*. *Biochemistry*, 2006. **45**(13): p. 4314-26.
41. Andrekopoulos, C., et al., *Bicarbonate enhances alpha-synuclein oligomerization and nitration: intermediacy of carbonate radical anion and nitrogen dioxide radical*. *Biochem J*, 2004. **378**(Pt 2): p. 435-47.
42. Cabello, P., M.D. Roldan, and C. Moreno-Vivian, *Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea*. *Microbiology*, 2004. **150**(Pt 11): p. 3527-46.
43. Gorren, A.C. and B. Mayer, *Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1770**(3): p. 432-45.
44. Gusarov, I. and E. Nudler, *NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(39): p. 13855-60.
45. Johnson, B.T., et al., *Extracellular proteolytic activities expressed by Bacillus pumilus isolated from endodontic and periodontal lesions*. *J Med Microbiol*, 2008. **57**(Pt 5): p. 643-51.
46. Shatalin, K., et al., *Bacillus anthracis-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(3): p. 1009-13.
47. Hogenhout, S.A. and R. Loria, *Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria*. *Curr Opin Plant Biol*, 2008. **11**(4): p. 449-56.
48. Kers, J.A., et al., *Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase*. *Nature*, 2004. **429**(6987): p. 79-82.
49. Buddha, M.R., K.M. Keery, and B.R. Crane, *An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(45): p. 15881-6.
50. Buddha, M.R., et al., *Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(48): p. 49567-70.

51. Patel, B.A., et al., *Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans from exposure to UV light*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(43): p. 18183-8.
52. Gusarov, I., et al., *Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13140-7.
53. Gusarov, I., et al., *Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics*. Science, 2009. **325**(5946): p. 1380-4.
54. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
55. Stuehr, D.J., et al., *N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine*. J Biol Chem, 1991. **266**(10): p. 6259-63.
56. Garcin, E.D., et al., *Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37918-27.
57. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 682-5.
58. McMillan, K. and B.S. Masters, *Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415*. Biochemistry, 1995. **34**(11): p. 3686-93.
59. Adak, S., et al., *Role of reductase domain cluster 1 acidic residues in neuronal nitric-oxide synthase. Characterization of the FMN-FREE enzyme*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22313-20.
60. Daff, S., *NO synthase: structures and mechanisms*. Nitric Oxide, 2010. **23**(1): p. 1-11.
61. Stuehr, D.J., J. Tejero, and M.M. Haque, *Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: electron transfer through the nitric oxide synthase flavoprotein domain*. FEBS J, 2009. **276**(15): p. 3959-74.
62. Feng, C., *Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions*. Coord Chem Rev, 2012. **256**(3-4): p. 393-411.
63. Schneiker, S., et al., *Complete genome sequence of the myxobacterium Sorangium cellulosum*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1281-9.
64. Derelle, E., et al., *Genome analysis of the smallest free-living eukaryote Ostreococcus tauri unveils many unique features*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11647-52.
65. Foresi, N., et al., *Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga Ostreococcus tauri is light irradiance and growth phase dependent*. Plant Cell, 2010. **22**(11): p. 3816-30.
66. Sudhamsu, J. and B.R. Crane, *Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for?* Trends Microbiol, 2009. **17**(5): p. 212-8.
67. Wang, Z.Q., et al., *Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by Bacillus subtilis nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2196-202.
68. Adak, S., et al., *Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from Deinococcus radiodurans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 107-12.
69. Zemojtel, T., R.C. Wade, and T. Dandekar, *In search of the prototype of nitric oxide synthase*. FEBS Lett, 2003. **554**(1-2): p. 1-5.
70. Ghosh, D.K., et al., *Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction*. Biochemistry, 1997. **36**(35): p. 10609-19.
71. Raman, C.S., et al., *Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center*. Cell, 1998. **95**(7): p. 939-50.
72. Fischmann, T.O., et al., *Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(3): p. 233-42.
73. Li, H., et al., *Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21276-84.
74. Hemmens, B., et al., *Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35786-91.

75. Crane, B.R., et al., *N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6271-81.
76. Klatt, P., et al., *Determination of nitric oxide synthase cofactors: heme, FAD, FMN, and tetrahydrobiopterin*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 358-65.
77. Rodriguez-Crespo, I., N.C. Gerber, and P.R. Ortiz de Montellano, *Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in Escherichia coli, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation*. J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11462-7.
78. List, B.M., et al., *Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization*. Biochem J, 1997. **323 (Pt 1)**: p. 159-65.
79. Panda, K., et al., *Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31020-30.
80. Hemmens, B., et al., *Haem insertion, dimerization and reactivation of haem-free rat neuronal nitric oxide synthase*. Biochem J, 1998. **332 (Pt 2)**: p. 337-42.
81. Venema, R.C., et al., *Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1276-82.
82. Siddhanta, U., et al., *Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7309-12.
83. Siddhanta, U., et al., *Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18950-8.
84. Panda, K., S. Ghosh, and D.J. Stuehr, *Calmodulin activates intersubunit electron transfer in the neuronal nitric-oxide synthase dimer*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23349-56.
85. Presta, A., et al., *Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity*. Nitric Oxide, 1997. **1**(1): p. 74-87.
86. Gachhui, R., et al., *Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5451-4.
87. Abu-Soud, H.M., et al., *Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17349-57.
88. Santolini, J., et al., *A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1233-43.
89. Santolini, J., A.L. Meade, and D.J. Stuehr, *Differences in three kinetic parameters underpin the unique catalytic profiles of nitric-oxide synthases I, II, and III*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48887-98.
90. Pant, K., et al., *Structure of a nitric oxide synthase heme protein from Bacillus subtilis*. Biochemistry, 2002. **41**(37): p. 11071-9.
91. Bird, L.E., et al., *Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from Staphylococcus aureus*. Structure, 2002. **10**(12): p. 1687-96.
92. Pant, K. and B.R. Crane, *Structure of a loose dimer: an intermediate in nitric oxide synthase assembly*. J Mol Biol, 2005. **352**(4): p. 932-40.
93. Crane, B.R., et al., *The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes*. Science, 1997. **278**(5337): p. 425-31.
94. Crane, B.R., et al., *Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate*. Science, 1998. **279**(5359): p. 2121-6.
95. Li, H., et al., *Structural studies of constitutive nitric oxide synthases with diatomic ligands bound*. J Biol Inorg Chem, 2006. **11**(6): p. 753-68.
96. Li, H., et al., *The novel binding mode of N-alkyl-N'-hydroxyguanidine to neuronal nitric oxide synthase provides mechanistic insights into NO biosynthesis*. Biochemistry, 2002. **41**(47): p. 13868-75.
97. Crane, B.R., et al., *Structures of the N(omega)-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins*. Biochemistry, 2000. **39**(16): p. 4608-21.
98. Li, H., et al., *Exploring the binding conformations of bulkier dipeptide amide inhibitors in constitutive nitric oxide synthases*. Biochemistry, 2005. **44**(46): p. 15222-9.
99. Sudhamsu, J. and B.R. Crane, *Structure and reactivity of a thermostable prokaryotic nitric-oxide synthase that forms a long-lived oxy-heme complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9623-32.

100. Salard, I., et al., *Analogies and surprising differences between recombinant nitric oxide synthase-like proteins from Staphylococcus aureus and Bacillus anthracis in their interactions with l-arginine analogs and iron ligands.* J Inorg Biochem, 2006. **100**(12): p. 2024-33.
101. Midha, S., et al., *Cloning, expression, and characterization of recombinant nitric oxide synthase-like protein from Bacillus anthracis.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(1): p. 346-56.
102. Santolini, J., et al., *Resonance Raman study of Bacillus subtilis NO synthase-like protein: similarities and differences with mammalian NO synthases.* Biochemistry, 2006. **45**(5): p. 1480-9.
103. Wang, Z.Q., et al., *A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles.* J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19018-25.
104. Reece, S.Y., J.J. Woodward, and M.A. Marletta, *Synthesis of nitric oxide by the NOS-like protein from deinococcus radiodurans: a direct role for tetrahydrofolate.* Biochemistry, 2009. **48**(23): p. 5483-91.
105. Meunier, B., S.P. de Visser, and S. Shaik, *Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes.* Chem Rev, 2004. **104**(9): p. 3947-80.
106. Poulos, T.L., *Structural and functional diversity in heme monooxygenases.* Drug Metab Dispos, 2005. **33**(1): p. 10-8.
107. Santolini, J., *The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: a story of electrons and protons.* J Inorg Biochem, 2011. **105**(2): p. 127-41.
108. Sono, M., et al., *Heme-Containing Oxygenases.* Chem Rev, 1996. **96**(7): p. 2841-2888.
109. Griffith, O.W. and D.J. Stuehr, *Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism.* Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 707-36.
110. Masters, B.S., *Nitric oxide synthases: why so complex?* Annu Rev Nutr, 1994. **14**: p. 131-45.
111. Mayer, B., et al., *Tetrahydrobiopterin binding to macrophage inducible nitric oxide synthase: heme spin shift and dimer stabilization by the potent pterin antagonist 4-amino-tetrahydrobiopterin.* Biochemistry, 1997. **36**(27): p. 8422-7.
112. McMillan, K. and B.S. Masters, *Optical difference spectrophotometry as a probe of rat brain nitric oxide synthase heme-substrate interaction.* Biochemistry, 1993. **32**(38): p. 9875-80.
113. Presta, A., et al., *Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase.* Biochemistry, 1998. **37**(1): p. 298-310.
114. Marchal, S., et al., *Hunting oxygen complexes of nitric oxide synthase at low temperature and high pressure.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 529-35.
115. Rousseau, D.L., et al., *Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase.* J Inorg Biochem, 2005. **99**(1): p. 306-23.
116. Marchal, S., et al., *Evidence of two distinct oxygen complexes of reduced endothelial nitric oxide synthase.* J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19824-31.
117. Ledbetter, A.P., et al., *Low-temperature stabilization and spectroscopic characterization of the dioxygen complex of the ferrous neuronal nitric oxide synthase oxygenase domain.* Biochemistry, 1999. **38**(25): p. 8014-21.
118. Couture, M., D.J. Stuehr, and D.L. Rousseau, *The ferrous dioxygen complex of the oxygenase domain of neuronal nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3201-5.
119. Crane, B.R., J. Sudhamsu, and B.A. Patel, *Bacterial nitric oxide synthases.* Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 445-70.
120. Adak, S., K.S. Aulak, and D.J. Stuehr, *Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from Bacillus subtilis.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 16167-71.
121. Hannibal, L., et al., *Influence of heme-thiolate in shaping the catalytic properties of a bacterial nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39224-35.
122. Moreau, M., et al., *Differential effects of alkyl- and arylguanidines on the stability and reactivity of inducible NOS heme-dioxygen complexes.* Biochemistry, 2006. **45**(12): p. 3988-99.
123. Abu-Soud, H.M., et al., *The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability.* J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17349-53.

124. Bec, N., et al., *Reaction of neuronal nitric-oxide synthase with oxygen at low temperature. Evidence for reductive activation of the oxy-ferrous complex by tetrahydrobiopterin.* J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13502-8.
125. Tsai, P., et al., *L-arginine regulates neuronal nitric oxide synthase production of superoxide and hydrogen peroxide.* Biochem Pharmacol, 2005. **69**(6): p. 971-9.
126. Vasquez-Vivar, J., et al., *Electron spin resonance spin-trapping detection of superoxide generated by neuronal nitric oxide synthase.* Methods Enzymol, 1999. **301**: p. 169-77.
127. Berka, V., L.H. Wang, and A.L. Tsai, *Oxygen-induced radical intermediates in the nNOS oxygenase domain regulated by L-arginine, tetrahydrobiopterin, and thiol.* Biochemistry, 2008. **47**(1): p. 405-20.
128. Gorren, A.C., et al., *Low-temperature optical absorption spectra suggest a redox role for tetrahydrobiopterin in both steps of nitric oxide synthase catalysis.* Biochemistry, 2000. **39**(38): p. 11763-70.
129. Schmidt, P.P., et al., *Formation of a protonated trihydrobiopterin radical cation in the first reaction cycle of neuronal and endothelial nitric oxide synthase detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy.* J Biol Inorg Chem, 2001. **6**(2): p. 151-8.
130. Wei, C.C., et al., *Structure of tetrahydrobiopterin tunes its electron transfer to the heme-dioxy intermediate in nitric oxide synthase.* Biochemistry, 2003. **42**(7): p. 1969-77.
131. Wei, C.C., et al., *Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 315-9.
132. Hurshman, A.R. and M.A. Marletta, *Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer.* Biochemistry, 2002. **41**(10): p. 3439-56.
133. Davydov, R., et al., *EPR and ENDOR characterization of intermediates in the cryoreduced oxy-nitric oxide synthase heme domain with bound L-arginine or N(G)-hydroxyarginine.* Biochemistry, 2002. **41**(33): p. 10375-81.
134. Pant, K. and B.R. Crane, *Nitrosyl-heme structures of Bacillus subtilis nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation.* Biochemistry, 2006. **45**(8): p. 2537-44.
135. Wei, C.C., et al., *The three nitric-oxide synthases differ in their kinetics of tetrahydrobiopterin radical formation, heme-dioxy reduction, and arginine hydroxylation.* J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8929-35.
136. Abu-Soud, H.M., et al., *Stopped-flow analysis of substrate binding to neuronal nitric oxide synthase.* Biochemistry, 1999. **38**(38): p. 12446-51.
137. Berka, V., et al., *Redox function of tetrahydrobiopterin and effect of L-arginine on oxygen binding in endothelial nitric oxide synthase.* Biochemistry, 2004. **43**(41): p. 13137-48.
138. Davydov, R., et al., *EPR and ENDOR characterization of the reactive intermediates in the generation of NO by cryoreduced oxy-nitric oxide synthase from Geobacillus stearothermophilus.* J Am Chem Soc, 2009. **131**(40): p. 14493-507.
139. Poulos, T.L., H. Li, and C.S. Raman, *Heme-mediated oxygen activation in biology: cytochrome c oxidase and nitric oxide synthase.* Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**(2): p. 131-7.
140. Stuehr, D.J., *Mammalian nitric oxide synthases.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 217-30.
141. Stuehr, D.J., et al., *Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases.* J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36167-70.
142. Wei, C.C., et al., *Why do nitric oxide synthases use tetrahydrobiopterin?* J Inorg Biochem, 2002. **91**(4): p. 618-24.
143. Zhu, Y. and R.B. Silverman, *Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), Heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s).* Biochemistry, 2008. **47**(8): p. 2231-43.
144. Cho, K.B., M.A. Carvajal, and S. Shaik, *First half-reaction mechanism of nitric oxide synthase: the role of proton and oxygen coupled electron transfer in the reaction by quantum mechanics/molecular mechanics.* J Phys Chem B, 2009. **113**(1): p. 336-46.
145. Cho, K.B., E. Derat, and S. Shaik, *Compound I of nitric oxide synthase: the active site protonation state.* J Am Chem Soc, 2007. **129**(11): p. 3182-8.

146. Adak, S., Q. Wang, and D.J. Stuehr, *Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase. Implications for mechanism.* J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33554-61.
147. Adhikari, S., S. Ray, and R. Gachhui, *Catalase activity of oxygenase domain of rat neuronal nitric oxide synthase. Evidence for product formation from L-arginine.* FEBS Lett, 2000. **475**(1): p. 35-8.
148. Pufahl, R.A., J.S. Wishnok, and M.A. Marletta, *Hydrogen peroxide-supported oxidation of NG-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase.* Biochemistry, 1995. **34**(6): p. 1930-41.
149. Hurshman, A.R., et al., *Formation of a pterin radical in the reaction of the heme domain of inducible nitric oxide synthase with oxygen.* Biochemistry, 1999. **38**(48): p. 15689-96.
150. Stoll, S., et al., *Nitric oxide synthase stabilizes the tetrahydrobiopterin cofactor radical by controlling its protonation state.* J Am Chem Soc, 2010. **132**(33): p. 11812-23.
151. Hurshman, A.R., et al., *Ability of tetrahydrobiopterin analogues to support catalysis by inducible nitric oxide synthase: formation of a pterin radical is required for enzyme activity.* Biochemistry, 2003. **42**(45): p. 13287-303.
152. Wang, Z.Q., et al., *A conserved tryptophan in nitric oxide synthase regulates heme-dioxy reduction by tetrahydrobiopterin.* Biochemistry, 2001. **40**(43): p. 12819-25.
153. Aoyagi, M., et al., *Structures of tetrahydrobiopterin binding-site mutants of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer and implicated roles of Trp457.* Biochemistry, 2001. **40**(43): p. 12826-32.
154. Wei, C.C., et al., *Catalytic reduction of a tetrahydrobiopterin radical within nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11734-42.
155. Sorlie, M., et al., *Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin: proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor.* J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48602-10.
156. Menyhard, D.K., *Comparative computational analysis of active and inactive cofactors of nitric oxide synthase.* J Phys Chem B, 2009. **113**(10): p. 3151-9.
157. de Visser, S.P. and L.S. Tan, *Is the bound substrate in nitric oxide synthase protonated or neutral and what is the active oxidant that performs substrate hydroxylation?* J Am Chem Soc, 2008. **130**(39): p. 12961-74.
158. Doukov, T., et al., *Single crystal structural and absorption spectral characterizations of nitric oxide synthase complexed with N(omega)-hydroxy-L-arginine and diatomic ligands.* Biochemistry, 2009. **48**(43): p. 10246-54.
159. Chartier, F.J., S.P. Blais, and M. Couture, *A weak Fe-O bond in the oxygenated complex of the nitric-oxide synthase of Staphylococcus aureus.* J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 9953-62.
160. Chartier, F.J. and M. Couture, *Substrate-specific interactions with the heme-bound oxygen molecule of nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 20877-86.
161. Li, D., et al., *Substrate- and isoform-specific dioxygen complexes of nitric oxide synthase.* J Am Chem Soc, 2007. **129**(21): p. 6943-51.
162. Martin, N.I., et al., *Design and synthesis of C5 methylated L-arginine analogues as active site probes for nitric oxide synthase.* J Am Chem Soc, 2007. **129**(41): p. 12563-70.
163. Giroud, C., et al., *Role of arginine guanidinium moiety in nitric-oxide synthase mechanism of oxygen activation.* J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7233-45.
164. Ost, T.W., et al., *Structural and spectroscopic analysis of the F393H mutant of flavocytochrome P450 BM3.* Biochemistry, 2001. **40**(45): p. 13430-8.
165. Adak, S., et al., *Tryptophan 409 controls the activity of neuronal nitric-oxide synthase by regulating nitric oxide feedback inhibition.* J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26907-11.
166. Tejero, J., et al., *Stabilization and characterization of a heme-oxy reaction intermediate in inducible nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33498-507.
167. Lang, J., et al., *Trp180 of endothelial NOS and Trp56 of bacterial saNOS modulate sigma bonding of the axial cysteine to the heme.* J Inorg Biochem, 2009. **103**(7): p. 1102-12.
168. Bec, N., et al., *The role of tetrahydrobiopterin in the activation of oxygen by nitric-oxide synthase.* J Inorg Biochem, 2000. **81**(3): p. 207-11.
169. Boggs, S., L. Huang, and D.J. Stuehr, *Formation and reactions of the heme-dioxygen intermediate in the first and second steps of nitric oxide synthesis as studied by stopped-flow spectroscopy under single-turnover conditions.* Biochemistry, 2000. **39**(9): p. 2332-9.

170. Wei, C.C., B.R. Crane, and D.J. Stuehr, *Tetrahydrobiopterin radical enzymology*. Chem Rev, 2003. **103**(6): p. 2365-83.
171. Wei, C.C., et al., *A tetrahydrobiopterin radical forms and then becomes reduced during Nomega-hydroxyarginine oxidation by nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46668-73.
172. Korth, H.G., et al., *On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide*. J Biol Chem, 1994. **269**(27): p. 17776-9.
173. Marletta, M.A., *Nitric oxide synthase: function and mechanism*. Adv Exp Med Biol, 1993. **338**: p. 281-4.
174. Marechal, A., et al., *Activation of peroxynitrite by inducible nitric-oxide synthase: a direct source of nitrative stress*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14101-12.
175. Clague, M.J., J.S. Wishnok, and M.A. Marletta, *Formation of N delta-cyanoornithine from NG-hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: implications for mechanism*. Biochemistry, 1997. **36**(47): p. 14465-73.
176. Woodward, J.J., et al., *The second step of the nitric oxide synthase reaction: evidence for ferric-peroxo as the active oxidant*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(1): p. 297-305.
177. Cho, K.B. and J.W. Gault, *Quantum chemical calculations of the NHA bound nitric oxide synthase active site: O₂ binding and implications for the catalytic mechanism*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(33): p. 10267-70.
178. Cho, K.B. and J.W. Gault, *Second half-reaction of nitric oxide synthase: computational insights into the initial step and key proposed intermediate*. J Phys Chem B, 2005. **109**(49): p. 23706-14.
179. Fukuto, J.M., et al., *Peracid oxidation of an N-hydroxyguanidine compound: a chemical model for the oxidation of N omega-hydroxyl-L-arginine by nitric oxide synthase*. J Med Chem, 1993. **36**(18): p. 2666-70.
180. Robinet, J.J., K.B. Cho, and J.W. Gault, *A density functional theory investigation on the mechanism of the second half-reaction of nitric oxide synthase*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(11): p. 3328-34.
181. Adak, S., et al., *Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1244-52.
182. Yumoto, T., et al., *Roles of the heme proximal side residues tryptophan409 and tryptophan421 of neuronal nitric oxide synthase in the electron transfer reaction*. J Inorg Biochem, 2000. **82**(1-4): p. 163-70.
183. Davydov, R., et al., *Proton transfer at helium temperatures during dioxygen activation by heme monooxygenases*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(49): p. 15960-1.
184. Davydov, R., et al., *Hydroxylation of camphor by reduced oxy-cytochrome P450cam: mechanistic implications of EPR and ENDOR studies of catalytic intermediates in native and mutant enzymes*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(7): p. 1403-15.
185. Verdon, C.P., B.A. Burton, and R.L. Prior, *Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite*. Anal Biochem, 1995. **224**(2): p. 502-8.
186. Wang, J., et al., *Heme coordination and structure of the catalytic site in nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22255-8.
187. Wang, J., D.J. Stuehr, and D.L. Rousseau, *Tetrahydrobiopterin-deficient nitric oxide synthase has a modified heme environment and forms a cytochrome P-420 analogue*. Biochemistry, 1995. **34**(21): p. 7080-7.
188. Wang, J., D.J. Stuehr, and D.L. Rousseau, *Interactions between substrate analogues and heme ligands in nitric oxide synthase*. Biochemistry, 1997. **36**(15): p. 4595-606.
189. Wang, J., et al., *Heme coordination of NO in NO synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10512-6.
190. Rodriguez-Crespo, I., et al., *Endothelial nitric oxide synthase: modulations of the distal heme site produced by progressive N-terminal deletions*. Biochemistry, 1997. **36**(28): p. 8530-8.
191. Schelvis, J.P., et al., *Resonance Raman detection of the Fe-S bond in endothelial nitric oxide synthase*. Biochemistry, 2002. **41**(18): p. 5695-701.

192. Spiro, T.G. and I.H. Wasbotten, *CO as a vibrational probe of heme protein active sites*. J Inorg Biochem, 2005. **99**(1): p. 34-44.
193. Jung, M., et al., *Effects of hepatocellular iron imbalance on nitric oxide and reactive oxygen intermediates production in a model of sepsis*. J Hepatol, 2000. **33**(3): p. 387-94.
194. Li, D., et al., *Heme distortion modulated by ligand-protein interactions in inducible nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26489-99.
195. Chartier, F.J. and M. Couture, *Stability of the heme environment of the nitric oxide synthase from Staphylococcus aureus in the absence of pterin cofactor*. Biophys J, 2004. **87**(3): p. 1939-50.
196. Couture, M., et al., *Regulation of the properties of the heme-NO complexes in nitric-oxide synthase by hydrogen bonding to the proximal cysteine*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38280-8.
197. Fan, B., et al., *NO synthase isozymes have distinct substrate binding sites*. Biochemistry, 1997. **36**(42): p. 12660-5.
198. Ingledew, W.J., et al., *Ligand, cofactor, and residue vibrations in the catalytic site of endothelial nitric oxide synthase*. Biochemistry, 2005. **44**(11): p. 4238-46.
199. Jung, C., H. Schulze, and E. Deprez, *Role of the polarity of the heme environment for the CO stretch modes in cytochrome P-450cam-CO*. Biochemistry, 1996. **35**(47): p. 15088-94.
200. Jung, C., et al., *Substrate analogue induced changes of the CO-stretching mode in the cytochrome P450cam-carbon monoxide complex*. Biochemistry, 1992. **31**(51): p. 12855-62.
201. Ingledew, W.J., et al., *Neuronal nitric oxide synthase ligand and protein vibrations at the substrate binding site. A study by FTIR*. Biochemistry, 2002. **41**(26): p. 8377-84.
202. O'Keefe, D.H., et al., *An infrared spectroscopic study of carbon monoxide bonding to ferrous cytochrome P-450*. Biochemistry, 1978. **17**(26): p. 5845-52.
203. Peisach, J., et al., *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**(10): p. 3342-55.
204. Salerno, J.C., et al., *Characterization by electron paramagnetic resonance of the interactions of L-arginine and L-thiocitrulline with the heme cofactor region of nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27423-8.
205. Salerno, J.C., et al., *Electron paramagnetic resonance spectroscopy of the heme domain of inducible nitric oxide synthase: binding of ligands at the arginine site induces changes in the heme ligation geometry*. Biochemistry, 1996. **35**(24): p. 7626-30.
206. Salerno, J.C., et al., *Substrate and substrate analog binding to endothelial nitric oxide synthase: electron paramagnetic resonance as an isoform-specific probe of the binding mode of substrate analogs*. Biochemistry, 1997. **36**(39): p. 11821-7.
207. Galli, C., et al., *EPR spectroscopic characterization of neuronal NO synthase*. Biochemistry, 1996. **35**(8): p. 2804-10.
208. Dorlet, P., A.W. Rutherford, and S. Un, *Orientation of the tyrosyl D, pheophytin anion, and semiquinone Q(A)(*)(-) radicals in photosystem II determined by high-field electron paramagnetic resonance*. Biochemistry, 2000. **39**(26): p. 7826-34.
209. Stoll, S. and A. Schweiger, *EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR*. J Magn Reson, 2006. **178**(1): p. 42-55.
210. Brittain, T., *The ferric form of the three human embryonic hemoglobins and their reactions with azide ions*. J Inorg Biochem, 2000. **81**(1-2): p. 99-103.
211. Marmo Moreira, L., et al., *Pentacoordinate and hexacoordinate ferric hemes in acid medium: EPR, UV-Vis and CD studies of the giant extracellular hemoglobin of Glossoscolex paulistus*. Biophys Chem, 2006. **124**(1): p. 62-72.
212. Takahashi, S., et al., *Microsecond generation of oxygen-bound cytochrome c oxidase by rapid solution mixing*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8405-7.
213. Ost, T.W., et al., *Phenylalanine 393 exerts thermodynamic control over the heme of flavocytochrome P450 BM3*. Biochemistry, 2001. **40**(45): p. 13421-9.
214. Voegtle, H.L., et al., *Spectroscopic characterization of five- and six-coordinate ferrous-NO heme complexes. Evidence for heme Fe-proximal cysteinyl bond cleavage in the ferrous-NO adducts of the Trp-409Tyr/Phe proximal environment mutants of neuronal nitric oxide synthase*. Biochemistry, 2003. **42**(8): p. 2475-84.

215. Wilson, D.J. and S.P. Rafferty, *A structural role for tryptophan 188 of inducible nitric oxide synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(1): p. 126-9.
216. Ray, S., et al., *Effects of balloon mitral commissurotomy on the diffusing capacity of the alveolar capillary membrane and pulmonary capillary volume in patients with mitral stenosis*. Am J Cardiol, 1994. **74**(10): p. 1068-70.
217. Abu-Soud, H.M., et al., *Stopped-flow analysis of CO and NO binding to inducible nitric oxide synthase*. Biochemistry, 1998. **37**(11): p. 3777-86.
218. Martinis, S.A., et al., *Probing the heme iron coordination structure of pressure-induced cytochrome P420cam*. Biochemistry, 1996. **35**(46): p. 14530-6.
219. Lang, J., J. Santolini, and M. Couture, *The conserved Trp-Cys hydrogen bond dampens the "push effect" of the heme cysteinate proximal ligand during the first catalytic cycle of nitric oxide synthase*. Biochemistry, 2011. **50**(46): p. 10069-81.
220. Vogel, R. and F. Siebert, *Vibrational spectroscopy as a tool for probing protein function*. Curr Opin Chem Biol, 2000. **4**(5): p. 518-23.
221. Kabir, M., et al., *Substrate-ligand interactions in Geobacillus stearothermophilus nitric oxide synthase*. Biochemistry, 2008. **47**(47): p. 12389-97.
222. Migita, C.T., et al., *Substrate binding-induced changes in the EPR spectra of the ferrous nitric oxide complexes of neuronal nitric oxide synthase*. Biochemistry, 1997. **36**(36): p. 10987-92.
223. Poulos, T.L., *Structural biology of heme monooxygenases*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 337-45.
224. Ogliaro, F., S.P. de Visser, and S. Shaik, *The 'push' effect of the thiolate ligand in cytochrome P450: a theoretical gauging*. J Inorg Biochem, 2002. **91**(4): p. 554-67.
225. Dijols, S., et al., *Oxidation of N(omega)-hydroxyarginine analogues by NO-synthase: the simple, non amino acid N-butyl N'-hydroxyguanidine is almost as efficient an NO precursor as N(omega)-hydroxyarginine*. J Med Chem, 2001. **44**(20): p. 3199-202.
226. Dijols, S., et al., *First non-alpha-amino acid guanidines acting as efficient NO precursors upon oxidation by NO-synthase II or activated mouse macrophages*. Biochemistry, 2002. **41**(30): p. 9286-92.
227. Mansuy, D. and J.L. Boucher, *Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(8): p. 1105-21.
228. Lefevre-Groboillot, D., et al., *Relationship between the structure of guanidines and N-hydroxyguanidines, their binding to inducible nitric oxide synthase (iNOS) and their iNOS-catalysed oxidation to NO*. FEBS J, 2005. **272**(12): p. 3172-83.
229. Gorren, A.C. and B. Mayer, *Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthesis: a novel biological role for pteridines*. Curr Drug Metab, 2002. **3**(2): p. 133-57.
230. Gorren, A.C., et al., *Tetrahydrobiopterin as combined electron/proton donor in nitric oxide biosynthesis: cryogenic UV-Vis and EPR detection of reaction intermediates*. Methods Enzymol, 2005. **396**: p. 456-66.
231. Kallen, R.G. and W.P. Jencks, *The dissociation constants of tetrahydrofolic acid*. J Biol Chem, 1966. **241**(24): p. 5845-50.
232. de Visser, S.P., *Density functional theory (DFT) and combined quantum mechanical/molecular mechanics (QM/MM) studies on the oxygen activation step in nitric oxide synthase enzymes*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 2): p. 373-7.
233. Wang, Z.Q., C.C. Wei, and D.J. Stuehr, *A conserved tryptophan 457 modulates the kinetics and extent of N-hydroxy-L-arginine oxidation by inducible nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12830-7.
234. Salerno, J.C., K. McMillan, and B.S. Masters, *Binding of intermediate, product, and substrate analogs to neuronal nitric oxide synthase: ferric heme is sensitive to ligand-specific effects in the L-arginine binding site*. Biochemistry, 1996. **35**(36): p. 11839-45.
235. Woodward, J.J., et al., *Pterin-centered radical as a mechanistic probe of the second step of nitric oxide synthase*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(14): p. 5105-13.
236. Davydov, R., et al., *Substrate modulation of the properties and reactivity of the oxy-ferrous and hydroperoxo-ferric intermediates of cytochrome P450cam as shown by cryoreduction-EPR/ENDOR spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(5): p. 1403-13.

237. Denisov, I.G., et al., *Resonance Raman characterization of the peroxy and hydroperoxy intermediates in cytochrome P450*. J Phys Chem A, 2008. **112**(50): p. 13172-9.
238. Davydov, R. and B.M. Hoffman, *Active intermediates in heme monooxygenase reactions as revealed by cryoreduction/annealing, EPR/ENDOR studies*. Arch Biochem Biophys, 2011. **507**(1): p. 36-43.
239. Gaber, B.P., V. Miskowski, and T.G. Spiro, *Resonance Raman scattering from iron(3)- and copper(II)-transferrin and an iron(3) model compound. A spectroscopic interpretation of the transferrin binding site*. J Am Chem Soc, 1974. **96**(22): p. 6868-73.
240. Spiro, T.G. and T.C. Streckas, *Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state*. J Am Chem Soc, 1974. **96**(2): p. 338-45.
241. Titheradge, M.A., *The enzymatic measurement of nitrate and nitrite*. Methods Mol Biol, 1998. **100**: p. 83-91.
242. Tzeng, E., et al., *Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line: H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11771-5.
243. Wells, A.V., et al., *Resonance Raman investigations of Escherichia coli-expressed Pseudomonas putida cytochrome P450 and P420*. Biochemistry, 1992. **31**(18): p. 4384-93.
244. Denisov, I.G., D.C. Victoria, and S.G. Sligar, *Cryoradiolytic reduction of heme proteins: Maximizing dose dependent yield*. Radiat Phys Chem Oxf Engl 1993, 2007. **76**(4): p. 714-721.
245. Sligar, S.G., T.M. Makris, and I.G. Denisov, *Thirty years of microbial P450 monooxygenase research: peroxy-heme intermediates--the central bus station in heme oxygenase catalysis*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 346-54.
246. Mak, P.J., et al., *Resonance Raman detection of the hydroperoxy intermediate in the cytochrome P450 enzymatic cycle*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(20): p. 6382-3.
247. Lehnert, N., et al., *Electronic structure and reactivity of low-spin Fe(III)-hydroperoxy complexes: comparison to activated bleomycin*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(36): p. 10810-22.
248. Rajani, C., J.R. Kincaid, and D.H. Petering, *Resonance Raman studies of HOO-Co(III)bleomycin and Co(III)bleomycin: identification of two important vibrational modes, nu(Co-OOH) and nu(O-OH)*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(12): p. 3829-36.
249. Kincaid, J.R., et al., *Resonance Raman spectra of native and mesoheme-reconstituted horseradish peroxidase and their catalytic intermediates*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28805-11.
250. Terner, J., et al., *Resonance Raman spectroscopy of oxoiron(IV) porphyrin pi-cation radical and oxoiron(IV) hemes in peroxidase intermediates*. J Inorg Biochem, 2006. **100**(4): p. 480-501.
251. Chartier, F.J. and M. Couture, *Interactions between substrates and the haem-bound nitric oxide of ferric and ferrous bacterial nitric oxide synthases*. Biochem J, 2007. **401**(1): p. 235-45.

Annexes

***Annexe 1 : The Proximal Hydrogen Bond Network Modulates
Bacillus subtilis Nitric-oxide Synthase Electronic and Structural
Properties***

Albane Brunel, Adjélé Wilson, Laura Henry, Pierre Dorlet et Jérôme Santolini

The Proximal Hydrogen Bond Network Modulates *Bacillus subtilis* Nitric-oxide Synthase Electronic and Structural Properties⁵

Received for publication, October 18, 2010, and in revised form, January 27, 2011. Published, JBC Papers in Press, February 10, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.195446

Albane Brunel, Adjélé Wilson, Laura Henry, Pierre Dorlet, and Jérôme Santolini¹

From the Commissariat à l'Energie Atomique, IBI Tec-S, SB²SM, F-91191 Gif-sur-Yvette, France and CNRS, Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, URA 2096, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Bacterial nitric-oxide synthase (NOS)-like proteins are believed to be genuine NOSs. As for cytochromes P450 (CYPs), NOS-proximal ligand is a thiolate that exerts a push effect crucial for the process of dioxygen activation. Unlike CYPs, this catalytic electron donation seems controlled by a hydrogen bond (H-bond) interaction between the thiolate ligand and a vicinal tryptophan. Variations of the strength of this H-bond could provide a direct way to tune the stability along with the electronic and structural properties of NOS. We generated five different mutations of bsNOS Trp⁶⁶, which can modulate this proximal H-bond. We investigated the effects of these mutations on different NOS complexes (Fe^{III}, Fe^{II}CO, and Fe^{II}NO), using a combination of UV-visible absorption, EPR, FTIR, and resonance Raman spectroscopies. Our results indicate that (i) the proximal H-bond modulation can selectively decrease or increase the electron donating properties of the proximal thiolate, (ii) this modulation controls the σ -competition between distal and proximal ligands, (iii) this H-bond controls the stability of various NOS intermediates, and (iv) a fine tuning of the electron donation by the proximal ligand is required to allow at the same time oxygen activation and to prevent uncoupling reactions.

Nitrogen monoxide (NO) is a well described radical molecule (1) that has been shown to exert major physiological functions in mammals, ranging from signaling processes to cytotoxic activities (2–5). It is exclusively synthesized by a family of enzymes named nitric-oxide synthases (NOSs)² that have been cloned and characterized in the early 1990s (6–9). With the emergence of efficient DNA sequencing techniques, the accessibility of an increasing number of genomes led to an unprece-

dent quest for new NOSs in other organisms. Although no NOSs have been found so far in plants and yeasts (10, 11), random BLAST analyses of several bacterial genomes led to the discovery of new NOS-like proteins, mostly in Gram-positive bacteria (12). These proteins correspond to the partially truncated oxygenase domain of mammalian NOSs (mNOSs). Because of the dominant structure-function approach, the first works on bacterial NOS-like proteins (bacNOSs) aimed at highlighting the similarities between mammalian and bacterial NOSs. Indeed, the crystallographic structures of NOSs from *Bacillus subtilis* (bsNOS (13)), *Staphylococcus aureus* (saNOS (14)), or *Geobacillus stearothermophilus* (15) were perfectly superimposable to the three-dimensional structure of mNOSs with the exception of a portion of the N-terminal region involved in BH₄ binding and in the formation of the zinc-tetra-thiolate complex (12). In addition, the first enzymological experiments suggested that bacNOSs, similarly to mNOSs, had the capacity to catalyze oxygen activation and to metabolize L-Arg, the natural substrate of mNOSs, into citrulline and NO (16, 17). However, despite such an assignment of bacNOSs as genuine NO synthases, their *in vivo* function has been poorly investigated and remains a matter of debate. The first investigations on the biological function of bacNOSs suggested a contribution to the biosynthesis of a phytotoxin (thaxtomin A) of *Streptomyces turgidiscabies*, presumably via the nitration of a Trp-like residue on a diketopiperazine precursor (18, 19). This metabolic role seemed to extend to the *Deinococcus radiodurans* NOS, which seemed able to associate with the tryptophanyl-tRNA synthetase and to nitrate Trp amino acids (20, 21). Following different hypotheses, Nudler and colleagues (22–24) proposed that bacNOSs could intervene in a series of functions related to host-pathogen interaction such as protection against oxidative stress (22), pathogen survival and virulence (23), or defense against antibiotics (24). Recently, Crane suggested that *D. radiodurans* NOS could intervene in the recovery processes of bacteria subject to a UV stress (25). Because NO production is primarily used by the host as a bactericidal weapon, we feel that NO is not the most appropriate molecule to elicit a concerted response against the host immune system. In fact, our recent data suggest that bsNOS is more likely to intervene in NO and peroxyxynitrite detoxification (26). This raises the following question about the *in vivo* enzymatic activity of bacNOSs. Are they genuine nitric-oxide synthases?

⁵ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S4 and Table S1.

¹ To whom correspondence should be addressed: CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France. Fax: 33-1-69088717; E-mail: jerome.santolini@cea.fr.

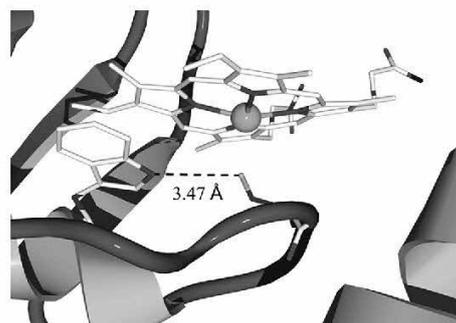
² The abbreviations used are: NOS, nitric-oxide synthase; bacNOS, bacterial NOS-like protein; eNOS, endothelial nitric-oxide synthase; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; mNOS, mammalian nitric-oxide synthase; nNOS, neuronal nitric-oxide synthase; bsNOS, NOS-like protein isolated from *B. subtilis*; saNOS, NOS-like protein isolated from *S. aureus*; ATR, attenuated total reflection; Fe^{II}NO, ferrous heme-nitrosyl complex; Fe^{II}CO, ferrous heme-carbon monoxide complex; Fe^{II}O₂, ferrous heme-oxygen complex; Fe^{III}NO, ferric heme-nitrosyl complex; XO, either NO, CO, or O₂; HS-5c and LS-6c, high spin pentacoordinated and low spin hexacoordinated, respectively; KP_v, inorganic phosphate buffer; P420, thiolate-free coordination of the heme; mT, millitesla(s); H-bond, hydrogen bond; H₄B, BH₄, tetrahydrobiopterin, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin.

Effect of Proximal Ligation on NOS Stability and Activity

In comparison with mNOSs, the catalytic mechanism of bacNOSs has not been intensely investigated, but the results obtained so far stress numerous differences between mNOSs and bacNOSs. On top of them, bacNOSs are lacking an effective electron donor. The absence of a dedicated reductase partner (27) should prevent an efficient first electron transfer, although flavodoxins have been reported to support bsNOS-mediated NO production (28). No strong evidence has been reported so far for the implication of a pterin in the second fast electron transfer. The natural pterin is presumably not synthesized by these bacteria, and although BH_4 and tetrahydrofolate increase the rate of decay of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex of several bacNOSs (16, 29, 30), no pterin radical has been identified in bacNOSs catalysis so far. Another problematic issue is the NO dissociation rate of the bsNOS $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ complex. Indeed, the Val \rightarrow Ile substitution observed in the bacNOSs heme pocket seems to impede a fast NO release (30), which is mandatory for NO synthesis (31, 32). Indeed, the Val \rightarrow Ile mutation dramatically diminishes NO production by inducible NOS (iNOS) and converts iNOS into a NO dioxygenase (33). Similarly, the isomerization of peroxynitrite by bsNOS, in contrast with iNOS-mediated peroxynitrite activation, might reflect modification of the heme distal pocket that leads to a transient capture of NO or any other reactive nitrogen species within the catalytic site, which in turn could lead to additional chemical reactions. Considering these points, one could legitimately question the role of bacNOSs as authentic NO-releasing oxygenase enzymes.

In this regard, mNOSs catalysis is highly related to the oxygen activation mechanism described for cytochromes P450 (34–37). It is characterized by two synergetic processes that allow the O–O bond cleavage, namely the “push-pull” effects (38). The pull effect engages the distal H-bond network that mediates the two proton transfers required for oxygen activation and, for NOS, L-Arg hydroxylation. The resonance Raman fingerprints of numerous saNOS (39–41) and bsNOS (42, 43) complexes reveal no significant differences in the heme distal environment of bacNOSs and mNOSs (44–46). Some subtle differences have been observed between the x-ray structures of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ complexes of bsNOS (47) and neuronal NOS (nNOS) (48, 49) in the presence of NOHA and L-Arg, but they should not significantly affect the proton transfer processes. In fact, the variability of the heme distal structure is greater within mNOSs than between bacNOSs and mNOSs.

However, we previously noticed a difference in the “push” effect. We reported that the proximal Fe–S bond was stronger for bsNOS than for mNOSs, suggesting a modulation of the electron donation exerted by the thiolate ligand (43). This regulation pattern seems to be inherent to mNOSs. Unlike P450s, the sulfur atom of NOS-proximal thiolate is naturally engaged in a strong H-bond interaction with the nitrogen proton of the indole ring of the vicinal tryptophan (Scheme 1). Modification of this H-bond alters mNOS mechanism and catalysis. Thus, the loss of this H-bond for the W409F/Y mutant of nNOS increases the rate of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ oxidation (50, 51). The proposed strengthening of this H-bond, in the case of the W188H mutant of iNOS, results in a slower oxygen activation process (52). If bacNOSs are *bona fide* oxygenases, the same regulation pattern should prevail. This has been suggested by Couture and co-



SCHEME 1. Crystallographic structure of the active site of bsNOS highlighting the interactions between the heme, the proximal thiolate, and tryptophan 66. This structure was generated from the crystallographic structure of native bsNOS (Protein Data Bank entry 1M7V) (13) by using the Swiss-Pdb viewer Deepview and PovRay software (both available on the World Wide Web). This image illustrates the H-bond between Trp⁶⁶ and the thiolate ligand, as well as the π -stacking between the tryptophan and the porphyrin.

workers (53), who showed that the suppression of the Trp-Cys H-bond in saNOS seemed to modify its proximal Fe–S bond.

We report here a comprehensive investigation of the modulation of the interaction between the proximal cysteine ligand and the vicinal Trp for bsNOS. We analyzed the effects of several mutations (W66A/L/F/Y/H) on the spectral fingerprints of bsNOS key species by using a combination of resonance Raman, ATR-FTIR, and EPR spectroscopies. Our results show that the modulation of this interaction not only modifies the electron donation of the thiolate ligand but also affects the electronic structure of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ complex. This seems to indicate that the reactivity of NOS major reactive intermediates ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$) is controlled by the same means (the proximal H-bond network) in bacterial and mammalian NOSs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals—All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. BH_4 and N^{ω} -hydroxy-L-arginine were purchased from Enzo Life Sciences (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY). NO and CO gases were purchased from Messer France SA (Asnières, France). NO-saturated solutions were freshly prepared by flushing NO gas through a previously degassed 100 mM potassium phosphate (KP_i) buffer at pH 7.4.

Molecular Biology—The bsNOS gene was a kind gift of Dr. Dennis J. Stuehr (16).³ Wild-type bsNOS and mutants containing a His₆ tag attached to their N terminus were overexpressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) using a pET15B expression vector as described (16). Trp⁶⁶ mutations were added in the bsNOS gene using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit from Stratagene and synthetic mutagenic oligonucleotides. Oligonucleotides used to construct site-directed mutants in bsNOS were synthesized by Eurofins MWG. Silent mutations coding for the disappearance of the EcoRI (GAATTC) restriction site were incorporated into the oligonucleotides to aid in screening. Mutations (boldface type), the EcoRI restriction site

³ It should be noted that the bsNOS used in Stuehr's laboratory (strain spizizenii W23) differs slightly from the one used in Crane's laboratory (strain 168) by a small N-terminal extension, leading to a shift in the residue numbering.

Effect of Proximal Ligation on NOS Stability and Activity

(underlined), and their corresponding oligonucleotides were as follows: W66F, TCTGCCGATGCAGCGGTTGCTGTTTCTG-AAAGCCATTTTCGCCCCGTG; W66Y, TCTGCCGATGCAGCGGTTGCTGTTTCTATAAGCCATTTTCGCCCCGTG; W66H, TCTGCCGATGCAGCGGTTGCTGTTTCTGTGAGCCATTTTCGCCCCGTG; W66L, TCTGCCGATGCAGCGGTTGCTGTTTCTGAGAGCCATTTTCGCCCCGTG; W66A, TCTGCCGATGCAGCGGTTGCTGTTTCTCGCAGCCATTTCGCCCCGTG; W66 sense, CTGCATCGGCAGATTGTTTGGAACTCGCTGAATGTCATCGACAGAC. Incorporated mutations were confirmed by DNA sequencing. DNAs containing the desired mutations were transformed into *E. coli* for protein expression.

Protein Expression and Purification—Wild-type and Trp⁶⁶ mutant bsNOS were expressed in *E. coli*. 400-ml cultures of terrific broth containing 125 mg/liter ampicillin were initiated with 500 μ l of stock glycerol bacterial culture and stirred at 250 rpm at 37 °C. At $A_{600} = 0.8-1$, starter cultures (400 ml) were used to inoculate 3.6 liter of the same medium. Protein expression was induced at $A_{600} = 1$ by adding 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside, and the cultures were supplemented with 500 μ M δ -aminolevulinic acid. After 12 h of growth at 20 °C, the cells were harvested by centrifugation at 6000 rpm for 20 min at 4 °C and resuspended in ice-cold lysis buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8–9, with 10% glycerol, 1 mM EDTA, and 0.25 M NaCl) containing 1 mg/ml lysozyme, 0.5 μ g/ml each leupeptin and pepstatin, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 50 units/ml DNase I (bovine pancreas type IV, Sigma) with or without 10 μ M H₄B and 5 mM L-arginine. Cells were lysed by two cycles of French press at 700 p.s.i. The lysate was centrifuged at 16,000 rpm for 45 min at 4 °C. (NH₄)₂SO₄ (50–55% w/v, final concentration) was added. After mixing for 30 min and centrifugation (30 min, 16,000 rpm at 4 °C), the pellet was resuspended in binding buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8–9, 10% glycerol, 0.25 M NaCl, 1 mM PMSF with or without 10 μ M H₄B and 5 mM L-arginine). The supernatant was loaded on a column of Ni-ProBond resin (Invitrogen) pretreated with binding buffer containing 10 mM imidazole (buffer A). The column was washed with 10 volumes of buffer A. Bound protein was eluted with binding buffer containing 200 mM imidazole. Column fractions were pooled and were concentrated using Centriprep (10 units) (Millipore, Bedford, MA) with centrifugation at 5000 rpm. The concentrated proteins were dialyzed at 4 °C against 2 liters of 0.1 M KP_i buffer, pH 8–9, containing 10% glycerol, 0.25 M NaCl, 1 mM PMSF, and 3 mM DTT in the presence or absence of 10 μ M H₄B and 10 mM L-arginine for 24 h. After one change of buffer overnight, the protein was checked for heme content and purity by SDS-PAGE and stored at –80 °C.

Preparation of WT and Mutant bsNOS Complexes—Samples were reconditioned in a KP_i (100 mM, pH 7.4) buffer in the presence of different combinations of Arg (10 mM) and/or BH₄ (100 μ M to 1 mM) by three successive cycles of dilution/centrifugation in the final buffer using MicroCon membrane concentrators with a 30 kDa cut-off (Millipore). For samples containing BH₄, a final dilution/concentration cycle with freshly prepared BH₄ buffer was performed just before the measurements.

Aerobic ferric NOS (Fe^{III}) was first prepared by 100–200 cycles of alternate vacuum and argon refilling, directly in a

quartz EPR tube (EPR and resonance Raman experiments) or in a quartz cuvette (ATR-FTIR and UV-visible spectrometry), both sealed with air-tight rubber septa. Ferrous samples (Fe^{II}) were obtained by reduction of Fe^{III} NOS with the addition of a small volume of dithionite solution (5–100 mM) directly into the EPR tube (or the cuvette) using a gas-tight syringe (Hamilton, Reno, NV). Ferrous heme-CO (Fe^{II}CO) samples were then obtained by flushing CO inside the EPR tube (or the cuvette) for 10 min to ensure CO saturation of the solution and complete CO binding to Fe^{II} NOS, as verified by UV-visible absorption. Ferrous heme-NO complexes were formed by the addition with a gas-tight syringe of a small volume of a NO-saturated solution (50–500 μ M final concentration) to the ferrous NOS solution. The ferric heme-NO (Fe^{III}NO) samples were prepared by the addition of a small volume of a NO-saturated solution (50–500 μ M final concentration) to the anaerobic ferric NOS solution. All UV-visible spectra were recorded at room temperature on a Uvikon XL (Secomam, Alès, France).

EPR Spectroscopy—9.4 GHz (X-band) EPR spectra were recorded on a Bruker ELEXSYS 500 spectrometer equipped with a standard TE cavity (Bruker) and an Oxford Instruments continuous flow liquid helium cryostat and a temperature control system. Simulations were performed by using the Easyspin software package (54).

Resonance Raman Spectroscopy—50- μ l samples of bsNOS Fe^{II}CO complexes solutions at 70–150 μ M were prepared in gas-tight quartz EPR tubes and disposed in a homemade spinning cell, at room temperature, to avoid local heating and to prevent photodissociation and degradation. Raman excitation at 441.6 nm was obtained with a helium-cadmium laser (Kimmon, Tokyo, Japan). Resonance Raman spectra were recorded using a modified single-stage spectrometer (Jobin-Yvon T64000, HORIBA Jobin Yvon S.A.S., Chilly Mazarin, France) equipped with a liquid N₂-cooled back-thinned CCD detector. Stray scattered light was rejected using a holographic notch filter (Kaiser Optical Systems, Ann Arbor, MI). Spectra were recorded as the co-addition of 40–60 individual spectra with CCD exposure times of 20–30 s each. 3–6 successive sets of such spectra were then averaged. Neutral density filters were used for the Fe^{II}CO complexes to decrease laser power (below 5 milliwatts at the sample) and avoid photodissociation and photo-oxidation. Spectral accuracy was estimated to be ± 1 cm⁻¹. Spectral resolution was about 3 cm⁻¹. Base-line correction was performed using GRAMS 32 software (Galactic Industries, Salem, NH).

ATR-FTIR Spectroscopy—Room temperature FTIR spectra were recorded using a Bruker IFS 66 Fourier transform infrared spectrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) coupled to a single reflection micro-ATR prism from Pike Technologies (Madison, WI). 30 μ l of 500 μ M bsNOS Fe^{II}CO sample were prepared in a small quartz cuvette as described above. 10 μ l were deposited using a gas-tight syringe on the ZnSe crystal surface of the ATR unit. The crystal was sealed within a gas-tight in-house built chamber, which permitted the control of the atmosphere above the sample. Twenty-fold 250 co-added interferograms were averaged for each FTIR measurement. A water vapor spectrum was used for background correction. Base-line correction was achieved using the GRAMS 32 soft-

Effect of Proximal Ligation on NOS Stability and Activity

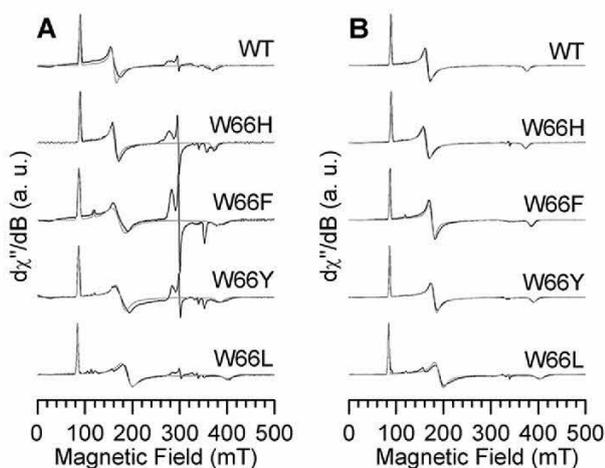


FIGURE 1. EPR spectra of WT and mutants ferric bsNOS in the absence of substrate and cofactor (A) and in the presence of saturating concentrations of L-Arg (B). Experimental conditions were as follows: microwave frequency, 9.41 GHz; microwave power, 2 milliwatts; field modulation amplitude, 2 mT; field modulation frequency, 100 kHz; temperature, 10 K. The simulated spectra are shown as gray lines. The parameters used for the simulations are given in Table 1. *a.u.*, arbitrary units.

ware package (Galactic Industries, Salem, NH). Each spectrum presented in this work corresponds to the averaging of 3–5 individual experiments.

Data Analysis—Identification of spectral components in Raman and/or FTIR bands was achieved as previously described by the combination of Fourier self-deconvolution and second order derivative analysis of the averaged spectra using GRAMS 32 software (Galactic Industries, Salem, NH) (55). The overlapping peaks were resolved by fitting the spectral region to Lorentzian functions using Origin 6.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA). The NOS Raman bands were assigned following previous assignments on NOS (46, 55–60).

RESULTS

Production of Trp⁶⁶ bsNOS Mutants—The sulfur atom of NOS-proximal thiolate is naturally engaged in a strong H-bond interaction with the nitrogen proton of the indole ring of the vicinal tryptophan (see Scheme 1). In order to check the influence of this H-bond interaction on the proximal thiolate properties, we mutated the bsNOS Trp⁶⁶ residue into five different amino acids (see “Experimental Procedures”): a phenylalanine (W66F) and a tyrosine (W66Y) to maintain the aromatic ring but remove the H-bond; a histidine (W66H) that is believed to maintain and even strengthen this H-bond (52); a leucine (W66L) to remove both the H-bond interaction and the aromaticity, keeping some hydrophobic environment; and an alanine (W66A), to remove all possible interactions. We slightly modified the expression and purification protocol to take into account the potential fragility of these mutated proteins (see “Experimental Procedures”). The expression of most of the mutant proteins was generally similar to that of wild-type bsNOS and reached around 10–20 mg of heme protein/liter of culture. However, yields of W66A were extremely weak, suggesting that the stability of the heme core was strongly altered by this mutation.

TABLE 1

Zero-field splitting rhombicity from the simulation of the HS-Fe^{III} heme for wild-type and mutated bsNOS

Common simulation parameters of the EPR spectra: $g = 2$, line width 2 mT, $|D| > 180$ GHz, D strain 10 GHz. D and E strains are the full width at half-maximum of the Gaussian distributions of the zero-field splitting parameters D and E .

	Without arginine		With arginine	
	E/D	E strain (% of E)	E/D	E strain (% of E)
		%		%
WT	0.074	15	0.080	15
W66H	0.076	18	0.077	19
W66Y	0.088	30	0.090	11
W66F	0.091	21	0.094	12
W66L	0.104	19	0.105	14

EPR Analysis of Native Wild-type and Mutated bsNOS—Wild-type and mutated bsNOS electronic properties were analyzed by EPR spectroscopy in the absence (Fig. 1A) or presence (Fig. 1B) of L-Arg. In both cases, the dominant features correspond to a signal from the high spin pentacoordinated (HS-5c) Fe^{III} heme moiety. This signal was simulated, taking into account the electronic Zeeman interaction (taken as isotropic) and the zero-field splitting interaction characterized by the parameters D and E . Because the zero-field splitting interaction is largely dominant over the Zeeman interaction, the important parameter obtained from the simulation is the ratio E/D that is listed in Table 1. The simulated spectra are displayed in Fig. 1 together with the experimental data. In the absence of substrate, the E/D value increases in the order WT < W66H < W66Y < W66F < W66L, with the main difference observed between the two groups WT/W66H and W66Y/F/L. The addition of L-Arg to the proteins greatly increases the structural homogeneity of the samples as indicated by the EPR spectra, which now display only a HS-5c Fe^{III} signal with features narrower than those observed in the absence of substrate. The rhombicity of the HS signal varies continuously between the different bsNOS with the order W66H < WT < W66Y < W66F < W66L.

In the absence of substrate, all bsNOSs exhibit a fraction of low spin hexacoordinated (LS-6c) species. This is particularly true in the case of W66Y and W66F, whereas the proportion of LS-6c heme is much lower in the case of WT, W66H, and W66L. The LS-6c EPR spectra are shown in Fig. 2 for WT and W66H/Y/F along with the simulated spectra, and the parameters used for the simulations are listed in Table 2. Also for those low spin species, an effect of the mutation is observed on the EPR spectra, with the W66H mutant being similar to the WT, whereas the W66Y and W66F exhibit lower g -anisotropy and isotropic g . The Trp⁶⁶ mutation affects the rhombicity of both LS-6c species (in the absence of L-Arg) and HS-5c species (in the absence or presence of L-Arg).

These EPR results are in agreement with the UV-visible data recorded on wild-type and mutated bsNOS samples that show a predominant HS-5c for all proteins in the presence of substrate and cofactor and the presence of a fraction of LS-6c species in the absence of both cofactor and substrate (see Table 3 and supplemental Fig. S1).

UV-visible and Resonance Raman Investigation of the Fe^{II}CO Complexes of bsNOS Proteins—We recorded the UV-visible spectrum of wild-type and mutated bsNOS in the presence of

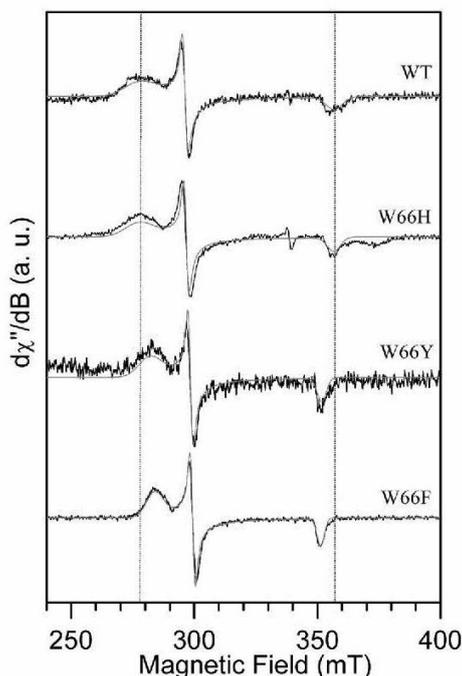


FIGURE 2. EPR spectra of the low spin Fe^{III} complex of bsNOS mutants in the absence of substrate and cofactor. Experimental conditions were as follows: microwave frequency, 9.41 GHz; microwave power, 0.25 milliwatt; field modulation amplitude, 1 mT; field modulation frequency, 100 kHz; temperature, 10 K. The simulated spectra are shown as gray lines. The parameters used for the simulations are given in Table 2. *a.u.*, arbitrary units.

TABLE 2

Simulation parameters for the EPR spectra of the LS Fe^{III} heme for wild-type and mutated bsNOS

Shown are the H strain values in MHz (full width at half-height line width describing broadening due to unresolved hyperfine couplings). g_{iso} is the average of the three principal values g_1 , g_2 , and g_3 .

	g_1 (H strain)	g_2 (H strain)	g_3 (H strain)	g_{iso}	Δg ($g_3 - g_1$)
WT	2.447 (500)	2.292 (0)	1.900 (200)	2.213	0.547
W66H	2.450 (450)	2.288 (0)	1.900 (157)	2.213	0.550
W66Y	2.409 (360)	2.274 (0)	1.928 (103)	2.204	0.481
W66F	2.392 (260)	2.267 (0)	1.931 (77)	2.197	0.461

both *L*-Arg and BH_4 . Characteristic Soret band absorption maxima are listed in Table 3 (see also supplemental Fig. S2). WT and W66H $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complexes are mostly hexacoordinated. W66L $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex exhibits a Soret band at 420 nm characteristic of a weakening of the proximal ligation (58, 61), supporting a loss of the proximal thiolate ligand (62, 63), whereas the proportion of pentacoordinated P420 complexes remains minor for W66F and W66Y mutants. Trp⁶⁶ mutation decreases the stability of the proximal thiolate-heme bond along the sequence WT/W66H > W66F/W66Y > W66L. The instability of the proximal bond of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex significantly increases for all proteins in the absence of *L*-Arg and BH_4 . The absorbance maximum of the Soret band varies with the mutant (Table 3). Wild-type bsNOS exhibits a Soret wavelength around 446.5 nm. This band is blue-shifted for W66H (441.5 nm) and red-shifted for W66F and W66Y mutants (449 and 448.5 nm, respectively), suggesting again an opposite modification of the electron donation of the proximal ligand for the

TABLE 3

Comparison of spectral characteristics of various complexes of wild-type bsNOS and Trp⁶⁶ mutants

Wild-type and mutant complexes were obtained in saturating conditions of *L*-Arg and H_4B . The top part of the table shows Soret wavelength values (in nm) for different NOS complexes. The bottom part shows wave numbers (in cm^{-1}) of different stretches of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complexes. 450/420, hexa- and pentacoordinated $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complexes, respectively. Values in parentheses correspond to full width at half-maximum values in cm^{-1} .

	WT	W66H	W66F	W66Y
Fe^{III}	396	395	396	396
$\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$	438	434.5	438	435
$\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$	439.5 ^a	433 ^a	435.5 ^a	436 ^a
	440	434	435	435.5
$\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$				
450	446.5	441.5	449	448.5
420		440 ^a	420.5	419.5
$\nu_{\text{Fe-CO}}$	501	504.5	500	501.5
$\delta_{\text{Fe-C-O}}$	567	567	566	567
$\nu_{\text{C-O}}$	1917 (9)	1920 (11)	1913 (10)	1913 (11)
		1930 (7)		

^a Complexes obtained in the absence of substrate and cofactor.

W66H and the W66F/Y mutants. The binding of *L*-Arg modifies the equilibrium between the P420 and P450 forms but also the wavelength of the Soret band, confirming that all mutants efficiently bind their natural substrate (Table 3 and supplemental Fig. S2). We also analyzed the binding of imidazole, a distal ligand of ferric NOS. We found that imidazole binds and converts bsNOS WT and W66H/F/Y mutants into a LS-6c complex with a Soret maximum around 426 nm (data not shown), as observed for other bacterial and mammalian NOSs (64–67). However, the dissociation constant was found to vary as a function of the Trp⁶⁶ mutation. The affinity of imidazole was the highest for W66H ($K_d = 0.4$ mM), followed by WT ($K_d = 0.95$ mM), W66F ($K_d = 3$ mM), and finally W66Y ($K_d = 6.5$ mM).

We recorded the resonance Raman spectra of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex of the W66F, W66Y, and W66H mutants in the presence of both substrate and cofactor. They all indicate the major presence of an LS-6c $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex, with some minor photodissociation contribution (data not shown) such as what we observed for the wild-type bsNOS (43). We analyzed the 450–600 cm^{-1} spectral region (Fig. 3B). Spectra were deconvolved by a multi-Lorentzian function as described under “Experimental Procedures.” The peak that corresponds to the $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ bending mode (40, 43, 45) was observed around 567 cm^{-1} for wild-type and mutated NOSs (Table 3), indicating the absence of significant alteration of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex geometry. Whereas wild-type $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex exhibits a $\nu_{\text{Fe-CO}}$ frequency around 501 cm^{-1} (43), this frequency decreases to 500 cm^{-1} for W66F mutant but increases up to 504.5 cm^{-1} for W66H bsNOS (Table 3). These data indicate that the Fe–C bond is the strongest for W66H $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex and then weakens for WT bsNOS and for W66F/Y mutants. Fig. 3A exhibits the ATR-FTIR spectra of the same complexes. We noticed a similar modification of the frequency of the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ stretching mode that was observed around 1920 cm^{-1} for W66H mutant, 1917 cm^{-1} for WT bsNOS, and 1913 cm^{-1} for W66F/Y mutants (Table 3). The C–O bond is stronger for the W66H $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex than for WT and weaker for the W66F/Y mutants. The concomitant decrease (respectively increase) of the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ and ν_{CO} stretching frequencies reflects an increase (respectively decrease) of

Effect of Proximal Ligation on NOS Stability and Activity

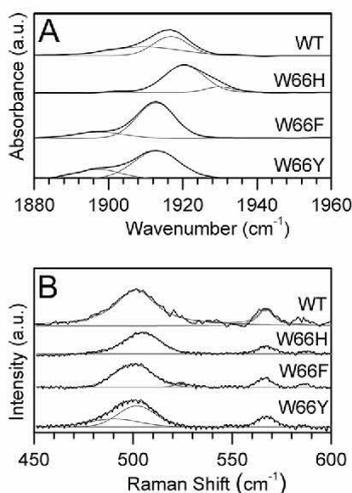


FIGURE 3. Analysis of the effect of the Trp⁶⁶ mutation on the coordination of the distal CO ligand. A, 1800–2000 cm⁻¹ spectral region of ATR-FTIR spectra of Fe^{II}CO complexes for wild-type bsNOS and several bsNOS mutants (W66H, W66F, and W66Y) in the presence of saturating concentrations of L-Arg and H₄B. B, 400–600 cm⁻¹ spectral region of resonance Raman spectra of Fe^{II}CO complexes for the same bsNOS proteins in the presence of saturating concentrations of L-Arg and H₄B. All spectra have been deconvoluted with a multi-Lorentzian function to determine the contribution of each conformation (see “Experimental Procedures”); resulting Lorentzian curves are shown as gray lines. a.u., arbitrary units.

the σ -competition between the distal and proximal ligands of the W66F/Y (respectively W66H) mutants (43, 45, 55).

Characterization of Heme-NO Complexes of Wild-type and Mutant bsNOS—The Fe^{II}NO complexes of WT and W66H/F/Y mutants were found to be relatively stable both in the absence and presence of substrate and cofactor (see [supplemental Fig. S3](#) for the UV-visible spectra). The mutation mostly affects the values of the Soret band maximum that varies between 433 (W66H) and 440 nm (WT; Table 3). The Fe^{II}NO complexes of the bsNOS mutants also display spectral fingerprints similar to those of WT bsNOS in the presence of both L-Arg and BH₄. Only the W66Y Fe^{II}NO spectrum was found to exhibit a shoulder around 417 nm that is reminiscent of what was observed for the nNOS W409F/Y mutant (60, 68). Here again, the wavelength of the Soret band maximum was observed between 434.5 nm (W66H) and 438 nm (WT; Table 3).

The Fe^{II}NO complexes of bsNOS proteins were also analyzed by EPR spectroscopy (Fig. 4). In the presence of L-Arg and BH₄, the observed spectra were dominated by the well known rhombic powder pattern with three different *g*-values and resolved hyperfine coupling with the nitrogen nucleus of the NO ligand (Fig. 4B), characteristic of a hexacoordinated structure (69). This was not the case for W66L (and a negligible fraction of W66Y) Fe^{II}NO complex, whose spectrum corresponded to an axial powder pattern, characteristic of a pentacoordinated nitrosyl iron species. The proportion of the pentacoordinated form increased for all proteins in the absence of any substrate and cofactor (Fig. 4A). The trend in the stability/loss of the proximal ligand is similar to the one we observed for the Fe^{II}CO complexes; whereas WT and W66H Fe^{II}NO complex exhibited an almost completely hexacoordinated structure, W66F/Y Fe^{II}NO complexes corresponded to a mixture of

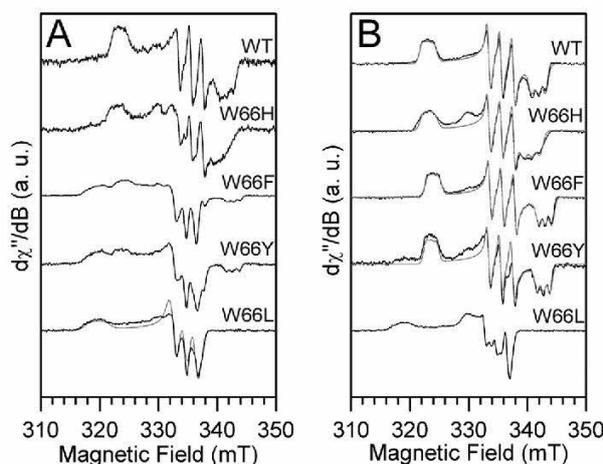


FIGURE 4. EPR spectra of WT and Trp⁶⁶ mutant bsNOS Fe^{II}NO complexes in the absence of substrate and cofactor (A) and in the presence of saturating concentrations of L-Arg and H₄B (B). Experimental conditions were as follows: microwave frequency, 9.41 GHz; microwave power, 0.004 milliwatt; field modulation amplitude, 0.5 mT; field modulation frequency, 100 kHz; temperature, 10 K. The simulated spectra are shown as gray lines. The parameters used for the simulations are given in Table 4. a.u., arbitrary units.

hexa- and pentacoordinated species. W66L Fe^{II}NO species remained entirely pentacoordinated, as expected. The stability of the proximal ligand seems to obey the following order: (WT/H) > (F/Y) > L, which might reflect the variations in the electronic donation of the proximal ligand induced by the Trp⁶⁶ mutations.

The EPR spectra were simulated for all hexacoordinated species (WT and W66H/F/Y in the presence of L-Arg and BH₄; Fig. 4B) as well as for the pentacoordinated complex of W66L (Fig. 4A), taking into account the Zeeman interaction and the hyperfine coupling to the nitrogen nucleus of the NO ligand. Simulation parameters are reported in Table 4. With respect to the hexacoordinated species (WT and W66H/F/Y), the total *g*-anisotropy (Δg) of the Fe^{II}NO signal increased with the order W66H < WT < W66F < W66Y, whereas the isotropic *g*-value (*g*_{iso}) decreased in the same order (Table 4). The isotropic hyperfine coupling of the nitrogen nucleus of the NO molecule also decreased in the same order, indicating that the spin density on the NO nitrogen is the greatest on W66H and decreases slightly for WT > W66F > W66Y. This indicates that Trp⁶⁶ mutations modify the electronic properties of Fe^{II}NO complexes.

DISCUSSION

Trp⁶⁶ of bsNOS is engaged in an H-bond with the heme proximal ligand that is believed to tune the properties of the NOS Fe–S bond (53). We present here for the first time a comparative analysis of five different mutants of this residue that differentially affect the environment of the proximal ligand: (i) the F and Y mutants, already described for nNOS (70) and recently for eNOS and saNOS (53), correspond to a suppression of the H-bond; (ii) the H mutant, described for iNOS (52), is supposed to induce a strengthening of the H-bond; (iii) finally, the A and L mutants, as yet undescribed, should suppress both H-bond and π -stacking interactions. A comparative analysis of

TABLE 4

Simulation parameters for the EPR spectra of Fe^{II}NO complexes for wild-type and mutated bsNOS

The values A_i correspond to the hyperfine coupling with the nitrogen nucleus of the NO ligand. g_{iso} (respectively A_{iso}) is the average of the three principal values g_1 , g_2 , and g_3 (respectively A_1 , A_2 , and A_3). g strain is the full width at half-maximum of the Gaussian distributions of the g principal values.

	g_1 (g strain)	g_2 (g strain)	g_3 (g strain)	g_{iso}	$\Delta g (g_3 - g_1)$	A_1	A_2	A_3	A_{iso}
						MHz	MHz	MHz	MHz
WT	2.0816 (0.0075)	2.0046 (0.0010)	1.9671 (0.0054)	2.0178	0.1145	28.8	58.9	32.5	40.1
W66H	2.0808 (0.0075)	2.0046 (0.0010)	1.9737 (0.0064)	2.0197	0.1071	32.0	59.0	37.0	42.7
W66Y	2.0771 (0.0062)	2.0043 (0.0010)	1.9615 (0.0047)	2.0143	0.1156	26.0	57.0	31.0	38.0
W66F	2.0760 (0.0050)	2.0037 (0.0010)	1.9610 (0.0045)	2.0146	0.1150	27.6	60.0	31.1	39.6
W66L	2.1040 (0.010)	2.0094 (0.0030)	2.0094 (0.0030)	2.0409		42.0	50.5	50.5	47.7

the effects of these different mutations on bsNOS structural and electronic properties should allow a better understanding of the way this H-bond modulates NOS structure and function.

Control of the σ -Competition between NOS-distal and -proximal Ligands—The Fe^{II}CO complex is commonly used as a probe to analyze the influence of heme environment on Fe^{II}O₂ structure and reactivity (55, 71, 72). Vibrational spectroscopies, such as resonance Raman and FTIR spectroscopies, allow the characterization of $\nu_{\text{Fe-CO}}$ and $\nu_{\text{C-O}}$ stretching modes. The frequencies of these modes are sensitive to the electronic properties of the proximal ligand and to polar and/or steric interactions between CO and the heme distal pocket (71, 72). Modifications of the electrostatic/polar distal environment of the CO ligand result in changes in the back donation from the iron $d\pi^*$ orbital to the empty π^* orbital of CO. This leads to the well known inverse correlation between the frequencies of the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ and $\nu_{\text{C-O}}$ (45). Additionally, there is a competition between the proximal and distal ligands for σ -bonding to the dz^2 orbital of the heme iron. Variations in the electronic properties of the proximal ligand will impact this competition and shift the $\nu_{\text{Fe-CO}}/\nu_{\text{C-O}}$ correlation curve. Strong electron-donating ligands (such as the thiolate of NOS and cytochromes P450) will shift correlation lines toward low $\nu_{\text{Fe-CO}}$ and $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies, whereas weak proximal ligand (in the case of globins or some peroxidases) will lead to higher $\nu_{\text{Fe-CO}}$ and $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies.

Our results suggest that the mutations do not affect Fe^{II}CO geometry (no change in the bending modes; Table 3). However, they show an increase in the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ and $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies for the W66H mutant, whereas the W66F and W66Y mutants are characterized by weaker Fe–CO and C–O bonds (Table 3). Plotted in the $\nu_{\text{Fe-CO}}/\nu_{\text{C-O}}$ correlation graph (data not shown), these data show a change in the offset of the correlation line, univocally linked to the variation of the proximal ligand strength. This indicates that the mutation directly modifies the electron donating ability of the proximal thiolate; W66F and W66Y are characterized by stronger electron donation (in agreement with the removal of the H-bond), whereas W66H is characterized by weaker electron donation (in agreement with a strengthening of the H-bond).

In this report, using the inverse $\nu_{\text{Fe-CO}}/\nu_{\text{C-O}}$ correlation, we are able for the first time to probe within a single NOS protein both the increase and the decrease of this σ -competition and to assign these variations to the modifications of the H-bonding interaction in which the proximal ligand is engaged.

Role of Tryptophan-Thiolate H-bond in bsNOS Stability—This variation in σ -competition has strong effects on the properties of bsNOS complexes, as reflected by the effects of the

mutation on Fe^{II}NO and Fe^{II}CO stability (Fig. 4 and supplemental Figs. S2 and S3). We observed a greater proportion of pentacoordinated forms of these complexes for W66F and W66Y bsNOS (due to a stronger σ -competition), whereas W66H hexacoordinated complex (with a weaker proximal ligand) seems as stable as (if not more stable than) WT complexes. The same trend is observed in the dissociation constants of the Fe^{III}-Im complex. The affinity of imidazole for bsNOS heme is the greatest for W66H (weak σ -competition), decreases for WT, and decreases even more for W66F and W66Y (strong σ -competition). However, we do not observe a better stabilization of Fe^{II}CO and Fe^{II}NO species for W66Y; no H-bond with the tyrosine proton, such as the one observed for eNOS (53), can be deduced from our data. Our work clearly indicates that the tryptophan-thiolate H-bond interaction controls the stability of bsNOS Fe^{II}-XO complexes, such as Fe^{II}NO, Fe^{II}CO, and most probably Fe^{II}O₂.

Additionally, our study reveals that other structural features contribute to bsNOS stability. Indeed, upon binding of a distal ligand, such as CO or NO, the W66L complex is quickly and fully converted into pentacoordinated species, indicating the loss of the proximal thiolate ligand. Compared with W66F and W66Y, this further decrease in stability might arise from the loss of specific interactions that stabilize NOS heme, such as the π -stacking between the tryptophan indole ring and the porphyrin cofactor (Scheme 1). Furthermore, the W66A mutant exhibits a critical instability of the protein, as illustrated by the severe difficulties of purification. Accordingly, the EPR spectrum of the W66A ferric enzyme (data not shown) suggests a complete unfolding of the protein and a partial loss of the heme.

Effect of Trp⁶⁶ Mutations on the Electronic Structures of Fe^{II}-XO Complexes—The variations in the electron-donating properties of the proximal thiolate seem to also exert an impact on the electronic structure of bsNOS complexes. For example, the Soret maximum of the Fe^{II}CO spectra is red-shifted for W66F and W66Y mutants (a stronger electron-donating ligand) and blue-shifted for W66H bsNOS (weaker proximal ligand). These variations are also reflected by the shifts of the Soret maxima of Fe^{III}NO and Fe^{II}NO complexes (Table 3) and to a lesser extent by the modification of the low spin/high spin equilibrium. The variations of bsNOS electronic properties can also be appreciated by EPR spectroscopy. The g -anisotropy of LS-6c Fe^{III} species, the minor fraction of native bsNOS, is greater for W66H/WT than for W66F/W66Y (Fig. 2 and Table 2). A similar distinction between W66F/W66Y on one hand and W66H/WT on the other hand is observed for the zero-field splitting rhombicity of the prevalent Fe^{III} HS-5c species. Indeed, the E/D value is clearly greater for the W66F/W66Y

Effect of Proximal Ligation on NOS Stability and Activity

mutants than for W66H and WT (Fig. 1 and Table 1). The same variations are observed for hexacoordinated Fe^{II}NO complex. The anisotropy is greater for W66F/W66Y than for W66H and WT bsNOS (Table 4).

The effects of the variation of the proximal bond on the detailed electronic structure of Fe^{II}NO complexes are more difficult to analyze. However, the comparison of the EPR fingerprints for this series of mutants indicates a significant contribution of the proximal H-bond in the distribution of the electronic density on the Fe^{II}NO moiety. The spin density on the NO nitrogen seems maximal for W66H and decreases as the hydrogen bond strength on the proximal thiolate ligand is decreased (Table 4). These results show that changes in the electron-donating properties of the proximal ligand drastically modify the electronic structure of Fe^{III} and Fe^{II}NO complexes.

Influence of the Proximal H-bond on Fe^{II}-XO Reactivity—The variations of NOS electronic structure induced by the changes in the proximal H-bond interactions are believed to modify its catalytic activity. Indeed, the rates of Fe^{II}O₂ autoxidation and Fe^{II}NO oxidation increase for W409F/Y nNOS (31, 70). Reciprocally, the strengthening of this H-bond in the case of W188H iNOS induces a decrease of Fe^{II}O₂ autoxidation and activation rates that eventually allow the observation of new reaction intermediates (52).

All of these results suggest that bacterial NOSs use the same regulation feature, the “push effect” (73), to finely tune its oxidative chemistry. They also underline the necessity to precisely delimit the proximal ligand electron donation. A too strong electron donation (e.g. for Phe/Tyr mutants) exacerbates the instability of NOS reaction intermediates and mostly leads to uncoupling processes and reactive nitrogen and oxygen species production. A weak electron donation (e.g. for the His mutant) leads to an insufficient reactivity of iron-oxo complexes (74). The functional analysis of our panel of mutants by the Griess assay (see [supplemental Fig. S4](#) and [Table S1](#)) confirms this model. On one hand, the W66H mutant exhibits an extremely weak nitrite synthase activity ($6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), which corresponds to around 5% of WT standard activity. On the other hand, W66F activity remains comparable with that of WT bsNOS (around 50%). This difference could arise from uncoupling reactions due to a stronger electron density on the heme intermediates.

CONCLUSION

We present here a comprehensive analysis of the role of the H-bond in the control of NOS structural and electronic properties. We analyzed the effects of both suppression (W66F/Y) and strengthening (W66H) of this H-bond on Fe^{III}, Fe^{II}CO, and Fe^{II}NO spectroscopic fingerprints.

We evidenced for the first time a tight correlation between the proximal H-bond network, the electron-donating properties of the proximal ligand, and the stability and reactivity of NOS. Our data indicate that the removal of the H-bond (W66F/Y) increases the electron donation properties of the proximal ligand, which in turn induces an increased σ -competition on the iron orbitals. This competition leads to the destabilization of Fe^{II}-XO complexes, such as Fe^{II}NO, Fe^{II}CO, and putatively Fe^{II}O₂. This destabilization is reverted when the

Phe/Tyr residues are replaced by a histidine that restores (and even strengthens) the proximal H-bond and thus diminishes the σ -competition. These results confirm and complete previous information obtained for the Phe/Tyr mutants of saNOS (Trp⁵⁶), eNOS (Trp¹⁸⁰) (53), and nNOS (Trp⁴⁰⁹) (60, 68) and highlight the crucial role of this proximal H-bond in the stability of NOS reactive intermediates.

Additionally, our results suggest that bacterial NOSs are genuine oxygenases that seem to utilize the electron donation from the thiolate to activate distal ligands, such as O₂ and NO, and to use the same regulation feature, namely the proximal H-bond to tune and control their catalytic activity. This pattern could also intervene in the interaction between NOS and other reactive ligands, such as peroxyxynitrite. A comparative analysis of the role of this H-bond in the mechanisms of dioxygen activation, of Fe^{II}NO oxidation, or of peroxyxynitrite activation could help understand the biological specificities of mammalian and bacterial NOSs.

Acknowledgments—We thank Dr. François André for help in modeling the structural effect of the Trp⁶⁶ mutation. We also thank Isabelle Boisdé for technical support.

REFERENCES

1. Hughes, M. N. (2008) *Methods Enzymol.* **436**, 3–19
2. Ignarro, L. J. (2002) *J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 503–514
3. Bogdan, C. (2001) *Nat. Immunol.* **2**, 907–916
4. Bredt, D. S. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 9–15
5. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) *Physiol. Rev.* **87**, 315–424
6. Sessa, W. C. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 2427–2429
7. Lowenstein, C. J., and Padalko, E. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 2865–2867
8. Mungue, I. N., and Bredt, D. S. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 2627–2629
9. Ghosh, D. K., and Salerno, J. C. (2003) *Front. Biosci.* **8**, d193–d209
10. Moreau, M., Lee, G. I., Wang, Y., Crane, B. R., and Klessig, D. F. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 32957–32967
11. Zemojtel, T., Fröhlich, A., Palmieri, M. C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L. S., Wanker, E. E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P., and Durner, J. (2006) *Trends Plant Sci.* **11**, 524–525; author reply 526–528
12. Sudhamsu, J., and Crane, B. R. (2009) *Trends Microbiol.* **17**, 212–218
13. Pant, K., Bilwes, A. M., Adak, S., Stuehr, D. J., and Crane, B. R. (2002) *Biochemistry* **41**, 11071–11079
14. Bird, L. E., Ren, J., Zhang, J., Foxwell, N., Hawkins, A. R., Charles, I. G., and Stammers, D. K. (2002) *Structure* **10**, 1687–1696
15. Sudhamsu, J., and Crane, B. R. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 9623–9632
16. Adak, S., Aulak, K. S., and Stuehr, D. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16167–16171
17. Adak, S., Bilwes, A. M., Panda, K., Hosfield, D., Aulak, K. S., McDonald, J. F., Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Crane, B. R., and Stuehr, D. J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 107–112
18. Kers, J. A., Wach, M. J., Krasnoff, S. B., Widom, J., Cameron, K. D., Bukhalid, R. A., Gibson, D. M., Crane, B. R., and Loria, R. (2004) *Nature* **429**, 79–82
19. Johnson, E. G., Sparks, J. P., Dzikovski, B., Crane, B. R., Gibson, D. M., and Loria, R. (2008) *Chem. Biol.* **15**, 43–50
20. Buddha, M. R., Keery, K. M., and Crane, B. R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 15881–15886
21. Buddha, M. R., Tao, T., Parry, R. J., and Crane, B. R. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 49567–49570
22. Gusarov, I., and Nudler, E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13855–13860
23. Shatalin, K., Gusarov, I., Avetisova, E., Shatalina, Y., McQuade, L. E., Lippard, S. J., and Nudler, E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1009–1013

Effect of Proximal Ligation on NOS Stability and Activity

24. Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M., and Nudler, E. (2009) *Science* **325**, 1380–1384
25. Patel, B. A., Moreau, M., Widom, J., Chen, H., Yin, L., Hua, Y., and Crane, B. R. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18183–18188
26. Maréchal, A., Mattioli, T. A., Stuehr, D. J., and Santolini, J. (2010) *FEBS J.* **277**, 3963–3973
27. Gusarov, I., Starodubtseva, M., Wang, Z. Q., McQuade, L., Lippard, S. J., Stuehr, D. J., and Nudler, E. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 13140–13147
28. Wang, Z. Q., Lawson, R. J., Buddha, M. R., Wei, C. C., Crane, B. R., Munro, A. W., and Stuehr, D. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2196–2202
29. Reece, S. Y., Woodward, J. J., and Marletta, M. A. (2009) *Biochemistry* **48**, 5483–5491
30. Wang, Z. Q., Wei, C. C., Sharma, M., Pant, K., Crane, B. R., and Stuehr, D. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 19018–19025
31. Stuehr, D. J., Santolini, J., Wang, Z. Q., Wei, C. C., and Adak, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 36167–36170
32. Santolini, J., Meade, A. L., and Stuehr, D. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48887–48898
33. Wang, Z. Q., Wei, C. C., and Stuehr, D. J. (2010) *J. Inorg. Biochem.* **104**, 349–356
34. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., and Dawson, J. H. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2841–2888
35. Meunier, B., de Visser, S. P., and Shaik, S. (2004) *Chem. Rev.* **104**, 3947–3980
36. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., and Schlichting, I. (2005) *Chem. Rev.* **105**, 2253–2277
37. Poulos, T. L. (2007) *Drug Metab. Rev.* **39**, 557–566
38. Poulos, T. L. (1996) *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 356–359
39. Chartier, F. J., Blais, S. P., and Couture, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 9953–9962
40. Chartier, F. J., and Couture, M. (2004) *Biophys. J.* **87**, 1939–1950
41. Chartier, F. J., and Couture, M. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 20877–20886
42. Chartier, F. J., and Couture, M. (2007) *Biochem. J.* **401**, 235–245
43. Santolini, J., Roman, M., Stuehr, D. J., and Mattioli, T. A. (2006) *Biochemistry* **45**, 1480–1489
44. Li, D., Kabir, M., Stuehr, D. J., Rousseau, D. L., and Yeh, S. R. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6943–6951
45. Rousseau, D. L., Li, D., Couture, M., and Yeh, S. R. (2005) *J. Inorg. Biochem.* **99**, 306–323
46. Fan, B., Wang, J., Stuehr, D. J., and Rousseau, D. L. (1997) *Biochemistry* **36**, 12660–12665
47. Pant, K., and Crane, B. R. (2006) *Biochemistry* **45**, 2537–2544
48. Doukov, T., Li, H., Soltis, M., and Poulos, T. L. (2009) *Biochemistry* **48**, 10246–10254
49. Li, H., Igarashi, J., Jamal, J., Yang, W., and Poulos, T. L. (2006) *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 753–768
50. Adak, S., and Stuehr, D. J. (2001) *J. Inorg. Biochem.* **83**, 301–308
51. Adak, S., Wang, Q., and Stuehr, D. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17434–17439
52. Tejero, J., Biswas, A., Wang, Z. Q., Page, R. C., Haque, M. M., Hemann, C., Zweier, J. L., Misra, S., and Stuehr, D. J. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 33498–33507
53. Lang, J., Driscoll, D., Gélinas, S., Rafferty, S. P., and Couture, M. (2009) *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1102–1112
54. Stoll, S., and Schweiger, A. (2006) *J. Magn. Reson.* **178**, 42–55
55. Giroud, C., Moreau, M., Mattioli, T. A., Balland, V., Boucher, J. L., Xu-Li, Y., Stuehr, D. J., and Santolini, J. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 7233–7245
56. Wang, J., Stuehr, D. J., Ikeda-Saito, M., and Rousseau, D. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22255–22258
57. Wang, J., Rousseau, D. L., Abu-Soud, H. M., and Stuehr, D. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10512–10516
58. Wang, J., Stuehr, D. J., and Rousseau, D. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 7080–7087
59. Wang, J., Stuehr, D. J., and Rousseau, D. L. (1997) *Biochemistry* **36**, 4595–4606
60. Couture, M., Adak, S., Stuehr, D. J., and Rousseau, D. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38280–38288
61. Martinis, S. A., Blanke, S. R., Hager, L. P., Sligar, S. G., Hoa, G. H., Rux, J. J., and Dawson, J. H. (1996) *Biochemistry* **35**, 14530–14536
62. Presta, A., Siddhanta, U., Wu, C., Sennequier, N., Huang, L., Abu-Soud, H. M., Erzurum, S., and Stuehr, D. J. (1998) *Biochemistry* **37**, 298–310
63. Abu-Soud, H. M., Wu, C., Ghosh, D. K., and Stuehr, D. J. (1998) *Biochemistry* **37**, 3777–3786
64. Berka, V., and Tsai, A. L. (2000) *Biochemistry* **39**, 9373–9383
65. Gorren, A. C., Schmidt, K., and Mayer, B. (2002) *Biochemistry* **41**, 7819–7829
66. Chabin, R. M., McCauley, E., Calaycay, J. R., Kelly, T. M., MacNaul, K. L., Wolfe, G. C., Hutchinson, N. I., Madhusudanaraju, S., Schmidt, J. A., Kozarich, J. W., and Wong, K. K. (1996) *Biochemistry* **35**, 9567–9575
67. Salar, I., Mercey, E., Rekka, E., Boucher, J. L., Nioche, P., Mikula, I., Martasek, P., Raman, C. S., and Mansuy, D. (2006) *J. Inorg. Biochem.* **100**, 2024–2033
68. Voegtli, H. L., Sono, M., Adak, S., Pond, A. E., Tomita, T., Perera, R., Goodin, D. B., Ikeda-Saito, M., Stuehr, D. J., and Dawson, J. H. (2003) *Biochemistry* **42**, 2475–2484
69. Migita, C. T., Salerno, J. C., Masters, B. S., Martasek, P., McMillan, K., and Ikeda-Saito, M. (1997) *Biochemistry* **36**, 10987–10992
70. Adak, S., Crooks, C., Wang, Q., Crane, B. R., Tainer, J. A., Getzoff, E. D., and Stuehr, D. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26907–26911
71. Ray, G. B., Li, X. Y., Ibers, J. A., Sessler, J. L., and Spiro, T. G. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 162–176
72. Spiro, T. G., and Wasbotten, I. H. (2005) *J. Inorg. Biochem.* **99**, 34–44
73. Poulos, T. L. (2005) *Drug Metab. Dispos.* **33**, 10–18
74. Oglario, F., de Visser, S. P., and Shaik, S. (2002) *J. Inorg. Biochem.* **91**, 554–567

Supplementary Information

THE PROXIMAL H-BOND NETWORK MODULATES *BACILLUS SUBTILIS* NO-SYNTASE ELECTRONIC AND STRUCTURAL PROPERTIES

Albane Brunel, Adjélé Wilson, Laura Henry, Pierre Dorlet and Jérôme Santolini

From CEA, iBiTec-S, SB²SM, F-91191 Gif-sur-Yvette, France
and CNRS; LSOD; URA 2096, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Running head: Influence of the proximal electron donation on bsNOS spectroscopic fingerprints
Address correspondence to: Jérôme Santolini, PhD, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France. Fax:
33-1-69088717 ; E-mail: jerome.santolini@cea.fr

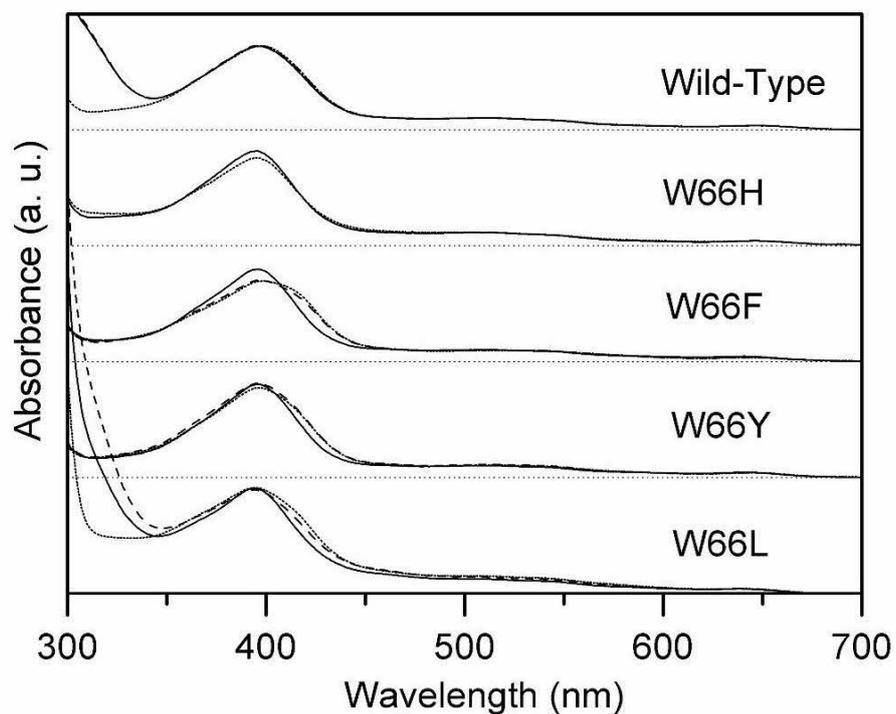


Fig. S1. Effect of L-Arg and H₄B binding on the electronic absorption of Fe^{III} bsNOS mutants. UV-Visible spectra of Fe^{III} bsNOS of wild-type and mutated proteins in the absence of substrate and cofactor (dotted line), in the presence of saturating concentrations of H₄B (dashed line) or in the presence of saturating concentrations of L-Arg and H₄B (solid line).

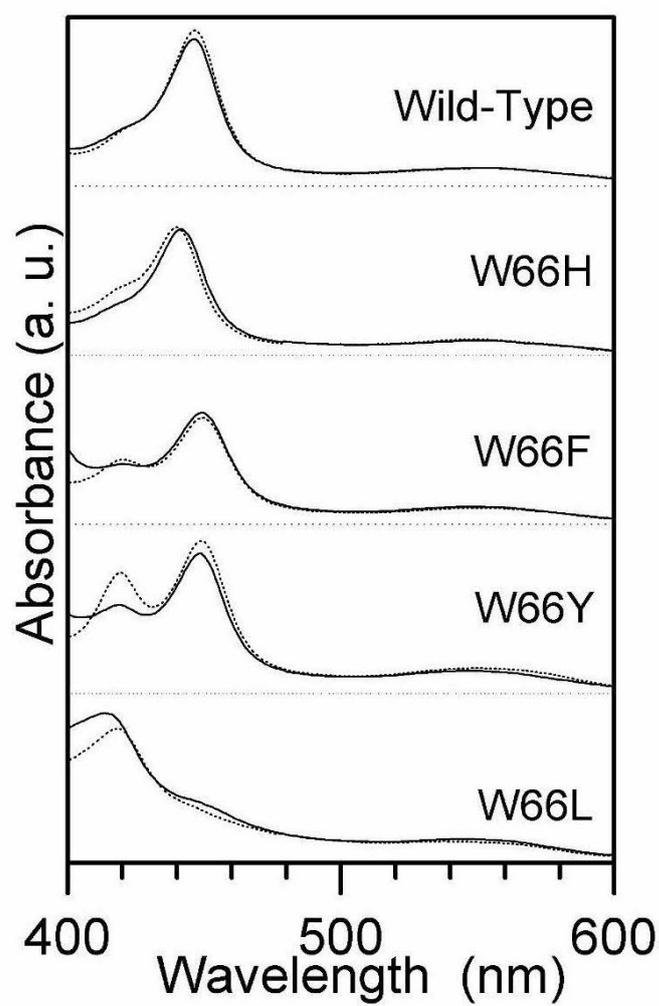


Fig. S2. Influence of the proximal H-bond in the stability of bsNOS Fe^{II}CO complexes. UV-Visible absorption spectra of Fe^{II}CO complexes of bsNOS mutants in the presence (solid line) or in the absence (dotted line) of saturating concentrations of L-Arg and H₂B.

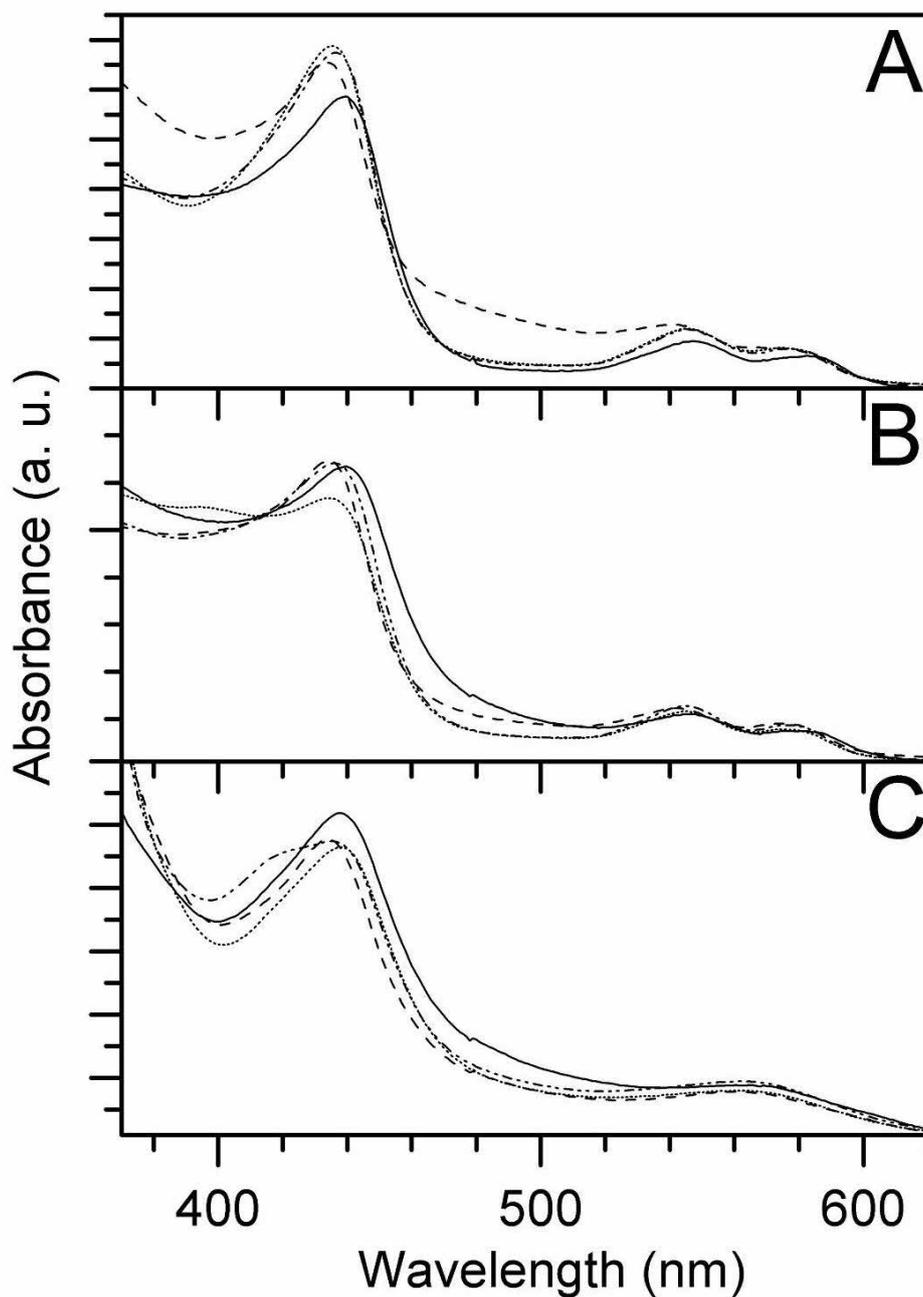


Fig. S3. Stability of bsNOS heme-NO complexes upon different W60 mutations. Superimposed UV-Visible absorption spectra of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (panels A and B) and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (panel C) of wild-type bsNOS (solid line), and of W66F (dotted line), W66H (dashed line) and W66Y (dash-dot line) mutants. Panel A: in the absence of substrate and cofactor. Panel B and C: in the presence of saturating concentrations of L-Arg and H_4B .

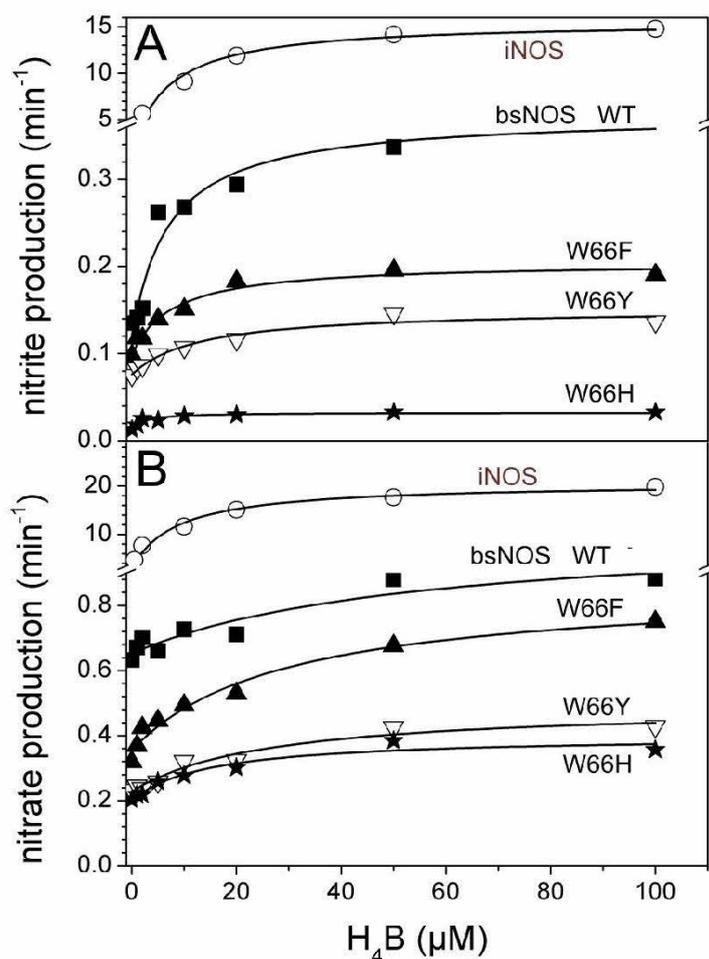


Fig. S4. Nitrite (Panel A) and nitrate (Panel B) production rate for iNOS and bsNOS wild-type and several W66 bsNOS mutants. Nitrite production was measured using the Griess assay. Curves are representative of four distinct experiments. Wild-type and mutants bsNOS samples, with concentrations varying between 1 and 3 μM , were incubated 30 minutes at 30°C in a KPi 0.1M pH 7.4 buffer containing DTT (1mM), BSA (0.1mg/mL), 10% glycerol, SOD (25U/mL) and increasing concentrations of H₄B to insure complete H₄B binding. Reaction was triggered at 30°C by the addition of saturating concentrations of NOHA and H₂O₂. After 10 minutes, reaction was stopped by the addition of excess catalase. Samples were split into two different aliquots. The production of nitrite was determined by adding the Griess reagent to the first aliquot and by measuring the absorption at 548 nm. Optical densities were converted into nitrite concentration using recent calibration curves of the Griess reagent. Production of nitrite was converted into turnover rates using reaction time and enzyme concentration for each sample. Rates were plotted as a function of H₄B concentration. Curves were fit by an hyperbolic function in order to generate apparent V_0 , V_{max} and K_m constants (Panel A). The second aliquot was used to determine nitrate production. Protein contamination was removed from this aliquot by centrifugation through MicroCon membrane concentrators with a 30 kDa cut-off (Millipore, Bedford, MA, USA). Nitrate molecules were converted into nitrite using a nitrate reductase buffer (0.1 M KPi pH 7.4 containing nitrate reductase (80 U/L), NADPH (1 μM), G6P-DH (160 U/L), G6P (900 μM)). The total nitrite production was determined as described above. Nitrate production was thus deduced by subtracting the catalytic nitrite production (derived from Panel A) from the total nitrite concentration. Turnover rates were determined as described above and plotted for the same conditions of H₄B concentrations. V_0 , V_{max} and K_m constants were determined as described above (Panel B).

Table S1. Nitrate and nitrite production rate for bsNOS and several W66 mutants. Values are the average of four distinct measurements. Analytical procedure is described in the legend of Figure S4. Values for W66L mutants were too small to be determined.

	iNOS	bsNOS	W66F	W66Y	W66H	W66L
Nitrite production						
V_0, min^{-1}	0.94	0.20	0.11	0.07	0.013	ND
$V_{\text{max}}, \text{min}^{-1}$	10.30	0.40	0.22	0.12	0.024	ND
Nitrate production						
V_0, min^{-1}	2.43	0.41	0.24	0.15	0.13	ND
$V_{\text{max}}, \text{min}^{-1}$	11.00	0.44	0.36	0.27	0.12	ND

Annexe 2 : Electron Paramagnetic Resonance Characterization of Tetrahydrobiopterin Radical Formation in Bacterial Nitric Oxide Synthase Compared to Mammalian Nitric Oxide Synthase

Albane Brunel, Jérôme Santolini et Pierre Dorlet

Electron Paramagnetic Resonance Characterization of Tetrahydrobiopterin Radical Formation in Bacterial Nitric Oxide Synthase Compared to Mammalian Nitric Oxide Synthase

Albane Brunel, Jérôme Santolini, and Pierre Dorlet*

CNRS, Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, Gif-sur-Yvette, France and CEA, iBiTec-S, Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT H₄B is an essential catalytic cofactor of the mNOSs. It acts as an electron donor and activates the ferrous heme-oxygen complex intermediate during Arg oxidation (first step) and NOHA oxidation (second step) leading to nitric oxide and citrulline as final products. However, its role as a proton donor is still debated. Furthermore, its exact involvement has never been explored for other NOSs such as NOS-like proteins from bacteria. This article proposes a comparative study of the role of H₄B between iNOS and bsNOS. In this work, we have used freeze-quench to stop the arginine and NOHA oxidation reactions and trap reaction intermediates. We have characterized these intermediates using multifrequency electron paramagnetic resonance. For the first time, to our knowledge, we report a radical formation for a nonmammalian NOS. The results indicate that bsNOS, like iNOS, has the capacity to generate a pterin radical during Arg oxidation. Our current electron paramagnetic resonance data suggest that this radical is protonated indicating that H₄B may not transfer any proton. In the 2nd step, the radical trapped for iNOS is also suggested to be protonated as in the 1st step, whereas it was not possible to trap a radical for the bsNOS 2nd step. Our data highlight potential differences for the catalytic mechanism of NOHA oxidation between mammalian and bacterial NOSs.

INTRODUCTION

Nitric oxide is an essential molecule in various biological processes ranging from signaling to cytotoxic purposes (1). It is produced in mammals by NOSs. The mNOSs are homodimeric proteins (2). Each monomer consists of a reductase domain and an oxygenase domain. The reductase domain contains two flavins responsible for the electron transfer from NADPH to the oxygenase domain (3,4). The oxygenase domain bears the catalytic site that consists in a protoporphyrin IX with a cysteine thiolate as proximal ligand (5,6), the substrate binding site and the essential cofactor H₄B (Scheme 1, (7)) binding site. H₄B is crucial for the protein structure, especially for the inducible NOS (iNOS), as it induces structural reorganization, forces H₂O out of the substrate cavity, and permits the ferric heme iron to become high-spin pentacoordinated (HS-5c Fe^{III}) (8).

Like cytochrome P450 (CYP450), NOS are heme-thiolate proteins and are believed to exhibit a similar molecular mechanism (9–11). However H₄B is not present for

CYP450 and bears an essential redox role in NOS catalytic mechanism (Scheme 2). NOS produces NO through a two-step reaction. The Arg substrate is first oxidized into NOHA (12,13). The 2nd catalytic step, NOHA oxidation, leads to the release of NO and citrulline (14). The most accepted mechanism of Arg oxidation by mNOSs is represented on Scheme 2 A. Fe^{III} is first reduced by an electron from the reductase domain. This event is followed by oxygen binding and the resulting complex is converted into a peroxo intermediate via an electron transfer from H₄B. Two proton transfers are necessary for the heterolytic cleavage of the O–O bond. One of these protons could be given by the H₄B considering that CPET is possible. The result is the formation of a Compound I species and water release. Compound I is responsible for Arg oxidation and NOHA formation (15,16). The biopterin radical is then reduced by an electron from the reductase domain (17). The 2nd catalytic step of NOS involves the same initial electron and proton transfer up to the formation of an (hydro)peroxo complex (Scheme 2 B). The subsequent course of events is yet unresolved. A nucleophilic attack of the peroxide intermediate on the NOHA guanidinium moiety is believed to lead to a tetrahedral complex (18), whose rearrangement results in the formation of a Fe^{III}NO intermediate and then NO release (19).

Despite intensive investigations, this catalytic model remains mostly hypothetical (20). With regard to the 1st step (Arg hydroxylation), most of the reaction intermediates (such as Compound I) remain elusive. (Hydro)peroxo-intermediates have been trapped only in extreme conditions and in the absence of H₄B (21,22). The H₄B redox role has been

Submitted February 6, 2012, and accepted for publication May 22, 2012.

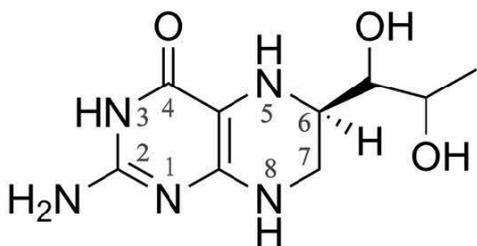
*Correspondence: pierre.dorlet@cea.fr

Abbreviations used: Arg, L-arginine; EPR, electron paramagnetic resonance; Fe^{II}NO, ferrous heme-nitrosyl complex; Fe^{II}O₂, ferrous heme-oxygen complex; Fe^{III}NO, ferric heme-nitrosyl complex; H₄B, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin; HS-5c, high-spin hexacoordinated iron; NO, nitric oxide; NOHA, N^ω-hydroxy-L-arginine; NOS, nitric oxide synthase; NOS_{oxy}, oxygenase domain of NOS; bacNOS, bacterial NOS-like proteins; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; mNOS, mammalian nitric oxide synthase; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; bsNOS, NOS-like protein isolated from *Bacillus subtilis*; CPET, concerted proton electron transfer.

Editor: Patrick Loria.

© 2012 by the Biophysical Society
0006-3495/12/07/0109/9 \$2.00

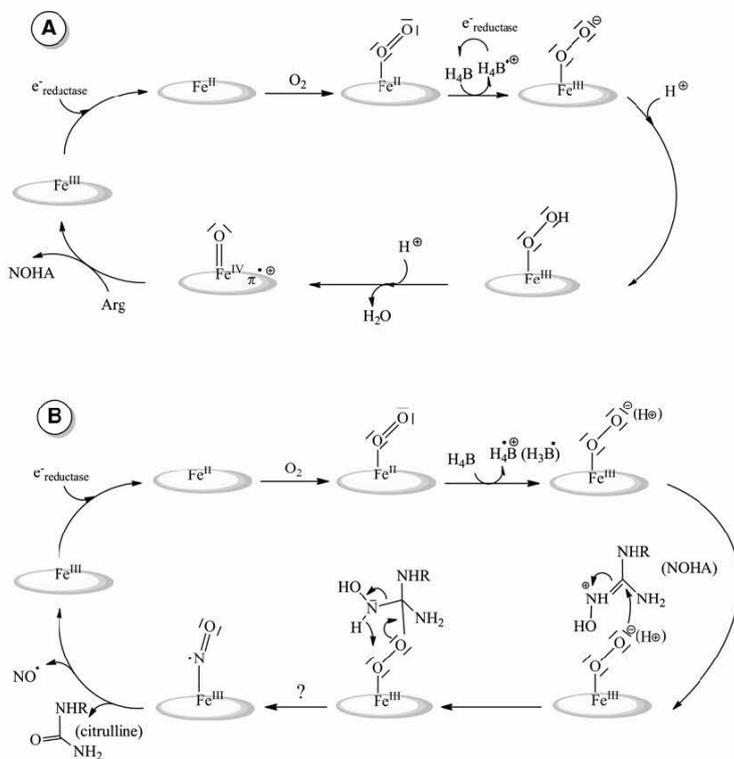
doi: 10.1016/j.bpj.2012.05.032

SCHEME 1 H₄B chemical structure.

demonstrated by radical trapping for the three mammalian NOS isoforms: iNOS, eNOS, and nNOS, respectively (23–25). Its formation is kinetically coupled to the Fe^{II}O₂ decay and to Arg hydroxylation (26). Although H₄B is chemically able to realize a proton coupled electron transfer, this possibility has not been definitely settled. That is why the H₄B protonation state is a key problem in the understanding of the NOSs catalytic cycle. The H₄B radical that builds up during the 1st step of iNOSoxy has been studied in detail by EPR (27). Stoll et al. have demonstrated that the radical trapped is in the H₄B^{•-} state during the 1st step, which suggests that the cofactor transfers only a single electron. During the 2nd step (NOHA oxidation), the H₄B radical has also been observed (28) with kinetic correlation to the Fe^{II}O₂ decay. However, there was no spectroscopic characterization of the radical, its protonation state was

not determined, and H₄B remains a potential proton donor during the second catalytic step.

Some bacterial organisms exhibit NOS gene sequences in their genome. These bacNOS share the same oxygenase domain with mNOS (29). The three-dimensional structure of bacNOS is superimposable to the catalytic domain of mNOS, making it a good investigation model (30–32). However, these bacteria do not possess the H₄B synthesis machinery (29) except maybe for *Bacillus subtilis* (33) but they are capable of producing H₄B analogs, such as tetrahydrofolate, which also contain the pterin moiety. The pterin binding site in bacNOS is truncated and, unlike iNOS, no structural modifications are observed upon H₄B binding. In addition, the redox role of H₄B in bacNOS has never been proven. This questions the actual nature and role of biopterins in general in bacNOS catalysis. Because bacNOS are able to produce NO and this activity seems conditioned to the presence of H₄B (34), H₄B has been routinely used so far in the literature to study bacNOS proteins and compare them to mNOS. To address the redox role of H₄B in bacNOS, our objective in this work was to comparatively explore the H₄B radical state during catalysis for iNOSoxy and bsNOS. Radicals have been trapped by freeze-quench during Fe^{II}O₂ activation. Samples were studied with multifrequency EPR. The H₄B radical formed during the iNOS 1st step has been compared to that formed during the 2nd step. In the same way the bsNOS capacity to



SCHEME 2 Proposed mechanisms of Arg (A) and NOHA (B) oxidations for mNOS. For both steps Fe^{III} is first reduced by an e⁻ from the reductase that is followed by oxygen binding. The oxo intermediate is converted into a (hydro)peroxy-complex via an electron transfer from H₄B. In the 1st step (A) two proton transfers are necessary to achieve heterolytic cleavage of the O–O bond. This will result in the formation of a Compound I responsible for Arg oxidation and NOHA formation. For the 2nd step (B) NOHA oxidation is achieved after the nucleophilic attack of the peroxide intermediate on the NOHA guanidinium moiety leading to a tetrahedral complex. The course of events is unresolved yet but surely finishes with a Fe^{III}NO intermediate responsible for NO release.

form H_4B radical has been investigated and compared to mNOSoxy.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma or Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). H_4B and NOHA were purchased from Enzo Life Sciences (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY). NO was purchased from Messer (Messer France SA, Asnières, France).

Samples preparation

Wild-type bsNOS and iNOSoxy were overexpressed in *Escherichia coli* as described previously (34–36).

Fe^{III} samples were prepared by conditioning the protein with Arg 5 mM or NOHA 5 mM and H_4B 800 μ M after two washing and concentrating cycles in 100 mM potassium phosphate buffer at pH 7.4. Samples were directly frozen into EPR tubes.

$Fe^{II}NO$ samples were prepared from the ferric samples. Anaerobic Fe^{III} NOS was obtained by 100 to 200 cycles of alternate vacuum and argon refilling, directly into an EPR tube. Ferric samples were reduced by an anaerobic dithionite solution (50 mM) added directly into the EPR tube using a gas-tight syringe (Hamilton, Reno, NV) in stoichiometric conditions. A small amount of NO saturated solution was added to form the $Fe^{II}NO$ complex. The NO-saturated solutions were prepared by flushing NO gas through a previously degassed buffer.

For freeze-quench experiments, proteins were conditioned with substrate and cofactor after two washing and concentrating cycles. Anaerobic Fe^{III} NOS 500 μ M was obtained by 100 to 200 cycles of alternate vacuum and argon refilling, directly into a quartz cuvette. Fe^{II} samples were then obtained by reduction of Fe^{III} NOS by the addition of a small volume of anaerobic dithionite solution (50 mM) directly into the cuvette by using a gas-tight syringe. Reduction was monitored by ultraviolet-visible absorption spectroscopy (Uvikon spectrometer from Serlabo Technologies, Entraigues-sur-la-Sorgue, France). To avoid unwanted reactions, the excess of dithionite was eliminated on PD 10 columns (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) or protein desalting spin columns (Thermo Scientific, Courtabouef, France) in a glove box. The ferrous protein sample was then quickly mixed at 10°C with an aerobic buffer by using a Freeze-Quench SFM-300 setup (BioLogic Science Instruments, Grenoble, France). The reaction was stopped at a given time by rapid freezing into an isopentane bath at 150 K. The sample was then collected into an EPR tube and frozen at 77 K. The final protein concentration was \sim 200 μ M. Time calibration on our freeze-quench setup was performed by using a known reaction between hemoglobin and azide (37).

For spectroscopic comparison, tetrahydrobiopterin in solution ($CF_3COOH:MeOH$ 6:1) was chemically oxidized by the addition of H_2O_2 (38). The mixture was immediately frozen in liquid nitrogen.

Some samples were annealed at temperatures above 77 K. This was achieved by transferring the sample to a methanol bath cooled with liquid nitrogen to a given temperature between 140 and 250 K for 1 min. The sample was then frozen back in liquid nitrogen.

EPR spectroscopy

9.4 GHz EPR (X-band) spectra were recorded on a Bruker ELEXSYS 500 spectrometer equipped with a standard TE cavity (Bruker, Wissensbourg, France) and an Oxford Instruments (Abingdon, UK) continuous flow liquid helium cryostat and a temperature control system. 285 GHz EPR spectra were recorded on a lab built transmission spectrometer, described previously (39). The absolute magnetic field was calibrated by using a manga-

nese-doped magnesium oxide standard (40). The absolute error in g was 10^{-4} . However, the relative accuracy was better than 2×10^{-5} in g . Sample temperature regulation was achieved by using a built-in helium flow cryostat. Simulations were performed by using the Easyspin software package (41) and routines written in the lab. The EPR parameters that were used for the simulations are reported in the corresponding tables.

RESULTS

The NOS proteins were reduced and conditioned with saturating concentrations of substrate (Arg or NOHA) and cofactor under anaerobic atmosphere. The catalytic reaction was initiated by rapid mixing of the NOS samples to an air-saturated buffer and was stopped by freeze-quench (see experimental procedures). For iNOSoxy, the time used to stop the reaction was based on the maximum yield of radical reported in the literature: 120 ms for Arg oxidation (25) and 60 ms for NOHA oxidation (28). Additionally, we have used other freezing times to prepare iNOSoxy samples. In the case of bsNOS, various freezing times between 10 and up to 450 ms were tested. With Arg as substrate, we chose the freezing time that yielded the largest amount of H_4B radical (35 ms in our case). With NOHA, the data shown here were obtained with a time of flight of 15 ms. Samples trapped by freeze-quench were analyzed by EPR.

X-band EPR spectra obtained on iNOSoxy and bsNOS samples for steps 1 and 2 are shown in Fig. 1. In all cases, the samples exhibit a rhombic EPR signal characteristic of a HS-5c Fe^{III} species showing that the active site has been at least partially oxidized. In the case of the iNOSoxy 1st step (Arg as initial substrate, Fig. 1 *a*), the effective g -values of the freeze-quench sample agree with a ferric heme with NOHA occupying the substrate cavity (see Table 1). This

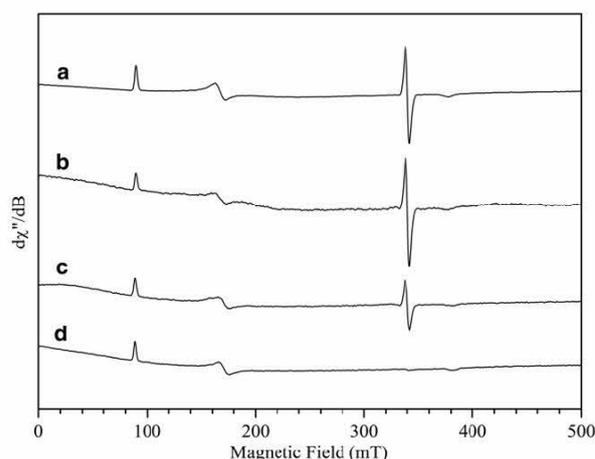


FIGURE 1 9 GHz EPR spectra of iNOSoxy and bsNOS freeze-quench samples. iNOSoxy/Arg stopped at 120 ms (*a*), iNOSoxy/NOHA stopped at 60 ms (*b*), bsNOS/Arg stopped at 35 ms (*c*), and bsNOS/NOHA stopped at 15 ms (*d*). Measurement parameters: microwave frequency 9.496 GHz, microwave power 4 mW, field modulation amplitude 1 mT, temperature 10 K.

TABLE 1 Effective g -values of the HS Fe^{III} heme for iNOSoxy and bsNOS

Samples	g_1^{eff}	g_2^{eff}	g_3^{eff}	E/D
iNOSoxy H ₄ B + Arg at 120 ms	7.63	4.05	1.80	0.076
iNOSoxy H ₄ B + NOHA at 60 ms	7.66	4.05	1.80	0.078
bsNOS H ₄ B + Arg at 35 ms	7.71	3.97	1.79	0.081
bsNOS H ₄ B + NOHA at 15 ms	7.72	3.97	1.79	0.081
iNOSoxy H ₄ B/Arg	7.57	4.13	1.81	0.073
iNOSoxy H ₄ B/NOHA	7.66	4.04	1.80	0.078
iNOSoxy H ₄ B/no substrate	7.68	3.98	1.79	0.079
bsNOS H ₄ B/Arg	7.64	4.07	1.80	0.077
bsNOS H ₄ B/NOHA	7.73	3.97	1.78	0.082
bsNOSoxy H ₄ B/no substrate	7.69	3.99	1.78	0.080

Freeze-quench samples (*top part*) are compared to prepared ferric samples (*bottom part*) with and without substrates. g -values are given ± 0.05 .

supports the fact that Arg has been oxidized in the portion of the proteins that display a ferric heme. Similarly, the bsNOS sample initially loaded with Arg also displays a ferric heme EPR signal in agreement with the presence of NOHA in the substrate cavity (Fig. 1 c, Table 1). In the case of the 2nd catalytic step (NOHA as initial substrate), a similar high-spin ferric heme signal is also observed for both iNOSoxy and bsNOS. However, in this case, the effective g -values (Table 1) do not allow distinguishing conclusively between the presence and the absence of NOHA in the substrate binding pocket. It should be noted that the samples obtained from freeze-quench correspond to a trapped state that might have slightly different effective g -values from a prepared native relaxed state due to geometry constraints.

In addition to the rhombic HS Fe^{III} signal, the X-band EPR spectra exhibits an additional signal in the $g = 2$ region (around 340 mT), which is expanded in Fig. 2. The iNOSoxy 1st step sample (Fig. 2 a) exhibits a radical signal attributed to the biopterin cofactor that has been recently well characterized (27). We recorded the EPR spectra at 70 K or above to alleviate the effect of the dipolar coupling to the nearby high-spin heme species and to better resolve the hyperfine pattern of the radical EPR signal (27). In the case of bsNOS, a radical signal is also observed during the 1st step of catalysis (Fig. 2 c). The spectrum exhibits a similar linewidth and hyperfine coupling pattern compared to that of the iNOSoxy 1st step thus supporting its attribution to a biopterin radical. Further evidence for the attribution of the signal to a biopterin radical in this bacNOS has been obtained by high-field EPR (see below). For the first time, to our knowledge, such a radical is trapped and directly observed for a bacterial NOS-like protein.

The EPR signature of the freeze-quenched sample for the second catalytic step of iNOSoxy (Fig. 2 b) is different than that of the first step. Indeed, the $g = 2$ region of the EPR spectrum shows a mixture of two signals: a radical similar to that observed in the 1st step and an additional signal visible on the low field side. The position of this signal is similar to what is observed for Fe^{II}NO. We have therefore recorded EPR spectra for various Fe^{II}NO NOS samples

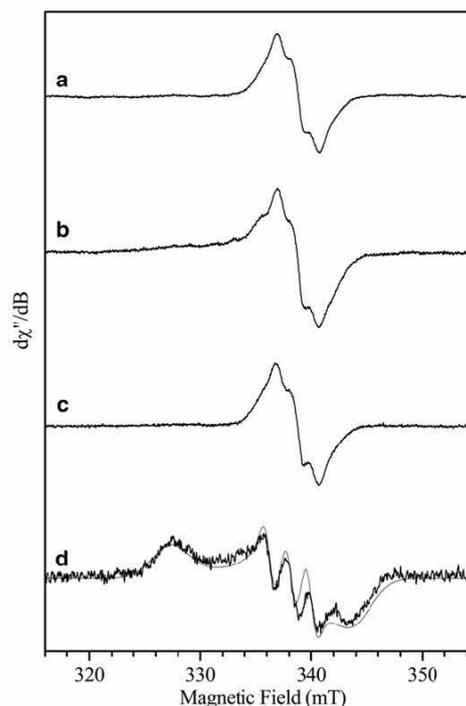


FIGURE 2 $g = 2$ region of the 9 GHz EPR spectra of iNOSoxy and bsNOS freeze-quench samples. iNOSoxy/Arg stopped at 120 ms (a); iNOSoxy/NOHA stopped at 60 ms (b); bsNOS/Arg stopped at 35 ms (c); bsNOS/NOHA stopped at 15 ms (black line), simulation (gray line) (d). Measurement parameters: microwave frequency 9.496 GHz, microwave power 1 mW (a–c) and 0.06 mW (d), field modulation amplitude 0.4 mT (a–c) and 1 mT (d), temperature 70 K (a–c), and 10 K (d), accumulation 20 scans (a–c) and 5 scans (d).

(see Fig. S2 in the Supporting Material and Table 2). The additional signal observed for the freeze-quench 2nd step iNOS sample (Fig. 2 b and Fig. 3 a, black line), corresponds well with the signal of an iNOS Fe^{II}NO sample with NOHA in the substrate cavity (Fig. 3 a, gray line). The difference EPR spectrum between these two samples yields a radical signal (Fig. 3 b) that is superimposable to that observed for the 1st step. In addition, the spectrum obtained on a sample frozen at an earlier time (15 ms, see Fig. 4 b) clearly show different relative amounts of radical and Fe^{II}NO species compared to those of the 60 ms sample (Fig. 4 a). The annealing of the 15 ms sample at different temperatures shows an increase of the radical signal before it starts to decrease (Fig. 4 c). The 240 K annealing point essentially shows a nitrosyl species signal left. These results indicate that the yields of Fe^{II}NO and radical species observed experimentally are not correlated and that the signals of these two species do not decrease concomitantly. Therefore, the nitrosyl heme complex observed here cannot be responsible for the reduction of the biopterin radical back into H₄B.

By contrast to iNOSoxy, no radical was observed by freeze-quench experiments for the 2nd step in the case of

TABLE 2 Simulation parameters for the 10 K EPR spectra of bsNOS and iNOS Fe^{II}NO samples

	g1 (g1 strain)	g2 (g2 strain)	g3 (g3 strain)	A ₁ (MHz)	A ₂ (MHz)	A ₃ (MHz)
bsNOS H ₂ B/NOHA at 120 ms	2.073 (0.0180)	2.006 (0.0000)	1.974 (0.0117)	22	53	25
bsNOS H ₂ B/NOHA	2.073 (0.0180)	2.007 (0.0000)	1.974 (0.0117)	22	58	20
bsNOS H ₂ B/Arg (54)	2.082 (0.0075)	2.005 (0.0010)	1.967 (0.0054)	29	59	33
bsNOS H ₂ B/citrulline	2.083 (0.0080)	2.005 (0.0000)	1.971 (0.0100)	30	58	35
bsNOS H ₂ B/-	2.082 (0.0050)	2.004 (0.0000)	1.972 (0.0025)	28	55	29
iNOS H ₂ B/NOHA at 60 ms	2.070 (0.0160)	2.009 (0.0032)	1.984 (0.0140)	40	52	14
iNOS H ₂ B/NOHA	2.073 (0.0160)	2.009 (0.0032)	1.984 (0.0140)	40	52	14
iNOS H ₂ B/Arg	2.084 (0.0180)	2.005 (0.0000)	1.972 (0.0108)	30	56	34
iNOS H ₂ B/Citrulline	2.084 (0.0080)	2.005 (0.0000)	1.974 (0.0122)	30	57	37
iNOS H ₂ B/-	2.084 (0.0080)	2.005 (0.0000)	1.974 (0.0117)	30	58	36

Freeze-quench samples (120 and 60 ms samples) are compared to samples prepared with different substrates. The hyperfine couplings (A_i) correspond to the coupling with the nitrogen nucleus of the NO ligand.

bsNOS (Figs. 1 *d* and 2 *d*), whatever the trapping time used between 10 ms up to 450 ms (see Fig. S1). The spectrum recorded in the $g = 2$ region exhibits instead a signal characteristic of a Fe^{II}NO species in very low quantity. The g -values obtained by simulations (see Fig. S3 and Table 2) are close to those normally obtained for the nitrosyl species when NOHA is present in the distal pocket, as was the case for the Fe^{II}NO species observed for the 2nd step of iNOSoxy.

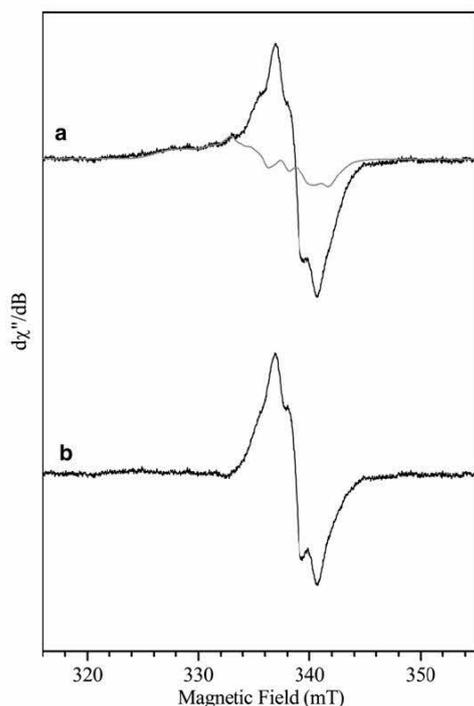


FIGURE 3 $g = 2$ region of the 9 GHz EPR spectra of the 60 ms iNOSoxy + NOHA freeze-quench sample. iNOSoxy/NOHA stopped at 60 ms (black line), scaled spectrum of a prepared iNOSoxy Fe^{II}NO sample with NOHA as substrate (gray line) (a); difference spectrum between the last two (b). Measurement parameters: microwave frequency 9.496 GHz, microwave power 1 mW, field modulation amplitude 0.4 mT, temperature 70 K, accumulation 20 scans.

The g -anisotropy of organic radicals is very small but can be resolved by using high-field EPR. The 285 GHz EPR spectra recorded on the same freeze-quench samples

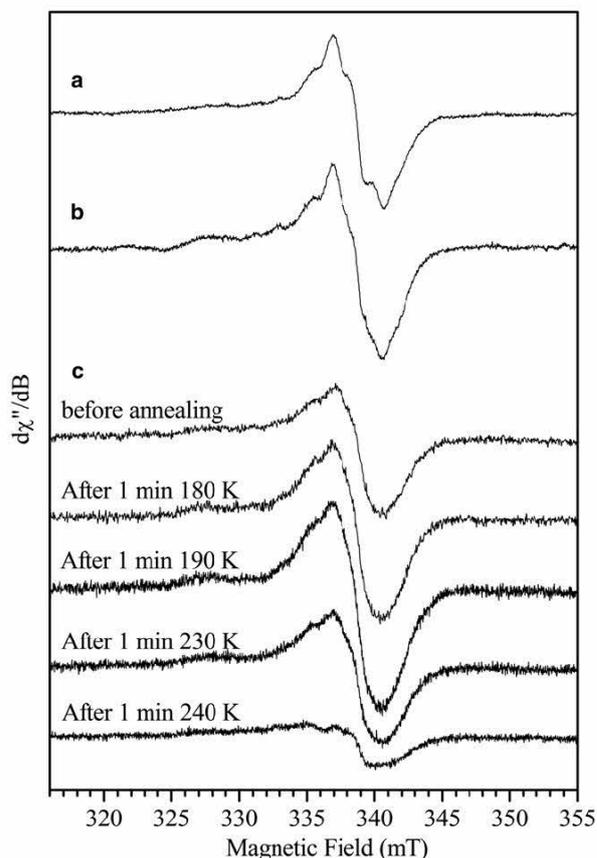


FIGURE 4 $g = 2$ region of the 9 GHz EPR spectra of iNOSoxy + NOHA freeze-quench samples. iNOSoxy/NOHA stopped at 60 ms (a); iNOSoxy/NOHA stopped at 15 ms (b). iNOSoxy/NOHA stopped at 15 ms and spectra after annealing (see experimental procedures) (c). Measurement parameters: microwave frequency 9.496 GHz, microwave power 1 mW (a and b) and 0.25 mW (c), field modulation amplitude 0.4 mT (a and b) and 1 mT (c), temperature 70 K (a and b) and 10 K (c), accumulation 20 scans (a and b) and 2 scans (c).

analyzed with 9 GHz EPR are shown in Fig. 5 (black lines) along with their simulations (gray lines). Due to a significant decrease of intensity with temperature at this frequency, it was not possible to record the high-field spectra at higher temperatures in our samples. The parameters for the simulations are reported in Table 3. For comparison, we obtained a spectrum in organic solvent for an isolated tetrahydrobiopterin radical oxidized chemically. Noteworthy, the three turning points of the corresponding high-field spectrum (Fig. 5 d) are well resolved and the linewidth narrower compared to what is observed on the protein samples. This is due to the absence of magnetic interaction between the radical and the heme in addition to good glass properties of the organic solvent. The similarities in g -values between the isolated biopterin radical and those observed in the NOS protein samples allows to attribute experimentally the protein radicals to the cofactor (Table 3). The radical obtained with iNOSoxy during Arg oxidation exhibits g -values ($g_x = 2.0043$, $g_y = 2.0038$, and $g_z = 2.0021$) in good agreement with those reported recently in the literature (27). The 285 GHz high-field spectrum for the radical generated in the bsNOS 1st step (Fig. 5 c) is virtually identical to that of

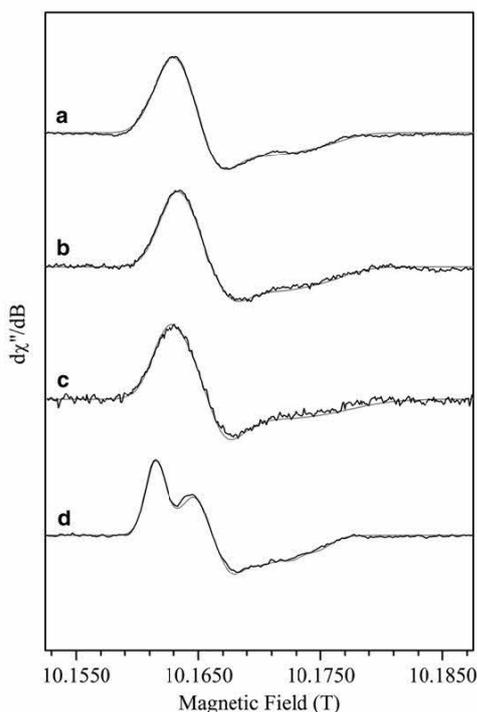


FIGURE 5 285 GHz EPR spectra of iNOSoxy and bsNOS freeze-quench samples. Black lines: experimental spectra for iNOSoxy/Arg stopped at 120 ms (a), iNOSoxy/NOHA stopped at 60 ms (b), bsNOS/Arg stopped at 35 ms (c), and H_4B chemically oxidized (d). Gray lines: simulated spectra. Measurement parameters: spectrometer frequency 285 GHz, microwave power 0.25 μ W, field modulation amplitude 2 mT, temperature 4 K. Simulation parameters are given in Table 2.

the iNOSoxy 1st step. Similarly, the high-field EPR spectrum recorded on the freeze-quenched sample for the 2nd step of iNOSoxy (Fig. 5 b) shows a radical signal identical to that observed for the 1st step.

For these three radicals, the similarity in g -values (measured from the 285 GHz spectra) and above all hyperfine coupling patterns (comparison of the 9 GHz spectra) strongly support the same protonation state. More precisely, the hyperfine coupling of the N5 nucleus is significantly affected for the neutral radical compared to the protonated radical (27); therefore, a change of protonation state would affect the hyperfine splitting dominating the 9 GHz spectra. This is not observed experimentally (see Fig. 2 and Fig. S4 for samples in D_2O), which indicates that all three observed radicals are in the $H_4B^{\cdot-}$ state.

DISCUSSION

H_4B is believed to play a crucial role in the NOSs molecular mechanism on one hand for its implication in the electron transfer processes required for oxygen activation (23,42) and $Fe^{II}NO$ oxidation (28), and on the other hand as a potential proton donor. The pterin radical has been well characterized for the 1st step of iNOSoxy by EPR combined to the density functional theory calculations and demonstrated to be in its protonated form $H_4B^{\cdot-}$ (27). During NOS catalysis it has been proposed that the biopterin cofactor acts not only as an electron donor but also as a proton donor in a CPET (21,43,44). If the debate remains open due to the unknown initial protonation state of the pterin and the possibility of ultrafast initial CPET as discussed by Stoll (27), the fact that the trapped radical is $H_4B^{\cdot-}$ tend to support a model in which the pterin acts only as an electron donor. In earlier EPR work, the radical trapped for the 1st catalytic step of nNOS and eNOS was already suggested to be protonated (26,45). By analyzing the EPR signals observed both for the heme and the radical, we show that the buildup of the $H_4B^{\cdot-}$ radical is correlated to the formation of NOHA-bound ferric species, which indicates that H_4B electron transfer is associated to Arg hydroxylation not only for iNOSoxy but also for bsNOS in the 1st step of catalysis.

Investigations on the role of H_4B for the iNOSoxy 2nd step are less extended. The trapping of H_4B radical during NOHA oxidation has been reported only once (28), but its protonation state has neither been determined nor compared to the 1st step. We completed the characterization of this radical using the same methodological approach for the 2nd catalytic step of iNOSoxy. The comparison of the EPR spectra obtained for this radical relative to that of the 1st step indicates that its protonation state is identical in both steps. Therefore, the biopterin seems to transfer only one electron, and no proton, in the course of NOHA oxidation. The absence of proton transfer from the pterin cofactor, combined with the modification of the water-guanidinium- $Fe^{II}O_2$ H-bond network (46–48), drastically restrains the

TABLE 3 Simulation parameters for the high-field EPR spectra of the H₄B radicals

	g1 (g-strain)	g2 (g-strain)	g3 (g-strain)	A _{zz} (MHz)
iNOSoxy H ₄ B/Arg at 120 ms	2.0043 (0.00003)	2.0038 (0.00018)	2.0021 (0.0012)	63
iNOSoxy H ₄ B/NOHA at 60 ms	2.0042 (0.00003)	2.0036 (0.00018)	2.0021 (0.0012)	63
bsNOS H ₄ B/Arg at 35 ms	2.0043 (0.00003)	2.0036 (0.00018)	2.0021 (0.0012)	66
H ₄ B chemical oxidation	2.0045	2.0036	2.0022	61
iNOSoxy H ₄ B/Arg (27)	2.0043	2.0035	2.0021	63

Hyperfine coupling (A_{zz}) corresponds to the coupling of the N₅ nitrogen nucleus of H₄B.

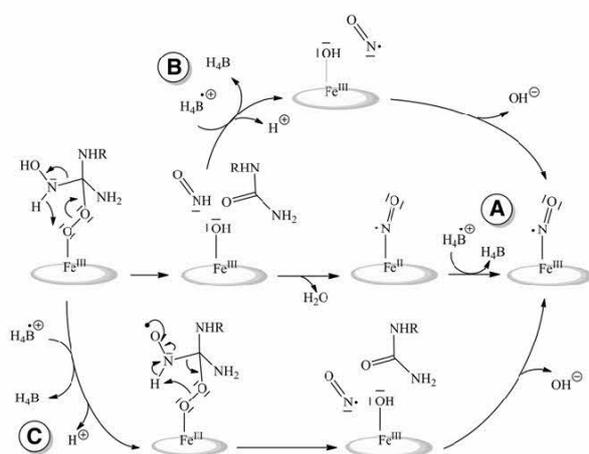
number of possible proton donors. This result is an additional support for a mechanism that does not involve the heterolytic cleavage of NOS ferric heme-peroxide intermediate.

Compared to the 1st step, the reduction of the H₄B^{•-} radical in iNOSoxy is greatly accelerated for the 2nd step (0.71 s⁻¹ vs. 8.3 s⁻¹ (26,28)), which implies that it may exert an oxidative role at the end of the catalytic cycle. Various regeneration pathways for the pterin radical have been proposed, including reduction by the Fe^{II}NO intermediate (Scheme 3). The same Fe^{II}NO complex, obtained with Angeli's salt, was shown to speed up the H₄B^{•-} reduction, supporting an electron transfer from the nitrosyl complex to the pterin radical (49). Thus, the Fe^{II}NO oxidation pathway is believed to account for the decay of the pterin radical. However, this should have allowed monitoring the related Fe^{II}NO → Fe^{III}NO oxidation reaction, whereas no Fe^{II}NO buildup has ever been reported for iNOSs in stopped-flow or freeze-quench experiments. In addition, the reported rates of Fe^{II}NO appearance (36.7 s⁻¹) and pterin radical decay (8.3 s⁻¹) do not match (28), which suggests additional reaction intermediates. Noteworthy, we observed the presence of a Fe^{II}NO intermediate along

with the H₄B^{•-} radical. This is somewhat similar to what has been observed in eNOS loaded with 4-amino-H₄B and NOHA by Sørli and co-workers (44). Fe^{II}NO was observed for different freezing times (15 ms and 60 ms) but in different quantities and without any correlation with the pterin radical buildup. Considering the extent of Fe^{II}NO buildup and the presence of NOHA in the substrate cavity of the nitrosyl complex, this could arise from some minor side reactions between released NO and residual ferrous heme. In any case the results observed here regarding uncorrelated amounts of radical and nitrosyl species do not support a model for the 2nd step in which the reduction of the radical would be provided by a ferrous heme-nitrosyl intermediate to form Fe^{II}NO that then releases NO.

Another aspect of our work deals with the actual role of H₄B in bacNOS mechanism. Although bacNOS are commonly used as a study model for mNOSs, they have not been shown to share the same catalytic mechanism. Although H₄B (but also tetrahydrofolate) increases the rate of bacNOS Fe^{II}O₂ decay and enhances their nitrite production (34), this effect is not necessarily related to a redox role. Furthermore, the effect of the presence of H₄B on the Fe^{II}O₂ decay is much greater for iNOSoxy than for bsNOS: 120 times faster with H₄B for iNOSoxy (28) versus 13 times for bsNOS (34). Radical trapping by freeze-quench allowed us to investigate the formation of a pterin radical during bsNOS catalysis and to compare its properties with those of the radical trapped for iNOSoxy. The radical we trapped for bsNOS during Arg oxidation suggests the capacity of the pterin to transfer one electron to the Fe^{II}O₂ species. The protonation state of the radical is the same for both the bsNOS and iNOSoxy 1st steps. These results strongly suggest that bacNOS and mNOS share a common electron transfer process when Arg is the substrate. They support the conservation of the 1st Arg-hydroxylation step and validate the use of bacNOS as a study model for more complex mNOSs.

By contrast, results obtained for the 2nd catalytic step revealed strong differences between iNOSoxy and bsNOS. Indeed, we did not observe any radical build-up for bsNOS 2nd step for a time ranging from 15 to 450 ms. There are a few possibilities for the absence of radical formation in this case: i), First it could arise from extremely fast H₄B^{•-} reduction kinetics. The decay of the Fe^{II}O₂ species has been reported to be ~8 s⁻¹ for the 2nd step of bsNOS (34,50) and should correspond to the formation rate of the



SCHEME 3 Proposed mechanisms for H₄B^{•+} regeneration during NOHA oxidation. (A) After the recombination of NO⁻ with NOS ferric heme, the H₄B radical reoxidizes Fe^{II}NO into Fe^{III}NO. (B) Direct reaction of the H₄B radical with the nitrosyl product. (C) The H₄B radical may be able to participate to the tetrahedral complex rearrangement directly leading to NO⁻.

biopterin radical. Assuming an identical radical decay rate for bsNOS and iNOSoxy (8.3 s^{-1} (28)), the calculated maximum yield of the radical should be 36% for a reaction time of 120 ms, which should be detected by using our protocol. Therefore, the lack of radical signal would mean a much faster reduction rate (estimated to at least 8 to 10 times that of iNOSoxy 2nd step) so that the maximum radical yield is low enough not to be detected. Although this seems unlikely, it could derive from an increased solvent accessibility to the pterin pocket in the case of bsNOS. However, in that case it should also affect the reduction kinetics for the 1st step and impede the buildup of the radical, which is not the case. ii), We could also envision the absence of oxidative turnover. Indeed, the g -values of ferric bsNOS at 15 ms do not allow excluding the presence of NOHA still in the substrate cavity. Our protocol (initial excess of NOHA and desalting on column) cannot preclude the rebinding of some NOHA as substrate after reaction. This is supported by the fact that the g -values for the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ species observed are in agreement with the presence of NOHA. At the same time, the presence of some $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ species argues for the occurrence of some NOHA oxidation. In addition, the measurement of nitrite and nitrate concentrations with the Griess reagent for the 2nd step freeze-quench samples also supports turnover of NOS. iii), The absence of radical trapping for bsNOS 2nd step might as well simply indicate the absence of electron transfer from H_4B . This raises the question of the redox role of H_4B in the 2nd catalytic step of bacNOS. Indeed, H_4B is not formally required to produce NO (2,51). Some chemical considerations and density functional theory calculations plead for an electron or H^+ transfer directly from the NOHA (52,53). These argumentations could be pertinent for NOS of bacteria for which, noticeably enough, H_4B is intrinsically absent. The effect of H_4B on bacNOS activity should be reassessed when one considers that this activity (NO or nitrite production) is negligible compared to iNOS production (only 8%). In any case, our results stress the strong discrepancy between iNOSoxy and bsNOS in the role of H_4B in the 2nd catalytic step. Further work ongoing in our laboratory aims at elucidating the origin of these differences that could shed some light on the catalytic mechanism and give insights into the role of the bsNOS protein.

CONCLUSION

Our report furthers the essential investigation of the redox role of H_4B in the catalytic activity of various NOS enzymes. We showed that the nature of the pterin radical is similar for both iNOSoxy catalytic steps. Our results are in agreement with an absence of the direct role of H_4B in the proton transfer sequences. For the first time, to our knowledge, we showed that bsNOS is able to generate a similar pterin radical as for iNOSoxy. Our results suggest that bacterial and mammalian NOSs share the same mechanism for the 1st catalytic step (Arg hydroxylation). On the opposite, we failed to trap a radical in bsNOS 2nd catalytic step. This supports the hypothesis that the 2nd catalytic step of bsNOS and iNOSoxy probably differs. The possible specificity of bsNOS molecular mechanism and catalytic activity raises again the question of the actual biological functioning and role of bacterial NOS-like proteins.

ism for the 1st catalytic step (Arg hydroxylation). On the opposite, we failed to trap a radical in bsNOS 2nd catalytic step. This supports the hypothesis that the 2nd catalytic step of bsNOS and iNOSoxy probably differs. The possible specificity of bsNOS molecular mechanism and catalytic activity raises again the question of the actual biological functioning and role of bacterial NOS-like proteins.

SUPPORTING MATERIAL

Four figures are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(12\)00612-1](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(12)00612-1).

We thank Sun Un for the use of the High-Field EPR spectrometer and useful discussions and Dennis Stuehr for discussions.

REFERENCES

1. Ignarro, L. J. 2002. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.* 53: 503–514.
2. Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593–615.
3. Stuehr, D. J., J. Tejero, and M. M. Haque. 2009. Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: electron transfer through the nitric oxide synthase flavoprotein domain. *FEBS J.* 276:3959–3974.
4. Roman, L. J., P. Martásek, and B. S. Masters. 2002. Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem. Rev.* 102:1179–1190.
5. White, K. A., and M. A. Marletta. 1992. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry.* 31:6627–6631.
6. Crane, B. R., A. S. Arvai, ..., J. A. Tainer. 1998. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science.* 279:2121–2126.
7. Wei, C. C., B. R. Crane, and D. J. Stuehr. 2003. Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chem. Rev.* 103:2365–2383.
8. Presta, A., U. Siddhanta, ..., D. J. Stuehr. 1998. Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 37:298–310.
9. Sono, M., D. J. Stuehr, ..., J. H. Dawson. 1995. Identification of nitric oxide synthase as a thiolate-ligated heme protein using magnetic circular dichroism spectroscopy. Comparison with cytochrome P-450-CAM and chloroperoxidase. *J. Biol. Chem.* 270:19943–19948.
10. Sono, M., M. P. Roach, ..., J. H. Dawson. 1996. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* 96:2841–2888.
11. Meunier, B., S. P. de Visser, and S. Shaik. 2004. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem. Rev.* 104:3947–3980.
12. Marletta, M. A., A. R. Hurshman, and K. M. Rusche. 1998. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:656–663.
13. Stuehr, D. J., N. S. Kwon, ..., J. Wiseman. 1991. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* 266:6259–6263.
14. Kwon, N. S., C. F. Nathan, ..., D. J. Stuehr. 1990. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J. Biol. Chem.* 265:13442–13445.
15. Poulos, T. L. 2005. Structural biology of heme monooxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:337–345.
16. Li, H., and T. L. Poulos. 2005. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* 99:293–305.

17. Wei, C. C., Z. Q. Wang, ..., D. J. Stuehr. 2008. Catalytic reduction of a tetrahydrobiopterin radical within nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 283:11734–11742.
18. Woodward, J. J., M. M. Chang, ..., M. A. Marletta. 2009. The second step of the nitric oxide synthase reaction: evidence for ferric-peroxo as the active oxidant. *J. Am. Chem. Soc.* 131:297–305.
19. Boggs, S., L. Huang, and D. J. Stuehr. 2000. Formation and reactions of the heme-dioxygen intermediate in the first and second steps of nitric oxide synthesis as studied by stopped-flow spectroscopy under single-turnover conditions. *Biochemistry*. 39:2332–2339.
20. Santolini, J. 2011. The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: a story of electrons and protons. *J. Inorg. Biochem.* 105:127–141.
21. Davydov, R., A. Ledbetter-Rogers, ..., B. M. Hoffman. 2002. EPR and ENDOR characterization of intermediates in the cryoreduced oxy-nitric oxide synthase heme domain with bound L-arginine or N(G)-hydroxyarginine. *Biochemistry*. 41:10375–10381.
22. Davydov, R., J. Sudhamsu, ..., B. M. Hoffman. 2009. EPR and ENDOR characterization of the reactive intermediates in the generation of NO by cryoreduced oxy-nitric oxide synthase from *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Am. Chem. Soc.* 131:14493–14507.
23. Bec, N., A. C. Gorren, ..., R. Lange. 1998. Reaction of neuronal nitric-oxide synthase with oxygen at low temperature. Evidence for reductive activation of the oxy-ferrous complex by tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 273:13502–13508.
24. Hurshman, A. R., C. Krebs, ..., M. A. Marletta. 1999. Formation of a pterin radical in the reaction of the heme domain of inducible nitric oxide synthase with oxygen. *Biochemistry*. 38:15689–15696.
25. Wei, C. C., Z. Q. Wang, ..., D. J. Stuehr. 2001. Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 276:315–319.
26. Wei, C. C., Z. Q. Wang, ..., D. J. Stuehr. 2005. The three nitric-oxide synthases differ in their kinetics of tetrahydrobiopterin radical formation, heme-dioxy reduction, and arginine hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 280:8929–8935.
27. Stoll, S., Y. NejatyJahromy, ..., R. D. Britt. 2010. Nitric oxide synthase stabilizes the tetrahydrobiopterin cofactor radical by controlling its protonation state. *J. Am. Chem. Soc.* 132:11812–11823.
28. Wei, C. C., Z. Q. Wang, ..., D. J. Stuehr. 2003. A tetrahydrobiopterin radical forms and then becomes reduced during Nomega-hydroxyarginine oxidation by nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 278:46668–46673.
29. Sudhamsu, J., and B. R. Crane. 2009. Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends Microbiol.* 17:212–218.
30. Adak, S., A. M. Bilwes, ..., D. J. Stuehr. 2002. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:107–112.
31. Pant, K., A. M. Bilwes, ..., B. R. Crane. 2002. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*. 41:11071–11079.
32. Bird, L. E., J. Ren, ..., D. K. Stammers. 2002. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. *Structure*. 10:1687–1696.
33. Crane, B. R., J. Sudhamsu, and B. A. Patel. 2010. Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 79:445–470.
34. Adak, S., K. S. Aulak, and D. J. Stuehr. 2002. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 277:16167–16171.
35. Ghosh, D. K., C. Wu, ..., D. J. Stuehr. 1997. Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *Biochemistry*. 36:10609–10619.
36. Gachhui, R., D. K. Ghosh, ..., D. J. Stuehr. 1997. Mutagenesis of acidic residues in the oxygenase domain of inducible nitric-oxide synthase identifies a glutamate involved in arginine binding. *Biochemistry*. 36:5097–5103.
37. Brittain, T. 2000. The ferric form of the three human embryonic hemoglobins and their reactions with azide ions. *J. Inorg. Biochem.* 81:99–103.
38. Bobst, A. 1967. Trapping of radicals during the oxidation of tetrahydrofolic acid and tetrahydropterine. *Helv. Chim. Acta.* 50:2222–2225.
39. Dorlet, P., A. W. Rutherford, and S. Un. 2000. Orientation of the tyrosyl D, pheophytin anion, and semiquinone QA⁻ radicals in photosystem II determined by high-field electron paramagnetic resonance. *Biochemistry*. 39:7826–7834.
40. Burghaus, O., M. Plato, ..., W. Lubitz. 1993. 3-mm High-field EPR on semiquinone radical anions Q⁻ related to photosynthesis and on the primary donor P⁺ and acceptor QA⁻ in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *J. Phys. Chem.* 97:7639–7647.
41. Stoll, S., and A. Schweiger. 2006. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* 178:42–55.
42. Gorren, A. C., N. Bec, ..., B. Mayer. 2000. Low-temperature optical absorption spectra suggest a redox role for tetrahydrobiopterin in both steps of nitric oxide synthase catalysis. *Biochemistry*. 39:11763–11770.
43. Gorren, A. C., and B. Mayer. 2007. Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770:432–445.
44. Sorlie, M., A. C. Gorren, ..., B. Mayer. 2003. Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin: proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor. *J. Biol. Chem.* 278:48602–48610.
45. Schmidt, P. P., R. Lange, ..., K. K. Andersson. 2001. Formation of a protonated trihydrobiopterin radical cation in the first reaction cycle of neuronal and endothelial nitric oxide synthase detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6:151–158.
46. Chartier, F. J., and M. Couture. 2007. Substrate-specific interactions with the heme-bound oxygen molecule of nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 282:20877–20886.
47. Li, D., M. Kabir, ..., S. R. Yeh. 2007. Substrate- and isoform-specific dioxygen complexes of nitric oxide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 129:6943–6951.
48. Pant, K., and B. R. Crane. 2006. Nitrosyl-heme structures of *Bacillus subtilis* nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation. *Biochemistry*. 45:2537–2544.
49. Woodward, J. J., Y. Nejatyjahromy, ..., M. A. Marletta. 2010. Pterin-centered radical as a mechanistic probe of the second step of nitric oxide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 132:5105–5113.
50. Wang, Z. Q., C. C. Wei, ..., D. J. Stuehr. 2004. A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. *J. Biol. Chem.* 279:19018–19025.
51. Zhu, Y., and R. B. Silverman. 2008. Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), Heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s). *Biochemistry*. 47:2231–2243.
52. Cho, K. B., and J. W. Gault. 2005. Second half-reaction of nitric oxide synthase: computational insights into the initial step and key proposed intermediate. *J. Phys. Chem. B.* 109:23706–23714.
53. Robinet, J. J., K. B. Cho, and J. W. Gault. 2008. A density functional theory investigation on the mechanism of the second half-reaction of nitric oxide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 130:3328–3334.
54. Brunel, A., A. Wilson, ..., J. Santolini. 2011. The proximal hydrogen bond network modulates *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase electronic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 286:11997–12005.

Supporting Material

for

**EPR CHARACTERIZATION OF TETRAHYDROBIOPTERIN RADICAL FORMATION IN
BACTERIAL NOS COMPARED TO MAMMALIAN NOS**

Albane Brunel, Jérôme Santolini and Pierre Dorlet*

From CNRS; Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication; UMR 8221, F-91191 Gif-sur-Yvette, France and CEA, iBiTec-S, SB²SM, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Running title: *Biopterin radical in bsNOS and iNOS*

* To whom correspondence should be addressed: Pierre Dorlet, CNRS; Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication; UMR 8221, F-91191 Gif-sur-Yvette, France and CEA/iBiTec-S/SB²SM, F-91191 Gif-sur-Yvette, France. Fax: (+33)-1-69088717; E-mail: pierre.dorlet@cea.fr

Figure S1.

9 GHz EPR spectra of bsNOS +NOHA freeze-quench samples at various freezing times. bsNOS/NOHA stopped at 10 ms (a), bsNOS/NOHA stopped at 150 ms (b) and bsNOS/NOHA stopped at 500 ms (c). Measurement parameters: microwave frequency 9.496 GHz, microwave power 4 mW, field modulation amplitude 1 mT, temperature 10 K.

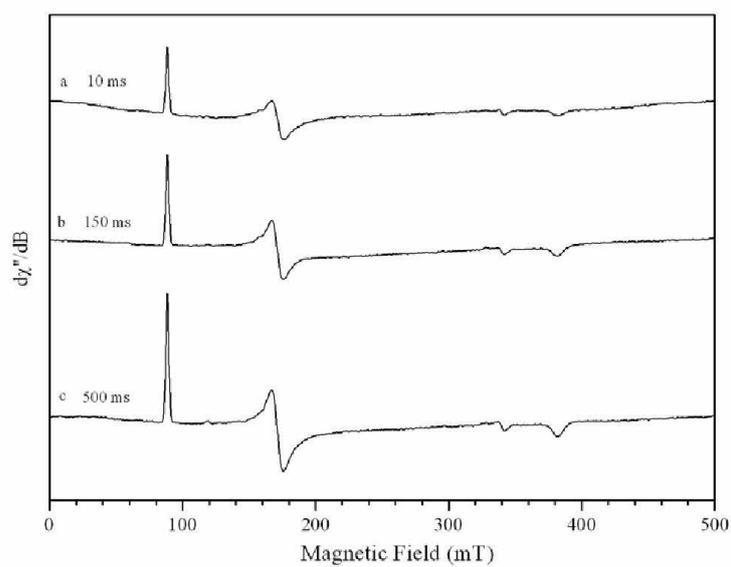


Figure S2.

9 GHz EPR spectra of various Fe^{II}NO iNOSoxy complexes in the presence of the cofactor H₄B. Fe^{II}NO without any substrate (a); Fe^{II}NO with Arg (b); Fe^{II}NO with NOHA (c); Fe^{II}NO with citrulline (d); Measurement parameters: microwave frequency 9.495 GHz, microwave power 0.001 mW, field modulation amplitude 0.4 mT, temperature 10 K. EPR parameters are given in Table 2.

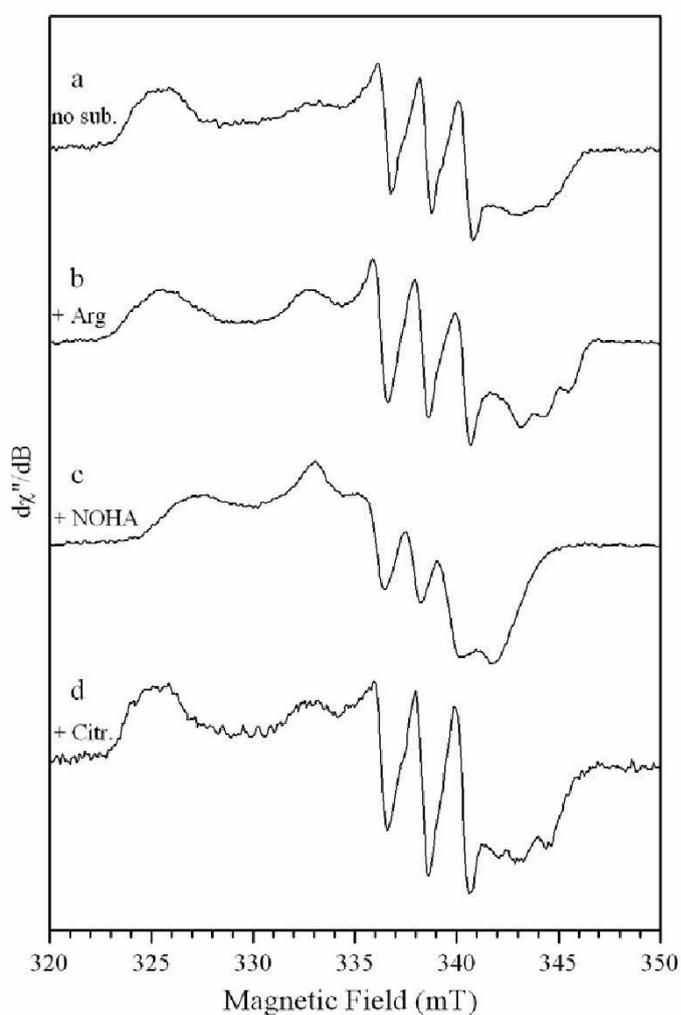


Figure S3.

9 GHz EPR spectra of various Fe^{II}NO bsNOS complexes in the presence of the cofactor H₄B. Fe^{II}NO without any substrate (a); Fe^{II}NO with Arg (b); Fe^{II}NO with NOHA (c); Fe^{II}NO with citrulline (d); Measurement parameters: microwave frequency 9.495 GHz, microwave power 0.001 mW, field modulation amplitude 0.4 mT, temperature 10 K. EPR parameters are given in Table 2.

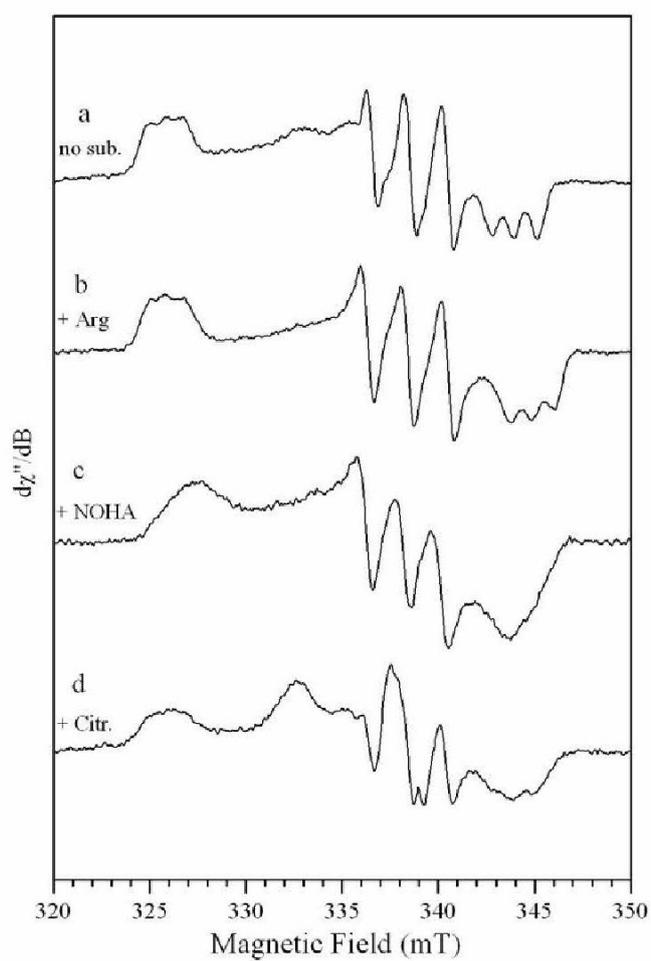
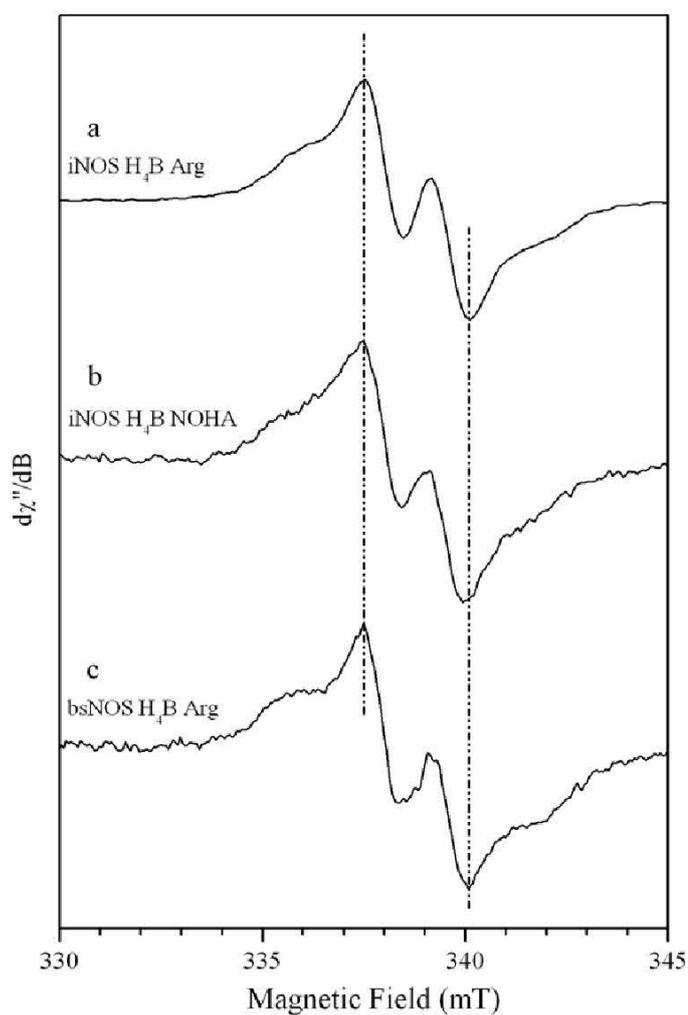


Figure S4

9 GHz EPR spectra of iNOSoxy and bsNOS freeze-quench samples prepared in D₂O. iNOSoxy/Arg stopped at 120 ms (a); iNOSoxy/NOHA stopped at 60 ms (b); bsNOS/Arg stopped at 35 ms (c); Measurement parameters: microwave frequency 9.497 GHz, microwave power 0.25 mW, field modulation amplitude 0.4 mT, temperature 70 K.



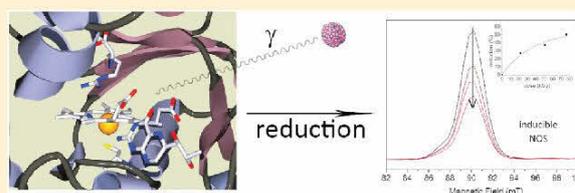
***Annexe 3 : A Novel Cryo-Reduction Method to Investigate the
Molecular Mechanism of Nitric Oxide Synthases***

Sophie Bernad, Albane Brunel, Pierre Dorlet, Cécile Sicard-Roselli et Jérôme Santolini

A Novel Cryo-Reduction Method to Investigate the Molecular Mechanism of Nitric Oxide Synthases

Sophie Bernad,^{†,§} Albane Brunel,^{‡,§} Pierre Dorlet,[‡] Cécile Sicard-Roselli,^{*,†} and Jérôme Santolini^{*,‡}[†]Laboratoire de Chimie Physique, CNRS UMR 8000, Univ Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France[‡]CNRS, Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, UMR 8221, 91191 Gif-sur-Yvette, France, and CEA, iBiTec-S, SB2SM, 91191 Gif-sur-Yvette, France Supporting Information

ABSTRACT: Nitric oxide synthases (NOSs) are hemoproteins responsible for the biosynthesis of NO in mammals. They catalyze two successive oxidation reactions. The mechanism of oxygen activation is based on the transfer of two electrons and two protons. Despite structural analogies with cytochromes P450, the molecular mechanism of NOS remains yet to be elucidated. Because of extremely high reaction rates, conventional kinetics methods failed to trap and characterize the major reaction intermediates. Cryo-reduction methods offer a possibility to circumvent this technological lock, by triggering oxygen activation at cryogenic temperatures by using water radiolysis. However, this method is not adapted to the NOS mechanism because of the high instability of the initial Fe^{II}O₂ complex (extremely fast autoxidation and/or reaction with the cofactor H₄B). This imposed a protocol with a stable Fe^{II}O₂ complex (observed only for one NOS-like protein) and that excludes any redox role for H₄B. A relevant approach to the NOS mechanism would use H₄B to provide the (second) electron involved in oxygen activation; water radiolysis would thus provide the first electron (heme reduction). In this context, we report here an investigation of the first electron transfer by this alternative approach, i.e., the reduction of native NOS by water radiolysis. We combined EPR and resonance Raman spectroscopies to analyze NOS reduction for a combination of different substrates, cofactor, and oxygen concentrations, and for different NOS isoforms. Our results show that cryo-reduction of native NOS is achieved for all conditions that are relevant to the investigation of the NOS mechanism.



INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is a biological messenger that is involved in numerous physiological events ranging from signaling processes (regulation of vascular tone, neural communication^{1,2}) to cytotoxic activities (immune response, tumoricidal agent³). In mammals, NO is exclusively synthesized by a family of enzymes named NO-synthases (NOS).^{4–6} Because of their involvement in several pathological conditions, NOSs have been the target of numerous biomedical and pharmaceutical investigations. This led to significant progress in the characterization of NOS structure, function, and mechanism.^{7–9}

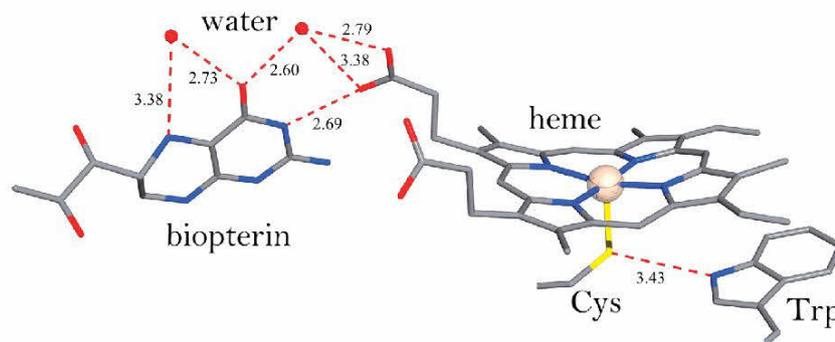
Nitric oxide synthases (NOSs) are hemoproteins that comprise a reductase and an oxygenase domain (Scheme 1). The latter catalyzes a two-step oxidation of a unique substrate, L-arginine (Arg), with formation of N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) as an intermediate.¹⁰ The mechanism of oxygen activation by NOS has long been considered similar to that of cytochromes P450.^{11,12} However, in the past decade, several pieces of information suggested that the molecular mechanisms of NOS and P450 are significantly different.^{13,14} Indeed, NOS utilizes the crucial cofactor (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (H₄B) as an additional source of electrons.^{15–17} The potential proton donors are also different and consist of the substrate (Arg), the cofactor (H₄B), or a water molecule.^{18–20} Besides, the two NOSs' catalytic steps are based on distinct proton and

electron transfer processes.^{13,21,22} All recent data support a model that is specific to NOS (Scheme 2): at first, the native ferric heme (1) is reduced by the reductase domain into a ferrous species (2) that will rapidly bind the dioxygen ligand. The resulting ferrous-oxy species (3) will be reduced by H₄B into a ferric-peroxy intermediate (4). In the first step (Arg hydroxylation), it is assumed that two successive protonation steps of the distal oxygen atom will favor the heterolytic cleavage of the peroxy O–O bond and the formation of a Compound I-like intermediate (6). This intermediate will achieve Arg mono-oxygenation *via* a radical rebound reaction. In the second step (NOHA oxidation), the ferric peroxy intermediate is believed to directly react with the NOHA guanidinium moiety and to lead after a sophisticated electron transfer sequence to H₄B regeneration and NO release (Scheme 2). This model stresses the central role of proton and electron transfers in each catalytic step. Thus, the absence of a clear understanding of these processes has led to the multiplication of diverse (and often opposite) models for the NOS molecular mechanism.^{13,14,23–25} The major reason for this is the absence of identification of NOS reaction

Received: January 23, 2012

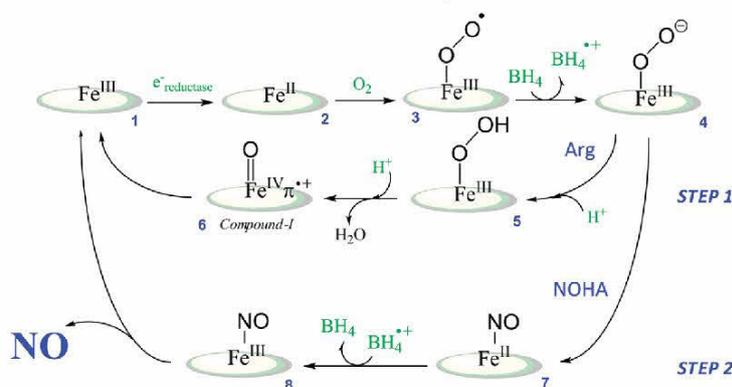
Revised: April 24, 2012

Published: April 24, 2012

Scheme 1. Structure of the Active Site of the NOS Oxygenase Domain^a

^aThe heme is coordinated by a cysteine residue which is hydrogen-bonded to a tryptophan. The bipterin cofactor is engaged in a hydrogen-bond network with water molecules and one of the heme propionate groups (it is also in hydrogen-bond contact with other amino acid residues not shown). The figure was generated by using the structure PDB: 2G6M.

Scheme 2. Current Model for the NOS Molecular Mechanism of Oxygen Activation



intermediates. This is mostly due to the instability of the initial $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex, which precludes the trapping and characterization of any downstream intermediate by conventional kinetic approaches.^{15,26} This constitutes a technological lock to the understanding of the NOS mechanism that calls for a new methodological approach.

Up to now, only Cryo-reduction approaches have allowed the trapping of a peroxo-intermediate.^{27–29} This technique analyses the catalytic mechanism in cryogenic conditions. The reaction is triggered by water radiolysis and proceeds by temperature annealing; the reaction intermediates are then identified by EPR spectroscopy.^{30,31} If this method gives access to short-lived intermediates, it requires a stable initial $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex. For NOS, it has been obtained only twice, in the absence of H_4B ³² or for a bacterial NOS-like protein.³³ Both experiments imposed conditions that modified the proton and electron processes (no redox cofactor, different distal H-bond network). Thus, the obtained reaction sequence might not reflect the actual molecular mechanism of mammalian NOS. In order to match as closely as possible the natural catalytic cycle, the cryo-reduction protocol must include H_4B as the second electron donor. In these conditions, water radiolysis should provide the first catalytic electron (NOS heme reduction). This approach imposes the use of native ferric enzyme as the initial species in the presence of all required cofactors.

In this work, we report for the first time the use of water radiolysis to achieve the first electron transfer of the NOS mechanism. We combined EPR and resonance Raman spectroscopies to analyze the profile of heme reduction. We analyzed the influence of substrate, cofactor, and oxygen on the reduction yields. We carried out a comparative approach between two different NOSs: iNOS, for which most of the results concerning the mechanism have been obtained, and bsNOS, a bacterial NOS-like protein that is often used as a mimic of mammalian NOSs. Our results show that cryo-reduction of native NOS is achieved for all conditions that are relevant to the investigation of the NOS mechanism.

■ MATERIAL AND METHODS

Enzyme Preparation. Mouse iNOS_{oxy} and bsNOS recombinant protein were expressed and purified (in the absence or in the presence of H_4B and/or Arg) as described previously.^{34–36} Samples were incubated in 100 mM KPi buffer (pH 7.4) in the presence of different combinations of Arg (5 mM) and/or H_4B (800 μM) and washed by two successive dilution–centrifugation cycles in the buffer using CentriCon membrane concentrators with a 30 kDa cutoff (Millipore, Bedford, MA). The samples were then diluted to an enzyme concentration of 200 μM with freshly prepared buffer containing 100 mM potassium phosphate and 20–50% glycerol (v/v) plus Arg (5 mM) and/or H_4B (400 μM). Arg and H_4B

binding were verified by UV–visible absorption spectroscopy via the spectral changes of the Soret absorption band from 417 nm (low spin, LS) to 395 nm (high spin, HS). iNOS concentrations were estimated using $71 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ as an extinction coefficient at 395 nm.³⁷ Samples (ca. 100 μL) were stored in EPR tubes at 77 K for further use.

Anaerobic ferric iNOSoxy was prepared directly in quartz EPR tubes sealed with airtight rubber septa by 30 cycles of alternate vacuum and argon refilling at room temperature. Ferrous samples were obtained by reduction of Fe^{III} iNOSoxy with the addition of a small volume of dithionite solution (5–10 mM) directly into the EPR tube using a gastight syringe (Hamilton, Reno, NV).

Resonance Raman Spectroscopy. Resonance Raman spectra were recorded at 15 K using a modified single-stage spectrometer (Jobin-Yvon T64000, Jobin-Yvon, Longjumeau, France) equipped with an optical Oxford Instrument Cryostat and a liquid- N_2 -cooled back-thinned CCD detector. Stray scattered light was rejected using a holographic notch filter (Kaiser Optical Systems, Ann Arbor, MI). Raman excitation at 413.1 nm was provided by a krypton ion laser (Spectra-Physics 2000, Spectra-Physics, Mountain View, CA).

Spectra were recorded as the coaddition of 40–240 individual spectra with CCD exposure times of 50–100 s each. Three to eight successive sets of such spectra were then averaged. The laser power at the sample was <5 mW. The spectral resolution was 3 cm^{-1} . Baseline correction was performed using GRAMS 32 (Galactic Industries, Salem, NH).

EPR Measurements. CW-EPR spectra were recorded at liquid helium temperatures on a Bruker Elexsys E500 CW-EPR spectrometer equipped with a standard ER 4102 X-band resonator and a continuous flow cryostat (Oxford Instruments). Quantification of the reduction of the pentacoordinated high spin (5cHS) Fe^{III} of the various NOS proteins was achieved by determining the area of the low field peak (around 90 mT) of the EPR signal.

Gamma Radiolysis Experiments. The samples were reduced at 77 K by gamma-irradiation with a panoramic ^{60}Co source (IL 60PL Cis-Bio International) from 16 h up to 50 h with a dose rate of 20–30 Gy/min (determined with a Fricke dosimeter), leading to a total dose from 24 000 Gy up to 76 500 Gy.³⁸ They were then stored at 77 K until further analysis by EPR and resonance Raman spectroscopies.

RESULTS

Cryo-Reduction of NO-Synthase in the Presence of L-Arginine and H_4B in Anaerobic Conditions. We used cryoradiolysis to investigate the NOS mechanism of oxygen activation. Native iNOSoxy was irradiated with a panoramic ^{60}Co source for 16 h at 77 K under a nitrogen atmosphere in the presence of saturating concentrations of L-Arg and H_4B . The total irradiation dose was 36.2 kGy. The resonance Raman spectra of the protein, before and after irradiation, and reduced by sodium dithionite, are presented in Figure 1. The high frequency region of the iNOSoxy RR spectrum before irradiation (Figure 1, blue spectrum) is dominated by the vibrational modes ν_4 (1374.2 cm^{-1}), ν_3 (1489.3 cm^{-1}), ν_2 (1562.9 cm^{-1}), ν_{10} (1627.4 cm^{-1}), and ν_5 (1121.6 cm^{-1}) (Supporting Information, Table S1). Those modes are in plane symmetric stretching vibrations involving porphyrin ring carbon or nitrogen atoms^{39–41} and provide information about the oxidation, spin, and coordination states of the heme iron. In the low frequency region, the ν_7 and ν_{16} marker bands that

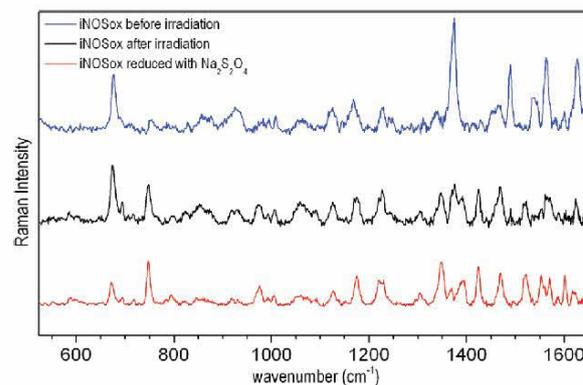


Figure 1. Reduction of NOS proteins upon gamma-irradiation. Resonance Raman spectra of iNOSoxy before irradiation (blue), after irradiation (black), and upon reduction of sodium dithionite (red) in the presence of saturating concentrations of substrate ([L-Arg] = 5 mM) and cofactor ($[\text{H}_4\text{B}] = 400 \mu\text{M}$) and in anaerobic conditions ($\lambda_{\text{exc}} = 413.1 \text{ nm}$, see the Materials and Methods).

represent in plane porphyrin ring deformation vibrations are observed at 676.9 and 753.9 cm^{-1} , respectively (Supporting Information, Table S1). These frequencies clearly confirm that, in the presence of substrate and cofactor, iNOS heme is in an oxidized five-coordinated high spin state (5cHS), with Cys194 as the proximal ligand.⁴²

After irradiation, several changes appear in the RR spectrum of iNOSoxy (Figure 1, black spectrum) that we analyzed in regards to the RR spectrum of a dithionite-reduced iNOSoxy sample (Figure 1, red spectrum): in the high frequency region, the intensity of the ν_4 marker band characteristic of the oxidized species at 1374 cm^{-1} diminishes to the benefit of a ν_4 marker band at 1348 cm^{-1} characteristic of the reduced species, that is also observed through the appearance of some depolarized bands of the ν_4 mode at 1391.9 and 1426.2 cm^{-1} .^{43,44} The ν_3 marker band downshifts from 1489 to 1469 cm^{-1} , which is typical for a reduced 5cHS species.⁴⁵ In the low frequency region, the ν_{16} mode frequency band downshifts to 747.6 cm^{-1} and its intensity increases significantly. Hence, the RR spectrum of the cryoreduced iNOSoxy contains new contributions similar to those found in the RR spectrum of the iNOS reduced with sodium dithionite (Figure 1, Table S1 in the Supporting Information), indicating the efficiency of cryogenic water radiolysis to reduce Fe^{III} into Fe^{II} . Calculating the intensity bands ratio $I(\nu_{4\text{pp}})/I(\nu_7)$ from the RR spectra, we estimated the reduction rate of iNOSoxy in the sample to 35%.

Resonance Raman spectra exhibit bands attributed to the heme being then directly informative of the redox and coordination state of the catalytic site of iNOS. Hence, it could give virtually access to all reaction intermediates. However, RR spectroscopy necessitates lengthy accumulations which did not allow us to repeat several times each experiment to obtain a more precise quantification. Thus, to confirm cryoreduction of iNOSoxy and to improve quantification, EPR spectroscopy was used. EPR, which detects molecules with unpaired electrons, is a method of choice to probe the ferric heme of iNOSoxy. The combined analysis of cryo-reduced samples by EPR and RR is complementary and allows a better identification of the nature and proportion of paramagnetic reaction intermediates, the characterization of their structural and electronic properties.

The EPR spectra, recorded at 15 K, of the native and cryo-reduced iNOSoxy in the presence of substrate L-Arg and cofactor H₄B are presented in Figure 2. The iNOSoxy EPR

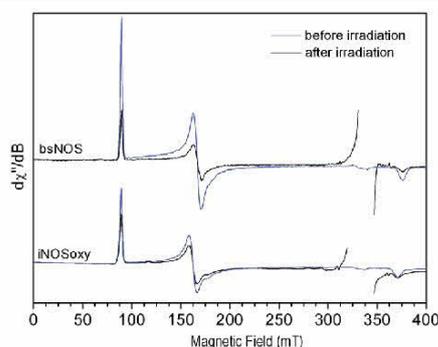


Figure 2. Effect of gamma-irradiation on NOS EPR fingerprints. EPR spectra of iNOSoxy and bsNOS in the presence of saturating concentrations of substrate ([L-Arg] = 5 mM) and cofactor ([H₄B] = 400 μM) before irradiation (blue line) and after irradiation (black line). Experimental conditions were similar as in Figure 1. EPR spectrum conditions were as follows for iNOS after 36.2 kGy: microwave frequency, 9.42 GHz; microwave power, 2 mW; field modulation amplitude, 2.5 mT; temperature, 10 K. For bsNOS after 76.5 kGy: microwave frequency, 9.49 GHz; microwave power, 4.0 mW; field modulation amplitude, 1 mT; temperature, 10 K.

spectrum before irradiation shows a major signal with effective g -values: $g_{1\text{eff}} = 7.54$, $g_{2\text{eff}} = 4.14$, and $g_{3\text{eff}} = 1.82$ (Table S2, Supporting Information). This signal is characteristic of the ferric high spin state species L-Arg-bound NOS in the presence of H₄B.⁴⁶ The iron atom in the active site of the protein is pentacoordinated with a proximal cystein ligand. A very minor contribution of a low spin species is also present at $g_1 = 2.42$, $g_2 = 2.28$, and $g_3 = 1.91$. It could be attributed to a six-coordinated bithiolate species.⁴⁶ After irradiation, the HS state species signal of iNOSoxy decreases. By calculating the ratio of the $g_{1\text{eff}}$ signal intensity after and before irradiation, we obtain 34% of reduction (Figure 2, bottom). This confirms the ability to achieve native iNOS reduction by water radiolysis in cryogenic conditions in the presence of both substrate and cofactor. The yields of reduction obtained by EPR and RR spectroscopies are in good agreement. Hence, for all irradiation experiments, we calculated the reduction rate from the EPR spectra.

Effect of Substrate, Cofactor, and Oxygen on the Reduction Rate. We studied the effect of the irradiation dose on the reduction yield. Figure 3A represents the reduction rate of iNOSoxy in anaerobic conditions with Arg/H₄B as a function of the irradiation dose. The reduction yield seems to increase until reaching a plateau around 50–60%, which is close to what has been reported on myoglobin (around 75%⁴⁷). Differences with the myoglobin reduction could be due to protein specificity, to the glycerol percentage (50% glycerol in our samples instead of 65% glycerol⁴⁷), or to differences in the dose rate (between 20 and 30 Gy/min in our case instead of 200 Gy/min for Denisov⁴⁷).

We analyzed the extent of iNOSoxy reduction as a function of the irradiation dose for different conditions. Figure 3B shows the progressive disappearance of ferric iNOSoxy in the presence of saturating concentrations of H₄B. The inset shows the yield of reduction as a function of the irradiation dose, with a final reduction yield around 60%. The same experiment has been

achieved for various combinations of substrate (L-Arg or NOHA) and cofactor. We observed a similar disappearance of native iNOSoxy as a function of the irradiation dose (data not shown). The final reduction yield (at 76.5 kGy) ranges between 50 and 74% (see Table 1). This result suggests that the presence of substrates and cofactor does not dramatically interfere with the water radiolysis and the reduction of NOS heme. We also analyzed the effect of the presence of oxygen on the cryo-reduction process. Figure 3 displays the progressive reduction of iNOSoxy in air-saturated conditions in the presence of H₄B (Figure 3D) and both H₄B and L-Arg (Figure 3C). We repeated the same experiment for all combinations of L-Arg and H₄B (data not shown). We observed the same reduction yield (within 10% margin) in the presence or in the absence of dioxygen (Table 1). This suggests that dioxygen does not significantly prevent heme reduction by reacting with solvated electron.

Cryo-Reduction of a Bacterial NOS-like Protein, bsNOS. Bacterial NOS-like proteins have been used as a model in particular for cryo-assays where the reports on NOS from *Geobacillus stearothermophilus* are central.³⁵ We therefore checked the structural integrity upon the cryoreduction procedure of another bacterial NOS-like protein from *Bacillus subtilis*, bsNOS. bsNOS was gamma-irradiated under the same conditions (77 K, 50% glycerol buffer, 76.5 kGy) in the presence of L-Arg and H₄B. We recorded the resonance Raman spectrum of bsNOS after irradiation (data not shown). We observed the appearance of similar bands characteristic of ferrous heme species. The frequencies of the major porphyrin modes (ν_2 at 1572 cm⁻¹, ν_3 at 1467 cm⁻¹, ν_4 at 1348 cm⁻¹, ν_7 at 677 cm⁻¹, ν_{10} at 1602 cm⁻¹, ν_{16} at 748 cm⁻¹) are similar to those we previously reported for ferrous bacterial NOSs in standard conditions.^{43,48} This suggests that, like iNOSoxy, bsNOS is reduced upon water radiolysis. This result was also confirmed by EPR analysis. As for iNOSoxy, the EPR spectrum of bsNOS before irradiation exhibits three effective g -values— $g_{1\text{eff}} = 7.59$, $g_{2\text{eff}} = 4.07$, and $g_{3\text{eff}} = 1.80$ (Figure 2, Table S2 in the Supporting Information)—that are characteristic of a ferric high spin state.⁴⁹ Similar to what we observed for iNOSoxy, gamma-irradiation induces a disappearance of the HS state signal of bsNOS (Figure 2, top). We also analyzed the effect of the presence of substrate, cofactor, and dioxygen on the cryo-reduction process of bsNOS. Figure 4 displays the dose-response of bsNOS reduction upon gamma-irradiation for six different combinations of substrate (NOHA or L-Arg) and cofactor (H₄B) in air-saturated conditions. The reduction yields (at 76.5 kGy) ranged between 28 and 67% for all the conditions we tested. We repeated the same experiment in the absence of dioxygen (data not shown). We did not see a significant effect of the presence of dioxygen on the reduction yield for all the conditions we tested (Table 1).

In summary, the results obtained for bsNOS are identical to those obtained for iNOSoxy. It appears that the nature of the NOS protein has only a marginal effect on the cryo-reduction yield. *In fine*, of the 21 different conditions we investigated, around 75% display percentage yields between 50 and 70% for a 76.5 kGy irradiation (Table 1). Given the fact that a great number of conditions were tested, it was not possible to replicate several times all the assays. Therefore, we estimate that the differences observed on some samples are within experimental error and not significant considering the experimental setup (small changes in irradiation doses, concentrations, annealing, etc.). This suggests that the presence

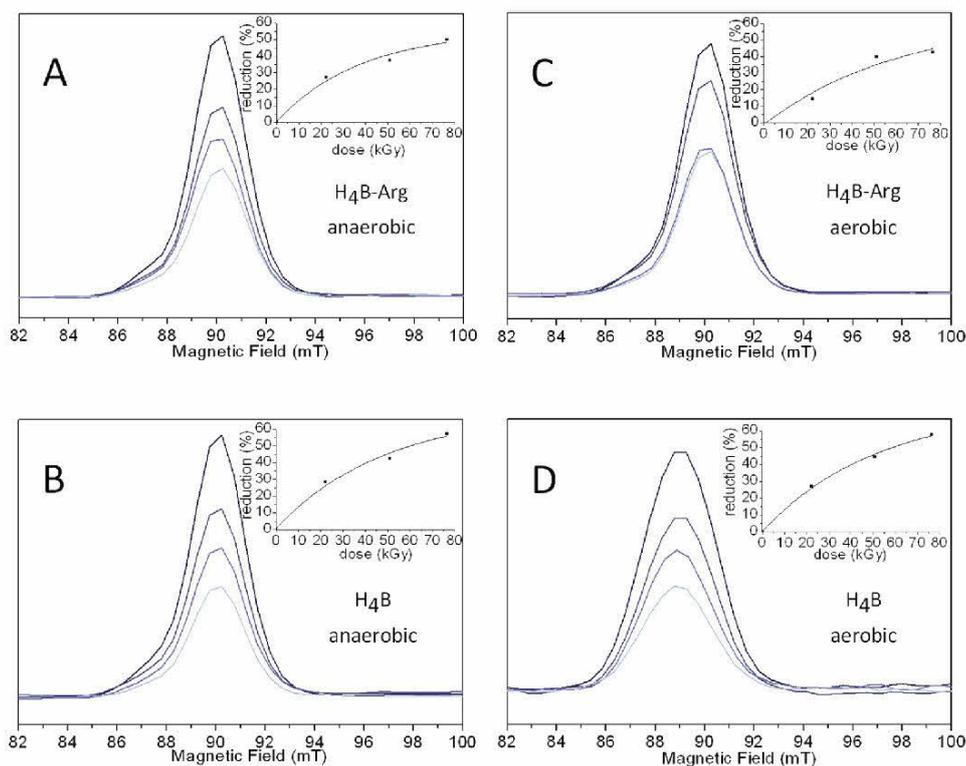


Figure 3. Dose–response of iNOSoxy reduction upon gamma-irradiation. Experimental conditions as described under the Materials and Methods. EPR spectrum conditions were as follows: microwave frequency, 9.42 GHz; microwave power, 2 mW; field modulation amplitude, 2.5 mT; temperature, 10 K. Panel A: g_{EPR} EPR signal of ferric iNOSoxy in the presence of saturating concentrations of substrate ($[\text{L-Arg}] = 5 \text{ mM}$) and cofactor ($[\text{H}_4\text{B}] = 400 \mu\text{M}$) for increasing irradiation doses (before irradiation and after 22.2, 51, and 76.5 kGy). Inset: reduction yield as a function of the irradiation dose. Panel B: same as in panel A but in the absence of L-Arg. Panels C and D: same as in panels A and B, respectively, but in air-saturated conditions.

of Arg, H₄B, or oxygen does not drastically interfere with the NOS reduction process. Our results also suggest that dioxygen does not significantly interfere with the capture by NOS of solvated electrons, which would lessen NOS reduction.

DISCUSSION

Conservation of NOS Heme Structure under Cryo-Assays Conditions. The cryo-reduction setup requires extreme experimental conditions: NOS samples are stored in liquid nitrogen at 77 K, exposed to high doses of γ -rays, and then analyzed at temperatures around 10 K. We used a glycerol/buffer mixture as a standard cryoprotectant that has been commonly used to study proteins such as hemoglobin, heme oxygenase, cytochrome P450, or peroxidase.^{27,50–54} Since the central steps of the NOS molecular mechanism—electron and proton transfers—are extremely sensitive to the structure of the catalytic site and thus to the milieu conditions, it is mandatory to check that these extreme experimental conditions do not affect the structure and the function of the enzyme.

We first analyzed the spin and coordination states of iNOSoxy for our series of substrate (L-Arg and NOHA) and cofactor combination throughout the experimental sequence. They directly inform on NOS quaternary structure and on its ability to carry out L-Arg oxidation. The resonance Raman and EPR spectra of iNOSoxy for each complex indicate the presence of the expected states, i.e., 5cHS in the presence of substrate and/or cofactor and 6cLS in the absence of cofactor

and substrate. This indicates that the high concentration of glycerol and the freezing steps do not disturb the 5cHS–6cLS equilibrium, i.e., the iNOSoxy quaternary structure.

We also recorded and compared the resonance Raman spectra of irradiated and non-irradiated iNOSoxy for all the tested conditions. Figure 1 illustrates this comparison for iNOSoxy with L-Arg and H₄B before and after gamma-irradiation (Figure 1). The frequencies of the characteristic vibrational modes of ferric NOS (ν_2 , ν_3 , ν_4 , ν_5 , ν_7 , ν_{10} , and ν_{16}) are similar and match those previously reported for iNOSoxy in standard conditions; the same observation was made for each of the tested conditions (Supporting Information, Table S1). This indicates the absence of modifications of the iNOSoxy catalytic site related to the production of reactive species that could have reacted with residues or cofactors of the NOS catalytic site. In particular, no oxidation/reduction of porphyrin macrocycle is to be reported. The same experiment has been achieved under air-saturated conditions. Identical frequencies were observed for the porphyrin vibration modes, indicating the absence of additional oxidative reactions in the presence of dioxygen (Supporting Information, Table S1). We achieved the same comparative analysis of cryo-reduced and dithionite-reduced iNOSoxy, in nitrogen- and air-saturated buffers, and for various combinations of substrate and cofactor. Once again, the frequencies that we determined were similar for both ferrous NOS and matched those reported in the literature (ref 45, Supporting Information, Table S1). Similarly, the EPR spectra

Table 1. Reduction Yield of iNOSoxy and bsNOS upon Cryo-Reduction (Yields Were Determined from the Decrease of the Low Field Peak of the Ferric EPR Signal)

	substrate-cofactor	oxygen conditions	reduction yield (%)			
			22.2 kGy	51.0 kGy	76.5 kGy	
iNOSoxy	Arg and H ₄ B free	aerobic 20%	19	62	64	
		anaerobic	51	64	74	
	Arg-H ₄ B	aerobic 20%	15	40	42	
		anaerobic	27	38	50	
	Arg	aerobic 20%	17	43	61	
		anaerobic	25	Nd	62	
	H ₄ B	aerobic 20%	27	45	58	
		anaerobic	29	43	57	
	NOHA-H ₄ B	aerobic 20%	25	49	61	
	NOHA	aerobic 20%	15	25	70	
	bsNOS	Arg and H ₄ B free	aerobic 20%	17	44	49
			anaerobic	26	Nd	60
Arg-H ₄ B		aerobic 20%	23	55	67	
		anaerobic	21	47	63	
Arg		aerobic 20%	40	51	60	
		anaerobic	22	41	55	
H ₄ B		aerobic 20%	25	26	33	
		anaerobic	20	42	57	
NOHA-H ₄ B		aerobic 20%	10	19	28	
NOHA		aerobic 20%	9	32	46	

of iNOSoxy and bsNOS HS heme exhibit identical *g*-values before and after irradiation (Figure 2, Supporting Information, Table S2), confirming the absence of structural alteration of the catalytic site of bsNOS and iNOSoxy upon gamma-irradiation (this does not exclude potential oxidative modifications of NOS on other locations, for example, on the protein surface).

These results indicate that the whole experimental procedure (high content of glycerol, analysis at cryogenic temperature, high dose of gamma-irradiation, etc.) does not affect the spectroscopic fingerprints (both EPR and resonance Raman) of two different NOS proteins, suggesting a good conservation throughout the cryo-assays of the catalytic site properties.

We also analyzed the impact of the cryo-reduction protocol on the functioning of iNOSoxy for two distinct conditions: with H₄B and with L-Arg. We first recorded the UV-visible absorption spectra of the iNOSoxy Fe^{II}CO complex after supplementation with saturating concentrations of L-Arg and H₄B. The P450/P420 equilibrium reflects the stability of the proximal thiolate ligation, that is essential to NOS catalysis.^{55,56} We compared the extent of P420 formation for native, frozen, and irradiated (60 kGy) samples to analyze the degradation of the NOS catalytic site. In the case of the iNOSoxy + H₄B sample, the percentage of pentacoordinated Fe^{II}CO complex (P420) remains negligible (Supporting Information, Figure S1A, inset). In the case of the iNOSoxy + L-Arg sample, the absorption at 420 nm slightly increases (the greater proportion of P420 complex for the +L-Arg sample is due to the weaker ability of the substrate to induce the hexacoordinated low spin, 6cLS → 5cHS transition of iNOSoxy) but remains minor and comparable for the three (native, frozen, irradiated) samples. These results indicate that the freezing and irradiation sequence does not disturb the thiolate binding of iNOSoxy. We also analyzed the effect of the freezing and irradiation procedure on the ability of iNOSoxy to achieve oxygen activation and catalyze

substrate oxidation. For this purpose, we used the Griess assay with NOHA as a substrate⁵⁷ and monitored the effect of increasing concentration of H₄B on the production of nitrite. For all conditions (+L-Arg or +H₄B), the production of nitrite was comparable to what is commonly expected for iNOSoxy and was affected neither by the freezing nor by the irradiation (Supporting Information, Figure S1, main panels). Additionally, the apparent *K*_d of H₄B was similar for the three curves and found around 5 μM, close to what is reported in the literature.^{58,59} This suggests that the experimental protocol does not affect H₄B binding and thus does not impede its crucial role in NOS catalysis. This series of results show unambiguously and definitely that the protocol used during the cryo-reduction experiments does not alter neither NOS structural and electronic properties, nor its functioning. Our data can therefore be cross-analyzed with results obtained through more conventional methods.

Alternative Radiolysis Technique to Investigate the NOS Molecular Mechanism. Water radiolysis in cryogenic conditions has been successfully used by Davydov and Hoffman to investigate the molecular mechanism of cytochromes P450 and numerous other hemo-proteins.³⁰ Their approach focuses on the second electron transfer (oxygen activation) and requires the build-up and trapping of a quantitative amount of Fe^{II}O₂ complex. However, mammalian NOSs are characterized by a great instability of the Fe^{II}O₂ complex especially in the presence of the H₄B cofactor (decay rate up to 25 s⁻¹ at 10 °C). This might explain why this method has only been used twice for NOS, first in the absence of H₄B³² and second for a bacterial NOS-like protein that presents a stable Fe^{II}O₂ intermediate³³ (decay rate of 1.4 s⁻¹ at room temperature). In this regard, a method that overcomes the obstacle of Fe^{II}O₂ instability seems required to investigate the molecular mechanism of mammalian NOS.

Our study lays the path for a new method to investigate the NOS molecular mechanism of dioxygen activation. This alternative method is based on the use of water radiolysis to provide the first electron (heme reduction), while oxygen activation would be triggered by the transfer of a second electron by the natural electron donor, H₄B. We analyzed in this work the efficiency and properties of heme reduction by water radiolysis. To our knowledge, this is the first time such a complete study is achieved for a hemo-protein. In the case of NOS, heme reduction by the reductase domain is a sophisticated process with numerous regulation patterns.⁶⁰ The reduction rate varies greatly among NOS isoforms. It depends on the presence of substrate and cofactor, on the presence of dioxygen, on the conformational state of the dimer, etc. We showed in this report that the heme reduction induced by water radiolysis was quantitative for a wide series of conditions: (i) we observed the same (high) reduction yield for distinct NOS isoforms (bsNOS vs iNOSoxy), which *a priori* allows the comparative analysis of isoforms; (ii) we also observed similar reduction yield for various quaternary structures of NOS such as loose dimer (iNOSoxy in the absence of substrate and cofactor,^{58,61} tight dimer iNOSoxy in the presence of substrate and cofactor,^{12,62} or dimer with an open interface bsNOS⁶³); (iii) the reduction profile did not depend on the nature of the substrates or the presence of dioxygen, which allows the comparison of the different catalytic cycles of NOS (first and second steps, NO dioxygenase activity); (iv) the presence of H₄B, that is crucial in the electron and proton transfer processes, does not influence the reduction

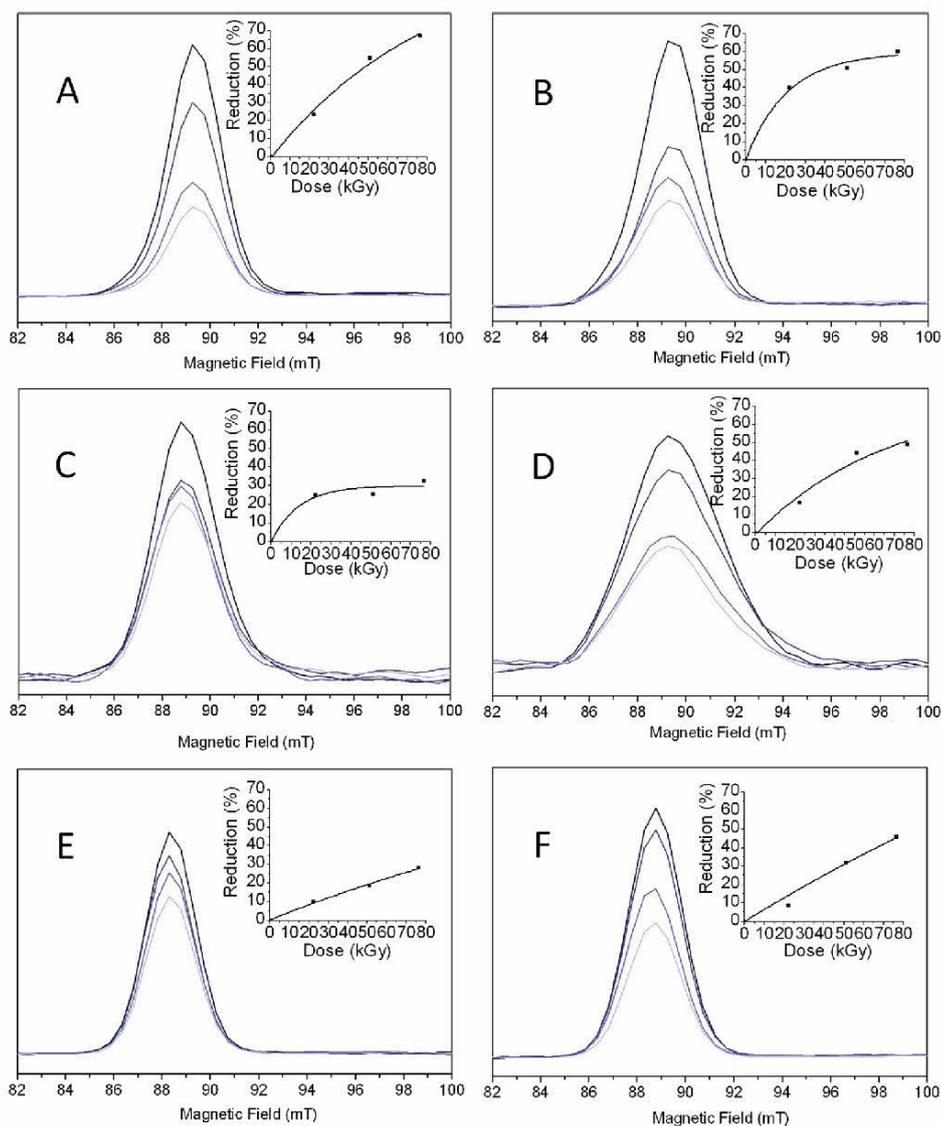


Figure 4. Dose–response of bsNOS reduction upon gamma-irradiation. Experimental conditions as described under the Materials and Methods. EPR spectrum conditions were as follows: microwave frequency, 9.49 GHz; microwave power, 4.0 mW; field modulation amplitude, 1 mT; temperature, 10 K. Panel A: g_1 EPR spectra of ferric bsNOSox in the presence of saturating concentrations of substrate ($[L\text{-Arg}] = 5 \text{ mM}$) and cofactor ($[H_4B] = 400 \mu\text{M}$) for increasing irradiation doses (before irradiation and after 22.2, 51.0, and 76.5 kGy). Spectra are in gray, and simulations are in black. Inset. Reduction yield as a function of the irradiation dose. Other panels: Same as in panel A but in the absence of H_4B (B), in the absence of $L\text{-Arg}$ (C), in the absence of H_4B and $L\text{-Arg}$ (D), in the presence of NOHA and H_4B (E), and in the presence of NOHA without H_4B (F).

yield. These results show that this cryo-reduction protocol can be used for a large series of conditions that will allow a complete investigation of NOS catalysis.

Our results show that all NOS proteins can be investigated with the same protocol. This will allow us to directly compare the reaction sequences of mammalian and bacterial NOSs and to highlight potential differences in their molecular mechanism. Thanks to the presence of H_4B , we will analyze the natural electron transfer process and, in this regard, we will detail and explain the differences in the oxidation reaction (nucleophilic attack vs heterolytic cleavage) between the first and second catalytic steps. The presence of H_4B could allow us to specifically analyze the role of H_4B in the proton transfer

sequence and to address the question of proton-coupled electron transfer.

CONCLUSION

We report here the first investigation of cryo-reduction of native NOS isoforms for a large series of conditions that include variations in isoforms, substrates, cofactor, and oxygen concentration. During this study, we verified the structural and functional integrity of the NOS catalytic site upon the extreme experimental conditions used during cryo-assays. This will allow correlating unambiguously the reaction sequence observed by the cryo-reduction method to the results previously obtained by

more conventional kinetic methods (stopped-flow, freeze-quench, enzymatic assays).

The possibility to compare the oxidation reaction for different isoforms, substrates, and cofactor will provide answers to the specificity of each catalytic step and will allow tracking the differences between the numerous NOS and NOS-like proteins. This new protocol will also give the opportunity to analyze the proton transfer pathways that lie at the core of the NOS molecular mechanism. In particular, this method allows investigating the conditions that favor NOS uncoupling (the absence of substrate and/or cofactor). This should permit the characterization of the molecular mechanism of RNOS production, in particular the precise role of decoupled proton and electron transfers and the specificity of each NOS isoform regarding the uncoupling scenarios.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Table S1 showing vibrational modes of the porphyrin of iNOSoxy before and after gamma-irradiation, Table S2 showing g-values of the ScHS species of FeIII of iNOS and bsNOS before and after irradiation, and Figure S1 showing the impact of gamma-irradiation on iNOSoxy structure and function. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: (33) 1 69 15 77 32 (C.R.-S.); (33) 1 69 08 53 63 (J.S.). Fax: (33) 1 69 15 61 88 (C.R.-S.); (33) 1 69 08 87 17 (J.S.). E-mail: cecile.sicard@u-psud.fr (C.R.-S.); jerome.santolini@cea.fr (J.S.).

Author Contributions

§Both authors contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Bredt, D. S. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 9–15.
- (2) Ignarro, L. J. *J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *53*, 503–514.
- (3) Bogdan, C. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 907–916.
- (4) Lowenstein, C. J.; Padalko, E. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2865–2867.
- (5) Mungrue, I. N.; Bredt, D. S. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2627–2629.
- (6) Sessa, W. C. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2427–2429.
- (7) Stuehr, D. J.; Santolini, J.; Wang, Z. Q.; Wei, C. C.; Adak, S. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36167–36170.
- (8) Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. *Biochem. J.* **2001**, *357*, 593–615.
- (9) Li, H.; Poulos, T. L. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 293–305.
- (10) Stuehr, D. J.; Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Griffith, O. W.; Feldman, P. L.; Wiseman, J. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6259–6263.
- (11) Poulos, T. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 337–345.
- (12) Crane, B. R.; Arvai, A. S.; Ghosh, D. K.; Wu, C.; Getzoff, E. D.; Stuehr, D. J.; Tainer, J. A. *Science* **1998**, *279*, 2121–2126.
- (13) Santolini, J. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 127–141.
- (14) Zhu, Y.; Silverman, R. B. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2231–2243.
- (15) Hurshman, A. R.; Krebs, C.; Edmondson, D. E.; Huynh, B. H.; Marletta, M. A. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15689–15696.
- (16) Wei, C. C.; Wang, Z. Q.; Wang, Q.; Meade, A. L.; Hemann, C.; Hille, R.; Stuehr, D. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 315–319.
- (17) Bec, N.; Gorren, A. F. C.; Mayer, B.; Schmidt, P. P.; Andersson, K. K.; Lange, R. J. *Inorg. Biochem.* **2000**, *81*, 207–211.
- (18) Li, D.; Kabir, M.; Stuehr, D. J.; Rousseau, D. L.; Yeh, S. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6943–6951.
- (19) Giroud, C.; Moreau, M.; Mattioli, T. A.; Balland, V.; Boucher, J. L.; Xu-Li, Y.; Stuehr, D. J.; Santolini, J. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7233–7245.
- (20) Chartier, F. J.; Couture, M. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 20877–20886.
- (21) Korth, H. G.; Sustmann, R.; Thater, C.; Butler, A. R.; Ingold, K. U. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17776–17779.
- (22) Doukov, T.; Li, H.; Soltis, M.; Poulos, T. L. *Biochemistry* **2009**, *48*, 10246–10254.
- (23) Robinet, J. J.; Cho, K. B.; Gauld, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3328–3334.
- (24) de Visser, S. P.; Tan, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12961–12974.
- (25) Cho, K. B.; Carvajal, M. A.; Shaik, S. J. *Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 336–346.
- (26) Wei, C. C.; Wang, Z. Q.; Durra, D.; Hemann, C.; Hille, R.; Garcin, E. D.; Getzoff, E. D.; Stuehr, D. J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8929–8935.
- (27) Davydov, R.; Makris, T. M.; Kofman, V.; Werst, D. E.; Sligar, S. G.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1403–1415.
- (28) Davydov, R.; Perera, R.; Jin, S.; Yang, T. C.; Bryson, T. A.; Sono, M.; Dawson, J. H.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1403–1413.
- (29) Denisov, I. G.; Mak, P. J.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 13172–13179.
- (30) Davydov, R.; Hoffman, B. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 36–43.
- (31) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G. *Methods Enzymol.* **2002**, *357*, 103–115.
- (32) Davydov, R.; Ledbetter-Rogers, A.; Martasek, P.; Larukhin, M.; Sono, M.; Dawson, J. H.; Masters, B. S.; Hoffman, B. M. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10375–10381.
- (33) Davydov, R.; Sudhamsu, J.; Lees, N. S.; Crane, B. R.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14493–14507.
- (34) Ghosh, D. K.; Wu, C.; Pitters, E.; Moloney, M.; Werner, E. R.; Mayer, B.; Stuehr, D. J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10609–10619.
- (35) Gachhui, R.; Ghosh, D. K.; Wu, C.; Parkinson, J.; Crane, B. R.; Stuehr, D. J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5097–5103.
- (36) Adak, S.; Aulak, K. S.; Stuehr, D. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16167–16171.
- (37) Stuehr, D. J.; Ikeda-saito, M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20547–20550.
- (38) Spinks, J. W. T.; Woods, R. J. *An Introduction to Radiation Chemistry*; John Wiley and Sons, Inc.: New York, Toronto, 1990.
- (39) Spiro, T. G.; Streaks, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 338–345.
- (40) Gaber, B. P.; Miskowski, V.; Spiro, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6868–6873.
- (41) Hu, S. Z.; Morris, I. K.; Singh, J. P.; Smith, K. M.; Spiro, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12446–12458.
- (42) Crane, B. R.; Arvai, A. S.; Gachhui, R.; Wu, C.; Ghosh, D. K.; Getzoff, E. D.; Stuehr, D. J.; Tainer, J. A. *Science* **1997**, *278*, 425–431.
- (43) Santolini, J.; Roman, M.; Stuehr, D. J.; Mattioli, T. A. *Biochemistry* **2006**, *45*, 1480–1489.
- (44) Wells, A. V.; Li, P.; Champion, P. M.; Martinis, S. A.; Sligar, S. G. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4384–4393.
- (45) Wang, J.; Stuehr, D. J.; Ikeda-Saito, M.; Rousseau, D. L. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22255–22258.
- (46) Salerno, J. C.; Martasek, P.; Roman, L. J.; Masters, B. S. *Biochemistry* **1996**, *35*, 7626–7630.
- (47) Sligar, S. G.; Denisov, I. G.; Victoria, D. C. *Radiat. Phys. Chem.* **2007**, *76*, 714–721.
- (48) Chartier, F. J.; Couture, M. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1939–1950.
- (49) Brumel, A.; Wilson, A.; Henry, L.; Dorlet, P.; Santolini, J. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 11997–12005.
- (50) Davydov, R.; Osborne, R. L.; Kim, S. H.; Dawson, J. H.; Hoffman, B. M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 5147–5155.

- (51) Davydov, R.; Osborne, R. L.; Shanmugam, M.; Du, J.; Dawson, J. H.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14995–15004.
- (52) Davydov, R.; Valentine, A. M.; Komar-Panicucci, S.; Hoffman, B. M.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4188–4197.
- (53) Davydov, R.; Kofman, V.; Fujii, H.; Yoshida, T.; Ikeda-Saito, M.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1798–1808.
- (54) Davydov, R.; Kofman, V.; Nocek, J. M.; Noble, R. W.; Hui, H.; Hoffman, B. M. *Biochemistry* **2004**, *43*, 6330–6338.
- (55) Wang, J.; Stuehr, D. J.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 7080–7087.
- (56) Martinis, S. A.; Blanke, S. R.; Hager, L. P.; Sligar, S. G.; Hoa, G. H.; Rux, J. J.; Dawson, J. H. *Biochemistry* **1996**, *35*, 14530–14536.
- (57) Titheradge, M. A. *Nitric oxide protocols*; Humana Press: Totowa, NJ; 1998.
- (58) Presta, A.; Siddhanta, U.; Wu, C.; Sennequier, N.; Huang, L.; Abu-Soud, H. M.; Erzurum, S.; Stuehr, D. J. *Biochemistry* **1998**, *37*, 298–310.
- (59) Tzeng, E.; Billiar, T. R.; Robbins, P. D.; Loftus, M.; Stuehr, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 11771–11775.
- (60) Stuehr, D. J.; Tejero, J.; Haque, M. M. *FEBS J.* **2009**, *276*, 3959–3974.
- (61) Panda, K.; Rosenfeld, R. J.; Ghosh, S.; Meade, A. L.; Getzoff, E. D.; Stuehr, D. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31020–31030.
- (62) Mayer, B.; Wu, C.; Gorren, A. C.; Pfeiffer, S.; Schmidt, K.; Clark, P.; Stuehr, D. J.; Werner, E. R. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8422–8427.
- (63) Pant, K.; Bilwes, A. M.; Adak, S.; Stuehr, D. J.; Crane, B. R. *Biochemistry* **2002**, *41*, 11071–11079.

**A novel Cryo-reduction method to investigate
the molecular mechanism of nitric oxide synthases.**

Running title: cryo-reduction of native iNOSoxy and bsNOS in the presence of cofactor and dioxygen.

Sophie Bernad^{§||}, Albane Brunel^{†||}, Pierre Dorlet[†], Cécile Roselli-Sicard^{*§} and Jérôme Santolini^{†*}

^{||} Both authors contributed equally to this work

[§] Laboratoire de Chimie Physique, CNRS UMR 8000, Univ Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex

[†] CNRS, Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, UMR8221, 91191 Gif-sur-Yvette, France and
CEA, iBiTec-S, SB2SM, 91191 Gif-sur-Yvette, France

* To whom correspondence should be addressed:

Jérôme Santolini, CEA-Saclay, iBiTec-S, SB2SM, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Tél: (33) 1 69 08 53 63

Fax: (33) 1 69 08 87 17

jerome.santolini@cea.fr

Cécile Roselli-Sicard, Univ Paris-Sud, Laboratoire de Chimie Physique, CNRS UMR 8000, Bâtiment
350, 91405 Orsay Cedex

Tél: (33) 1 69 15 77 32

Fax: (33) 1 69 15 61 88

cecile.sicard@u-psud.fr

Substrate-cofactor	Conditions	ν_5	ν_7	ν_{16}	ν_4	ν_3	ν_{10}	ν_{4pp}
Substrate and cofactor free	Ferric heme Before irradiation	1129.1	677	753.5	1374.2	1503.3	1627.3	N.D.
	Ferric heme anaerobic irradiation	1130.7	676	751.1	1376	1506.8	N.D.	N.D.
	Ferric heme air-saturated irradiation	1131.9	675	751	1374.8	1502.1	N.D.	N.D.
	Ferrous heme reduced with dithionite	1131.2	674.6	746.7	1348.9 1368.2 1391.9	1467.8	1619.5	1424.8
	Ferrous heme anaerobic irradiation	N.D.	676.4	N.D.	1351.5 1391.2	1471.8	N.D.	1426.2
	Ferrous heme air-saturated irradiation	1127.5	675.2	N.D.	1350.3 1391.2	1470.6	N.D.	1425.1
	Ferric heme Before irradiation	1121.6	676.9	753.9	1373.8	1489.3	1627.4	1429.3
Arg-H ₄ B	Ferric heme Anaerobic irradiation	1129	674	753	1373.7	1491.6	1627.1	1429.7
	Ferric heme air-saturated irradiation	1119?	675	ND	1372.5	1490.5	1626	ND
	Ferrous heme Reduced with dithionite	1126	671.7	747.6	1349.1 1366.6 1393.5	1469.4	1619	1423.1
	Ferrous heme anaerobic irradiation	1126	674	747.6	1349.1 1392.3	1469.4	1620	1425.1
	Ferrous heme air-saturated irradiation	1127.2	675.2	747.6	1349.1 1391.2	1470.6	1619	1425.1

Table S1. Vibrational modes of the porphyrin of iNOSoxy before and after gamma-irradiation. Comparison between various conditions (anaerobic vs air-saturated, in the presence or absence of saturating concentrations of substrate and cofactor) and with chemically-reduced (with excess dithionite) iNOSoxy. See experimental procedures for experimental details.

Table S2.

		g ₁	g ₂	g ₃
iNOSox	Before irradiation	7.54	4.14	1.82
H ₄ B-Arg	After 36.2 kGy	7.54	4.14	1.82
bsNOS	Before irradiation	7.59	4.07	1.80
H ₄ B-Arg	After 76.5 kGy	7.59	4.07	1.80

Table S2. g-values of the 5cHS species of Fe^{III} of iNOS and bsNOS before and after irradiation. EPR X-band spectrum conditions were as follows: microwave frequency, 9.49 GHz; microwave power, 4.0 mW; field modulation amplitude, 1 mT; temperature, 10 K.

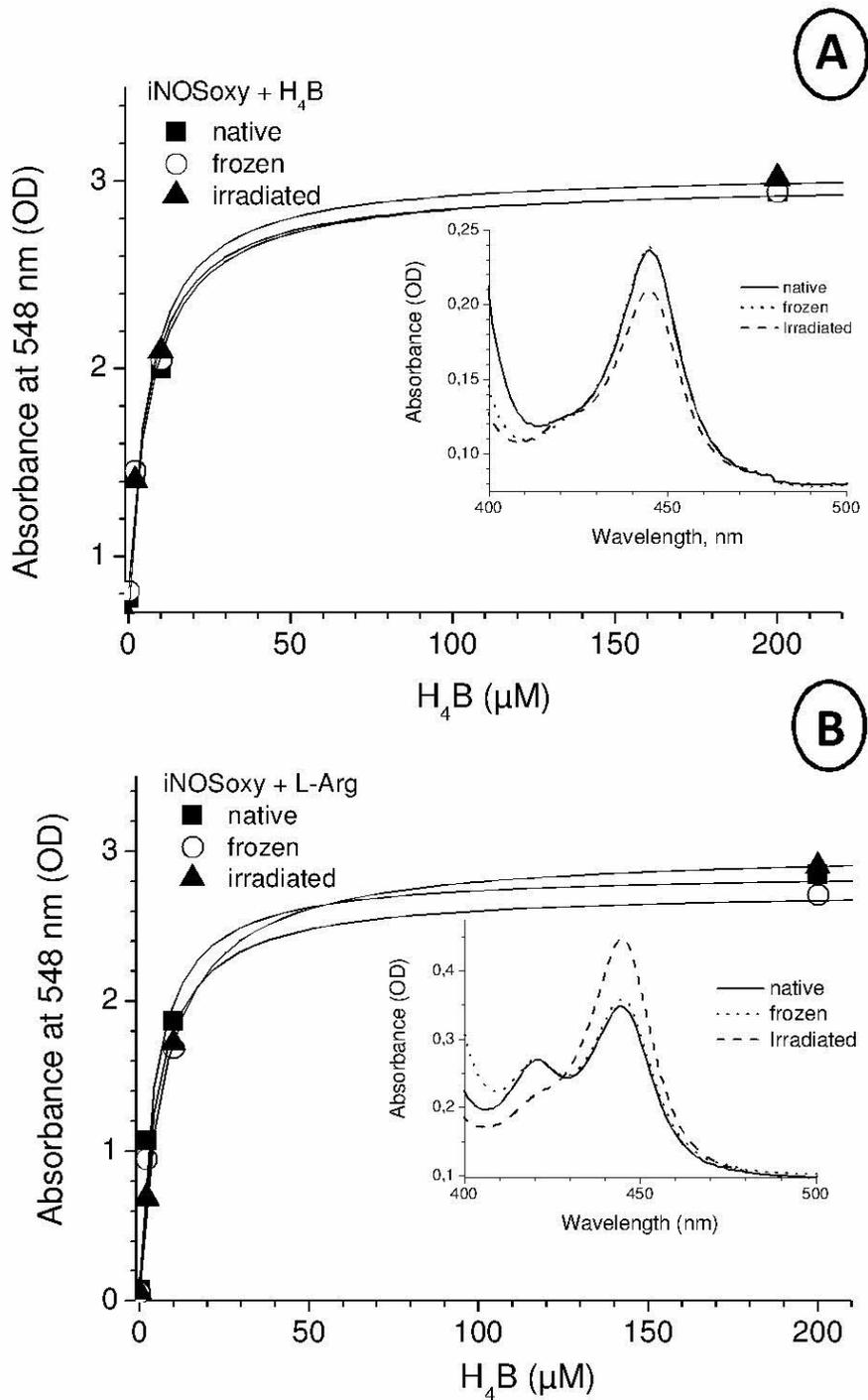


FIGURE S1

Figure S1: Impact of gamma-irradiation on iNOSoxy structure and function. Two samples of 150 µM iNOSoxy were gamma-irradiated with a ⁶⁰Co source up to 60 kGy in the presence of 800 µM H₄B (Panel A) and in the presence of 5 mM L-Arg (Panel B). The catalytic activity of iNOSoxy from native (full square), frozen (open circle) and irradiated (full triangle) samples were determined by the Griess Assay (Main panels). iNOS samples

were diluted (final concentration 300 nM) in the assay buffer (KPi 0.1 M pH 7.4; Glycerol 10%; DTT 1 mM; BSA 0.1mg/mL; SOD 25 U/mL). After addition of H₄B (between 0.5 and 200 μM final), the samples were incubated 30 minutes at 30°C. Reaction was triggered by the addition of saturating concentrations of NOHA (10 mM final) and H₂O₂ (30 mM). After 10 minutes at 30°C, the reaction was stopped by addition of catalase. Nitrite concentration was measured by addition of Griess reagent and the rate of nitrite production was plotted as a function of H₄B concentration. Simulation to a hyperbolic function gives rise to the V_{max} , V_o and $K_{d,H4B}$ parameters for each condition. The stability of the proximal ligation was investigated for all conditions by determining the P420/P450 transition of the Fe^{II}CO complexes (Inset). iNOS samples were diluted (3-5 μM final concentration) in a KPi 0.1 M pH 7.4, L-Arg 10 mM, H₄B 80 μM buffer. Fe^{II}CO complexes were obtained by addition of dithionite and CO flush. **Panel A.** the nitrite production of iNOSoxy with H₄B was similar for the native, frozen and irradiated samples. V_{max} was respectively 63.6, 61.4, 68.5 s⁻¹ and the apparent K_d for H₄B was comparable (4.6, 5.50, 7.6 μM, respectively). These results, in agreement with what is commonly reported in the literature, indicate that neither the H₄B binding properties, nor the ability to activate oxygen, are affected by the freezing and irradiation sequence. The UV-Visible characterization of Fe^{II}CO complexes for these three conditions shows a large majority of hexa-coordinated Fe^{II}CO species. The greater stability of irradiated samples (>95% 6c) versus native and frozen samples (70-80 % 6c) might be due to a longer incubation in the presence of L-Arg, which allowed the completion of the 6cLS to 5cHS conversion of the initial ferric enzyme. **Panel B.** The nitrite productions of iNOSoxy + L-Arg show a similar profile as in Panel A and do not show significant differences between native, frozen and irradiated. The V_{max} values are respectively 50.4, 49.5 and 54.6 s⁻¹. The same observation can also be made for the stability of Fe^{II}CO complexes of iNOSoxy + H₄B samples. The proportions of P420 are more pronounced than in Panel A because the 6cLS→5cHS transition is rapidly completed in the presence of pterin cofactors.

Annexe 4 : Valeurs des modes vibrationnels et valeurs de g des complexes héminiques des NO-Synthases caractérisées par spectroscopie Raman de résonance et par spectroscopie RPE.

Valeurs des modes vibrationnels des complexes Fe^{III} de NOS caractérisées par spectroscopie Raman de résonance.

Fe ^{III} (en cm ⁻¹)	ν_8	ν_7	ν_{16}	ν_5	ν_4	ν_{pp}	$\nu_{35C,6C}$	$\nu_{25C,6C}$	ν_{10}/ν_{vinyl}	ν_{Fe-S}	Références
NOS		677	754	1129	1374		-,1503		-/1627		[10]
iNOSoxy +Arg +BH ₄		677	754	1122	1374	1429	1489,-		-/1627	331	[10, 102]
eNOSoxy					1373	1427	1488,1500	1562,1578	-/1624,1635		[190]
eNOSoxy +Arg					1370	1427	1488,1500	1562,1578	-/1624,1635		[190]
eNOSoxy +BH ₄					1371	1427	1487,1500	1562,1578	-/1623		[190]
eNOSoxy +Arg +BH ₄					1373	1427	1489,1503	1563,1579	-/1624,1638	338	[190, 191]
nNOSoxy					1370		1488		-/1623		[187]
nNOSoxy +BH ₄					1369		1488		-/1624		[187]
nNOSoxy +Arg +BH ₄					1370		1487	1563,1574	-/1623		[187]
bsNOS	343	675	754		1370		1488	1562,-	-/1624		[102]
bsNOS +Arg		675	754		1370		1489	1564,-	-/1625	342	[102]
saNOS					1373		1489		-/1626		[195]
saNOS +Arg					1373		1503		-/1639		[195]
saNOS +BH ₄	342	675	755		1372		1490	1565,-	-/1625		[102]
saNOS +Arg +BH ₄		674	754		1369		1486	1561,-	-/1623		[102]

Valeurs des modes vibrationnels des complexes Fe^{II} de NOS caractérisées par spectroscopie Raman de résonance.

Fe ^{II} (en cm ⁻¹)	ν_8	ν_7	ν_{16}	ν_5	ν_4	ν_{4pp}	ν_3	ν_2	ν_{10}/ν_{vinyl}	Références
iNOS		675	747	1131	1349,1368,1392	1425	1468		-/1620	[10]
iNOSoxy +Arg +BH ₄		672	748	1126	1349,1367,1394	1423	1469		-/1619	[10]
nNOSoxy					1360		1467,1470		-/1615	[187]
nNOSoxy +BH ₄					1347		1466		1600/1617	[187]
nNOSoxy +Arg +BH ₄					1347		1465	1553	1600/1617	[187]
bsNOS	347	675	748		1349		1468	1572	1602/1617	[102]
bsNOS +Arg	344	672	745		1347		1466	1570	1600/1616	[102]
bsNOS +Arg +BH ₄	348	676	747		1349		1468	1572	1601/1617	[102]
saNOS					1349		1467		1602/1619	[195]
saNOS +Arg	347				1349		1467	1554	1602/1619	[195]

Valeurs des modes vibrationnels des complexes Fe^{II}CO de NOS caractérisées par spectroscopie Raman de résonance.

Fe ^{II} CO (en cm ⁻¹)	$\nu_{\text{Fe-CO}}$	$\delta_{\text{Fe-C-O}}$	$\nu_{\text{C-O}}$	ν_8	ν_7	ν_{16}	ν_4	ν_3	ν_2	$\nu_{10}/\nu_{\text{vinyl}}$	Références
iNOS	482, 502	560	1943, 1951								[161, 193, 197]
iNOSoxy +Arg	512	569	1907								[194]
iNOSoxy +BH ₄	460, 475, 492, 507	559	1949, 1963								[193, 197]
iNOSoxy +Arg +BH ₄	485, 501, 513	566	1903								[163]
iNOSoxy +NOHA +BH ₄	485, 499, 514	563									[163]
eNOSoxy +Arg	503, 513	568									[167]
eNOSoxy +Arg +BH ₄	504	567									[167, 193, 197]
nNOSoxy	489, 501, 514	562	1936								[161, 163, 188]
nNOSoxy +Arg	502	565	1932								[118]
nNOSoxy +BH ₄	487, 501	562	1930, 1949								[188]
nNOSoxy +Arg +BH ₄	489, 502, 514	565	1929				1369	1495	1561	-/1621	[161, 163, 186, 188]
nNOSoxy +NOHA +BH ₄	490, 501, 514	563	1928								[161, 163, 188]
nNOSoxy +Cit +BH ₄	484, 498	562									[188]
bsNOS	485, 499	564	1914, 1943	344	674	748	1366	1488	1569	-/1620	[102]
bsNOS +Arg	502	568	1910	344	675	748	1368				[102]
bsNOS +BH ₄	487, 501	567	1917, 1933, 1944	344	675	749	1368				[102]
bsNOS +Arg +BH ₄	501	567	1917	346	675	747	1367	1483		-/1622	[10, 102]
saNOS		560	1930, 1949								[195]
saNOS +Arg +BH ₄	502	565	1917								[167, 195]

Valeurs des modes vibrationnels des complexes Fe^{II}NO de NOS caractérisées par spectroscopie Raman de résonance.

Fe ^{II} NO (en cm ⁻¹)	$\nu_{\text{Fe-NO}}$	$\delta_{\text{Fe-N-O}}$	ν_4	ν_3	Références
iNOSoxy + Arg	540				[194]
iNOSoxy + Arg + BH ₄	549				[194]
nNOSoxy	394		1376	1508	[196]
nNOSoxy + BH ₄	437	543			[196]
nNOSoxy + Arg + BH ₄	437	549	1376	1497	[196]
bsNOS			1374	1508/1498	[251]
bsNOS + Arg + BH ₄	550		1374	1498	[251]
saNOS	526		1374	1507	[251]
saNOS + Arg	550		1374	1497	[251]
saNOS + Arg + BH ₄	550				[251]
saNOS + NOHA + BH ₄	555				[251]

Valeurs des modes vibrationnels des complexes Fe^{III}NO de NOS caractérisées par spectroscopie Raman de résonance.

Fe ^{III} NO (en cm ⁻¹)	$\nu_{\text{Fe-NO}}$	$\delta_{\text{Fe-N-O}}$	ν_8	ν_7	ν_{16}	ν_4	ν_3	ν_2	$\nu_{\text{vinyl}}/\nu_{10}$	Références
iNOS	537									[194]
iNOSoxy +Arg	537									[194]
iNOSoxy +BH ₄	541	550								[194]
iNOSoxy +Arg +BH ₄		545								[194]
eNOSoxy +Arg	530	548								[167]
eNOSoxy +Arg +BH ₄	529	548								[167]
nNOSoxy	535									[196]
nNOSoxy +BH ₄	542									[196]
nNOSoxy +Arg +BH ₄		546								[196]
bsNOS	540	551	342	673	750	1373	1502	1581	1624/1636	[102]
bsNOS +Arg		541	342	673	750	1372	1500	1582	1623/1635	[102]
bsNOS +BH ₄	540		345	672	749	1373	1500	1582	1623/1633	[102]
bsNOS +Arg +BH ₄		542	341	672	748	1372	1500	1580	1623/1634	[102]
bsNOS +NOHA +BH ₄		542								[159]
bsNOS +Cit +BH ₄		547								[159]
saNOS	539	551				1373	1503	1575		[160]
saNOS +Arg		541				1375	1502	1572		[160]
saNOS +BH ₄	539	551				1376	1503	1575		[160]
saNOS +Arg +BH ₄		542								[160]
saNOS +NOHA +BH ₄		543								[160]
saNOS +Cit +BH ₄		549								[160]

Valeurs des modes vibrationnels des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ de NOS caractérisées par spectroscopie Raman de résonance.

$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (en cm^{-1})	$\nu_{\text{Fe-O}}$	$\nu_{\text{O-O}}$	Références
iNOS	482, 502	1133	[161]
iNOSoxy + Arg + BH_4	482, 503, 512	1126	[161]
iNOSoxy + NOHA + BH_4	481, 500, 513	1132	[161]
nNOSoxy		1135	[115, 118]
nNOSoxy + BH_4		1135	[115, 118]
nNOSoxy + Arg + BH_4		1135/1122	[115, 118]
nNOSoxy + NOHA + BH_4		1135	[115, 118]
bsNOS + Arg	517	1124/1136	[160]
bsNOS + NOHA	530	1137	[160]
saNOS	517	1135	[159]
saNOS + BH_4	517	1123/1135	[159]
saNOS + Arg + BH_4	517	1123/1135	[159]
saNOS + NOHA + BH_4	530	1135	[160]

Valeurs de g des espèces Fe^{III} de NOS caractérisées par spectroscopie RPE.

Fe ^{III}	Haut Spin			E/D	Bas Spin			Références
	g _{1eff}	g _{2eff}	g _{3eff}		g ₁	g ₂	g ₃	
iNOS	7,69	4,15	1,77		2,36	2,26	1,92	[205]
iNOSoxy +Arg	7,59	4,20	1,80		2,36	2,26	1,92	[205]
iNOSoxy +BH ₄	7,68	3,98	1,79	0,076				[9]
iNOSoxy +BH ₄					2,35	2,25	1,91	[205]
iNOSoxy +Arg +BH ₄	7,57	4,13	1,81	0,078				[9]
iNOSoxy +Arg +BH ₄	7,59							[205]
iNOSoxy +NOHA	7,69							[205]
iNOSoxy +NOHA +BH ₄	7,66	4,04	1,80	0,078				[9]
eNOSoxy	7,58	4,30	ND					[206]
eNOSoxy +Arg	7,62	4,11	1,80	0,078				[206]
eNOSoxy +NOHA	7,67	4,02	1,79	0,081				[206]
eNOSoxy +BH ₄	7,53	ND	ND					[206]
eNOSoxy +Arg +BH ₄	7,53	4,18	1,80	0,073				[206]
eNOSoxy +NOHA +BH ₄	7,67	4,02						[206]
nNOSoxy	7,65	4,15	1,89	0,079	2,43	2,28	1,89	[234]
nNOSoxy +Arg	7,56	4,09	1,81	0,075				[234]
nNOSoxy +NOHA	7,68	3,98	1,79	0,081				[234]
nNOSoxy +Cit	7,65	4,30	1,87		2,46	2,29	ND	[234]
bsNOS	7,59	4,22	1,83		2,45	2,29	1,90	[9]
bsNOS +Arg	7,70	4,09	1,80					[9]
bsNOS +BH ₄	7,69	3,99	1,78	0,080				[9]
bsNOS +Arg +BH ₄	7,64	4,07	1,80	0,077				[9]
bsNOS +NOHA +BH ₄	7,73	3,97	1,78	0,082				[9]

Valeurs de g des espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de NOS caractérisées par spectroscopie RPE.

$\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$	g_1	g_2	g_3	A_1	Références
nNOSoxy	2,080	2,005	1,970	2,03	[222]
nNOSoxy +Arg	2,086	2,005	1,970	2,08	[222]
nNOSoxy +NOHA	2,077	2,021	1,990	1,94	[222]
iNOSoxy +BH ₄	2,084	2,005	1,974		[9]
iNOSoxy +Arg +BH ₄	2,084	2,005	1,972		[9]
iNOSoxy +NOHA +BH ₄	2,073	2,009	1,984		[9]
iNOSoxy +Cit +BH ₄	2,084	2,005	1,974		[9]
bsNOS +BH ₄	2,082	2,004	1,972		[9]
bsNOS +Arg +BH ₄	2,082	2,005	1,967		[8]
bsNOS +NOHA +BH ₄	2,073	2,007	1,974		[9]
bsNOS +Cit +BH ₄	2,083	2,005	1,971		[9]
gsNOS +Cit	2,079		1,967		[138]

RESUME :

Le monoxyde d'azote est exclusivement synthétisé chez les mammifères par une famille d'hémoprotéines, les **NO-Synthases**. Le cœur de l'activité des NO-Synthases est **l'activation de l'oxygène** c'est-à-dire l'activation de l'intermédiaire réactionnel $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Cette étape est contrôlée par la réactivité intrinsèque du fer, par les transferts de proton et les transferts d'électron. Elle doit être parfaitement maîtrisée car elle contrôle le chemin catalytique emprunté et la nature du produit final. Comprendre l'étape d'activation de l'oxygène est essentiel à la compréhension du rôle biologique et/ou pathologique de la NO-Synthase de mammifère. Cette question s'étend aux NO-Synthases bactériennes pour lesquelles on ne connaît ni le mécanisme moléculaire ni la fonction biologique.

Ce manuscrit propose une analyse approfondie de l'étape d'activation de l'oxygène de la NO-Synthase. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de l'environnement proximal sur la réactivité intrinsèque du fer et l'activation de l'oxygène. Nous avons généré des protéines mutées qui modifient les propriétés électroniques de la liaison proximale de l'hème. Ces protéines mutées ont été caractérisées par différentes spectroscopies (**résonance paramagnétique électronique, Raman de résonance**). Dans un second temps nous avons directement étudié le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, en présence d'analogues de substrat, grâce à des **analyses de cinétique rapide en flux continu** et en flux arrêté (**stopped-flow**). Dans un troisième temps, le rôle du cofacteur **tetrahydrobioptérine** dans le transfert de proton et d'électron a été étudié par une méthode de piégeage à des temps très courts : **le freeze-quench**. L'ensemble de nos résultats montrent que l'activation de l'oxygène est régulée par les propriétés électro-donneuses du ligand proximal et par le réseau de liaisons H distal. Nous mettons en évidence des différences dans le rôle redox du cofacteur tetrahydrobioptérine entre la NO-Synthase de mammifère et la NO-Synthase bactérienne.

La difficulté majeure pour comprendre l'étape d'activation de l'oxygène de la NO-Synthase réside dans la complexité et la rapidité de la réaction catalytique. Dans ce contexte, nous avons cherché à adapter une méthodologie qui a prouvé son efficacité dans le cas des cytochromes P450 : la **cryo-réduction** couplée à des sauts en température.

ABSTRACT :

Nitric oxide is exclusively synthesized by **NO-Synthases** in mammals. The heart of the NO-synthase activity is **oxygen activation**, which corresponds to the activation of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ intermediate. This step depends on the heme electronic properties and on the electron and proton transfers. Oxygen activation has to be well mastered to control exactly the nature of the end-product. Understanding the oxygen activation step is necessary to better understand the biological/pathological role of the mammalian NO-Synthases. Furthermore, bacterial NO-Synthases function and oxygen activation mechanism are unknown.

This PhD work proposes a deep analysis of the oxygen activation step in NO-Synthases. First, proximal environment has been studied with mutated proteins. These mutations impact the electronic properties of the heme proximal bond. Spectroscopic analyses of these mutants have been done by **electron paramagnetic resonance** and **resonance Raman**. Then, we have studied the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ intermediate with substrate analogs which has necessitated **continuous flow** and **stopped-flow analyses**. Finally, the role of the **tetrahydrobiopterin** cofactor in the electron and proton transfer has been studied and clarified thanks to a very fast trapping method : the **freeze-quench**. Our results show that the oxygen activation step is elaborately controlled by the proximal bond electron donation and the distal H bond network. At the same time we show some differences between mammalian and bacterial NO-Synthases concerning the redox role of the tetrahydrobiopterin cofactor.

The major obstacle to understand the oxygen activation step resides in the complexity of the active site chemistry and the rate of catalytic reactions. For this reason, we propose to adapt an already successful protocol to trap some intermediates in the cytochromes P450 mechanism : **cryo-reduction** coupled with temperature jumps.