



**HAL**  
open science

# Simulations Numériques de Transferts Interdépendants d'Electrons et de Protons dans les Protéines

Natacha Gillet

► **To cite this version:**

Natacha Gillet. Simulations Numériques de Transferts Interdépendants d'Electrons et de Protons dans les Protéines. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Paris Sud - Paris XI; Universitat Jaume I (Castellón de la Plana, Espagne), 2014. Français. NNT : 2014PA112159 . tel-01062706

**HAL Id: tel-01062706**

**<https://theses.hal.science/tel-01062706v1>**

Submitted on 10 Sep 2014

**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.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



UNIVERSITAT  
JAUME•I

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE DE PARIS SUD ED 470  
Laboratoire de Chimie Physique

Chimie Physique

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 21/07/2014

par

**Natacha GILLET**

# Simulations Numériques de Transferts Interdépendants d'Electrons et de Protons dans les Protéines

**Directeur de thèse :**  
**Co-directeur de thèse :**

Isabelle DEMACHY  
Vicent MOLINER

Professeur (Université Paris Sud)  
Professeur (Université Jaume I<sup>er</sup>)

**Composition du jury :**

*Président du jury :*  
*Rapporteurs :*

Ally AUKAULOO  
Elise DUMONT  
Rodolphe VUILLEUMIER  
Sergio MARTI  
Iñaki TUNON  
Aurélien DE LA LANDE  
Javier RUIZ PERNIA

Professeur (Université Paris Sud)  
Maître de Conférences (ENS Lyon)  
Professeur (ENS)  
Professeur (Université Jaume I<sup>er</sup>)  
Professeur (Université de Valence)  
Chargé de Recherche (Université Paris Sud)  
Docteur (Université Jaume I<sup>er</sup>)

*Membres invités :*

## Résumé

Les processus d'oxydo-réduction impliquant des molécules organiques se retrouvent très fréquemment dans les protéines. Ces réactions comprennent généralement des transferts d'électrons et de protons qui se traduisent dans le bilan réactionnel par des transferts couplés proton-électron, des transferts simples d'hydrogène, d'hydrure... Une des principales méthodes pour élucider ces mécanismes est fournie par l'évaluation de grandeurs thermodynamiques et cinétiques. Expérimentalement, ces informations sont cependant obtenues avec une résolution temporelle souvent limitée à la milli/microseconde. Les simulations numériques présentées ici complètent, à des échelles de temps plus courtes (femto, pico, nanosecondes), ces données expérimentales.

Il existe de nombreuses méthodes de simulations dédiées à l'étude de mécanismes redox dans les protéines combinant la description quantique des réactifs (QM) nécessaire à l'étude des changements d'états électroniques et la description classique de l'environnement (MM), l'échantillonnage de conformations se faisant grâce à des simulations de dynamique moléculaire (MD). Ces méthodes diffèrent par la qualité de la description du mécanisme réactionnel et le coût en temps de calcul. L'objectif de cette thèse est d'étudier les mécanismes de différents processus impliquant des transferts de protons et d'électrons en recherchant à chaque fois les outils adaptés. Elle comporte trois parties : i) l'évaluation de potentiels redox de cofacteurs quinones ; ii) la description du mécanisme d'oxydation du L-lactate dans l'enzyme flavocytochrome  $b_2$  ; iii) la décomposition d'un transfert formel d'hydrure entre deux flavines au sein de la protéine EmoB.

Dans le cas du calcul des potentiels redox, nous utilisons une méthode notée QM+MM où la description électronique se fait en phase gaz au niveau DFT tandis que les simulations de MD s'effectuent classiquement. Nous appliquons l'approximation de réponse linéaire (ARL) pour décrire la réponse du système aux étapes de changement d'état de protonation ou d'oxydation de la fonction quinone ce qui aboutit au calcul du potentiel redox théorique. Nous avons pu ainsi établir une courbe de calibration des résultats théoriques en fonction des données expérimentales, confirmant la validité de l'ARL pour les cofacteurs quinones dans l'eau. La méthode a été étendue à la protéine MADH mais les limites de l'ARL ont été atteintes du fait des fluctuations importantes de l'environnement.

L'étude de l'oxydation du L-lactate en pyruvate repose sur le calcul de surfaces d'énergie libre au niveau AM1/MM. Ces surfaces sont obtenues à l'aide de simulations de MD biaisées puis corrigées à l'aide de calculs d'énergies DFT. Différents chemins de réactions impliquant les transferts d'un proton et d'un hydrure du substrat vers une histidine et une flavine respectivement ont pu être identifiés. Ces transferts peuvent être séquentiels ou concertés suivant la conformation du site actif ou les mutations effectuées. Les surfaces concordent avec les effets observés expérimentalement. Les barrières obtenues restent cependant supérieures à celles attendues ouvrant la voie à d'autres simulations.

La décomposition du mécanisme de transfert d'hydrure en transfert d'électron et d'atome d'hydrogène s'appuie sur de longues simulations classiques et des calculs d'énergies au niveau au niveau DFT contrainte (cDFT)/MM. La cDFT permet de décrire les états diabatiques associés au transfert d'électron à différents stades du transfert d'hydrogène. En appliquant l'ARL, nous pouvons construire des paraboles correspondant aux états diabatiques et déterminer la séquence des événements de transfert d'électron et d'hydrogène. La comparaison entre milieux protéique et aqueux nous a permis d'établir que le rôle de la protéine dans le transfert d'hydrure global est de bloquer le transfert d'électron en l'absence du transfert d'hydrogène empêchant ainsi la formation de flavines semi-réduites.



## Summary

Redox processes involving organic molecules are ubiquitous in proteins. They generally imply global reactions such as Proton Coupled Electron Transfers, hydrogen atom or hydride transfers which can be decomposed into both electrons and proton transfers. Kinetic and thermodynamic information leads to a better understanding of these mechanisms. However, experiments are often limited to a milli- or microsecond timescales. We present here numerical simulations allowing modeling at shorter timescales (femto, pico or nanosecond) to complete experimental data.

Many numerical methods combine quantum description (QM) of the active center and classical description (MM) of the environment to describe redox transformations into biological media. Molecular dynamics (MD) simulations allowed a conformational sampling of the global system. Nevertheless, depending on their level of description of the QM part, the methods can cost more or less CPU time to get a good conformational sampling. In this thesis, we have studied different redox mechanisms involving both proton and electron transfers with a particular care paid to the balance between quality of the electronic description and of conformational sampling. For each mechanism, the coupled proton and electron transfers are investigated differently. This manuscript thus falls into three parts: i) the evaluation of the redox potentials quinone derivatives; ii) the mechanistic description of the L-lactate oxidation into pyruvate in the flavocytochrome  $b_2$  enzyme; iii) decomposition of the formal hydride transfer occurring between two flavins in EmoB protein.

A QM+MM scheme is chosen to evaluate redox potential of quinone cofactors: the electronic behavior is described at DFT level in gas phase while classical MDs provide a large conformational sampling of the molecule and its environment. Deprotonation and oxidation free energies are estimated by applying the linear response approximation (LRA). We finally get a theoretical value of the redox potential for different quinocofactors in water and a calibration curve of these theoretical results in function of experimental data. This curve allowed predictions of quinone redox potentials in water with a good accuracy (less than 0.1 eV). We also try our method on the MADH protein containing a Tryptophan Tryptophilquinone cofactor. However, because of great fluctuations of the environment, the LRA is not suitable for this system. This underlines the limits of our methodology.

## *Summary*

The oxidation of L-lactate to pyruvate is described by free energy surfaces obtained at AM1/MM level. Biased MDs provide the AM1/MM profile which is then corrected at DFT level. Several reactions pathways have been noticed. They consist in sequential or concerted transfers of a proton from L-lactate to a histidine and a hydride from L-lactate to a flavin cofactor. The coupling between the two transfers depends on the conformation of the active site or on the mutations. The obtained surfaces fit qualitatively the experimental data but the theoretical activation barriers are too high. Other simulations must be explored: different methods, other mechanism...

Finally, a combination of long classical MDs and constrained DFT (cDFT)/MM are employed to decompose a hydride transfer between two flavins into one hydrogen atom and one electron transfer. cDFT methodology allow us to describe diabatic states associated to the electron transfer during the hydrogen atom transfer. Applying the LRA, we can build parabola of the diabatic and determine the sequence of the two transfers. The comparison of our results in the EmoB protein or in aqueous medium shows that the protein allows the electron transfer only if the hydrogen atom transfer is happening. By this way, no semi-reduced flavin is created.

## **Resumen**

Una de las seis grandes clases de enzimas son las oxidorreductasas, enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción entre moléculas orgánicas. Estas reacciones se pueden describir como una transferencia de hidruro, de hidrogeno o como una transferencia conjunta de protón y electrón. Para describir y distinguir entre estos mecanismos se requiere la evaluación de las propiedades termodinámicas y cinéticas. Diferentes técnicas experimentales se pueden utilizar para determinar dichas propiedades pese a que requieren tiempos bastante largos (mili o microsegundos). Por otro lado, las simulaciones numéricas pueden describir los mecanismos a una escala de tiempo más cortas (femto, pico, nanosegundos...).

Existe una gran variedad de metodologías de simulación para el estudio de mecanismos redox en proteínas. Las más adecuadas, que permiten incluir el efecto de la proteína, son aquellas que combinan una descripción cuántica (QM) del centro activo para estudiar los cambios de estado electrónico y una descripción clásica del entorno (MM). Las diferentes conformaciones del sistema se pueden obtener mediante simulaciones de dinámicas moleculares (MD). Obviamente, según el nivel de descripción del mecanismo elegido, el método cuesta más o menos tiempo de cálculo. El objetivo de esta tesis consiste en la descripción de diferentes reacciones redox incluyendo transferencias de protones y de electrones con una metodología adecuada para describir las propiedades de este tipo de procesos. La tesis se divide en tres capítulos: i) la evaluación de potenciales de óxido-reducción de cofactores de tipo quinona; ii) la descripción del mecanismo de oxidación del L-lactato a piruvato en la enzima flavocitocromo  $b_2$ ; y iii) la transferencia de hidruro entre dos flavinas en la proteína EmoB.

Para calcular los potenciales redox, utilizamos un método llamado QM+MM con el cual la evolución electrónica se determine al nivel DFT en fase gas mientras las simulaciones de MD se hacen a nivel clásico. Aplicamos la aproximación de la repuesta lineal (ARL) para describir los cambios del sistema en las diferentes etapas de protonación o de oxidación, y calcular finalmente el potencial red-ox. Hemos construido una curva de calibración de los resultados teóricos en función de los datos experimentales en disolución acuosa, lo que ha permitido confirmar así la validez de la aproximación ARL en dicho medio. Posteriormente este método se ha utilizado para estudiar el proceso en la proteína MADH. Sin embargo, la aproximación ARL no se ha podido aplicar a causa de las importantes fluctuaciones del entorno.

La descripción de la oxidación del L-lactato a piruvato se ha llevado a cabo mediante la exploración de superficies de energía libre calculadas al nivel AM1/MM. Estas superficies se han corregido con cálculos DFT. Su análisis ha permitido identificar diferentes caminos de reacción implicando las transferencias de un protón y de un hidruro desde el L-lactato a una histidina y una flavina respectivamente. Esas transferencias pueden ser secuenciales o concertadas según la conformación del centro activo y las mutaciones realizadas. Las conclusiones deducidas a partir de dichas superficies coinciden, a nivel cualitativo, con datos experimentales, pese a que las barreras de activación parecen sobreestimadas. La conclusión es que otros métodos y mecanismos deberán ser explorados.

La descomposición del mecanismo de transferencia de hidruro en la transferencia de un electrón y la transferencia de un átomo de hidrogeno se ha llevado a cabo con MDs clásicas largas y cálculos de energías a nivel *constrained* DFT (cDFT)/MM. La aproximación cDFT nos permite simular los estados diabáticos relacionados con la transferencia de electrón a diferentes momentos de la transferencia del hidrogeno. Aplicando la aproximación ARL podemos construir parábolas de los estados diabáticos y determinar la secuencia de las transferencias de electrón y de hidrogeno. La comparación entre la reacción en medio proteico y acuoso nos permite establecer que la proteína impide la transferencia de electrón en ausencia de transferencia de hidrogeno y, por tanto, la formación de flavinas semi-reducidas.

## **Remerciements**

Ce travail de thèse n'aurait pu être mené à bien sans l'aide, le soutien, les conseils avisés et les sourires chaleureux de nombreuses personnes, tant en France qu'en Espagne. En préambule de ce mémoire, je souhaite donc les remercier pour ces trois années de doctorat, riches en expériences scientifiques et humaines.

En este prólogo, quiero agradecer a toda la gente que ha jugado un papel en la elaboración de mi trabajo de tesis. Sin embargo, es muy difícil para mí hacerlo en Castellano, entonces esta parte es en Francés. ¡Lo siento, y quiero decir “muchas gracias” a todos!

Tout d'abord, je tiens à remercier Mehran Mostafavi, Juan Andres Bort et David Lauvergnat, respectivement directeur du Laboratoire de Chimie Physique d'Orsay, directeur du groupe de « Química Teórica y Computacional » à l'université Jaume I de Castellon de la Plana et animateur du groupe Theosim du LCP, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire dans le cadre de ma thèse en co-tutelle.

J'adresse également tous mes remerciements aux rapporteurs de ce manuscrit, Elise Dumont et Rodolphe Vuilleumier, ainsi qu'aux examinateurs présents au sein de mon jury de thèse, Sergio Martí, Iñaki Tuñon et Ally Aukauloo, pour avoir accepté ce rôle et pour l'intérêt qu'ils ont accordé à mon travail, malgré les difficultés linguistiques pour certains d'entre eux.

Un grand merci par ailleurs à mes deux directeurs de thèse, Isabelle Demachy et Vicent Moliner, ainsi qu'à mes deux encadrants, Aurélien de la Lande et Javier Ruiz Pernia. Leur disponibilité, leur gentillesse, leur aide, leurs conseils et leurs encouragements ont été des alliés indispensables à la réussite de ce doctorat. Grâce à eux, ces trois années se sont passées dans un climat scientifique et humain extraordinaire et resteront pour moi une expérience formidable. J'ajoute dans ces remerciements Bernard Lévy et Florence Lederer, également très impliqués dans l'évolution de mes travaux de thèse et qui m'ont fait partager leur grande expérience de la recherche.

Je remercie également tous ceux qui, au cours de ces années, m'ont apporté une aide ponctuelle et bienvenue et m'ont soutenue au quotidien par leur gentillesse et leur bonne humeur. Je pense à Fabien Cailliez, Jacqueline Ridard et Pascal Pernot, avec qui j'ai pu énormément échanger sur des problèmes scientifiques, et sur mes incertitudes. Mes remerciements vont

## *Remerciements*

également à Jean-Marie Teuler pour son aide précieuse (pour ne pas dire irremplaçable) sur les problèmes informatiques divers et variés et aux membres du personnel administratif et logistique du LCP, Marie Françoise Lecanu, Delphine Lelièvre, Eve Ranvier et Joël François, ainsi qu'à Merce Garcia à la UJI pour leur efficacité dans les différentes démarches.

Travailler au sein de deux équipes dans deux pays différents n'est pas toujours facile mais j'ai rencontré au sein de chaque groupe des personnes qui m'ont chaleureusement accueillie et permis de me sentir chez moi dans chaque groupe. Je tiens à remercier les adeptes de la cafeteria du LCP pour tout le chocolat dévoré (un soutien moral essentiel) et les discussions du midi, véritable moment de détente, de culture, et de jeux de mots pas toujours excellents, ainsi que les participants au petit déjeuner du vendredi matin (que de délices chaque semaine !). Un grand merci aux anciens et nouveaux doctorants du LCP, en particulier à Gabriella, Jérémy (pour les retours en RER partagés) et Aurélie C. (pour ces années en commun et l'angoisse finale partagée). Au sein des membres de la UJI, j'adresse un grand merci à tous ceux qui ont partagé mes repas et mon bureau dans une ambiance sympathique et chaleureuse. Je tiens à remercier tout particulièrement Pato, Isabel et surtout Erica, qui m'a tellement aidé à m'installer et avec qui j'ai partagé tant de joie et de peines, et de longues conversations...

Enfin, ma reconnaissance va à toutes ces personnes, extérieures au laboratoire mais si présentes dans ma vie, qui m'ont soutenue par leur présence et leur affection au cours de ces trois années et même avant. Un grand merci donc à mes amis : Elodie et Marine, pour ces longues années ensemble, Lucie, Morgane, Mathilde, Clarisse et Matthias, pour les sorties, les verres et les restaurants japonais, et surtout Sarah et Mélanie pour ces six années de « souffrance » et de délire communs. Je pense fort à vous ! Merci également à ma famille, à mes frères, qui resteront des modèles quoiqu'il en soit et à mes parents, pour leur soutien, leur amour et leur disponibilité : merci maman pour nos longues conversations, ton soutien moral de directrice de thèse accomplie et merci papa pour ta patience lorsque ces débats dépassaient des heures raisonnables. Pour conclure, je remercie Florent pour tant de choses que je ne peux toutes les écrire... désolée pour ces longues absences, merci pour ton amour, ton soutien et ta confiance en moi malgré ta hantise de la chimie !

*A la mémoire de Mutty*





## Table des matières

Abbréviation.....	13
I. Introduction.....	15
II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH.....	18
1. Introduction .....	18
2. Méthodes de détermination des potentiels redox .....	21
a. Calcul du potentiel redox .....	21
b. Simulations numériques .....	23
3. Application au TTQ, comparaison des méthodes .....	27
a. Etude quantique en phase gazeuse.....	28
b. Calibration du champ de force .....	34
c. Etude des oxydations du TTQ en solution .....	41
d. Evaluation des pKa.....	47
4. Courbe de calibration .....	50
a. Calibration du champ de force pour les molécules quinones .....	50
b. Calcul des potentiels redox par la méthode QM +MM .....	52
c. Application au CTQ.....	56
5. Etude du TTQ dans la protéine MADH .....	59
a. MADH seule .....	59
b. Comparaison avec le complexe MADH/amicyanine .....	68
6. Conclusion.....	76
III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2.....	79
1. Introduction .....	79
2. Mécanisme de type hydrure : méthode.....	84
a. Préparation du système .....	85
b. Obtention des surfaces d'énergie potentielle .....	87
c. Obtention du potentiel de force moyenne .....	90
3. Mécanisme de type hydrure : Résultats.....	92
a. Etude de l'enzyme sauvage.....	93
b. Etude avec l'arginine 289 en position distale .....	104
c. Mutation Y254L.....	109
d. Mutation D282N .....	113
e. Mutation A198G/L230A et réaction avec le Mandélate.....	117

*Table des matières*

4. Mécanisme Carbanion.....	121
a. Etude de la rotation du L-lactate .....	122
b. Etude du transfert de H <sub>α</sub> vers l'His373.....	123
5. Conclusion.....	125
IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob.....	128
1. Introduction .....	128
2. Etude statique du transfert formel d'hydrure.....	133
a. Signature topologique de l'hydrure, cas du catéchol.....	133
b. Chemin de réaction du transfert formel d'hydrure.....	139
c. Chemin de transfert dans les états diabatiques.....	143
3. Etude dynamique : méthodologie et résultats .....	146
a. Construction de courbes de type Marcus .....	146
b. Etude QM/MM.....	149
c. Calibration d'un champ de force adapté .....	151
d. Dynamiques moléculaires classiques .....	155
e. Rôle de l'environnement protéique .....	159
4. Couplage du transfert d'électron avec le transfert d'hydrogène .....	170
a. Profil du transfert d'hydrogène .....	170
b. Transfert d'électron aux positions intermédiaires .....	171
5. Conclusion.....	175
V. Conclusion.....	179
Bibliographie.....	183
Annexe A. Acides Aminés.....	191

## Abbréviation

AIM : *Atoms in Molecules*

AM1 : *Austin Model 1* méthode semi-empirique

ARL : Approximation de la Réponse Linéaire

CTQ : Cystéine TryptophilQuinone

DFT : *Density Functional Theory* Théorie de la Fonctionnelle de la Densité

cDFT : *constrained Density Functional Theory* Théorie de la Fonctionnelle de la Densité contrainte

SCC-DFTB : *Self Consistent Charge Density Functional Tight Binding* méthode semi-empirique

ELF : *Electron Localization Function*

EmoB : FMN:FMN oxido-reductase

ESP : *Electrostatic Potential* utilisée pour les charges atomiques déterminées sur le potentiel électrostatique

Fcb2 : Flavocytochrome  $b_2$

FMN : Flavine Mononucléotide

IH : méthode Hirshfeld itérative

LTQ : Lysine Tyrosyl Quinone

MADH : Méthylamine Deshydrogénase

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

PCET : *Proton Coupled Electron Transfer* Transfert couplé électron proton

PFM : Potentiel de Force Moyenne

PM6 : *Parameterized Model number 6* méthode semi-empirique

PT : Perturbation Thermodynamique

RRMSD : *Relative Root Mean Square Deviation* déviation à l'écart quadratique moyen relatif

QM/MM : *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics* méthode hybride Quantique/Classique

SEP : Surface d'Énergie Potentielle

TTQ : Tryptophane TryptophilQuinone



## **I. Introduction**

De nombreux processus enzymatiques impliquent des réactions d'oxydo-réduction de molécules organiques ou de complexes métalliques. Elles interviennent dans la photosynthèse, les chaînes respiratoires cellulaires, la dégradation de molécules... et sont largement étudiés tant d'un point de vue expérimental que théorique. Cependant, chaque enzyme ou famille d'enzymes détient des caractéristiques structurales spécifiques, ce qui entraîne des questionnements et des axes d'études différents pour chaque système. Cette thèse présente trois exemples de ces problématiques et les méthodes de simulation numérique élaborées pour les résoudre. Ces méthodes ont été appliquées à des systèmes enzymatiques différents : la protéine méthylamine déshydrogénase MADH, le flavocytochrome  $b_2$  Fcb2 et la protéine NADH : FMN oxydoréductase EmoB.

Ces enzymes possèdent en commun un cofacteur organique, de type flavine ou quinone, capable d'accepter ou de donner deux électrons et, aussi bien, d'accepter ou de donner jusqu'à deux protons. De fait, transferts de protons et d'électrons se trouvent intimement liés dans les réactions faisant intervenir de telles molécules organiques. Ils se présentent souvent, à l'échelle de temps des méthodes expérimentales, comme des transferts d'atome d'hydrogène ou d'hydrure dans les cas où donneurs et accepteurs de proton et d'électrons sont identiques. Ces mécanismes globaux ne peuvent rendre compte des différentes étapes élémentaires ni de leur interdépendance sur lesquelles l'environnement protéique peut exercer une influence. Parvenir à élucider la relation entre transfert d'électrons et de protons apporte un éclairage nouveau sur les mécanismes enzymatiques.

Les modèles de chimie théorique constituent une alternative aux procédés expérimentaux en ciblant ces processus enzymatiques particuliers et en les simulant sur une échelle de temps autorisant leur éventuel découplage. Ces simulations doivent rendre compte de deux aspects : d'une part le caractère quantique des déplacements de particules (électron ou proton) entraînant des modifications de la structure électronique des molécules, et d'autre part la spécificité de l'environnement protéique et de ses fluctuations. L'efficacité catalytique des enzymes s'expliquent en effet par leurs structures stabilisant certaines conformations proches de l'état de transition, par le champ électrostatique créé, leur dynamique... Les modélisations multi-échelles associant description quantique (QM) du centre réactif et représentation classique (MM) de

## I. Introduction

L'environnement protéique offrent la possibilité d'étudier les transferts d'électrons et de protons en prenant en compte ces deux aspects.

La structure tertiaire d'une protéine peut être connue grâce aux données cristallographiques recensées au sein de la *Protein Data Bank* (PDB). Toutefois, les structures cristallisées ne correspondent pas toujours aux formes actives ni au comportement en solution des protéines. De plus, le calcul de grandeurs thermodynamiques telles que les énergies libres d'activation ou de réaction nécessitent l'échantillonnage suffisant des conformations accessibles à la protéine. Pour l'obtenir et pour garantir un comportement proche de celui de la protéine solvatée *in vitro*, nous pouvons réaliser des simulations de dynamiques moléculaires à différentes échelles de temps selon les besoins : les dynamiques courtes (échelle de la picoseconde à la centaine de picosecondes) ne permettent pas de visualiser des mouvements de grande amplitude, mais plus la durée d'échantillonnage est longue (jusqu'à plusieurs centaines de nanosecondes ou la microseconde), moins la méthode utilisée peut décrire finement les phénomènes électroniques. Ainsi, les dynamiques QM/MM utilisant la théorie de fonctionnelle de la densité (DFT) sont limitées en général à quelques dizaines de picosecondes, celles s'appuyant sur des méthodes semi-empiriques permettent d'atteindre la nanoseconde et les dynamiques classiques tout atome quelques centaines de nanosecondes, voire la microseconde...

L'objectif de cette thèse est d'aborder la compréhension de processus de transfert d'électron et/ou de proton par la simulation et le calcul de différentes grandeurs (potentiel d'oxydoréduction, chemin d'énergie libre, couplage entre étapes élémentaires) dans des systèmes biologiques d'intérêt. Il convient donc d'adapter notre protocole de simulation au type d'informations recherché, pour aboutir à un équilibre entre description quantique et échantillonnage des conformations en solution et/ou dans la protéine. Il s'agit de combiner des méthodes de chimie théorique existantes de façon appropriée, de les associer de manière parfois nouvelle, et d'en analyser les limites.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au calcul du potentiel d'oxydo-réduction d'une série cofacteurs de type quinone. Présents dans certaines enzymes, ces derniers participent à des réactions de transfert d'électrons. Le potentiel d'oxydation de différentes molécules modèles de ces cofacteurs a été étudié en solution aqueuse. Nous avons cherché à établir une méthodologie permettant de calculer cette grandeur en considérant individuellement les étapes élémentaires de déprotonation et d'oxydation. Par la suite, la construction d'une courbe

## *I. Introduction*

de calibration de nos résultats théoriques sur les données expérimentales nous autorise à étendre notre protocole de simulation à d'autres systèmes. Nous nous sommes alors intéressés au processus d'oxydation du tryptophane tryptophilquinone (TTQ) dans la protéine MADH.

La deuxième partie de cette thèse décrit l'étude mécanistique de l'oxydation d'une molécule de L-lactate dans la protéine Fcb2. Cette réaction implique trois partenaires : le substrat, un acide aminé basique (une histidine) et un cofacteur flavine mononucléotide FMN. L'oxydation de la fonction alcool du L-lactate en cétone entraîne le transfert de deux protons et de deux électrons. Nous avons envisagé ces différentes étapes de manière couplée. Pour ce faire, des surfaces adiabatiques prenant en compte les différents transferts de noyaux en jeux sont déterminées pour différentes formes du site actif variant dans leur conformation, par mutation d'acides aminés ou dans la nature du substrat.

Enfin, la troisième partie est consacrée à l'étude du couplage (ou du découplage) entre des transferts d'électrons et de proton lors d'un transfert formel d'hydrure. L'étude du transfert d'électron est abordée dans le cadre de la théorie de Marcus et s'appuie sur la simulation des états diabatiques grâce à l'utilisation de la DFT contrainte. Les courbes correspondant aux états diabatiques et adiabatiques peuvent être tracées. Nous parvenons alors à décrire ce transfert et de définir dans quel régime il s'effectue (diabatique ou adiabatique) le long du mouvement de l'atome d'hydrogène. L'influence de l'environnement, protéique ou aqueux, est prise en compte et particulièrement étudiée. Un tel transfert formel d'hydrure se produit entre deux cofacteurs FMN à la surface de la protéine EmoB et a pu être décrit en étapes élémentaire de transfert d'hydrogène et d'électrons couplés.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

### 1. Introduction

Le potentiel d'oxydoréduction constitue une valeur de référence pour caractériser donneurs et accepteurs d'électron dans un milieu et permet de remonter jusqu'à la thermodynamique voire la cinétique du transfert d'électron. Toutefois, s'il est aisément mesurable en solution pour des espèces isolées, il demeure souvent indéterminé pour une même molécule enfouie dans un système biologique complexe. Or l'environnement protéique, avec de nombreux groupements polaires ou ioniques présents sur les acides aminés, de nombreuses contraintes conformationnelles, et un accès plus ou moins limité au solvant, impose un champ électrostatique à cette molécule différent de celui de l'eau en solution ce qui se ressent sur la valeur du potentiel d'oxydoréduction. La présence dans de nombreuses protéines de cofacteurs organiques (flavines, nicotinamides, quinones...) ou de complexes métalliques (hème) jouant un rôle essentiel dans des mécanismes enzymatiques divers impliquant des transferts d'électrons entraînent de nombreuses questions quant aux modulations des propriétés de ces derniers par l'environnement protéique. La chimie théorique présente alors une alternative aux méthodes expérimentales en permettant de modéliser le cofacteur et le milieu et d'en déduire les propriétés thermodynamiques du système. Nous proposons ici de quantifier le potentiel redox d'un cofacteur de type quinone, le tryptophane tryptophylquinone ou TTQ, présent au sein de la protéine Méthylamine Déshydrogénase ou MADH de la bactérie *Paracoccus Denitrificans*.

La protéine MADH, présente dans le périplasme de nombreux organismes unicellulaires, permet à ces derniers d'utiliser des molécules de méthylamine comme source de carbone et d'énergie.<sup>1</sup> En effet, elle catalyse la réaction de déamination de cette espèce chimique par réduction à deux électrons de son cofacteur TTQ. Ce dernier est par la suite à nouveau oxydé par transfert d'électron vers deux protéines bleues à cuivre de type I, nommées amicyanines (Figure 1 et Figure 2). Chaque électron est ensuite transféré vers un cytochrome c551i. Des structures cristallographiques du complexe MADH/amicyanine/cytochrome ont été obtenue, comme par exemple la structure PDB 2GC4.<sup>2</sup> La protéine MADH est constituée de deux monomères identiques comportant chacun une chaîne lourde, notée  $\alpha$ , et une chaîne légère,  $\beta$ , l'ensemble pesant 125kDa. Le TTQ est formé par modification post-traductionnelle des tryptophanes 57 et



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

108 de la chaîne  $\beta$ . Outre la liaison entre ces tryptophanes, une fonction aminoquinole est introduite sur le cycle indole de l'acide aminé 57, créant ainsi un cofacteur organique de type quinone au sein de la protéine (Figure 3). Au laboratoire, il est possible de transformer cette N-quinole en O-quinole ce qui entraîne des comportements différents vis-à-vis du transfert d'électrons du TTQ réduit vers le cuivre de l'amicyanine : la fonction amine doit être déprotonée avant de transmettre l'électron, et non l'hydroxyle.<sup>3</sup> Le transfert de proton constitue alors l'étape cinétiquement déterminante de la réduction de l'amicyanine par la MADH réduite. Nous avons choisi de travailler avec la forme O-quinole du TTQ, absente *in vivo* mais largement étudié *in vitro*. Nous souhaitons déterminer le potentiel redox théorique pour le TTQ réduit dans deux cas : la MADH seule ou la MADH complexée à l'amicyanine pour étudier l'impact de l'association des deux protéines sur les propriétés de donneur d'électron du TTQ.

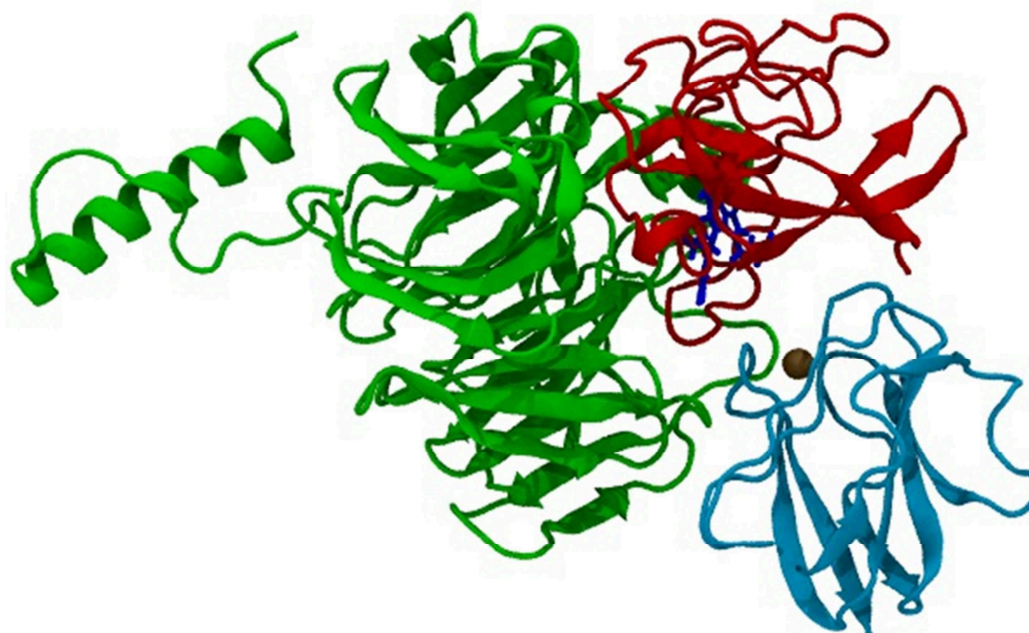


Figure 1 : représentation de complexe MADH/amicyanine obtenu lors d'une simulation de dynamique moléculaire à partir de la structure cristallographique 2GC4.<sup>2</sup> Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine MADH sont colorées respectivement en vert et rouge, l'amicyanine est en cyan, le cofacteur quinone TTQ de la MADH est représenté en bâtons bleu et l'ion cuivre complexé à la MADH en sphère de Van der Waals marron.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

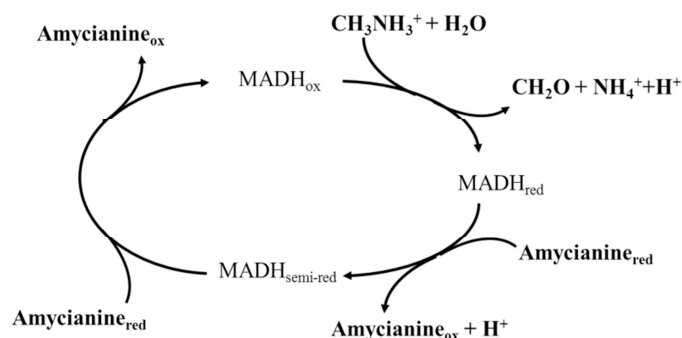


Figure 2 : cycle catalytique de la protéine MADH comprenant la déamination oxydante de la méthylamine réduisant la MADH et les transferts d'électrons de la MADH vers des partenaires amicyanines permettant le renouvellement de la MADH oxydée.

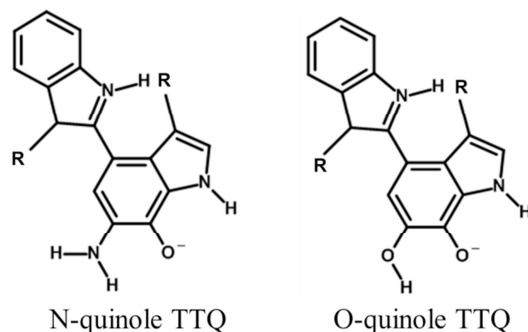


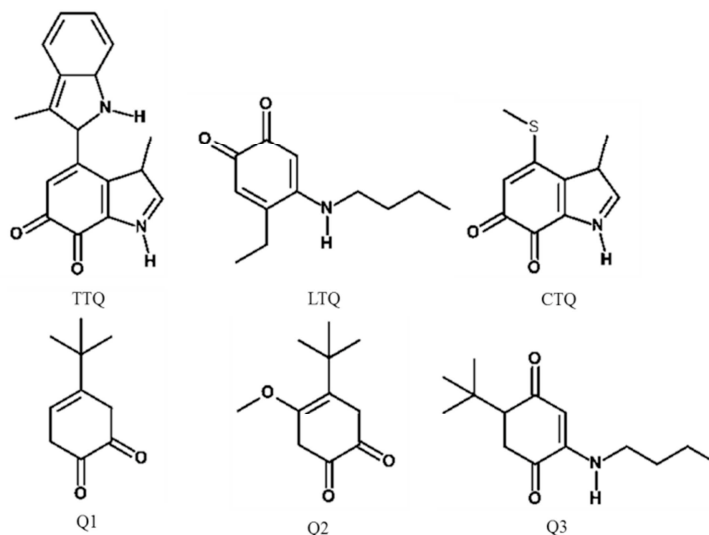
Figure 3 : représentation du N-quinole TTQ et du O-quinole TTQ à l'état réduit anionique. R désigne la chaîne protéique.

La bibliographie concernant le calcul de propriétés redox de cofacteurs organiques recouvre de nombreuses méthodes à différents niveaux de théorie. Notre premier objectif est d'en sélectionner une qui réalise un bon compromis entre échantillonnage conformationnel et qualité de la description électronique. Dans cette optique, nous allons tout d'abord nous pencher sur le TTQ en solution aqueuse. Nous ne chercherons pas à atteindre une valeur du potentiel redox reproduisant des données expérimentales avec exactitude mais à déterminer un protocole de calcul applicable en solution et en milieu biologique. Le lien avec les expériences se fera par l'intermédiaire d'une courbe de calibration de nos résultats théoriques en fonction de résultats expérimentaux sur plusieurs molécules de la famille des quinones.

Plusieurs cofacteurs quinones ont été identifiés et largement étudiés dans des protéines.<sup>4,5</sup> Le potentiel redox de molécules modèles de certains d'entre eux a pu être déterminé dans l'eau : c'est par exemple le cas du TTQ<sup>6</sup> et du LTQ.<sup>7</sup> Leur propriétés ont également été comparées à

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

celles de molécules proches, non biologiques mais appartenant néanmoins à la famille de quinones.<sup>8</sup>



**Figure 4 : représentation des molécules de la famille des quinones étudiées dans cette partie. Les espèces de la première rangée sont des modèles de cofacteurs biologiques et celles de la deuxième des molécules quinones synthétisées et étudiées par le groupe de J. Klinman.**

Afin de construire notre courbe de calibration sur des valeurs expérimentales de potentiels redox relativement espacées, nous avons décidé de réaliser nos calculs sur les molécules TTQ, LTQ, Q1, Q2 et Q3 représentées dans la Figure 4 dont les potentiels redox expérimentaux varient de -87 mV à 353 mV par rapport à l'électrode standard à hydrogène. La molécule modèle du CTQ n'a pas été étudiée en tant que telle mais dans une version proche, où le méthyle du thioéther est remplacé par un phényle.<sup>9</sup> Elle nous servira de test pour notre courbe.

Enfin, nous utiliserons notre protocole de simulation dans le cadre du calcul du potentiel redox du TTQ au sein de la protéine MADH complexée ou non avec sa partenaire, la protéine amycianine.

### 2. Méthodes de détermination des potentiels redox

#### a. Calcul du potentiel redox

Le potentiel d'oxydo-réduction  $E^\circ$  à un pH donné peut s'écrire à partir de l'énergie libre de réaction totale  $\Delta F^\circ$  comme :

$$E^\circ = \frac{\Delta F^\circ}{n\mathcal{F}} \quad 1$$

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

où  $\mathcal{F}$  est la constante de Faraday et  $n$  le nombre d'électrons transférés. Expérimentalement, ce potentiel s'obtient par rapport à une électrode de référence : électrode standard à hydrogène (ESH), électrode au calomel saturé, au sulfate mercurieux... L'électrode idéale étant l'ESH, il existe des relations permettant de convertir un potentiel redox par rapport à une autre électrode à un potentiel par rapport à l'ESH. Toutefois, la valeur exacte du potentiel ESH reste inconnue. Or, dans nos calculs, nous obtenons l'énergie libre de l'oxydation de la fonction quinole, indépendamment de l'électrode. Pour relier directement résultats théoriques et expérimentaux, il faut alors évaluer également le potentiel de l'électrode. Dans la littérature, les valeurs proposées pour l'ESH varient entre 4,2 V et 4,8 V,<sup>10</sup> soit sur une large gamme de 600 mV, plus large que la différence maximale entre les potentiels redox expérimentaux des cofacteurs quinones étudiés ici. L'erreur sur l'ESH est donc bien trop importante. Considérer les différences relatives des potentiels et non leur valeur absolue, et ce *via* la réalisation d'une courbe de calibration, permet de s'affranchir de ce problème lié à l'évaluation de l'ESH, même si retrouver un écart entre potentiel théoriques et expérimentaux compris dans les valeurs possible de cette référence est préférable quant à la pertinence de la méthode.

Dans le cadre de simulations de dynamiques moléculaires, l'énergie libre de réaction associée au potentiel redox peut être évaluée de plusieurs manières. De façon générale, les méthodes de perturbation ou d'intégration thermodynamique permettent d'obtenir cette énergie en échantillonnant l'espace des phases le long d'une coordonnée de réaction. Dans le cas de l'oxydation d'une molécule, des états intermédiaires entre la forme réduite et la forme oxydée, non physiques, peuvent être définie. La charge de la molécule représente alors la grandeur modifiée lors du calcul par perturbation ou intégration thermodynamique et peut prendre différentes valeurs  $c_i$ :

$$c_i = c_0 + (c_1 - c_0)\lambda_i \quad 2$$

où  $c_0$  et  $c_1$  sont les charges à l'état réduit et oxydé respectivement et  $\lambda_i$  est un nombre compris entre 0 et 1. Les simulations sont effectuées sur différentes fenêtres définies chacune par une valeur de  $\lambda$ . L'énergie libre totale s'obtient alors :

- soit en sommant les variations d'énergies libres déterminées par les équations 3 ou 4 sur chaque fenêtre

$$\Delta F_{i \rightarrow j} = -k_B T \ln \langle \exp(-\frac{V_j - V_i}{k_B T}) \rangle_i \quad 3$$

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

$$\Delta F_{j \rightarrow i} = k_B T \ln \langle \exp(-\frac{V_i - V_j}{k_B T}) \rangle_j \quad 4$$

où  $k_B$  désigne la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $V_x$  l'énergie du système pour une valeur  $c_x$  de la charge et  $\langle \dots \rangle_x$  la moyenne sur la fenêtre correspondant à  $\lambda_x$ . Cette méthode, nommée perturbation thermodynamique, requiert deux calculs d'énergies par fenêtre.

- soit par intégration thermodynamique : l'énergie est redéfinie sur chaque fenêtre comme une fonction de  $\lambda$  puis ses variations sont intégrées du réactif au produit :

$$V(\lambda) = \lambda V_f + (1 - \lambda) V_i \quad 5$$

$$\Delta F^\circ = \int_0^1 \langle \frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda} \rangle_\lambda d\lambda \quad 6$$

Toutefois, si l'évolution de l'énergie est linéaire en fonction de  $\lambda$ , il est possible de simplifier les calculs de l'énergie libre de réaction en ne prenant en compte que deux points de la réaction, de préférence le réactif et le produit (soit  $\lambda$  égal à 0 et 1 respectivement). Dans ce cas, l'énergie libre de réaction s'écrit :

$$\Delta F^\circ = \frac{1}{2} (\langle V_f - V_i \rangle_i + \langle V_f - V_i \rangle_f) \quad 7$$

où  $V_x$  désigne l'énergie de l'état  $x$  (initial ou final) et  $\langle \dots \rangle_x$  la moyenne sur l'état  $x$ . Si cette approximation, dite de la réponse linéaire (ARL ou *linear response approximation*), peut s'appliquer, seules deux simulations se révèlent nécessaires au calcul de l'énergie libre : une sur l'état réduit et l'autre sur l'état oxydé, ce qui réduit considérablement le nombre de calculs requis. Cependant, cette hypothèse n'est pas toujours valable : par exemple dans le cas de sphère de solvation très différentes entre réactif et produit. Certains auteurs proposent alors une correction à l'ARL<sup>11</sup> ou de simuler un point intermédiaire,<sup>12</sup> permettant de prendre en compte un éventuel comportement non-linéaire au cours de la réaction.

### b. Simulations numériques

De nombreux outils de chimie théorique sont dédiés à la détermination de potentiel redox de molécules organiques en solution. Une première approche consiste à passer par un cycle thermodynamique et de déterminer les énergies de transfert en phase gazeuse au niveau quantique et les énergies de solvation des différentes espèces. Certains auteurs utilisent des dynamiques classiques pour évaluer cette énergie de solvation pour des transferts complets (deux protons et deux électrons) entre deux quinones<sup>13</sup> ou des transferts à un électron.<sup>14</sup> Les modèles de

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

continuum de solvants dans lesquels la géométrie des molécules est optimisée au niveau quantique sont également largement utilisés dans le cadre de calculs de potentiels redox de quinones en solvants isotropes.<sup>15-18</sup> Ils permettent d'évaluer les énergies de solvatations avec une certaine précision pour un coût minime : les résultats obtenus pour des molécules de la famille des quinones correspondent aux données expérimentales avec une erreur allant de 0,1 à 0,3 eV. Un large éventail de systèmes peut être étudié rapidement, ce qui permet d'obtenir une courbe de calibration pour prédire d'autres potentiels ou bien de voir l'influence des différents groupes et de leur position sur le potentiel redox. Toutefois, ces méthodes de solvants implicites présentent certains défauts : en s'appuyant sur des optimisations de géométries, elles ne prennent pas en compte explicitement la dynamique du soluté ni du solvant, or une modification de la charge du système peut entraîner des comportements dynamiques différents, en particulier en milieu protéique où l'environnement présente une forte hétérogénéité et une grande anisotropie.

Une autre voie consiste donc à employer des simulations de dynamiques moléculaires. Par exemple, Cheng *et al* ont obtenu les énergies libres des différentes demi-réactions redox ou acido-basique de la benzoquinone dans l'eau *via* des simulations de dynamiques *ab initio* (DFT).<sup>12</sup> Cette méthode convient tout à fait à de petits systèmes en solution où l'échantillonnage des géométries se fait en quelques picosecondes. En revanche, étant donné les performances des moyens de calcul actuels, elle demeure inadaptée à des systèmes de tailles importantes et/ou dont les déplacements s'effectuent sur des échelles de temps relativement lentes (au-delà de quelques dizaines de ps).

Dans le contexte de systèmes protéiques, qui peuvent contenir plus d'une centaine de milliers d'atomes, les modélisations multiéchelles<sup>19</sup> constituent une méthode de choix puisqu'elles autorisent la prise en compte de l'ensemble de l'environnement sur diverses échelles de temps et de l'aspect quantique du transfert d'électron. De nombreuses méthodologies QM/MM ont été développées depuis une trentaine d'années pour l'évaluation des potentiels redox et des pKa d'espèces en solution et en milieu biologique.<sup>20</sup>

Récemment, Yang et son équipe ont développé une méthode alliant théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) et calculs classiques dédiée au calcul de potentiel redox par perturbation thermodynamique.<sup>10,21,22</sup> Ils proposent de modifier progressivement la charge de la partie quantique dans des fenêtres successives en imposant un nombre fractionnaire d'électron. Afin de diminuer le temps de calcul, ils ont mis au point un algorithme alternant optimisations au

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

niveau quantique et dynamiques classiques en figeant respectivement la partie MM et la partie QM jusqu'à la convergence. Ils déterminent ainsi le potentiel de force moyenne (PFM) associé au départ de l'électron pour le lumichrome et la riboflavine en solution. Ils obtiennent ainsi un très bon accord expérience/théorie pour la différence d'enthalpie libre entre les deux espèces. Dans le but de réaliser une courbe de calibration, une bonne précision des grandeurs thermodynamiques relatives nous intéresse plus qu'une précision des données absolues. Cette méthode semble donc un bon candidat pour l'évaluation des potentiels redox en solution. Toutefois, malgré les améliorations proposées pour réduire le temps de calcul, elle demeure relativement coûteuse et ne peut être transférée au cas de la protéine MADH et de son complexe avec l'amicyanine du fait de la taille trop importante du système. Par ailleurs, les données expérimentales obtenues à pH 7 sur les modèles de cofacteurs quinones comprennent deux transferts d'électrons et deux transferts de protons. L'idéal étant d'évaluer les énergies d'oxydation et de déprotonation au même niveau de théorie, utiliser cette méthodologie implique la réalisation de quatre calculs au niveau DFT/MM par molécule, ce qui devient extrêmement coûteux. Bien qu'attrayante d'un point de vue calcul de potentiel redox en solution, cette méthode n'a pu être retenue dans l'optique de la réalisation de la courbe de calibration et de calcul en milieu biologique.

Les méthodes semi-empiriques, moins coûteuses que les méthodes DFT, sont pour leur part employées dans le cadre de simulations QM/MM dans des systèmes protéiques. Elles permettent d'atteindre aisément des échelles de temps allant de plusieurs centaines de picosecondes à quelques nanosecondes. Parmi celles-ci se trouve la méthode *Self-Consistent Charge Density Functional Tight Binding* (SCC-DFTB) développée en 1998<sup>23</sup> dont une interface QM/MM a été implémentée dans CHARMM<sup>24</sup> peu de temps après.<sup>25</sup> Son implémentation pour des calculs QM/MM suit un schéma additif de calcul de l'énergie totale. Des versions récentes de ce module SCC-DFTB/MM permettent de prendre en compte dans le calcul quantique la dispersion,<sup>26</sup> les améliorations de la SCC-DFTB concernant les liaisons X-H<sup>27</sup> et une extension au troisième ordre de l'énergie totale DFT,<sup>28</sup> ainsi que la détermination des interactions coulombiennes par une méthode de type Ewald.<sup>29</sup> Des méthodes de calculs de potentiel redox<sup>30</sup> et de pKa<sup>31</sup> par perturbation thermodynamique ont également été implémentées dans ce module du programme CHARMM. De plus, des potentiels redox à deux protons-deux électrons de flavines solvatées ou en milieu protéique ont été calculés en SCC-DFTB/MM.<sup>32,33</sup>

## *II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH*

Une alternative consiste à associer de façon séquentielle des calculs d'énergie quantiques et des simulations classiques. Ces dernières permettent d'obtenir des dynamiques de plusieurs dizaines de nanosecondes en quelques jours et autorisent donc un plus large échantillonnage des configurations que les méthodologies calculant les contributions QM et MM à chaque pas de dynamique. Toutefois, les aspects électroniques du système ne sont évidemment pas décrits par un champ de force traitant les atomes comme des particules classiques. Afin de simuler l'oxydation du cofacteur, il est nécessaire de connaître son énergie d'ionisation au niveau quantique. Ce calcul peut s'effectuer en phase gazeuse, par des optimisations de géométrie sur chaque espèce impliquée dans la réaction. Dans ce cas, les variations de l'énergie dues à la dynamique du soluté dans son environnement ne sont pas prises en compte. La méthode est alors notée QM+MM. Une autre possibilité revient à évaluer l'énergie d'ionisation à un niveau QM/MM sur un échantillonnage de géométries issues des dynamiques classiques, ce qui requiert plus de calculs sans toutefois devenir prohibitif. Cette seconde option est désignée comme une méthode QM/MM. Pour l'évaluation de grandeurs thermodynamiques telles que les potentiels redox ou les pKa, seule la valeur moyenne de l'énergie libre (ou de l'enthalpie libre) importe. Si l'énergie d'ionisation moyenne en phase condensée est proche de la valeur obtenue en phase gazeuse, son évaluation ne s'avère pas nécessaire, d'autant qu'elle suppose tout de même que l'échantillonnage classique des conformations équivaut à un échantillonnage quantique. Une comparaison de ces méthodes QM+MM et QM/MM a été effectuée dans l'équipe de Blumberger<sup>34</sup> pour le calcul du transfert d'électron interne dans le cytochrome *c*. Les résultats montrent que la contribution interne ne varie que de 0,1 eV d'une méthode à l'autre. Nous avons donc décidé dans un premier temps d'employer une méthode de type QM+MM afin de limiter la quantité de calculs quantiques. La réalisation de dynamiques purement classiques sous-tend l'utilisation d'un champ de force adapté : si les paramètres pour différents solvants et pour de nombreuses molécules biologiques sont présents dans la littérature, ils doivent être calibrés pour des molécules moins fréquentes comme les cofacteurs quinones étudiés ici.

Une première étape consiste donc à tester les différentes méthodes que nous avons sélectionnées : SCC-DFTB/MM ou bien QM+MM avec évaluation des énergies QM au niveau DFT sur des optimisations de géométries en phase gazeuse.

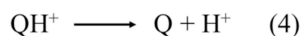
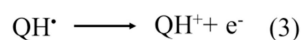
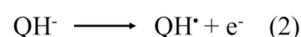
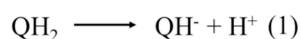


## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

D'un point de vue coût et temps de calcul, l'ARL est préférable, surtout dans l'objectif de simulations au sein de la protéine MADH. De même, des dynamiques MM des systèmes protéiques permettent un meilleur échantillonnage des conformations. Il est donc tentant d'utiliser ces méthodes pour des calculs de potentiel redox en milieu biologique. Il convient alors de s'assurer de la pertinence des résultats obtenus avec ces méthodes en les comparant avec des données plus précises et de les calibrer sur une gamme de molécules.

### 3. Application au TTQ, comparaison des méthodes

Le potentiel redox mesuré à pH neutre pour les molécules quinones correspond à l'oxydation complète de la fonction quinole (les deux atomes d'oxygène étant protonés), en deux fonctions cétone, équivalente aux départs de deux protons et de deux électrons. Comme l'ordre des étapes n'influe pas sur la valeur du potentiel redox, nous avons décidé de les étudier dans l'ordre indiqué dans le Schéma 1 où Q représente la molécule quinone :



**Schéma 1 : séquence d'étapes étudiées pour l'oxydation complète de la quinole QH<sub>2</sub> en quinone Q.**

Cet ordre ne correspond pas à celui observé expérimentalement, pour lequel le départ du second proton intervient au niveau de la quinone semi réduite QH<sup>•</sup> que ce soit en solution ou au sein de la protéine. Notre objectif principal étant l'étude de l'oxydation de l'étape (2) dans la protéine, notre intérêt se porte principalement sur les étapes de transfert d'électron sur lesquelles nous avons testé différentes méthodes. Les demi-équations acido-basiques sont cependant nécessaires à l'obtention du potentiel redox total en milieu aqueux et sont prises en compte par la suite.

Afin de choisir notre méthode de calcul, nous avons évalué les énergies libres d'oxydation du TTQ, soit le passage de TTQH<sup>-</sup> à TTQH<sup>•</sup> puis à TTQH<sup>++</sup> (Figure 5), de diverses manières : en utilisant l'ARL ou bien des méthodes de perturbations thermodynamiques (PT) aux niveaux QM/MM et QM+MM. Dans un premier temps, les différentes formes du TTQ sont étudiées au niveau DFT afin i) de s'assurer de la validité de la SCC-DFTB dans la modélisation du TTQ ; ii) de calculer la contribution interne des calculs QM+MM ; iii) de calibrer un champ de force pour

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

le TTQ. Par la suite, les résultats quant au calcul de l'énergie libre d'oxydation sont comparés afin de déterminer la méthode assurant un équilibre adéquat entre précision et coût de calcul. Cette dernière pourra être étendue au calcul des énergies libres de déprotonation et au potentiel redox des autres quinones.

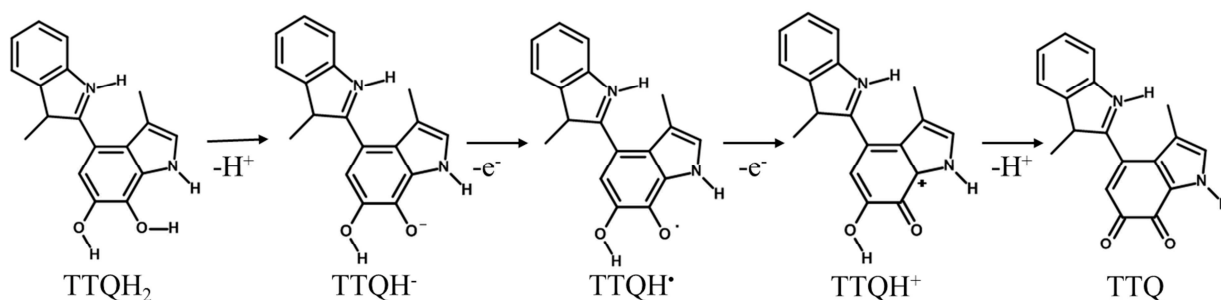


Figure 5 : différents états de protonation et d'oxydation du TTQ et les transformations étudiées (Schéma 1). Dans cette partie, nous nous intéresserons principalement aux départs d'électron.

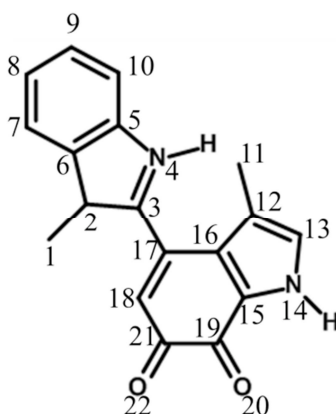


Figure 6 : numérotation des atomes lourds du TTQ. Par la suite, le O20 sera noté  $O_p$  (position en *para* du second tryptophane) et le O22,  $O_m$  (position en *méta* du second tryptophane).

### a. Etude quantique en phase gazeuse

Nous avons tout d'abord caractérisé le TTQ en phase gazeuse pour ses différents états redox et de protonation, à savoir : réduit et doublement protoné  $TTQH_2$ , réduit et protoné une fois  $TTQH^-$ , semi-réduit et protoné une fois  $TTQH^\bullet$ , oxydé et protoné une fois  $TTQH^+$  et oxydé déprotoné TTQ (Figure 5). Les géométries ont été optimisées sur chaque état en utilisant dans le programme deMon2K<sup>35</sup> une fonctionnelle d'échange corrélation revPBE<sup>36</sup>LYP<sup>37</sup> et une base DZVP-GGA<sup>38</sup> dans laquelle des orbitales p diffuses ont été ajoutées pour les atomes possédant au moins une paire libre (O, N et S). La dispersion est incluse dans les calculs.<sup>39</sup> Afin d'évaluer les

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

différences énergétiques entre les différents états, et de fait, la contribution interne  $\Delta E_{int}$  à l'énergie libre par la méthode QM+MM, nous avons appliqué l'équation 8 qui consiste à calculer la moyenne des écarts d'énergie potentielle sur les géométries optimisées dans chaque état impliqué dans le mécanisme considéré :

$$\Delta E_{int} = \frac{1}{2}((E_f - E_i)_i + (E_f - E_i)_f) \quad 8$$

Les parenthèses indiquent la géométrie optimisée pour l'état avant (*i*) ou après (*f*) transfert de proton ou d'électron, à partir de laquelle est calculée la différence d'énergie. L'énergie de point zéro (ZPE) est prise en compte pour chaque valeur d'énergie considérée. Nous obtenons alors les valeurs présentées dans le Tableau 1 qui donne également les valeurs obtenues en utilisant la SCC-DFTB du programme DFTB+<sup>40</sup> pour optimiser les molécules *via* le programme cuby<sup>41</sup> en prenant en compte la dispersion (la ZPE n'a en revanche pas été déterminée au niveau SCC-DFTB). Regardons dans un premier temps les énergies associées aux demi-équations redox : l'espèce réduite est la plus stable mais la première oxydation se fait plus facilement que la seconde. De plus, les résultats DFTB et DFT sont similaires avec moins de 0,3 eV d'écart entre les deux. Les énergies de déprotonation sont beaucoup plus importantes en valeur absolue au niveau DFT. En revanche, les énergies DFTB ne reproduisent pas ces résultats DFT, soulignant certainement une faiblesse de cette dernière dans le calcul de l'énergie associée à la disparition du proton. Si la DFTB semble donner de bons résultats pour les étapes d'oxydation, le traitement des réactions acide-base requiert plus d'attention et d'éventuelles corrections.

	TTQH <sub>2</sub> /TTQH <sup>-</sup>	TTQH <sup>-</sup> /TTQH <sup>-</sup>	TTQH <sup>+</sup> /TTQH <sup>-</sup>	TTQH <sup>+</sup> /TTQ
<b>DFT (eV)</b>	14,03	1,94	5,94	10,32
<b>DFTB (eV)</b>	8,89	2,10	6,21	4,18

**Tableau 1: contributions internes en eV aux énergies de déprotonation ou d'oxydation du TTQ calculées à partir de l'équation 8 sur les géométries optimisées en DFT et SCC-DFTB.**

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à des spécificités structurales du TTQ, en particulier au niveau de la fonction quinone et de la liaison entre les deux groupements indole. En effet, les changements d'états de protonation et de charge modifient les fonctions liées aux atomes d'oxygène : d'alcool dans le TTQH<sub>2</sub> ils deviennent cétones dans TTQ, ce qui a un impact sur les longueurs de liaisons CO, qui de simples deviennent doubles, et sur la délocalisation des électrons du système  $\pi$  (Tableau 2). Concernant les liaisons covalentes, les résultats DFT et DFTB sont très proches, mais ils diffèrent davantage pour les valeurs de l'angle

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

dièdre : suivant la méthode choisie pour l'optimisation de géométrie, l'angle dièdre pour un état peut varier de 3 à 11,4°. Néanmoins, entre les différents états du TTQ, l'évolution de l'angle dièdre optimal est sensiblement la même aux niveaux DFT ou DFTB. La DFTB reproduit correctement l'influence de l'état de la molécule sur sa géométrie.

		TTQH <sub>2</sub>	TTQH <sup>-</sup>	TTQH <sup>•</sup>	TTQH <sup>+</sup>	TTQ
C-O <sub>p</sub>	DFT	1,40	1,31	1,28	1,26	1,25
	DFTB	1,39	1,29	1,26	1,23	1,22
C-O <sub>m</sub>	DFT	1,41	1,40	1,37	1,34	1,25
	DFTB	1,40	1,41	1,36	1,32	1,22
C-C	DFT	1,49	1,47	1,47	1,44	1,48
	DFTB	1,47	1,45	1,45	1,43	1,46
φ	DFT	134,2	149,8	146,1	154,9	136,1
	DFTB	127,2	138,4	139,0	150,7	133,1

Tableau 2 : distances en Å des liaisons C-O et de la liaison inter-cycle C3-C17 (numérotation en Figure 6) et angle dièdre φ en degré (angle entre les atomes 2-3-17-16) entre les deux groupes indoles observés dans les géométries optimisées au niveau DFT et SCC-DFTB pour les différents états du TTQ.

Il apparaît alors que la liaison entre les deux tryptophanes intervient dans l'aromaticité de la molécule comme le montre certaines formes mésomères (Figure 7) et l'étude des orbitales atomiques (Figure 8). Le caractère aromatique de cette liaison C-C induirait une planéité entre les deux cycles. Cependant, la répulsion stérique entre les groupements méthyles et amine est au contraire minimale lorsque les cycles indoles sont perpendiculaires. L'angle dièdre autour de cette liaison résulte donc d'une compétition entre deux effets : l'aromaticité de la liaison et la gêne stérique entre les deux tryptophanes (Tableau 2). Par conséquent, plus la délocalisation du système π sur l'ensemble de la molécule se renforce, plus ce dièdre se rapproche de 0° ou 180°, puisque la répulsion stérique demeure inchangée sur chaque état. Ce phénomène a déjà fait l'objet d'études dans la littérature.<sup>42</sup>

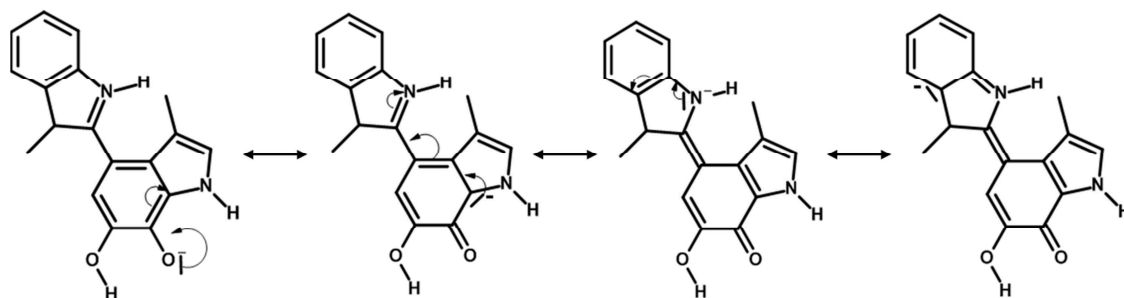
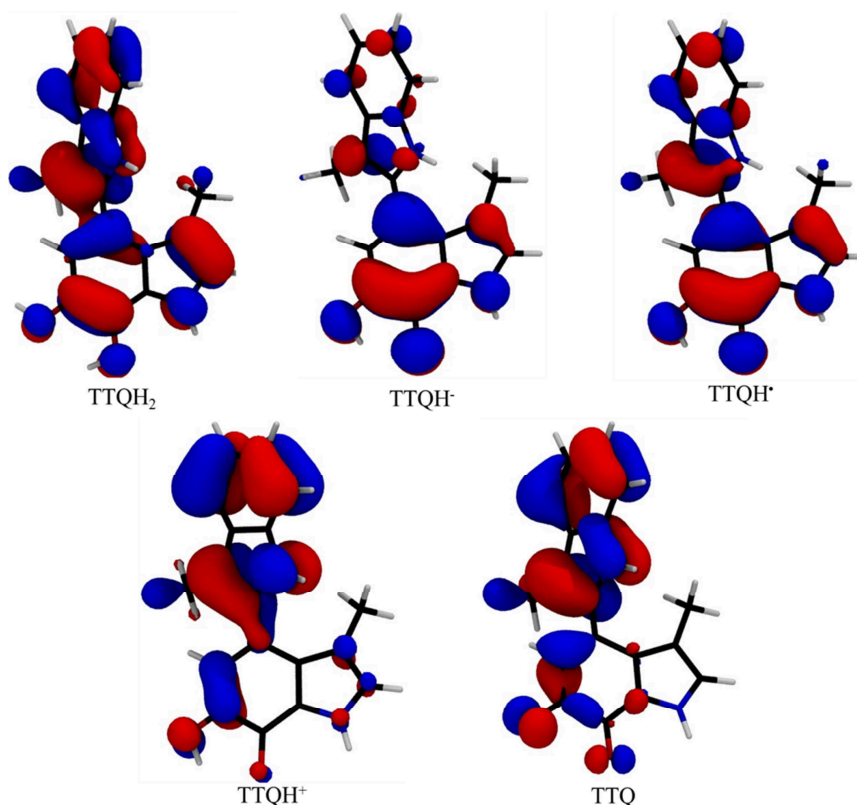


Figure 7 : exemples de formes mésomères du TTQH<sup>•</sup> pouvant impliquer les deux cycles indoles et soulignant le caractère aromatique de la liaison entre les deux tryptophanes.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH



**Figure 8** : représentation de l'orbitale la plus haute occupée (HO) calculée en DFT pour les différentes formes du TTQ. Les formes réduites et semi-réduites possèdent la même HO (partiellement occupée pour la forme TTQH<sup>•</sup>) délocalisée sur l'ensemble du système  $\pi$  du TTQ. La HO des formes oxydées TTQH<sup>+</sup> et TTQ se délocalise principalement sur le tryptophane non modifié et autour de la fonction quinone.

Afin de mieux comprendre cette compétition dans les différents états du TTQ, nous avons déterminé le profil énergétique de la rotation autour de cette liaison par la méthode *Nudged Elastic Band* (NEB).<sup>43-45</sup> Cette dernière optimise un chemin d'énergie potentielle minimale entre un réactif et un produit. Les points sont reliés par une force élastique qui assure la continuité du chemin et permet de conserver une certaine distance entre ceux-ci le long de la coordonnée de réaction. La projection de cette force et de celle dérivant de l'énergie permet d'éviter deux écueils : le fait que la minimisation des géométries retire les points des zones de haute énergie et donc de la barrière et l'effet segmenté du chemin dû à la force élastique reliant les points. Le programme cuby permet de réaliser le NEB de la rotation de 360° dans lequel les points sont optimisés au niveau quantique par le programme deMon2k.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

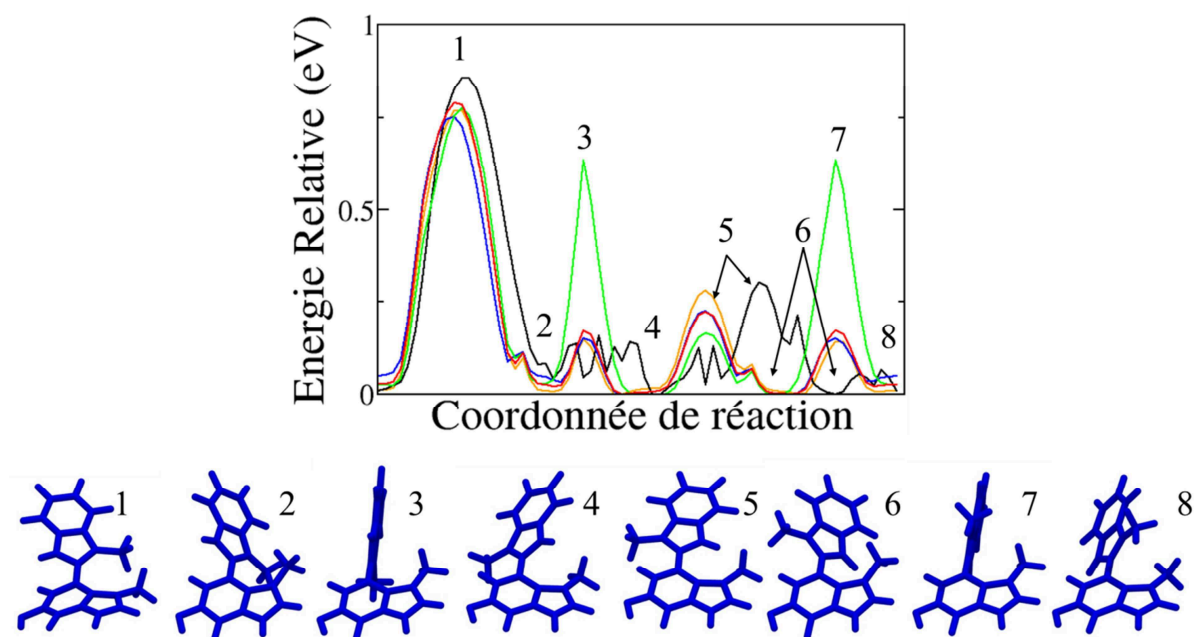


Figure 9 : NEB de la rotation autour de la liaison entre les deux cycles indoles du TTQ au niveau DFT dans les différents états  $\text{TTQH}_2$  (noir),  $\text{TTQH}^-$  (bleu),  $\text{TTQH}^+$  (rouge),  $\text{TTQH}^+$  (vert) et  $\text{TTQ}$  (orange). Le NEB de la forme  $\text{TTQH}_2$  est décalé par rapport aux autres et l'optimisation de ce chemin ne parvient pas à diminuer les fluctuations de 0,1 eV entre les conformations parallèles 1 et 5.

Qualitativement, les profils représentés dans la Figure 9 se ressemblent : les configurations parallèles (1 et 5) correspondent à des maxima à cause de la répulsion stérique entre le groupement méthyle du tryptophilquinone et l'amine ou le méthyle du second tryptophane, la rencontre des deux méthyles engendrant une barrière particulièrement importante. Les géométries perpendiculaires (3 et 7) constituent des maxima locaux du profil à cause de la perte de délocalisation électronique entre les deux cycles dans ces conformations. La hauteur relative des barrières et leur largeur dépendent quant à elles de l'état d'oxydation et de protonation. Lorsque le TTQ est totalement protoné ( $\text{TTQH}_2$ , noir), la délocalisation reste assez faible, et les conformations perpendiculaires ne sont pas fortement déstabilisées. Les espèces  $\text{TTQH}^-$ ,  $\text{TTQH}^+$  et  $\text{TTQ}$  présentent un profil similaire, bien que la délocalisation sur la forme totalement déprotonée ( $\text{TTQ}$ , orange) apparaisse légèrement plus faible du fait d'un angle dièdre optimal plus proche de  $90^\circ$  et d'une barrière plus importante de 0,05 eV au niveau de la conformation plane 5. Dans ces trois états, les conformations perpendiculaires sont moins déstabilisées que les planaires. Au contraire, pour la forme  $\text{TTQH}^+$ , cette tendance s'inverse : outre un dièdre optimal plus proche de  $180^\circ$ , les maxima des conformations perpendiculaires atteignent une quinzaine de kcal/mol ce qui rend impossible toute rotation autour de ces

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

géométries. En revanche, la rotation passant par une molécule plane où l'amine rencontre le méthyle est possible. La délocalisation de la charge positive est donc nettement plus forte que celle du radical ou de la charge négative. Les atomes d'oxygène, du fait de leur caractère électro-négatif fort, ont tendance à conserver la charge négative ou l'électron célibataire, qui ne sont alors que partiellement délocalisés sur l'ensemble de la molécule, mais également à récupérer les électrons du cycle aromatique voisin s'ils se trouvent en défaut d'électron, d'où par ailleurs l'évolution des distances de liaisons C-O qui acquièrent un caractère double. Une délocalisation de la charge stabilise d'autant plus le cycle qu'elle s'effectue sur un plus grand nombre d'atomes, induisant le caractère aromatique renforcé de la liaison inter-indole pour le TTQH<sup>+</sup> où la charge est principalement portée par les cycles. La géométrie influe donc sur la contribution interne du TTQ au potentiel redox : suivant l'angle dièdre, le départ de l'électron ou du proton est plus ou moins facilité car la stabilisation de la charge par l'aromaticité du cycle est modifiée. Ce problème pourra se retrouver au sein de la protéine où l'environnement impose une contrainte sur la valeur de cet angle (toutefois proche de la conformation optimale dans la structure cristallographique).

La présence d'un groupement à la fois donneur et attracteur d'électrons sur le même cycle que le groupement quinone influence le comportement de la molécule. La localisation de l'hydrogène sur l'un ou l'autre des atomes d'oxygène dépend également des groupements du cycle benzénique. Ainsi, dans le cas du TTQ, il semble plus favorable de déprotoner l'atome d'oxygène en *para* du tryptophane et en *ortho* de l'atome d'azote du pyrrole du tryptophylquinone. Des études théoriques de quinones en *ortho* ou *para* ont montré que des effets inductifs des groupements voisins peuvent influencer l'affinité entre les différents atomes d'oxygène de la fonction quinone et un ion hydrure.<sup>17,46</sup> En particulier, un groupement amine, inductif attracteur, positionné en *ortho* d'un atome d'oxygène rend plus difficile la réaction entre ce dernier et l'hydrure.

En outre, ce proton voit sa position favorable dépendre de la charge : soit il interagit avec l'oxygène déprotoné (TTQH<sup>-</sup>) soit il se tourne vers l'extérieur du groupement quinone (TTQH<sup>•</sup>, TTQH<sup>+</sup>). La charge négative le maintient donc en interaction hydrogène avec l'oxygène, ce qui peut conduire à un transfert de proton d'un oxygène à l'autre. Si l'oxygène déprotoné perd des électrons, il attire ceux des paires libres de l'oxygène voisin et non plus le proton. En solution

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

polaire ou dans la protéine cette organisation peut être modifiée par les interactions entre le proton et l'environnement.

La rotation entre les deux tryptophanes a également été étudiée au niveau semi-empirique : par des calculs SCC-DFTB (programme DFTB+) et PM6-DH2<sup>47,48</sup> (*Parameterized Model number 6* incluant des corrections pour la dispersion D et les liaisons hydrogène H, dans le programme MOPAC).<sup>49</sup> Les profils représentés dans la Figure 10 montrent que la SCC-DFTB reproduit correctement les résultats DFT, soit le caractère aromatique partiel de la liaison entre les tryptophanes et son influence sur la géométrie de la molécule (voir aussi le Tableau 2). En revanche, la méthode PM6 donne comme minimales les conformations perpendiculaires (3 et 7). Elle ne rend pas correctement compte de la compétition entre gêne stérique et délocalisation électronique.

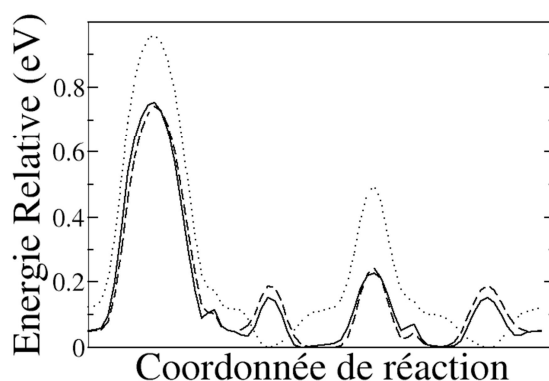


Figure 10 : NEB de la rotation autour de la liaison entre les deux cycles indoles du TTQ à l'état semi-réduit au niveau DFT (trait plein), SCC-DFTB (tirets) et PM6 (pointillés).

Ce résultat nous conforte dans l'utilisation de dynamiques SCC-DFTB/MM dans l'étude des cofacteurs quinones et rappelle que le choix d'une méthode semi-empirique, tout comme finalement celui d'une méthode *ab initio*, dépend des caractéristiques du système étudié.

### b. Calibration du champ de force

Cette correspondance entre les résultats SCC-DFTB et DFT nous autorise par ailleurs à considérer des dynamiques au niveau semi-empiriques en phase gazeuse, peu coûteuses, pour la calibration des paramètres du champ de force, en complément des optimisations de géométries en DFT. Des dynamiques de 1 ns pour chaque état du TTQ ont été réalisées par le programme cuby interfacé avec DFTB+ en utilisant un thermostat de type Nose-Hoover. Ces simulations apportent des informations quant aux fluctuations des valeurs de distances et d'angles de liaison autour des positions d'équilibre.



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

Le champ de force doit reproduire d'une part les caractéristiques structurales observées précédemment et d'autre part la répartition de la densité électronique au travers du calcul des charges atomiques. Le champ de force CHARMM27<sup>50,51</sup> contient des paramètres pour l'acide aminé tryptophane, repris pour une grande part dans le champ de force du TTQ. Le passage du CH<sub>2</sub> liant le squelette à la chaîne latérale du tryptophane à un groupement méthyle se fait en modifiant le type d'atome et en s'inspirant de données sur des méthyles dans le champ de force CHARMM27 pour les paramètres d'angle et de torsion. L'ajout des atomes d'oxygène du groupement quinone et de la liaison C-C entre les cycles implique toutefois plusieurs autres modifications. Les atomes d'oxygène n'étant pas équivalents vis-à-vis de la protonation et la distance C-O variant selon la charge, deux nouveaux types d'atomes ont été créés, permettant ainsi de modifier pour chaque état de la fonction quinone les paramètres géométriques sans interférer avec les autres liaisons C-O éventuelles. Les paramètres d'angle et de torsion correspondent à ceux décrits pour des cycles aromatiques (Tyrosine par exemple). La valeur d'équilibre de la distance C-O est celle obtenue pour les optimisations DFT tandis que la constante de force est calibrée afin de reproduire les fluctuations obtenues sur des dynamiques SCC-DFTB.

Les deux carbones impliqués dans la liaison inter-indole correspondent à des carbones aromatiques dans le champ de force CHARMM27. Afin de modifier cette distance sans toucher aux autres liaisons aromatiques, deux contraintes harmoniques sont imposées spécifiquement, la première visant à annuler la force due aux paramètres originels, la seconde imposant une nouvelle contrainte, adaptable à chaque état étudié et s'appuyant, tout comme pour les liaisons C-O, sur les données quantiques en phase gazeuse.

Pour les angles et les torsions, les paramètres sont absents du champ de force CHARMM27 originel. D'une part, les paramètres des angles sont choisis de manière à reproduire au mieux la valeur optimisée en DFT et les fluctuations obtenues sur les dynamiques SCC-DFTB. D'autre part, sans consigne particulière, les conformations perpendiculaires sont largement stabilisées par les forces classiques car elles minimisent la gêne stérique due aux forces de Van der Waals. Il faut alors déterminer des paramètres de torsion permettant de reproduire les effets quantiques venant contrer cette répulsion classique. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur les profils énergétiques NEB de la rotation des deux indoles pour l'obtention d'un jeu de paramètres, qui doit par la suite également reproduire les fluctuations de la torsion dans les

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

dynamiques SCC-DFTB en phase gazeuse. A partir du résultat obtenu sans paramètre sur le champ de force nous constatons qu'il nous faut d'une part réduire l'énergie des conformations parallèles tout en augmentant celle des géométries perpendiculaires et en maintenant des minima autour de 40° et 140°. La formule utilisée dans le champ de force CHARMM27 pour l'énergie  $E_\phi$  associée aux angles dièdres est :

$$E_\phi = k (1 + \cos(n\phi - \delta)) \quad 9$$

où  $k$  est la constante de force,  $n$  la multiplicité et  $\delta$  la phase. Une première combinaison de paramètres intervenant dans cette formule est obtenue pour l'ensemble des états. Elle ne prend toutefois pas en compte les spécificités de chaque forme du TTQ. Une correction spécifique est donc déterminée et ajoutée comme une contrainte, dont la formule est :

$$E_{\phi_{corr}} = k (1 - \cos(n\phi - \delta)) \quad 10$$

Commun			TTQH <sub>2</sub>			TTQH <sup>-</sup>			TTQH <sup>•</sup>			TTQH <sup>+</sup>			TTQ		
k	n	d	k	n	d	k	n	d	k	n	d	k	n	d	k	n	d
3,0	2	180	0,2	2	90	0,3	2	90	0,4	4	90	4,0	2	180	-	-	-
1,0	4	±40	0,8	4	0	0,4	4	0									

**Tableau 3 : paramètres pour l'angle dièdre entre les deux cycles indoles du TTQ présents pour chaque état (commun, utilisant la formule 9) ou spécifique à chacun (10). La constante de force  $k$  est donnée en kcal/mol et la phase  $\delta$  en degré (convertie en radian dans le programme). Ces paramètres s'appliquent à deux angles dièdres opposés (impliquant les atomes 2-3-17-16 et 4-3-17-18, Figure 6), la constante de force associée aux deux autres angles étant nulle.**

Ce jeu de paramètre reproduit correctement le profil énergétique DFT pour chaque état (Figure 11) dans sa majeure partie. Le maximum global est surestimé mais cette conformation plane (géométrie 1) n'est jamais visitée au niveau quantique. Par conséquent, cette erreur ne constitue pas un problème pour l'échantillonnage des géométries par des dynamiques classiques en solution. La comparaison des distributions des valeurs des angles dièdres échantillonnées lors de dynamiques moléculaires aux niveaux SCC-DFTB et classique en phase gazeuse confirme la capacité de notre champ de force à rendre compte de la compétition entre répulsion stérique et délocalisation électronique au sein du TTQ.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

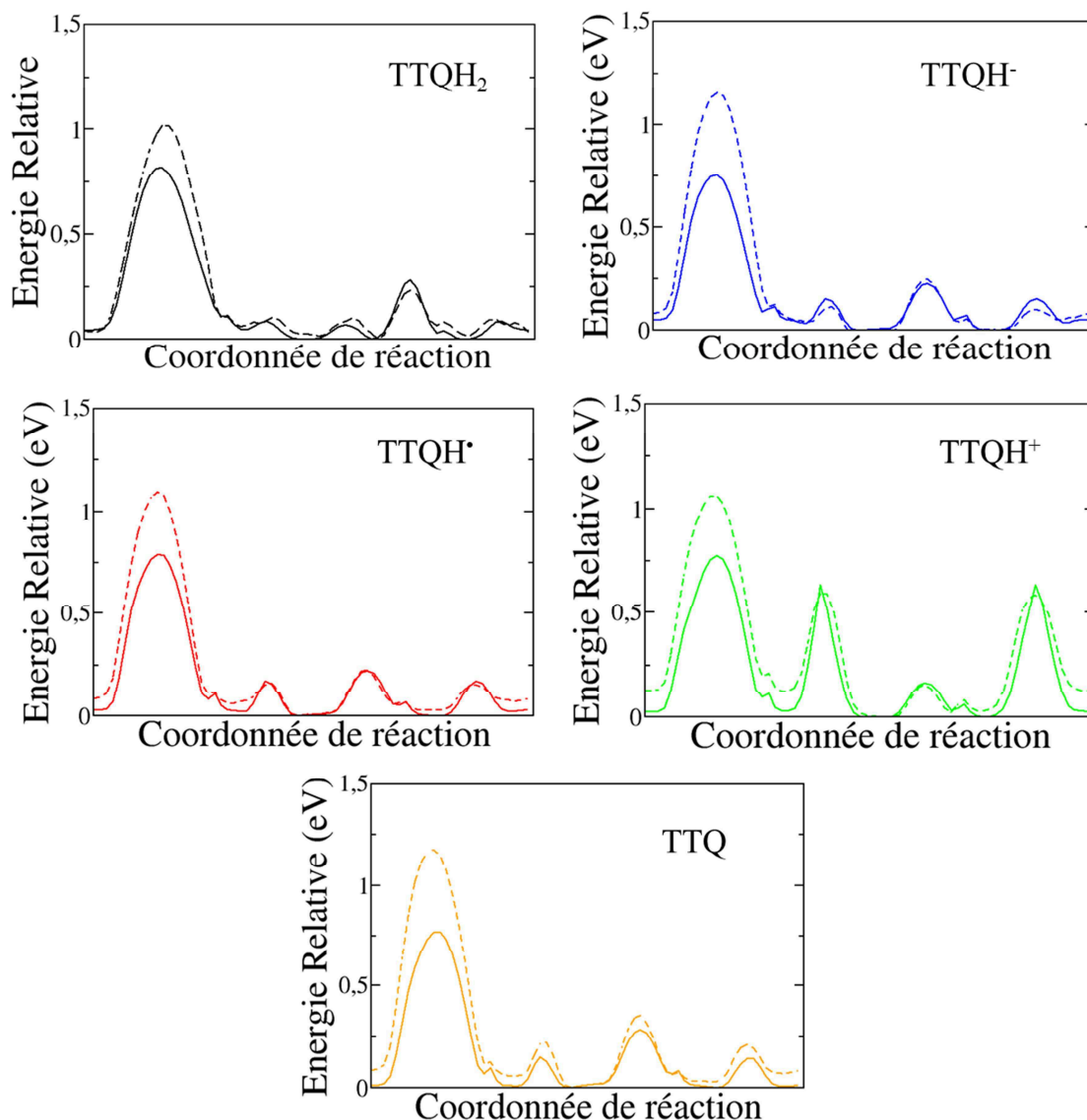


Figure 11 : NEB de la rotation autour de la liaison entre les deux cycles indoles du TTQ au niveau quantique (SCC-DFTB pour TTQH<sub>2</sub>, DFT pour les autres états) en trait plein et au niveau classique avec le champ de force calibré pour le TTQ en tirets. Noir : TTQH<sub>2</sub> ; bleu : TTQH<sup>-</sup> ; rouge : TTQH<sup>·</sup> ; vert : TTQH<sup>+</sup> ; orange : TTQ. Tout comme au niveau DFT, le chemin pour la forme TTQH<sub>2</sub> est décalé par rapport aux autres chemins.

Afin d'évaluer la contribution de l'environnement à l'énergie libre d'oxydation ou de déprotonation par le calcul des interactions coulombiennes avec l'environnement, les charges atomiques doivent être déterminées pour chaque état, d'autant plus qu'elles reflètent la répartition des électrons au sein de la molécule. De nombreuses méthodes de calculs des charges atomiques sont décrites dans la littérature et comparées du point de vue de leur stabilité vis-à-vis des méthodes utilisées et de la reproduction de données expérimentales. La méthode consistant à

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

paramétrer les charges sur le potentiel électrostatique (*electrostatic potential* ESP), apparaît comme l'une des plus couramment utilisées dans le calcul des charges atomiques dans les champs de force de première génération.

Récemment, la détermination des charges atomiques par une méthode itérative d'Hirshfeld (IH) a été décrite dans la littérature.<sup>52,53</sup> En principe, cette méthode fournit une répartition des charges atomiques utilisables dans un champ de force. Cette méthode reste pour l'instant peu utilisée et nous avons souhaité étudier sa pertinence dans nos simulations en comparant les résultats obtenus avec les jeux de charges IH et ESP.

Le potentiel électrostatique est calculé au niveau DFT sur une grille constituée de points distribués sur des sphères de rayons égaux à des multiples du rayon de Van der Waals de chaque atome (1,4 ; 1,6 ; 1,8 ; et 2,0) grâce à un algorithme de Conolly.<sup>54</sup> Ainsi, le calcul du potentiel s'appuie principalement sur les interactions interatomiques à moyenne distance (3 à 5 Å). Les charges ESP sont ajustées de manière à reproduire ce potentiel, ce qui est évalué directement par le calcul de la déviation à l'écart quadratique moyen relatif (*Relative Root Mean Square Deviation* RRMSD) et indirectement par la comparaison des moments dipolaires de la molécule obtenus au niveau quantique ou à partir des charges atomiques. Lors du calcul de ces dernières, nous avons contraint la charge totale de la molécule et imposé l'équivalence des charges des hydrogènes au sein de chaque groupement méthyle. La méthode IH est implémentée directement dans le programme deMon2k. Les RRMSD obtenus pour les charges IH proviennent d'un calcul semblable à celui des charges ESP mais pour lequel l'ensemble des charges atomiques sont égales aux valeurs de la méthode IH.

Le Tableau 4 recense les charges atomiques obtenues. Les deux jeux de charges sont assez similaires pour la plupart des atomes (Figure 12), sauf au niveau du cycle benzénique (ovale violet) de l'indole non-modifié (TRP) et autour de l'atome d'azote (ovale cyan) de la partie tryptophilquinone (TRPQ). Pour les carbones aromatiques 6 à 8, les écarts entre les charges ESP subissent des variations suivant l'état du TTQ (particulièrement importante sur l'état TTQH<sup>-</sup>) tandis que les charges IH demeurent relativement constantes, ce qui entraîne les écarts observés entre les deux méthodes. Les effets de la délocalisation se font plus ressentir sur certains atomes que sur d'autres dans le schéma ESP. La différence au niveau du pyrrole, quant à elle indépendante de la charge du TTQ, s'explique par une attribution différente de densité électronique : la somme des charges des atomes 13 à 15 est égale quelle que soit la méthode

## *II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH*

employée mais IH dépeuple les atomes de carbone au profit de l'atome d'azote tandis que ESP attribue plus de densité au carbone 13, ce qui semble chimiquement moins pertinent.

Cependant, dans tous les cas le RRMSD est du même ordre quelle que soit la méthode et le moment dipolaire est assez proche de celui calculé au niveau DFT. Le potentiel électrostatique et le moment dipolaire des espèces neutres sont toutefois moins bien reproduits que ceux des espèces chargées. Les différences d'attribution des électrons observées entre les deux schémas ne modifient donc pas le comportement de la molécule du point de vue du potentiel électrostatique, mais souligne la difficulté d'associer à un atome précis la densité électronique d'un cycle aromatique. La méthode IH apparaît donc comme un bon candidat pour la détermination des charges atomiques et une alternative au calcul du potentiel électrostatique. Par ailleurs, le calcul des charges sur chacun des tryptophanes souligne une certaine délocalisation de la charge, en particulier sur l'espèce  $\text{TTQH}^+$  pour laquelle la charge positive se trouve presque équitablement répartie sur les deux cycles. Pour le  $\text{TTQH}^-$ , un peu plus des trois quarts de la charge totale se situe sur le tryptophilquinone tandis que pour les espèces neutres, les charges de chaque indole sont proches de 0.

II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

atome	TTQH <sub>2</sub>		TTQH <sup>-</sup>		TTQH <sup>•</sup>		TTQH <sup>+</sup>		TTQ	
	ESP	IH	ESP	IH	ESP	IH	ESP	IH	ESP	IH
1	-0,37	-0,41	-0,48	-0,47	-0,43	-0,53	-0,51	-0,58	-0,38	-0,53
2	0,13	0,01	0,12	-0,02	0,12	0,08	0,19	0,19	0,12	0,08
3	-0,02	0,16	0,14	0,21	0,04	0,15	0,00	0,13	0,03	0,13
4	-0,53	-0,52	-0,65	-0,56	-0,53	-0,54	-0,47	-0,53	-0,56	-0,53
5	0,42	0,24	0,57	0,25	0,45	0,27	0,42	0,31	0,45	0,26
6	-0,13	-0,04	-0,24	-0,02	-0,12	-0,06	-0,10	-0,15	-0,12	-0,05
7	-0,09	-0,12	-0,09	-0,17	-0,12	-0,12	-0,08	-0,07	-0,12	-0,12
8	-0,28	-0,13	-0,33	-0,16	-0,27	-0,15	-0,23	-0,14	-0,28	-0,15
9	-0,38	-0,22	-0,51	-0,25	-0,45	-0,25	-0,39	-0,26	-0,45	-0,25
10	-0,05	-0,08	-0,06	-0,13	-0,02	-0,07	0,04	0,02	0,00	-0,07
11	-0,55	-0,43	-0,51	-0,49	-0,52	-0,53	-0,49	-0,57	-0,48	-0,54
12	0,26	0,08	0,25	0,07	0,28	0,13	0,25	0,18	0,27	0,14
13	-0,38	-0,02	-0,44	-0,09	-0,39	-0,06	-0,27	-0,02	-0,38	-0,04
14	-0,14	-0,43	-0,17	-0,43	-0,08	-0,38	-0,05	-0,33	-0,02	-0,35
15	-0,11	0,13	-0,11	-0,08	-0,14	0,08	-0,18	0,06	-0,21	0,04
16	-0,07	-0,09	-0,06	0,08	-0,10	-0,13	-0,09	-0,15	-0,09	-0,11
17	0,15	0,06	-0,04	-0,05	0,13	0,12	0,21	0,21	0,15	0,15
18	-0,42	-0,33	-0,44	-0,32	-0,44	-0,38	-0,38	-0,40	-0,44	-0,39
19	0,28	0,18	0,23	0,22	0,31	0,24	0,43	0,29	0,41	0,31
20 (O <sub>p</sub> )	-0,58	-0,56	-0,67	-0,65	-0,53	-0,50	-0,44	-0,40	-0,47	-0,42
21	0,20	0,26	0,31	0,23	0,33	0,32	0,29	0,37	0,53	0,40
22(O <sub>m</sub> )	-0,62	-0,61	-0,60	-0,60	-0,48	-0,52	-0,38	-0,45	-0,48	-0,41
TRP	-0,08	-0,03	-0,24	-0,22	0,05	0,07	0,47	0,42	0,06	0,07
TRPQ	0,09	0,03	-0,76	-0,78	-0,05	-0,07	0,53	0,50	-0,06	-0,07
RRMSD										
(%)	13,6	27,0	2,1	3,3	11,5	20,0	1,4	2,8	8,4	12,8
moment dipolaire (D)	2,18	1,74	11,62	11,61	4,35	4,40	3,60	3,60	7,97	7,73
		(2,05)		(11,64)		(4,15)		(3,59)		(7,88)

Tableau 4 : charges des atomes lourds du TTQ obtenues à partir du potentiel électrostatique (ESP) ou par la méthode d'Hirshfeld itérative (IH) et de chaque groupe indole du TTQ : le tryptophane non modifié (TRP) ou celui possédant la fonction quinone (TRPQ). Pour la numérotation des atomes, se référer à la Figure 6. Pour chaque jeu de charge, le RRMSD en % et le moment dipolaire en Debye sont reportés, le moment dipolaire calculé au niveau DFT est rappelé entre parenthèses.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

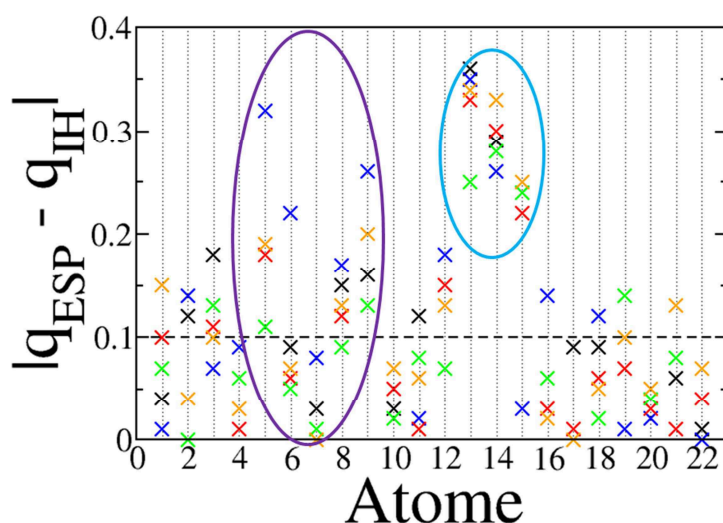


Figure 12 : différence en valeur absolue des charges atomiques sur chaque atome entre les deux jeux de charges envisagés, ajustées sur le potentiel électrostatique (ESP) ou calculées par la méthode d’Hirshfeld itérative (IH) pour chaque état du TTQ : TTQH<sub>2</sub> (noir) ; TTQH<sup>-</sup> (bleu) ; TTQH<sup>+</sup> (rouge) ; TTQH<sup>+</sup> (vert) ; TTQ (orange). Le cercle violet entoure les atomes du cycle benzénique de l’indole TRP et le cercle cyan les atomes C-N-C de l’indole TRPQ pour lesquels les différences entre les charges IH et ESP peuvent être importantes. Les charges des atomes d’hydrogène restent proches (moins de 0,1 de différence entre les deux jeux).

L’étude du TTQ en phase gazeuse nous a donc permis d’une part de valider le choix de la méthode SCC-DFTB pour les dynamiques QM/MM tant sur des aspects énergétiques que conformationnels et d’autre part de créer un champ de force adapté au TTQ, permettant de reproduire son potentiel électrostatique et les effets de la compétition entre délocalisation électronique et répulsion stérique entre les deux groupes indoles. Forts de ces résultats, nous avons effectué des simulations concernant l’oxydation en solution du TTQH<sup>-</sup> et du TTQH<sup>+</sup> afin de définir un protocole de calcul des potentiel redox nécessaire à l’élaboration de la courbe de calibration et à la détermination des propriétés redox du TTQ dynamiques dans la protéine.

### c. Etude des oxydations du TTQ en solution

Plusieurs méthodologies peuvent être testées pour le calcul de potentiel redox : QM/MM, QM+MM, emploi de l’approximation de la réponse linéaire ou nécessité de perturbation thermodynamique... Pour les comparer, seules les deux étapes élémentaires d’oxydation du TTQH<sup>-</sup> puis du TTQH<sup>+</sup> ont été étudiées dans un premier temps.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

Pour l'ensemble des dynamiques, la molécule de TTQ a été solvatée dans une boîte d'eau cubique de 40 Å de côté. Nous avons utilisé le modèle SPCF<sup>55</sup> (*flexible single point charge*) pour représenter les molécules d'eau. Des conditions périodiques sont imposées. Les interactions coulombiennes sont calculées à l'aide de la méthode d'Ewald pour les simulations QM/MM ou *Particle Mesh Ewald* (PME) dans les simulations classiques. Fondée sur le passage par un espace réciproque pour le calcul des interactions à longues distances, ces méthodes permettent de déterminer ces dernières de manière efficace sans requérir de *cutoffs* particulièrement important. Les simulations de dynamique moléculaire sont réalisées par le programme CHARMM dans l'ensemble NVT à 298 K grâce aux équations de Langevin, avec un pas de temps de 1 fs pour les dynamiques classiques ou de 0,5 fs au niveau QM/MM. Lors des calculs SCC-DFTB, la dispersion et des corrections au troisième ordre des liaisons X-H sont prises en compte.

Le calcul de l'énergie libre par l'approximation de la réponse linéaire requiert deux simulations, l'une sur l'état réduit et l'autre sur l'état oxydé. Après 500 ps d'équilibration, des dynamiques MM de 5 ns ou SCC-DFTB/MM de 1 ns sont réalisées sur les formes TTQH<sup>-</sup>, TTQH<sup>•</sup> et TTQH<sup>+</sup>. L'écart énergétique entre les deux états redox impliqués est calculé toutes les 10 ps. Seule la contribution électrostatique intervient dans cet écart pour les simulations classiques. Dans le cadre de perturbations thermodynamiques, les modules PERT et SCC-DFTB/MM du programme CHARMM ont été utilisées. La charge est progressivement diminuée de 0,1 électron sur 11 fenêtres de 500 ps (dont 100 ps d'équilibration) à 350 ps (dont 50 ps d'équilibration) pour les systèmes MM et QM/MM respectivement. Le tableau résume les résultats obtenus *via* ces différentes méthodes.

		TTQH <sup>-</sup> /TTQH <sup>•</sup>	TTQH <sup>•</sup> /TTQH <sup>+</sup>
<b>DFT</b>		1,94	5,94
	<b>ARL</b>		
	<b>ESP</b>	4,09	5,61
<b>QM+MM</b>			
	<b>IH</b>	4,00	5,68
	<b>PT</b>	4,08	5,65
	<b>ARL</b>	5,17	5,31
<b>QM/MM</b>			
	<b>PT</b>	5,20	5,33

**Tableau 5** : énergie libre d'oxydation  $\Delta F$  en eV obtenue pour les couples redox TTQH<sup>-</sup>/TTQH<sup>•</sup> et TTQH<sup>•</sup>/TTQH<sup>+</sup> aux niveaux QM+MM et QM/MM en appliquant l'approximation de la réponse linéaire (ARL) ou par perturbations thermodynamiques (PT). Pour le calcul classique, deux jeux de charges ont été étudiés : celui calculé sur le potentiel électrostatique (ESP) et le jeu Hirshfeld itératif (IH). Les énergies obtenues en phase gazeuse au niveau DFT sont rappelées dans la première ligne (en eV).



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

Les résultats QM+MM obtenus par ARL pour les deux jeux de charges ESP et IH sont similaires. Ceci confirme que les différences de charges atomiques locales observées sur le TTQ influent peu sur le calcul de  $\Delta F$ . Le modèle IH apparaît donc bien comme une bonne alternative à la méthode ESP. Nous l'avons utilisé dans la suite des calculs.

Par ailleurs, la détermination de l'énergie libre par ARL ou par perturbation thermodynamique donne des résultats équivalents (à 0,08 eV près) quel que soit le niveau de théorie envisagé. L'hypothèse de la réponse linéaire, qui implique que la réorganisation du système s'effectue linéairement lors de l'oxydation et donc l'absence de modification majeure entre les conformations de chaque état, est donc valide dans le cas du TTQ en solution. D'un point de vue coût de calcul, cette information se révèle particulièrement intéressante. Pour un temps de calcul équivalent à celui requis pour la perturbation thermodynamique, des simulations plus longues, et donc un meilleur échantillonnage conformationnel, peuvent être alors réalisés sur les états de charges entières (réduit ou oxydé) du système.

Ce résultat nous renseigne également sur la validité de la méthode QM+MM. En effet, dans cette méthode, la contribution interne résulte des calculs DFT en phase gazeuse sur la géométrie optimisée. Elle reste donc indépendante de l'échantillonnage des géométries du TTQ en solution. Le fait que les énergies libres ARL et PT QM+MM soient identiques souligne donc que l'environnement, répond de façon linéaire à la perte d'un électron mais ne permet pas de conclure sur le comportement interne du TTQ. La méthode QM/MM par contre, prend en compte cette contribution dans le calcul et la similitude entre les résultats ARL et PT indique que l'ensemble du système, dont le TTQ, réagit de façon linéaire. La réponse linéaire s'applique par conséquent tout autant sur les contributions internes et externes. Il n'apparaît pas nécessaire de prendre en compte les géométries du TTQ pour des charges intermédiaires afin de calculer le potentiel redox, la détermination de la contribution QM du TTQ par le calcul sur deux états uniquement est donc suffisante d'un point de vue interne au TTQ. Toutefois, les interactions avec le solvant peuvent modifier la structure géométrique et électronique du TTQ, ainsi que sa dynamique, ce qui demeure absent des calculs QM+MM.

Si nous comparons maintenant les résultats obtenus pour les deux niveaux de calculs, nous observons une différence d'énergie libre entre les résultats QM+MM et QM/MM allant de 0,4 eV pour le couple  $\text{TTQH}^+/\text{TTQH}^\bullet$  à 1,2 eV pour le couple  $\text{TTQH}^\bullet/\text{TTQH}^-$ . Bien que ces écarts soient importants, l'ordre relatif des énergies libres est le même dans les deux cas à savoir

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

que  $\Delta F(\text{TTQH}^+/\text{TTQH}^\bullet)$  est supérieure en valeur absolue à  $\Delta F(\text{TTQH}^\bullet/\text{TTQH}^-)$ . L'espèce la plus stable en solution est donc le TTQ réduit et la moins stable le TTQ oxydé protoné une fois. Toutefois, en comparant ces résultats avec ceux en phase gazeuse, nous constatons que le milieu aqueux stabilise davantage les formes chargées  $\text{TTQH}^-$  et  $\text{TTQH}^+$  (de 2,1 eV et 0,26 eV respectivement pour la méthode QM+MM et de 3,1 eV et 0,9 eV pour la méthode QM/MM). La différence entre phase gazeuse et phase aqueuse est plus prononcée dans les calculs SCC-DFTB.

L'environnement polaire stabilise donc les charges sur le cofacteur, en particulier la charge négative. Cet effet est plus prononcé dans les calculs QM/MM où la densité électronique du cofacteur peut être polarisée. A courte distance, le solvant se structure autour des groupes polaires du TTQ, en particulier autour de l'atome d'oxygène déprotoné  $O_p$ , comme le montre la Figure 13, qui représente les fonctions de distribution radiale de l'eau autour des atomes d'oxygène du soluté. Ainsi, lors des dynamiques QM/MM, nous pouvons observer un premier pic net à 2,5 Å environ dans la fonction de distribution radiale pour l'état réduit qui correspond à deux molécules d'eau. La deuxième sphère de solvation se situe au-delà de 4 Å. Un profil similaire est obtenu pour l'état semi-réduit au même niveau de théorie, à la différence que la première couche ne contient qu'environ 1,5 molécule d'eau. Autour de l'état oxydé, la couche de solvation est nettement moins bien structurée comme le souligne le comportement quasi-linéaire de l'intégrale de la fonction de distribution radiale. Au niveau classique, nous retrouvons qualitativement cette diminution de l'organisation du solvant mais avec moins de molécules d'eau autour de l'atome d'oxygène : une seule molécule en liaison avec l'oxygène dans le cas du  $\text{TTQH}^-$  à 3 Å et un peu plus de 0,5 dans le cas du  $\text{TTQH}^\bullet$ . Les molécules d'eau étant modélisées de la même manière dans toutes nos simulations, cette différence dans la couche de solvation montre que la densité électronique perçue sur cet atome d'oxygène au niveau QM/MM est plus importante que celle reflétée par la charge attribuée à l'atome classique dans les cas réduit et semi-réduit. L'utilisation d'un champ de force polarisable permettrait de modifier la charge atomique de cet atome et de mieux reproduire les résultats QM/MM. Dans le cas de l'oxygène protoné  $O_m$ , le comportement de la couche de solvation ne présente guère de différence selon l'état étudié ou la méthode utilisée. Les molécules d'eau interagissant dans ce cas plutôt en temps qu'accepteur de liaison hydrogène, ceci signifie que la charge du proton hydroxyle reste semblable dans l'eau à celle obtenue en phase gazeuse.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

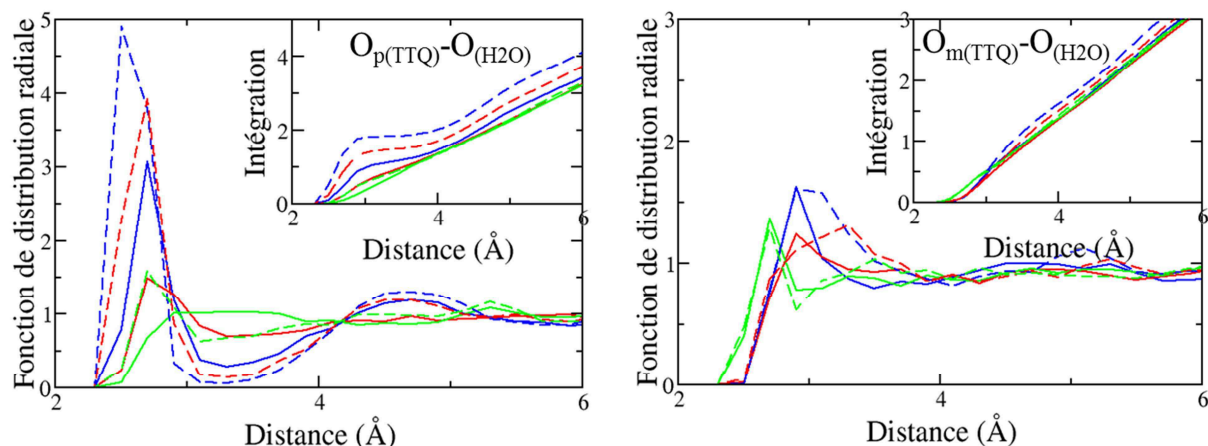


Figure 13 : fonctions de distributions radiales des atomes d'oxygène des molécules d'eau autour de ceux du TTQ ( $O_p$  à gauche et  $O_m$  à droite) pour les simulations de dynamiques moléculaires au niveau classique (traits pleins) ou QM/MM (tirets). L'intégration de cette fonction est donnée en encart en haut à droite de chaque graphe. Bleu :  $TTQH^\bullet$  ; rouge :  $TTQH^\bullet$  ; vert :  $TTQH^+$ .

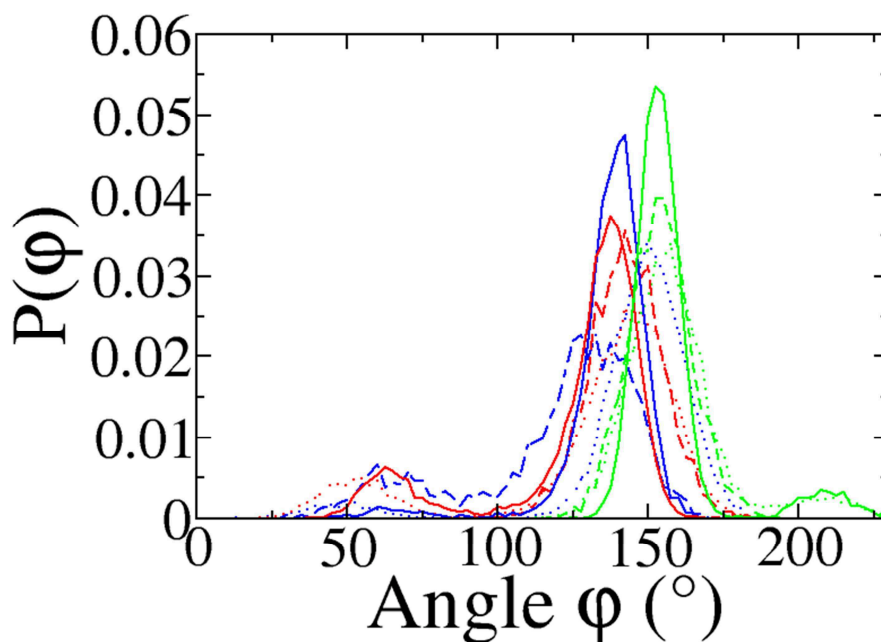


Figure 14 : répartition des valeurs de l'angle dièdre  $\phi$  autour de la liaison entre les cycles indoles du TTQ pour les dynamiques SCC-DFTB en phase gazeuse (pointillés) et en phase aqueuse (tiret) ainsi que pour les dynamiques classiques dans l'eau (traits pleins). Bleu :  $TTQH^\bullet$  ; rouge :  $TTQH^\bullet$  ; vert :  $TTQH^+$ .

La présence d'une molécule d'eau de plus ou de moins à proximité du TTQ modifie d'une part l'interaction électrostatique entre le TTQ et son environnement et d'autre part la densité électronique interne du cofacteur. En effet, la Figure 14 montre la répartition des angles dièdres dans les différentes dynamiques en phase gazeuse et condensées. L'angle de torsion ne varie guère pour les espèces semi-oxydée et oxydée entre les deux milieux : le pic vers  $140^\circ$  est

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

plus important dans l'eau au dépens de la population autour de 40° ou au-delà de 180°, le solvant rend donc plus difficile la rotation sans modifier l'angle d'équilibre et ce quel que soit le niveau de description choisi. Pour la forme TTQH<sup>-</sup> modélisée en SCC-DFTB en revanche, l'angle d'équilibre se rapproche de 90° et la conformation perpendiculaire est moins déstabilisée. L'eau, en interagissant avec les atomes d'oxygènes du groupe quinone, stabilise la charge négative sur ces derniers ce qui induit une diminution de la délocalisation dans l'ensemble des cycles. Cette baisse se traduit par une moindre stabilisation des conformations planes des deux indoles par rapport aux formes perpendiculaires favorisées par la répulsion stérique. Cet effet ne peut être représenté dans la méthode QM+MM dans la mesure où la calibration du champ de force de la torsion s'est faite en phase gazeuse. Toutefois, les profils NEB de la torsion du TTQH<sup>-</sup> et du TTQH<sup>•</sup> sont similaires : l'écart énergétique entre les deux états reste quasi-constant lors de la rotation des deux indoles. La contribution interne en phase gazeuse à la conformation d'équilibre en solution plutôt qu'à celle précédemment optimisée donnerait donc un résultat similaire et il ne semble pas nécessaire de la considérer dans le calcul QM+MM.

Il est par ailleurs possible, en appliquant l'ARL, d'évaluer l'énergie de réorganisation  $\lambda$  à l'aide de l'équation suivante :

$$\lambda = \frac{1}{2} (\langle V_f - V_i \rangle_i - \langle V_f - V_i \rangle_f) \quad 11$$

reprenant les mêmes notations que dans l'équation 7. Le Tableau 6 recense ces énergies pour les simulations SCC-DFTB/MM et MM.

		TTQH <sup>•</sup> /TTQH <sup>-</sup>	TTQH <sup>+</sup> /TTQH <sup>•</sup>
QM+MM	ARL IH	1,42	1,08
QM/MM	ARL	1,44	1,39

**Tableau 6:** énergie libre de réorganisation en eV obtenue pour les couples redox TTQH<sup>•</sup>/TTQH<sup>-</sup> et TTQH<sup>+</sup>/TTQH<sup>•</sup> aux niveaux QM+MM et QM/MM en appliquant l'approximation de la réponse linéaire.

En premier lieu, nous constatons que pour le couple TTQH<sup>•</sup>/TTQH<sup>-</sup>, les énergies de réorganisation sont similaires quelle que soit la méthode de modélisation utilisée. Même si le nombre de molécules d'eau autour du soluté diffère selon le niveau de description, la réorganisation du solvant entre l'état réduit et l'état semi-réduit est la même. Si les charges atomiques peinent à reproduire la polarisation de la densité électronique des états TTQH<sup>-</sup> et TTQH<sup>•</sup>, leurs différences entre ces deux états correspondent à l'évolution de la densité observée au niveau SCC-DFTB/MM. En revanche, l'énergie de réorganisation pour le couple

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

TTQH<sup>+</sup>/TTQH<sup>•</sup> au niveau QM+MM est de 0,31 eV plus faible que celle obtenue au niveau SCC-DFTB/MM. Dans ce cas, l'évolution des charges entre les deux états ne reflète pas complètement celle de la densité électronique en milieu aqueux. Nous pouvons rapprocher ces résultats des fonctions de distributions radiales autour de l'atome O<sub>p</sub>. Vers 3 Å, nous avons 0,5 molécule d'eau en moins dans l'état TTQH<sup>•</sup> que dans l'état TTQH<sup>-</sup> pour les deux niveaux de description du soluté tandis que les profils associés aux états TTQH<sup>•</sup> et TTQH<sup>+</sup> diffèrent d'une molécule d'eau au niveau SCC-DFTB/MM mais sont très proches au niveau classique.

La différence entre les résultats QM/MM et QM+MM provient donc principalement de l'organisation du solvant autour de la fonction quinone et de la polarisation de la densité électronique autour des atomes d'oxygène dans les états réduits et semi-réduits, ce qui engendre des énergies d'interactions électrostatiques différentes entre les deux niveaux de théorie. Cependant, la réorganisation du solvant lors du passage d'un état à l'autre n'est pas énergétiquement modifiée, indiquant que les différences de comportements du solvant entre les deux états sont similaires en QM+MM et en QM/MM. De plus, ce groupement quinone est justement le point commun entre l'ensemble des molécules que nous souhaitons étudier pour notre courbe de calibration. Il semble raisonnable de penser que cet effet du solvant sur les oxygènes se produit lors des simulations QM+MM de chacun des cofacteurs et constitue une erreur commune à chaque potentiel redox final. Cette dernière est par conséquent prise en compte dans la calibration de la courbe des résultats théoriques par rapport aux résultats expérimentaux. En appliquant cette hypothèse, nous pouvons donc valider l'utilisation de la méthode QM+MM, moins coûteuse que les calculs SCC-DFTB/MM, pour la courbe de calibration du potentiel redox, puis dans la protéine.

### d. Evaluation des pKa

Le pKa expérimental du TTQH<sub>2</sub> est d'environ 10,8, tandis que celui du TTQH<sup>+</sup>, acide fort, est négatif.<sup>6</sup> A pH neutre, l'oxydation à deux électrons d'une molécule de TTQH<sub>2</sub> induit donc également sa double déprotonation ; le potentiel redox mesuré expérimentalement prend en compte l'énergie libre associée à chacune des étapes d'oxydation et de déprotonation. Il nous faut donc, pour déterminer un potentiel redox comparable aux résultats expérimentaux, calculer les valeurs des deux pKa. Comme nous avons choisi la méthode QM+MM pour les calculs d'oxydo-

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

réduction, nous devons également l'utiliser pour les réactions acido-basiques. Toutefois, le départ d'un proton est plus complexe que celui d'un électron puisque non seulement une charge mais également un noyau est retiré de la molécule et une liaison covalente est rompue. Au niveau classique auquel nous effectuons nos simulations, ces modifications perturbent, pour la contribution externe, les interactions électrostatiques mais aussi celles de Van der Waals. De plus, l'énergie de solvation du proton, égale à 11,5 eV<sup>56</sup> doit être prise en compte dans l'évaluation du pKa. Cette dernière peut alors s'effectuer *via* un cycle thermodynamique comme celui présenté dans Figure 15 pour la contribution externe, la contribution interne étant déjà déterminé en phase gazeuse. L'ensemble des contributions est résumé dans le Tableau 7.

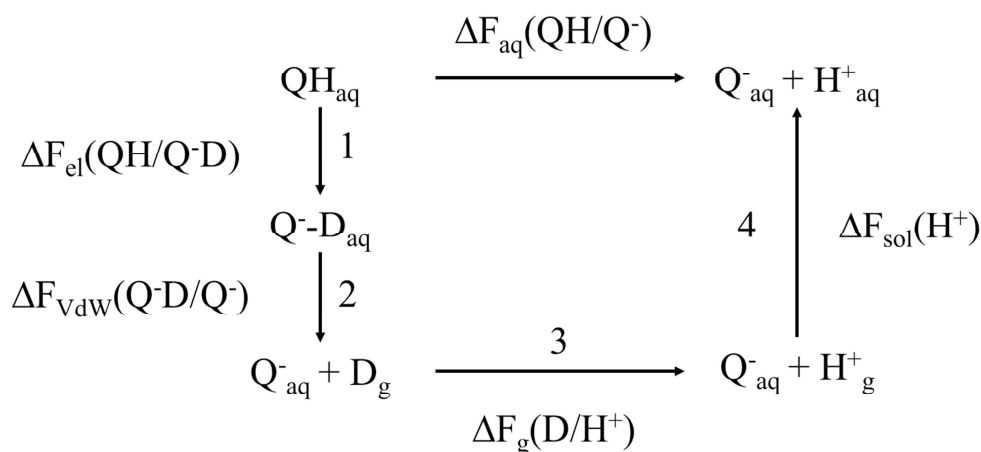


Figure 15 : cycle thermodynamique utilisé pour calculer l'énergie libre de déprotonation  $\Delta F_{\text{aq}}(\text{QH}/\text{Q}^-)$  d'une forme acide d'une molécule quinone (QH2 ou QH+) en milieu aqueux. La première étape (1) consiste en la neutralisation de la charge du proton acide  $\Delta F_{\text{el}}(\text{QH}/\text{Q}^-\text{D})$  puis à l'évaporation de celui-ci par disparition progressive des énergies de Van der Waals associées  $\Delta F_{\text{vdw}}(\text{Q}^- \text{D}/\text{Q}^-)$  (étape 2). L'atome fantôme neutre gazeux D est alors retransformé en proton sans coût énergétique ( $\Delta F_{\text{g}}(\text{D}/\text{H}^+)$  nulle, étape 3) et enfin le proton est à nouveau solvaté avec une énergie libre de solvation  $\Delta F_{\text{sol}}(\text{H}^+)$  égale à -11,53 eV (étape 4).

	$E_{\text{QM}}(\text{QH}/\text{Q}^-)$	$\Delta F_{\text{el}}(\text{QH}/\text{Q}^- \text{D})$	$\Delta F_{\text{vdw}}(\text{Q}^- \text{D}/\text{Q}^-)$	$\Delta F_{\text{aq}}(\text{QH}/\text{Q}^-)$	$\text{pKa}_{\text{th}}$	$\text{pKa}_{\text{exp}}$
TTQH <sub>2</sub> /TTQH <sup>-</sup>	14,03	-2,23	-0,07	0,20	3,38	10,8
TTQH <sup>+</sup> /TTQ	10,32	0,43	0,00	-0,79	-13,36	-

Tableau 7 : différentes contributions en eV à l'énergie libre associée aux couples acide/base TTQH<sub>2</sub>/TTQH<sup>-</sup> et TTQH<sup>+</sup>/TTQ en solution et valeur des pKa correspondants théoriques et expérimentaux.

La première étape de ce cycle, notée 1, concerne uniquement l'électrostatique du système et l'énergie libre associée  $\Delta F_{\text{el}}(\text{QH}/\text{Q}^- \text{D})$  se calcule de manière similaire aux énergies libres d'oxydation. Les deux états considérés sont alors la forme acide et une forme intermédiaire pour

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

laquelle la charge du proton est nulle et la charge de chaque atome correspond à celle de la forme basique. Les paramètres de Lennard-Jones sont conservés pour le proton. Des dynamiques classiques de 15 ns pour le couple  $\text{TTQH}_2/\text{TTQH}^-$  sont réalisées sur chacun de ces états, l'écart énergétique convergeant plus lentement, tandis que 5 ns suffisent pour le couple  $\text{TTQH}^+/\text{TTQ}$ . Les paramètres de simulations sont les mêmes que précédemment. L'énergie libre correspondant à cette étape est calculée en appliquant l'approximation de la réponse linéaire. Il peut être souligné que dans l'eau, les interactions électrostatiques restent toujours plus favorables aux espèces chargées  $\text{TTQH}^-$  et  $\text{TTQH}^+$  qu'aux espèces neutres  $\text{TTQH}_2$  et  $\text{TTQ}$ .

La deuxième étape consiste à la disparition progressive de la répulsion de Van der Waals entre le proton et les autres atomes. L'énergie de rupture de liaison est quant à elle comprise dans le calcul QM. Le paramètre de Lennard-Jones du proton est progressivement annulé par une méthode d'intégration thermodynamique : en utilisant le module PERTUB de CHARMM, dix simulations de 500 ps, dont 100 ps d'équilibration, sont effectuées sur des formes du TTQ intermédiaires entre la molécule avec le proton neutre et la forme basique du couple étudié. L'énergie libre obtenue est particulièrement faible.

Ces deux étapes correspondent à un départ en phase gazeuse du proton porté par la forme acide du couple étudié. Or, le produit final comporte le proton en solution : en phase gazeuse, le passage d'un proton artificiellement neutre à un proton chargé ne requiert pas d'énergie. L'énergie de solvation du proton est connue et égale à -11,53 eV. En sommant l'ensemble des énergies obtenues pour ce cycle, nous obtenons l'énergie libre associée à la déprotonation du TTQ puis le pKa en appliquant la formule suivante :

$$pKa = \frac{\Delta F_{sol}(QH/Q^-)}{RT \ln 10} \quad 12$$

où

$$\Delta F_{sol}(QH/Q^-) = -E_{QM}(QH/Q^-) + \Delta F_{el}(QH/Q^-D) + \Delta F_{vdw}(Q^-D/Q^-) + \Delta F_{sol}(H^+) \quad 13$$

est l'énergie libre de déprotonation exprimée en J/mol et R et T décrivent respectivement la constante des gaz parfait, soit 8,314 J/mol/K et la température en K (ici 298 K).

Pour le couple  $\text{TTQH}_2/\text{TTQH}^-$ , le résultat obtenu est nettement inférieur à la valeur expérimentale (3,38 vs 10,8). Comme aucune donnée expérimentale n'existe pour le deuxième couple, l'erreur associée ne peut être évaluée. Les résultats concernant les réactions acide-base

## *II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH*

par une méthode QM+MM s'avèrent, pour le TTQ, relativement éloignés des données expérimentales.

Nous avons désormais tous les éléments permettant de calculer le potentiel redox du TTQ dans l'eau. En sommant les énergies libres associées aux différentes étapes de l'oxydation complète et en appliquant l'équation 1, nous trouvons une valeur théorique pour  $E^\circ$  de 4,55 V. Pour comparer directement ce résultat au potentiel redox expérimental, il nous faudrait une valeur de potentiel pour l'électrode standard à hydrogène dans l'eau, qui, nous l'avons vu, s'étale dans la littérature sur une gamme allant de 4,2 V à 4,8 V. La différence entre notre résultat théorique et la valeur expérimentale pour le TTQ donne 4,44 V, ce qui est compris dans la plage possible de potentiel pour l'ESH. Cette donnée prouve une certaine pertinence de notre étude mais n'assure pas de son exactitude et ne donne pas d'ordre de grandeur de l'erreur sur le résultat.

Dans ce contexte la courbe de calibration des calculs théoriques vs données expérimentales s'avère particulièrement utile puisqu'elle s'émancipe de la valeur de l'ESH, mais pourrait également permettre de compenser des sources d'erreurs systématiques entrevues dans cette partie : pas assez d'eau autour des atomes d'oxygène, pKa trop faibles, absence de prise en compte de l'interface solution/air...

### ***4. Courbe de calibration***

Suite à notre étude sur le TTQ, nous avons choisi d'employer une méthode QM+MM et d'appliquer l'approximation de la réponse linéaire pour la détermination de potentiel redox sur un ensemble de molécules de la famille des quinones dont les potentiels redox expérimentaux à pH 7 sont connus et couvrent une gamme relativement grande de potentiel. En comparant résultats théoriques et expérimentaux, une courbe de corrélation peut être obtenue avec une certaine incertitude sur ses prédictions de potentiels redox. Un dernier cofacteur quinone, le CTQ, est utilisé pour tester notre courbe.

#### *a. Calibration du champ de force pour les molécules quinones*

Un champ de force doit être calibré pour chacun des cofacteurs quinones. Le problème de la compétition entre délocalisation et répulsion stérique propre au TTQ ne se pose pas pour ces molécules mais les liaisons entre les différents groupes caractéristiques et le cycle aromatique



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

principal (benzène ou indole) doivent être paramétrées. Le champ de force associé à certains acides aminés (tyrosine, tryptophane, lysine, cystéine...) fournit des données pour la majeure partie des molécules. Suivant la méthode employée pour le TTQ, les valeurs d'équilibre, les phases et les constantes de forces sont choisies de manière à reproduire en moyenne la valeur obtenue lors de l'optimisation DFT et les fluctuations observées dans les dynamiques SCC-DFTB dans le vide. Le caractère mésomère donneur des fonctions éther ou amine implique une aromaticité plus ou moins prononcée des liaisons entre ces groupements et le benzène suivant les états. Ainsi, dans les cas réduits, aucune délocalisation du système  $\pi$  du cycle aromatique vers ces groupes n'est observée tandis que pour les états semi-réduits et oxydés, la planéité de la liaison obtenue au niveau quantique souligne le don d'électron de ce groupe vers le cycle.

Ce caractère détermine aussi, de même que le caractère inductif donneur ou accepteur d'autres fonctions, lequel des atomes d'oxygène porte le proton dans les états TTQH<sup>-</sup>, TTQH<sup>•</sup> et TTQH<sup>+</sup>. Les charges atomiques de chaque molécule dans chaque état sont calculées au moyen d'un schéma Hirshfeld itératif. Le Tableau 8 rassemble les charges des atomes d'oxygène et indiquent ceux protonés dans la forme la plus stable en phase gazeuse de l'état considéré.

		QH <sub>2</sub>	QH <sup>-</sup>	QH <sup>•</sup>	QH <sup>+</sup>	Q
TTQ	O <sub>p</sub>	-0,56	-0,65	-0,50	-0,40	-0,42
	O <sub>m</sub>	-0,61	-0,60	-0,52	-0,45	-0,41
LTQ	O <sub>p</sub>	-0,61	-0,61	-0,50	-0,35	-0,41
	O <sub>m</sub>	-0,58	-0,71	-0,53	-0,45	-0,45
Q1	O <sub>p</sub>	-0,60	-0,72	-0,47	-0,31	-0,39
	O <sub>m</sub>	-0,57	-0,62	-0,51	-0,40	-0,39
Q2	O <sub>p</sub>	-0,57	-0,62	-0,48	-0,33	-0,40
	O <sub>m</sub>	-0,60	-0,71	-0,52	-0,42	-0,42
Q3	O <sub>o</sub>	-0,57	-0,61	-0,50	-0,34	-0,47
	O <sub>m</sub>	-0,60	-0,72	-0,58	-0,49	-0,44

**Tableau 8 : charges calculées par la méthode Hirshfeld itérative pour les atomes d'oxygène des fonctions quinones des molécules utilisées pour la courbe de calibration. Les indices o, m ou p signalent respectivement la position *ortho*, *méta* ou *para* de l'oxygène vis-à-vis du groupement amine pour les molécules LTQ et Q3, éther pour Q2 et tertio-butyle pour C1. Les atomes indiqués en rouge sont protonés dans la forme optimisée en phase gazeuse au niveau DFT.**

Nous observons alors que le choix de l'état de protonation des atomes d'oxygène dépend des groupements présents sur le cycle ainsi que de l'état considéré. Par exemple, lorsqu'un groupement mésomère donneur est présent, comme dans les cas LTQ, Q2 et Q3, le proton sera plus stable sur l'oxygène en *ortho* ou *para* dans la forme réduite puis sur l'oxygène en *méta* sur

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

les formes semi-réduites et oxydées. Lorsqu'un groupement mésomère donneur est présent sur un cycle, les carbones les plus nucléophiles se trouvent en *ortho* et *para* de ce dernier. Le carbone en *méta* est donc plus électrophile ce qui stabilise davantage une charge négative sur l'oxygène associé que dans le cas d'un carbone en *ortho* ou en *para*. La réciproque est vraie pour le carbone lié au groupement mésomère donneur et les effets des deux groupes se cumulent ainsi. Dans les autres formes, l'atome d'oxygène déprotoné est équivalent ou moins chargé que l'hydroxyle et devient demandeur d'électron. Or les deux autres groupements sont mésomères donneurs et donnent leurs électrons en *ortho* et *para*. Il devient plus favorable de déprotoner l'atome d'oxygène à ces positions. Dans le cas de Q1, le seul groupement est un alkyle simplement inductif donneur. Le proton est alors toujours stabilisé sur l'atome d'oxygène en *méta*.

Nous constatons par ailleurs que les charges des atomes d'oxygène s'étalent sur une gamme plus large de valeurs dans les cas des quinones LTQ, Q1, Q2 et Q3, de -0,70 à -0,3 environ, que dans celui du TTQ où elles varient entre 0,65 et 0,40. De même, les différences entre atomes d'oxygène protonés et déprotonés dans les formes chargées positivement ou négativement sont de 0,1 environ pour les quinones et de 0,05 seulement pour le TTQ. Ces comportements, indépendants des autres groupements présents sur le benzène des quinones, soulignent la plus forte aromaticité du TTQ par rapport aux autres molécules étudiées du fait des indoles : la charge est alors diluée sur un plus grand nombre d'atomes.

### b. Calcul des potentiels redox par la méthode QM +MM

Les contributions interne et externe associées à chaque transformation sont calculées de la même manière exactement que dans le cas du TTQ. Le Tableau 9 contient l'ensemble des résultats obtenus pour les modèles de quinones dont les potentiels redox expérimentaux sont connus, et qui servent à construire la courbe d'équilibration présentée sur la Figure 16. L'équation de la droite de régression donne:

$$E^{\circ}_{th} = 1,12 \times E^{\circ}_{exp} + 4,51 \quad 14$$

Au global, les calculs théoriques reproduisent assez bien les données expérimentales puisque la droite de régression possède un coefficient proche de 1 (1,12). Les différences relatives entre les potentiels redox de chaque espèce sont respectées à 0,12 V près et seuls le TTQ et le LTQ voient l'ordre relatif de leur potentiel redox inversé entre expérience et théorie. Les barres d'erreurs associées à chaque potentiel redox correspondent aux incertitudes u associées à l'échantillonnage

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

de chaque écart énergétique MM pondéré par la corrélation entre les points de la dynamique par la formule :

$$u = \frac{\sigma}{\sqrt{N\rho}} \quad 15$$

où  $\sigma$  correspond à l'écart type observé sur l'écart énergétique, N le nombre de pas considérés et  $\rho$  l'efficacité statistique sur l'ensemble des résultats. Cette dernière grandeur traduit la possible corrélation entre les valeurs d'écart énergétiques le long des différentes dynamiques. L'erreur associée aux coefficients de la droite est de 0.04 pour le coefficient directeur et 0,01 eV pour l'ordonnée à l'origine, avec une corrélation entre les deux de -0,75.

	$E^{\circ}_{\text{exp vs ESH}}$	$E^{\circ}_{\text{th}}$	pKa (1)	pKa (4)	$\Delta F^{\circ}$ (1)	$\Delta F^{\circ}$ (2)	$\Delta F^{\circ}$ (3)	$\Delta F^{\circ}$ (4)
<b>TTQ</b>	0,107	4,55	3,38	-13,36	0,20 (14,03)	4,00 (1,94)	5,68 (5,94)	-0,79 (10,32)
<b>LTO</b>	0,062	4,62	7,27	-9,98	0,43 (14,63)	3,86 (1,51)	5,57 (6,14)	-0,59 (10,21)
<b>Q1</b>	0,353	4,92	6,26	-22,83	0,37 (14,56)	4,37 (1,88)	6,45 (7,27)	-1,35 (9,13)
<b>Q2</b>	0,212	4,72	7,10	-16,57	0,42 (14,53)	3,00 (1,71)	6,01 (6,71)	-0,98 (9,64)
<b>Q3</b>	-0,087	4,41	10,82	-16,91	0,64 (14,95)	3,74 (1,37)	5,43 (6,03)	-1,00 (9,68)

**Tableau 9 : valeurs du potentiel redox expérimental et théorique des cofacteurs quinone en Volt et des pKa théoriques. Les énergies libres associées à chaque étape du mécanisme présenté dans le Schéma 1 sont données en eV, la valeur entre parenthèse correspondant au calcul DFT en phase gazeuse.**

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

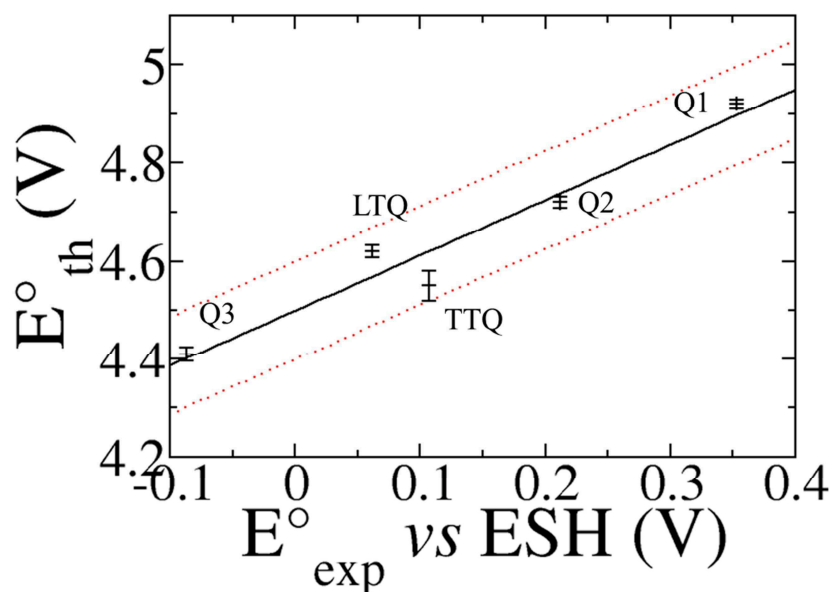


Figure 16 : courbe de calibration du potentiel redox théorique dans l'eau par rapport au résultat expérimental pour les différentes molécules de la famille des quinones. La droite en trait plein représente la droite de régression calculée à partir des 5 points (coefficient de détermination  $R^2=0,94$ ) et les droites en pointillés rouges symbolisent les valeurs à  $\pm 0,1$  eV de la droite de calibration.

Plus en détails, il apparaît qu'à la fois les contributions internes et externes diffèrent pour une même étape selon la molécule étudiée : le calcul QM en phase gazeuse n'est pas suffisant pour retrouver une bonne corrélation entre les résultats théoriques et expérimentaux et la prise en compte de l'environnement se révèle essentielle. Ainsi, si nous ne prenons que les énergies QM, l'ordre des potentiels redox serait :  $Q2 > Q1 > TTQ > Q3 > LTQ$ , bien loin du  $Q1 > Q2 > TTQ > LTQ > Q3$  trouvé expérimentalement ou du  $Q1 > Q2 > LTQ > TTQ > Q3$  obtenu avec la méthode QM+MM.

Si nous nous penchons sur les valeurs obtenues étape par étape, nous observons, pour les réactions d'oxydation, que plus les fonctions présentes sur le benzène possèdent un caractère mésomère donneur (à savoir l'éther puis l'amine), moins la forme réduite est stabilisée par rapport à la forme semi-oxydée. Cette dernière autorise en effet la délocalisation de la paire libre de l'atome donneur contrairement à la forme réduite. Ce phénomène permet donc une meilleure stabilisation de l'électron célibataire mais assure également la planéité de la liaison entre le cycle et le groupement mésomère donneur. Dans le cas de la deuxième oxydation, pour laquelle les atomes impliqués dans l'aromaticité sont les mêmes dans chaque état considéré, il s'avère que les quinones oxydées associées à des groupements amines sont mieux stabilisées que dans les autres

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

molécules par rapport à la forme semi-réduite. Le groupe éther de la molécule Q2, ou pire l'absence de groupe donneur de la molécule Q1, défavorise davantage la forme cationique lors de l'oxydation ce qui revient à une moins bonne stabilisation de la charge positive. Cette différence se retrouve aussi bien en phase gazeuse que dans l'énergie libre totale et semble alors due à un effet interne à la molécule.

Par ailleurs, les valeurs de pKa théoriques pour le couple  $\text{QH}_2/\text{QH}^-$  des quinones issues d'une tyrosine (LTQ, Q1, Q2 et Q3) semblent plus raisonnables que celle obtenue pour le TTQ. La différence apparaît dès le calcul en phase gazeuse où la contribution QM est d'au moins 0,5 eV plus faible pour le TTQ que pour les autres molécules. Il est possible que le pKa théorique du TTQ provienne d'une mauvaise description du comportement interne. Une première hypothèse pour la mauvaise reproduction du pKa pour le TTQ repose sur la différence de comportement du  $\text{TTQH}^-$  et du  $\text{TTQH}_2$  quant à la rotation des deux indoles. L'angle de torsion à l'équilibre se trouvant modifié en solution pour le  $\text{TTQH}^-$  et se rapprochant de la valeur d'équilibre du  $\text{TTQH}_2$ , la contribution interne au pKa dépend du milieu. Toutefois, les deux profils de torsion en phase gazeuse ne diffèrent pas de plus de quelques centièmes d'eV entre  $40^\circ$  et  $140^\circ$ , ce qui peut entraîner une augmentation du pKa d'à peine plus de 1, insuffisante pour reproduire la valeur expérimentale.

Les pKa du couple  $\text{QH}^+/\text{Q}$  s'étalent quant à eux sur presque 13 unités. Comme aucune donnée expérimentale ne peut être obtenue pour ce pKa, il reste difficile de s'assurer de la pertinence de ces valeurs. La même observation que pour la deuxième oxydation peut toutefois être faite, même si dans ce cas, la molécule Q3, soit la seule para-quinone, donne un résultat similaire à Q2.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

### c. Application au CTQ

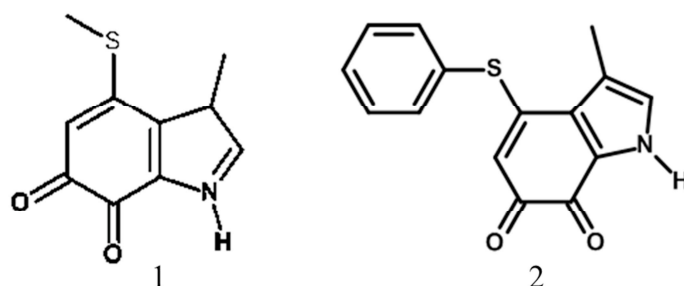


Figure 17 : représentation du modèle utilisé pour la cystéine tryptophilquinone (CTQ) à l'état quinone dans les calculs (1) ou en solution (2).<sup>9</sup>

En appliquant la même méthodologie que pour les précédentes molécules quinones, nous avons tenté d'obtenir ainsi une valeur de  $E^\circ$  vs ESH pour le CTQ (Figure 17, 1) dans l'eau, sachant qu'il existe une valeur expérimentale de 0,07 mV pour un modèle du CTQ pour lequel un phényle est rattaché au thioéther (Figure 17, 2). Nous avons écarté l'étude théorique d'une telle forme en QM+MM du fait de la difficulté de prévoir le comportement du phényle en solution : il semble probable que ce groupement, hydrophobe, cherche à interagir avec le groupement indole par superposition de leur système  $\pi$ , ce qui contraint fortement la conformation de la molécule et qui ne se produit pas en phase gazeuse où aucun environnement n'interagit de manière défavorable avec le phényle. Nous préférons étudier une forme méthylée, plus proche de la philosophie des modèles du TTQ et du LTQ, et plus aisément modélisable en solution.

Le champ de force de notre modèle a été paramétré de la même manière que pour les autres molécules quinone. Cependant, dans le cas du thioéther, la charge du soufre obtenue dans les différents états par la méthode IH apparaît comme proche de zéro et positive ce qui s'accorde mal avec le caractère électronégatif du soufre (Tableau 10), en particulier pour la forme chargée négativement du CTQ. Un second jeu de charge, noté  $IH_{\text{corr}}$ , a été calculé par une méthode ESP en contraignant la charge du groupement indole sur les résultats obtenus pour le schéma IH et en recalculant les charges atomiques sur la chaîne soufrée. Ces nouvelles charges sont chimiquement plus satisfaisantes, avec un soufre négatif dans le CTQ réduit, de charge nulle pour les formes neutres et légèrement positif pour la forme  $CTQH^+$ . Cette observation est corroborée par une meilleure reproduction du moment dipolaire et du potentiel électrostatique du CTQ par le jeu de charge  $IH_{\text{corr}}$ .

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

	CTQH <sub>2</sub>		CTQH <sup>-</sup>		CTQH <sup>•</sup>		CTQH <sup>+</sup>		CTQ	
	IH	IH <sub>corr</sub>	IH	IH <sub>corr</sub>	IH	IH <sub>corr</sub>	IH	IH <sub>corr</sub>	IH	IH <sub>corr</sub>
<b>O<sub>p</sub></b>	-0,56		-0,68		-0,51		-0,39		-0,42	
<b>O<sub>m</sub></b>	-0,61		-0,61		-0,53		-0,39		-0,43	
<b>S</b>	0,05	-0,21	0,01	-0,29	0,17	-0,04	0,37	0,16	0,18	-0,03
<b>RRMSD (%)</b>	48,9	27,8	5,7	3,1	39,2	19,1	5,2	2,3	23,3	11,7
<b>moment</b>	0,61	1,12	5,20	6,17	4,85	3,89	13,81	13,30	8,14	7,10
<b>dipolaire (D)</b>	(1,43)		(6,28)		(3,92)		(13,36)		(7,32)	

**Tableau 10** : charge des atomes d'oxygène et de soufre du CTQ dans les différents états pour les deux jeux de charges calculés. Le RRMSD (en pourcentage) et moment dipolaire (en Debye) associé à chaque jeu sont donnés (moment dipolaire calculé en DFT donné entre parenthèse).

A titre de comparaison, nous avons tout de même calculé les énergies libres, les valeurs de pKa et du potentiel redox du CTQ pour les deux schémas de charges (Tableau 11). Si nous plaçons nos résultats théoriques sur la courbe de calibration de la Figure 16, nous obtenons une valeur du potentiel redox vs ESH de  $-94 \pm 0,03$  mV ou de  $-50 \pm 0,02$  mV (incertitude associée aux dynamiques et à la droite) pour les charges IH et IH<sub>corr</sub> respectivement. Le deuxième schéma donne un résultat plus proche de celui obtenu expérimentalement pour le modèle de CTQ expérimental, il semble donc bien plus pertinent du point de vue de l'oxydation en milieu aqueux. La principale différence entre les deux potentiels provient de la contribution externe à l'oxydation de la forme CTQH<sup>•</sup> (0,17 eV) mais est partiellement compensée par la contribution à l'énergie de déprotonation de CTQH<sup>+</sup> (0,13 eV). Dans cet état, le soufre est décrit comme assez positivement chargé dans le schéma IH (0,37), tandis que la méthode IH<sub>corr</sub> lui attribue une charge moitié moins grande. Cette diminution entraîne une moins bonne interaction entre le soufre et les atomes d'oxygène des molécules d'eau voisines et donc une moins bonne stabilisation de la forme CTQH<sup>+</sup>. En revanche, l'augmentation de la charge négative du soufre sur les formes réduites n'a pas d'effet sur la valeur de la contribution externe à l'énergie libre. Les observations réalisées précédemment sur les énergies des étapes d'oxydation demeurent valides dans le cas du CTQ où le thioéther joue le rôle de mésomère donneur, moins fort que l'éther ou l'amine mais plus que le tertio-butyle et non accepteur contrairement à l'indole.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

	$E^{\circ}_{th}$	pKa (1)	pKa (4)	$\Delta F^{\circ}$ (1)	$\Delta F^{\circ}$ (2)	$\Delta F^{\circ}$ (3)	$\Delta F^{\circ}$ (4)
CTQ	4.40	1.40	-10.47	0.08 (14.15)	3,90 (1.71)	5,43 (6.18)	-0.62 (9.99)
CTQ <sub>corr</sub>	4.45	2.34	-12.74	0.14	3,90	5,60	-0.75

**Tableau 11 : valeurs du potentiel redox expérimental et théorique du CTQ en V et des pKa théoriques. Les énergies libres associées à chaque étape du mécanisme présenté dans le Schéma 1 sont données en eV, la valeur entre parenthèse correspondant au calcul DFT en phase gazeuse.**

Comme dans le cas du TTQ, le couple acide-base CTQH<sub>2</sub>/CTQH<sup>-</sup> possède un pKa théorique inférieur aux données expérimentales. Le point commun entre ces deux espèces est la nature du groupe portant la fonction quinone, c'est-à-dire l'indole. Contrairement au TTQ, le CTQ ne possède cependant pas de groupement mésomère attracteur sur lequel la délocalisation électronique est modifiée entre phases gazeuse et condensée dans l'état négativement chargé. Une autre explication est à chercher dans la structure du groupement indole, qui possède, en plus du cycle benzénique présent sur les quinones issues de la tyrosine, un second cycle participant par une liaison double et la paire libre de l'azote à l'aromaticité du cycle. La différence de comportement entre indoles et quinone se retrouve surtout en phase gazeuse où la contribution QM à l'énergie libre  $\Delta F^{\circ}(1)$  est plus faible en valeur absolue pour le TTQ et le CTQ que pour les autres quinones (Tableau 9 et Tableau 11). Le système  $\pi$  étant de taille plus importante, la charge est plus diluée sur les indoles et les densités électroniques entre les formes réduites doublement ou une fois protonées sont plus proches dans les cas du CTQ et du TTQ. De fait, la localisation de la charge négative sur l'atome d'oxygène en présence de molécules d'eau peut perturber davantage l'aromaticité des quino-indoles négatifs vis-à-vis des quino-indoles neutres que dans le cas du cycle benzénique seul. Ceci se remarque également au niveau des charges obtenues en phase gazeuse qui diffèrent moins pour les oxygènes portés par les indoles. La prise en compte de la polarisation de la densité électronique en milieu aqueux et de ses répercussions sur l'écart énergétique quantique pourrait permettre d'affiner les résultats quant au pKa des quinones.

Malgré ce problème quant à la reproduction des pKa, notre courbe de calibration permet d'avoir une idée correcte du potentiel redox d'un cofacteur de type quinone, tout en employant une méthode peu coûteuse et qui prend en compte l'ensemble des étapes intégrées à ce potentiel. L'étude des résultats étape par étape montre que les valeurs obtenues par le calcul sont qualitativement pertinentes vis-à-vis des propriétés des fonctions chimiques présentes sur les



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

molécules. Il nous paraît alors envisageable de transposer nos résultats à d'autres systèmes à savoir des protéines munies de tels cofacteurs, par exemple la MADH possédant une molécule de TTQ.

### 5. Etude du TTQ dans la protéine MADH

Les résultats obtenus dans l'eau ont pour but de définir une méthode de calcul et une apporter une comparaison expérience-théorie afin d'évaluer le potentiel redox du TTQ dans la protéine MADH. Cette protéine présente l'avantage d'avoir pu être cristallisée complexée à l'amicyanine et à un cytochrome c551i (code PDB : 2GC4). Ce complexe ternaire correspond bien à une structure dans laquelle peut s'effectuer le transfert d'électron depuis le TTQ vers l'ion cuivre II contenant dans la protéine amicyanine.<sup>57</sup> De plus, les deux électrons issus de l'oxydation de la quinone sont transférés séquentiellement depuis le O-TTQ vers le complexe à cuivre. Chaque transfert peut-être par conséquent étudié individuellement.

Nous ne nous sommes intéressés dans le système biologique qu'au potentiel de la première oxydation du TTQ, à savoir le passage de TTQH<sup>-</sup> à TTQH<sup>•</sup>. Nous souhaitons comparer le résultat du TTQ dans l'eau à celui du TTQ dans la protéine MADH, seule ou complexée avec l'amicyanine, afin de comprendre l'influence de l'environnement. Pour se faire l'étude de dynamiques classiques de longues durées et des différentes contributions de l'environnement sont nécessaires. Comme le cytochrome c551i n'intervient pas dans le transfert d'électron du TTQ, nous n'avons pas testé son influence sur le potentiel du TTQ.

#### a. MADH seule

A partir de la structure cristallographique du complexe MADH/amicyanine/cytochrome c551i de *Paracoccus denitrificans*, la protéine MADH est isolée et solvatée dans une boîte de symétrie orthorhombique de 120×100×100 Å<sup>3</sup>. Le modèle utilisé pour les molécules d'eau reste identique à celui des simulations précédentes (modèle d'eau flexible SPCF). La boîte de simulation utilisée doit être suffisamment grande pour contenir les protéines dans leurs différentes conformations et éviter des interactions non pertinentes entre une protéine et son image dues aux conditions périodiques. En particulier, une boucle de la chaîne  $\alpha$  de la protéine MADH s'est révélée particulièrement mobile et la boîte de simulation doit contenir ses différentes positions.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

Le pKa des différents acides aminés est obtenu l'aide du programme propKa.<sup>58-61</sup> Nous en déduisons leur état de protonation à pH 7, soit directement grâce au pKa lorsque celui-ci est suffisamment éloigné de 7, soit en observant dans la structure la présence d'éventuelles interactions permettant de stabiliser une charge ou un proton. Il apparaît alors que la protéine contient de nombreux acides-aminés chargés négativement. Lorsque le TTQ se trouve dans l'état semi-réduit neutre, la charge négative due à la protéine s'élève à -32. Afin de neutraliser la charge totale du système, 32 ions sodium sont ajoutés en remplacement de molécules d'eau désignées aléatoirement. Dans le cas du TTQH<sup>-</sup>, la charge totale équivaut à -1 tout comme dans les simulations en solution.

Pour chaque état du TTQ, deux boîtes de simulations sont équilibrées donnant lieu à deux géométries de départ différentes. A partir de ces dernières, des dynamiques moléculaires de 50 ns ont été réalisées grâce au programme NAMD.<sup>62</sup> Ces simulations utilisent les paramètres de simulations suivant : dynamique de type Langevin dans l'ensemble NPT à une température de 298 K et une pression de 1 bar, conditions périodiques et énergie électrostatique calculée par la méthode *Particul Mesh Ewald* avec une distance de 1 Å entre chaque point de la grille.

Pour chacune de ces trajectoires, les interactions électrostatiques entre le TTQ et son environnement sont évaluées sur les deux états TTQH<sup>-</sup> et TTQH<sup>\*</sup>. La convergence de l'écart énergétique entre ces contributions électrostatiques est donnée dans la Figure 18 tandis que les valeurs moyennes et l'écart-type de celui-ci sont reportés dans le Tableau 12. Les deux dynamiques sur chaque état sont étudiées séparément car les différences de  $\Delta E$  moyen entre deux simulations peuvent atteindre 0,4 eV de différence comme dans le cas du TTQH<sup>\*</sup>. Par ailleurs, si nous traçons les histogrammes associés à  $\Delta E$  (Figure 19), nous constatons qu'ils correspondent bien à une répartition normale de l'écart d'énergie électrostatique.

MADH				
	TTQH <sup>-</sup> 1	TTQH <sup>-</sup> 2	TTQH <sup>*</sup> 1	TTQH <sup>*</sup> 2
$\langle \Delta E \rangle$	3,37	3,28	0,01	0,45
$\sigma_{\Delta E}$	0,33	0,30	0,25	0,26
$\Delta F_{MM}$	1,78			

Tableau 12 : valeur moyenne  $\langle \Delta E \rangle$  et écart-type  $\sigma_{\Delta E}$  de la différence d'énergie des interactions électrostatiques classiques entre l'environnement et TTQH<sup>-</sup> ou TTQH<sup>\*</sup> sur chaque ainsi que la valeur de la contribution classique à l'énergie libre d'oxydation obtenue par l'application de l'ARL, le tout exprimé en eV.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

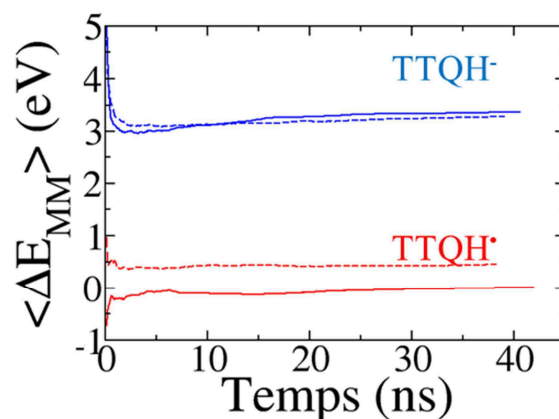


Figure 18 : convergence de la différence d'énergie des interactions électrostatiques classiques entre l'environnement et TTQH<sup>-</sup> ou TTQH<sup>+</sup> pour les dynamiques dans le système MADH seule. Les résultats pour les dynamiques sur l'état réduit TTQH<sup>-</sup> et sur l'état TTQH<sup>+</sup> sont tracés respectivement en bleu et en rouge. Les simulations notées 1 sont en traits pleins et celles notées 2 en tirets.

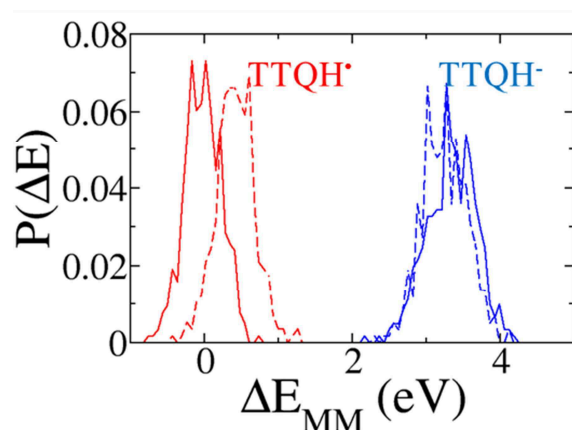


Figure 19 : histogramme de répartition des différences d'énergie des interactions électrostatiques classiques entre l'environnement et TTQH<sup>-</sup> ou TTQH<sup>+</sup> pour les dynamiques dans le système MADH seule. Les résultats pour les dynamiques sur l'état réduit TTQH<sup>-</sup> et sur l'état TTQH<sup>+</sup> sont tracés respectivement en bleu et en rouge. Les simulations notées 1 sont en traits pleins et celles notées 2 en tirets.

Le calcul de la contribution externe au potentiel redox du TTQ pour cette oxydation dans la MADH dans l'ARL, nous donne une valeur de 1,78 eV, soit en QM+MM une énergie libre totale de 3,72 eV, d'environ 0,3 eV plus faible que celle dans l'eau. Si nous appliquons la formule correctrice issue notre courbe de calibration à cette différence de potentiel, nous obtenons une valeur de 0,27 eV. La protéine semble donc favoriser davantage la forme semi-oxydée que l'eau et diminuer par conséquent le caractère oxydant du TTQ. La question de l'application de l'ARL dans ce cas peut néanmoins se poser, puisque les deux simulations sur l'état TTQH<sup>-</sup> échantillonnent des valeurs assez différentes de l'écart d'énergie électrostatique. Il convient par conséquent de s'intéresser aux causes induisant une telle différence.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

L'énergie classique coulombienne étant additive dans notre modèle, il est possible de décomposer la contribution externe au potentiel redox en différentes parts correspondant aux interactions avec des éléments précis de l'environnement : l'eau, la protéine et les cations sodium (Tableau 13).

MADH			
$\Delta F_{MM}$	MADH	Eau	Ions
1,78	-6,24	4,47	3,55

**Tableau 13 : contributions moyennes en eV à l'énergie libre classique totale calculée par ARL de différents éléments de l'environnement : la protéine MADH, les molécules d'eau et les cations sodium.**

Nous constatons que chacune de ces contributions se révèle importante et que seule celle associée à la MADH favorise la forme semi-oxydée au détriment de la forme réduite du TTQ. La concentration en cation dans notre système est beaucoup trop forte par rapport aux valeurs en solution. En conséquence, notre modèle induit certainement une surestimation de la contribution des ions au champ électrostatique environnant le TTQ. Celle-ci stabilisant le TTQ réduit par interaction entre sa charge négative et les cations, le bilan totale de l'écart énergétique pencherait davantage en faveur du TTQH<sup>\*</sup> pour une force ionique plus faible et comparable à l'expérience.

Lors de cette décomposition, nous avons regroupé les deux dynamiques sur chaque état et nous nous sommes placés dans le cadre de l'ARL. Toutefois, cette approximation n'est pas nécessairement valide et nous pouvons nous interroger sur le comportement de l'environnement autour du TTQ dans les différentes simulations, en séparant à nouveau les dynamiques 1 et 2, de même que dans l'étude de l'écart énergétique classique total.

Ainsi, les fonctions de distributions radiales autour des atomes d'oxygène du TTQ varient selon la simulation de dynamique moléculaire (Figure 20). Ces deux atomes se situent sur le Trp 57 de la chaîne  $\beta$  de la MADH, dans la poche du site actif où se déroule la réaction de déamination de la méthylamine et la transformation des Trp 57 et 108 en TTQ. Des résultats expérimentaux montre que l'oxygène en *para* est moins accessible au solvant celui en *méta*. Il est lié par liaison hydrogène avec l'amine du squelette du  $\beta$ Asp32, ce qui explique son caractère moins acide que l'atome d'oxygène en *méta*.<sup>63</sup> L'évolution de la distance de cette liaison au cours de nos dynamiques est reportée dans la Figure 25. Au contraire, l'atome d'oxygène en *méta* est considéré comme pouvant interagir avec de nombreuses molécules de solvant auxquelles il pourra transmettre son proton à l'état semi-réduit.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

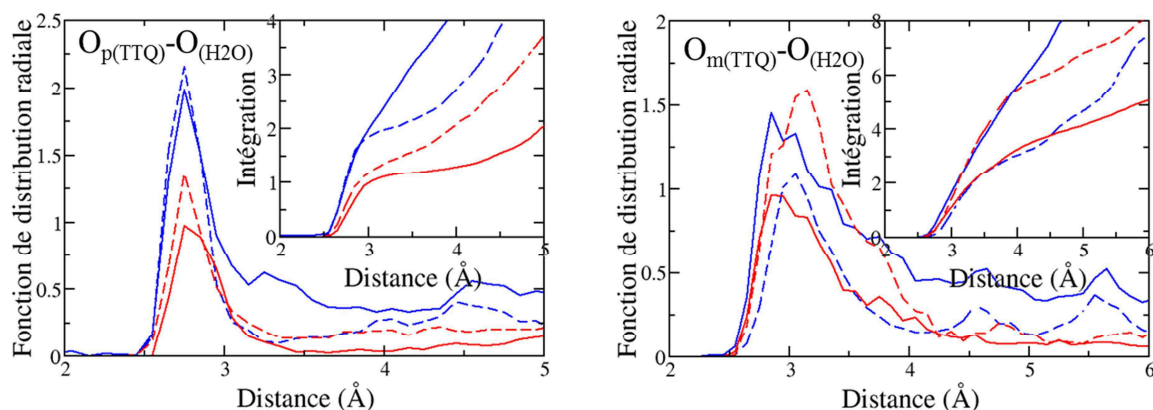


Figure 20 : fonction de distribution radiale des atomes d'oxygène des molécules d'eau autour de ceux du TTQ ( $O_p$  à gauche et  $O_m$  à droite) pour les simulations de dynamiques moléculaires sur le système MADH. L'intégration de cette fonction est donnée en encart en haut à droite de chaque graphe. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état TTQH<sup>-</sup> et les rouges à l'état TTQH<sup>•</sup>, les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.

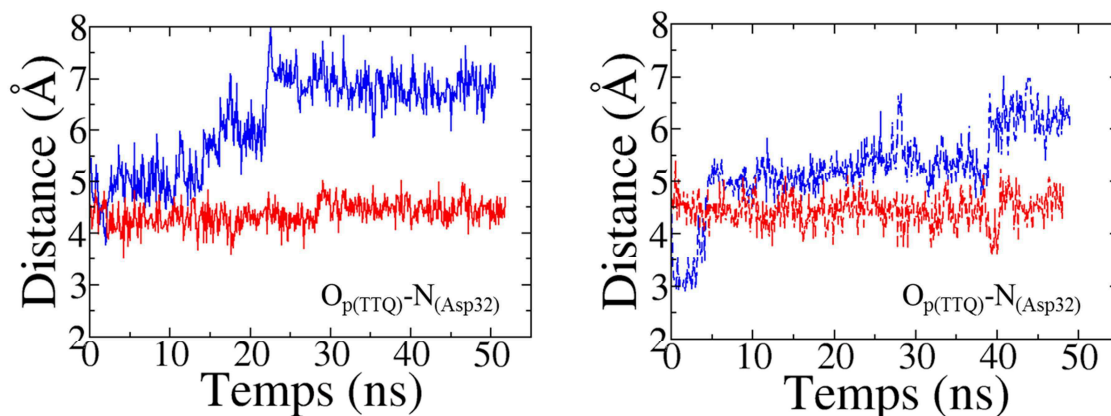


Figure 21 : évolution de la distance  $O_p(\text{TTQ})-N_{(\text{Asp32})}$  au cours du temps lors des dynamiques sur le système MADH seule. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état TTQH<sup>-</sup> et les rouges à l'état TTQH<sup>•</sup>, les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.

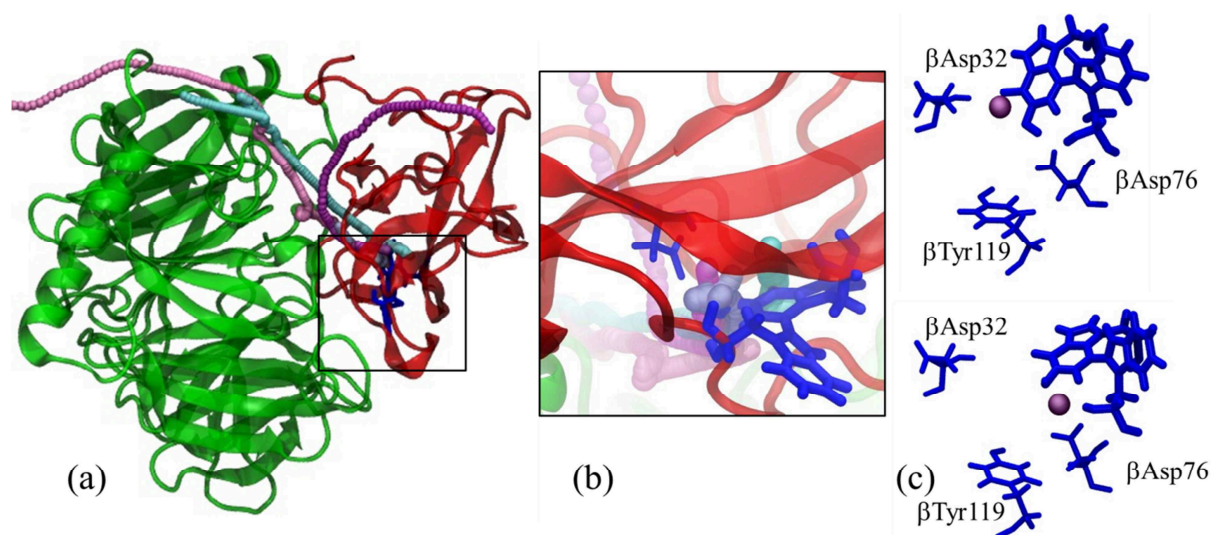
Nous observons effectivement un assez grand nombre de molécules d'eau autour de l'atome  $O_m$  indépendamment de l'état redox du TTQ. La fonction distribution radiale autour de cet atome d'oxygène présente un large pic centré vers 3 Å et allant de 2,5 Å à 4 Å pouvant intégrer de 3 à 6 molécules d'eau suivant la dynamique. Le nombre de molécules d'eau à proximité de l'atome  $O_m$  ne dépend pas de l'état redox du TTQ. La dynamique MADH/TTQH<sup>-</sup> 1 présente davantage de molécules d'eau autour dans la poche du site actif que les autres simulations, en particulier à plus de 4 Å de l'atome  $O_m$  tandis qu'à l'inverse, aucune molécule d'eau n'est visible à plus de 5 Å de cet atome dans la dynamique MADH/TTQH<sup>•</sup> 1. Les autres dynamiques donnent des comportements intermédiaires ; à courte distance de  $O_m$  cependant, le

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

profil associé à la simulation MADH/TTQH<sup>-</sup> 2 se rapproche de celui de MADH/TTQH<sup>•</sup> 1 et le profil de MADH/TTQH<sup>-</sup> 2 à celui de MADH/TTQH<sup>•</sup> 1.

Au contraire, la fonction associée à l'atome O<sub>p</sub> présente un pic plus fin (de 2,5 Å à 3 Å) et plus haut, puis un creux au moins jusqu'à 5 Å. Le nombre de molécules d'eau représentées par ce pic dépend de l'état du TTQ : deux molécules environ pour la forme réduite anionique et une molécule pour la forme semi-réduite neutre. La liaison entre l'oxygène O<sub>p</sub> et le βAsp32 se trouve également modifiée en fonction de l'état : de 3 Å à un peu plus de 4 Å à l'état TTQH<sup>•</sup>, elle augmente à l'état réduit jusqu'à 7 Å lorsque deux molécules d'eau sont visibles dans la fonction de distribution radiale. Il semble alors que la seconde molécule d'eau s'intercale au moins en partie entre le TTQ et le βAsp32. La différence de charge de 0,08 au niveau de l'atome en *para* entre les deux états redox induit cette variation du nombre de molécules d'eau autour de cet oxygène. Nous constatons par conséquent que l'oxygène en *méta* est effectivement bien plus accessible au solvant que celui en *para* du Trp108.

La contribution des ions semble par ailleurs extrêmement importante, même si leur nombre est relativement conséquent et que la charge du TTQ est modifiée lors des calculs de ΔE. Toutefois elle s'explique par l'arrivée d'un cation sodium dans le site actif dans la plupart des simulations (Figure 22).



**Figure 22 :** (a) chemin d'entrée du cation sodium (sphères colorées) dans le site actif de la protéine au voisinage du TTQ (bleu) par un passage entre les chaînes  $\alpha$  (vert) et  $\beta$  (rouge) de la MADH pour les quatre simulations réalisées avec la MADH seule (chaque sphère représente en une position du cation Na<sup>+</sup> moyennée sur 20 géométries). (b) zoom autour du TTQ et (c) les deux positions occupées par le cation : soit dans la poche face à la fonction quinone (haut) soit en interaction avec le carboxylate du βAsp76 (bas).

## *II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH*

Une fois au sein du site actif ce cation se déplace au voisinage du TTQ mais également à proximité du  $\beta$ Asp76 lequel interagit avec le proton de la fonction quinone du TTQ par liaison hydrogène (Figure 22, (c)). De temps en temps, cet acide aminé s'écarte du TTQ permettant alors au cation sodium de s'intercaler entre la fonction carboxylate et la fonction quinone. Or l'interaction avec l'aspartate revêt une grande importance dans la stabilisation de la forme  $\text{TTQH}^-$ . D'une part, lorsque le TTQ est réduit, sa charge négative interagit de manière répulsive avec l'anion carboxylate, ce qui entre en compétition avec l'interaction hydrogène dans les dynamiques sur le  $\text{TTQH}^-$  et qui déstabilise ces formes dans les dynamiques sur l'état  $\text{TTQH}^-$ . D'autre part, l'interaction quinone-carboxylate maintient le proton du TTQ à l'extérieur de la fonction quinone, ce qui, d'un point de vue interne, est moins favorable à la forme réduite. Cet effet n'est cependant pas pris en compte dans nos calculs.

Si le cation sodium prend la place de cet acide, il diminue la stabilisation de la forme neutre du TTQ et empêche le retour de l'Asp76 dans sa conformation initiale, du moins à l'échelle de temps de nos dynamiques. Le mouvement de cet aspartate s'accompagne d'un déplacement plus global : ainsi la tyrosine 119 de la chaîne  $\beta$ , qui peut interagir par son groupement hydroxyle avec la fonction quinone s'éloigne du TTQ en même temps que l'Asp76 (Figure 23).

II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

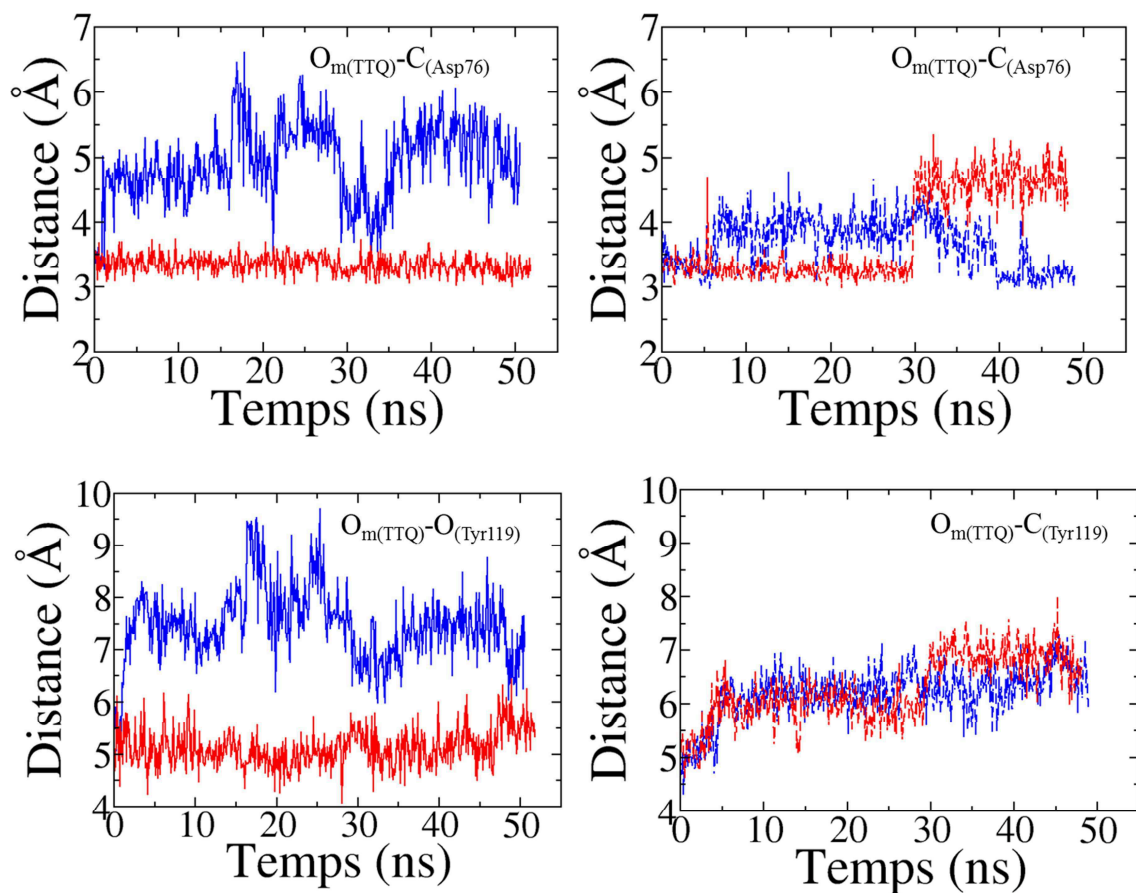


Figure 23 : évolution des distances  $O_{m(TTQ)}-C_{(Asp76)}$  (haut) et  $O_{m(TTQ)}-O_{Tyr119}$  (bas) au cours du temps lors des dynamiques sur le système MADH. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état  $TTQH^-$  et les rouges à l'état  $TTQH^+$ , les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.

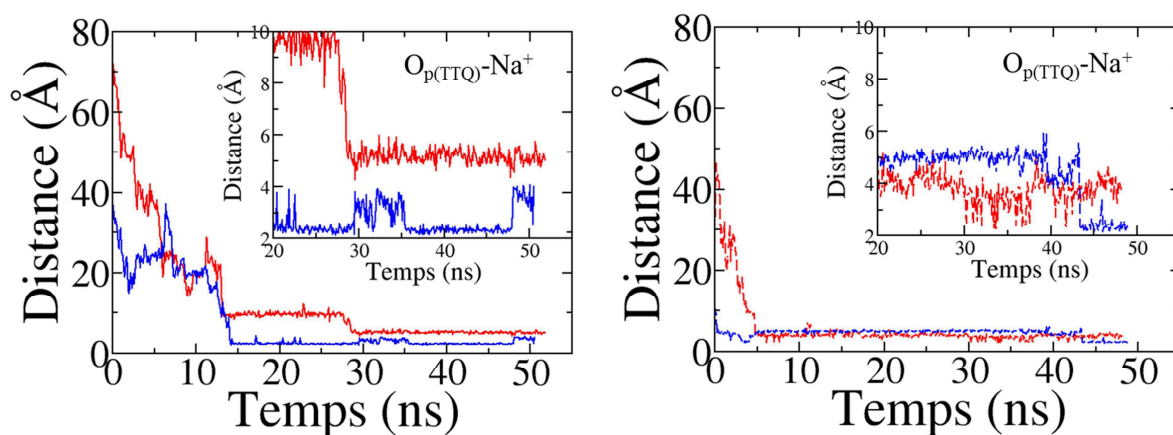


Figure 24 : évolution de la distance  $O_{p(TTQ)}-Na^+$  entrant de le site actif au cours du temps lors des dynamiques sur le système MADH. Un zoom de l'évolution après 20 ns de simulations (qui comprennent les 10 ns non prises en compte dans le calcul de  $\Delta E$ ) est donné en haut de chaque graphe. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état  $TTQH^-$  et les rouges à l'état  $TTQH^+$ , les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

En comparant l'évolution des différentes distances entre les atomes d'oxygène du TTQ et les acides aminés voisins ou le cation sodium, nous pouvons distinguer deux valeurs correspondant aux différents sites de fixation du cation (Figure 24). Si ce dernier demeure dans la poche accessible au solvant, à une distance de 5 Å environs de l'oxygène  $O_m$ , les distances  $O_m$ -Asp76 et  $O_m$ -Tyr119 ne sont guère modifiées par rapport aux géométries en l'absence de cation et fluctuent respectivement autour de 3,5 Å et 5-6 Å. A l'inverse, si le cation s'intercale entre l'hydroxyle de la fonction quinone et l'aspartate, il se situe de 2 à 4 Å de l'oxygène  $O_m$  et les chaînes latérales de l'aspartate et de la tyrosine s'éloignent de cet atome jusqu'à des distances respectives 4-6 Å et 6,5-7 Å. Ce changement conformationnel n'arrive pas nécessairement, ou peut être tardif. Dans le cas des simulations sur l'état TTQH<sup>•</sup>, le cation ne parvient pas toujours à atteindre le voisinage du TTQ et s'intercale difficilement entre celui-ci et l'Asp76. Dans le cas où le cation s'approche lentement, l'interaction avec celui-ci est nettement plus faible, expliquant en grande partie les 0,4 eV de différence constatés entre les  $\Delta E$  des dynamiques à l'état semi-réduit.

En moyenne toutefois, l'interaction avec le cation proche représente plus de la moitié des contributions dues à l'ensemble des ions sodium dans le milieu. Cependant, la force ionique de notre milieu est élevée par rapport aux conditions expérimentales usuelles qui sont de 10 mM. Se pose alors la question de la pertinence de la présence du cation au sein du site actif. Un tel évènement peut-il se produire dans des milieux d'études ou au sein d'une cellule ? Des expériences de spectrophotométrie ont montré que des cations monovalents peuvent s'insérer dans deux sites de fixation à proximité de la fonction quinone dans la protéine MADH.<sup>64-66</sup> De plus, des études cinétiques à différentes valeurs de la force ionique et différents cations monovalents ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ) indiquent que la présence d'un ion au sein du site actif influence la vitesse de transfert dans le cas de l'aminoquinone.<sup>63</sup> En effet, si un groupement amine remplace l'hydroxyle en position *méta* par rapport au Trp108, le transfert d'électron entre le TTQ et le cuivre complexé à l'amicyanine ne peut s'effectuer sans un transfert de proton depuis l'amine en question. Ce transfert est alors favorisé par le cation interagissant avec l'azote et le rendant plus électrophile. Dans le cas de l'O-quinone, où le transfert d'électron est direct, la force ionique ne modifie pas la cinétique de transfert d'électron. Cependant, des études cristallographiques avec des ions césium suggèrent que les sites se situent soit à proximité de la Tyr119 (interaction cation- $\pi$ ) soit du côté du TTQ opposé à l'Asp76 (structure PDB 2BBK).<sup>67</sup> Dans les simulations classiques, une interaction cation- $\pi$  ne peut être correctement reproduite d'où l'absence de

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

stabilisation du cation par la  $\beta$ Tyr119 ou la  $\alpha$ Phe55. Mais le second site décrit dans l'étude de Sun et Davidson est parfois occupé lors de nos dynamiques. Quant au site entre le TTQ et l'Asp 76, il est possible que le césium, dont le rayon de Van der Waals est le plus élevé des éléments chimique, soit de taille trop importante pour s'y insérer. Par ailleurs, dans la structure cristallographique de la quinohémostéine amine déshydrogénase de *Paracoccus Denitrificans* (code PDB 1JJU)<sup>68</sup> contenant un cofacteur CTQ, un cation sodium se place entre l'oxygène  $O_m$  du CTQ et un acide aspartique voisin.

Ces résultats nous confortent dans la possibilité de rencontrer un cation au sein du site actif lors de nos simulations. Cependant, comme l'arrivée du cation et ses déplacements au sein du site actif modifient le champ électrostatique autour du TTQ mais ne se déroulent pas systématiquement, il nous est impossible d'appliquer l'ARL (laquelle suppose des modifications de faibles amplitudes de l'environnement lors du changement d'état). Il est par ailleurs difficile de s'assurer que l'ensemble des conformations est correctement échantillonné au cours de nos simulations.

### b. Comparaison avec le complexe MADH/amicyanine

Le complexe MADH/amicyanine issu de la structure cristallographique 2GC4 est solvato dans une boîte d'eau de symétrie orthorhombique d'un volume de  $144 \times 120 \times 120 \text{ \AA}^3$ . Du fait de la présence de l'amicyanine, 34 ions sodium sont désormais nécessaires pour neutraliser les charges des protéines pour l'état TTQH<sup>+</sup>. Comme nous étudions le potentiel redox et non le transfert d'électron, l'état d'oxydation II du cuivre complexé dans l'amicyanine est maintenu lors de l'oxydation du TTQ. Le champ de force décrit dans les travaux de Comba *et al* est utilisé pour ce complexe (métal et ligand).<sup>69</sup>

Deux simulations de dynamiques moléculaires de 40 ns ont été réalisées pour les états TTQH<sup>-</sup> et TTQH<sup>+</sup>. L'ensemble des autres paramètres de simulations correspondent à ceux utilisés pour le système MADH seule.

A nouveau, l'écart d'énergie d'interaction coulombienne entre l'environnement et le TTQ à l'état réduit et à l'état semi-réduit est déterminé tout au long des dynamiques. La valeur moyenne de cette grandeur et ses fluctuations sont données dans le Tableau 14 tandis que sa convergence au cours de la dynamique est représentée dans la Figure 25. De même que pour la MADH seule, l'écart énergétique moyen semble converger mais à des valeurs différentes selon la

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

simulation considérée. Il varie de 0,35 eV entre les dynamiques sur l'état semi-réduit à 0,86 eV entre celles sur l'état réduit. Les fluctuations autour de la moyenne, traduites par la valeur de l'écart-type, diffèrent également de manière assez conséquente selon la dynamique considérée (jusqu'à 0,2 eV) alors que l'une des conditions d'application de l'ARL est leur égalité.

	MADH/amicyanine			
	TTQH <sup>-</sup> 1	TTQH <sup>-</sup> 2	TTQH <sup>•</sup> 1	TTQH <sup>•</sup> 2
$\langle \Delta E \rangle$	2,74	3,60	0,36	0,11
$\sigma_{\Delta E}$	0,44	0,30	0,23	0,27
$\Delta F_{MM}$	1,71			

Tableau 14 : valeur moyenne  $\langle \Delta E \rangle$  et écart-type  $\sigma_{\Delta E}$  de la différence d'énergie des interactions électrostatiques classiques entre l'environnement et TTQH<sup>-</sup> ou TTQH<sup>•</sup> ainsi que la valeur de la contribution classique à l'énergie libre d'oxydation obtenue par l'application de l'ARL, le tout exprimé en eV.

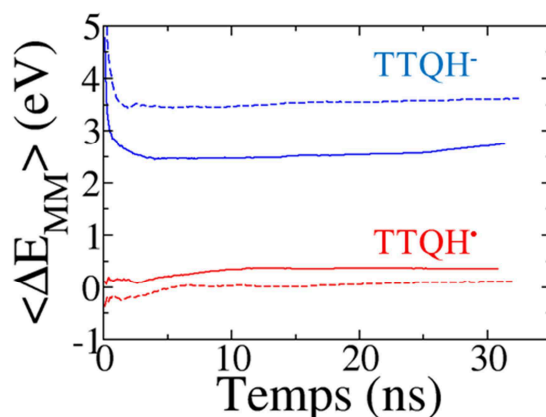


Figure 25 : convergence de la différence d'énergie moyenne des interactions électrostatiques classiques entre l'environnement et TTQH<sup>-</sup> ou TTQH<sup>•</sup> pour les dynamiques dans le système MADH/amicyanine. Les résultats pour les dynamiques sur l'état réduit TTQH<sup>-</sup> et sur l'état TTQH<sup>•</sup> sont tracés respectivement en bleu et en rouge. Les simulations notées 1 sont en traits pleins et celles notées 2 en tirets.

Par ailleurs, si nous traçons les histogrammes associés à  $\Delta E$  (Figure 26), nous constatons que si la plupart correspondent bien à une courbe gaussienne, la courbe de la dynamique MADH/amicyanine/TTQH<sup>-</sup> 1 présente quant à elle deux « bosses » : la majeure partie des valeurs se situent aux alentours de 2,5 eV mais une petite partie rejoint les valeurs obtenus lors de la seconde dynamique sur ce système vers 3,5 eV. Un événement se produit au cours de la simulation induisant un déplacement de l'écart énergétique de 0,9 eV environ en faveur de la forme réduite du TTQ. L'ARL ne peut s'appliquer dans une telle situation et nous pouvons nous interroger quant à la validité de notre échantillonnage. Toutefois, avant de réaliser de nouvelles simulations, il semble nécessaire de comprendre dans un premier temps les différences constatées dans ce premier jeu de trajectoires et de comparer ces résultats avec ceux de la MADH seule.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

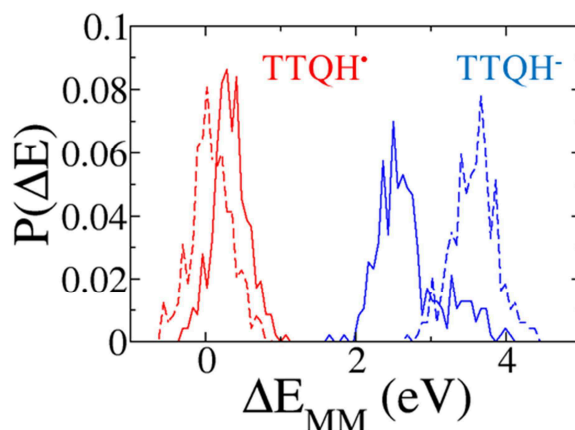


Figure 26 : histogramme de répartition des différences d'énergie des interactions électrostatiques classiques entre l'environnement et TTQH<sup>•</sup> ou TTQH<sup>-</sup> pour les dynamiques dans le système MADH/amicyanine. Les résultats pour les dynamiques sur l'état réduit TTQH<sup>-</sup> et sur l'état TTQH<sup>•</sup> sont tracés respectivement en bleu et en rouge. Les simulations notées 1 sont en traits pleins et celles notées 2 en tirets.

Si, malgré ces défauts dans l'échantillonnage de l'écart énergétique, nous calculons la contribution de l'environnement à l'énergie libre d'oxydation en appliquant l'ARL, nous obtenons pour le système MADH/amicyanine une valeur de 1,71 eV, très proche de celle calculée pour la MADH seule. Il semble donc que la formation du complexe entre les deux partenaires protéique ne provoque pas de profonde modification de l'énergie libre d'oxydation. Pourtant la protéine amicyanine possède un complexe à cuivre et des acides aminés chargés susceptibles d'interagir de manière électrostatique avec le TTQ.

D'ailleurs, si nous calculons comme précédemment la décomposition de la contribution externe à l'énergie QM+MM d'oxydation (Tableau 15), nous constatons à nouveau que chaque contribution est importante et que seule celle associée à la MADH favorise la forme semi-oxydée.

MADH/amicyanine				
$\Delta F_{MM}$	MADH	Amicyanine	Eau	Ions
1,71	-7,83	1,47	3,96	4,10

Tableau 15 : contributions en eV à l'énergie libre classique totale calculée par ARL de différents éléments de l'environnement : les protéines MADH et amicyanine, les molécules d'eau et les cations sodium.

Cette interaction MADH/TTQ vient compenser l'effet de l'amicyanine, qui elle stabilise la forme TTQH<sup>•</sup>, donnant au total une contribution protéique totale identique dans les deux systèmes. La présence de l'amicyanine modifie donc l'interaction entre le cofacteur TTQ et la MADH. Par ailleurs, la contribution due aux ions se voit ici renforcée tandis que celle due aux molécules d'eau diminue. Leur somme dans ce système ou dans la MADH seule restent toutefois similaires.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

Nous pouvons également calculer les contributions résidu par résidu et les comparer dans les deux cas : la Figure 27 montre les acides aminés colorés selon leur contribution relative, la contribution maximale étant celle du  $\beta$ Asp76 tandis que la Figure 28 reporte les valeurs de ces contributions et leurs sommes en prenant en compte de plus en plus d'acides aminés.

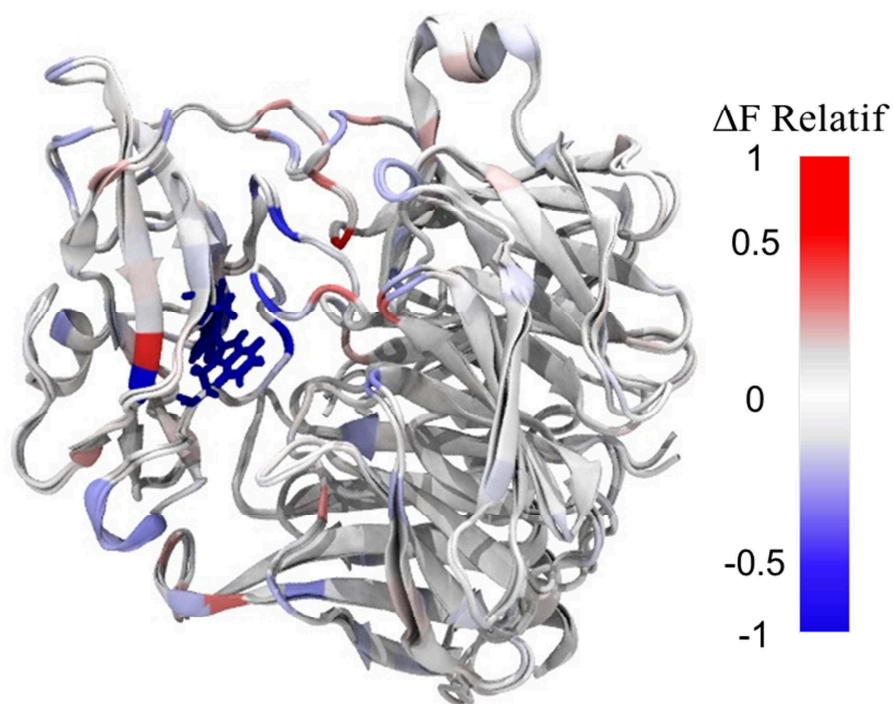


Figure 27 : superposition des structures de la MAD dans lesquelles les acides aminés sont colorés en fonction de leur contribution relative (par rapport à la contribution du  $\beta$ Asp76) à l'énergie libre d'oxydation  $\Delta F$  dans les simulations de la MADH seule ou du complexe MADH/amicyanine dans une même géométrie. Le TTQ est représenté en bâtons bleus.

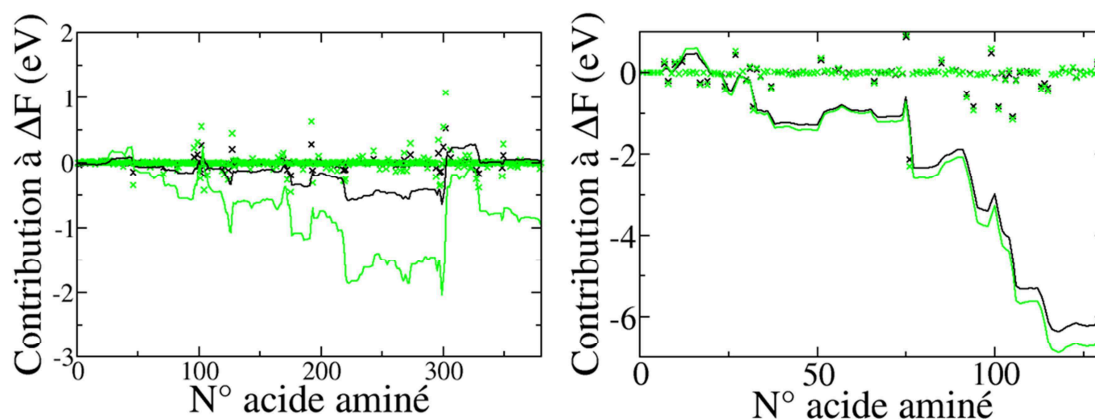
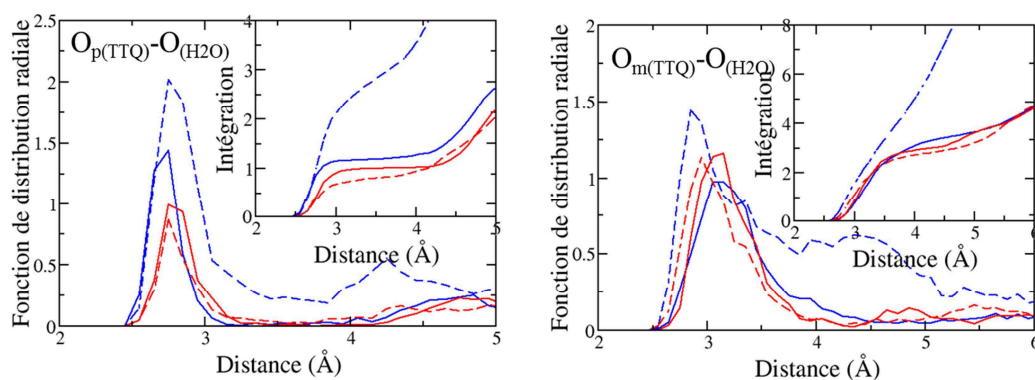


Figure 28 : valeur des contributions de chaque acide aminé à l'énergie libre de réaction (croix) et somme de ces contributions en fonction de l'ensemble des acides aminés considérés (traits épais) pour les deux chaînes de la MADH ( $\alpha$  à droite et  $\beta$  à gauche) pour les systèmes MADH seule (noir) ou MADH et amicyanine (vert).

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

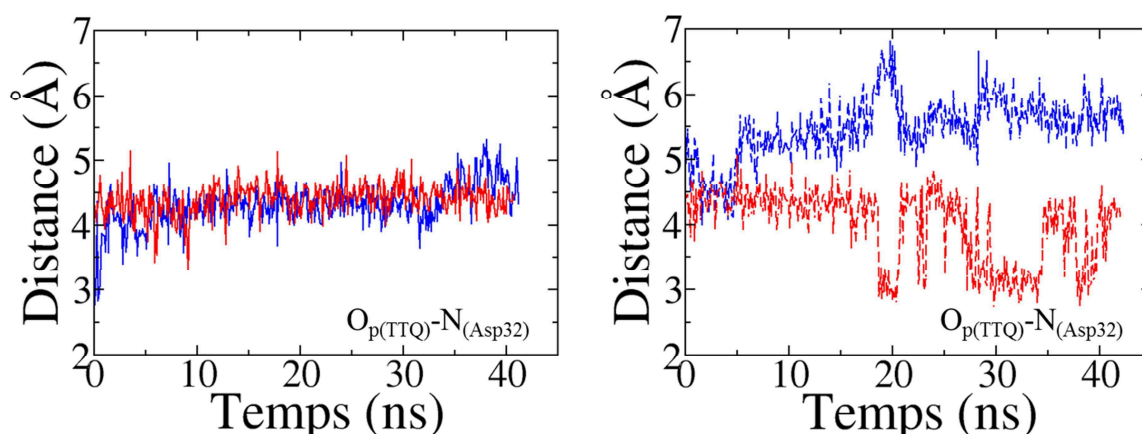
Quel que soit le système protéique, les valeurs des contributions relatives sont les mêmes comme le souligne la coloration identique des acides aminés dans la Figure 27. L'électrostatique de la MADH n'est donc pas modifiée localement par l'interaction avec l'amicyanine. A l'inverse, chaque interaction avec des résidus chargés est plus importante dans le cas du complexe entre les deux protéines, la somme associée étant toujours supérieure en valeur absolue à celle correspondant au système MADH seule. Au global, les contributions des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  augmentent respectivement de plus de 0,9 eV et 0,4 eV en valeur absolue en présence de l'amicyanine. Cette protéine induit par conséquent un effet qui se répercute sur l'ensemble de la protéine MADH mais qui n'opère pas de profond changement sur l'énergie libre associée à cette première oxydation du TTQ. Selon nos résultats, la protéine MADH assure la conservation d'une certaine valeur de potentiel redox pour son cofacteur quinone en présence ou non de l'amicyanine.

La contribution des molécules d'eau diminue pour sa part lorsque les deux protéines interagissent. La formation de ce complexe éloigne le solvant du Trp108, l'amicyanine venant se placer de ce côté-ci de la chaîne  $\beta$  portant le TTQ. Certaines molécules d'eau forment un chemin possible de transfert d'électron de la MADH vers l'amicyanine.<sup>70</sup> En l'absence de cette dernière, un plus grand nombre de molécules d'eau est susceptible d'interagir avec le TTQ, d'où éventuellement une certaine différence de la contribution de l'eau à l'énergie libre d'oxydation entre les deux systèmes. Du côté du Trp57, le site actif reste accessible aux molécules d'eau qui viennent alors interagir avec la quinone (Figure 29 et Figure 30).



**Figure 29 : fonction de distribution radiale des atomes d'oxygènes des molécules d'eau autour de ceux du TTQ ( $O_p$  à gauche et  $O_m$  à droite) pour les simulations de dynamiques moléculaires sur le système MADH/amicyanine. L'intégration de cette fonction est donnée en encart en haut à droite de chaque graphe. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état TTQH et les rouges à l'état TTQH', les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.**

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH



**Figure 30** : évolution de la distance  $O_{p(TTQ)}-N_{(Asp32)}$  au cours du temps lors des dynamiques sur le système MADH/amicyanine. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état TTQH et les rouges à l'état TTQH', les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.

Les premiers pics de chacune de ces fonctions de distributions radiales correspondent à ceux déjà décrits pour le système de la MADH seule. Le profil des fonctions autour de l'atome  $O_p$  dépend toujours de l'état du TTQ tandis que celui autour de l'atome  $O_m$  n'est pas spécialement modifié par le changement d'état. Toutefois, deux comportements principaux sont décrits par ces fonctions : soit de nombreuses molécules d'eau se trouvent dans le site actif et la distance entre l'atome d'oxygène  $O_p$  et le  $\beta Asp32$  oscille autour de 6 Å ce qui est le cas de la dynamique MADH/amicyanine/TTQH 2 ; soit le nombre de ces molécules est restreint et très peu se situent entre 4 Å et 6 Å de l'atome  $O_m$ , comme nous l'observons pour les 3 autres dynamiques. Ces courbes se rapprochent des profils extrêmes observés pour la MADH seule : ceux des dynamiques MADH/TTQH 1 et MADH/TTQH' 1. Par conséquent, sur l'ensemble des simulations, un plus grand nombre de molécules d'eau est présent lors des dynamiques sur la MADH seule que lors de celle sur le complexe MADH/amicyanine, ce qui peut aussi expliquer en partie la différence de la contribution de l'eau à l'énergie libre d'oxydation entre les deux systèmes. En moyenne, nous pouvons noter qu'un des effets possibles de l'interaction entre la MADH et l'amicyanine semble de fermer légèrement l'accès du site actif au solvant, mais il faudrait plus de simulations pour confirmer ou non cette observation.

La présence de l'amicyanine n'empêche cependant pas l'entrée du cation sodium au sein du site actif. Dans l'ensemble des dynamiques concernant le complexe entre les deux protéines, un ion parvient à s'insérer dans la poche (Figure 31). Parfois, il parvient également à s'insérer entre le TTQ et le  $\beta Asp76$ .



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

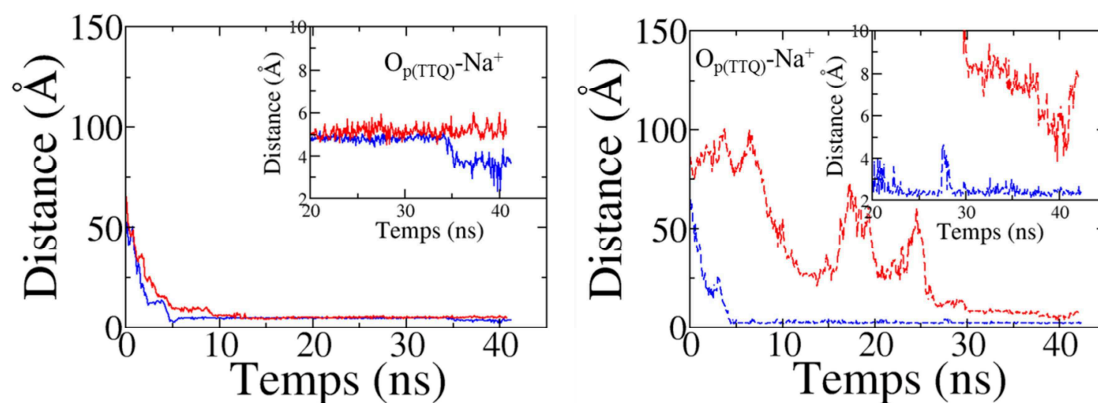


Figure 31 : évolution de la distance  $O_p\text{-Na}^+$  entrant de le site actif au cours du temps lors des dynamiques sur le système MADH/amicyanine. Un zoom de l'évolution après 20 ns de simulations (qui comprennent les 10 ns non prises en compte dans le calcul de  $\Delta E$ ) est donné en haut de chaque graphe. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état  $\text{TTQH}^-$  et les rouges à l'état  $\text{TTQH}^+$ , les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.

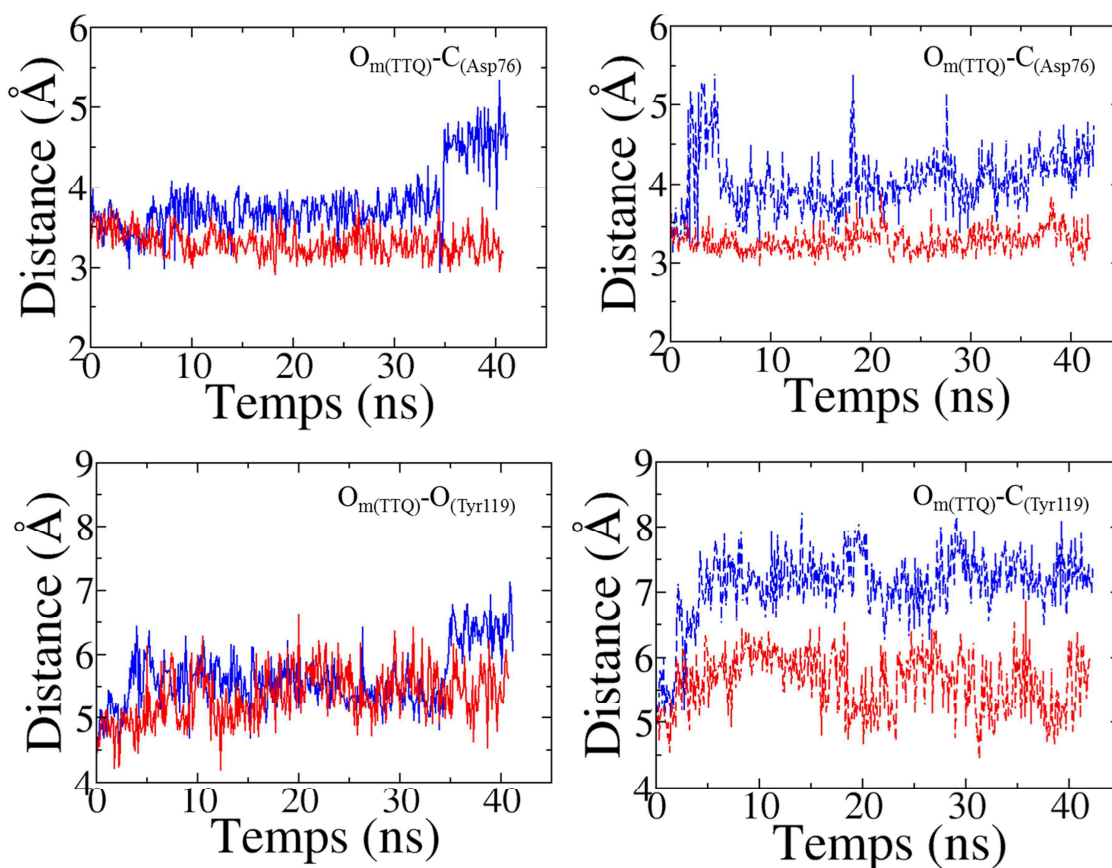


Figure 32 : évolution des distances  $O_m\text{(TTQ)-C}_{(\text{Asp76})}$  (haut) et  $O_m\text{(TTQ)-O}_{\text{Tyr119}}$  (bas) au cours du temps lors des dynamiques sur le système MADH/amicyanine. Les courbes bleues correspondent aux simulations sur l'état  $\text{TTQH}^-$  et les rouges à l'état  $\text{TTQH}^+$ , les traits pleins aux dynamiques notées 1 et les tirets à celles notées 2.



## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

Dans le cas de la MADH/amicyanine, le déplacement des acides aminés  $\beta$ Asp76 et  $\beta$ Tyr119 est moins conséquent que dans le cas de la MADH seule, et les fluctuations des distances semblent moins importantes, suggérant une certaine augmentation de la rigidité du squelette lors de l'interaction de la MADH avec l'amicyanine. Le changement conformationnel de la chaîne  $\beta$  permettant l'insertion du cation entre l'aspartate et la quinone n'arrive pas nécessairement, ou peut être tardif. Ainsi, dans la dynamique MADH/amicyanine/TTQH<sup>-1</sup>, le changement de valeur de  $\Delta E$  correspond à ce déplacement au bout de 34,9 ns de l'aspartate et du cation tandis que dans la seconde dynamique, ce mouvement intervient dès les premières nanosecondes. Nous expliquons ainsi la différence de 0,9 eV observée pour le  $\Delta E$  entre ces deux dynamiques. Comme dans le cas de la protéine MADH seule, la différence de 0,35 eV entre les deux simulations sur l'état oxydé s'explique également par la présence et les déplacements du cation dans le site actif.

De ce fait, nous ne pouvons donner, avec nos résultats, une valeur du potentiel redox du TTQ au sein de la protéine MADH. Néanmoins, nos simulations nous ont fourni de nombreuses informations. Premièrement, même en présence du cation sodium, l'environnement protéique contribue d'au moins 0,25 eV à l'abaissement du potentiel redox par rapport aux résultats en solution. Dans un second temps, l'interaction avec l'amicyanine engendre une modification globale des interactions entre résidus chargés et TTQ qui vient compenser l'arrivée du partenaire protéique et maintient constant le potentiel redox. Enfin, les simulations rejoignent les résultats expérimentaux sur la possibilité de présence d'un cation à proximité de la fonction quinone, en particulier à l'état réduit et venant s'intercaler entre le TTQ et l'aspartate voisin.

Il nous est en revanche difficile de conclure sur l'influence quantitative de ce dernier sur le potentiel redox. Il est nécessaire de choisir quelles conditions de pH et de force ionique nous souhaitons reproduire pour avancer une conclusion à partir de simulations. Par exemple, à forte concentration en ions (supérieure à 0,1M) il semble que de nombreuses protéines possèdent un cation au sein du site actif, ce qui est notre cas. Nos dynamiques sont cependant trop courtes pour que les différentes positions du cation soient correctement échantillonnées, étant donné les importantes différences d'écart énergétique moyen obtenues selon les dynamiques (de 0,4 à 0,9 eV). Les différences de comportements du cation entre les états suggèrent par ailleurs que l'approximation de la réponse linéaire ne s'applique pas au système.

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

Par ailleurs, à faible force ionique, quelle est la probabilité de rencontrer un cation proche du TTQ? Comme nous ne pouvons simuler plusieurs protéines à la fois, il faut donc faire plusieurs simulations relativement longues et comparer les temps de présence et d'absence du cation en des valeurs de concentration faible. Mais se pose alors le problème de la neutralité de la boîte et de sa taille. Un biais peut éventuellement être imposé pour éviter l'entrée d'un cation dans la poche du TTQ, mais nous ne sommes pas assurés que le comportement *in vitro* de la MADH soit alors reproduit. La modélisation de ce système dans des conditions similaires aux expériences requiert donc de nouvelles dynamiques dans lesquelles une attention particulière doit être portée aux cations sodium.

### 6. Conclusion

Dans cette première partie, nous nous sommes penchés sur le problème de l'évaluation du potentiel d'oxydo-réduction de cofacteurs organiques enfouis dans des protéines. Nous nous sommes intéressés par le comportement du TTQ au sein de la protéine MADH de la bactérie *Paracoccus Denitrificans*. Afin de pouvoir échantillonner au mieux les géométries au sein de la protéine étudiée et d'atteindre des échelles de temps de plusieurs dizaines de nanosecondes, des dynamiques classiques se révèlent indispensables mais elles ne décrivent pas le comportement de la densité électronique entre les différents états. La méthode QM+MM, dans laquelle la contribution interne du cofacteur à l'énergie d'oxydation est calculée en phase gazeuse à un niveau quantique, tandis que la contribution du champ électrostatique créé par l'environnement est évaluée au cours de longues dynamiques classiques, nous semble alors un bon compromis entre une bonne description du comportement quantique et des fluctuations du milieu sur une large échelle temporelle. Toutefois, les sources d'erreurs issues d'une telle méthode sont nombreuses, en particulier quant à la transposition des résultats en phase gazeuse pour des grandeurs en solution, et la validité des résultats en valeur absolue n'est pas assurée. Dans le but de s'affranchir de ces problèmes, nous avons mis au point une courbe de calibration du potentiel calculé en fonction de valeurs expérimentales.

La première étape de ce travail consiste en l'étude en phase gazeuse des énergies associées aux étapes d'oxydation et de déprotonation de la fonction quinone. Ces calculs nous permettent d'une part d'évaluer la contribution interne du cofacteur à l'énergie totale QM+MM et d'autre part de déterminer les charges atomiques et des paramètres géométriques utiles à la

## *II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH*

création d'un champ de force adapté à nos molécules. Les jeux de charges obtenus à partir du potentiel électrostatique de la molécule ou par une méthode Hirshfeld itérative donnent des charges atomiques similaires validant cette dernière méthode, jusqu'à maintenant peu utilisée. D'autre part, nous avons constaté que la méthode semi-empirique SCC-DFTB reproduit les écarts énergétiques et les géométries observés en DFT, en particulier en ce qui concerne la torsion entre les deux indoles du TTQ. Moins onéreuses que des calculs DFT, des dynamiques SCC-DFTB et SCC-DFTB/MM de quelques nanosecondes peuvent être réalisés sur des systèmes relativement simples, apportant des informations quant aux fluctuations des géométries du TTQ mais aussi un élément de comparaison avec nos résultats QM+MM dans l'eau.

Une fois le champ de force classique paramétré, différentes simulations en solution ont été réalisées et nous avons pu constater que l'approximation de la réponse linéaire s'appliquait aux transformations redox des quinones en solution. Le potentiel redox correspondant à deux étapes de déprotonation et deux d'oxydation a été évalué pour cinq molécules quinone ce qui nous a permis de construire une courbe de calibration de ces résultats en fonction des données expérimentales. Nous obtenons alors une droite avec un coefficient linéaire de 1,12 et une ordonnée à l'origine pouvant correspondre à la valeur de potentiel de l'électrode standard à hydrogène. Nous l'avons testée avec une molécule modèle du CTQ et obtenu un résultat assez satisfaisant.

Enfin, nous avons réalisé des simulations dans la protéine MADH en l'absence ou en présence de son partenaire amicyanine. Cette étude montre que l'amicyanine induit des changements globaux dans la dynamique de la protéine MADH ce qui permet de maintenir constant le potentiel redox du TTQ malgré la présence de la seconde protéine. Toutefois nos dynamiques ne permettent pas d'obtenir une valeur sûre du potentiel d'oxydation du TTQ de l'état réduit vers l'état semi-réduit du fait de l'arrivée d'un cation sodium à proximité de la fonction quinone venant bouleverser le champ électrostatique dans l'environnement du cofacteur.

Différents problèmes se sont posés au cours de cette partie. Tout d'abord, l'environnement peut polariser la densité électronique et modifier la répartition des charges atomiques par rapport à celle obtenue en phase gazeuse. D'une part, l'absence de cette polarisation des charges atomiques engendre un comportement du solvant différent de celui observé avec des méthodes QM/MM. D'autre part, dans des molécules aromatiques comme le TTQ où la délocalisation électronique est fortement liée à la géométrie, une modification de la

## II. Détermination de potentiel redox : cas du TTQ et de la protéine MADH

répartition de la densité électronique modifie également la conformation d'équilibre du cofacteur. Ce problème se pose moins dans la protéine où l'angle de torsion est contraint par les liaisons avec le squelette protéique. Une méthode alternative serait de paramétrer le champ de force non pas à partir d'optimisation en phase gazeuse mais à l'aide de calculs QM/MM dans l'environnement souhaité, ce qui en augmente cependant le coût. Si nous souhaitons rester dans un cadre QM+MM, seule la courbe de calibration permet de diminuer ces incertitudes en supposant que les comportements chimiques des quinones sont suffisamment proches pour que cette absence de polarisation entraîne des effets similaires sur les calculs de potentiel redox.

L'échantillonnage des conformations au sein des systèmes protéiques est lui aussi problématique. Expérimentalement, les échelles de temps et de quantités de matière sont bien supérieures à celles auxquelles nous avons accès. La mesure de la grandeur étudiée correspond alors à une moyenne sur un grand nombre de conformations. Malgré plusieurs simulations de plusieurs dizaines de ns, les écarts énergétiques que nous calculons donnent des résultats différents suivant des modifications de l'environnement proche du TTQ, notamment du fait de l'arrivée d'un cation sodium. Or celui-ci n'est pas uniquement un artefact de la simulation engendré par la nécessité de neutralisation de la boîte de simulation puisqu'au contraire il semble tout à fait envisageable que des cations monovalents soient présents dans le site actif lors des expériences *in vitro*. Il convient alors d'envisager de nouveaux protocoles de simulations permettant de mieux définir le cadre dans lequel nous souhaitons mesurer le potentiel en redox, en particulier du point de vue de la force ionique. L'ajout de cations dans le but de neutraliser la boîte de simulation n'est pas toujours innocent et il convient d'y consacrer une attention particulière dans le cadre d'études de propriétés d'oxydo-réduction.

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

#### 1. Introduction

Les réactions d'oxydations impliquant des cofacteurs organiques tels les quinones que nous venons d'étudier, les flavines ou les nicotinamides se résument rarement à de simples transfert d'électron. En effet, ces molécules peuvent non seulement accepter ou donner un ou deux électrons mais également un ou deux protons. Il est de fait courant de les retrouver dans les enzymes de type déshydrogénases, pour l'oxydation de substrats organiques de type alcool, amine, aldéhyde... Si les réactions globales au sein de ces protéines sont clairement identifiées, les mécanismes sous-jacents restent parfois sujets à débats. Les données expérimentales ne permettent pas toujours de trancher entre plusieurs hypothèses mécanistiques. Les études théoriques offrent une méthode alternative pour la compréhension de ces réactions enzymatiques en modélisant les différentes étapes et les différents mécanismes possibles.

Le flavocytochrome  $b_2$  (Fcb2 ou L-lactate cytochrome c oxydoreductase), étudié depuis de nombreuses années, (voir la revue récente de F. Lederer<sup>71</sup>) fait partie des flavoenzymes dont le mécanisme n'est pas complètement élucidé. Cette protéine, rencontrée dans l'espace intermembranaire mitochondrial de levures *Saccharomyces cerevisiae*, se compose de quatre monomères identiques comprenant chacun deux domaines (Figure 33). Elle participe au processus de respiration cellulaire et permet à la levure de croître en présence de L-lactate comme unique source de carbone. Les domaines orientés vers le cœur du complexe quaternaire catalysent l'oxydation du L-lactate en pyruvate par réduction d'une flavine mononucléotide (FMN) ancrée dans le site actif (Figure 34). La ré-oxydation du cofacteur FMN se fait par transfert d'électron vers l'hème contenu dans le second domaine, orienté vers l'extérieur de la protéine et dont la mobilité joue un rôle essentiel.<sup>72</sup> L'électron porté par l'hème est par la suite transféré à un cytochrome c. La partie flavoenzyme de cette protéine constitue un prototype de la famille des enzymes responsables de l'oxydation d'acides  $\alpha$ -hydroxylés en  $\alpha$ -cétoacides au sein de laquelle de nombreux acides aminés du site actif sont conservés.

III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

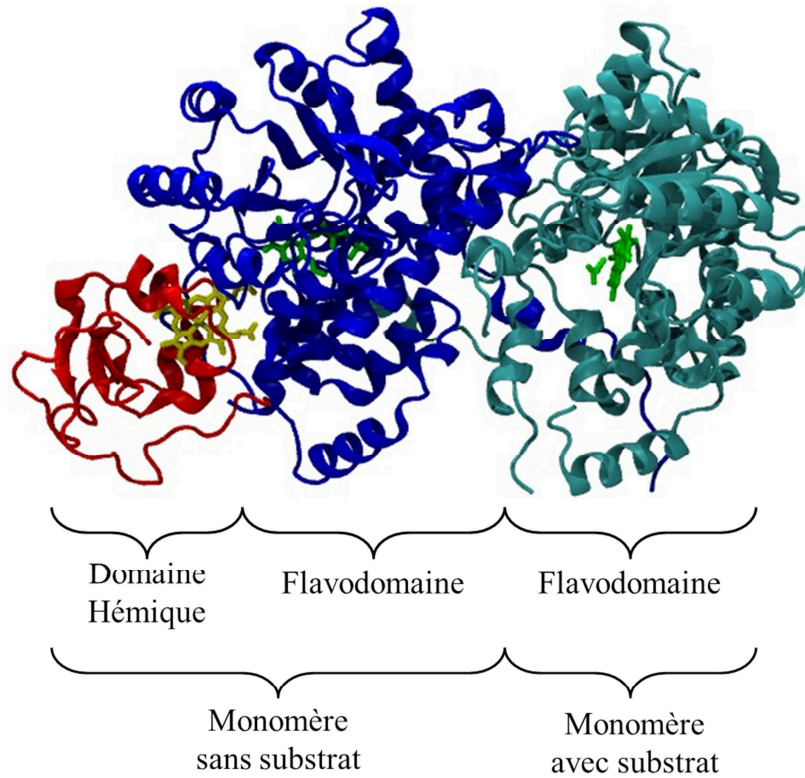


Figure 33 : structure cristallographique du Flavocytochrome  $b_2$  (code PDB 1KBI)<sup>73</sup> présentant deux monomères du complexe quaternaire. Un des monomères contient les deux domaines : le domaine hémique (rouge, hème en jaune) et le flavodomaine (bleu, FMN en vert) ; dans le second, le domaine hémique n'apparaît pas du fait de sa grande mobilité mais une molécule de pyruvate (vert) est présente dans le site actif.

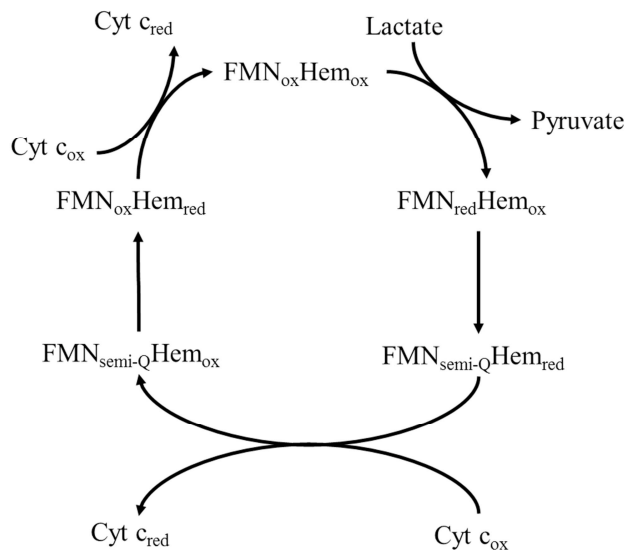
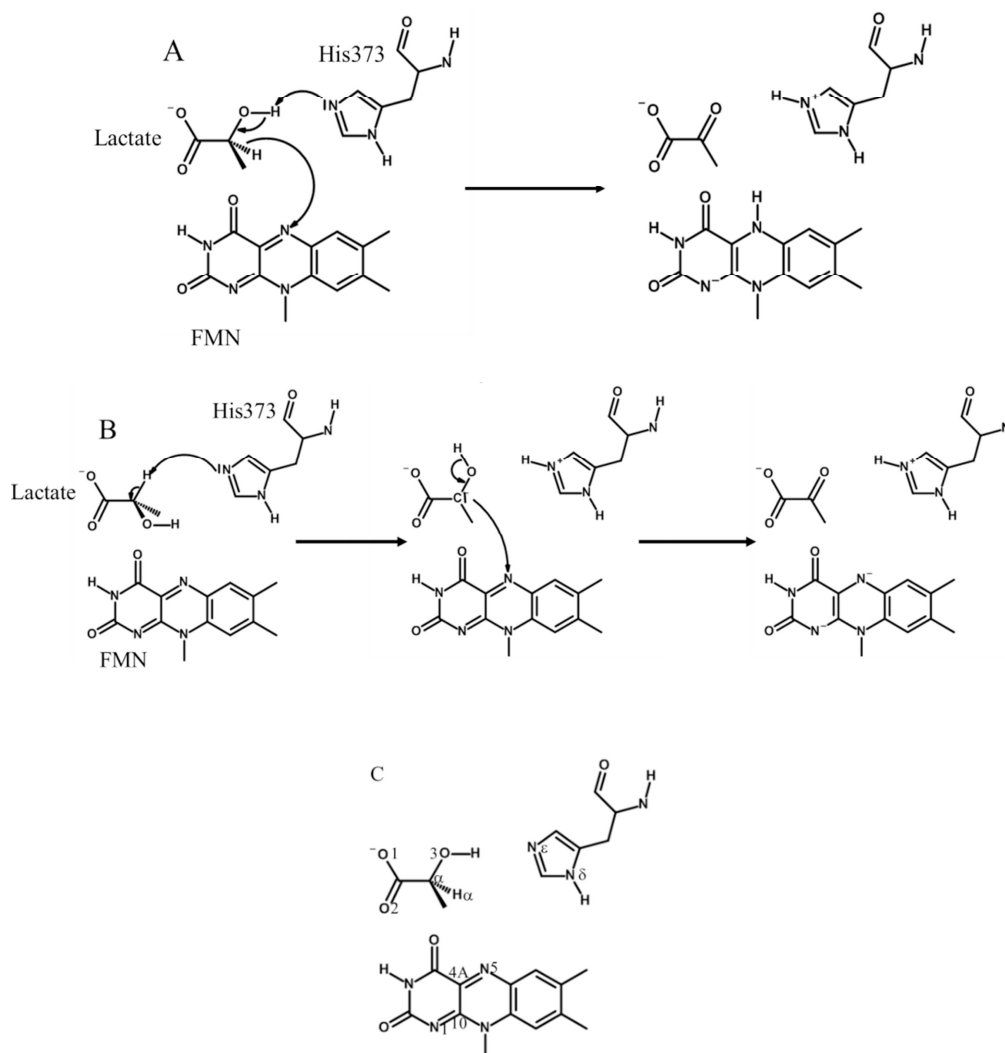


Figure 34 : cycle enzymatique complet du flavocytochrome  $b_2$  (Fcb2) comprenant l'oxydation du L-lactate en pyruvate et la réoxydation du cofacteur flavinique par deux transferts d'électron successifs au domaine hémique puis à une protéine de cytochrome c.

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

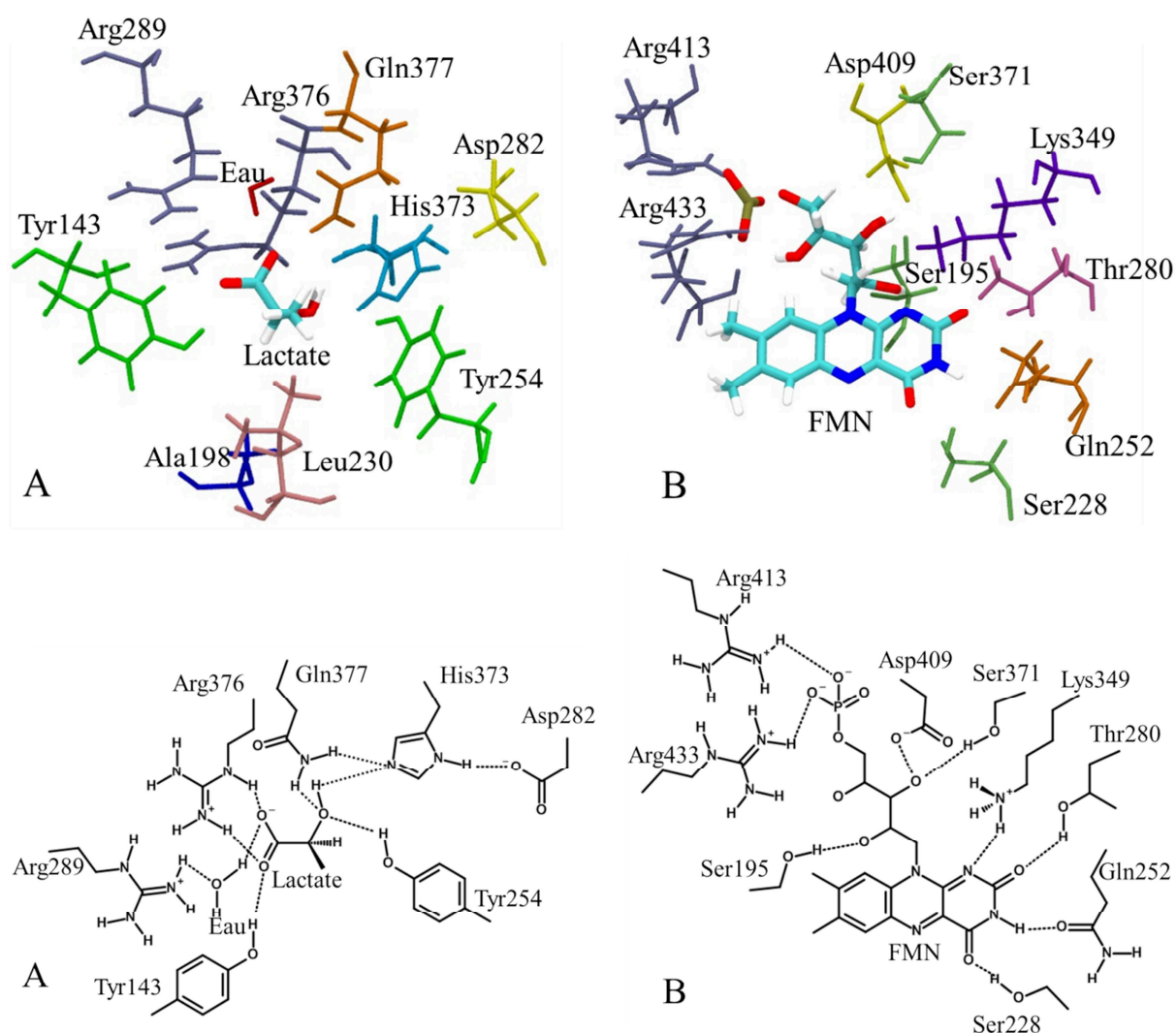
Toutefois, la question du mécanisme de cette conversion d'alcool en cétone par un transfert à deux protons et deux électrons n'est pas tranchée à ce jour, malgré de nombreuses études depuis quatre décennies. En effet, deux hypothèses existent : le premier mécanisme qualifié de type hydrure (Figure 35 A),<sup>74,75</sup> implique un transfert de proton depuis le groupement hydroxyle du L-lactate vers un acide aminé basique du site actif, l'histidine 373<sup>76-78</sup> et le transfert du proton  $\alpha$  en tant qu'hydrure vers la flavine ; le second mécanisme, dit de type carbanion (Figure 35 B),<sup>79,80</sup> suppose le transfert du proton  $\alpha$  du lactate vers cette même histidine ce qui conduit à la formation d'un carbanion, puis le transfert des deux électrons du lactate vers le cycle isoalloxazine de la flavine .



**Figure 35 : les deux hypothèses mécanistiques pour l'oxydation du L-lactate dans le site actif du Fcb2 : mécanisme de type hydrure (A) et de type carbanion (B) et numérotation des atomes (C).**

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

L'étude des effets cinétiques isotopiques sur le proton  $\alpha$  a montré que le transfert de celui-ci constitue l'étape cinétiquement déterminante de l'oxydation<sup>81,82</sup> mais il n'existe pas de preuve définitive de la nature de son accepteur, à savoir l'His373 ou la FMN. Des études de mutagénèses dirigées, d'inhibition de la protéine et de réactions inverses ont été menées afin d'élucider ce mécanisme et de mieux comprendre le rôle des acides aminés présents dans le site actif représentés dans la Figure 36.



**Figure 36 :** représentation tridimensionnelle (haut) et schématique (bas) des acides aminés présents autour du L-lactate (A) et de la FMN (B). Dans le schéma, seuls les acides aminés interagissant par liaison hydrogène ou interaction électrostatique sont dessinés.

Selon le cas, les résultats des différentes études expérimentales s'interprètent mieux par l'un ou l'autre des deux mécanismes. Ainsi, les réactions d'élimination sur le bromopyruvate ou de transhydrogénation du L-lactate tritié au bromopyruvate s'expliquent par un mécanisme de



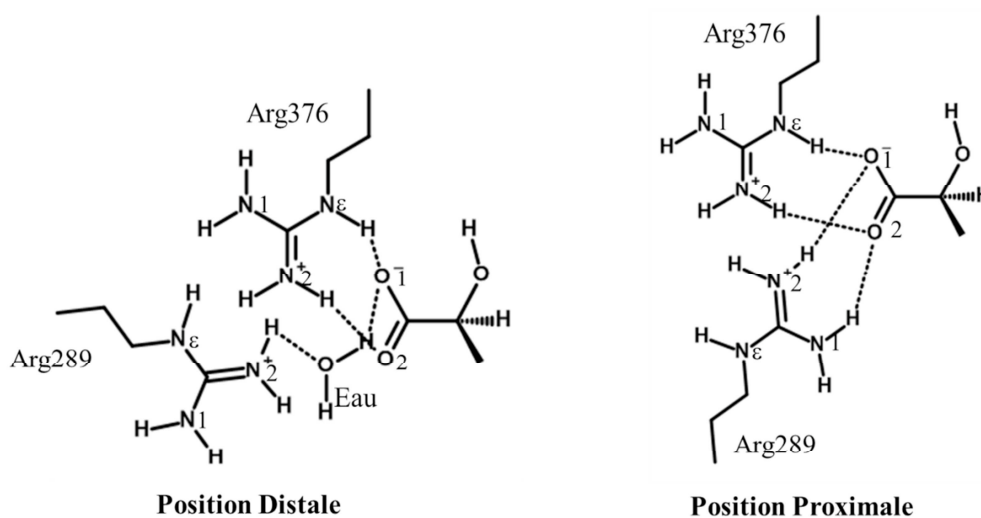
### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

type carbanion.<sup>83</sup> Un intermédiaire réactionnel pouvant correspondre au carbanion a par ailleurs été identifié dans une protéine proche, la L-mandélate deshydrogénase.<sup>84</sup> Cependant, les effets de la mutation de la Tyr254 en phénylalanine s'interprète dans le cadre du mécanisme hydrure.<sup>85</sup> De même, la réaction avec le L-mandélate, possible dans certains mutants, se fait uniquement par un mécanisme hydrure du fait des contraintes stériques.<sup>86</sup>

Une première étude théorique, menée à l'aide de dynamiques Car-Parinello au niveau DFT, a été publiée assez récemment.<sup>87</sup> Seul le mécanisme de type hydrure est présenté, la conformation favorable au carbanion n'ayant pu être optimisée. S'appuyant sur la structure cristallographique de l'enzyme sauvage exprimée dans *Saccharomyces cerevisiae* (code PDB 1FCB<sup>88</sup>), ces simulations comprennent jusqu'à 171 atomes du site actif (substrat, cofacteurs, acides aminés et molécules d'eau). L'équipe de Tabacchi obtient une barrière de 12,1 kcal/mol (comparable aux valeurs expérimentales de 13,5-13,6 kcal/mol) pour un mécanisme concerté mais asynchrone du transfert de proton depuis l'hydroxyle vers l'histidine puis du transfert d'hydrure vers la FMN. Bien que l'énergie d'activation obtenue correspond bien aux valeurs expérimentales, ces simulations présentent le défaut de ne pas prendre en compte l'ensemble de la protéine dans le calcul ni les effets dus au solvant.

Nous nous proposons donc de compléter cette étude par des simulations de dynamiques moléculaires QM/MM réalisées à l'aide des outils développés au sein du groupe de chimie théorique de l'université Jaume I de Castellon de la Plana, dans le cadre d'une co-tutelle de mon travail de thèse. Cette étude a été par ailleurs menée en étroite collaboration avec Florence Lederer du laboratoire de Chimie Physique. Contrairement au sujet précédent, le problème de la méthode n'est pas le point central de ce travail, les méthodologies employées ayant été développées et largement utilisées par le groupe de V. Moliner.<sup>89</sup> Nous souhaitons ici plutôt nous concentrer sur des problématiques biochimiques, afin de contribuer à l'élucidation du mécanisme du Fcb2. Dans notre modèle, la protéine est entièrement solvatée ce qui permet de prendre en compte les influences de l'ensemble des acides aminés et des molécules d'eau du solvant sur la réaction. La structure cristallographique de départ est celle de la protéine de levure (code PDB : 1KBI<sup>73</sup>) comprenant deux monomères, l'un contenant les deux domaines, l'autre contenant une molécule de pyruvate au sein du site actif mais dont le domaine hémique est absent du fait de sa mobilité. Comme ce dernier domaine ne joue pas de rôle dans l'oxydation du lactate, comme l'indique les études menées en présence du flavodomaine seul, nous avons décidé de ne

considérer que celui-ci et de partir de la structure stabilisant le L-lactate. Les deux mécanismes ont été envisagés ainsi que des modifications (de conformation et mutations) du site actif. Ainsi, l'Arg289 présente deux positions possibles vis-à-vis du carboxylate du L-lactate dans les structures cristallographiques : soit une molécule d'eau est présente en interaction avec cette arginine et le carboxylate ce qui maintient le groupement guanidinium en position dite distale, c'est-à-dire superposée à l'Arg376 et ne pouvant stabiliser directement le carboxylate, soit cette molécule est absente et l'Arg289 se tourne en position proximale, dans laquelle sa charge positive fait face au carboxylate (Figure 37).



**Figure 37 :** représentation schématique des deux positions possibles de l'arginine 289 au sein du site actif. La notation des atomes d'azote des arginine est rappelée.

Deux mutations ont par ailleurs retenu notre attention : le mutant Y254L et le mutant D282N, dont les effets sur les vitesses de réactions apparaissent expérimentalement suffisamment importants pour être clairement identifiés par les méthodes que nous souhaitons utiliser. Enfin, nous nous sommes penchés sur la catalyse de l'oxydation du L-lactate et du L-mandélate dans le double mutant A198G/L230A. L'ensemble de ces effets ont pu être étudiés dans le modèle du mécanisme de type hydrure mais le mécanisme de type carbanion pose certains problèmes, présentés à la fin de cette partie.

## ***2. Mécanisme de type hydrure : méthode***

Nous nous intéressons dans ce chapitre au chemin suivi par le système pour passer du réactif au produit et pas seulement à la différence d'énergie entre ces deux états, contrairement au

### *III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2*

cas des calculs de potentiel redox. Il nous faut donc pouvoir évaluer l'énergie libre du système tout au long de coordonnées de réaction soigneusement choisies pour décrire le mécanisme envisagé afin de déterminer le ou les états de transitions, la hauteur de la ou des barrières d'activation etc...

#### *a. Préparation du système*

Pour nos simulations QM/MM, nous avons sélectionné la chaîne notée B de la structure cristallographique 1KBI, ainsi que les molécules d'eau de cristallisation associées. Une molécule de pyruvate se trouve dans le site actif de ce monomère, apportant des indications quant à la position probable du L-lactate dans le fcb2. Une boucle de huit acides aminés, absente dans la structure cristallographique, a été reconstruite dans notre système. Le pyruvate a été transformé en L-lactate, en conservant la position du carboxylate et l'orientation globale de la molécule. L'ajout des atomes d'hydrogène se fait par le programme fDYNAMO<sup>90</sup> après vérification de l'état de protonation des acides aminés acides et basiques à l'aide du programme propKa.<sup>58-61</sup> Ensuite, six contre-ions sodium ont été disposés de manière optimale autour de la protéine afin d'assurer la neutralité du système. Enfin, l'ensemble protéine-ions a été solvaté dans une boîte d'eau cubique de 130 Å de côté. L'énergie de ce système est d'abord minimisée au niveau classique, puis des simulations de dynamiques moléculaires des différentes parties du système sont successivement réalisées afin de relaxer l'ensemble du système. La boîte ainsi équilibrée sert de point de départ à nos différentes études et son site actif est modifié selon les besoins : changement conformationnel, mutation, modification du substrat.

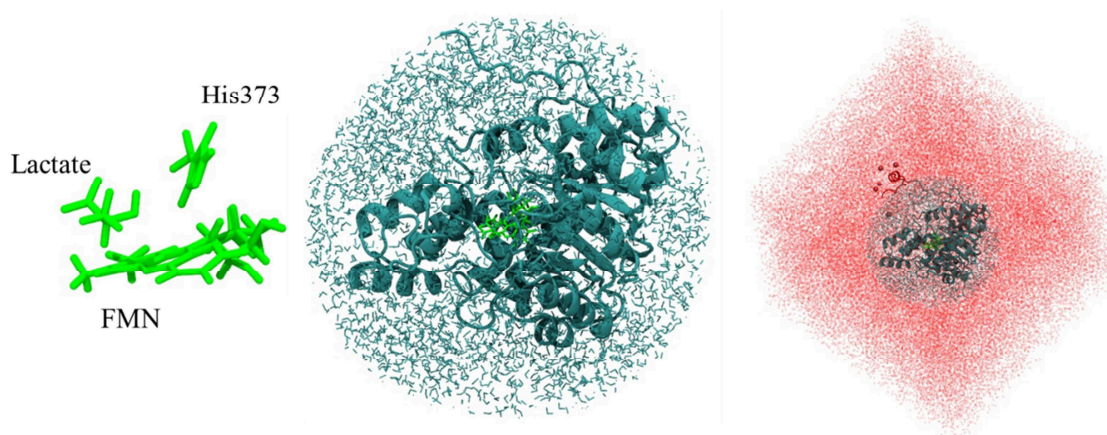


Figure 38 : découpage QM et MM du modèle du flavodomaine du Fcb2 en solution : la partie QM (en vert à gauche) comprend le substrat, le cofacteur FMN dans son intégralité et la chaîne latérale de l'histidine 373 ; dans un rayon de 30 Å autour de la partie quantique, les atomes sont définis au niveau classique et sont mobiles (en cyan, milieu) ; enfin le reste de la boîte est figé (rouge, droite). La protéine est représentée en structure secondaire, les molécules d'eau par des bâtonnets et les cations  $\text{Na}^+$  par des sphères de Van der Waals.

La partie quantique du système comprend le substrat, la FMN dans son intégralité, et la chaîne latérale de l'His373. Le reste du système est modélisé au niveau classique, par un champ de force OPLS-AA<sup>91</sup> pour la protéine et TIP3P<sup>92</sup> pour les molécules d'eau. Les conditions périodiques ne sont pas employées et les atomes situés à plus de 30 Å de la partie quantique sont gelés suite à l'équilibration du système (Figure 38). Les interactions non-covalentes sont prises en compte dans un rayon de 15 Å. Le calcul de l'énergie QM/MM s'appuie sur un schéma de type additif dans lequel les contributions électrostatiques de la partie classique polarisent le calcul quantique par *electrostatic embedding*. La frontière entre les parties quantique et classique de l'His373 est traitée par la méthode de l'atome hydrogène de liaison dans les calculs au niveau quantique. Le programme fDYNAMO gère l'interface entre la partie classique et les programmes de chimie quantique pour les calculs d'énergie, d'optimisation de géométrie et de dynamiques moléculaires réalisés au cours de ce chapitre.

A partir de notre système équilibré au niveau classique, dont le site actif a été éventuellement modifié, des dynamiques QM/MM de 500 ps (pas de temps de 0,5 fs) ont été réalisées afin de relaxer la partie mobile du système, en particulier la partie quantique. Cette dernière est modélisée par la méthode semi-empirique AM1 (*Austin Model 1*),<sup>93</sup> présente dans le programme MOPAC.<sup>49</sup>

b. Obtention des surfaces d'énergie potentielle

Une première étape de ce travail consiste à établir une surface d'énergie potentielle (SEP) pour l'ensemble des deux transferts supposés dans le mécanisme de type hydrure dans un système donné. Pour chacun de ces transferts, une coordonnée de réaction peut être définie, à savoir la combinaison linéaire antisymétrique des deux distances atome lourd-hydrogène impliquées dans chaque réaction, comme indiqué dans la Figure 39 et les équations 1 et 2 :

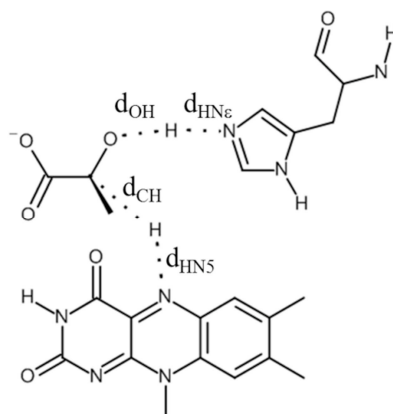


Figure 39 : distances utilisées dans les coordonnées réactionnelles  $CR_{proton}$  ( $d_{OH}$  et  $d_{HN\epsilon}$ ) et  $CR_{hydrure}$  ( $d_{CH}$  et  $d_{HN5}$ ).

$$CR_{proton} = d_{OH} - d_{HN\epsilon} \quad 16$$

$$CR_{hydrure} = d_{CH} - d_{HN5} \quad 17$$

où CR signifie coordonnée de réaction.

Pour simplifier les notations dans la suite de ce chapitre, le transfert depuis l'hydroxyle vers l'His373 et celui de l'hydrogène  $\alpha$  vers le N5 de la flavine seront notés respectivement transfert de proton et transfert d'hydrure, sans que la nature exacte de l'espèce transférée soit étudiée. En contraignant l'une de ces coordonnées et en optimisant la géométrie du système au niveau QM/MM, nous obtenons un profil d'énergie potentielle pour un transfert. Ce profil ne constitue pas un chemin de réaction pertinent en l'état puisque les différentes géométries ne sont pas reliées par une contrainte contrairement au cas d'un profil Nudged Elastic Band,<sup>45,94,95</sup> et il ne découle pas de la détermination de l'état de transition et des modes de vibrations sur lesquels s'effectue la réaction contrairement à un calcul de coordonnée de réaction intrinsèque.<sup>96</sup> Il apporte toutefois une première idée du mécanisme et une base sur laquelle appuyer la suite de nos calculs. Comme nous avons deux coordonnées de réaction, soit deux dimensions, chacune associée sans

équivoque soit au transfert de proton de l'hydroxyle du lactate vers l'His373 soit au transfert de l'hydrogène  $\alpha$  vers la FMN, nous pouvons contraindre chaque coordonnée et obtenir une surface d'énergie potentielle. Celle-ci permet d'avoir une première idée de l'ordre des étapes, leur caractère séquentiel ou concerté, et d'éventuelles structures intermédiaires. En faisant varier les combinaisons des distances de  $-1,8$  à  $1,5$  Å pour la coordonnée du transfert de proton et de  $-2$  à  $2$  Å pour la coordonnée du transfert d'hydrure et en optimisant la géométrie tous les  $0,05$  Å, nous devons calculer une grille d'énergie de 5427 points (Figure 40).

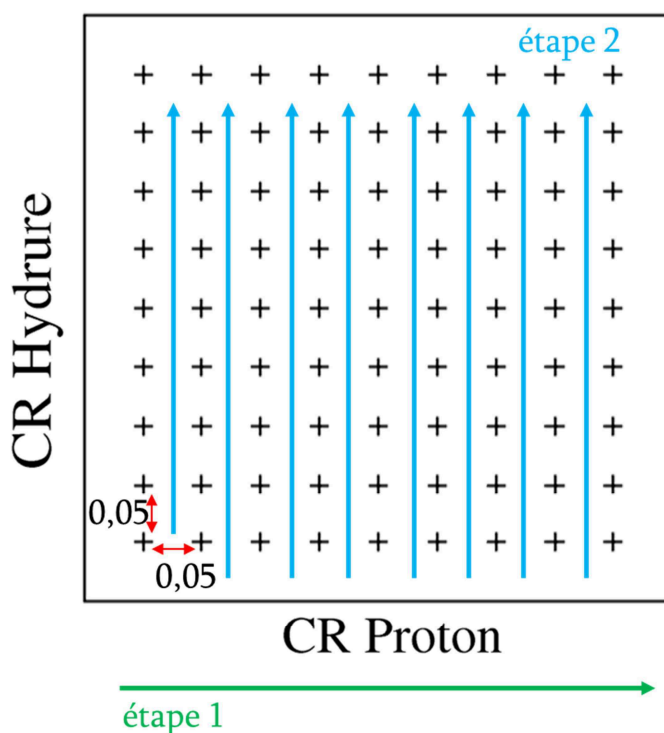
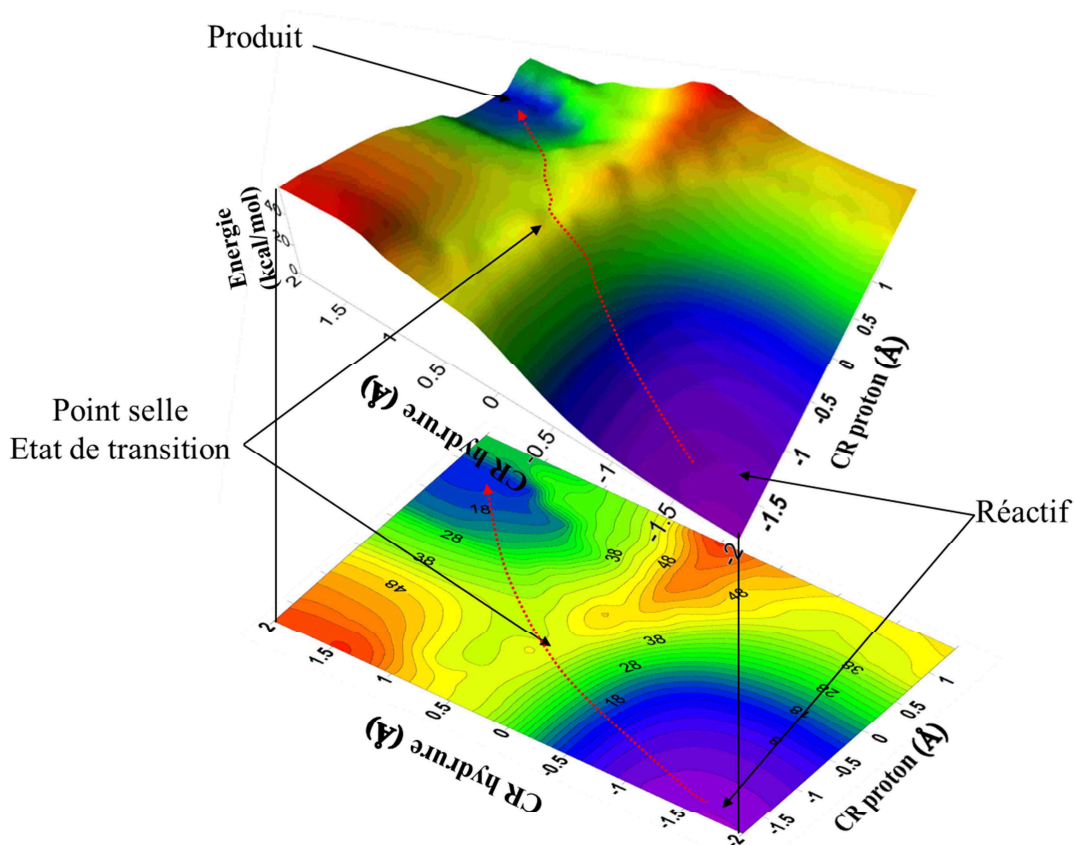


Figure 40 : construction de la surface d'énergie potentielle à deux dimensions. Lors de la première étape (flèche verte) des géométries sont optimisées le long de la coordonnée de réaction associée au transfert de proton tous les  $0,05$  Å. A partir de ces structures, de nouvelles optimisations sont réalisées le long de la coordonnée de réaction associée au transfert d'hydrure tous les  $0,05$  Å (étape 2, flèches bleues).

Les potentiels harmoniques de contraintes de chaque coordonnée imposent la valeur choisie de la combinaison antisymétrique avec une constante de force de  $2400$  kcal/mol/Å<sup>2</sup>. Afin de limiter le coût de calcul pour l'ensemble de ces optimisations QM/MM, celles-ci se font au niveau AM1/MM. La courbe n'est pas tracée en énergie absolue mais relativement au point  $(-1,8$  Å ;  $-2$  Å) pour les coordonnées proton et hydrure respectivement. Ce point, situé dans la zone du réactif, correspond tout simplement au premier calcul effectué. La surface d'énergie obtenue se

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

représente en trois dimensions ou en deux dimensions, les différentes valeurs d'énergies correspondant aux courbes de niveaux (Figure 41). Dans la suite, nous ne donnerons que les projections en deux dimensions, plus lisibles.



**Figure 41 :** exemple de surface d'énergie représentée en deux et trois dimensions. La notation CR proton correspond à la coordonnée associée au transfert de proton depuis le groupement hydroxyle du L-lactate vers le Nε de l'His373 et la notation CR hydrure à la coordonnée de réaction du transfert de l'hydrogène α vers le N5 de la flavine. Les états réactifs, produits et de transition ainsi qu'un ou plusieurs chemin(s) réactionnel(s) peuvent être identifiés.

. La surface obtenue permet d'identifier différents chemins et états de transitions (le réactif et le produit étant connus), mais du point de vue statique, sans prendre en compte les fluctuations du système autour du point d'équilibre. Les SEP restent insuffisantes pour décrire le comportement thermodynamique du système et apporter des résultats comparables à l'expérience. L'aspect dynamique du système n'est pas traduit et l'énergie libre associée au système dans une conformation donnée n'est pas quantifiée.

c. Obtention du potentiel de force moyenne

Pour obtenir une surface en énergie libre, l'échantillonnage de l'espace des phases est nécessaire. Toutefois, il s'agit ici de visualiser l'ensemble des conformations pouvant être visitées lors du transfert des deux noyaux et d'en estimer l'énergie libre  $F$ . Cette grandeur, déterminée à partir de la fonction de partition du système  $Q$  dans l'ensemble thermodynamique  $(N, V, T)$  :

$$F = -kT \ln Q \quad 18$$

où  $k$  est la constante de Boltzmann et  $T$  la température.

Elle dépend de la probabilité de trouver ce système dans un état donné, ce qui requiert l'échantillonnage de l'espace des phases accessible au système. Si une coordonnée de réaction particulière est choisie pour le processus chimique simulé, l'énergie libre peut s'écrire en fonction de la densité de probabilité de trouver le système dans un état satisfaisant une valeur de la coordonnée réactionnelle  $q$  :

$$F(q) = -kT \ln Q_p(q) \quad 19$$

le terme  $Q_p$  correspond alors à une fonction de partition partielle du système où le degré de liberté associé à la coordonnée  $q$  est supprimé en contraignant la valeur de celle-ci :

$$Q_p = \int \delta(q - q(r^N)) \exp\left(-\frac{U(r^N)}{kT}\right) dr^N \quad 20$$

où  $U(r^N)$  est l'énergie potentielle du système pour une configuration donnée des  $N$  degrés de liberté notée  $r^N$ .

Dans ce cas la densité de probabilité de trouver le système à une valeur donnée de la coordonnée de réaction s'écrit :

$$\rho(q) = \frac{Q_p}{Q} \quad 21$$

ce qui permet d'écrire l'énergie libre en fonction de la densité de probabilité associée à la coordonnée de réaction comme :

$$F(q) = -kT \ln \rho(q) + C_1 \quad 22$$

Avec  $C_1$  une constante liée à  $Q$ , indépendante de la valeur de la coordonnée de réaction.

La modification de l'énergie libre le long d'une coordonnée réactionnelle est appelée potentiel de force moyenne (PFM) et permet d'atteindre des grandeurs telles que l'énergie d'activation d'une réaction chimique.<sup>97</sup>



### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

Plusieurs méthodes permettent d'obtenir des différences d'énergies libre telles les techniques de perturbation et d'intégrations thermodynamique ou d'*umbrella sampling*.<sup>98</sup> Les deux premières ont été présentées et utilisées dans la première partie de cette thèse, la dernière, que nous allons expliciter par la suite, représente une méthode de choix dans l'étude du mécanisme du Fcb2.

La méthode d'*umbrella sampling* utilise un potentiel de biais dépendant de la coordonnée de réaction pour atteindre des conformations intéressantes, mais peu visitées, du système. Ce biais prend la plupart du temps la forme d'un potentiel  $V_b$  de type harmonique autour d'une valeur de la coordonnée de réaction  $q_0$  :

$$V_b = k(q - q_0)^2 \quad 23$$

A chacune de ces valeurs de la coordonnée de réaction va correspondre une fenêtre de simulation de dynamique moléculaire biaisée. La densité de probabilité biaisée  $\rho_b$  autour d'une valeur de la coordonnée de réaction s'écrit alors :

$$\rho_b(q) = \frac{\int \delta(q - q(r^N)) \exp\left(-\frac{U(r^N) + V_b(r^N)}{kT}\right) dr^N}{\int \exp\left(-\frac{U(r^N) + V_b(r^N)}{kT}\right) dr^N} \quad 24$$

ou plus simplement, en factorisant par le potentiel de biais ne dépendant que de la coordonnée  $q$ , dont la densité de probabilité est à déterminer, et en multipliant au numérateur et au dénominateur par  $Q$ :

$$\rho_b(q) = \frac{\exp\left(-\frac{V_b(r^N)}{kT}\right) \rho(q) Q}{Q_b} \quad 25$$

Avec  $Q_b$  la fonction de partition du système soumis au potentiel de biais.

Le potentiel de force moyenne devient alors :

$$\begin{aligned} F(q) &= -kT \ln \rho(q) + C_1 \\ &= -kT \ln \rho_b(q) - V_b(q) + C_2 \end{aligned} \quad 26$$

La méthode d'*umbrella sampling* permet d'obtenir la densité de probabilité  $\rho_b$  au cours des dynamiques biaisées. Il n'en demeure pas moins que la constante  $C_2$  reste une inconnue ce qui empêche l'obtention directe de l'énergie libre.

Pour pallier ce problème, nous avons utilisé la méthode WHAM (*Weighted Histogram Analysis Method*).<sup>99</sup> Un poids  $w$  est attribué à la fonction de distribution de la coordonnée de réaction dans les  $N_f$  fenêtres de simulation afin de calculer la densité de probabilité totale :

$$\rho(\mathbf{q}) = \sum_{i=1}^{N_f} w_i \rho_{bi}(\mathbf{q})$$

27

Ces poids doivent respecter une condition de normalisation et minimiser l'erreur statistique sur la densité de probabilité totale. Ils dépendent du potentiel de biais et de la constante  $C_2$  dans la fenêtre considérée.

Les valeurs de ces constantes et de la densité de probabilité non-biaisée sont alors déterminées de manière itérative : à partir d'un premier jeu de constantes, une densité de probabilité est calculée, servant elle-même à déterminer de nouvelles constantes et ainsi de suite jusqu'à convergence de la densité totale.

Dans le cadre de l'étude du mécanisme de type hydrure, nous avons déterminé les coordonnées de réactions ainsi que les fenêtres de simulations lors du calcul des SEP. Des simulations de dynamiques moléculaires biaisées de 30 ps dont 10 ps d'équilibration (pas de simulation de 0,5 fs) ont été réalisées à partir des géométries optimisées pour chaque point de la grille soit un total de 5427 fenêtres (plus de 100 ns de simulations utilisées au total). L'ensemble de ces dynamiques moléculaires est simulé au niveau AM1/MM. La constante de force utilisée dans le potentiel de biais est de 600 kcal/mol/Å<sup>2</sup>. La valeur de chaque coordonnée de réaction est relevée à chaque pas de dynamique. La méthode WHAM est appliquée à l'ensemble des données.

### **3. Mécanisme de type hydrure : Résultats**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au mécanisme de type hydrure à partir de la structure cristallographique non modifiée du Fcb2. Tout d'abord, nous avons comparé les courbes d'énergies libre et potentielle à différents niveaux de théorie afin de constater les effets de la correction DFT de l'énergie AM1 et de la prise en compte de la dynamique de la protéine. Par la suite, les contributions des différents acides aminés au mécanisme enzymatique sont décrites à l'aide de simulations de dynamique moléculaire puis par l'analyse des effets de diverses transformations du site actif (changement de conformation, mutation, modification du substrat...).

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

#### a. Etude de l'enzyme sauvage

Notre première étude concerne donc la simulation du mécanisme de type hydrure en présence de la molécule d'eau de cristallisation à proximité de l'Arg289, la contraignant dans une position distale vis-à-vis du lactate (Figure 42). Après la première dynamique de relaxation du système au niveau AM1/MM, la molécule d'eau ne s'est pas déplacée et est toujours en interaction avec le groupement carboxylate du lactate et l'Arg289. Le substrat se maintient par ailleurs au sein du site actif par liaisons hydrogènes avec l'Arg376, les tyrosines 143 et 254. Le groupement hydroxyle du L-lactate se positionne de manière satisfaisante pour le transfert de son proton vers le N $\epsilon$  de l'His373. Une première série d'optimisations de géométrie est réalisée en contraignant uniquement la coordonnée associée au transfert de ce proton. A partir des structures obtenues, de nouveaux calculs d'optimisation sont effectués en imposant la valeur des deux coordonnées de réaction. La Figure 43 représente la valeur relative au point (-1,8 ; -2) de l'énergie potentielle AM1/MM du système total pour chaque jeu de contrainte.

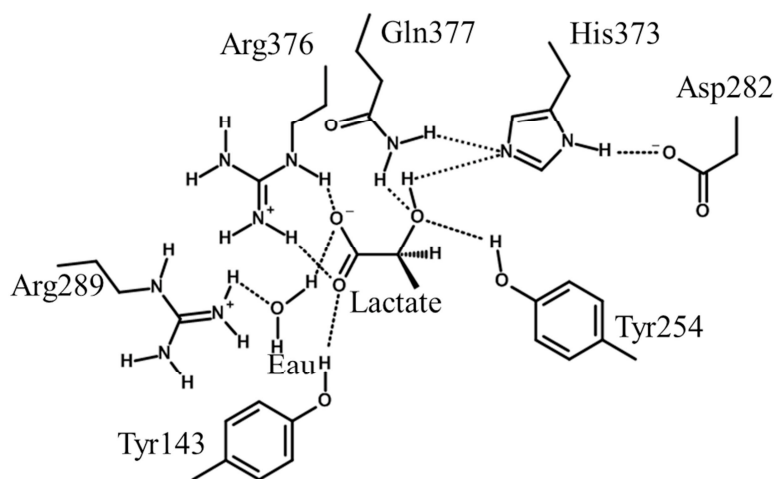


Figure 42: représentation du site actif autour du L-lactate en présence de la molécule d'eau de cristallisation contraignant l'arginine 289 en position distale.

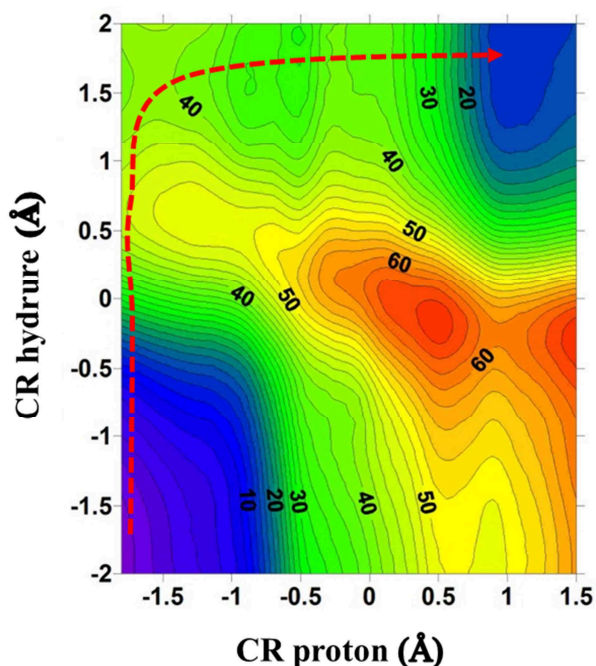


Figure 43 : surface d'énergie potentielle AM1/MM pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position distale.

Selon cette SEP, le mécanisme d'oxydation se déroulerait de la façon suivante : tout d'abord l'hydrure  $\alpha$  est transféré vers la flavine suivi du transfert de proton du groupement hydroxyle vers l'histidine. Ce résultat se trouve en contradiction avec les chemins obtenus lors des précédentes études théoriques menée par Tabacchi *et al.*<sup>87</sup> Cependant la barrière extrêmement élevée de ce mécanisme (entre 40 kcal/mol et 50 kcal/mol) interdit de l'envisager comme modèle de réaction enzymatique : soit l'énergie AM1 surestime l'énergie d'activation requise et donne une mauvaise représentation de la SEP correspondant au système, soit ce mécanisme ne peut se produire.

Dans un second temps, nous avons apporté une correction calculée au niveau DFT à l'ensemble de la courbe (Figure 44). Ces calculs permettent de pallier partiellement aux imprécisions des énergies AM1. Pour ce faire, les géométries optimisées au niveau AM1/MM de la partie quantique sont extraites de points de la grille, avec un intervalle de 0,2 Å entre chaque point. L'énergie de ces structures est calculée en phase gaz au niveau AM1 ( $E_{AM1}^{QM}$ ) et au niveau DFT ( $E_{M06}^{QM}$ ) avec la fonctionnelle M06-2X<sup>100</sup> et la base 6-31+g(d,p)<sup>101,102</sup> avec le programme Gaussian09.<sup>103</sup> L'énergie totale QM/MM corrigée  $E_{corr}$  correspond alors à l'énergie AM1/MM

dans laquelle l'énergie interne du système quantique est calculée au niveau DFT et non plus au niveau AM1 :

$$E_{corr} = E_{AM1/MM} + E_{M06}^{QM} - E_{AM1}^{QM} \quad 28$$

Cette correction suppose que la géométrie obtenue en AM1 ne diffère guère de la géométrie que l'on obtiendrait par un calcul DFT/MM. En revanche, le calcul de l'énergie interne au niveau DFT améliore la précision notamment dans les zones de transferts de charge. La fonctionnelle utilisée a été optimisée pour reproduire la thermochimie des éléments du groupe principal, la hauteur des barrières de réaction et les interactions non-covalentes.

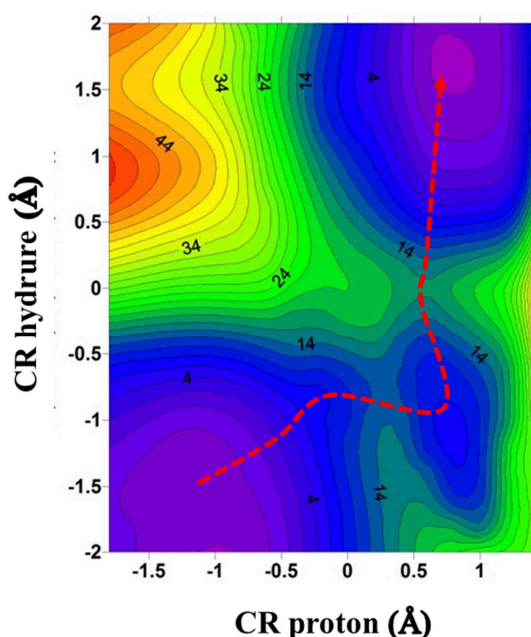


Figure 44 : surface d'énergie potentielle AM1/MM comprenant l'énergie de la partie quantique en phase gazeuse corrigée au niveau M06-2X/6-31+g(d,p) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position distale.

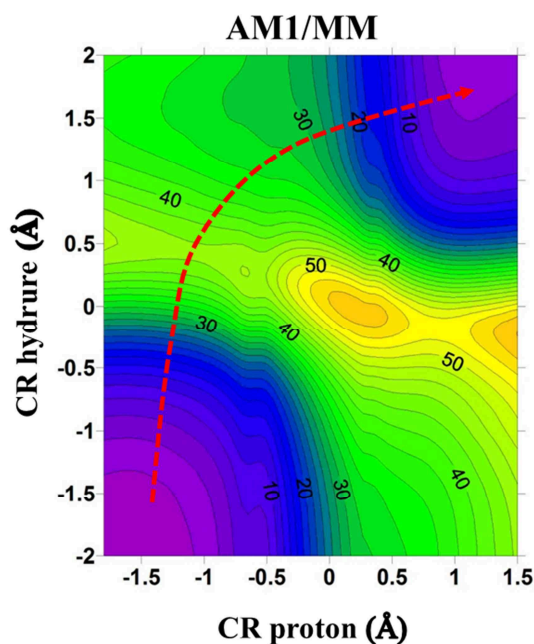
Cette SEP corrigée diffère de la surface AM1/MM. En effet le chemin réactionnel décrit par cette seconde courbe débute par le transfert de proton vers l'histidine, atteint un état intermédiaire (minimum d'énergie vers (0,75 Å ; -1 Å)), puis le second noyau d'hydrogène est transféré vers la FMN. L'énergie d'activation requise est alors d'une quinzaine de kcal/mol. Ce résultat apparaît bien plus satisfaisant que le précédent. Tout d'abord, la barrière possède une hauteur en accord avec l'expérience.<sup>87</sup> De plus, nous retrouvons un processus similaire à celui décrit grâce à l'étude des dynamiques Car Parinello et des données expérimentales suggèrent que la rupture de la liaison O-H s'effectue en amont du transfert de l'hydrogène  $\alpha$ . Néanmoins, les

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

deux étapes du mécanisme présentent une énergie d'activation similaire alors que les effets cinétiques isotopiques primaires expérimentaux impliquent le départ de l'hydrogène  $\alpha$  dans l'étape cinétiquement déterminante. La SEP corrigée corrèle par conséquent mieux les résultats expérimentaux. Une correction au niveau DFT de l'énergie AM1 améliore nos résultats et s'avère indispensable à l'exploitation de nos surfaces d'énergie.

Des modifications similaires ont été décrites précédemment pour la réaction de réduction du pyruvate en L-lactate au sein de la L-lactate déshydrogénase.<sup>104</sup> Dans ce système l'application de la correction calculée au niveau MP2 (théorie de la perturbation Møller-Plesset) à la surface d'énergie potentielle AM1/MM modifie le chemin réactionnel et diminue la barrière d'une vingtaine de kcal/mol. Au niveau semi-empirique, le chemin le plus stable débute par le transfert de proton et se termine par le transfert d'hydrure tandis que l'ordre de ces deux étapes est inversé sur le chemin obtenu sur la surface corrigée. Les résultats corrigés sont davantage en accord avec les données expérimentales. En comparant ce travail avec nos SEP, il semble que la méthode AM1 stabilise davantage la forme cationique du L-lactate oxydé que la forme anionique du L-lactate réduit au contraire des méthodes quantique (DFT ou MP2).

Afin d'obtenir une cartographie de la réaction en énergie libre, nous avons par la suite déterminé le potentiel de force moyenne associé à la réaction (Figure 45). Dans les calculs AM1/MM, la première étape du mécanisme le moins coûteux en énergie demeure le transfert d'hydrure suivi du transfert de proton, que ce soit en énergie potentielle ou en énergie libre.

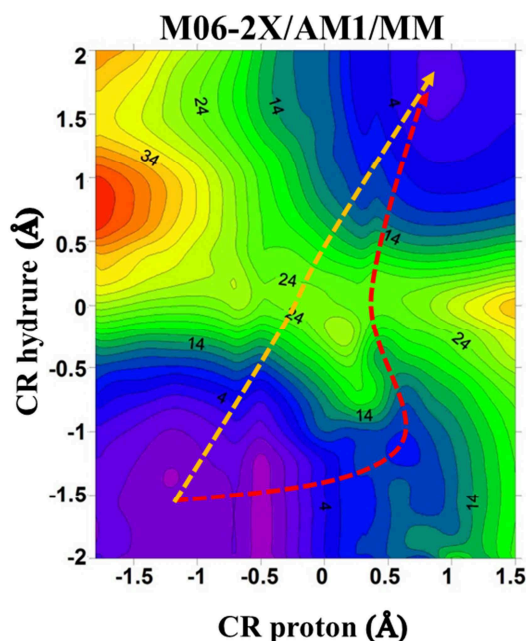


**Figure 45 :** surface de potentiel de force moyenne (PFM) au niveau AM1/MM pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position distale.

Tout comme dans le cas des énergies potentielles, l'énergie AM1 peut être corrigée à un niveau de théorie plus élevé. Plutôt que de recalculer l'énergie en phase gaz du sous-système quantique le long des dynamiques, la méthode proposée par Pernia *et al*<sup>105</sup> revient à déterminer des fonctions de *spline*  $S$  interpolant la correction obtenue pour les SEP sur l'ensemble de la surface. Ces courbes comprennent la différence entre énergie interne calculée en DFT et au niveau AM1 et il suffit alors de les ajouter à la surface de PFM établie au niveau AM1/MM  $F_{AM1/MM}$  pour obtenir une surface corrigée M06-2X/AM1/MM  $F_{corr}$  :

$$F_{corr} = F_{AM1/MM} + S(E_{M06}^{QM} - E_{AM1}^{QM}) \quad 29$$

Après application de la correction au niveau DFT au PFM AM1/MM, nous obtenons la surface de la Figure 46. Ces surfaces diffèrent de celles en énergie potentielle, mais pas de façon à modifier radicalement les chemins déjà décrits dans les SEP. Ainsi, le chemin décrit au niveau AM1 débute par un transfert d'hydrure suivi d'un transfert de proton ne coûtant pas d'énergie supplémentaire, tandis que la surface corrigée ordonne ces étapes dans l'ordre inverse. Tout comme dans le cas des SEP, et pour les mêmes raisons, nous considérons que la surface corrigée offre une meilleure description du mécanisme de transfert d'hydrure que le PFM AM1/MM. Dans la suite de cette partie, seules les surfaces corrigées seront en conséquence discutées.



**Figure 46 :** surface de potentiel de force moyenne (PFM) corrigée au niveau DFT pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position distale.

Sur la surface de PFM corrigée (Figure 46), nous pouvons distinguer deux cols d'énergie libre énergétiquement proches auxquels correspondent deux états de transitions différents : le premier autour de (0,5 Å ; 0,1 Å) et le second vers (-0,5 Å ; 0,1 Å). A chacune de ces géométries de transition nous pouvons associer un chemin réactionnel permettant de passer du réactif au produit : le chemin rouge, passant par le point (0,5 Å ; 0,1 Å), impliquant le transfert du proton avant celui d'hydrure, et le chemin jaune, passant par le point (-0,5 Å ; 0,1 Å), pour lequel les deux transferts sont concertés.

Le chemin rouge est assez proche de celui d'énergie minimale décrit dans la SEP corrigé. Il s'en distingue cependant d'état intermédiaire stable après la rupture de la liaison O-H. Ce transfert de proton requiert ici une énergie d'activation de 12 à 13 kcal/mol. Un plateau d'énergie est atteint pour la géométrie au produit du transfert de proton dans lequel l'His373 est positivement chargée et le groupement hydroxyle du L-lactate déprotoné. A partir de ce plateau, l'énergie libre requise pour transférer l'hydrure est d'environ 18 kcal/mol. L'énergie d'activation totale pour le transfert d'hydrure est alors exactement de 29,5 kcal/mol. Celle-ci semble bien trop élevée pour correspondre à l'oxydation du lactate au sein du Fcb2. Toutefois, en découpant le mécanisme en deux transferts séquentiels, nous obtenons des barrières nettement plus raisonnables. Le mécanisme peut alors être décrit de cette manière : dans un premier temps, le



### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

transfert de proton se déroule ; puis, l'hydrogène  $\alpha$  se rapproche du N5 de la flavine et se transfère du L-lactate à la FMN. La rupture de la liaison C-H correspond alors bien à l'étape cinétiquement déterminante requérant préalablement le transfert de proton hydroxyle du substrat vers l'histidine. Le site actif doit alors se trouver dans une configuration adéquate au transfert d'hydrure pour que celui-ci se produise.

Par ailleurs un deuxième chemin (en orange dans la Figure 46) se révèle possible, présentant une barrière de hauteur de 29,8 kcal/mol et qui procède par le départ concerté des deux protons. Malgré le coût énergétique total similaire à celui du mécanisme asynchrone, ce chemin semble moins probable que le premier puisque, d'une part, il entre en compétition avec le transfert de proton, plus favorable, et d'autre part il requiert la mise en place d'une conformation autorisant simultanément les deux transferts. Dans un premier temps nous avons donc écarté cette seconde hypothèse pour nous consacrer au premier mécanisme défini pour cette surface.

Des dynamiques moléculaires de 500 ps ont été réalisées au niveau AM1/MM sur les géométries du réactif, du produit et de l'état transition localisés sur la surface du PFM. Dans le cas de l'état de transition, les distances entre atomes lourds et noyaux transférés intervenant dans la description des coordonnées de réactions sont contraintes autour de la valeur reportée dans le Tableau 16 par un potentiel harmonique de constante de force égale à 600 kcal/mol/Å<sup>2</sup>, tandis que les dynamiques sur les états stables sont laissées entièrement libres. Les distances moyennes entre le lactate et les groupes polaires voisins ainsi que l'énergie d'interaction moyenne entre la partie quantique et certains acides aminés sont évaluées pour les différentes dynamiques (Tableau 17). Cette énergie d'interaction est calculée toute les 100 fs au niveau AM1/MM pour chaque acide aminé de la protéine. La charge atomique des autres atomes de la partie MM est alors égale à 0.

III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

	Espèce sauvage R289 distale					
	Réactif		E. T.		Produit	
	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$
<b>H3-O3</b>	0,97	0,03	1,56	0,04	2,41	0,4
<b>H3-N<math>\epsilon</math>H373</b>	3,23	0,6	1,12	0,03	1,01	0,03
<b>H2-C2</b>	1,13	0,03	1,44	0,04	3,89	0,63
<b>H2-N5FMN</b>	3,37	0,48	1,26	0,04	1,01	0,03
<b>C<math>\alpha</math>-O3</b>	1,42	0,02	1,27	0,02	1,24	0,02
<b>N5-C4a</b>	1,31	0,02	1,4	0,02	1,42	0,03
<b>C4a-C10</b>	1,5	0,03	1,44	0,03	1,42	0,02
<b>C10-N1</b>	1,34	0,02	1,36	0,02	1,38	0,02
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R376</b>	2,9	0,14	2,94	0,14	2,94	0,16
<b>O1-N2R376</b>	3,48	0,31	3,7	0,22	3,49	0,29
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R376</b>	3,75	0,37	3,57	0,21	3,85	0,29
<b>O2-N2R376</b>	2,89	0,16	2,86	0,12	2,93	0,21
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R289</b>	4,82	0,35	5,33	0,23	4,45	0,31
<b>O1-N1R289</b>	6,29	0,52	7,04	0,27	5,79	0,31
<b>O1-N2R289</b>	4,77	0,59	6,06	0,39	4,41	0,32
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R289</b>	4,92	0,31	4,98	0,22	4,14	0,26
<b>O2-N1R289</b>	5,66	0,46	6,21	0,26	4,76	0,26
<b>O2-N2R289</b>	3,95	0,52	4,86	0,34	3,04	0,26
<b>O2-OY143</b>	2,95	0,23	3,11	0,41	4,42	0,76
<b>O1-EAU</b>	2,91	0,17	3,15	0,3	3	0,21
<b>O3-Y254</b>	3,04	0,3	2,82	0,12	3,08	0,31
<b>N<math>\delta</math>H373-D289</b>	3,44	0,58	3,18	0,36	2,93	0,28

Tableau 16 : valeurs moyennes (moy) et écart-types ( $\sigma$ ) de différentes distances intra ou intermoléculaires observés au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position distale. Les notations des atomes reprennent celles présentées en introduction (Figure 36 et Figure 37).

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

Espèce sauvage R289 distale			
	Réactif	E.T.	Produit
<b>R376</b>	-116,30	-103,80	-102,63
<b>R289</b>	-48,04	-33,70	-54,28
<b>Y254</b>	-5,21	-8,56	-6,31
<b>Y143</b>	-6,84	-2,99	6,31
<b>D282</b>	19,34	9,15	6,84

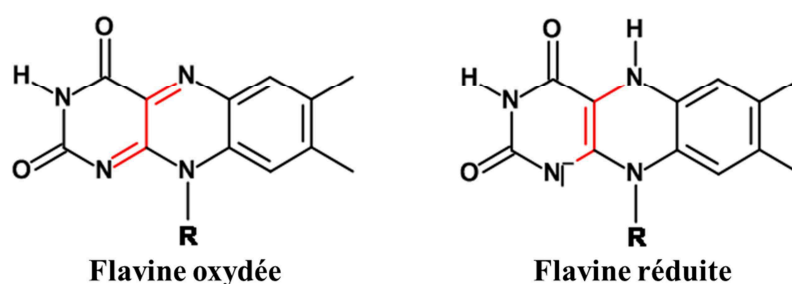
**Tableau 17 : énergie d'interaction moyenne entre la partie quantique et différents acides aminés du site actif observées au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position distale.**

Concernant le réactif, nous constatons tout d'abord que les atomes d'hydrogène transférables se trouvent déjà proches des groupements accepteurs (entre 3 et 3,5 Å), indiquant une pré-organisation du site actif favorable au mécanisme d'oxydation de type hydrure. L'Arg376 stabilise le groupement carboxylate du lactate par des liaisons hydrogène impliquant les protons portés par le Nε et l'un des atomes d'azote terminaux. La charge positive portée par le groupement guanidinium renforce cette stabilisation par interaction électrostatique avec la charge négative du L-lactate d'où la forte énergie d'interaction entre cet acide aminé et la partie quantique. L'Arg289 demeure assez éloignée du substrat tout au long de la dynamique, du fait de la présence de la molécule d'eau, et interagit plus faiblement avec le substrat (entre -30 et -50 kcal/mol à comparer à l'interaction partie quantique-Arg376 d'une énergie inférieure à -100 kcal/mol). Par ailleurs, l'un des atomes d'oxygène du carboxylate interagit avec le phénol de la Tyr 143 tandis qu'à l'opposé de la molécule de lactate, le groupement hydroxyle est maintenu par liaison hydrogène avec la chaîne latérale de la Tyr254. Les énergies d'interactions de la partie quantique avec ces acides aminés neutres restent relativement faibles (moins d'une dizaine de kcal/mol) par rapport à celles due à des acides aminés chargés mais ne sont pas pour autant négligeables. D'ailleurs, l'évolution de l'énergie d'interaction au cours de la réaction s'avère plus intéressante que sa valeur pour comprendre le rôle de l'environnement du substrat.

Ainsi, au niveau de l'état de transition, pour lequel l'His373 se trouve déjà chargée positivement, nous constatons que le L-lactate se décale vers la Tyr254 de 0,2 Å par rapport à la position moyenne dans l'état réactif (passe de 3,04 Å à 2,82 Å). Ce déplacement se retrouve aussi dans les distances entre le carboxylate et les arginines 376 et 289 ou la Tyr143, qui s'allongent de quelques centièmes à quelques unités d'Angström. L'interaction de la partie QM avec ces derniers acides aminés décroît tandis que la Tyr254 stabilise légèrement plus le L-lactate

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

déprotoné (-8,56 kcal/mol au lieu de 5,21 kcal/mol à l'état réactif). Du fait du transfert d'hydrure, le substrat se rapproche également de la FMN. Cette conformation, bien que contrainte, montre qu'à l'état de transition, les charges négatives du L-lactate sont globalement moins bien stabilisées, en particulier celle du carboxylate. Suite au transfert de proton vers l'histidine, le substrat contient deux charges négatives ; la déstabilisation de l'une d'elle facilite le transfert d'au moins un électron vers le cofacteur flavinique oxydé. En comparant l'évolution de certaines distances internes du lactate et de la flavine, nous observons qu'à l'état de transition, la liaison  $C_{\alpha}-O_3$  du lactate acquiert un caractère quasi-double avec une longueur moyenne de 1,27 Å soit 0,03 Å plus longue que dans le pyruvate. De plus, les longueurs des liaisons reliant le N5 de la FMN au N1, dont les caractères simples ou doubles dépendent de l'état d'oxydation (Figure 47), fluctuent à l'état de transition autour d'une valeur moyenne intermédiaire entre l'état réactif et l'état produit. A l'état de transition, le substrat se rapproche très fortement d'un pyruvate tandis que la flavine est en partie réduite.



**Figure 47 :** représentation de Lewis du cycle isoalloxazine du cofacteur FMN à l'état réduit et à l'état oxydé. Les liaisons indiquées en rouge voient leur caractère double ou simple changer suivant l'état d'oxydation de la flavine.

Par ailleurs, l'Asp282, dont la fonction carboxylate stabilise l'His373 sous sa forme acide positivement chargée par interaction avec le  $N\delta$ , se rapproche de cette dernière et son énergie d'interaction avec la partie quantique diminue, passant de 19,34 kcal/mol à 9,15 kcal/mol. Cette contribution est positive du fait de la répulsion entre l'aspartate anionique et les trois charges négatives de la partie QM, dont deux portées par le groupement phosphate.

Enfin, dans l'état produit, le substrat retrouve une position proche de celle des réactifs. La position de la Tyr143 diffère cependant entre ces deux états : elle n'interagit pas avec le pyruvate dans la géométrie du produit, comme l'indiquent la distance moyenne entre sa fonction hydroxyle et le groupement carboxylate (4,42 Å) et le changement de signe de son énergie d'interaction avec la partie QM qui devient légèrement répulsive (6,31 Å). Expérimentalement, il a été montré

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

par mutagénèse dirigée d'une part que cet acide aminé contribue à la formation du complexe enzyme-substrat par liaison hydrogène avec le carboxylate, interaction qui se maintient à l'état de transition sans pour autant que la tyrosine joue le rôle d'électrophile,<sup>106</sup> et d'autre part qu'il jouait un rôle crucial dans le transfert d'électron de la flavine vers l'hème.<sup>107</sup> Nos simulations corroborent la conclusion expérimentale quant au rôle de la Tyr143 dans l'oxydation du L-lactate. L'absence d'interaction entre cette dernière et le substrat à l'état produit semble indiquer que cette tyrosine, se situant à l'interface entre le solvant et le site actif en l'absence du domaine hémique, joue également le rôle de porte bloquant le L-lactate au sein du site actif et autorisant le départ du pyruvate.

Quelques acides aminés interviennent également dans la stabilisation de la FMN<sup>108</sup> (Tableau 18 et Figure 36). Les interactions entre ces derniers et la partie quantique dépendent assez peu du point du chemin considéré, en particulier pour les acides aminés proche de la queue D-ribitol-5-Phosphate. L'interaction avec la Lys349, censée contribuer à la stabilisation de la charge négative sur l'atome N1 de la FMN, augmente en valeur absolue de 5 kcal/mol entre l'état réactif et l'état produit, tandis que l'interaction avec la Ser228 et l'un des atomes d'oxygène de la flavine se renforce au niveau de l'état de transition (passe de -4,95 kcal/mol à -8,75 kcal/mol). Cette évolution indique que le cofacteur FMN se charge négativement au cours de la réaction mais la dilution de la charge sur l'ensemble du cycle isoalloxazine rend moins perceptible la réduction de la flavine que l'oxydation du L-lactate par les acides aminés voisins.

	Espèce Sauvage R289 distale		
	Réactif	E.T.	Produit
<b>K349</b>	-108,44	-109,70	-113,19
<b>S228</b>	-4,95	-8,75	-6,74
<b>Q252</b>	-4,06	-2,65	-4,13
<b>S195</b>	-4,59	-4,13	-5,81
<b>S371</b>	-0,22	-1,31	-1,29
<b>T280</b>	-11,30	-10,85	-10,21
<b>D409</b>	40,51	38,26	43,95
<b>R413</b>	-124,12	-127,63	-124,52
<b>R433</b>	-134,85	-143,91	-135,54

**Tableau 18** : énergie d'interaction moyenne entre la partie quantique et différents acides aminés autour du cofacteur FMN observées au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position distale.

### *III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2*

Nos résultats sur le mécanisme de type hydrure dans cette conformation du site actif rejoignent ceux précédemment obtenus par modélisation théorique. Toutefois, la présence de la molécule d'eau de cristallisation au sein du site actif n'est pas d'une certitude absolue de même que le maintien de l'Arg289 en position distale. Dans un second temps, nous avons donc modélisé la même réaction mais en retirant la molécule d'eau et en plaçant cette arginine en position proximale.

#### *b. Etude avec l'arginine 289 en position distale*

Bien que la molécule d'eau de cristallisation maintenant l'Arg289 en position distale se retrouve dans de nombreuses structures sauvages ou mutées, elle n'apparaît pas systématiquement. En son absence, l'Arg289 peut prendre une autre conformation, dite proximale, sa fonction guanidinium pointant alors sa charge positive vers le groupement carboxylate du substrat. Dans les structures 1FCB et 1KBI, en présence de pyruvate dans le site actif, l'Arg289 se trouve en position distale, bloquée par une molécule d'eau de cristallisation interagissant également avec le substrat. Cependant, les deux positions distale et proximale sont décrites dans la structure recombinante 1KBJ,<sup>73</sup> qui comprend uniquement le flavodomaine. De même, lorsque cette arginine est mutée en lysine, la charge positive de cette dernière se trouve très proche du substrat, dans une conformation semblable à une position proximale (structure 1QCW).<sup>109</sup> La présence de la molécule d'eau de cristallisation dans ces structures ne prouve donc pas la nécessité de celle-ci dans la catalyse de l'oxydation de L-lactate, ni celle de la position distale de l'Arg289. Nous avons donc étudié cette seconde conformation (Figure 48).

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

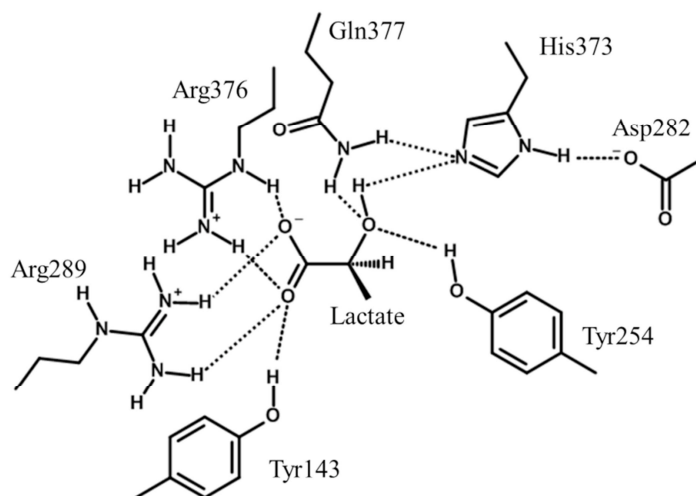


Figure 48 : représentation du site actif autour du L-lactate en l'absence de la molécule d'eau de cristallisation et avec l'arginine 289 en position proximale.

La surface d'énergie libre corrigée au niveau DFT obtenue pour la modélisation du mécanisme de type hydrure est représentée dans la Figure 49.

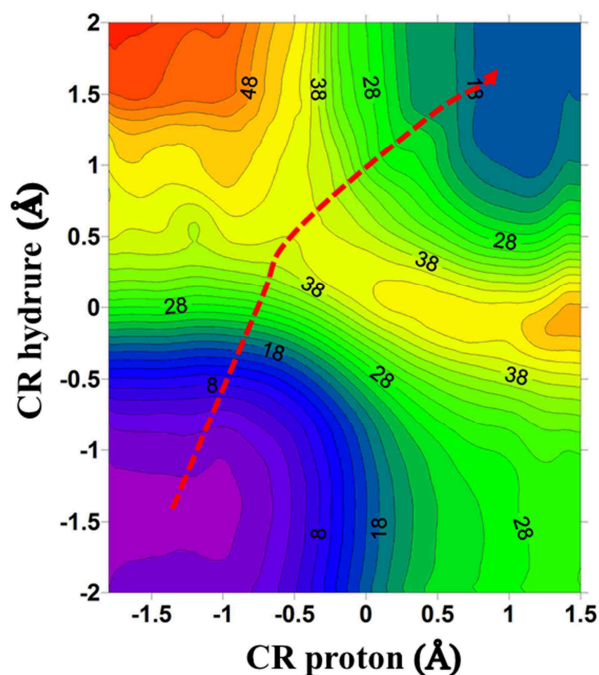


Figure 49 : surface de potentiel de force moyenne (PFM) corrigée pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position proximale.

Dans ce cas, le chemin le moins coûteux énergétiquement consiste en un transfert concerté du proton et de l'hydrure vers leurs accepteurs respectifs (l'His373 et la FMN). L'état de transition se situe en un point où les deux noyaux d'hydrogène sont transférés partiellement mais

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

où le proton est encore proche du L-lactate et l'hydrure presque sur la flavine. Contrairement à la surface correspondant à la position distale de l'Arg289, cette courbe ne présente pas de plateau d'énergie après un transfert de proton seul. La barrière énergétique est particulièrement élevée : 42,2 kcal/mol. Une telle énergie d'activation écarte la possibilité d'un mécanisme de type hydrure dans cette conformation. La molécule d'eau de cristallisation et le maintien de l'Arg289 en position distale semblent donc indispensables à l'oxydation du L-lactate par ce mécanisme. Cependant, la présence de la charge positive de l'arginine à proximité du substrat devrait en principe jouer principalement sur la stabilisation de ce dernier au sein du site actif. Comment expliquer une telle différence de réactivité entre les deux positions de l'arginine?

Les longueurs moyennes de liaisons et les valeurs moyennes des interactions entre la partie quantique et les acides aminés voisins obtenues pour des dynamiques moléculaires sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition sont reportées dans le Tableau 19 et Tableau 20. Nous pouvons constater qu'avant la réaction, le L-lactate interagit très fortement et de manière équivalente avec les deux arginines Arg376 et Arg289 (entre -90 et -110 kcal/mol). Il est de fait beaucoup plus éloigné de la Tyr254 que dans le cas où l'Arg289 se trouve en position distale (4,32 Å au lieu de 3,04 Å). Cet éloignement empêche la liaison hydrogène entre le phénol et le groupement hydroxyle du L-lactate laissant la tyrosine libre d'interagir avec un autre atome, en l'occurrence le N $\epsilon$  de l'His373. De fait, la distance entre le proton hydroxyle et son accepteur est importante : plus de 5 Å. La place laissée autour du C $\alpha$  du lactate facilite par ailleurs la rotation des groupements liés à celui-ci et autorise au cours de la dynamique des structures dans lesquelles le H $\alpha$  fait face à l'His373 et non l'hydroxyle. Ce dernier atome se situe en moyenne assez loin du N5 de la FMN (4,23 Å). La conformation d'équilibre du site actif à l'état réactif apparaît alors assez différente de celle requise pour les transferts de proton et d'hydrure.



III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

	Espèce sauvage R289 proximale					
	Réactif		E. T.		Produit	
	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$
<b>H3-O3</b>	0,97	0,03	1,08	0,03	4,52	1,19
<b>H3-N<math>\epsilon</math>H373</b>	5,45	1,78	1,6	0,04	1,01	0,03
<b>H2-C2</b>	1,13	0,03	1,61	0,04	3,84	0,69
<b>H2-N5FMN</b>	4,23	1,1	1,13	0,03	1,01	0,03
<b>C<math>\alpha</math>-O3</b>	1,43	0,02	1,32	0,02	1,24	0,02
<b>N5-C4a</b>	1,31	0,02	1,4	0,03	1,42	0,02
<b>C4a-C10</b>	1,5	0,03	1,45	0,03	1,42	0,02
<b>C10-N1</b>	1,34	0,02	1,36	0,02	1,38	0,02
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R376</b>	3,11	0,47	3,07	0,22	3,85	0,6
<b>O1-N2R376</b>	3,87	0,47	3,67	0,25	4,8	0,55
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R376</b>	3,47	0,3	3,79	0,22	3,22	0,35
<b>O2-N2R376</b>	2,85	0,11	2,96	0,14	2,96	0,17
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R289</b>	4,96	0,16	5,02	0,15	5,11	0,24
<b>O1-N1R289</b>	3,58	0,25	3,74	0,2	3,9	0,29
<b>O1-N2R289</b>	2,88	0,13	2,91	0,13	2,95	0,21
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R289</b>	5,11	0,22	5,05	0,15	4,85	0,19
<b>O2-N1R289</b>	2,99	0,18	2,98	0,14	2,93	0,17
<b>O2-N2R289</b>	3,72	0,31	3,63	0,2	3,28	0,29
<b>O2-OY143</b>	3,12	0,57	2,97	0,21	4,33	0,97
<b>O3-Y254</b>	4,32	1,01	3	0,16	3,58	0,87
<b>N<math>\delta</math>H373-D289</b>	3,33	0,21	3,15	0,39	3,24	0,2

Tableau 19 : valeurs moyennes (moy) et écart-types ( $\sigma$ ) de différentes distances intra ou intermoléculaires observés au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position proximale. Les notations des atomes reprennent celles présentées en introduction (Figure 36 et Figure 37).

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

Espèce sauvage R289 proximale			
	Réactif	E.T.	Produit
<b>R376</b>	-106,69	-97,80	-95,67
<b>R289</b>	-90,27	-75,65	-86,81
<b>Y254</b>	-3,32	-5,57	-6,86
<b>Y143</b>	-6,62	-5,50	4,09
<b>D282</b>	22,42	23,33	-5,33

**Tableau 20 : énergie d'interaction moyenne entre la partie quantique et différents acides aminés du site actif observées au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans l'enzyme sauvage, avec Arg289 en position proximale.**

Afin de passer à l'état de transition, la conformation du site actif doit donc être modifiée : le substrat interagit moins avec les arginines 376 et 289 (diminution de 10 à 15 kcal/mol de l'énergie d'interaction en valeur absolue) et se rapproche du N5 de la FMN, de l'His 373 et de la Tyr254 de plus d'un angström, ces deux derniers acides aminés n'interagissant alors plus entre eux. Ce passage nécessite donc une diminution de l'interaction stabilisant le carboxylate et la rupture d'une liaison hydrogène pour la formation de deux autres. De plus, malgré les contraintes imposées lors de la simulation de dynamique moléculaire à l'état de transition, la Tyr254 ne parvient pas à se placer aussi près du L-lactate que dans la conformation précédente, stabilisant d'autant moins une éventuelle charge négative sur l'atome d'oxygène oxydé en cétone. Les changements conformationnels requis pour passer de l'état réactif à une géométrie autorisant le transfert de proton vers la base du site actif peuvent expliquer d'une part la difficulté de voir s'effectuer le transfert de proton seul et d'autre part le coût énergétique élevé du transfert concerté, plus important que lorsque l'Arg289 se trouve en position distale.

L'analyse des distances internes au substrat et à la flavine montre qu'à l'état de transition, le cofacteur est en partie réduit comme dans la conformation précédente du site actif (distances moyennes à l'état de transition des liaisons N5-C4a, C4a-C10 et C10-N1 à 0,2 Å des valeurs obtenues pour la géométrie du produit), tandis que le substrat se trouve dans un état intermédiaire entre le lactate et le pyruvate (distance C-O de 1,32 Å). Il semble qu'à l'état de transition, un électron a été transféré à la flavine alors que le H $\alpha$  quitte le lactate et la liaison double C-O n'est pas encore formée. Il est possible que le L-lactate ne soit alors pas entièrement oxydé.

Dans le cas précédent, lors du transfert de l'hydrogène  $\alpha$ , au niveau de l'état de transition, les deux électrons ont quittés le substrat. Lorsque l'Arg289 se trouve en position distale, le

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

groupement carboxylate du substrat est principalement stabilisé par des liaisons hydrogènes. Si la charge de ce groupement est par ailleurs stabilisée de manière électrostatique, comme c'est le cas lorsque l'Arg289 se tourne en position proximale, la fonction carboxylate voit son caractère électro-attracteur renforcé. Dans ce cas, le C $\alpha$  est plus électrophile que lorsque l'Arg289 se trouve en position distale et donne moins facilement des électrons à la flavine. Cet effet peut contribuer à la hauteur de la barrière.

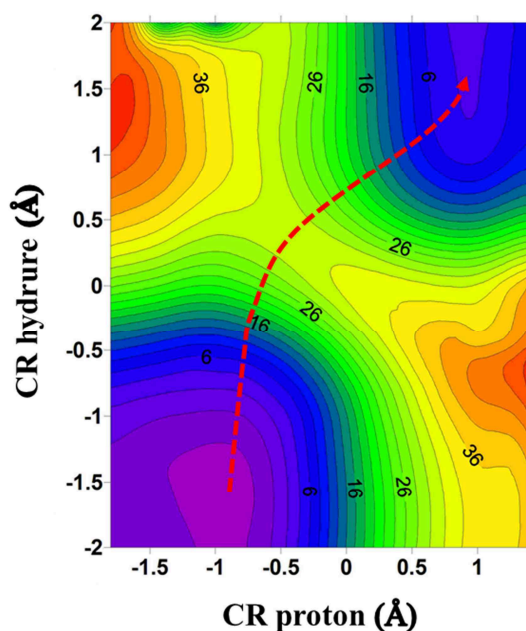
Par ailleurs, du fait de l'absence de protonation de l'His373 au niveau de l'état de transition, l'interaction de l'Asp282 avec la partie quantique n'est pas modifiée entre le réactif et cet état. Au contraire, cet acide aminé stabilise bien la charge de l'histidine dans la dynamique moléculaire sur le produit. Dans cette dernière simulation, nous pouvons constater un éloignement de la Tyr143 qui rejoint nos conclusions précédentes quant au rôle de celle-ci.

La conformation du site actif lorsque l'Arg289 se trouve en position proximale ne convient pas au mécanisme de type hydrure. Dans la suite de notre étude, la molécule d'eau de cristallisation n'est pas retirée du site actif et l'Arg289 conserve sa position distale observée dans la structure cristalline.

#### c. Mutation Y254L

La première mutation que nous avons modélisée consiste en la transformation de la Tyr254 en leucine.<sup>110</sup> Expérimentalement, la constante de vitesse de réaction au sein de ce mutant décroît de trois ordres de grandeur par rapport à l'espèce sauvage. La mutation de cette tyrosine en phénylalanine a également été étudiée expérimentalement.<sup>85,110,111</sup> Dans ce cas, la constante de vitesse décroît de deux ordres de grandeur. Par contre, aucune mutation n'entraîne de changement dans la constante d'association du L-lactate au sein du site actif. Le rôle de la Tyr254 relève probablement de la stabilisation de l'état de transition par liaison hydrogène. Si les effets stériques engendrés par la phénylalanine ou la tyrosine restent similaires, la leucine est de taille moins importante que les acides aminés aromatiques et occupe moins de place dans l'environnement du substrat. Le mutant Y254L se révèle capable de catalyser l'oxydation du L-phényllactate ou de L-mandélate plus efficacement que celle du L-lactate. La modélisation de cette protéine mutée permet donc de prendre en compte deux effets : l'absence de liaison hydrogène stabilisant l'état de transition et celle de gêne stérique autour du C $\alpha$  du L-lactate.

Le PFM obtenu après correction est représenté dans la Figure 50.



**Figure 50 : surface de potentiel de force moyenne (PFM) corrigée pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans le mutant Y254L, avec Arg289 en position distale.**

D'après cette surface, l'oxydation du L-lactate se fait par transfert concerté des deux noyaux d'hydrogène, avec toutefois un état de transition pour lequel le transfert de l'hydrure est plus avancé que celui du proton, pour une barrière d'activation de 36,7 kcal/mol. A nouveau, la voie observée pour l'enzyme sauvage selon laquelle le transfert de proton se produit complètement avant celui d'hydrure ne peut être suivie, la barrière de ce transfert seul étant du même ordre que celle du mécanisme concerté.

De la même manière que pour les systèmes précédents, les modifications du site actif entre les différentes étapes de la réaction peuvent être évaluées (Tableau 21 et Tableau 22). En l'absence du phénol, le L-lactate dispose de plus d'espace au sein du site actif du Fcb2 mutant. Seul le carboxylate est maintenu en position par son interaction avec l'Arg376 et la Tyr143. La rotation autour des groupements liés au C $\alpha$  se fait très facilement et complètement puisque, parfois, le méthyle fait face à l'His373. L'espace disponible autour du L-lactate rend donc plus difficile l'obtention d'une conformation dans laquelle les deux atomes d'hydrogène du substrat s'orientent correctement pour leur transfert respectif. Cependant, comme la leucine ne possède pas de groupement polaire, aucune interaction ne décale particulièrement l'His373. Lorsque le système passe du complexe enzyme-substrat à l'état de transition, aucune liaison hydrogène n'est

III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

détruite ou créée, réduisant éventuellement le coût énergétique de la réaction dans ce système par rapport à celui de l'enzyme sauvage où Arg289 se place en position proximale.

	Mutant Y254L R289 distale					
	Réactif		E. T.		Produit	
	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$
<b>H3-O3</b>	0,96	0,03	1,04	0,03	3,3	0,23
<b>H3-N<math>\epsilon</math>H373</b>	4,35	1,52	1,76	0,04	1	0,03
<b>H2-C2</b>	1,13	0,03	1,62	0,04	4,12	0,57
<b>H2-N5FMN</b>	4,52	1,12	1,14	0,03	1,01	0,03
<b>C<math>\alpha</math>-O3</b>	1,42	0,02	1,32	0,02	1,24	0,02
<b>N5-C4a</b>	1,31	0,02	1,4	0,02	1,41	0,02
<b>C4a-C10</b>	1,5	0,03	1,45	0,03	1,41	0,02
<b>C10-N1</b>	1,34	0,02	1,36	0,02	1,38	0,02
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R376</b>	2,87	0,12	2,93	0,13	2,81	0,1
<b>O1-N2R376</b>	3,39	0,22	3,76	0,23	3,43	0,24
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R376</b>	3,82	0,12	3,59	0,23	3,9	0,24
<b>O2-N2R376</b>	2,9	0,14	2,94	0,16	3,01	0,19
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R289</b>	5,76	0,33	5,64	0,3	5,38	0,48
<b>O1-N1R289</b>	5,76	0,33	7,36	0,29	7,14	0,48
<b>O1-N2R289</b>	4,39	0,32	6,31	0,49	6,24	0,55
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R289</b>	4,49	0,5	5,14	0,27	5,37	0,41
<b>O2-N1R289</b>	5,06	0,39	6,39	0,3	6,73	0,44
<b>O2-N2R289</b>	3,49	0,46	5,04	0,44	5,4	0,48
<b>O2-OY143</b>	3,34	0,59	3,48	0,51	3,7	0,59
<b>O1-EAU</b>	2,9	0,19	3,73	0,79	3,33	0,64
<b>O3-Y254</b>	7,74	0,49	6,65	0,35	6,73	0,47
<b>N<math>\delta</math>H373-D289</b>	3,71	0,32	3,86	0,3	3,3	0,23

Tableau 21 : valeurs moyennes (moy) et écart-types ( $\sigma$ ) de différentes distances intra ou intermoléculaires observés au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans le mutant Y254L, avec Arg289 en position distale. Les notations des atomes reprennent celles présentées en introduction (Figure 36 et Figure 37).

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

Mutant Y254L R289 distale			
	Réactif	E.T.	Produit
R376	-113,19	-98,45	-107,67
R289	-55,26	-27,68	-30,33
Y254	-0,19	0,14	0,07
Y143	-5,40	2,53	4,68
D282	24,07	28,82	1,71

Tableau 22 : énergie d'interaction moyenne entre la partie quantique et différents acides aminés du site actif observées au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans le mutant Y254L, avec Arg289 en position distale.

L'absence de groupement pouvant stabiliser la charge négative autour de la fonction hydroxyle du L-lactate contribue à rendre très difficile le transfert de proton seul. Celui-ci ne peut donc pas jouer le rôle d'initiateur du départ de l'hydrogène  $\alpha$  et des électrons. Comme dans le précédent mécanisme concerté, la FMN est par ailleurs en partie réduite au niveau de l'état de transition, selon les distances observées. Nous ne savons pas à quel moment cet électron est transféré mais nous pouvons imaginer que son départ provoque également celui des deux hydrogènes, celui en  $\alpha$ , dont la liaison avec le carbone est affaiblie, et celui de l'hydroxyle afin de combler la lacune présente sur le  $C_\alpha$ . Le transfert de ce second proton est par ailleurs moins avancé au niveau de l'état de transition, soulignant qu'effectivement, en l'absence de groupement stabilisant la charge négative, cette étape ne se déroule que si le substrat possède un défaut d'électron.

La Tyr143 interagit peu avec le substrat à partir de l'état de transition. De même, l'Arg289 s'éloigne du carboxylate lors du passage de la barrière. La diminution de ces interactions entraîne une déstabilisation de la charge négative du carboxylate, contribuant ainsi à faciliter le départ de l'hydrogène  $\alpha$  et des électrons. Par ailleurs, elle renforce le caractère basique de l'hydroxyle du L-lactate puisque la présence de deux charges négatives sur cette molécule non stabilisées par l'environnement paraît hautement défavorable.

Des résultats expérimentaux confirment la possibilité de ce mécanisme concerté puisqu'ils indiquent que dans le cas du mutant Y254F, le départ des deux hydrogènes du L-lactate s'effectue lors d'une même étape.<sup>85</sup> L'absence de stabilisation possible de la charge négative présente sur l'atome d'oxygène après transfert de proton explique ce mécanisme concerté. D'après nos résultats, cette stabilisation n'intervient d'ailleurs pas exactement au niveau

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

de l'état de transition mais auparavant, permettant au système d'emprunter un chemin réactionnel plus favorable que le mécanisme concerté. En effet, dans l'espèce sauvage, l'analyse des distances indique que le substrat est quasiment oxydé au niveau de l'état de transition. De plus, dans le mécanisme concerté, la tyrosine 254 ne semble pas jouer un rôle essentiel puisque la barrière dans le cas de l'espèce sauvage avec l'Arg289 en position proximale est plus élevée que celle dans le mutant Y254L. Cette mutation entraîne deux conséquences : une plus grande liberté au sein du site actif rendant plus difficile l'obtention d'une conformation adéquate à l'oxydation du L-lactate et une modification du chemin préférentiel en ne stabilisant pas la charge négative sur l'oxygène du groupement hydroxyle.

#### d. Mutation D282N

Dans le cas du mutant D282N, la poche entourant le substrat reste identique à celle de l'enzyme sauvage mais, du fait que sa charge positive n'est plus stabilisée par le carboxylate de l'aspartate, l'His373 doit voir son pKa décroître et capte plus difficilement un proton en provenance du L-lactate.<sup>112</sup> La mutation de l'aspartate en asparagine entraîne une diminution de la constante de vitesse de deux ordres de grandeurs sans grande modification du complexe enzyme-substrat.

La surface obtenue pour l'énergie libre corrigée est présentée dans la Figure 51.

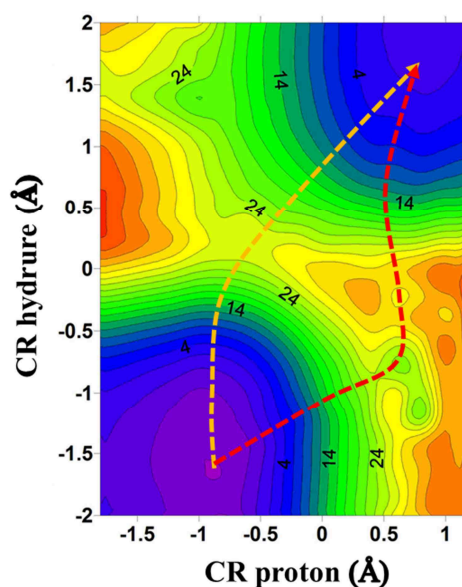


Figure 51 : surface de potentiel de force moyenne (PFM) corrigée pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans le mutant D282N, avec Arg289 en position distale.

### *III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2*

Une fois de plus, nous pouvons constater que le chemin réactionnel préférentiel (chemin orange sur la Figure 51) consiste en un mécanisme concerté pour lequel le transfert de l'hydrure se trouve plus avancé que celui du proton au niveau de l'état de transition. L'énergie d'activation est cependant moins élevée que dans les deux systèmes précédents, à savoir 32,9 kcal/mol. Il semble possible d'obtenir une géométrie dans laquelle seul le proton est transféré mais la barrière de ce transfert est équivalente au transfert concerté et le départ de l'hydrure depuis cette conformation reste difficile (plus de 6 kcal/mol). En comparant ce mécanisme concerté avec celui obtenu pour l'enzyme sauvage avec Arg289 en position distale, nous observons que la barrière n'augmente entre les deux que de 3 kcal/mol. La zone de plus basse énergie dans la vallée du réactif se situe entre des valeurs de la coordonnée de réaction associée au proton allant de -1,2 Å à -0,5 Å, soit des conformations du L-lactate pour lesquelles l'hydroxyle interagit par liaison hydrogène avec l'His373. Même si le pKa de cette dernière devient trop faible pour capter le proton, elle peut toujours contribuer à stabiliser le substrat dans une géométrie propice à son oxydation. La valeur de cette coordonnée ne varie guère du réactif jusqu'à l'état de transition, suggérant que le transfert de proton s'effectue après celui d'hydrure, mais que l'His373 et le groupement hydroxyle demeurent en interaction.



III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

	Mutant D282N R289 distale					
	Réactif		E. T.		Produit	
	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$
<b>H3-O3</b>	0,97	0,03	1,01	0,03	2,43	0,48
<b>H3-N<math>\epsilon</math>H373</b>	3,77	0,73	1,79	0,04	1,02	0,03
<b>H2-C2</b>	1,13	0,03	1,45	0,04	4,16	0,63
<b>H2-N5FMN</b>	3,81	0,52	1,24	0,04	1,01	0,03
<b>C<math>\alpha</math>-O3</b>	1,42	0,03	1,37	0,02	1,24	0,02
<b>N5-C4a</b>	1,31	0,02	1,35	0,03	1,42	0,02
<b>C4a-C10</b>	1,5	0,03	1,48	0,03	1,42	0,02
<b>C10-N1</b>	1,34	0,02	1,35	0,02	1,38	0,02
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R376</b>	2,89	0,13	2,91	0,12	2,95	0,15
<b>O1-N2R376</b>	3,15	0,23	3,28	0,2	3,45	0,27
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R376</b>	4,06	0,26	3,96	0,22	3,9	0,29
<b>O2-N2R376</b>	3,01	0,19	2,91	0,13	2,94	0,2
<b>O1-N<math>\epsilon</math>R289</b>	3,92	0,33	4,59	0,22	4,65	0,25
<b>O1-N1R289</b>	5,21	0,33	5,67	0,23	5,88	0,25
<b>O1-N2R289</b>	3,78	0,37	4,18	0,26	4,52	0,31
<b>O2-N<math>\epsilon</math>R289</b>	4,63	0,43	5,01	0,3	4,42	0,39
<b>O2-N1R289</b>	5,03	0,31	5,2	0,26	4,89	0,25
<b>O2-N2R289</b>	3,41	0,42	3,74	0,32	3,34	0,39
<b>O2-OY143</b>	3,29	0,58	2,89	0,23	3,93	1,17
<b>O1-EAU</b>	2,85	0,17	2,93	0,16	3,07	0,28
<b>O3-Y254</b>	3,84	0,51	2,9	0,16	3,15	0,4
<b>N<math>\delta</math>H373-D289</b>	3,58	0,46	3,41	0,29	3,68	0,52

Tableau 23 : valeurs moyennes (moy) et écart-types ( $\sigma$ ) de différentes distances intra ou intermoléculaires observés au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans le mutant D282N, avec Arg289 en position distale. Les notations des atomes reprennent celles présentées en introduction (Figure 36 et Figure 37).

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

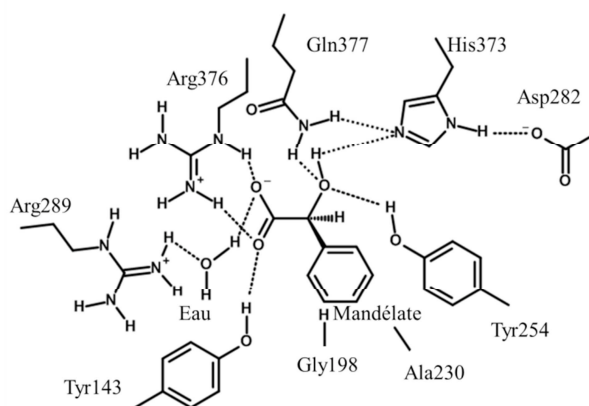
Mutant D282N R289 distale			
	Réactif	E.T.	Produit
<b>R376</b>	-110,11	-108,15	-95,72
<b>R289</b>	-58,10	-48,78	-43,40
<b>Y254</b>	-3,23	-6,12	-5,35
<b>Y143</b>	-6,62	-9,78	-1,25
<b>D282</b>	0,26	-1,48	-1,60

**Tableau 24 : énergie d'interaction moyenne entre la partie quantique et différents acides aminés du site actif observées au cours des simulations de dynamique moléculaire sur les géométries du réactif, du produit et de l'état de transition (E.T.) pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans le mutant D282N, avec Arg289 en position distale.**

Au niveau du réactif, ce mutant se rapproche de l'espèce sauvage (Tableau 23 et Tableau 24). Toutefois, l'His373 ne capte pas le proton du groupement hydroxyle du substrat avant le départ de l'hydrure. Les distances internes à la flavine au niveau de l'état de transition indiquent que celle-ci est en partie réduite à l'état de transition, toutefois moins que dans les cas précédents (distances internes différant de 0,02 Å de l'état oxydé). L'hydrogène  $\alpha$  se situe également plus loin de la flavine que dans les deux mécanismes concertés déjà étudiés. Au sein du L-lactate, la liaison C-O n'évolue guère entre le réactif et le sommet de la barrière d'activation. Il semble que malgré l'interaction avec l'His373 et le départ de l'hydrure, un dernier élément doit être mis en place pour que le proton quitte le substrat et que la lacune de ce dernier soit comblée. D'après la littérature, il est possible que la charge négative présente sur la flavine réduite, dont le cycle isoalloxazine se situe sous le cycle imidazole de l'His373, stabilise par interaction électrostatique la charge positive sur l'histidine protonée.<sup>113</sup> Une fois la flavine réduite, même partiellement, le transfert de proton est donc facilité, ce que reflète bien la surface obtenue.

Nous obtenons alors des informations supplémentaires sur le rôle des différents partenaires : si l'Asp282 permet bien d'augmenter en toute circonstance le pKa de l'His373, la flavine réduite contribue également à la stabilisation de la base protonée dans l'état produit. En l'absence de cet aspartate, seule cette dernière contribution est présente, et uniquement après transfert d'hydrure. Celui-ci devient alors nécessaire au transfert de proton depuis l'hydroxyle vers le N $\epsilon$  de l'histidine. Comme ces deux groupes se font face à l'état de transition et que le C $\alpha$  devient particulièrement électrophile, une fois passée la barrière, le départ du proton se fait sans coût énergétique.

e. Mutation A198G/L230A et réaction avec le Mandélate



**Figure 52 :** représentation du site actif autour du L-mandélate en présence de la molécule d'eau de cristallisation contraignant l'arginine 289 en position distale et de la double mutation A198G/L230A.

Nous avons étudié un dernier mutant du Fcb2, qui concerne non pas la stabilisation des charges au sein du site actif mais la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du L-lactate. Les expériences de mutagenèses dirigées ont montré que l'Ala198 et la Leu230 induisent un encombrement stérique au sein du site actif permettant au seul L-lactate d'y entrer.<sup>86,114,115</sup> Le double mutant A198G/L230A permet quant à lui l'oxydation du L-mandélate de manière préférentielle à celle du L-lactate (Figure 52). Ces mutations entraînent donc une modification de la spécificité de la protéine. Par ailleurs, les structures cristallographiques indiquent que la seule conformation que le L-mandélate peut adopter dans le site actif du mutant est celle correspondant à un mécanisme de type hydrure. Celui de type carbanion semble alors à exclure : si le  $H_{\alpha}$  fait face à l'His373, le phényle se trouve beaucoup trop proche de la flavine. Ce résultat laisse donc penser que l'oxydation du L-lactate, tout comme celle du L-mandélate, est permise par un mécanisme de type hydrure. Toutefois la constante de vitesse de l'oxydation du L-mandélate au sein du Fcb2 muté est d'un ordre de grandeur plus faible que celle du L-lactate dans l'espèce sauvage. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence : soit les deux enzymes procèdent par des mécanismes différents (hydrure pour le mutant avec le L-mandélate, carbanion pour la protéine sauvage avec le L-lactate), soit d'autres effets provoquent le ralentissement de la réaction avec le L-mandélate. L'étude théorique de ce mutant en présence soit du substrat naturel de l'enzyme soit du L-mandélate peut apporter un éclairage nouveau sur cette réaction.

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

Nous avons donc réalisé deux surfaces du potentiel de force moyenne pour ce mutant, l'une en présence du L-lactate (Figure 53 gauche), l'autre en présence du L-mandélate (Figure 53 droite).

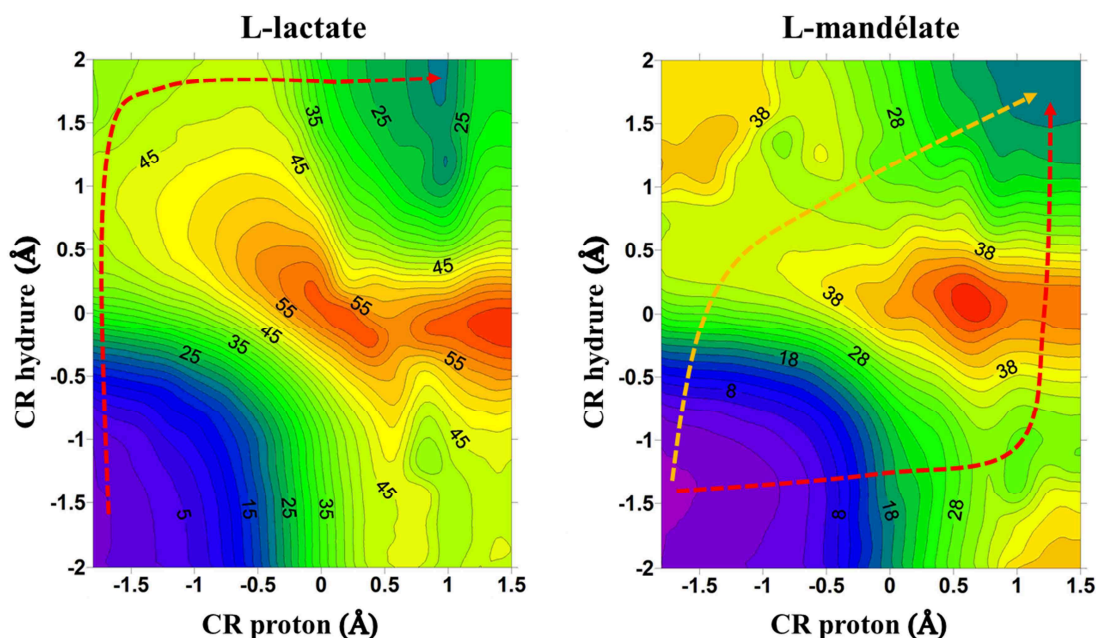


Figure 53 : surfaces de potentiel de force moyenne (PFM) corrigée pour le mécanisme de transfert d'hydrure dans le mutant A198G/L230A, avec Arg289 en position distale en utilisant le L-lactate (gauche) ou le L-mandélate (droite) comme substrat.

Dans le cas du L-lactate, nous observons que l'oxydation est extrêmement difficile, et dans la fenêtre des coordonnées de réaction utilisées, aucun chemin réactionnel ne peut être identifié avec certitude. Le transfert de proton du substrat vers l'His373 requiert une énergie d'activation particulièrement élevée (plus de 45 kcal/mol) et un éventuel transfert d'hydrure suite à cette première étape coûte plus de 15 kcal/mol supplémentaires. Dans le double mutant, l'oxydation du L-lactate par cette voie semble donc hautement improbable. Une seconde possibilité semble être un mécanisme de transfert d'hydrure suivi du transfert de proton. L'état de transition correspondant à un tel chemin n'est cependant pas visible sur la surface obtenue et correspondrait à une géométrie dans laquelle l'hydroxyle se situe assez loin de l'histidine et n'est donc probablement pas en interaction avec celle-ci. La barrière atteindrait dans ce cas certainement une quarantaine de kcal/mol à laquelle s'ajouteraient éventuellement quelques kcal/mol pour le transfert de proton.

### *III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2*

Le PFM du L-mandélate présente quant à lui un état de transition correspondant à un mécanisme de transfert de l'hydrogène  $\alpha$  vers la flavine associé à une énergie d'activation de 36,4 kcal/mol. Le déplacement du proton hydroxyle se fait dans la continuité de ce transfert sans coût énergétique supplémentaire. Dans ce système également, le transfert de proton seul entre en compétition avec le mécanisme de l'oxydation totale avec une énergie d'activation d'un peu plus de 30 kcal/mol. Le transfert d'hydrure depuis le L-mandélate déprotoné implique le passage d'une nouvelle barrière d'une quinzaine de kcal/mol. Le L-mandélate réagit donc plus facilement dans ce mutant que L-lactate. Cette conclusion rejoint en partie les résultats expérimentaux selon lesquels la préférence de la protéine mutée pour le L-mandélate provient principalement d'une différence dans la constante de formation du complexe de Michaelis, soit la stabilisation du substrat au sein du site actif. Il est possible que du fait de l'absence de gêne stérique autour du L-lactate, ce dernier ne parvienne pas aisément à se fixer dans une position favorable au transfert de proton. Au contraire, même si le L-mandélate parvient à rentrer au sein du site actif, il est trop volumineux pour pouvoir occuper une autre position que celle favorable au mécanisme de transfert d'hydrure.

Faute de temps, les dynamiques sur les différentes étapes clés de ces deux réactions n'ont pu être réalisées. Toutefois, les distances obtenues sur les dynamiques d'équilibration sur l'état réactif sont reportées dans le Tableau 25.

III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

Mutant	L-lactate		L-mandélate	
	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$
<b>H3-NeH373</b>	4,23	0,6	4,55	0,5
<b>H2-N5FMN</b>	3,24	0,36	3,21	0,38
<b>O1-NeR376</b>	2,9	0,14	2,92	0,15
<b>O1-N2R376</b>	3,5	0,23	3,57	0,23
<b>O2-NeR376</b>	3,76	0,22	3,68	0,22
<b>O2-N2R376</b>	2,91	0,15	2,86	0,12
<b>O1-NeR289</b>	4,88	0,29	5,06	0,26
<b>O1-N1R289</b>	6,6	0,29	6,71	0,26
<b>O1-N2R289</b>	5,61	0,3	5,61	0,31
<b>O2-NeR289</b>	4,71	0,27	4,86	0,3
<b>O2-N1R289</b>	5,87	0,3	5,92	0,32
<b>O2-N2R289</b>	4,5	0,3	4,52	0,33
<b>O2-OY143</b>	2,88	0,15	2,9	0,17
<b>O1-EAU</b>	2,91	0,21	2,99	0,28
<b>O3-Y254</b>	3,31	0,48	3	0,24
<b>N8H373-D289</b>	5,55	0,27	7,23	1,21

Tableau 25 : valeurs moyennes (moy) et écart-types ( $\sigma$ ) de différentes distances intra ou intermoléculaires observés au cours des dynamiques moléculaires d'équilibration dans le mutant A198G/L230A avec Arg289 en position distale en présence du L-lactate ou du L-mandélate. Les notations des atomes reprennent celles présentées en introduction (Figure 36 et Figure 37).

Les valeurs moyennes de ces distances restent relativement proches de celles obtenues pour l'enzyme sauvage en présence de L-lactate. L'unique différence notable est l'augmentation de la distance entre l'hydroxyle et l'His373 dans le cas du mutant qui s'accompagne, contrairement au cas des systèmes précédents, d'un rapprochement entre le substrat et le N5 du cofacteur FMN. L'Asp282 se situe par ailleurs assez loin de l'His373, en particulier dans le cas du L-mandélate. Ceci s'explique par une rotation de la partie carboxylate de cet acide aminé qui l'éloigne de l'His373.

L'importante barrière d'activation observée dans ce double mutant peut être due à une position favorable du substrat relativement éloignée de l'His373 mais proche de la flavine. Le mécanisme le plus facile commence par conséquent par le transfert de l'hydrogène  $\alpha$ . La perte de celui-ci et l'oxydation du substrat qui en résulte conduit à un transfert immédiat du proton vers l'His373 même à large distance. Toutefois, l'absence de liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle et la base du site actif induit certainement une augmentation de la barrière. De même,

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

si la position d'équilibre du complexe de Michaelis diffère de trop de celle de l'état de transition, la réorganisation du site actif entraîne une hausse de l'énergie d'activation.

L'étude du mécanisme de transfert d'hydrure dans le flavocytochrome  $b_2$  dans différents systèmes nous amène à plusieurs conclusions :

- le mécanisme le plus facile requiert le transfert de proton avant celui dit d'hydrure ;
- lors du transfert de l'hydrure, la flavine se trouve déjà en partie oxydée ;
- la position distale de l'Arg289 et la présence de la molécule d'eau de cristallisation se révèlent nécessaires au bon déroulement du mécanisme ;
- la présence de la Tyr254 et de l'Asp282 sont requises pour que le transfert de proton se déroule avant celui d'hydrure. Dans les mutants, la charge positive de l'His373 ou l'hydroxyle négativement chargé ne sont pas suffisamment stabilisés pour permettre ce transfert de proton ;
- l'absence de gêne stérique due aux mutations Y254L ou A198G/L230A induit une certaine difficulté pour atteindre une conformation autorisant les différents transferts.

Bien que les barrières obtenues soient trop élevées pour correspondre aux données expérimentales, nos résultats suivent qualitativement ces dernières. Le mécanisme de type hydrure ne peut donc être exclu des hypothèses de réaction possibles dans le Fcb2.

#### 4. Mécanisme Carbanion

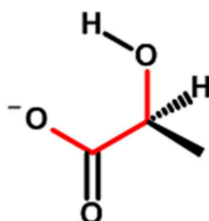
Après cette étude extensive du mécanisme de type hydrure, il conviendrait de réaliser un travail similaire en simulant cette fois-ci le mécanisme de type « carbanion ». Dans ce mécanisme, le proton  $\alpha$  est capté par l'histidine et deux électrons sont transférés depuis le substrat vers la FMN oxydée. Cependant, plusieurs difficultés se posent quant à la modélisation de la réaction. Tout d'abord, si dans le cas du transfert du proton de l'hydroxyle vers l'histidine une liaison hydrogène pouvait se former entre le donneur et l'accepteur de proton, ce n'est pas le cas du transfert du  $H_\alpha$  vers l'histidine. De plus, afin de pouvoir comparer les barrières d'activation deux mécanismes, il faudrait obtenir un réactif et un produit similaire ; or dans le mécanisme de type carbanion, l'accepteur du proton hydroxyle et le donneur de proton à la flavine réduite ne sont pas identifiés. Nous pouvons donc aisément simuler le transfert de proton vers l'histidine, ce qui nous donne un potentiel de force moyenne à une dimension, mais une

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

seconde coordonnée de réaction décrivant le reste du mécanisme reste difficile à définir. Enfin se pose la question de la pertinence de l'existence d'un carbanion au sein du site actif qui suppose la présence de deux charges négatives sur le L-lactate au voisinage du FMN oxydée, électrophile. Ceci revient à s'interroger sur l'ordre relatif des transferts d'électrons et du transfert de proton.

#### a. Etude de la rotation du L-lactate

Comme nous l'avons montré dans l'étude du mécanisme de type hydrure, la rotation autour de la liaison C-C du L-lactate dépend de l'espace disponible autour du substrat. Cette rotation permet au substrat de présenter le proton  $\alpha$  ou le groupement hydroxyle face à l'His373. Toutefois, les dynamiques moléculaires réalisées ne permettent pas de rendre compte du profil énergétique de rotation et d'en caractériser les minima. Nous avons donc simulé le potentiel de force moyenne associé à cette rotation à l'état réactif en prenant pour coordonnée de réaction l'angle dièdre indiqué dans la Figure 54.



**Figure 54 : représentation de Lewis du L-lactate. L'angle dièdre contraint lors des dynamiques est indiqué en rouge**

Pour ce faire, une méthode d'*umbrella sampling* au niveau AM1/MM a été utilisée. Le PFM est obtenu à partir des valeurs du dièdre sur 50 fenêtres de 60 ps chacune (dont 30 ps d'équilibration, pas de temps de 1 fs). L'écart entre les fenêtres est de 3°. La Figure 55 donne les résultats pour l'enzyme sauvage dans les deux conformations possibles de l'Arg289.



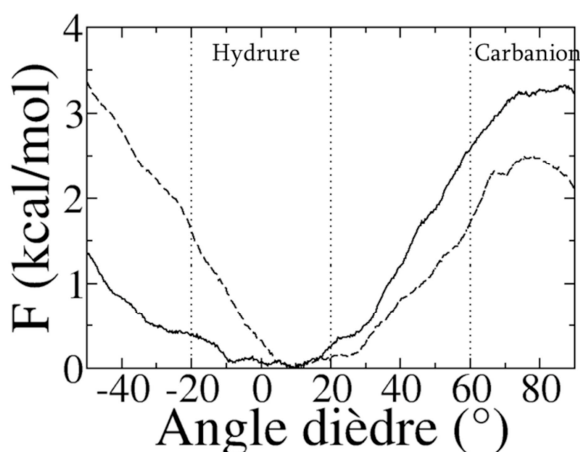


Figure 55 : potentiel de force moyenne associé à la rotation du L-lactate par la variation de l'angle dièdre indiqué dans la Figure 54. Chaque courbe correspond à une position possible de l'Arg289 : distale (trait plein) ou proximale (tirets). Les pointillés verticaux délimitent les valeurs de l'angle dièdre pour lesquelles la conformation préférentielle est celle associée au mécanisme de type hydrure (autour de 0°) ou carbanion (autour de 70°).

D'après ces profils, il apparaît clairement que la géométrie dans laquelle le groupement hydroxyle fait face à l'His373 constitue le minimum du profil de rotation pour les valeurs de la coordonnée de réaction simulées. La position correspondant au mécanisme de type carbanion représente au contraire un maximum. Cependant, l'énergie requise pour passer de l'un à l'autre reste relativement faible : un peu plus de 3 kcal/mol pour l'Arg289 en position distale et de 2 kcal/mol pour sa position proximale. Même si la géométrie du mécanisme carbanion semble instable, le L-lactate peut aisément passer de l'une à l'autre, en particulier lorsqu'il interagit directement avec l'Arg289, l'His373 pouvant se trouver, nous l'avons déjà observé, en interaction avec la Tyr254 et assez loin du substrat. Dans ce cas, le puits correspondant à la position favorable au transfert d'hydrure devient moins large que lorsque l'Arg289 se trouve en position distale et se décale vers la position favorable au mécanisme de type carbanion.

Cette première étude de la rotation confirme que la position entraînant le transfert du proton hydroxyle représente bien un minimum mais que le L-lactate peut tourner facilement jusqu'à ce que le  $H_{\alpha}$  se positionne face à l'His373. Cette conformation est moins déstabilisée par la position proximale de l'Arg289.

#### b. Etude du transfert de $H_{\alpha}$ vers l'His373

Le PFM corrigé du transfert de proton depuis le  $C_{\alpha}$  du L-lactate vers le Ne de l'His373 peut être obtenu de la même manière que les PFM à 2 dimensions calculés pour le mécanisme de

type hydrure. Dans ce cas, une seule coordonnée de réaction est considérée, à savoir la combinaison antisymétrique des distances  $C_{\alpha}-H_{\alpha}$  et  $H_{\alpha}-N_{\epsilon}$ . Le protocole reste exactement le même que dans le cas à deux dimensions, mais seul un transfert est ici considéré. Les courbes obtenues pour les deux positions de l'Arg289 sont représentées dans la Figure 56.

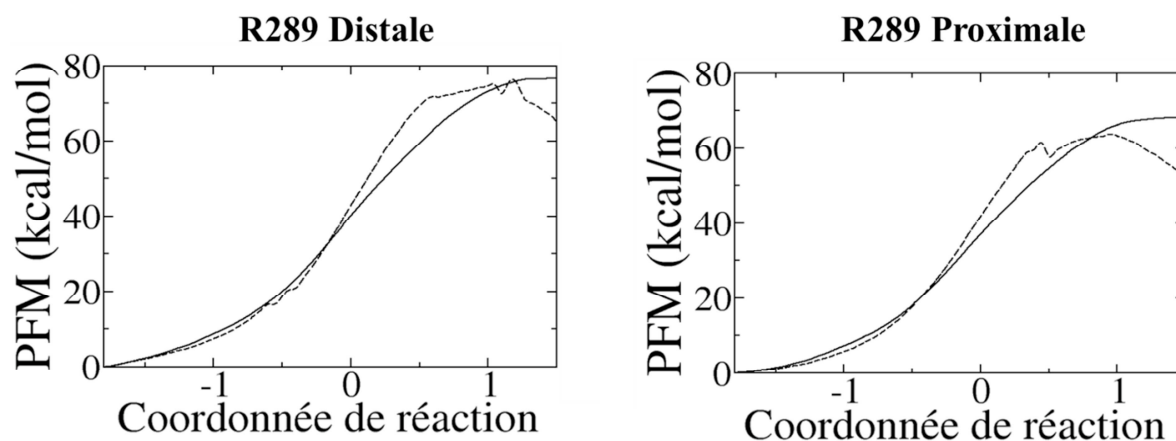


Figure 56 : courbe du potentiel de force moyenne associé au transfert du proton  $\alpha$  depuis le L-lactate vers le Ne de l'His373 pour les deux positions possibles de l'Arg289 au sein du site actif : distale (gauche) ou proximale (droite). Les traits pleins correspondent à la surface AM1/MM et les tirets à la courbe corrigée.

Quelle que soit la géométrie du site actif (avec l'Arg289 en position distale ou proximale) l'énergie d'activation de ce transfert est particulièrement élevée : plus de 60 kcal/mol. Contrairement au cas du mécanisme de type hydrure, le calcul de la correction au niveau DFT n'abaisse pas cette barrière. Il semble alors que le transfert de ce proton seul ne puisse se produire. Nous pouvons néanmoins souligner qu'il se fait plus facilement de plus d'une dizaine de kcal/mol dans le cas où l'Arg289 se trouve en position proximale.

Dans ce mécanisme, aucun accepteur du proton de l'hydroxyle n'est clairement identifié. Or la déprotonation de ce groupe est essentielle pour obtenir l'oxydation du L-lactate. Une attraction de ce proton par une molécule du solvant (eau ou anion présent dans le tampon lors des expériences) semble envisageable mais est difficilement modélisable par une méthode similaire à celle utilisée dans le transfert d'hydrure. En effet, la formation d'un ion  $H_3O^+$  conduit à la déprotonation de ce dernier et à la présence d'un proton en solution. Or, pour effectuer un transfert de noyau d'une molécule à une autre dans notre système, le donneur et l'accepteur doivent être modélisés au niveau quantique. Nous nous retrouvons alors avec un proton solitaire, fortement instable et qui cherche un accepteur (le carboxylate par exemple). Il nous semble alors

impossible de réaliser des courbes de ce transfert à deux dimensions en utilisant des coordonnées de type géométriques.

De plus, dans ce cas, la comparaison entre les deux mécanismes proposés pour l'oxydation du L-lactate reste impossible puisque sans cette déprotonation du groupement hydroxyle, nous n'obtenons pas le même produit. Dans l'idéal, la flavine devrait également être protonée à la fin du mécanisme, ce qui peut se faire aisément à l'aide de n'importe quel donneur proche du cycle isoalloxazine réduit. Cependant, du fait de sa conformation, ce donneur ne peut être le substrat, la fonction alcool se trouvant à l'opposé du plan du cofacteur lorsque le H<sub>α</sub> fait face à l'His373.

Une solution pour palier à ce problème serait de considérer comme seconde coordonnée de réaction non pas une modification géométrique mais une coordonnée qui rendrait compte du départ du proton (modification de pH, réaction alchimique de disparition du proton...). Pour le moment, aucun calcul n'a pu être effectué en ce sens.

Cette brève étude du mécanisme de type carbanion nous montre toutefois que le transfert du H<sub>α</sub> vers l'His373 n'est guère favorable, ni énergétiquement, ni dans sa conformation. Il semble néanmoins plus aisé lorsque l'Arg289 se trouve en position proximale, l'interaction avec celle-ci éloignant le L-lactate de la Tyr254, ce qui facilite la rotation du substrat, et renforçant le caractère électrophile de l'atome C<sub>α</sub>.

## 5. Conclusion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au cas de l'oxydation du L-lactate au sein du flavocytochrome b<sub>2</sub> en envisageant deux mécanismes proposés par les groupes d'expérimentateurs spécialistes de cette protéine. En nous appuyant sur la littérature riche à propos de cette flavoenzyme, nous avons étudié cette réaction dans différents mutants et pour différentes conformation du site actif.

Constitué de deux transferts de proton dont les donneurs et les accepteurs sont identifiés, le mécanisme de type hydrure apparaît comme le plus aisément modélisable. Il implique un transfert de proton du groupement hydroxyle du substrat vers la base du site actif, l'His373 et un transfert d'un proton et de deux électrons vers le cofacteur FMN ancré au sein du site actif. Les simulations dans différents systèmes ont montré que, pour ce mécanisme, deux voies permettent

### III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2

l'oxydation du L-lactate : la première commence par le transfert de proton et se poursuit par le transfert d'hydrure, chaque transfert requérant une certaine énergie mais sans l'apparition d'un état intermédiaire; la seconde débute par le départ de l'hydrogène  $\alpha$  mais de manière à ce que le transfert du proton du groupement hydroxyle se fasse sans surcoût énergétique. Le premier chemin semble légèrement plus favorable que le second et correspond davantage aux observations expérimentales. Toutefois les barrières d'activations observées sont trop élevées par rapport aux données expérimentales.

Cependant, un changement conformationnel ou une mutation modifie le chemin préférentiel et dans plusieurs cas le mécanisme débutant par le transfert d'hydrure devient compétitif, voire le moins coûteux. Par exemple, une plus forte interaction au niveau du groupement carboxylate du L-lactate engendre une perte d'interaction entre l'histidine et le substrat et la conformation favorable au transfert de proton est atteinte plus difficilement. Trop d'espace laissé au L-lactate dans la poche par la mutation d'acides aminés volumineux entraîne un effet similaire. Dans ces différents cas, la flavine oxydée, acceptrice d'électron intervient en premier lieu : en captant un électron du L-lactate et son proton (puis le second électron) elle provoque le départ du second proton vers l'histidine de manière automatique afin d'éviter la formation d'un carbocation. Nous pouvons alors nous poser la question de la valeur de potentiel redox des différentes espèces en jeu ainsi que de l'ordre de transfert des différentes particules (électrons et proton) comprises sous la dénomination « hydrure ». Ces données nous permettraient d'apporter un éclairage différent sur les deux chemins présents sur les surfaces de potentiels de force moyenne obtenues lors de notre étude.

Le mécanisme de type carbanion demeure en revanche plus difficile à modéliser du fait de l'absence d'accepteur défini du proton du groupement hydroxyle. Si ce dernier ne quitte pas le substrat, l'énergie d'activation requise pour le transfert du  $H_\alpha$  vers l'His373 apparaît bien trop élevée en comparaison de celle obtenue pour le mécanisme de type hydrure, déjà nettement supérieure aux données expérimentales. Une nouvelle méthode de modélisation doit être envisagée. De plus, nous devons nous assurer du transfert des électrons du substrat vers la flavine, si possible de déterminer à quel moment se produit ce transfert, et si les électrons se déplacent simultanément, ou plus probablement l'un après l'autre.

Par ailleurs, il reste la question de l'échantillonnage des conformations. En effet, afin d'obtenir une description quantique de la réaction, nos simulations sont limitées à l'échelle de la

### *III. Etude de l'oxydation du L-lactate dans le flavocytochrome B2*

centaine de picosecondes, ce qui semble insuffisants pour prendre en compte des changements conformationnels pouvant entraîner de profondes modifications du mécanisme. Ainsi, quelle est la stabilité des différentes conformations de l'Arg289 ? La molécule d'eau de cristallisation présente dans le site actif peut-elle le quitter ? D'autres molécules d'eau peuvent-elles s'introduire dans le site actif et s'échanger ? Par exemple, dans les simulations du mutant A198G/L230A, une seconde molécule d'eau, en provenance du solvant, interagit avec l'Arg289. D'autre part, la boucle que nous avons reconstruite au début de ce travail existe sous plusieurs formes (deux isozymes possibles, différant de trois acides aminés) et peut avoir une influence sur la vitesse de réaction.<sup>116</sup> Nous nous sommes pour le moment concentrés sur quelques cas de ces multiples conformations possibles, représentatifs cependant des différentes structures élucidées pour cette protéine.

Dans les deux mécanismes, nous n'avons pour le moment considéré que des surfaces adiabatiques et des transferts au cours desquels protons et électrons se déplacent simultanément. Cependant, la présence d'un hydrure ou d'un carbanion au sein du site actif et à courte distance du cofacteur FMN oxydé pose question. Une décomposition des mécanismes en étapes élémentaire de transferts de proton, d'atome d'hydrogène ou d'électron pourrait venir compléter cette étude.

## **IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob**

### ***1. Introduction***

Dans l'étude précédente, nous avons pu observer que, pour mécanisme de type hydrure, la flavine se trouvait à l'état semi-oxydé durant l'état de transition soit avant sa liaison avec l'hydrure en question. Il semble par conséquent que le transfert d'hydrure puisse se décomposer en transfert d'électron, d'hydrogène ou de proton plus ou moins couplés. Des revues récentes, de Hammes-Schiffer en particulier,<sup>117-120</sup> mentionnent les couplages de transferts de proton et d'électrons dans les mécanismes de types hydrogène, hydrure ou PCET (*Proton Coupled Electron Transfers*) où les transferts d'électrons et d'espèces hydrogénées se font d'un donneur vers un accepteur identiques ou différents. Comme nous l'avons déjà vu dans les deux parties précédentes, la réduction à deux électrons d'un cofacteur organique, quinone ou flavine, entraîne également sa protonation, ce qui se résume, au bilan, à un transfert d'hydrure. Cependant, la présence d'un anion hydrure semble hautement improbable dans des milieux organiques où les accepteurs d'électrons sont nombreux (atomes accepteurs de doublets, systèmes  $\pi$  conjugués). Il est plus raisonnable de considérer des mécanismes de transfert d'électrons couplés à des transferts de proton ou d'hydrogène. Si nous nous en tenons à un transfert formel d'hydrure entre une seule molécule organique donneuse D et un seul accepteur organique A, nous pouvons envisager les différents mécanismes décrits dans la Figure 57.

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

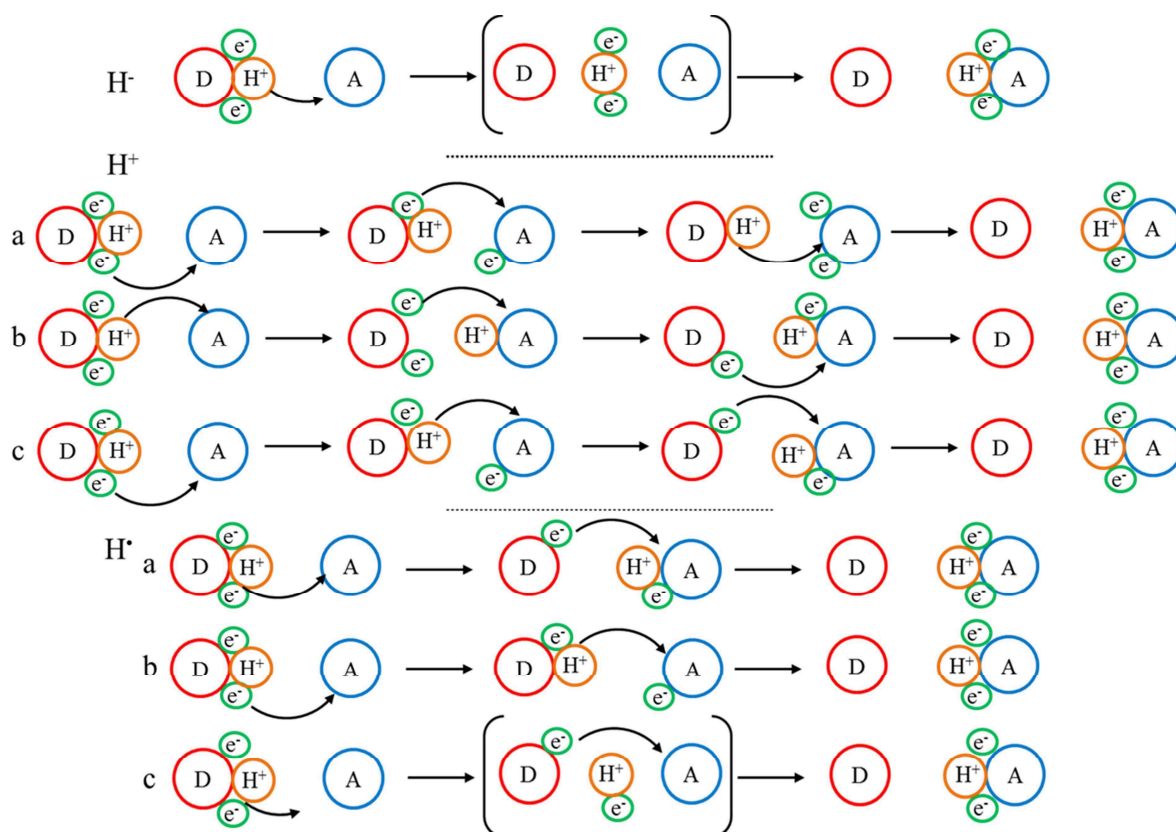


Figure 57 : différentes décompositions envisageables pour un transfert formel d'hydrure entre un donneur D et un accepteur A. Les mécanismes envisagés peuvent s'écrire comme un transfert élémentaire d'hydrure ( $H^\bullet$ ) ; des transferts de proton et de deux électrons ( $H^+$  a, b et c) ; des transferts d'un atome d'hydrogène et d'un électron ( $H^\bullet$  a, b et c).

Outre le transfert réel d'hydrure, hautement improbable puisque l'électron supplémentaire n'est pas stabilisé sur l'atome d'hydrogène, deux familles de mécanismes se distinguent : les mécanismes impliquant le transfert d'un proton et de deux électrons, qui s'appuient sur les propriétés acido-basiques des différents partenaires, et les mécanismes de transferts d'un atome d'hydrogène et d'un électron. L'ordre et le couplage des différentes étapes varient d'un mécanisme à l'autre. Si les réactions de transfert d'hydrure sont largement étudiées expérimentalement,<sup>121</sup> la discrimination de l'un de ces mécanismes de décomposition au sein d'un système biologique s'effectue difficilement du fait des limitations en résolution temporelle des techniques usuelles. Les méthodes de simulations théoriques offrent en revanche la possibilité de modéliser un transfert d'hydrure sur des échelles de temps plus courtes et de différencier les différentes étapes de la réaction, quitte à aboutir parfois à des systèmes non-physiques. Dans la littérature dédiée aux modélisations de systèmes biologiques, nous trouvons cependant peu d'études envisageant la décomposition du transfert d'hydrure : beaucoup portent sur le

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

mécanisme global et la résolution de la thermodynamique du système à l'aide de surfaces adiabatiques,<sup>122-128</sup> l'étude de l'effet tunnel<sup>129</sup> ou encore sur les propriétés acido-basiques ou rédox des cofacteurs en solution ou au sein d'une protéine.<sup>32,130,131</sup> La question se pose toutefois dans la littérature,<sup>132-134</sup> d'autant plus que les outils méthodologiques sont déjà grandement développés (modélisations multi-échelles, théorie de Marcus pour le transfert d'électron, méthodes de perturbations ou d'intégration thermodynamiques pour les transferts d'atomes ou d'électrons, etc...) et que les progrès technologiques repoussent chaque année les limitations en temps de simulation et en taille de système. Nous nous proposons donc, dans cette partie, de décomposer un transfert d'hydrure en différents transferts d'électrons et de proton ou d'hydrogène en utilisant différentes méthodes déjà accessibles au chimiste théoricien.

Pour ce faire, nous avons choisi de nous intéresser au cas de la protéine EmoB. Présente dans des bactéries du genre *Mesorhizobium*, cette protéine homotétramérique contribue à la dégradation de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) en assurant la production de flavine mononucléotide (FMN) réduites dans le milieu cellulaire, oxydée ensuite par l'enzyme EmoA lors de cette dégradation.<sup>135</sup> La protéine EmoB contient également un cofacteur FMN, maintenu par des interactions de type liaison hydrogène et dont le cycle isoalloxazine est accessible au solvant (Figure 58). Lorsque ce cofacteur se trouve à l'état oxydé, il peut être réduit par une molécule de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) présente dans le milieu qui, stabilisée par des interactions  $\pi$  au-dessus de la flavine protéique, lui transfère formellement un hydrure (Figure 59). Ce dernier peut être à nouveau transféré vers une flavine qui vient interagir avec le cycle après départ de la NADH. La protéine EmoB est par conséquent décrite comme un convoyeur d'hydrure.



IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

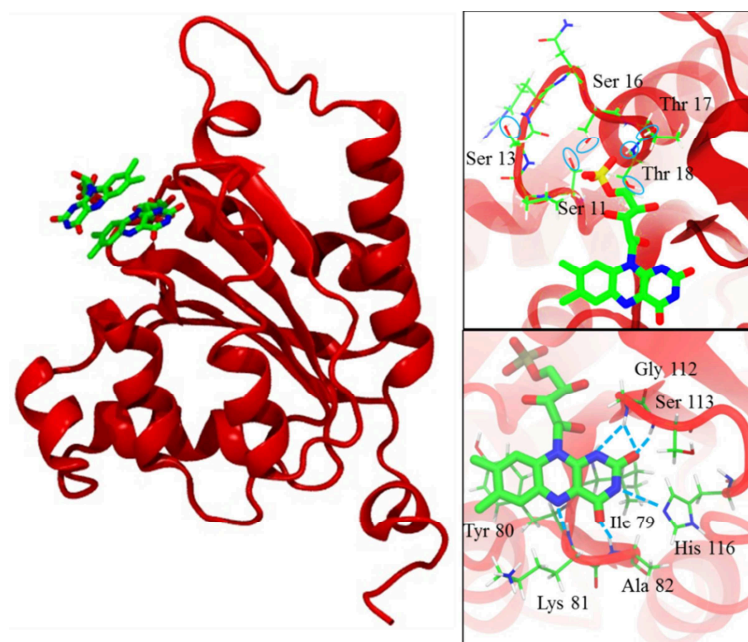


Figure 58 : représentation de la protéine Emob (structure PDB : 2VZH<sup>135</sup>) avec les deux flavines superposées à sa surface (gauche). Les acides aminés interagissant avec la FMN ancrée dans la protéine Emob sont représentés à droite : les groupements polaires de la boucle des résidus 11 à 18 pouvant former des liaisons hydrogènes avec le groupe phosphate au cours des dynamiques sont entourés en bleu (haut) et les liaisons hydrogènes entre le cycle isoalloxazine et les résidus proches sont symbolisées par des traits pointillés bleus (bas).

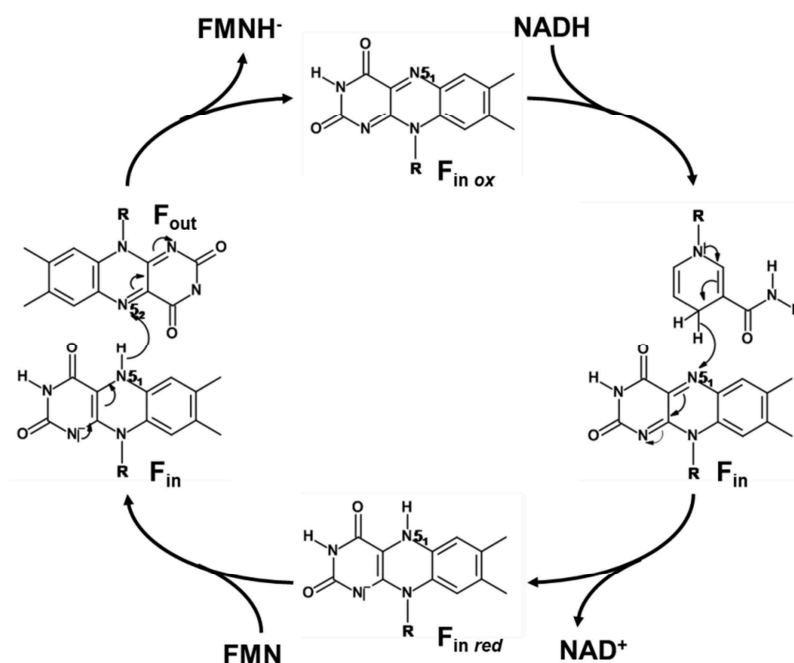


Figure 59 : cycle de réaction de la protéine Emob : la FMN ancrée dans la protéine (notée F<sub>in</sub>) à l'état oxydé est réduite par un transfert formel d'hydrure depuis une molécule NADH du solvant puis oxydée par un deuxième transfert formel d'hydrure vers une FMN du solvant (notée F<sub>out</sub>).

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

Nous allons ici plus particulièrement étudier le deuxième transfert de ce cycle de réactions d'oxydo-réduction, celui de la flavine protéique  $F_{in}$  à la flavine dans le solvant  $F_{out}$ . D'une part, il existe une structure cristallographique de la protéine contenant ces deux flavines superposées.<sup>135</sup> D'autre part, dans l'optique de tester différentes méthodologies et de comparer leurs apports, la simplicité relative de ce système s'avère avantageuse : un seul noyau est transféré entre un donneur et un accepteur clairement identifié (contrairement au cas du Flavocytochrome  $b_2$  par exemple où deux noyaux sont transférés). De plus, le donneur et l'accepteur sont deux molécules identiques, et les caractéristiques des flavines sont largement étudiées d'un point de vue théorique ce qui peut fournir une base sur laquelle s'appuyer pour vérifier les grandeurs énergétiques et le comportement des flavines au cours de nos simulations. Le transfert formel d'hydrure donne lieu à un réactif et à un produit symétrique du point de vue du donneur et de l'accepteur mais l'environnement protéique engendre une dissymétrie du système dont l'importance sera tout particulièrement étudiée.

Cette réaction impliquant un transfert de charge, et donc une modification de la densité électronique, une description quantique des molécules intervenant directement dans le transfert d'hydrure s'avère nécessaire. Une fois encore, la prise en compte de l'environnement conduit à l'utilisation de méthodes multi-échelles.<sup>19</sup> Toutefois, dans le cas présent, la décomposition du transfert d'hydrure implique de connaître la localisation des charges (autour du proton ou sur les cycles isoalloxazines) tout au long du transfert du proton. En fixant la charge des différents partenaires, il est possible de travailler sur des états diabatiques (ou quasi-diabatique) des éventuels transferts d'électrons ce qui permet, si les hypothèses de l'approximation de la réponse linéaire (ARL) sont validées, de construire des courbes s'appuyant sur la théorie de Marcus. Une telle étude se distingue de celle du Flavocytochrome  $b_2$  où les calculs sont effectués sur la surface adiabatique et où la position des électrons n'est pas déterminée. Si le donneur et l'accepteur n'interagissent pas directement, comme c'est le cas lors d'un transfert entre deux complexes métalliques, ou de transfert à longues distances, de telles courbes sont obtenues en calculant les énergies associées à chaque demi-équation du système : l'un des complexes est représenté au niveau quantique et l'autre classiquement.<sup>34,136,137</sup> Dans notre cas, les systèmes  $\pi$  des deux flavines sont proches et interagissent nécessairement : il faut donc décrire dans un même temps les deux cycles au niveau quantique. Dans ce cadre, la théorie de la densité de la fonctionnelle

#### *IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob*

contrainte (cDFT)<sup>138,139</sup> apparaît comme un outil de choix, puisqu'elle permet de contraindre la charge ou la différence de charge d'atomes ou de groupes d'atomes.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à identifier les espèces transférées et le couplage entre les différentes étapes par une étude statique du transfert d'hydrure. Cette dernière se révélant insuffisante, nous nous sommes tournés vers des simulations de dynamiques moléculaires afin de mieux pouvoir prendre en compte la réorganisation du système suivant la localisation des différentes particules (proton et électrons). Les aspects adiabatiques et diabatiques du transfert d'hydrure et de sa décomposition vont être tour à tour étudiés.

### ***2. Etude statique du transfert formel d'hydrure***

Cette première partie concerne donc la caractérisation de l'espèce transférée entre les deux flavines dans la protéine Emob. Ce travail a été commencé lors de mon stage de Master 2, sous la direction de Jean-Philip Piquemal et de Robin Chaudret au Laboratoire de Chimie Théorique (université Pierre et Marie Curie) en collaboration avec le LCP et présente une méthode associant l'analyse topologique ELF et la DFT contrainte. Cette étude a été complétée par l'analyse de chemins de transfert optimisés.

#### *a. Signature topologique de l'hydrure, cas du catéchol*

Afin de décomposer le transfert d'hydrure en plusieurs étapes, il est dans un premier temps nécessaire de caractériser l'espèce transférée : proton, hydrogène ou hydrure et le nombre de transferts d'électron (respectivement deux, un ou aucun). L'étude des charges atomiques le long du chemin réactionnel est parfois utilisée à cette fin.<sup>133</sup> Toutefois, les méthodes de déterminations des charges atomiques sont nombreuses et peuvent parfois donner des résultats assez différents, comme nous l'avons vu dans le cas du paramétrage du champ de force des cofacteurs quinones. De plus, dans le cas des deux flavines dont les systèmes  $\pi$  sont superposés, le découpage de l'espace intermoléculaire aura une grande influence sur l'attribution des charges atomiques et requiert donc une attention particulière.

La fonction de localisation électronique (*Electron Localization function* ELF)<sup>140</sup> repose sur la probabilité de rencontrer des électrons appariés en tout point de l'espace à partir de la densité électronique. Les points de probabilité maximale, nommés attracteurs, se situent au centre des zones d'appariement d'électrons comme les noyaux pour les électrons de cœur, les liaisons

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

ou les paires libres pour les électrons de valence. De plus, ces zones, ou bassins, limitées par des surfaces de flux de densité nulle, peuvent être attribuées à un atome (bassin monosynaptique), ou, dans le cas d'une liaison, à plusieurs atomes (bassin disynaptique pour 2 atomes) dans le cadre de l'analyse topologique de cette fonction. Il est possible de visualiser ces bassins sur une isosurface de la fonction ELF, notée  $\eta$ , et de connaître leur volume, leur population, etc...<sup>141</sup> Cette fonction offre donc plus qu'une simple méthode de calcul des charges puisqu'elle permet de distinguer les électrons intervenant dans les liaisons covalentes et ceux demeurant sur l'atome et de faire un lien entre le calcul de chimie quantique et une description de la molécule de type structure de Lewis. Elle évite ainsi le problème d'attribution des électrons aux atomes formant des liaisons asymétriques, comme O et H ou N et H où la majorité des électrons sera porté par l'atome lourd, plus électronégatif. Cette attribution peut dépendre fortement de la méthode choisie et perdre de sa pertinence dans le cadre de notre étude où c'est justement les électrons dans l'environnement proche de l'hydrogène qui nous intéressent (et non ceux des paires libres de l'oxygène). L'analyse topologique de la fonction ELF permet de plus une visualisation simple et rapide des bassins et des attracteurs et donc de l'attribution des électrons.

Récemment, la signature topologique ELF des différentes liaisons hydrogènes a été étudiée montrant qu'il était alors possible de différencier un proton  $H^+$  d'un hydrogène entouré d'une densité électronique non nulle (comprise dans un bassin attribué à l'hydrogène).<sup>142</sup> Des systèmes comportant des hydrures ont également été étudiés,<sup>143-146</sup> mais ces études concernent des systèmes lacunaires ou comportant des atomes de gaz rare dans le vide, ce qui s'éloigne des problématiques biochimiques. Par ailleurs, des exemples d'analyses ELF de systèmes biologiques décrits par des méthodes QM/MM existent également dans la littérature.<sup>147-150</sup> Toutefois, la signature topologique ELF d'un hydrure dans un système organique ou biologique n'a pas été encore identifiée. L'existence d'un véritable hydrure dans de tels systèmes, où les accepteurs d'électrons sont souvent nombreux (groupements polaires, systèmes  $\pi$ , solvant) pose question. Un hydrure où deux électrons se localisent sur l'hydrogène serait plutôt une espèce limite en milieu biologique, de même que le proton nu. Cependant, en identifier la signature topologique, ainsi que celle de l'hydrogène, permet de définir le caractère « hydrure » plus ou moins prononcé de l'espèce transférée dans notre système.

La DFT contrainte (ou cDFT)<sup>138,139</sup> permet d'imposer la charge d'un atome ou d'un groupe d'atome lors de la détermination de densité électronique. Cette contrainte est introduite

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

dans le calcul de la densité électronique *via* un multiplicateur de Lagrange qui est optimisé au cours des cycles Self-Consistent-Field (SCF). La définition de la contrainte requiert le choix préalable d'un système d'attribution des charges atomiques. Dans cette étude, nous avons choisi la méthode de Hirshfeld.

Dans un premier temps, nous avons testé la méthode couplée cDFT/ELF sur une molécule simple, le catéchol semi-réduit, où l'hydrogène est transféré d'un atome d'oxygène à l'autre en phase gaz. Nous allons nous intéresser dans un premier temps à l'état de transition de ce transfert (Figure 60). La géométrie de ce transfert présente la particularité qu'un pseudo cycle à cinq centres est formé par le noyau transféré, les deux atomes d'oxygène et les atomes de carbone liés à ces derniers. La densité électronique autour du noyau transféré est alors assez importante et le transfert assez rapide puisque l'état de transition possède une énergie de 4 kcal/mol supérieure à celle d'un état réactif (où l'un des oxygène est protoné). Après optimisation de la structure en DFT non contrainte en utilisant la fonctionnelle PBE<sup>151</sup> et la base DZVP-GGA,<sup>38</sup> des calculs d'énergie en cDFT sont effectués au même niveau de théorie pour différentes valeurs de la charge de l'atome transféré : -1, 0 ou +1. Le programme deMon2K<sup>35</sup> est employé pour l'ensemble de ces calculs. La détermination des charges par la méthode *Atom In Molecule* (AIM)<sup>152</sup> valide le choix de la contrainte (Tableau 26). En effet, nous pouvons voir que le nombre d'électron attribué par la méthode AIM à l'atome transféré correspond bien à la contrainte souhaitée : pas d'électrons pour le proton, environ un électron pour l'hydrogène et deux pour l'hydrure. Par ailleurs, ce nombre par atome d'oxygène ne varie que de 0,5 électron lors du passage du proton à l'hydrure : la perte d'électron du cycle au profit de l'hydrogène est répartie entre le cycle benzénique et les atomes d'oxygène.

Contrainte	H	O
H <sup>+</sup>	0	8,98
H <sup>·</sup>	0,83	8,87
H <sup>-</sup>	2,02	8,53

**Tableau 26 :** population en nombre d'électron des bassins AIM associés au noyau transféré de charge contrainte +1, 0 et -1 et à chaque noyau d'oxygène (les atomes d'oxygène sont équivalents dans le catéchol étudié).

Le calcul de la fonction ELF est alors réalisé à partir des densités électroniques des différents systèmes contraints et du système non-contraint. La topologie des différents bassins obtenus est représentée dans la Figure 60.

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

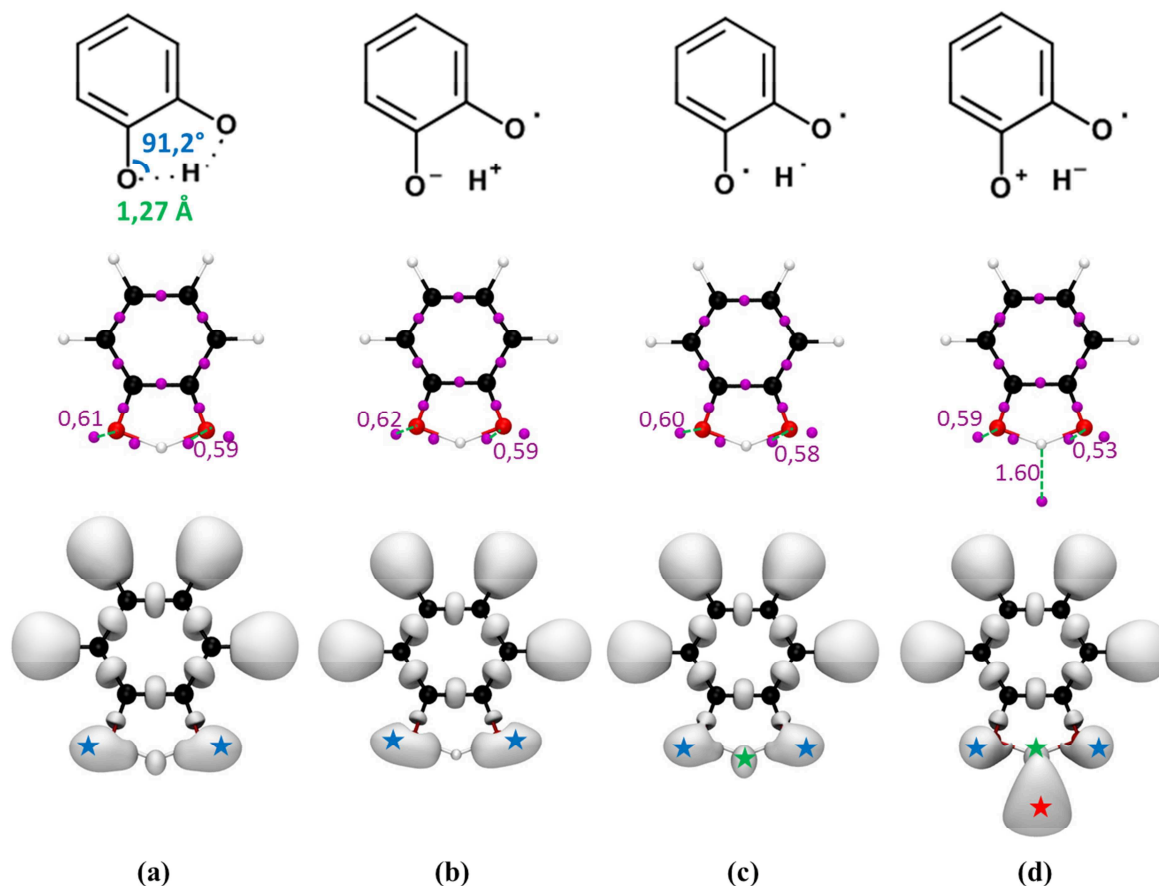
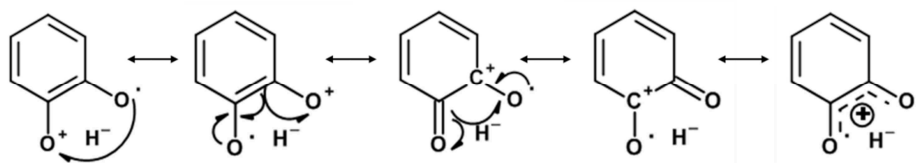


Figure 60 : représentation de Lewis (1<sup>ère</sup> ligne), attracteurs ELF et topologie des bassins ELF ( $\eta = 0,8$ ) pour la géométrie d'état de transition du transfert de proton entre les deux atomes d'oxygène d'une molécule de catéchol semi-réduite. La distance O-H et l'angle C-O-H, équivalents quel que soit l'atome d'oxygène considéré, sont reportés en vert et bleu respectivement. La charge de l'espèce transférée est soit non-contrainte (a), soit contrainte à être de +1 (b), 0 (c) ou -1 (d). La distance entre les attracteurs des bassins (paires libres des atomes d'oxygène ou bassin de l'hydrure) et les noyaux des atomes associés est donnée en Angström. Les étoiles bleues indiquent les bassins des paires libres des atomes d'oxygène, les étoiles vertes le bassin associé à l'atome d'hydrogène et l'étoile rouge le bassin associé à l'hydrure.

Premièrement, considérons le cas du proton (Figure 60 b). Aucun bassin, ni attracteur n'est visible autour du noyau transféré, ce qui concorde avec l'absence de densité électronique engendrée par la contrainte. Au contraire, un bassin électronique peu volumineux est visible dans le cas du transfert d'hydrure (Figure 60 c), centré sur ce dernier mais sans attracteur associé. La topologie des paires libres des atomes d'oxygène est également modifiée : les attracteurs sont plus proches des noyaux (de 0,1 à 0,2 Å) et le volume des bassins est plus important à l'extérieur de la molécule qu'en direction du transfert. Enfin, pour le transfert d'hydrure (Figure 60 d), nous retrouvons le bassin observé dans le cas de l'hydrogène mais accompagné d'un second bassin, particulièrement volumineux, qui se développe à l'extérieur de la molécule, là où la densité

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

électronique due au reste de la molécule est la plus faible. Les paires libres des atomes d'oxygène sont nettement moins volumineuses que dans les cas précédents avec très peu de densité au niveau de l'interaction oxygène-hydrure. La forte densité électronique présente entre les atomes d'oxygène repousse ces paires libres, ce qui se traduit par un déplacement des attracteurs, en particulier de ceux proche de l'hydrure, en direction des noyaux oxygènes (distance noyau-attracteur de 0,58 Å dans le cas de hydrogène puis de 0,53 Å dans le cas de l'hydrure). Au niveau du cycle aromatique, nous observons l'apparition d'un deuxième attracteur au milieu de deux liaisons C-C, ce qui est la signature topologique d'une liaison double (une liaison de type aromatique, où les électrons  $\pi$  sont délocalisés autour du cycle, ne présente qu'un seul attracteur tout comme une liaison simple). Une interprétation par des formes de Lewis est donnée Figure 61. Ce dédoublement de liaison traduit une perte d'aromaticité du cycle due à son oxydation : dans le cas de l'hydrogène, l'électron localisé sur le noyau transféré intervient encore dans la densité électronique totale de la molécule en interagissant avec les électrons célibataires des atomes d'oxygène ; dans le cas de l'hydrure, l'électron centré sur le noyau joue le même rôle mais celui situé dans le bassin volumineux se localise en dehors du cycle, puisque l'attracteur associé se trouve à 1,60 Å du noyau, et peut être considéré comme retiré du catéchol. Seule la contrainte maintient cet électron à proximité du noyau d'hydrogène puisqu'aucune interaction ne l'y stabilise. La forme hydrure semble donc hautement improbable. D'ailleurs, l'analyse topologique de la forme non contrainte (Figure 60 a) donne une figure similaire à celle de l'hydrogène, avec un bassin centré sur le noyau transféré, dépourvu d'attracteur, mais dont les attracteurs associés aux paires libres des atomes d'oxygène se situent à des distances équivalentes à celle du cas « proton ».



**Figure 61 : formes mésomères du catéchol semi-réduit dans le cas contraint du transfert d'hydrure. La charge positive est alors délocalisée sur les deux atomes d'oxygène et les atomes de carbone liés à ces derniers.**

L'analyse ELF donne également les populations de chaque bassin (Tableau 27). Dans le cas de l'hydrure, nous pouvons constater que d'une part le bassin contenant l'électron supplémentaire ( $V(\text{Asyn})$ , *i.e.* non-assigné par le programme TopMod<sup>153</sup> mais que nous avons associé à l'espèce transférée) contient effectivement un électron dans un volume équivalent à

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

celui des paires libres des atomes d'oxygène et dix fois supérieur au volume du bassin monosynaptique (*i.e.* assigné à un seul atome) associé à l'atome d'hydrogène (V(H)) comprenant également un électron. Dans le cas où l'espèce transférée est un atome d'hydrogène, le bassin hydrogéné est partagé considéré comme disynaptique (assignation à deux atomes, comme dans le cas d'une liaison). Nous observons par ailleurs que si l'hydrogène emprunte son électron en majeure partie aux atomes d'oxygène (baisse de 0,5 électron de la population des paires libres de chaque atome d'oxygène par rapport au cas du proton), l'hydrure dépeuple également le cycle (perte d'un électron dans le cycle aromatique, d'où perte de l'aromaticité). La forme non contrainte présente un bassin centré sur l'hydrogène à demi peuplé et des bassins oxygénés intermédiaires entre ceux obtenus pour les contraintes « proton » et « hydrogène ». D'après les travaux de Chaudret *et al.*<sup>142</sup>, la présence d'un bassin V(H) signale la délocalisation du proton entre les deux atomes d'oxygène. L'espèce transférée est donc intermédiaire entre le proton et l'hydrogène et participe au système électronique de la molécule.

	V(Asyn)	V(H)	V(O,H)	V(O)	V(C-C) <sub>tot</sub>
Non-cst	-	0,48	-	5,5	16,5
H <sup>+</sup>	-	-	-	5,7	16,6
H <sup>•</sup>	-	-	1,0	5,2	16,5
H <sup>-</sup>	1,08	1,07	-	4,6	15,7

**Tableau 27 : population en nombre d'électrons de certains bassins ELF présents sur le catéchol non-contraint et avec différentes contraintes de charge sur l'atome d'hydrogène transféré. Dans le cas d'un dédoublement du bassin des paires libres d'un atome d'oxygène (les atomes d'oxygène étant équivalents), la population donnée pour V(O) correspond à la somme des deux bassins monosynaptiques. La population notée V(C-C)<sub>tot</sub> correspond à la somme des populations des bassins disynaptiques associés aux liaisons carbone-carbone du cycle.**

Néanmoins la question du devenir du bassin de l'électron supplémentaire de l'hydrure en solution peut se poser. En effet, dans ce cas, l'électron n'aura pas autant d'espace à disposition du fait de la présence de molécules d'eau voisines. Le système présenté dans la Figure 62 où trois molécules d'eau sont placées à proximité de la fonction quinole permet une première approche d'un cas en solution. Dans ce système, si la charge est contrainte afin d'obtenir un hydrure, le bassin supplémentaire non assigné apparaît, mais dans un volume beaucoup plus restreint (il est par ailleurs moins peuplé d'environ 0,2 électron par rapport au catéchol isolé). La présence d'un tel bassin demeure cependant la signature topologique ELF de l'hydrure tandis que le bassin centré sur le noyau d'hydrogène est celle de l'atome d'hydrogène (avec un caractère proton plus ou moins prononcé toutefois).



#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

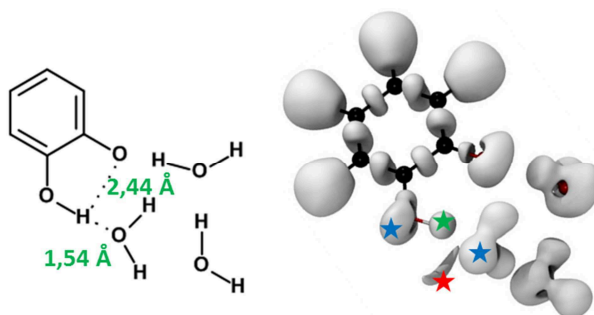


Figure 62 : représentation de Lewis et topologie des bassins ELF ( $\eta=0,8$ ) pour une molécule de catéchol à l'état semi-réduit en présence de trois molécules d'eau autour de la fonction quinole. Les distances entre le proton de la fonction quinole et les atomes d'oxygènes voisins sont reportées en vert. Les étoiles bleues indiquent les bassins des paires libres des atomes d'oxygène, les étoiles vertes le bassin associé à l'atome d'hydrogène et l'étoile rouge le bassin associé à l'hydrure.

Nous avons donc montré que l'analyse topologique ELF permettait de caractériser l'espèce transférée de manière simple par la représentation tridimensionnelle des bassins et de façon plus détaillée par l'analyse fine de la population de ces derniers. Nous allons maintenant pouvoir l'appliquer au cas de la protéine Emob et au transfert formel d'hydrure entre les deux flavines.

##### b. Chemin de réaction du transfert formel d'hydrure

Dans un premier temps, le chemin réactionnel du transfert du noyau d'hydrogène a été calculé en appliquant la méthode Nudge Elastic Band,<sup>43-45</sup> présentée rapidement dans la première partie concernant le TTQ. Dans le cas du transfert formel d'hydrure au sein de la protéine Emob, une quinzaine de points du chemin ont été optimisés en utilisant un schéma QM/MM dans lequel les cycles isoalloxazines des deux flavines constituent la partie quantique. L'environnement comprend les queues D-ribitol-5-Phosphate, la protéine, le solvant et les contre-ions sodium (Figure 63). La saturation du carbone situé à la frontière entre la partie QM et la partie MM est assurée par un atome d'hydrogène de liaison : la queue des flavines est remplacée par un atome d'hydrogène dans les calculs quantiques. Les interactions entre les parties QM et MM sont modélisées par un schéma *electrostatic embedding* dans lequel les charges environnantes sont prises en compte dans le calcul de la partie quantique dans un rayon de 15 Å autour de celle-ci. Par ailleurs, afin de conserver la structure de la boîte tout au long de la simulation et en l'absence de conditions périodiques, les atomes se trouvant au-delà de 20 Å des flavines sont figés. Les calculs au niveau quantique s'effectuent au même niveau de théorie que les précédentes optimisations de géométries sur le catéchol toujours avec le programme deMon2K ; les calculs

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

classiques sont réalisés par le programme CHARMM<sup>24</sup>. La communication entre les deux programmes et le calcul de l'énergie totale se font par le programme cuby.<sup>41</sup> Le chemin obtenu est présenté dans la Figure 64 une barrière étroite de 9 kcal/mol et une différence d'énergie entre réactif et produit d'un peu plus de 1 kcal/mol.

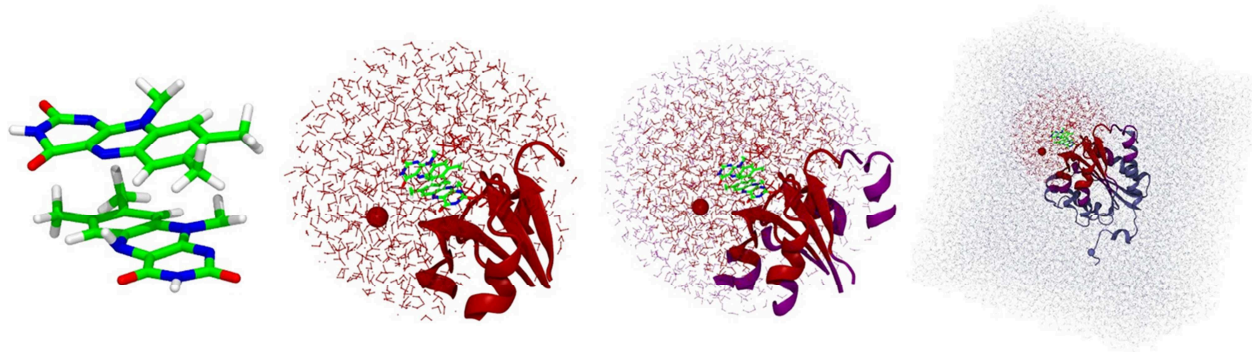


Figure 63 : découpage des parties QM et MM utilisé dans les calculs des chemins de transfert d'hydrure par une méthode NEB. Les cycles isoalloxazines (à gauche) constitue la partie QM. La partie MM se décompose en trois parties : les atomes compris dans une sphère de 15 Å autour de la partie QM, colorés en rouge, sont mobiles et leur charge polarise la partie quantique ; la couche violette (sphère de 20 Å) est mobile mais les charges atomiques sont absentes du calcul quantique ; le reste de la boîte (bleu) est figé. Les cations sont représentés par les sphères de Van der Waals et les molécules d'eau sont en « boules et bâtonnets ».

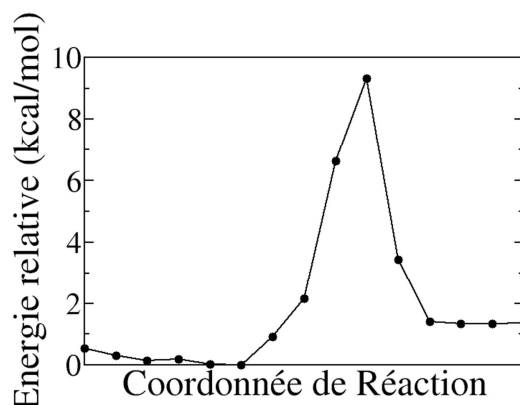


Figure 64 : énergie potentielle relative au minimum énergétique de la courbe le long du chemin de transfert adiabatique de l'hydrure de  $F_{in}$  vers  $F_{out}$ . La coordonnée de réaction est une coordonnée globale comprenant l'ensemble des variations du système lors du transfert et pas uniquement la distance N5-H (Figure 59).

Les points situés avant ou après la barrière correspondent à une même valeur de la distance N5<sub>1</sub>-H ou N5<sub>2</sub>-H (1.03 Å) mais pour différentes positions du noyau transféré entre les deux flavines (variations de l'angle de liaisons). La barrière se situe au moment où les deux distances N5-H sont supérieures à cette longueur de liaison.

Tout comme dans le cas précédent du catéchol, il est possible d'effectuer l'analyse ELF au niveau de l'état de transition approximatif du transfert (géométrie d'énergie maximale). La

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

charge de l'espèce transférée a également été contrainte. Les bassins obtenus sont représentés dans la Figure 65 et certaines populations retranscrites dans le Tableau 28.

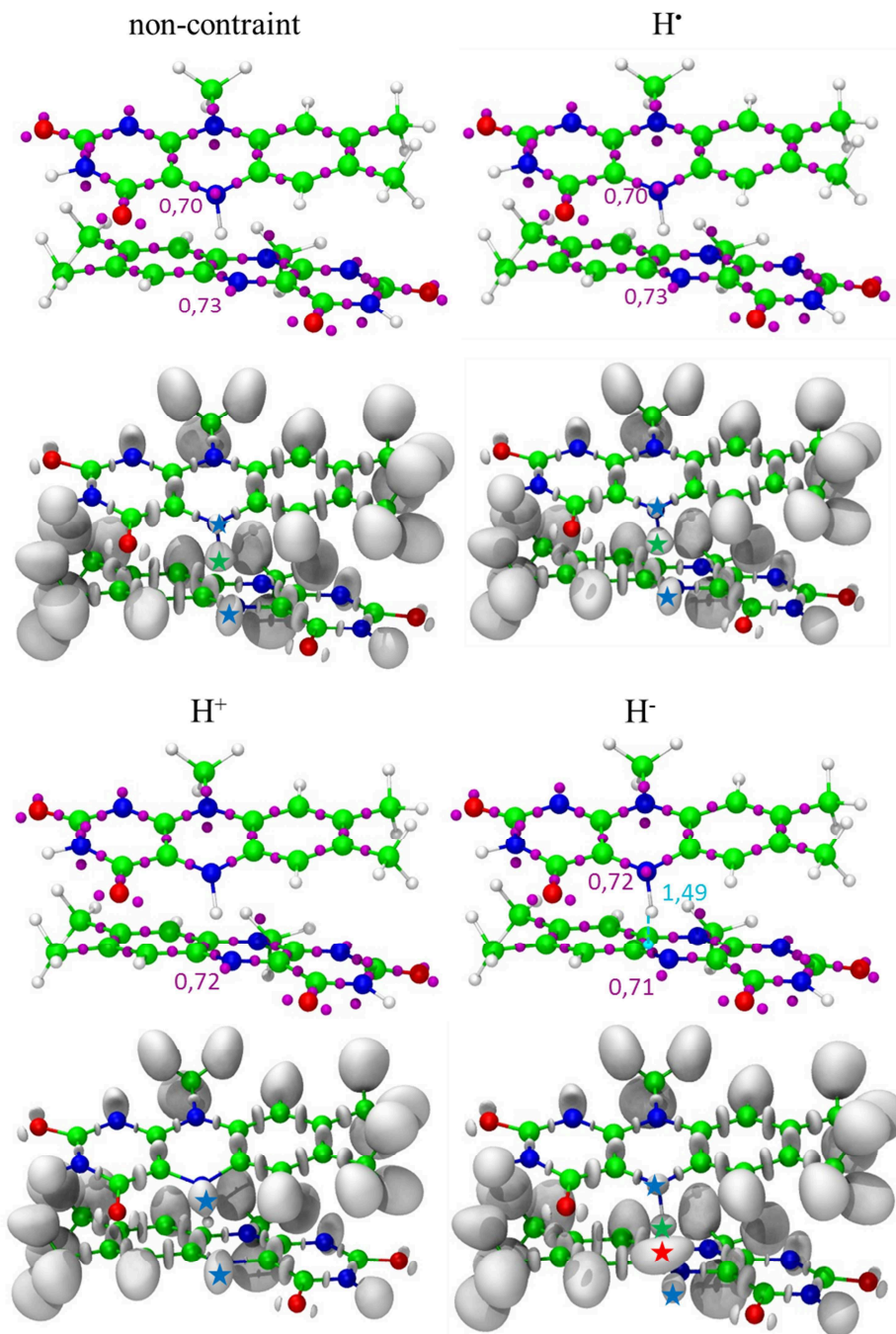


Figure 65 : représentation des attracteurs et des bassins ELF ( $\eta = 0,9$ ) pour la géométrie de l'état de transition du chemin obtenu par NEB du transfert d'hydrure entre les deux flavines de la protéine Emob. La charge de l'espèce transférée est soit non-contrainte, soit contrainte à être de 0 (H•), +1 (H<sup>+</sup>) ou -1 (H<sup>-</sup>). La distance entre les attracteurs des bassins (paires libres des atomes d'azote ou bassin de l'hydrure) et les noyaux des atomes

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

associés est donnée en Angström. Les étoiles bleues indiquent les bassins des paires libres des atomes d'azote, les étoiles vertes le bassin associé à l'atome d'hydrogène et l'étoile rouge le bassin associé à l'hydrure.

	V(Asyn)	V(H,N5 <sub>2</sub> )	V(N5 <sub>1</sub> )	V(N5 <sub>2</sub> )
Non-cst	-	1,9	2,9	1,6
H <sup>+</sup>	-	-	3,1	3,1
H <sup>•</sup>	-	1,9	2,8	1,6
H <sup>-</sup>	0,93	1,9	2,15	1,8

Tableau 28 : population ELF en nombre d'électron des bassins associés au noyau d'hydrogène et à la paire libre de chaque atome d'azote impliqué dans le transfert du proton. La notation V(Asyn) distingue le bassin volumineux associé à l'hydrure du bassin associé à l'hydrogène transféré.

La figure non-contrainte donne un bassin centré autour du proton transféré, signature, comme nous l'avons vu précédemment, d'un caractère "hydrogène" plus ou moins prononcé. Dans la géométrie choisie, l'espèce transférée est légèrement plus proche de l'atome d'azote de la flavine solvatée (N5<sub>2</sub>) ce qui explique l'attribution de ce bassin en tant que bassin de liaison disynaptique V(N5<sub>2</sub>,H). La comparaison entre la forme non-contrainte et les structures contraintes permet de quantifier un peu mieux ce caractère hydrogène. Tout d'abord, nous observons dans les espèces contraintes les signatures déjà observées pour le catéchol : pas de bassin pour le proton avec des bassins volumineux sur les atomes d'azote, un bassin centré sur l'hydrogène pour le cas hydrogène et pour l'hydrure avec pour ce dernier un second bassin, de taille importante et développé dans les zones de faible densité électronique. Au niveau de la paire libre de chaque atome d'azote, nous constatons que celle du N5<sub>1</sub> est plus volumineuse et plus peuplée que celle du N5<sub>2</sub> du fait de l'attribution d'un électron de l'azote N5<sub>2</sub> au bassin V(N5<sub>2</sub>, H), sauf dans le cas contraint du proton, où ce bassin disynaptique n'existe pas et où chaque atome d'azote dispose de trois électrons. Dans ce dernier cas, un électron reste donc sur la flavine protéique F<sub>in</sub> tandis que l'autre est transféré à la flavine solvatée F<sub>out</sub>, aboutissant ainsi à un système symétrique. Dans le cas hydrure, les paires libres des atomes d'azote sont aussi assez proches, tant d'un point de vue topologie que population, ce qui signifie que l'électron supplémentaire est emprunté à N5<sub>1</sub>, qui voit sa population décroître de un électron par rapport au cas proton. Cependant, dans le cas du transfert d'hydrogène, un électron demeure sur la flavine F<sub>in</sub>, tandis que le cycle isoalloxazine de F<sub>out</sub> fournit un électron à l'interaction azote-hydrogène

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

(Figure 66). Les populations dans les cas hydrogène et non contraint sont quasiment similaires. Dans le cas des flavines, l'espèce transférée possède donc un caractère hydrogène fort. Plus chimiquement, ceci peut se comprendre par le caractère acide fort et base forte des flavines oxydées et réduites respectivement. Dans les conditions de la protéine Emob, il est impossible pour la flavine réduite de perdre uniquement un proton ou uniquement deux électrons. D'ailleurs, lorsque la charge de l'espèce transférée est de +1, la flavine  $F_{out}$  est réduite une fois, ce qui corrobore le fait que le départ du proton s'accompagne automatiquement du départ d'un électron. De même, l'hydrure semble improbable du fait de la proximité des cycles isoalloxazines, tous deux oxydés et plus électrophiles que l'atome d'hydrogène, donc susceptibles d'attirer l'électron supplémentaire de l'hydrure.

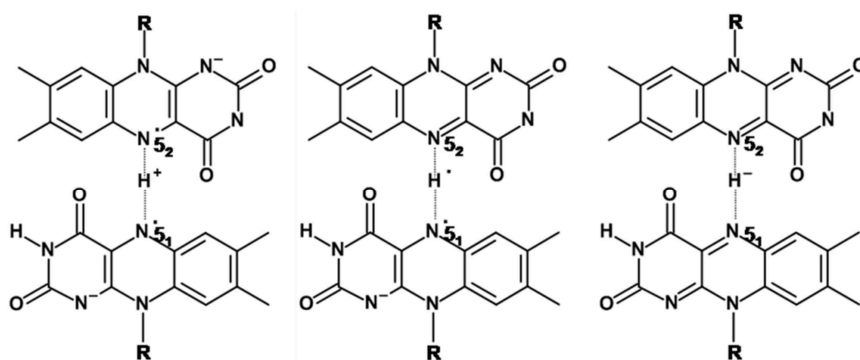


Figure 66 : représentation de Lewis du transfert entre les deux flavines dans les cas où l'espèce transférée est, de gauche à droite, un proton, un atome d'hydrogène ou un hydrure. Les états des flavines sont déduits des populations ELF.

Nous avons donc établi, en appliquant une méthode couplée cDFT/ELF à un système décrit en QM/MM, que le transfert formel d'hydrure entre les deux flavines de la protéine Emob s'écrit comme un transfert d'hydrogène accompagné d'un transfert d'électron. Néanmoins, le couplage entre ces deux étapes ainsi que leur ordre relatif reste à déterminer. Pour ce faire, nous pouvons nous intéresser non pas au transfert adiabatique, où le mouvement des électrons est considéré comme étant plus rapide que celui des noyaux et donc n'est pas étudié, mais à des états diabatiques du système.

##### c. Chemin de transfert dans les états diabatiques

Ayant établi que nous pouvions écrire le transfert d'hydrure comme la résultante d'un transfert d'un atome d'hydrogène et d'un électron, nous allons nous intéresser maintenant au transfert de cet électron. Deux états diabatiques associés à ce transfert peuvent être décrits : soit

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

l'électron se localise sur le cycle isoalloxazine de la flavine protéique (état  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$ ) ; soit sur celui de la flavine solvatée (état  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$ ). L'idée est de comparer les chemins réactionnels du transfert d'hydrogène sur chacun de ces deux états avec celui du transfert adiabatique dans le but d'obtenir des informations sur le couplage du transfert d'électron et du transfert d'hydrogène.

La DFT n'est toutefois pas une méthode de choix pour décrire des états diabatiques. En effet, les résultats obtenus par DFT correspondent à la surface adiabatique sur laquelle l'électron pourra être réparti sur les deux cycles isoalloxazines. Il faudrait donc étudier les flavines séparément pour en fixer la charge sans que celle-ci puisse se transférer, entièrement ou partiellement, au second cycle. Or un tel système ne permet pas de prendre en compte la spécificité du cas EmoB où les deux flavines doivent être prises en compte pour le transfert d'hydrogène et où leur superposition influence probablement fortement leurs propriétés rédox. Dans ce cadre, la cDFT s'avère idéale puisque qu'elle permet de contraindre la différence de charge entre les deux cycles isoalloxazines tout en définissant un donneur et un accepteur d'électron. Ainsi, dans l'état diabatique  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$ , la flavine protéique est le donneur d'électron et possède une charge négative de plus que la flavine solvatée, et *vice-versa* pour l'état  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$ . Des chemins cDFT/MM du transfert d'hydrogène sur chacun de ces états diabatiques ont été obtenus par NEB (Figure 67).

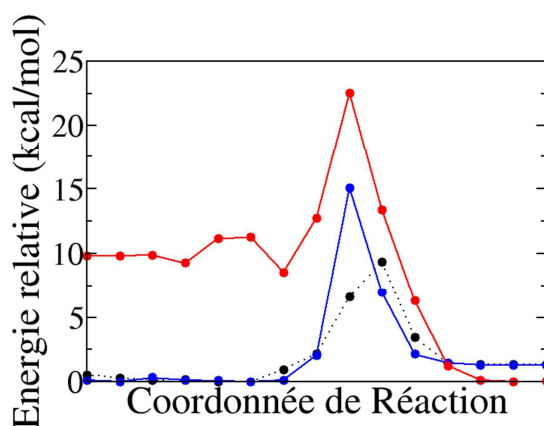


Figure 67 : énergie potentielle (relative au minimum énergétique de chaque courbe) le long des chemins de transfert de l'atome d'hydrogène de  $F_{in}$  vers  $F_{out}$  de la protéine EmoB pour les états diabatiques  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  en bleu et  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$  en rouge. La courbe obtenue pour le transfert adiabatique est rappelée en trait pointillé noir.

D'une part, les barrières obtenues pour ces chemins sont plus importantes que dans le cas adiabatique (15 et 13 kcal/mol). D'autre part, si le produit dans l'état  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  est de 1 kcal/mol moins stable que le réactif comme dans le cas non-contraint, il est de 10 kcal/mol plus stable que

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

le réactif dans l'état  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$ . Le profil sur l'état diabatique  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  apparaît comme le plus proche des énergies non-contraintes. Du fait de la différence de barrières entre les chemins contraints et non contraint, il apparaît qu'un transfert partiel de l'électron contribue certainement à faciliter le départ de l'hydrogène. Cependant, un transfert complet avant départ déstabilise d'une dizaine de kcal/mol le réactif, et il semble moins coûteux énergétiquement que l'électron demeure sur  $F_{in}$  le long du transfert d'hydrogène plutôt qu'il soit transféré sur  $F_{out}$  dès le départ. Pour étudier plus finement la réaction, l'analyse des populations ELF en différents points clefs des chemins a été effectuée (Tableau 29).

		V(H,N5 <sub>i</sub> )	V(N5 <sub>1</sub> )	V(N5 <sub>2</sub> )
	<b>R</b>	2,06	1,39	2,67
<b>Non-cst</b>	<b>ET</b>	1,90	2,90	1,60
	<b>P</b>	2,15	2,84	1,15
	<b>R</b>	2,05	1,57	2,64
$\{F_{in}^-; F_{out}\}$	<b>ET</b>	1,82	3,07	1,46
	<b>P</b>	2,17	2,96	0,93
	<b>R</b>	2,15	0,63	2,96
$\{F_{in}; F_{out}^-\}$	<b>ET</b>	1,38	1,25	3,09
	<b>P</b>	2,07	2,63	1,79

**Tableau 29 : population ELF en électron des bassins associés à l'espèce transférée et aux paires libres des atomes d'azote N5 impliqués dans le transfert pour les géométries des états réactif (R), de transition (ET) et produit (P) des différents chemins de transfert sur les états adiabatique (non-cst) et diabatiques  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  et  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$ .**

Considérons, dans un premier temps, le chemin non-contraint. Il apparaît que le système n'est pas complètement symétrique : la paire libre de l'atome N5<sub>1</sub> est plus peuplée que celle de N5<sub>2</sub> dans des états rédox *a priori* comparables (*i.e.* dans l'état réactif pour l'un des azotes et l'état produit pour l'autre). De même, comme nous l'avons vu précédemment, l'électron supplémentaire demeure majoritairement sur N5<sub>1</sub> au niveau de l'état de transition. Au contraire, les liaisons N5-H présentent des bassins similaires dans les états réactifs et produits. Si nous nous intéressons maintenant aux les résultats obtenus le long des chemins contraints, nous observons que l'ensemble des bassins associés aux paires libres des atomes d'azote sur l'état  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  sont plus proches des bassins non-contraints que ceux sur l'état  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$  sans pour autant être similaires : les populations diffèrent de 0,03 à 0,22 électron entre le cas  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  et le cas non-contraint et de 0,21 à 1,65 électrons entre le cas  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$  et le cas non-contraint. Par

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

conséquent, il semble que l'électron ne soit pas intégralement transféré de  $F_{in}$  à  $F_{out}$  au cours du transfert d'hydrogène, voire qu'il demeure en grande partie sur  $F_{in}$ .

L'étude statique du transfert d'hydrure au sein de la protéine Emob indique donc d'une part que le transfert se découpe en transfert d'hydrogène et en transfert d'électron et d'autre part que le transfert d'électron reste incomplet. Or, il apparaît clairement expérimentalement que le rôle biologique de la protéine Emob est de transmettre l'hydrure d'une molécule nicotinamide à une flavine *via* son cofacteur FMN protéique  $F_{in}$ . Il faut donc que l'électron soit entièrement transféré de  $F_{in}$  à  $F_{out}$ . Il est envisageable que ce transfert intégral ne s'effectue qu'une fois une certaine conformation du complexe des deux flavines atteinte (par exemple un *destacking* des deux cycles isoalloxazines) ou que la relaxation du système, particulièrement au niveau de l'état produit, ne soit pas complète. Dans tous les cas, l'étude statique est insuffisante pour expliquer l'intégralité du mécanisme. Pour approfondir cette analyse, nous avons réalisé une étude dynamique du transfert.

### 3. Etude dynamique : méthodologie et résultats

Afin d'étudier le transfert d'électron nous souhaitons modéliser le comportement du système par des simulations de dynamique moléculaire sur chacun des états diabatiques décrits précédemment. En calculant l'énergie libre du système dans chaque simulation nous escomptons construire des courbes de type Marcus. Pour ce faire, plusieurs possibilités s'offrent à nous : soit le calcul de dynamiques en cDFT/MM, où le comportement des cycles isoalloxazines est calculé au niveau quantique à chaque pas de la dynamique ; soit des simulations purement classiques, où le champ de force des flavines est calibré à partir de données obtenues au niveau DFT et où l'énergie de la partie quantique est évaluée sur les trajectoires classiques. Nous étudierons chacune de ces méthodes au cours de ce chapitre.

#### a. Construction de courbes de type Marcus

La théorie de Marcus<sup>154,155</sup> est largement employée pour déterminer la thermodynamique du transfert d'électron tant à partir de données expérimentales que de données théoriques. La coordonnée de réaction associée à la théorie de Marcus, théorie macroscopique, doit pouvoir prendre en compte l'ensemble des degrés de liberté du système : les modes de vibration des



#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

réactifs et la polarisation du solvant, qui doit être modifiée pour autoriser le transfert de charge, soit un grand nombre de dimensions. Or, il est plus facile de travailler avec un problème à une dimension. Dans la littérature, la valeur de la différence d'énergie entre les états diabatiques  $\Delta E_{\text{dia}}$  pour une géométrie donnée est proposée comme coordonnée de réaction pour la construction de courbes de Marcus à partir de données théoriques, permettant ainsi de faire le lien entre descriptions microscopique et macroscopique.<sup>156,157</sup> Non seulement cette différence est quantifiable tout au long des simulations une fois définis les états diabatiques mais elle permet également de prendre en compte l'ensemble des degrés de liberté du système, contrairement à une coordonnée de type géométrique. Nous pouvons exprimer l'énergie libre  $F$  du système dans un état  $x$  à partir de la probabilité  $p$  des valeurs de  $\Delta E_{\text{dia}}$  :

$$F_x = -kT \ln(p_x(\Delta E_{\text{dia}})) + C_x \quad 30$$

où  $k$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $C$  une constante dont nous détaillerons la détermination par la suite. Cette définition de l'énergie libre suppose un échantillonnage complet de l'espace des phases.

Par ailleurs, dans la théorie de Marcus, les énergies libres associées à chaque état diabatique sont représentées par des paraboles de même courbure ce qui suppose que l'approximation de la réponse linéaire (ARL) peut s'appliquer et que la densité de probabilité de l'écart énergétique diabatique est assimilée à une loi normale de même écart-type pour les simulations dans les deux états diabatiques. Dans le cadre de l'ARL, les énergies libres de réaction et de réorganisation s'expriment simplement en fonction de l'écart énergétique diabatique (voir aussi la partie II):

$$\Delta F = \frac{1}{2} (\langle \Delta E_{\text{dia}} \rangle_f + \langle \Delta E_{\text{dia}} \rangle_i) \quad 31$$

$$\lambda = \frac{1}{2} (\langle \Delta E_{\text{dia}} \rangle_f - \langle \Delta E_{\text{dia}} \rangle_i) \quad 32$$

où  $i$  et  $f$  désignent les états diabatiques avant ou après transfert d'électrons de  $F_{\text{in}}$  vers  $F_{\text{out}}$  respectivement, et les crochets correspondent aux valeurs moyennes sur les dynamiques. De plus, les écarts en énergies libre et potentielle le long de la coordonnée de réaction sont alors liés par la relation<sup>158,159</sup> :

$$F_f(\Delta E_{\text{dia}}) = F_i + |\Delta E_{\text{dia}}| \quad 33$$

A partir des données issues des simulations diabatiques, nous avons choisi de construire les courbes diabatiques en suivant ce protocole (voir aussi la Figure 68):

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

- calcul de l'énergie libre associée à l'écart énergétique diabatique sur chaque dynamique dans chaque état diabatique par l'équation 30, en négligeant la constante ;

- placement des courbes l'une par rapport à l'autre : nous avons choisi de placer le minimum des courbes issues des dynamiques sur les états  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  en zéro et de décaler celui sur les états  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$  de la valeur de l'énergie libre de réaction par rapport à 0 (ce qui revient à considérer une constante  $C$  nulle dans l'équation 1 pour les états  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  et égale à  $\Delta F$  pour les états  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$ ) (croix dans la Figure 68) ;

- construction de points supplémentaires en appliquant l'équation 33 (cercles dans la Figure 68)

- modélisation des courbes obtenues par des paraboles à partir des deux jeux de points pour chaque état diabatique.

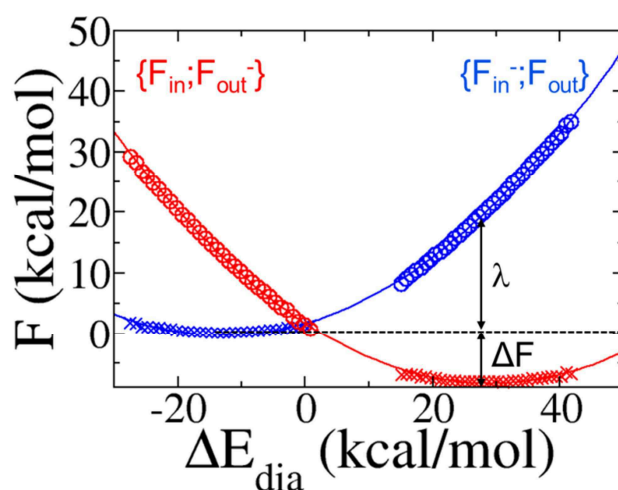


Figure 68 : courbes diabatiques construites à partir des résultats cDFT/MM sur les dynamiques classiques sur chacun des états diabatiques. Les points obtenus à partir des dynamiques sont représentés par des croix et constituent le puits de chaque parabole. Les points de la courbe de l'état diabatique où l'électron est localisé sur  $F_{out}$  sont décalés de la valeur de l'énergie libre de réaction. Les points représentés par des cercles sont construits en appliquant la formule 33. Ces deux jeux de points par état diabatique permettent d'obtenir les courbes paraboliques dessinées en trait plein.

Il est par ailleurs possible d'obtenir le couplage entre les états diabatiques lors des calculs au niveau quantique. A partir de ce dernier et des énergies diabatiques, il est possible de déterminer l'énergie adiabatique du système.<sup>160</sup> Toutefois, l'échantillonnage des géométries s'effectuant sur les états diabatiques, il n'est pas possible d'exprimer l'énergie libre en fonction de la distribution des énergies adiabatiques. Si nous supposons que l'ARL s'applique également aux états adiabatiques, cela signifie que la différence d'énergie libre entre les états adiabatiques

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

est égale à l'écart énergétique potentiel adiabatique entre ces deux états. Au niveau de l'état de transition, les courbes adiabatiques sont situées à égale distance (correspondant au couplage) du point de croisement des paraboles diabatiques, c'est-à-dire que la moyenne des énergies libres diabatiques y est égale à celle des énergies libres adiabatiques. En faisant l'hypothèse que cette relation est valable en tout point, il est possible d'obtenir des courbes d'états adiabatiques par le système :

$$\begin{cases} \frac{1}{2}(F_{i\,dia}(\Delta E_{dia}) + F_{f\,dia}(\Delta E_{dia})) = \frac{1}{2}(F_{1\,adia}(\Delta E_{dia}) + F_{2\,adia}(\Delta E_{dia})) \\ |F_{1\,adia}(\Delta E_{dia}) - F_{2\,adia}(\Delta E_{dia})| = |E_{1\,adia}(\Delta E_{dia}) - E_{2\,adia}(\Delta E_{dia})| \end{cases} \quad 34$$

soit

$$\begin{cases} F_{1\,adia}(\Delta E_{dia}) = \frac{1}{2}(F_{i\,dia}(\Delta E_{dia}) + F_{f\,dia}(\Delta E_{dia})) - \Delta E_{adia}(\Delta E_{dia}) \\ F_{2\,adia}(\Delta E_{dia}) = \frac{1}{2}(F_{i\,dia}(\Delta E_{dia}) + F_{f\,dia}(\Delta E_{dia})) + \Delta E_{adia}(\Delta E_{dia}) \end{cases} \quad 35$$

avec  $i$  et  $f$  les états diabatiques avant et après transfert d'électrons, 1 l'état adiabatique fondamental et 2 l'état adiabatique excité.

L'énergie libre d'activation liée aux courbes diabatiques peut être déterminée par lecture graphique (constante des paraboles) ou par le calcul en appliquant la relation de Marcus :

$$\Delta F^\ddagger = \frac{(\Delta F^\circ + \lambda)^2}{4\lambda} \quad 36$$

##### b. Etude QM/MM

Afin de prendre en compte la dynamique du système lors du transfert formel d'hydrure, nous avons effectué dans un premier temps des dynamiques cDFT/MM pour les géométries du réactif et du produit du NEB pour l'état  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$ . Ces dynamiques utilisent le même système et le même niveau de théorie que les NEB précédemment calculés. Ce sont des dynamiques de type Langevin dans l'ensemble NVT à 300 K utilisant un pas de 0,5 fs. Après 2 ps d'équilibration, 6 à 8 ps de simulations ont été réalisées sur les différentes géométries en contraignant les positions de l'hydrogène et des atomes N5 et N10, alors identiques à celles obtenues lors du NEB. L'écart énergétique entre les états diabatiques  $\{F_{in}^-; F_{out}\}$  et  $\{F_{in}; F_{out}^-\}$  a été calculé toutes les 100 fs tout au long des simulations. Les résultats concernant les géométries des états réactif et produit du transfert d'hydrogène sont donnés dans le Tableau 30 et dans la Figure 69.

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

	R		P	
	moy	$\sigma$	moy	$\sigma$
$\Delta E_{\text{dia}}$	-46,6	10,3	-40,7	11,8
$H_{\text{DA}}$	10,4	4,1	17,0	6,4

Tableau 30 : valeur moyenne (moy) et écart-type ( $\sigma$ ) de l'écart énergétique diabatique ( $\Delta E_{\text{dia}}$ ) et du couplage ( $H_{\text{DA}}$ ) entre les états diabatiques en kcal/mol pour les dynamiques cDFT/MM sur l'état  $\{F_{\text{in}}^-; F_{\text{out}}\}$  pour différentes positions de l'atome d'hydrogène : sur  $F_{\text{in}}$  (réactif R) ou sur  $F_{\text{out}}$  (produit P).

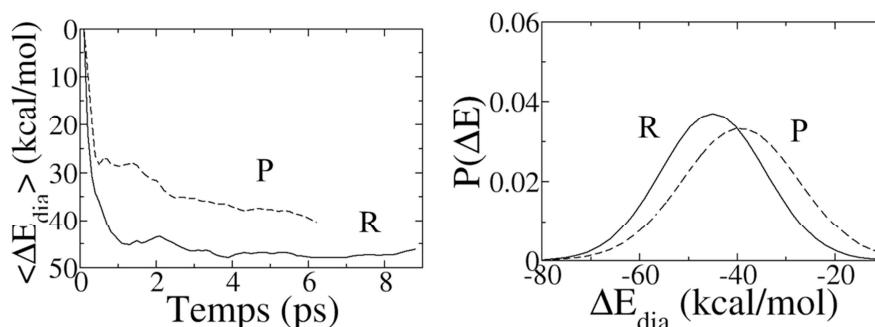


Figure 69 : convergence au cours du temps (gauche) et distribution (droite) de l'écart énergétique diabatique pour les dynamiques cDFT/MM sur l'état  $\{F_{\text{in}}^-; F_{\text{out}}\}$  pour différentes positions de l'hydrogène : sur  $F_{\text{in}}$  (réactif R) ou sur  $F_{\text{out}}$  (produit P). Les coefficients de corrélation entre les histogrammes de l'écart énergétique diabatique et les courbes gaussiennes correspondantes est de 0,83 pour le produit et de 0,92 pour le réactif.

Les écarts d'énergies diabatiques sont très importants même dans le cas où l'atome d'hydrogène se situe sur  $F_{\text{out}}$ , signifiant que le transfert d'électron est toujours fortement défavorable (de plus de 40 kcal/mol) quelle que soit la position cet atome sur la surface de l'état diabatique  $\{F_{\text{in}}^-; F_{\text{out}}\}$ . Le couplage entre les états est en moyenne nettement inférieur à ces écarts. Par conséquent le transfert d'électron de la flavine  $F_{\text{in}}$  vers la flavine  $F_{\text{out}}$  ne peut pas se dérouler lors de ces simulations. Toutefois, les variations de l'écart énergétique sont relativement importantes (l'écart-type représente 25% de la valeur moyenne) et les valeurs obtenues s'étalent sur une cinquantaine de kcal/mol pour un nombre limité de points issus de chaque simulation pris en compte dans les calculs (moins d'une centaine). De même, les valeurs du couplage fluctuent de manière importante par rapport à la moyenne. Malgré une apparente convergence de l'écart énergétique diabatique moyen sur le temps de simulation, l'échantillonnage des conformations obtenu en une si courte durée de simulation semble insuffisant. De plus, les variations de l'environnement protéique, qui impliquent souvent des déplacements d'importants groupes d'atomes s'effectuent à des échelles de temps beaucoup plus longues et ne peuvent être pris en compte en quelques ps.

Bien qu'offrant une description quantique adaptée au système étudié, ces simulations cDFT/MM demeurent coûteuses en temps de calcul. De plus, des dynamiques sur le deuxième

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

état diabatique  $\{F_{in}; F_{out}\}$  sont nécessaires pour obtenir des informations thermodynamiques sur le transfert d'électron en appliquant l'approximation de la réponse linéaire (ARL) par exemple. L'emploi de dynamiques moléculaire cDFT/MM s'avère inapproprié à l'étude de la protéine Emob car trop coûteux. Une autre solution consiste en des simulations à l'échelle de la centaine de ns des états diabatiques en mécanique classique à l'aide d'un champ de force adapté dont l'énergie QM/MM est recalculée par la suite.

##### c. Calibration d'un champ de force adapté

D'un point de vue temps de calcul, les dynamiques classiques restent largement préférables aux dynamiques multi-échelles décrites ci-dessus. En employant par exemple le programme NAMD,<sup>54</sup> il est possible de réaliser une dizaine de ns de simulation par jour pour la protéine Emob solvatée. L'échantillonnage des conformations est donc bien meilleur qu'avec la méthode cDFT/MM. Toutefois, les déplacements électroniques ne peuvent être décrits classiquement et la mécanique quantique est nécessaire à l'obtention de données quant au transfert d'électron étudié. Si les conformations visitées lors de la dynamique classique sont équivalentes à celles qui seraient obtenues au niveau quantique, il nous suffit de recalculer la densité électronique sur les cycles isoalloxazines pour des géométries issues des simulations classiques. Ces calculs d'énergie « simple point » séparés de 100 ps restent moins coûteux que la résolution des équations de la dynamique pour un système QM/MM à chaque pas de simulation (0,5 fs). Pour s'assurer de la validité de cette hypothèse de la correspondance entre les échantillonnages classiques et quantiques, le champ de force utilisé doit refléter au mieux le comportement quantique du système étudié.

La calibration du champ de force, tout comme dans le cas des cofacteurs quinones, concerne les coordonnées internes (distances, angles, dièdres et angles impropres éventuels) et les interactions interatomiques (paramètres de Lennard-Jones pour les interactions de Van der Waals et charges atomiques pour le calcul des interactions électrostatiques). Une grande partie des paramètres géométriques et de Lennard-Jones de notre champ de force pour les flavines reprend les données du champ de force CHARMM27. Toutefois, certaines liaisons évoluent suivant l'état rédox de la flavine (Figure 70). Il est donc nécessaire de redéfinir, dans chaque état, leur distance d'équilibre et leur constante de force. Ces deux paramètres ont été ajustés afin de reproduire les

#### *IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob*

résultats obtenus lors des dynamiques courtes cDFT/MM pour les flavines dans les différents états redox.

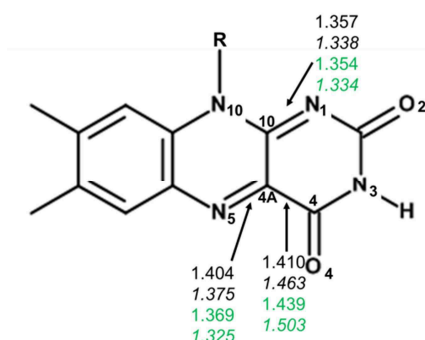
Les charges atomiques ont été déterminées à partir du potentiel électrostatique calculé au niveau de calcul cDFT des flavines pour des géométries optimisées en cDFT/MM sur les états diabatiques pour l'ensemble du système et pour différentes positions de l'hydrogène transféré (voir partie II pour plus de détail sur les méthodes de calcul de charge). Une contrainte harmonique est imposée au niveau de chaque atome pour éviter des valeurs de charge trop importantes (proches de l'unité) et nous avons imposé aux atomes d'hydrogène de chaque groupe méthyle de porter des charges équivalentes, et à l'ensemble des deux cycles isoalloxazines d'avoir une charge totale égale à -1. Les charges obtenues semblent raisonnables : elles reproduisent correctement le potentiel électrostatique ainsi que le moment dipolaire calculés en cDFT (Tableau 31) et la différence de charge entre les deux flavines est quasiment égale à -1. Les variations suivant l'état rédox sont particulièrement visibles au niveau des atomes polaires et des carbones voisins.

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

		$\{\mathbf{F}_{in}^- ; \mathbf{F}_{out}\}$					$\{\mathbf{F}_{in} ; \mathbf{F}_{out}^-\}$				
		R	-1	ET	1	P	R	-1	ET	1	P
$\mathbf{F}_{in}$	N5	-0,41	-0,38	-0,40	-0,48	-0,53	-0,10	-0,13	-0,21	-0,36	-0,40
	C4A	0,00	0,01	0,02	0,09	0,10	-0,05	0,00	0,03	0,10	0,14
	C4	0,30	0,32	0,36	0,40	0,47	0,37	0,39	0,46	0,50	0,46
	O4	-0,60	-0,60	-0,59	-0,59	-0,60	-0,52	-0,51	-0,51	-0,52	-0,52
	N3	-0,26	-0,28	-0,33	-0,39	-0,47	-0,23	-0,29	-0,37	-0,44	-0,34
	C2	0,47	0,50	0,57	0,59	0,62	0,41	0,48	0,54	0,61	0,46
	O2	-0,63	-0,63	-0,64	-0,63	-0,64	-0,51	-0,53	-0,53	-0,55	-0,51
	N1	-0,46	-0,46	-0,50	-0,52	-0,52	-0,39	-0,41	-0,45	-0,48	-0,44
	C10	0,21	0,19	0,21	0,20	0,19	0,29	0,29	0,29	0,30	0,31
	N10	0,10	0,09	0,11	0,13	0,13	0,12	0,11	0,13	0,11	0,10
$\mathbf{F}_{out}$	N5	-0,35	-0,31	-0,16	-0,06	-0,06	-0,46	-0,41	-0,31	-0,27	-0,21
	C4A	0,27	0,25	0,19	0,13	0,09	0,21	0,18	0,10	0,06	0,00
	C4	0,15	0,15	0,13	0,11	0,10	0,14	0,13	0,10	0,06	0,05
	O4	-0,43	-0,43	-0,42	-0,43	-0,44	-0,52	-0,52	-0,51	-0,51	-0,52
	N3	-0,05	-0,05	-0,04	-0,05	0,00	-0,10	-0,07	-0,06	-0,05	-0,03
	C2	0,25	0,25	0,24	0,24	0,23	0,26	0,22	0,21	0,22	0,23
	O2	-0,44	-0,44	-0,45	-0,45	-0,46	-0,53	-0,52	-0,53	-0,54	-0,54
	N1	-0,33	-0,33	-0,32	-0,29	-0,29	-0,36	-0,37	-0,34	-0,35	-0,35
	C10	0,20	0,19	0,18	0,16	0,18	0,13	0,15	0,15	0,15	0,14
	N10	0,07	0,09	0,10	0,10	0,08	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
H	0,32	0,25	0,17	0,22	0,26	0,26	0,23	0,16	0,23	0,30	
<b>Moment</b>	80,58	80,31	80,41	80,60	79,55	94,67	94,27	94,09	94,70	93,18	
<b>Dipolaire (D)</b>	(80,59)	(80,34)	(80,47)	(80,65)	(79,61)	(94,66)	(94,27)	(94,07)	(94,70)	93,20	
<b>RRMSD</b>	2,4%	2,4%	2,5%	2,5%	2,5%	2,6%	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%	

Tableau 31 : charge atomique de certains atomes des cycles isoalloxazines (voir Figure 70) dans chaque état diabatique associé au transfert d'électron ( $\{\mathbf{F}_{in}^- ; \mathbf{F}_{out}\}$  et  $\{\mathbf{F}_{in} ; \mathbf{F}_{out}^-\}$ ) pour différentes géométries du transfert d'hydrogène (R : réactif ; ET : état de transition ; P : produit ; -1 : combinaison antisymétrique de N5<sub>in</sub>-H et H-N5<sub>out</sub> égale à -1 Å ; 1 : combinaison antisymétrique de N5<sub>in</sub>-H et H-N5<sub>out</sub> égale à 1 Å). Le moment dipolaire de l'ensemble des deux groupes isoalloxazine, exprimé en Debye, est déterminé à partir de ces charges et au niveau cDFT (donné entre parenthèse). L'adéquation des charges avec le potentiel électrostatique calculé au niveau cDFT est représentée par la faible valeur de RRMSD (*Relative Root Mean Square Deviation*).

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob



**Figure 70 :** représentation du cycle isoalloxazine d'une FMN avec les numéros de quelques atomes lourds et l'évolution des distances paramétrées dans notre champ de force pour différents états de la flavine : protonée (noir), déprotonée (vert), négativement chargée (police normale) ou neutre (italique).

Nous nous focalisons ici uniquement sur les charges des atomes d'oxygène, d'azote et de carbone représentés sur la Figure 70 ainsi qu'à la charge de l'atome transféré. La charge des atomes d'oxygène s'avère indépendante de la position de l'hydrogène transféré, ainsi que celle de l'atome N1 dont les variations sont inférieures à 0,1. Au contraire, la charge des atomes N5 évolue au cours du transfert, étant donné qu'ils changent d'état de protonation. Cette évolution est plus importante (la différence est égale à 0,3 entre R et P au lieu de 0,25 ou 0,15) lorsque la flavine est neutre. L'atome de carbone voisin C4A voit également sa charge diminuer de 0,1 à 0,2 électron lorsque l'hydrogène quitte la flavine, ce qui correspond à un transfert partiel de charge de C4A vers N5 lors de la déprotonation de N5. Sur la flavine  $F_{in}$ , les atomes C4, C2 et N3 présentent également des différences de charge de 0,1 à 0,2 environ entre R et P alors que ces dernières restent constantes sur  $F_{out}$  ; la somme des charges de N3, C2 et C4 n'évolue cependant pas au cours du transfert, ce résultat est donc dû à une répartition de la charge entre ces atomes qui diffère au cours du transfert de H (effet similaire à celui observé au sein du TTQ pour les charges ESP). Enfin, la charge de l'hydrogène diminue au niveau de l'état de transition pour atteindre une valeur de 0,16 ou 0,17, ce qui semble logique puisqu'il est alors au point le plus éloigné d'un accepteur et donc où il partage le moins son électron. Nous retrouvons alors quasiment un électron autour du proton transféré bien que la charge de celui-ci ne soit pas contrainte, tout comme dans l'étude statique. Nous pouvons également étudier les atomes dont la charge dépend de l'état redox de la flavine comme l'atome N5 dont les différences de charge varient de 0,1 à 0,3 pour un même état de protonation mais un état d'oxydation différent. Les autres variations notables sont celles des atomes d'oxygène dont la charge augmente de 0,1 électron dans l'état anionique. Ils reçoivent alors une partie de l'électron transféré

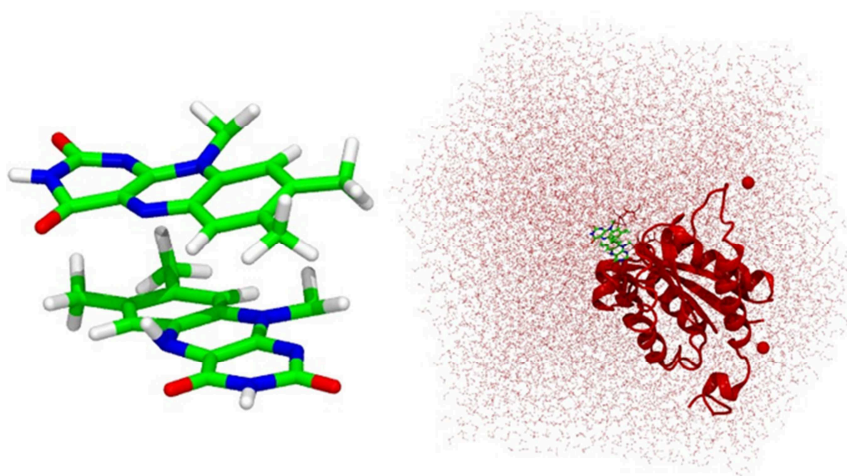


#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

indépendamment de la position de l'hydrogène. A propos de ces atomes, nous pouvons aussi remarquer qu'ils sont moins chargés de 0,1 électron dans  $F_{out}$  que dans  $F_{in}$  pour des états identiques. Il est possible que l'environnement, pris en compte lors de l'optimisation de géométrie dans un schéma *electrostatic embedding*, influe sur la géométrie des flavines créant ainsi cette dissymétrie de charge (par exemple les distances C-O pour un même état de la flavine sont légèrement plus courtes, 0,01 à 0,02 Å, pour  $F_{out}$  que pour  $F_{in}$ ).

##### d. Dynamiques moléculaires classiques

La protéine est solvatée dans une boîte d'eau de  $70 \times 70 \times 60$  Å, contenant deux contre-ions sodium pour neutraliser l'ensemble des charges (Figure 71). Nous employons des conditions périodiques, ce qui limite les problèmes liés aux bords de la boîte et autorise une boîte de simulation de taille inférieure à celle précédemment utilisées lors des calculs QM/MM. Nous avons utilisé la méthode Particle Mesh Ewald (PME), avec un espacement de 1 Å entre chaque point de la grille, pour le calcul des interactions électrostatiques. Cette méthode présente l'avantage de calculer les interactions électrostatiques à longues distances dans un espace réciproque sans requérir de trop grands *cutoffs* ce qui augmenterait considérablement le temps de calcul. Les simulations sont des dynamiques de type Langevin réalisées dans l'ensemble NPT à 300 K et une pression de 1 bar avec un pas de 1 fs. Les géométries traitées par la suite sont extraites toutes les 100 ps.



**Figure 71** : représentation des cycles isoalloxazines paramétrés aux niveaux cDFT et cDFT/MM (gauche) et de la boîte de simulation utilisée pour les dynamiques moléculaires classiques (droite). Du fait de l'utilisation de conditions périodiques et de la méthode PME pour le calcul des interactions électrostatiques, l'intégralité des atomes de la boîte (FMN, protéine, molécules d'eau et ions  $Na^+$ ) sont mobiles et leur charge est prise en compte lors de la simulation de dynamique moléculaire.

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

Nous nous intéressons dans un premier temps aux états diabatiques associés à l'état réactif et à l'état produit du transfert de l'atome d'hydrogène : respectivement  $\{F_{in}H^{\cdot-}; F_{out}\}$  et  $\{F_{in}H; F_{out}^{\cdot-}\}$  d'une part ;  $\{F_{in}^{\cdot-}; F_{out}H\}$  et  $\{F_{in}; F_{out}H^{\cdot-}\}$  d'autre part. Deux simulations classiques de 100 ns chacune ont été réalisées dans chacun de ces états diabatiques, après équilibration. Pour chaque géométrie extraite des dynamiques, des calculs quantiques et classiques sont effectués séparément. D'une part, l'énergie des cycles isoalloxazines dans chaque état diabatique, ainsi que le couplage entre ces états, sont calculés au niveau cDFT, en utilisant le même niveau de théorie que précédemment. D'autre part, les interactions électrostatiques entre ces cycles et l'environnement sont déterminées classiquement pour chaque état diabatique. Comme nous souhaitons obtenir la différence des énergies des états diabatiques pour une même géométrie, il n'est pas nécessaire de calculer les grandeurs uniquement liées à la conformation du système, comme les interactions de Van der Waals, puisque qu'elles s'annuleront lors de la différence. L'énergie du système dans un état diabatique donné est donc égale à la somme de la contribution quantique interne aux cycles isoalloxazines superposés et à la contribution classique de l'environnement :

$$E_{F+env}^{cDFTMM} = E_{F+env}^{MM} - E_F^{MM} + E_F^{cDFT} \quad 37$$

où  $E_A^X$  correspond à l'énergie du système A (flavine  $F$  ou environnement  $env$ ) au niveau de théorie X (cDFT et MM). Après 10 ns d'équilibration (non représentées), la convergence de la différence moyenne des énergies des états diabatiques au cours des simulations est relativement rapide, de l'ordre de quelques ns à une vingtaine de ns (Figure 72). Toutefois les fluctuations de l'écart énergétique diabatique sur cette première période restent importantes par rapport aux grandeurs thermodynamiques que nous souhaitons extraire de ces simulations (supérieures à 5 kcal/mol pour certaines). Un échantillonnage de plusieurs dizaines de ns s'avère donc bien nécessaire pour s'assurer de la stabilité de la différence d'énergie diabatique sur une simulation. Les dynamiques cDFT/MM à l'échelle de quelques ps ne couvraient donc qu'une petite fenêtre des conformations du système. Si l'énergie semblait converger, du moins avant transfert d'hydrogène, il est fort probable qu'une autre structure de départ pour une même position de l'hydrogène aurait donné un échantillonnage de  $\Delta E_{dia}$  différent. Nous pouvons constater que les simulations réalisées au niveau classique sur un même état diabatique, bien qu'issues de géométries initiales différentes, convergent vers une même valeur de  $\Delta E_{dia}$  à 1 kcal/mol près. La convergence relativement rapide, l'absence de fluctuations dans la suite de la simulation et la

similarité des résultats pour deux simulations différentes appuie fortement l'hypothèse d'un échantillonnage correct de  $\Delta E_{\text{dia}}$  au niveau de calcul utilisé.

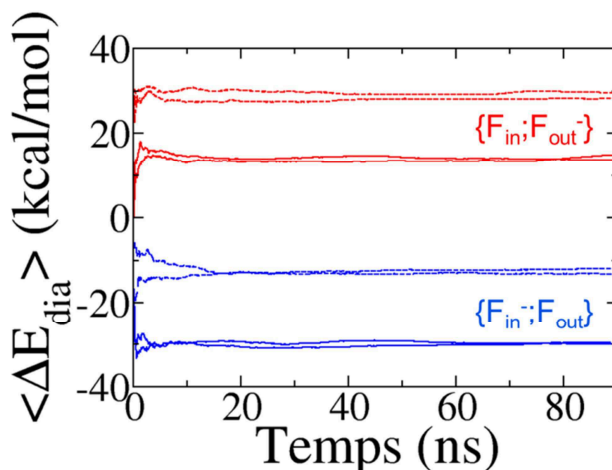


Figure 72 : convergence après 10 ns d'équilibration de l'écart énergétique diabatique moyen sur les dynamiques avant transfert (en trait plein) et après transfert (tirets) sur les états diabatiques où l'électron est localisé sur  $F_{\text{in}}$  (bleu) ou sur  $F_{\text{out}}$  (rouge).

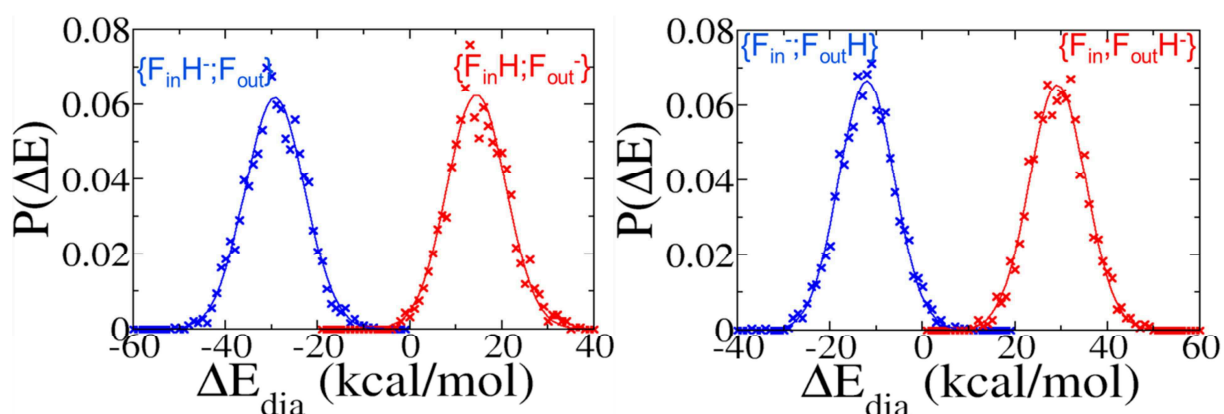


Figure 73 : Distribution des écarts énergétiques diabatiques liés au transfert d'électron lors des dynamiques sur les états diabatiques avant et après transfert d'hydrogène. Les croix correspondent aux histogrammes de la probabilité  $p(\Delta E)$  et les traits pleins aux courbes gaussiennes associées (les coefficients de détermination entre les histogrammes et les courbes est supérieur à 0,99).

Afin de tester la validité de l'ARL pour le transfert d'électron avant et après transfert d'hydrogène, les histogrammes de la densité de probabilité de  $\Delta E_{\text{dia}}$  doivent suivre une loi normale de même écart-type pour chaque état. Ces histogrammes, donnés dans la Figure 73, peuvent être représentés par des courbes gaussiennes avec un coefficient de détermination supérieur à 0.99. Les écarts-types obtenus pour les distributions diffèrent de moins de 0,1 kcal/mol avant et après transfert. Au vu de ces résultats, il apparaît que l'approximation de la réponse

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

linéaire est valide dans notre système. Par conséquent, les surfaces d'énergie libre correspondant aux états diabatiques peuvent être représentées par des paraboles de même courbures.

Les courbes diabatiques, adiabatiques et les grandeurs thermodynamiques associées sont données dans la Figure 74 et le Tableau 32.

	$\{F_{in}H; F_{out}\}$	$\{F_{in}; F_{out}H\}$
$\Delta F$	7,7	-8,2
$\lambda$	22,1	20,7
$\Delta F^\ddagger$	10,1	1,9
$H_{DA}$	8,0	7,1

Tableau 32 : énergie libre de réaction  $\Delta F$ , énergie libre de réorganisation  $\lambda$ , énergie libre d'activation  $\Delta F^\ddagger$  et couplage moyen entre les états diabatiques  $H_{DA}$  pour le transfert d'électron avant ( $\{F_{in}H; F_{out}\}$ ) et après ( $\{F_{in}; F_{out}H\}$ ) transfert d'hydrogène en kcal/mol. Les énergies libres de réactions et de réorganisation sont calculées en appliquant l'ARL (équations 31 et 32) et celle d'activation par la formule de Marcus (équation 36).

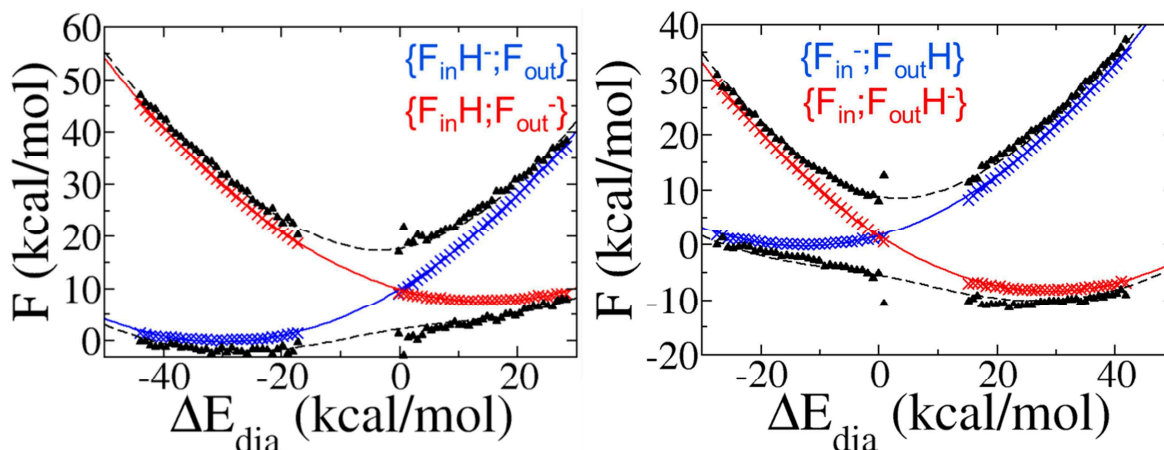


Figure 74 : courbes diabatiques et adiabatiques du transfert d'électron avant (gauche) et après (droite) transfert d'hydrogène. Les courbes bleues correspondent à l'état diabatique pour lequel l'électron se situe sur  $F_{in}$  et les rouges à l'état diabatique pour lequel l'électron se situe sur  $F_{out}$ . Les triangles et les courbes en tirets noirs représentent les deux états adiabatiques construits à partir des états diabatiques et de leur couplage, en supposant l'équation 35 valide.

La symétrie du système par rapport au transfert de l'atome d'hydrogène semble évidente. En effet, avant ou après le transfert, l'état le plus stable correspond à l'état où les deux électrons sont appariés, à savoir l'état  $\{F_{in}H; F_{out}\}$  dans l'état réactif et  $\{F_{in}; F_{out}H\}$  dans l'état produit, et ceci avec une énergie libre de réaction et une énergie de réorganisation très proches. Les états diabatiques où les deux flavines sont semi-oxydées ( $\{F_{in}H; F_{out}^- \}$  et  $\{F_{in}^-; F_{out}H\}$ ) sont énergétiquement proches du point de croisement des courbes diabatiques : la différence d'énergie libre entre ce point du transfert d'électron et du minimum de ces états est d'à peine 2 kcal/mol environ au lieu d'une dizaine de kcal/mol pour l'autre état. De plus, leurs courbes présentent des

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

points au-delà de l'intersection des courbes diabatiques, c'est-à-dire que, dans certaines géométries visitées durant les dynamiques moléculaires associées aux états  $\{F_{in}H; F_{out}^-\}$  et  $\{F_{in}^-; F_{out}H\}$ , l'état le plus stable est respectivement  $\{F_{in}H; F_{out}\}$  et  $\{F_{in}; F_{out}H\}$ . Dans ces structures, malgré des paramètres favorables aux états  $\{F_{in}H; F_{out}^-\}$  ou  $\{F_{in}^-; F_{out}H\}$ , la conformation obtenue favorise le transfert d'électron vers la flavine protonée. Au contraire, les points issus des dynamiques où l'électron est localisé sur la flavine protonée se trouvent éloignés de plus de 15 kcal/mol de l'état de transition, démontrant la stabilité de cet état.

Le couplage entre les états diabatiques est cependant du même ordre de grandeur que l'énergie de réaction et à peu près constant pour les différentes valeurs de  $\Delta E_{dia}$ . Le transfert d'électron s'opère donc dans le régime adiabatique, et ne présente pas de barrière d'activation. Néanmoins, même sur la courbe adiabatique, l'électron n'est jamais stabilisé sur une flavine semi-oxydée. Les conclusions déduites des états diabatiques sont qualitativement les mêmes pour les états adiabatiques. Le transfert d'électron s'accompagne nécessairement du transfert d'hydrogène : il ne peut avoir lieu sans le départ de l'hydrogène de la flavine protéique et s'opère obligatoirement et complètement lorsque l'hydrogène est lié à la flavine solvatée. Le transfert d'électron d'une flavine à l'autre s'effectue certainement durant le transfert d'hydrogène selon un mécanisme global du type de celui décrit dans la Figure 57 H' c. Ce type de mécanisme interdit le départ depuis la protéine d'une flavine à l'état semi-oxydé, protonée ou non.

Contrairement à ce qu'indiquait l'étude statique du transfert formel d'hydrure au sein de la protéine EmoB, le transfert d'électron s'effectue complètement durant le transfert d'hydrogène d'une flavine à l'autre, une fois les flavines et l'environnement relaxé par dynamique moléculaires sur les états diabatiques. Cependant, la question de l'influence des conformations des flavines (par exemple de la superposition des cycles isoalloxazines) et de l'environnement sur ce mécanisme demeure. Y répondre revient à décrire le rôle de la protéine vis-à-vis du transfert d'hydrure.

##### *e. Rôle de l'environnement protéique*

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la protéine, nous avons étudié d'une part le comportement d'un complexe de deux flavines solvatées dans de l'eau et analysé d'autre part les contributions internes et externes aux grandeurs thermodynamiques des transferts d'électron, que ce soit dans la protéine ou dans en milieu aqueux.

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

Lorsque les deux flavines sont solvatées dans l'eau, le système devient symétrique par rapport au transfert formel d'hydrure : non seulement les cofacteurs sont identiques mais leur environnement est *a priori* équivalent. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de considérer le déplacement de l'hydrogène d'une flavine à l'autre. Deux états diabatiques peuvent être décrits pour le transfert d'électron et notés simplement  $\{FH^-; F\}$  et  $\{FH; F^-\}$ . Des dynamiques classiques sur chacun de ces états ont été réalisées en utilisant le champ de force obtenu pour les cofacteurs flavines avant transfert d'hydrogène dans Emob. La géométrie de départ des flavines est extraite d'une structure protéique puis celles-ci sont introduites dans une boîte cubique d'eau de 50 Å de côté. Les conditions de simulations sont identiques à celles des dynamiques au sein de la protéine Emob.

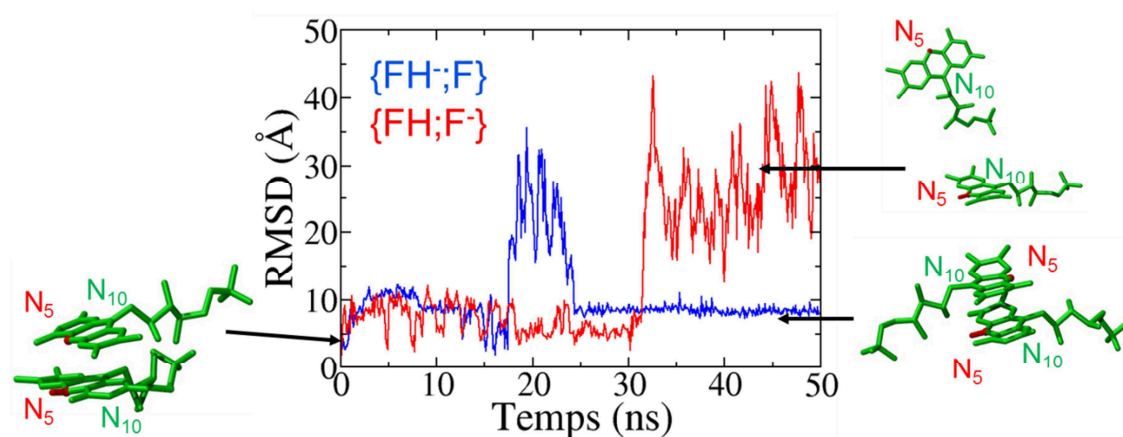


Figure 75 : évolution de l'écart quadratique moyen (RMSD) de la flavine non protonée F par rapport à la flavine protonée FH pour les dynamiques sur les états diabatiques  $\{FH^-; F\}$  (bleu) et  $\{FH; F^-\}$  (rouge). Des exemples des différentes géométries du complexe formé par les deux flavines sont donnés : structure similaire à celle de la protéine (côté gauche), structure défavorable au transfert d'hydrogène (côté droit, bas) ou séparation des flavines (côté droit, haut). Les atomes N5 et l'atome d'hydrogène à transférer sont colorés en rouge (les autres atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés).

Après équilibration du système et quelques ns de simulations, il apparaît que le complexe des flavines dans sa conformation initiale est instable. En effet, comme le montre la Figure 75, non seulement des rotations des flavines l'une par rapport à l'autre peuvent se produire, de façon à ce que les deux azotes N5 ne se situent plus l'un au-dessus de l'autre, mais de plus les cycles peuvent se séparer complètement et évoluer isolément. Le transfert d'hydrure ne peut pas avoir lieu dans de telles conformations. Ce problème ne s'est pas posé lors des simulations en milieu protéique : la déformation de la superposition des flavines la plus importante correspond à une rotation de 90° de la flavine solvatée et ne durait au plus qu'une dizaine de ns. Dans tous les cas les flavines restaient parallèles. Comme nous nous intéressons à l'influence de l'environnement

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

sur le transfert d'électron dans la protéine Emob, les comparaisons avec les dynamiques dans le solvant doivent se faire en considérant un échantillonnage des géométries similaire à celui obtenu dans la protéine. De nouvelles dynamiques ont donc été effectuées en imposant une contrainte harmonique sur les distances  $N5_{in}-N5_{out}$  et  $N10_{in}-N10_{out}$  de 3,5 Å et 4,5 Å respectivement. La constante de force doit répondre à deux critères : suffisamment forte pour assurer l'obtention d'une majorité de conformations permettant le transfert d'hydrogène mais suffisamment faible pour assurer une certaine liberté de mouvement des flavines l'une par rapport à l'autre, tout comme à la surface de la protéine. Une contrainte de 5 kcal/mol a été choisie car d'une part la superposition des flavines est maintenue au cours des simulations et d'autre part les fluctuations de la partie quantique des énergies adiabatiques (indifférente au milieu puisque le calcul de l'énergie quantique sur la géométrie classique s'effectue en phase gaz) sont similaires à celles obtenues dans la protéine. Ce premier résultat quant à l'instabilité du complexe souligne cependant le rôle de la protéine Emob dans le maintien d'une position de la flavine solvatée propice au transfert formel d'hydrure.

Une simulation de 100 ns a été produite pour chaque état adiabatique. Etant donné que les molécules d'eau se réorganisent plus rapidement que la protéine, cette durée peut être considérée suffisante pour obtenir une bonne convergence de la différence d'énergie adiabatique et un bon échantillonnage de celle-ci comme le montre d'ailleurs la Figure 76. Les courbes de Marcus pour les états  $\{FH^-; F\}$  et  $\{FH; F^-\}$  ainsi que les grandeurs associées sont reportées dans la Figure 77 et le Tableau 33.

{FH ; F}	
$\Delta F$	2,2
$\lambda$	21,8
$\Delta F^\ddagger$	6,6
$H_{DA}$	6,5

**Tableau 33** : énergie libre de réaction  $\Delta F$ , de réorganisation  $\lambda$ , d'activation  $\Delta F^\ddagger$  et couplage moyen entre les états adiabatiques  $H_{DA}$  pour le transfert d'électron entre les deux flavines solvatées en milieu aqueux (système  $\{FH^-; F\}$ ) en kcal/mol. Les énergies libres de réaction, de réorganisation et d'activation sont calculées en appliquant l'ARL (équations 31 et 32) et la formule de Marcus (équation 36).

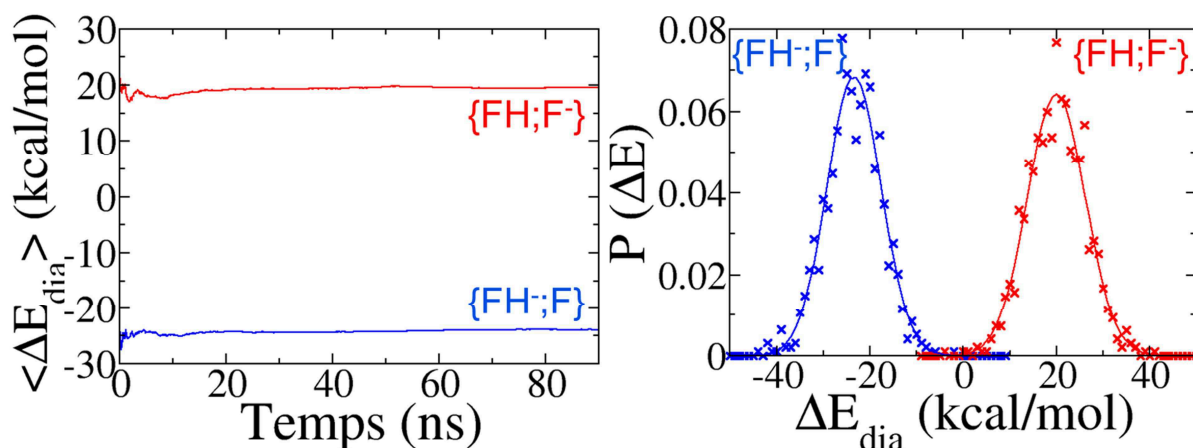


Figure 76 : convergence (gauche) et distribution de l'écart énergétique diabatique pour les simulations de dynamique moléculaire sur les états diabatiques {FH ; F} (bleu) et {FH ; F} (rouge) pour les deux flavines dans l'eau. Les croix correspondent aux histogrammes de la probabilité  $p(\Delta E)$  de l'écart énergétique diabatique et les traits pleins aux courbes gaussiennes associées (les coefficients de détermination entre les histogrammes et les courbes est de 0,98).

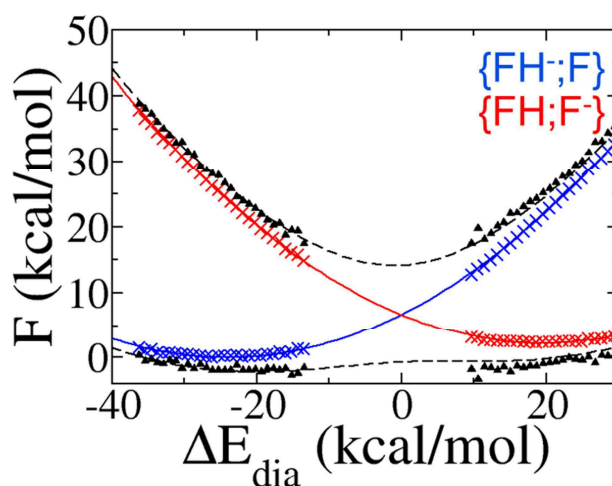


Figure 77 : courbes diabatiques et adiabatiques du transfert d'électron en milieu aqueux. Les courbes bleues correspondent à l'état diabatique {FH ; F} et les rouges à l'état diabatique {FH ; F}. Les triangles et les courbes en tirets noirs représentent les deux états adiabatiques construits à partir des états diabatiques et de leur couplage, en supposant l'équation 35 valide.

Les différences avec le cas dans la protéine sont notables : tout d'abord, l'énergie libre de réaction est beaucoup plus faible (2,2 kcal/mol vs environ 8 kcal/mol) : les états diabatiques sont proches énergétiquement et donc quasi-équivalents d'un point de vue thermodynamique. De plus, le signe de l'écart énergétique diabatique ne varie pas lors des dynamiques moléculaires : les positions d'équilibre de chaque état se trouvent suffisamment loin du point de croisement des courbes diabatiques (d'une valeur de  $\Delta E_{\text{dia}}$  d'au moins 10 kcal/mol). L'énergie de ce point est, dans la description diabatique du système, de 6,6 kcal/mol, soit suffisamment faible pour



IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

autoriser le transfert d'électron et l'existence des deux états diabatiques en solution même si le couplage n'est pas pris en compte. Des similitudes se retrouvent également entre le système aqueux et le système protéique : ainsi les énergies de réorganisation et le couplage entre les états diabatiques sont très proches, quel que soit l'environnement. Ce couplage est d'ailleurs supérieur à l'énergie libre de réaction et du même ordre de grandeur que l'énergie libre d'activation pour le complexe en milieu aqueux : le transfert s'effectue une fois de plus en régime adiabatique. Cependant, dans ce cas, contrairement à celui de la protéine Emob, l'électron se transmet d'une flavine à l'autre sans dépense énergétique sur la surface adiabatique, indépendamment de l'état de protonation des cycles isoalloxazines. Les états  $\{FH; F\}$  et  $\{FH; F^-\}$  sont équiprobables. Une séparation des deux flavines à l'état semi-oxydé à la suite d'un transfert d'électron non-accompagné du transfert de l'atome d'hydrogène (et inversement) est envisageable en solution. La protéine est nécessaire au transfert formel d'hydrure d'une flavine à l'autre. La dissymétrie de l'environnement engendrée par la présence d'acides aminés autour de  $F_{in}$  et de molécules d'eau autour de  $F_{out}$  influe donc sur le mécanisme de transfert et assure le transfert complet de l'hydrure.

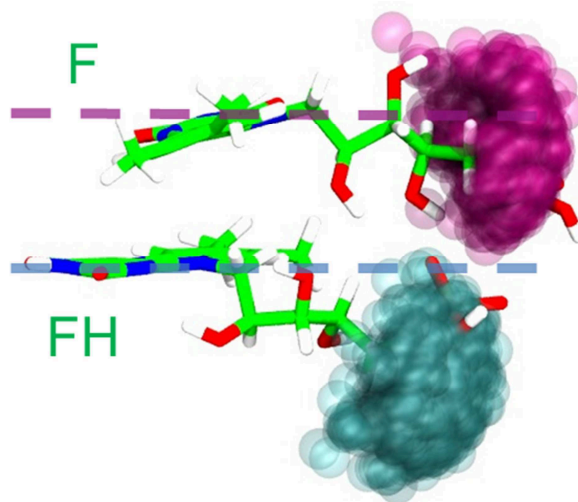
Les différentes contributions internes et externes à l'énergie libre de réaction et l'énergie de réorganisation sont regroupées dans le Tableau 34. Du fait du caractère additif des interactions électrostatiques au niveau classique, les contributions externes peuvent être calculées pour différents sous-ensembles de l'environnement : le solvant, les queues D-ribitol-5-phosphate, la protéine et les contre-ions. D'autres partitions sont envisageables, en particulier la prise en compte de chacun des acides-aminés ou bien de structures secondaires de la protéine.

		Total	interne	solvant	protéine	D-ribitol- 5-Phosphate	ions
$\{F_{in}H; F_{out}\}$	$\Delta F$	7,7	9,6	-14,8	19,4	-6,0	-0,5
	$\lambda$	22,1	4,3	12,3	1,8	3,8	0,0
$\{F_{in}; F_{out}H\}$	$\Delta F$	-8,2	-7,0	-10,6	15,2	-5,8	-0,3
	$\lambda$	20,7	2,1	13,9	2,3	1,9	0,2
$\{FH; F\}$	$\Delta F$	2,2	7,0	2,2	-	-6,9	-
	$\lambda$	21,8	2,1	18,3	-	1,4	-

Tableau 34 : contribution aux énergies libres de réaction et de réorganisation des cycles isoalloxazines (interne, calculée au niveau cDFT) et de l'environnement (séparé en contributions du solvant, de la protéine, de la queue D-ribitol-5-phosphate et des ions) pour les systèmes avant transfert d'hydrogène ( $\{F_{in}H; F_{out}\}$ ), après transfert d'hydrogène ( $\{F_{in}; F_{out}H\}$ ) et en solution aqueuse ( $\{FH; F\}$ ).

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

Considérons dans un premier temps les contributions à l'énergie libre de réaction. Les contributions internes sont toutes du même ordre de grandeur (entre 7 et 9,6 kcal/mol) et toujours en faveur de l'état où l'électron se localise sur la flavine protonée :  $\{F_{in}H^- ; F_{out}\}$ ,  $\{F_{in} ; F_{out}H^-\}$  et  $\{FH^- ; F\}$ . Au niveau quantique, l'appariement des électrons est stabilisé indépendamment de l'environnement et des géométries visitées.



**Figure 78 : représentation des positions occupées par les atomes de phosphore durant la dynamique sur l'état  $\{FH^- ; F\}$ . Le phosphore de la flavine protonée (sphères bleues) se déplace principalement sous le plan du cycle isoalloxazine de FH (tirets bleus) tandis que le deuxième phosphore (sphères mauves) se situe en grande partie entre les deux plans des cycles isoalloxazines (tirets bleus et mauves).**

Cet effet est contrebalancé en milieu aqueux par la contribution des queues D-ribitol-5-phosphate. Au premier abord, la valeur non-nulle de cette dernière peut surprendre du fait de la symétrie du système en milieu aqueux ; toutefois elle s'explique très bien par des considérations géométriques sur la conformation du complexe des deux flavines. Ces dernières sont positionnées de telle manière que la queue de FH se situe en dehors des plans des cycles isoalloxazines alors que celle de F se déplacent entre ces deux plans (Figure 78). La hauteur de la barrière énergétique associée à la rotation de la queue par rapport au plan du tricycle isoalloxazine est suffisamment importante pour empêcher cette rotation au cours de nos dynamiques. Le groupement phosphate de chacune de ces queues possède une charge négative interagissant de manière répulsive avec la charge des cycles, mais à suffisamment grande distance (10 Å environ) pour voir les cycles de manière globale. Pour le phosphate demeurant entre les flavines, la position de l'électron influe peu sur la répulsion, cette dernière reste quasiment la même quel que soit l'état diabatique. Pour le groupement de la flavine protonée, qui reste globalement plus proche du tricycle de celle-ci au

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

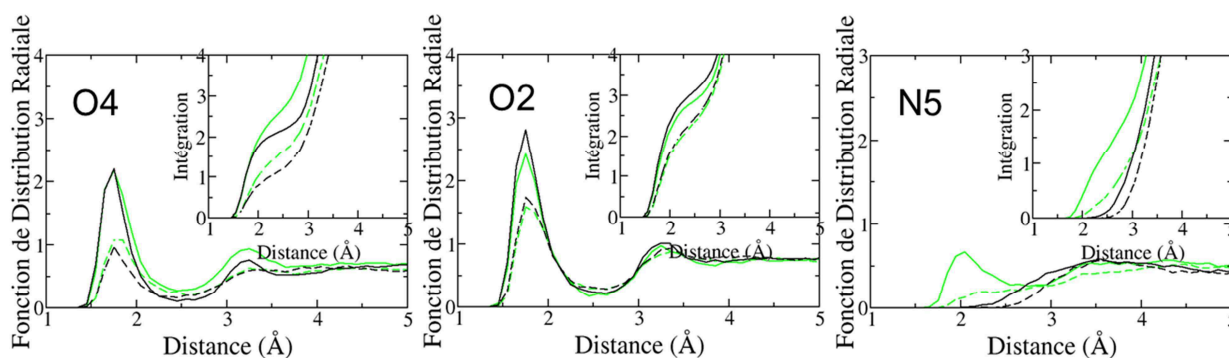
cours des dynamiques, la répulsion est moins forte lorsque l'électron est porté par F que par FH, d'où une déstabilisation de l'état  $\{FH^- ; F\}$ . La contribution des queues est donc indépendante de l'état de protonation des flavines. Si l'hydrogène était porté par l'autre flavine, l'état le plus stabilisé serait  $\{F ; FH^-\}$  et la thermodynamique du transfert d'électron serait modifiée. Dans ce cas, nous serions toutefois dans une conformation différente de celle de la protéine puisque, dans cette dernière, le cofacteur flavine est ancré de manière à ce que le phosphate soit maintenu en dessous du cycle (voir Figure 58). L'autre flavine n'a alors guère de choix pour se positionner de manière à recevoir l'hydrogène. La contribution des queues est d'ailleurs équivalente dans chacun des cas. L'objectif des simulations dans l'eau étant de permettre une meilleure compréhension du rôle de la protéine, il semble judicieux de se restreindre à des conformations des queues comparables à celles obtenues au sein de l'environnement protéique.

Par ailleurs, nous constatons que la protéine favorise toujours la localisation de l'électron sur  $F_{in}$  tandis que l'eau stabilise la charge négative sur  $F_{out}$ , ceci indépendamment de la position de l'hydrogène. Cette interaction attractive eau-charge négative indépendante de l'état de protonation se retrouve en milieu aqueux où la contribution du solvant à l'énergie libre de réaction est quasi-nulle. La stabilisation de la protéine est plus importante de 4,6 kcal/mol par rapport à celle de l'eau et les contributions du solvant et de la protéine décroissent de 4 à 5 kcal/mol plus faibles en valeur absolue après transfert d'hydrogène. L'ordre relatif des contributions de la protéine et du solvant n'est donc pas modifié par le transfert de l'atome d'hydrogène mais, en prenant en compte la contribution des queues, celle des contre-ions étant négligeable, nous observons que la contribution globale de l'environnement est quasi-nulle et donc que la contribution interne impose son signe et son ordre de grandeur à l'énergie libre de réaction.

Si nous nous intéressons maintenant à l'énergie de réorganisation, nous constatons que la contribution de l'eau en est la composante principale (elle en représente la moitié en milieu protéique et la quasi-totalité en milieu aqueux). La contribution de la protéine n'en représente en revanche qu'environ 10%. Les autres contributions ne dépassent pas les 5 kcal/mol. Ce résultat fait apparaître une assez forte réorganisation des molécules de solvant suivant l'état neutre ou négativement chargés des cycles isoalloxazines. Les fonctions de distributions radiales autour des fonctions polaires des flavines, présentées dans la Figure 79, en sont l'illustration. Autour des atomes d'oxygène, deux structurations types sont identifiables suivant que l'état de charge de la

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

flavine (neutre ou anionique). L'intégration du premier pic donne environ une molécule d'eau supplémentaire autour de chaque atome d'oxygène lorsque l'électron se trouve sur la flavine concernée. Les charges de ces atomes d'oxygène varient de presque 0,1 suivant la charge de la flavine mais seulement de 0,01 à 0,02 suivant l'état de protonation ce qui explique la dépendance de la fonction de distribution radiale uniquement envers l'état de charge de la flavine. Au contraire, dans le cas de l'atome N5, un pic n'est visible que pour la flavine dans l'état F<sup>-</sup>. La charge y est plus importante de 0,1 par rapport à l'état neutre, et de 0,2 à 0,4 par rapport aux formes protonées anionique et neutre. Bien que cette charge soit également proche de celles des atomes d'oxygène pour les flavines neutres, le pic du N5 est plus bas et correspond à moins de molécules d'eau que ceux des cétones : la première couche de solvation de cet atome d'azote est moins bien définie. Cet atome appartient au cycle central de la flavine et se trouve donc moins accessible aux molécules de solvant que les atomes d'oxygène qui pointent en dehors du groupe isoalloxazine. Une charge de 0,45 semble donc dans ce cas tout juste suffisante à maintenir une liaison hydrogène autour de l'atome N5, d'où l'absence de pic dans l'état oxydé. Par ailleurs, lorsque l'atome d'azote est protoné, la présence de l'hydrogène ajoute une charge positive et une gêne stérique qui provoque l'éloignement du solvant et la modification du type de liaison hydrogène possible : d'interactions N5-H<sub>2</sub>O nous passons à des interactions H<sub>N5</sub>-O<sub>H2O</sub>.



**Figure 79 : fonctions de distribution radiale des atomes d'hydrogène des molécules d'eau autour des atomes O4, O2 et N5 de la flavine solvatée au cours des dynamiques sur la protéine EmoB pour différents états de la flavine : protonée (noir), déprotonée (vert), négativement chargée (traits pleins) neutre (tirets). L'intégrale de la fonction de distribution radiale est donnée en encart pour chaque atome.**

Des courbes semblables ont été décrites par Kiliç *et al* dans leur étude d'une lumiflavine solvatée par des dynamiques au niveau DFT.<sup>131</sup> Bien que la hauteur des pics soit différente, les fonctions de distributions radiales autour de l'atome N5, ainsi que des atomes d'oxygène pour une lumiflavine déprotonée, présentent la même allure. Lorsque la lumiflavine est protonée, la première couche de solvation autour des atomes d'oxygène de la lumiflavine ne dépend pas de la

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

charge contrairement à notre cas. Si la ressemblance qualitative entre les deux modèles rassure quant à la pertinence de notre système de charge, les différences peuvent être dues au niveau de théorie choisi (dynamiques Born-Oppenheimer ou classiques), à la durée de simulation (dizaine de ps ou centaine de ns) et au système (lumiflavine isolée ou deux flavines superposées).

Dans notre système, nous observons une réorganisation de la première couche de solvation autour des flavines qui dépend principalement de l'état de charge (neutre ou négative) des cycles isoalloxazines et qui permet d'expliquer d'une part l'énergie de réorganisation des molécules d'eau relativement grande et d'autre part la faible contribution de ces dernières à l'énergie de réaction en milieu aqueux puisque l'énergie d'interaction ne dépendant que de l'état de charge, elle est équivalente dans les deux états diabatiques. La réorganisation particulière autour du N5 entraîne une différence entre les contributions avant et après transfert de l'atome d'hydrogène dans la protéine.

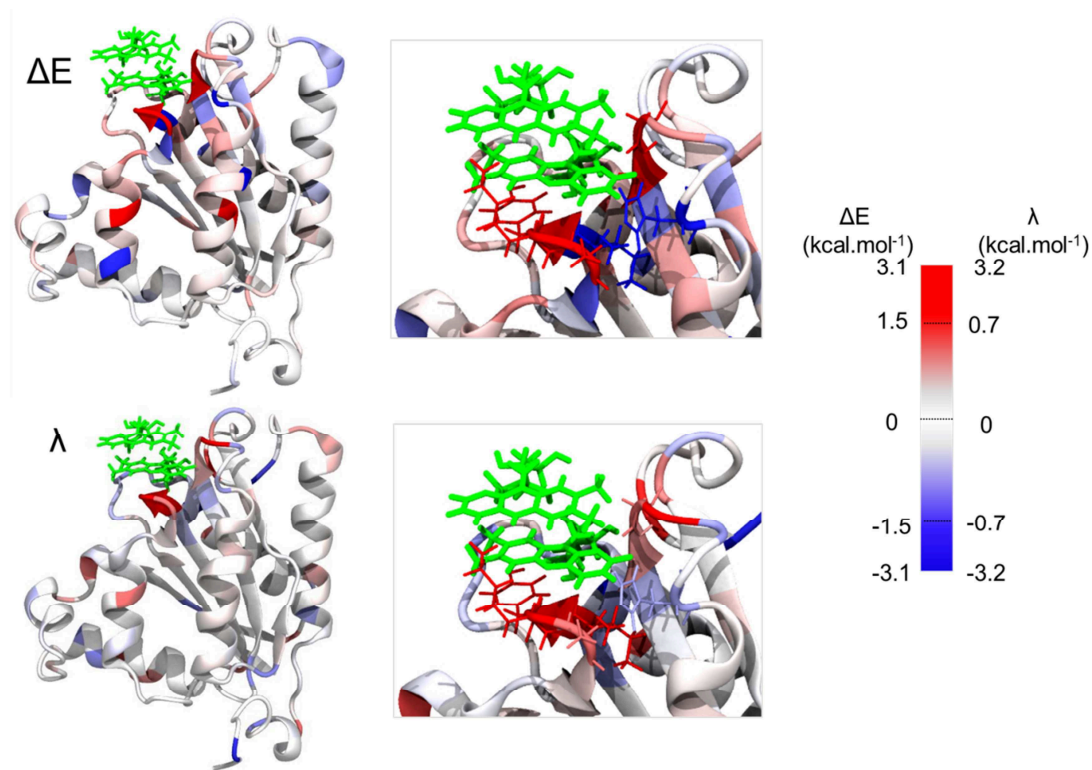


Figure 80 : représentation de la protéine Emob où chaque acide aminé est coloré en fonction de sa contribution à l'énergie libre de réaction (haut) ou à l'énergie de réorganisation (bas). La partie entourant les flavines est agrandie (figure du milieu) est l'échelle colorimétrique est donnée à droite.

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

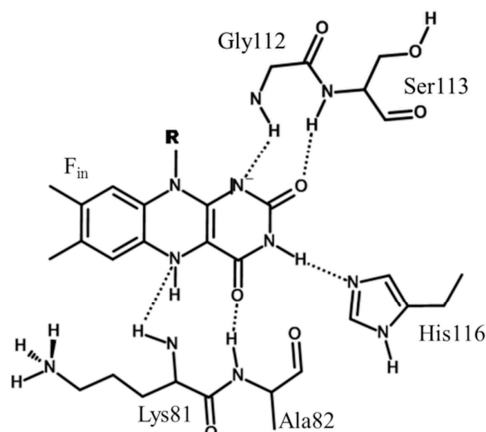


Figure 81 : schéma de Lewis des acides aminés formant des liaisons hydrogène avec le cycle isoalloxazine de la flavine  $F_{in}$ .

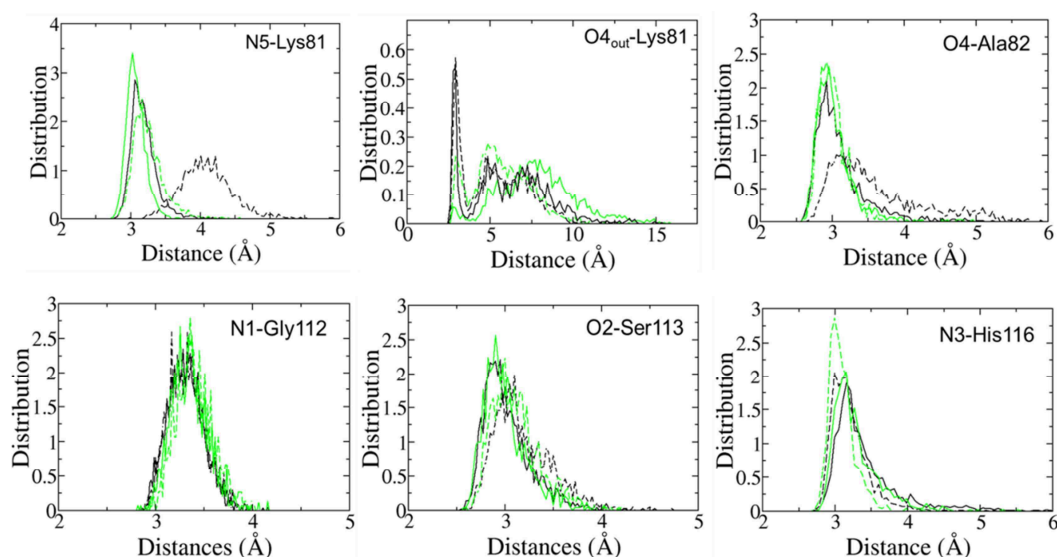


Figure 82 : distribution des distances des acides aminés de la protéine Emob entre les atomes lourds polaires des flavines (en majorité de  $F_{in}$  sauf dans le cas de la distance O4-Lys81 où l'indice out indique que l'atome d'oxygène est celui de  $F_{out}$ ) pour leurs différents états : protonée (noir), déprotonée (vert), négativement chargée (traits pleins) neutre (tirets).

Enfin, la contribution aux énergies libres de réactions et de réorganisation de chaque acide aminé de la protéine a été calculée. Dans la Figure 80, chaque résidu est coloré suivant la valeur de sa contribution. Nous observons que la région la plus colorée correspond à l'environnement immédiat du cycle isoalloxazine. Quelques acides aminés chargés plus lointains contribuent individuellement de manière assez forte mais interagissent souvent ensemble et, du point de vue

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

des cofacteurs, les deux contributions se compensent. Autour des flavines, nous retrouvons (Figure 58 et Figure 81):

- la tyrosine 80, en interaction  $\pi$  avec  $F_{in}$  ;
- la lysine 81, interagissant d'une part avec N5 de  $F_{in}$  *via* le proton de l'amine du squelette et d'autre part, sur quelques géométries, avec O4 de  $F_{out}$  *via* l'amine de sa chaîne latérale ;
- l'alanine 82, dont l'amine du squelette interagit avec O4 de  $F_{in}$  ;
- la glycine 112, en interaction avec N1 et O2 de  $F_{in}$  par l'amine du squelette ;
- la serine 113, également en interaction avec O2 par l'amine du squelette ;
- l'histidine 116, dont le Ne interagit avec le H3 de  $F_{in}$ .

L'ensemble de ces interactions, mis à part celle avec la Tyr80, sont des liaisons hydrogène. Quasiment aucun groupe chargé n'intervient dans ces interactions, qui sont toutes relativement faibles, que ce soit du point de vue de leur contribution à l'énergie libre de réaction ou à celle de réorganisation. Les contributions globales dues à la protéine proviennent donc plutôt de la somme de petites contributions de certains résidus que de la compensation d'interactions fortes flavines/acides aminés (ce qui serait plutôt le cas en présence de groupements chargés).

La Figure 82 donne la répartition des distances des interactions mentionnées ci-dessus. Certaines distances n'évoluent pas ou peu suivant l'état de la flavine : N1-Gly112, O2-Ser113, N3-His116, soulignant la faible variation de la charge des atomes d'azote et une certaine rigidité de la protéine au niveau de la boucle 112-117. En effet, malgré une variation de la charge de 0,1, la distance O2-Ser113 est à peine plus large pour la forme neutre que pour l'anionique. Au contraire, la distance N5-Lys81 est profondément modifiée dans le cas  $F_{in}H$  neutre : un large pic centré autour de 4 Å est observé au lieu du pic fin aux environs de 3 Å présent dans les autres états. Ceci s'explique par le caractère plan ( $sp_2$ ) de l'atome N5 dans le cas de la flavine semi-réduite : le proton gêne alors l'interaction du N5 avec le proton de l'amine de Lys81, tandis que dans le cas totalement réduit, l'atome N5 est  $sp_3$ , et le proton orienté vers la flavine solvatée. Cet effet stérique entraîne une répulsion entre le cofacteur et la boucle portant la lysine, d'où le profil observé pour la distance O4-Ala82, similaire à celui de N5-Lys81. Après transfert, le proton n'empêche évidemment plus la liaison hydrogène N5-Lys81 et les profils sont similaires à ceux dans l'état  $\{F_{in}H^- ; F_{out}\}$ . Enfin, la distance entre l'amine positive de la chaîne latérale de Lys81 et l'atome d'oxygène O4 de  $F_{out}$  présente un profil différent suivant l'état de protonation de cette flavine : si  $F_{out}$  est protonée, nous observons un premier pic fin vers 3 Å puis une large

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

distribution des distances sur une dizaine d'Angström ; si elle est déprotoné, ce premier pic diminue pour la flavine neutre ou disparaît dans le cas anionique. Cette disparition peut être rapprochée de l'écartement Lys81-flavines déjà évoqué pour l'état diabatique  $\{F_{in}H ; F_{out}^-\}$ . Dans le cas de l'état  $\{F_{in}H^- ; F_{out}\}$ , la présence de molécules d'eau autour du N5, légèrement plus importante que dans les états après transfert d'hydrogène, peut empêcher l'approche de la chaîne latérale de la lysine. Toutefois ces effets sont relativement fins et dans la grande majorité des géométries, l'atome O4 de  $F_{out}$  n'interagit pas avec la lysine.

Outre le maintien du complexe des deux flavines dans une conformation favorable au transfert d'hydrogène, le rôle de la protéine est donc d'assurer le transfert de l'électron uniquement pendant le transfert d'hydrogène. Des effets relativement fins, s'appuyant principalement sur des interactions de types hydrogènes venant compenser les interactions avec le solvant et les groupements phosphate, assure l'inversion de la stabilité relative des états diabatiques (électron sur  $F_{in}$  ou sur  $F_{out}$ ). Si la première couche de solvation de  $F_{out}$  se réorganise suivant l'état de charge du cycle isoalloxazine, les mouvements de la protéine sont eux assez indépendants de l'état diabatique considéré et de faible amplitude autour du complexe. La force motrice du transfert d'électron devient alors la stabilisation de l'appariement des électrons sur la flavine protonée.

### 4. Couplage du transfert d'électron avec le transfert d'hydrogène

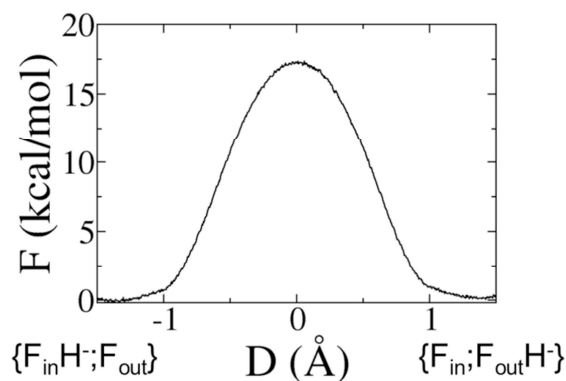
#### a. Profil du transfert d'hydrogène

Précédemment, nous avons montré que les états réactif et produit du transfert formel d'hydrure dans la protéine EmoB correspondent aux états respectifs  $\{F_{in}H^- ; F_{out}\}$  et  $\{F_{in} ; F_{out}H^-\}$  et que le transfert d'électron est total durant le transfert d'hydrogène. Nous nous intéressons maintenant la courbe d'énergie libre du transfert de l'atome d'hydrogène par le calcul du potentiel de force moyenne (PFM) (Figure 83). Un schéma de type *umbrella sampling*<sup>98</sup> a été utilisé en choisissant comme coordonnée de réaction la combinaison linéaire antisymétrique des deux distances N5-H. 61 fenêtres de 500 ps (100 ps d'équilibrations et 400 ps de production) de dynamiques moléculaires ont été réalisées au niveau SCC-DFTBMM dans CHARMM.<sup>25</sup> Une contrainte harmonique de constante de force 600 kcal/mol/Å<sup>2</sup> est imposée pour une coordonnée de réaction allant de -1,5 à 1,5 Å. Les dynamiques sont de types Langevin, dans l'ensemble NVT,



#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

dans un bain à 300K, avec un pas de temps de 0,5 fs. Des conditions périodiques sont imposées, mais le calcul s'effectue uniquement dans l'espace direct (*cutoff* de 15 Å). L'énergie libre est ensuite déterminée en appliquant la méthode WHAM (*Weight Histogramme Analysis Method*).<sup>99</sup>



**Figure 83** : énergie libre associée au transfert d'hydrogène de F<sub>in</sub> vers F<sub>out</sub> obtenue par *umbrella sampling* au niveau SCC-DFTBMM. La coordonnée de réaction D correspond à la différence entre la distance N5<sub>in</sub>-H et la distance H-N5<sub>out</sub>.

La barrière obtenue pour le transfert de l'atome d'hydrogène est d'environ 17 kcal/mol, ce qui correspond aux valeurs rencontrées dans la littérature pour des processus similaires.<sup>122,161</sup> Le transfert de l'atome d'hydrogène est beaucoup plus lent que le transfert d'électron. Bien qu'à aucun moment de nos simulations dans la protéine Emob, les deux flavines ne se séparent (la déformation la plus importante du complexe est une rotation de la flavine oxydée de 90° dans le plan du cycle isoalloxazine), ce phénomène peut toutefois se dérouler avant que l'hydrogène soit transféré de F<sub>in</sub> vers F<sub>out</sub>. Comme l'environnement protéique interdit tout transfert d'électron en l'absence de transfert d'hydrogène, seule une flavine à l'état oxydée peut quitter la protéine.

##### *b. Transfert d'électron aux positions intermédiaires*

Lors du transfert d'hydrogène, nous pouvons imaginer que l'inversion des courbes des états diabatiques pour le transfert d'électron est soit progressive, soit abrupte (se déroulant au niveau de l'état de transition du transfert d'hydrogène). Afin d'évaluer l'influence de la position de l'atome d'hydrogène entre les flavines sur le transfert d'électron, trois couples de simulations classiques sur les états diabatiques ont été étudiés de la même manière que pour les géométries du réactif et du produit. Nous nous sommes intéressés à des cas intermédiaires dans lesquels l'hydrogène, encore lié à un des cycles, se situe à environ 2 Å du N5 non protoné, soit une différence entre les distances N5-H de plus ou moins 1 Å. Nous noterons ces cas {F<sub>in</sub>—H ; F<sub>out</sub>} et {F<sub>in</sub> ; H—F<sub>out</sub>}. Le cas de l'état de transition, noté {F<sub>in</sub>—H—F<sub>out</sub>}, a également été étudié. Les

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

charges des atomes des cycles isoalloxazines ont été préalablement calculées au niveau cDFT (Tableau 31). Le choix de la contrainte harmonique à imposer afin de conserver une géométrie intermédiaire tout en permettant au système de relaxer est assez complexe. Pour les systèmes  $\{F_{in}-H ; F_{out}\}$  et  $\{F_{in} ; H-F_{out}\}$ , notre choix s'est porté sur :

- considérer le champ de force de l'hydrogène lié à l'azote pour la liaison N5-H existante en retirant les dièdres afin de permettre à l'hydrogène de pointer plus facilement vers l'autre flavine.

- ajouter une contrainte harmonique sur la deuxième distance N5-H à 2 Å avec une constante de force de 100 kcal/mol/Å<sup>2</sup>. Les fluctuations de la différence des deux distances N5-H sont comparables dans chacune des dynamiques à celles obtenues lors du calcul du PFM.

- ajouter une contrainte harmonique sur l'angle N5-H-N5 autour de 130° angle obtenu dans le NEB au niveau DFT/MM, avec une constante de force de 40 kcal/mol/deg<sup>2</sup>. L'angle final obtenu dans chaque dynamique fluctue plutôt autour de 140°.

Pour le système à l'état de transition  $\{F_{in}-H-F_{out}\}$ , la contrainte a été définie différemment :

- aucun paramètre entre l'atome d'hydrogène transféré et les flavines
- ajout d'une contrainte harmonique sur la combinaison antisymétrique des deux distances N5-H pour qu'elle soit égale à zéro avec une constante de force de 555 kcal/mol.
- ajout d'une contrainte harmonique sur l'angle N5-H-N5 (150° avec une constante de force de 100 kcal/mol/deg<sup>2</sup>) et sur la distance N5-N5 (2,5 Å avec une constante de force de 5 kcal/mol/Å<sup>2</sup>).

Le champ de force choisi pour les paramètres de liaisons au sein des cycles est similaire à ceux déjà créés pour les états réactif et produit. La valeur moyenne des liaisons a été modifiée dans l'état de transition pour correspondre à celle obtenue lors des dynamiques cDFT/MM sur cette géométrie.

Toutefois, les deux flavines ne peuvent se rapprocher autant en classique que ce qu'il est possible d'observer au niveau quantique. Les paramètres de Lennard-Jones ne sont peut-être pas adaptés à simuler de telles conformations intermédiaires. Les géométries MM obtenues sont donc assez différentes des géométries du NEB. De plus, l'échantillonnage des géométries n'est pas aussi complet que pour les trajectoires non-contraintes avant et après transfert d'hydrogène, les simulations n'étant que de 30 ns. Ces dernières apportent donc une information plutôt qualitative sur le mécanisme de transfert d'électron. Toutefois la convergence en 30 ns est bonne (Figure

84). La répartition des écarts énergétiques au long des dynamiques donne des gaussiennes différentes avant et après transfert d'électron, surtout dans les cas  $\{F_{in}-H; F_{out}\}$  où la différence d'écart-type entre les états est de 1 kcal/mol environ (Figure 85). Par ailleurs le coefficient de détermination entre l'histogramme des écarts énergétiques et la fonction gaussienne associée est moins bon ( $R^2$  entre 0.93 et 0.96) que lors des simulations non-contraintes ( $R^2 > 0.99$ ). Bien que moins pertinente dans ce cas, l'approximation de la réponse linéaire peut être à nouveau appliquée, étant donné que les informations obtenues sont qualitatives et non quantitative.

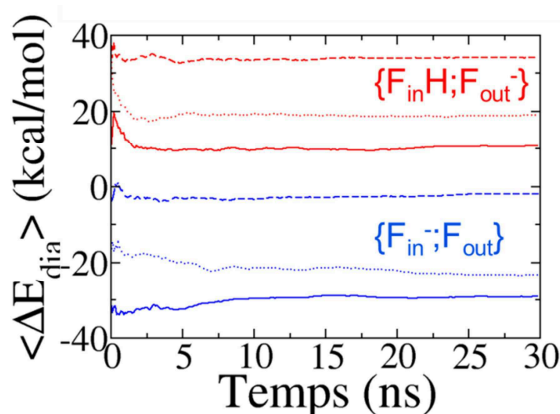


Figure 84 : convergence de l'écart énergétique diabatique liés au transfert d'électron sur les différentes dynamiques intermédiaires :  $\{F_{in}-H; F_{out}\}$  (trait plein) ;  $\{F_{in}-H; H-F_{out}\}$  (pointillé) ;  $\{F_{in}; H-F_{out}\}$  (tiret). Les états diabatiques où l'électron est porté par  $F_{in}$  sont en bleu et ceux où il est localisé sur  $F_{out}$  sont en rouge.

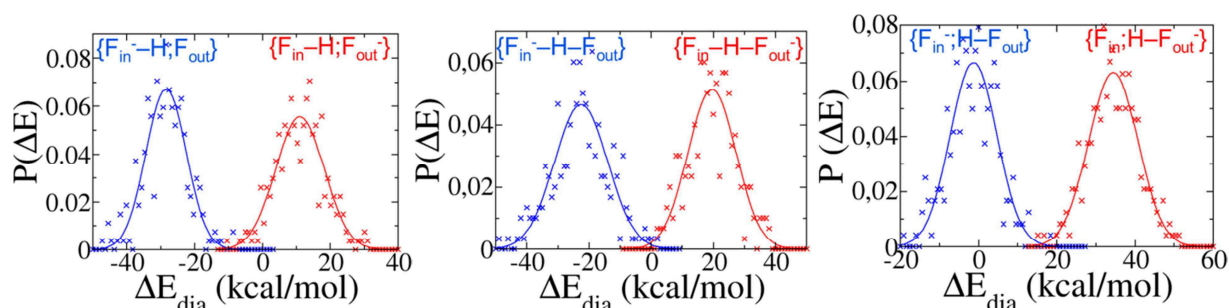


Figure 85 : Distribution des écarts énergétiques diabatiques liés au transfert d'électron lors des dynamiques intermédiaires  $\{F_{in}-H; F_{out}\}$  (gauche),  $\{F_{in}-H; H-F_{out}\}$  (milieu),  $\{F_{in}; H-F_{out}\}$  (droite). Les croix correspondent aux histogrammes de la probabilité  $p(\Delta E)$  et les traits pleins aux courbes gaussiennes associées (les coefficients de détermination entre les histogrammes et les courbes sont compris entre 0,93 et 0,96).

IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

		Total	interne	Solvant	Protéine	D-ribitol-5-Phosphate	ions
$\{F_{in}H ; F_{out}\}$	$\Delta F$	7,73	9,63	-14,76	19,36	-6,01	-0,49
	$\lambda$	22,07	4,25	12,26	1,80	3,75	0,01
$\{F_{in}-H ; F_{out}\}$	$\Delta F$	9,15	13,25	-8,47	15,53	-10,71	-0,45
	$\lambda$	19,86	2,99	11,01	4,96	0,81	0,09
$\{F_{in}-H-F_{out}\}$	$\Delta F$	2,10	1,82	-9,75	13,75	-3,20	-0,52
	$\lambda$	21,12	4,80	11,39	3,66	1,01	0,26
$\{F_{in} ; H-F_{out}\}$	$\Delta F$	-16,12	-10,83	-10,52	10,34	-4,97	-0,14
	$\lambda$	17,97	3,37	10,73	3,06	0,71	0,10
$\{F_{in} ; F_{out}H\}$	$\Delta F$	-8,19	-6,95	-10,58	15,20	-5,82	-0,26
	$\lambda$	20,69	2,10	13,93	2,28	1,93	0,18

Tableau 35 : énergies libres de réaction et de réorganisation (en kcal/mol) du transfert d'électron pour différentes positions de l'hydrogène. Sa décomposition en différentes contributions des cycles isoalloxazines (interne, calculée au niveau QM) ou de l'environnement (séparé en contributions du solvant, c'est-à-dire les molécules d'eau, de la protéine, de la queue D-ribitol-5-phosphate et des ions) est également donnée.

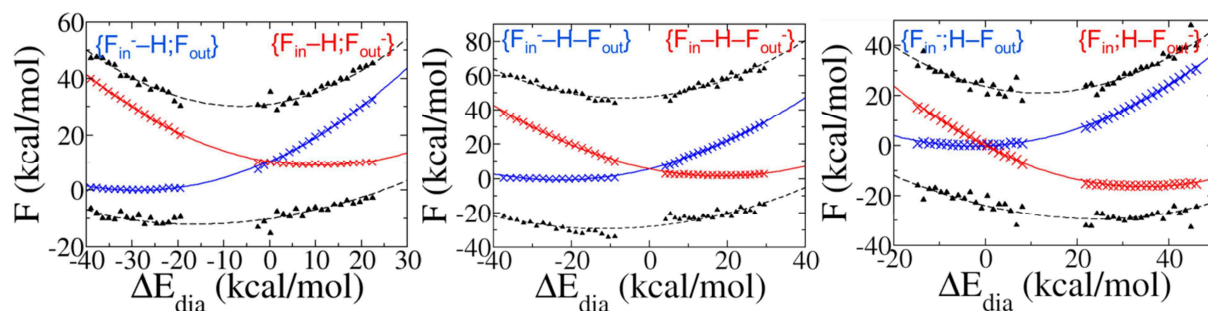


Figure 86: courbes diadiabatiques et adiabatiques du transfert d'électron dans la protéine Emob pour les dynamiques intermédiaires  $\{F_{in}-H ; F_{out}\}$  (gauche),  $\{F_{in}-H-F_{out}\}$  (milieu),  $\{F_{in} ; H-F_{out}\}$  (droite). Les croix et paraboles bleues correspondent à l'état diadiabatique  $\{F_{in}^- ; F_{out}\}$  et les rouges à l'état diadiabatique  $\{F_{in} ; F_{out}^-\}$ . Les triangles et les courbes en tirets noirs représentent les deux états adiabatiques construits à partir des états diadiabatiques et de leur couplage, en supposant l'équation 35 valide.

Les courbes diadiabatiques des états  $\{F_{in}-H ; F_{out}\}$  et  $\{F_{in} ; H-F_{out}\}$  sont légèrement différentes de celles obtenues précédemment pour les cas  $\{F_{in}H ; F_{out}\}$  et  $\{F_{in} ; F_{out}H\}$ . En particulier, l'énergie libre de réaction est plus importante dans les cas intermédiaires ce qui peut paraître surprenant et écarte l'hypothèse d'une inversion progressive des courbes. Ce résultat peut toutefois être attribué à un mauvais échantillonnage de géométries ne reflétant pas une réalité physique. Cependant, au niveau de l'état de transition du transfert d'hydrogène, nous retrouvons bien deux états diadiabatiques quasi iso-énergétiques (énergie libre de réaction de 2,1 kcal/mol), avec une très faible contribution interne : dans aucun des états diadiabatiques, l'électron transféré ne

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

peut s'apparier à l'atome d'hydrogène du fait de la contrainte, donc aucun n'est particulièrement stabilisé au niveau quantique. Les courbes diabatiques semblent donc évoluer de manière assez brutale mais ce n'est pas le cas du couplage qui lui augmente considérablement jusqu'à l'état de transition puis diminue : le couplage moyen est de 20 kcal/mol, 38 kcal/mol et 23 kcal/mol durant les dynamiques intermédiaires  $\{F_{in}-H; F_{out}\}$ ,  $\{F_{in}-H-F_{out}\}$  et  $\{F_{in}; H-F_{out}\}$  respectivement. La surface de l'état adiabatique fondamental est donc un large puits sur lequel l'électron se déplace sans dépense d'énergie d'un cycle isoalloxazine à l'autre. Le moteur du transfert d'électron entre les deux flavines s'apparente plus à l'évolution du couplage entre les deux états diabatiques qu'à leurs positions énergétiques relatives au cours du transfert d'hydrogène. La délocalisation de l'électron est autorisée uniquement par le départ de l'atome d'hydrogène. Les contributions de l'environnement des cas intermédiaires restent proches de celles des états initial et final du transfert d'hydrogène (Tableau 35). De même l'énergie de réorganisation n'évolue guère tout au long du transfert d'hydrogène et reste principalement déterminée par les modifications de la première couche de solvation autour de  $F_{out}$  due au changement d'état de charge.

Le transfert d'hydrogène d'une flavine à une autre apparaît donc comme un processus relativement lent, qui peut être mis en compétition avec le départ de  $F_{out}$  de la protéine. Toutefois, en maintenant un couplage entre états diabatiques assez bas en l'absence de transfert d'hydrogène, la protéine Emob inhibe le transfert d'électron. Lors du déplacement de l'atome d'hydrogène d'une flavine à l'autre, ce couplage augmente fortement et la position relative des états diabatiques s'inverse au niveau de l'état de transition, permettant la délocalisation de l'électron sur les deux cycles.

### 5. Conclusion

Dans cette partie nous nous sommes attachés à décomposer le transfert d'hydrure au sein de la protéine Emob entre deux cofacteurs flavine. Dans un premier temps nous avons proposé une méthode pour identifier la ou les espèce(s) transférée(s) : proton et deux électrons, hydrogène et un électron ou hydrure. Notre choix s'est porté sur la méthode d'analyse topologique ELF pour laquelle les signatures des différentes espèces associées à l'atome d'hydrogène peuvent être aisément identifiées. L'association ELF et DFT contrainte permet en effet de simuler diverses valeurs de charges et de visualiser les bassins issus de l'analyse topologiques correspondant. Cette méthode a été testée dans un premier temps sur le transfert de proton entre les deux atomes

#### *IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine EmoB*

d'oxygène d'un catéchol semi-réduit puis appliquée au cas de la protéine EmoB, au niveau de l'état de transition du transfert d'hydrure. La topologie ainsi que l'analyse des populations ELF indiquent sans ambiguïté que l'espèce transférée, au niveau de l'état de transition, est un atome d'hydrogène. Le transfert d'hydrure peut donc se découper en transfert d'hydrogène et transfert d'un électron.

Dans un second temps, nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement au transfert d'électron. En localisant l'électron sur l'une ou l'autre flavine par cDFT, nous obtenons des états diabatiques associés à son transfert. L'étude des chemins de réaction du transfert d'hydrogène sur ces états et les comparaisons des populations entre les cas diabatiques et adiabatiques semblent indiquer que le transfert d'électron n'est pas complet même lorsque l'hydrogène est lié à la flavine solvatée. Ce résultat est assez surprenant étant donné que le rôle de la protéine EmoB est de transmettre l'hydrure à la flavine pour que celle-ci réagisse avec EmoA.

Nous avons par la suite pris en compte les fluctuations de l'environnement en traitant ce transfert d'électron avec des outils de dynamiques moléculaires. Afin de pouvoir échantillonner l'espace des configurations par des simulations à l'échelle de la centaine de ns, nous avons réalisé des dynamiques classiques sur les états diabatiques en utilisant un champ de force calibré à partir de calculs cDFT/MM. La différence entre les énergies des états diabatiques sur des géométries extraites des dynamiques est ensuite calculée au niveau cDFT/MM et utilisée pour construire des courbes de type Marcus et obtenir les grandeurs thermodynamiques associées au transfert d'électron. Cette étude dynamique, effectuée pour des structures avant et après transfert d'hydrogène, montre que le transfert d'électron ne peut se produire que lors du transfert de l'atome d'hydrogène. En effet, les états où l'électron et l'hydrogène se situent sur deux cycles isoalloxazines différents sont déstabilisés tant en régime diabatique qu'adiabatique.

La comparaison avec un environnement seulement composé de solvant aqueux, et l'étude des contributions internes et externes aux énergies libres de réaction et de réorganisation ont permis de mieux comprendre le rôle de la protéine. En effet, dans l'eau, le transfert d'électron peut se produire indépendamment du transfert d'hydrogène et les deux états diabatiques sont énergiquement équivalents. L'asymétrie engendrée par l'environnement protéique stabilise suffisamment la présence de l'électron sur la flavine protéique par des liaisons hydrogènes pour que celui reste sur le cofacteur avant départ de l'hydrogène. Ces interactions relativement faibles

#### IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob

ne peuvent compenser la stabilisation résultant de l'appariement des électrons après transfert d'hydrogène sur la flavine solvatée, ce qui conduit au transfert total de l'électron pendant le transfert de l'hydrogène. Un second rôle de la protéine est de permettre la formation et le maintien du complexe  $\pi$  favorable au transfert d'hydrogène entre les deux flavines.

Ce dernier transfert est d'ailleurs relativement lent : son énergie libre d'activation est de 17 kcal/mol environ. Une séparation des deux flavines pourrait se produire avant que l'atome soit transféré. Toutefois, comme signalé précédemment, l'électron est alors maintenu sur la flavine protéique, évitant ainsi les risques de retrouver une flavine semi-réduite dans le milieu cellulaire. L'électron est cependant fortement délocalisé entre les deux flavines lorsque l'hydrogène passe de l'une à l'autre du fait du très fort couplage entre les états diabatiques dans des géométries intermédiaires du transfert d'hydrogène.

Lors de cette étude nous avons envisagé la décomposition du transfert d'hydrure sous deux angles : un modèle QM/MM statique et un modèle dynamique, qui permettent de représenter ce transfert soit en régime adiabatique soit en régime diabatique. Si nous nous contentons du chemin en énergie potentielle du transfert formel d'hydrure, nous obtenons la décomposition en transfert d'hydrogène et d'un électron mais cette étude est insuffisante pour rendre compte du couplage entre ces deux transferts. Elle conduit même à penser que le transfert n'est pas nécessairement complet en indiquant que l'électron n'est pas entièrement transféré à la flavine solvatée une fois cette dernière protonée. Comme cette donnée ne corrobore pas les résultats expérimentaux, ce modèle reste insuffisant : la réorganisation du système après transfert d'hydrogène permet-elle le transfert d'électron? Ce transfert incomplet est-il un artefact des optimisations? Des simulations de dynamiques moléculaires s'imposent donc. En laissant au système le temps de se relaxer, nous obtenons une courbe d'énergie libre thermodynamiquement symétrique : énergie libre de réaction nulle, état de transition pour l'hydrogène à mi-chemin entre les atomes d'azotes N5. Celle-ci n'apporte toutefois pas d'information directe sur l'état rédox de chaque flavine au long du transfert d'hydrogène : en considérant uniquement le régime adiabatique, il semble difficile de déterminer quand peut avoir lieu le transfert d'électron : tout le temps, seulement à l'état de transition, seulement au début ou à la fin (Figure 57)? De même, ce transfert est-il permis grâce à un couplage fort entre les cycles isoalloxazines (*i.e.* l'électron est délocalisé sur les deux cycles) ou bien grâce à une modification du champ électrostatique dû à l'environnement ? Si une étude adiabatique ne peut répondre à ces interrogations, nous pouvons

#### *IV. Etude d'un transfert d'hydrure : cas de flavines dans la protéine Emob*

décorrélérer les deux transferts en étudiant les états diabatiques du transfert d'électron par des représentations de type Marcus. Nous avons vu que l'étude de ces états diabatiques a permis de souligner l'importance de l'environnement protéique qui inhibe tout transfert d'électron en l'absence de transfert d'hydrogène et donc le départ d'une flavine semi-réduite dans le milieu cellulaire. Bien qu'il ait été établi que le transfert de l'électron se fait en régime adiabatique lors du transfert d'hydrogène du fait du couplage important, nous avons également montré que celui-ci évoluait au cours du transfert d'hydrogène et que la délocalisation de l'électron n'est autorisée que pour des géométries intermédiaires du transfert d'hydrogène grâce en particulier à un couplage fort entre état diabatique. L'intérêt d'un tel découpage est également la prise en compte de la réorganisation de l'environnement qui joue un rôle dans le transfert d'électron en fonction de la position de l'hydrogène.

Les simulations en régime diabatique et adiabatique sont donc complémentaires, surtout en ce qui concerne le découpage d'un transfert d'un hydrure ou d'un hydrogène en un hydrogène ou en proton et en transfert d'électron(s). Si l'approximation de la réponse linéaire s'applique au système, et si les états diabatiques peuvent être clairement définis comme dans le cas de la protéine Emob, la méthodologie employée ici est exportable et peut être utilisée dans des cas où l'adiabaticité du système est moins évidente. Pour rester dans le cadre de la protéine Emob, nous pourrions envisager une mutation d'un résidu proche du cycle isoalloxazine en un résidu chargé positivement ou négativement qui modifierait certainement la thermodynamique du transfert d'électron en stabilisant ou déstabilisant la charge sur le cofacteur flavine. Nous pouvons également envisager une telle étude dans le flavocytochrome  $b_2$ , où les états diabatiques à étudier sont multiples du fait de la présence d'au moins deux transferts de proton et deux d'électron plus ou moins couplés.



## **V. Conclusion**

Au cours de ce travail, nous avons étudié des réactions d'oxydo-réduction se produisant en milieu biologique et faisant intervenir des transferts d'électrons et de protons entre molécules organiques sous trois angles différents : l'évaluation d'une grandeur macroscopique, le potentiel redox ; la détermination de chemins réactionnels ; et la relation entre les transferts des différentes particules rassemblées sous le terme d'hydrure. Chacune de ces problématiques a été considérée dans un système protéique spécifique et à l'aide d'une méthode propre. Les méthodes utilisées s'appuient toutes sur la combinaison de l'évaluation quantique des modifications de la densité électronique des espèces intervenant directement dans le processus étudié et de la description classique de l'environnement aux cours de dynamiques moléculaires plus ou moins longues. Nous avons exploré toutefois plusieurs facettes de cette combinaison : méthode QM+MM dans la première partie, QM/MM biaisée dans la seconde et QM/MM sur des états diabatiques dans la troisième. Les avantages et les limites de chacune ont pu être étudiés.

Dans le cas du calcul du potentiel redox, notre choix s'est porté sur la méthode QM+MM, relativement peu coûteuse en temps de calcul, reposant sur de longues dynamiques classiques sur chaque état d'oxydation et de protonation de la fonction quinone dans son environnement (solution aqueuse ou protéine) et une évaluation au niveau quantique en phase gazeuse de l'énergie d'ionisation ou de déprotonation sur des géométries optimisées. L'inconvénient d'une telle méthode est qu'elle requiert au préalable l'élaboration d'un champ de force adapté à notre molécule dans ses différents états.

Par ailleurs, afin de nous assurer de la pertinence de nos calculs théoriques, nous les avons calibrés pour différentes molécules de la famille des quinones par rapport à des résultats expérimentaux. La courbe et la formule de correction obtenues semblent tout à fait pertinentes et peuvent être utilisées, en appliquant toutefois le même protocole de simulation, pour d'autres systèmes proches dont le potentiel redox n'a pu être déterminé expérimentalement avec une précision de 0,1 eV, malgré un problème dans l'évaluation des pKa.

Dans ce cadre, nous avons étudié le cas du TTQ dans la protéine MADH, celle-ci étant complexée ou non à son partenaire protéique, la protéine bleue à cuivre amicyanine. Nous avons alors mis en évidence une difficulté inattendue, à savoir la présence d'un cation  $\text{Na}^+$  dans le site actif. L'échantillonnage des conformations se révèle alors particulièrement délicat. De futurs

## V. Conclusion

travaux, reposant sur une meilleure définition de la force ionique du système étudié, pourraient permettre d'éviter cet écueil. Malgré cette difficulté, nous avons établi que l'association entre les protéines MADH et amicyanine ne modifiait guère le potentiel redox associé au passage de l'état réduit à l'état semi-réduit du TTQ.

A partir de notre courbe de calibration et en s'inspirant des premières simulations réalisées sur la protéine MADH, il est envisageable de s'intéresser au potentiel redox de cofacteurs quinones présents dans d'autres systèmes protéiques.

L'étude des chemins réactionnels de l'oxydation du L-lactate au sein du flavocytochrome  $b_2$  s'appuie quant à elle sur des dynamiques hybrides QM/MM biaisée où la partie QM est évaluée au niveau semi-classique AM1 puis corrigée par des énergies DFT en phase gazeuse. Sur les deux mécanismes envisagés expérimentalement, seul le mécanisme de type hydrure a pu être modélisé de manière satisfaisante pour différentes conformations et mutations du site actif. Le choix de deux coordonnées de réactions, chacune associée au transfert d'un noyau d'hydrogène du substrat allant l'un vers une histidine et l'autre vers un cofacteur FMN, autorise la description du mécanisme en fonction de l'ordre et du couplage de ces deux transferts. Nous avons par conséquent pu établir que l'oxydation du L-lactate pouvait se faire soit par transfert de proton vers l'histidine puis transfert d'hydrure vers la flavine, soit par un transfert couplé des deux espèces. Suivant les interactions hydrogènes, électrostatiques ou stériques autour du substrat, l'un ou l'autre des chemins est plus ou moins favorisé.

Cependant il apparaît que, malgré la correction DFT apportée à l'énergie de la surface AM1, les énergies d'activations obtenues se révèlent trop importantes. Qualitativement, nos conclusions rejoignent néanmoins les données expérimentales. Elles soulignent l'importance de la présence d'une molécule d'eau dans le site actif bloquant une arginine dans une conformation distale. La question de la pertinence du biais imposé et du choix de nos coordonnées de réaction peut se poser, en particulier dans le cadre de transfert de proton ou d'hydrogène qui peuvent être considérés comme des particules quantiques comme l'électron.

Dans le cas du second mécanisme envisagé, dit de type carbanion, nous manquons d'informations quant à un éventuel accepteur du proton issu de l'alcool du L-lactate. En son absence, la barrière associée au transfert du proton  $\alpha$  du substrat apparaît bien plus élevée que celle associée à l'oxydation du L-lactate par le mécanisme de type hydrure. Le produit obtenu

## V. Conclusion

suite à ce transfert n'étant toutefois pas le pyruvate, nous ne pouvons pas pour le moment comparer les deux mécanismes.

Par la suite, il convient donc de définir une nouvelle coordonnée de réaction pour le mécanisme de type carbanion permettant de prendre en compte le départ du proton depuis la fonction alcool du substrat. L'idéal serait de comparer les deux mécanismes dans les différents systèmes déjà considérés pour le mécanisme de type hydrure. Par exemple, la position distale ou proximale de l'arginine peut jouer un rôle important car si le chemin envisagé dans le mécanisme de transfert d'hydrure est plus simple dans le cas distal, la conformation proximale semble favoriser le départ du proton  $\alpha$ . Or les deux conformations ont été obtenues dans différentes structures cristallographiques. Des dynamiques plus longues permettraient d'étudier les différentes conformations du site actif et son évolution à l'échelle de dizaine voir de centaines de nanosecondes. Afin de compléter l'étude du Fcb2, nous pouvons également nous pencher sur la modélisation du transfert d'électrons depuis la flavine réduite vers l'hème contenue dans un domaine mobile du Fcb2.

Enfin, nous avons montré que le transfert d'hydrure entre les deux flavines superposées à la surface de la protéine EmoB pouvait se décomposer en transferts d'un hydrogène et d'un électron que nous avons étudiés séparément. La caractérisation de l'espèce transférée s'est faite à partir de profil d'énergie potentiel du transfert du noyau d'une flavine à l'autre à l'aide de l'analyse topologique ELF. De plus, nous avons montré que la présence d'un hydrure est fortement improbable à proximité de groupements accepteurs d'électron. Ensuite, nous avons réalisé des dynamiques moléculaires sur les états diabatiques associés au transfert d'électron avant et après transfert d'hydrogène grâce à l'utilisation de la DFT contrainte pour décrire la densité électronique sur les cycles isoalloxazine. A l'aide d'un champ de force adapté à ces états, de longues dynamiques moléculaires classiques ont permis d'échantillonner l'écart énergétique diabatique et le couplage entre les états afin de construire des courbes de type Marcus. Nous avons alors montré qu'au sein de la protéine EmoB, le transfert d'électron ne pouvait se faire qu'une fois l'hydrogène parti de la flavine, en régime adiabatique, et ce grâce à l'augmentation du couplage. Au contraire, en solution, l'électron peut passer aisément d'une flavine à l'autre quelle que soit la position de l'hydrogène. L'environnement protéique assure donc le transfert

## *V. Conclusion*

complet hydrogène et électron et n'autorise pas le départ d'une flavine à l'état semi-réduit (contenant un électron célibataire).

La stratégie appliquée à l'étude du transfert d'électron par une combinaison des méthodes DFT contrainte et dynamiques classique pour l'évaluation de courbes de type Marcus peut tout à fait s'étendre à d'autres systèmes protéiques ou en solution.

Les trois méthodologies présentées dans cette thèse peuvent être évidemment employées ensembles ou séparément sur des systèmes protéiques catalysant une réaction d'oxydo-réduction entre molécules organiques. La détermination du potentiel rédox au sein de la protéine permet de caractériser le donneur et l'accepteur d'électron(s) dans un environnement particulier. La recherche du chemin réactionnel permet d'évaluer la barrière d'activation et de déterminer les différentes étapes du processus. Enfin, dans le cas d'une étape de transfert d'hydrogène ou d'hydrure pouvant se découpler en transfert de proton et d'électron, il est possible d'étudier séparément ces déplacements afin de mieux décomposer et comprendre le mécanisme enzymatique.

Ce travail de thèse, inscrit dans une démarche d'applications des méthodes de chimie théorique à des systèmes complexes, a permis à la fois d'apporter des analyses mécanistiques ou énergétiques inaccessibles à l'expérience mais aussi d'identifier les forces et les faiblesses des méthodes actuelles.

D'une part, des développements de la DFT contrainte pour décrire au niveau quantique le couplage entre transfert d'électron et de proton pourront donner une vision encore plus complète des processus élémentaires à l'œuvre. D'autre part, les différentes approches de définition de coordonnée de réaction et d'échantillonnage de la surface d'énergie potentielle restent des problématiques ouvertes, à définir spécifiquement en fonction des processus à étudier.

## Bibliographie

1. Davidson, V. L. Structure and Mechanism of Tryptophylquinone Enzymes. *Bioorganic Chem.* **33**, 159–170 (2005).
2. Chen, L., Durley, R. C., Mathews, F. S. & Davidson, V. L. Structure of an Electron Transfer Complex: Methylamine Dehydrogenase, Amicyanin, and Cytochrome c551i. *Science* **264**, 86–90 (1994).
3. Davidson, V. L. Protein Control of True, Gated, and Coupled Electron Transfer Reactions. *Acc. Chem. Res.* **41**, 730–738 (2008).
4. McIntire, W. S. Quinoproteins. *FASEB J.* **8**, 513–521 (1994).
5. Klinman, J. P. & Bonnot, F. Intrigues and Intricacies of the Biosynthetic Pathways for the Enzymatic Quinocofactors: PQQ, TTQ, CTQ, TPQ, and LTQ. *Chem. Rev.* 131218101049006 (2013). doi:10.1021/cr400475g
6. Itoh, S. *et al.* A Model Compound of the Novel Cofactor Tryptophan Tryptophylquinone of Bacterial Methylamine Dehydrogenases. Synthesis and Physicochemical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1485–1493 (1995).
7. Mure, M., Wang, S. X. & Klinman, J. P. Synthesis and Characterization of Model Compounds of the Lysine Tyrosyl Quinone Cofactor of Lysyl Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6113–6125 (2003).
8. Mure, M. & Klinman, J. P. Model Studies of Topaquinone-Dependent Amine Oxidases. 1. Oxidation of Benzylamine by Topaquinone Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8698–8706 (1995).
9. Murakami, Y., Tachi, Y. & Itoh, S. A Model Compound of the Novel Organic Cofactor CTQ (Cysteine Tryptophylquinone) of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3074–3079 (2004).
10. Zeng, X., Hu, H., Hu, X. & Yang, W. Calculating Solution Redox Free Energies with Ab Initio Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Minimum Free Energy Path Method. *J. Chem. Phys.* **130**, 164111 (2009).
11. Vuilleumier, R., Tay, K. A., Jeanmairet, G., Borgis, D. & Boutin, A. Extension of Marcus Picture for Electron Transfer Reactions with Large Solvation Changes. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2067–2074 (2012).
12. Cheng, J., Sulpizi, M. & Sprik, M. Redox Potentials and pKa for Benzoquinone from Density Functional Theory Based Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **131**, 154504 (2009).
13. Reynolds, C. A. Theoretical Electrode Potentials and Conformational Energies of Benzoquinones and Naphthoquinones in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7545–7551 (1990).
14. Wheeler, R. A. A Method for Computing One-Electron Reduction Potentials and its Application to p-Benzoquinone in Water at 300 K. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11048–11051 (1994).
15. Rosso, K. M., Smith, D. M. A., Wang, Z., Ainsworth, C. C. & Fredrickson, J. K. Self-Exchange Electron Transfer Kinetics and Reduction Potentials for Anthraquinone Disulfonate. *J. Phys. Chem. A* **108**, 3292–3303 (2004).
16. Johnsson Wass, J. R. T., Ahlberg, E., Panas, I. & Schiffrin, D. J. Quantum Chemical Modeling of the Reduction of Quinones. *J. Phys. Chem. A* **110**, 2005–2020 (2006).
17. Zhu, X.-Q., Wang, C.-H., Liang, H. & Cheng, J.-P. Theoretical Prediction of the Hydride Affinities of Various *p*- and *o*-Quinones in DMSO. *J. Org. Chem.* **72**, 945–956 (2007).
18. Zhu, X.-Q. & Wang, C.-H. Accurate Estimation of the One-Electron Reduction Potentials of Various Substituted Quinones in DMSO and CH<sub>3</sub>CN. *J. Org. Chem.* **75**, 5037–5047 (2010).
19. Levitt, M. & Warshel, A. Computer Simulation of Protein Folding. *Nature* **253**, 694–695 (1975).
20. Kamerlin, S. C. L., Haranczyk, M. & Warshel, A. Progress in *Ab Initio* QM/MM Free-Energy Simulations of Electrostatic Energies in Proteins: Accelerated QM/MM Studies of pK<sub>a</sub>, Redox Reactions and Solvation Free Energies. *J. Phys. Chem. B* **113**, 1253–1272 (2009).
21. Hu, H., Lu, Z., Parks, J. M., Burger, S. K. & Yang, W. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Minimum Free-Energy Path for Accurate Reaction Energetics in Solution and Enzymes: Sequential

## Bibliographie

- Sampling and Optimization on the Potential of Mean Force Surface. *J. Chem. Phys.* **128**, 034105 (2008).
22. Zeng, X., Hu, H., Hu, X., Cohen, A. J. & Yang, W. Ab Initio Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Simulation of Electron Transfer Process: Fractional Electron Approach. *J. Chem. Phys.* **128**, 124510 (2008).
  23. Elstner, M. *et al.* Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding Method for Simulations of Complex Materials Properties. *Phys. Rev. B* **58**, 7260 (1998).
  24. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1614 (2009).
  25. Cui, Q., Elstner, M., Kaxiras, E., Frauenheim, T. & Karplus, M. A QM/MM Implementation of the Self-Consistent Charge Density Functional Tight Binding (SCC-DFTB) Method. *J. Phys. Chem. B* **105**, 569–585 (2001).
  26. Elstner, M., Hobza, P., Frauenheim, T., Suhai, S. & Kaxiras, E. Hydrogen Bonding and Stacking Interactions of Nucleic Acid Base Pairs: A Density-Functional-Theory Based Treatment. *J. Chem. Phys.* **114**, 5149 (2001).
  27. Elstner, M. SCC-DFTB: What Is the Proper Degree of Self-Consistency? *J. Phys. Chem. A* **111**, 5614–5621 (2007).
  28. Yang, Yu, H., York, D., Cui, Q. & Elstner, M. Extension of the Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding Method: Third-Order Expansion of the Density Functional Theory Total Energy and Introduction of a Modified Effective Coulomb Interaction. *J. Phys. Chem. A* **111**, 10861–10873 (2007).
  29. Riccardi, D., Schaefer, P. & Cui, Q. pK<sub>a</sub> Calculations in Solution and Proteins with QM/MM Free Energy Perturbation Simulations: A Quantitative Test of QM/MM Protocols. *J. Phys. Chem. B* **109**, 17715–17733 (2005).
  30. Li, G., Zhang, X. & Cui, Q. Free Energy Perturbation Calculations with Combined QM/MM Potentials Complications, Simplifications, and Applications to Redox Potential Calculations. *J. Phys. Chem. B* **107**, 8643–8653 (2003).
  31. Li, G. & Cui, Q. pK<sub>a</sub> Calculations with QM/MM Free Energy Perturbations. *J. Phys. Chem. B* **107**, 14521–14528 (2003).
  32. Bhattacharyya, S., Stankovich, M. T., Truhlar, D. G. & Gao, J. Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Simulations of One-and Two-Electron Reduction Potentials of Flavin Cofactor in Water, Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, and Cholesterol Oxidase. *J. Phys. Chem. A* **111**, 5729–5742 (2007).
  33. Rauschnot, J. C., Yang, C., Yang, V. & Bhattacharyya, S. Theoretical Determination of the Redox Potentials of NRH:Quinone Oxidoreductase 2 Using Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Simulations. *J. Phys. Chem. B* **113**, 8149–8157 (2009).
  34. Blumberger, J. Free Energies for Biological Electron Transfer from QM/MM Calculation: Method, Application and Critical Assessment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 5651 (2008).
  35. Köster, A. M. *et al.* deMon2k. (2006).
  36. Zhang, Y. & Yang, W. Comment on ‘Generalized Gradient Approximation Made Simple’. *Phys. Rev. Lett.* **80**, 890–890 (1998).
  37. Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785–789 (1988).
  38. Calaminici, P., Janetzko, F., Köster, A. M., Mejia-Olvera, R. & Zuniga-Gutierrez, B. Density Functional Theory Optimized Basis Sets for Gradient Corrected Functionals: 3d Transition Metal Systems. *J. Chem. Phys.* **126**, 044108 (2007).
  39. Goursot, A., Mineva, T., Kevorkyants, R. & Talbi, D. Interaction between *n*-Alkane Chains: Applicability of the Empirically Corrected Density Functional Theory for Van der Waals Complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **3**, 755–763 (2007).
  40. Aradi, B., Hourahine, B. & Frauenheim, T. DFTB+, a Sparse Matrix-Based Implementation of the DFTB Method. *J. Phys. Chem. A* **111**, 5678–5684 (2007).

## Bibliographie

41. Fanfrlík, J., Brynda, J., Rezáč, J., Hobza, P. & Lepsík, M. Interpretation of Protein/Ligand Crystal Structure using QM/MM Calculations: Case of HIV-1 Protease/Metallacarborane Complex. *J. Phys. Chem. B* **112**, 15094–15102 (2008).
42. Solomon, G. C., Andrews, D. Q., Van Duyne, R. P. & Ratner, M. A. Electron Transport through Conjugated Molecules: When the  $\pi$  System Only Tells Part of the Story. *ChemPhysChem* **10**, 257–264 (2009).
43. Mills, G. & Jónsson, H. Quantum and Thermal Effects in H<sub>2</sub> Dissociative Adsorption: Evaluation of Free Energy Barriers in Multidimensional Quantum Systems. *Phys. Rev. Lett.* **72**, 1124 (1994).
44. Mills, G., Jónsson, H. & Schenter, G. K. Reversible Work Transition State Theory: Application to Dissociative Adsorption of Hydrogen. *Surf. Sci.* **324**, 305–337 (1995).
45. Jónsson, H., Mills, G. & Jacobsen, K. W. in *Class. Quantum Dyn. Condens. Phase Simul.* 385 (World Scientific, 1998).
46. Mbiya, W., Chipinda, I., Siegel, P. D., Mhike, M. & Simoyi, R. H. Substituent Effects on the Reactivity of Benzoquinone Derivatives with Thiols. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 112–123 (2013).
47. Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Model.* **13**, 1173–1213 (2007).
48. Korth, M., Pitonák, M., Rezáč, J. & Hobza, P. A Transferable H-Bonding Correction for Semiempirical Quantum-Chemical Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 344–352 (2010).
49. Stewart, J. J. P. MOPAC2009 [HTTP://OpenMopac.net](http://OpenMopac.net). (2008).
50. Foloppe, N. & MacKerell Jr, A. D. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: I. Parameter Optimization Based on Small Molecule and Condensed Phase Macromolecular Target Data. *J. Comput. Chem.* **21**, 86–104 (2000).
51. Mackerell, A. D. & Banavali, N. K. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: II. Application to Molecular Dynamics Simulations of DNA and RNA in Solution. *J. Comput. Chem.* **21**, 105–120 (2000).
52. Bultinck, P., Van Alsenoy, C., Ayers, P. W. & Carbó-Dorca, R. Critical Analysis and Extension of the Hirshfeld Atoms in Molecules. *J. Chem. Phys.* **126**, 144111 (2007).
53. Van Damme, S., Bultinck, P. & Fias, S. Electrostatic Potentials from Self-Consistent Hirshfeld Atomic Charges. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 334–340 (2009).
54. Singh, U. C. & Kollman, P. A. An Approach to Computing Electrostatic Charges for Molecules. *J. Comput. Chem.* **5**, 129–145 (1984).
55. Tironi, I. G., Brunne, R. M. & Gunsteren, W. F. On the Relative Merits of Flexible versus Rigid Models for Use in Computer Simulations of Molecular Liquids. *Chem. Phys. Lett.* **250**, 19–24 (1996).
56. Tissandier, M. D. *et al.* The Proton's Absolute Aqueous Enthalpy and Gibbs Free Energy of Solvation from Cluster-Ion Solvation Data. *J. Phys. Chem. A* **102**, 7787–7794 (1998).
57. Ferrari, D. *et al.* Electron Transfer in Crystals of the Binary and ternary complexes of Methylamine Dehydrogenase with Amicyanin and Cytochrome c 551i as Detected by EPR Spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 231–237 (2004).
58. Li, H., Robertson, A. D. & Jensen, J. H. Very Fast Empirical Prediction and Rationalization of Protein pKa Values. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **61**, 704–721 (2005).
59. Bas, D. C., Rogers, D. M. & Jensen, J. H. Very Fast Prediction and Rationalization of pKa Values for Protein–Ligand Complexes. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **73**, 765–783 (2008).
60. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537 (2011).
61. Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 2284–2295 (2011).
62. Phillips, J. C. *et al.* Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).

## Bibliographie

63. Bishop, G. R. & Davidson, V. L. Catalytic Role of Monovalent Cations in the Mechanism of Proton Transfer which Gates an Interprotein Electron Transfer Reaction. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 13586–13592 (1997).
64. Gorren, A. C., de Vries, S. & Duine, J. A. Binding of Monovalent Cations to Methylamine Dehydrogenase in the Semiquinone State and its Effect on Electron Transfer. *Biochemistry (Mosc.)* **34**, 9748–9754 (1995).
65. Gorren, A. C. & Duine, J. A. The Effects of pH and Cations on the Spectral and Kinetic Properties of Methylamine Dehydrogenase from *Thiobacillus Versutus*. *Biochemistry (Mosc.)* **33**, 12202–12209 (1994).
66. Kuusk, V. & McIntire, W. S. Influence of Monovalent Cations on the Ultraviolet-visible Spectrum of Tryptophan Tryptophylquinone-containing Methylamine Dehydrogenase from *Bacterium W3A1*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26136–26143 (1994).
67. Sun, D. & Davidson, V. L. Re-Engineering Monovalent Cation Binding Sites of Methylamine Dehydrogenase: Effects on Spectral Properties and Gated Electron Transfer. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 12285–12291 (2001).
68. Datta, S. *et al.* Structure of a Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase with an Uncommon Redox Cofactor and Highly Unusual Crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14268–14273 (2001).
69. Comba, P. & Remenyi, R. A New Molecular Mechanics Force Field for the Oxidized Form of Blue Copper Proteins. *J. Comput. Chem.* **23**, 697–705 (2002).
70. De la Lande, A., Babcock, N. S., Řezáč, J., Sanders, B. C. & Salahub, D. R. Surface Residues Dynamically Organize Water Bridges to Enhance Electron Transfer between Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 11799–11804 (2010).
71. Lederer, F. Another Look at the Interaction between Mitochondrial Cytochrome c and Flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Eur. Biophys. J.* **40**, 1283–1299 (2011).
72. Diép Lê, K. H., Lederer, F. & Golinelli-Pimpaneau, B. Structural Evidence for the Functional Importance of the Heme Domain Mobility in Flavocytochrome b<sub>2</sub>. *J. Mol. Biol.* **400**, 518–530 (2010).
73. Cunane, L. M. *et al.* Crystallographic Study of the Recombinant Flavin-Binding Domain of Baker's Yeast Flavocytochrome b(2): Comparison with the Intact Wild-Type Enzyme. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 4264–4272 (2002).
74. Fitzpatrick, P. F. Substrate Dehydrogenation by Flavoproteins. *Acc. Chem. Res.* **34**, 299–307 (2001).
75. Fitzpatrick, P. F. Carbanion versus hydride transfer mechanisms in flavoprotein-catalyzed dehydrogenations. *Bioorganic Chem.* **32**, 125–139 (2004).
76. Urban, P. & Lederer, F. Inactivation of flavocytochrome b<sub>2</sub> with fluoropyruvate. *Eur. J. Biochem.* **173**, 155–162 (1988).
77. Gaume, B. *et al.* Mutation to Glutamine of Histidine 373, the Catalytic Base of Flavocytochrome b<sub>2</sub> (L-Lactate Dehydrogenase). *Biochimie* **77**, 621–630 (1995).
78. Tsai, C.-L., Gokulan, K., Sobrado, P., Sacchettini, J. C. & Fitzpatrick, P. F. Mechanistic and Structural Studies of H373Q Flavocytochrome b<sub>2</sub>: Effects of Mutating the Active Site Base. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 7844–7851 (2007).
79. Lederer, F. On the First Steps of Lactate Oxidation by Bakers' Yeast L-(+)-Lactate Dehydrogenase (Cytochrome b<sub>2</sub>). *Eur. J. Biochem.* **46**, 393–399 (1974).
80. Lederer, F., Belmouden, A. & Gondry, M. The Chemical Mechanism of Flavoprotein-Catalysed Alpha-Hydroxy Acid Dehydrogenation: a Mutational Analysis. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 77–83 (1996).
81. Pompon, D., Iwatsubo, M. & Lederer, F. Flavocytochrome b<sub>2</sub> (Baker's Yeast). *Eur. J. Biochem.* **104**, 479–488 (1980).
82. Sobrado, P., Daubner, S. C. & Fitzpatrick, P. F. Probing the Relative Timing of Hydrogen Abstraction Steps in the Flavocytochrome b<sub>2</sub> Reaction with Primary and Solvent Deuterium Isotope Effects and Mutant Enzymes. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 994–1001 (2001).
83. Urban, P. & Lederer, F. Intermolecular hydrogen transfer catalyzed by a flavodehydrogenase, bakers' yeast flavocytochrome b<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **260**, 11115–11122 (1985).



## Bibliographie

84. Dewanti, A. R. & Mitra, B. A Transient Intermediate in the Reaction Catalyzed by (S)-Mandelate Dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry (Mosc.)* **42**, 12893–12901 (2003).
85. Sobrado, P. & Fitzpatrick, P. F. Solvent and Primary Deuterium Isotope Effects Show That Lactate CH and OH Bond Cleavages Are Concerted in Y254F Flavocytochrome  $b_2$ , Consistent with a Hydride Transfer Mechanism. *Biochemistry (Mosc.)* **42**, 15208–15214 (2003).
86. Mowat, C. G. *et al.* Altered Substrate Specificity in Flavocytochrome  $b_2$ : Structural Insights into the Mechanism of L-Lactate Dehydrogenation. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 9519–9526 (2004).
87. Tabacchi, G. *et al.* L-Lactate Dehydrogenation in Flavocytochrome  $b_2$ . *FEBS J.* **276**, 2368–2380 (2009).
88. Xia, Z. & Mathews, F. S. Molecular Structure of Flavocytochrome  $b_2$  at 2.4 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **212**, 837–863 (1990).
89. Ferrer, S. *et al.* in *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* (ed. Christo Christov) **Volume 85**, 81–142 (Academic Press, 2011).
90. Field, M. J., Albe, M., Bret, C., Proust-De Martin, F. & Thomas, A. The Dynamo Library for Molecular Simulations using Hybrid Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potentials. *J. Comput. Chem.* **21**, 1088–1100 (2000).
91. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. & Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236 (1996).
92. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
93. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F. & Stewart, J. J. P. Development and Use of Quantum Mechanical Molecular Models. 76. AM1: a New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3902–3909 (1985).
94. Henkelman, G. & Jónsson, H. Improved Tangent Estimate in the Nudged Elastic Band method for Finding Minimum Energy Paths and Saddle Points. *J. Chem. Phys.* **113**, 9978 (2000).
95. Henkelman, G., Uberuaga, B. P. & Jónsson, H. A Climbing Image Nudged Elastic Band Method for Finding Saddle Points and Minimum Energy Paths. *J. Chem. Phys.* **113**, 9901 (2000).
96. Fukui, K. The Path of Chemical Reactions - the IRC Approach. *Acc. Chem. Res.* **14**, 363–368 (1981).
97. Truhlar, D. G. & Garrett, B. C. Variational Transition-State Theory. *Acc. Chem. Res.* **13**, 440–448 (1980).
98. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. Nonphysical Sampling Distributions in Monte Carlo Free-Energy Estimation: Umbrella Sampling. *J. Comput. Phys.* **23**, 187–199 (1977).
99. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. & Kollman, P. A. The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules. I. The Method. *J. Comput. Chem.* **13**, 1011–1021 (1992).
100. Zhao, Y. & Truhlar, D. G. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-class Functionals and 12 other Functionals. *Theor. Chem. Acc.* **120**, 215–241 (2008).
101. Petersson, G. A. *et al.* A Complete Basis Set Model Chemistry. I. The Total Energies of Closed-Shell Atoms and Hydrides of the First-Row Elements. *J. Chem. Phys.* **89**, 2193–2218 (1988).
102. Petersson, G. A. & Al-Laham, M. A. A Complete Basis Set Model Chemistry. II. Open-Shell Systems and the Total Energies of the First-Row Atoms. *J. Chem. Phys.* **94**, 6081–6090 (1991).
103. Frisch, M. J. *et al.* *Gaussian 09*. (Gaussian, Inc., 2009).
104. Ferrer, S. *et al.* A QM/MM Exploration of the Potential Energy Surface of Pyruvate to Lactate Transformation Catalyzed by LDH. Improving the Accuracy of Semiempirical Descriptions. *J. Chem. Theory Comput.* **1**, 750–761 (2005).
105. Ruiz-Pernía, J. J., Silla, E., Tuñón, I., Martí, S. & Moliner, V. Hybrid QM/MM Potentials of Mean Force with Interpolated Corrections. *J. Phys. Chem. B* **108**, 8427–8433 (2004).

## Bibliographie

106. Rouviere-Fourmy, N., Capeillere-Blandin, C. & Lederer, F. Role of Tyrosine 143 in Lactate Dehydrogenation by Flavocytochrome b<sub>2</sub>. Primary Kinetic Isotope Effect Studies with a Phenylalanine Mutant. *Biochemistry (Mosc.)* **33**, 798–806 (1994).
107. Miles, C. S. *et al.* Tyr-143 Facilitates Interdomain Electron Transfer in Flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Biochem J* **285**, 187–192 (1992).
108. Fleischmann, G., Lederer, F., Müller, F., Bacher, A. & Rüterjans, H. Flavin–Protein Interactions in Flavocytochrome b<sub>2</sub> as Studied by NMR after Reconstitution of the Enzyme with <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-Labelled Flavin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5156–5167 (2000).
109. Mowat, C. G. *et al.* Kinetic and Crystallographic Studies on the Active Site Arg289Lys Mutant of Flavocytochrome b<sub>2</sub> (Yeast L-Lactate Dehydrogenase). *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 3266–3275 (2000).
110. Gondry, M., Dubois, J., Terrier, M. & Lederer, F. The Catalytic Role of Tyrosine 254 in Flavocytochrome b<sub>2</sub> (L-Lactate Dehydrogenase from Baker's Yeast). *Eur. J. Biochem.* **268**, 4918–4927 (2001).
111. Dubois, J., Chapman, S. K., Mathews, F. S., Reid, G. A. & Lederer, F. Substitution of Tyr254 with Phe at the Active Site of Flavocytochrome b<sub>2</sub>: Consequences on Catalysis of Lactate Dehydrogenation. *Biochemistry (Mosc.)* **29**, 6393–6400 (1990).
112. Gondry, M. & Lederer, F. Functional Properties of the Histidine-Aspartate Ion Pair of Flavocytochrome b<sub>2</sub> (L-Lactate Dehydrogenase): Substitution of Asp282 with Asparagine. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 8587–8594 (1996).
113. Lederer, F. Extreme pK<sub>a</sub> Displacements at the Active Sites of FMN-Dependent  $\alpha$ -Hydroxy Acid-Oxidizing Enzymes. *Protein Sci.* **1**, 540–548 (1992).
114. Daff, S., Manson, F. D., Reid, G. A. & Chapman, S. K. Strategic Manipulation of the Substrate Specificity of *Saccharomyces Cerevisiae* Flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Biochem J* **301**, 829–834 (1994).
115. Sinclair, R., Reid, G. & Chapman, S. Re-Design of *Saccharomyces Cerevisiae* Flavocytochrome b<sub>2</sub>: Introduction of L-Mandelate Dehydrogenase Activity. *Biochem J* **333**, 117–120 (1998).
116. Ghrir, R. & Lederer, F. Study of a Zone Highly Sensitive to Proteases in Flavocytochrome b<sub>2</sub> from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **120**, 279–282 (1981).
117. Hammes-Schiffer, S. Comparison of Hydride, Hydrogen Atom, and Proton-Coupled Electron Transfer Reactions. *ChemPhysChem* **3**, 33–42 (2002).
118. Hammes-Schiffer, S. Proton-Coupled Electron Transfer: Classification Scheme and Guide to Theoretical Methods. *Energy Environ. Sci.* **5**, 7696 (2012).
119. Hammes-Schiffer, S. Catalytic Efficiency of Enzymes: A Theoretical Analysis. *Biochemistry (Mosc.)* **52**, 2012–2020 (2013).
120. Huynh, M. H. V. & Meyer, T. J. Proton-Coupled Electron Transfer. *Chem. Rev.* **107**, 5004–5064 (2007).
121. Nagel, Z. D. & Klinman, J. P. Update 1 of: Tunneling and Dynamics in Enzymatic Hydride Transfer. *Chem. Rev.* **110**, PR41–PR67 (2010).
122. Bhattacharyya, S., Ma, S., Stankovich, M. T., Truhlar, D. G. & Gao, J. Potential of Mean Force Calculation for the Proton and Hydride Transfer Reactions Catalyzed by Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase: Effect of Mutations on Enzyme Catalysis. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 16549–16562 (2005).
123. Cavalier, G. Role of Fluctuations in Quinone Reductase Hydride Transfer: a Combined Quantum Mechanics and Molecular Dynamics Study. in **851**, 1–15 (AIP, 2006).
124. Vardi-Kilshtain, A., Major, D. T., Kohen, A., Engel, H. & Doron, D. Hybrid Quantum and Classical Simulations of the Formate Dehydrogenase Catalyzed Hydride Transfer Reaction on an Accurate Semiempirical Potential Energy Surface. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 4786–4796 (2012).
125. Haines, B. E., Steussy, C. N., Stauffacher, C. V. & Wiest, O. Molecular Modeling of the Reaction Pathway and Hydride Transfer Reactions of HMG-CoA Reductase. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 7983–7995 (2012).

## Bibliographie

126. Breugst, M., Eschenmoser, A. & Houk, K. N. Theoretical Exploration of the Mechanism of Riboflavin Formation from 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine: Nucleophilic Catalysis, Hydride Transfer, Hydrogen Atom Transfer, or Nucleophilic Addition? *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 6658–6668 (2013).
127. Wang, Z., Ferrer, S., Moliner, V. & Kohen, A. QM/MM Calculations Suggest a Novel Intermediate Following the Proton Abstraction Catalyzed by Thymidylate Synthase. *Biochemistry (Mosc.)* **52**, 2348–2358 (2013).
128. Akyüz, M. A. & Erdem, S. S. Computational Modeling of the Direct Hydride Transfer Mechanism for the MAO Catalyzed Oxidation of Phenethylamine and Benzylamine: ONIOM (QM/QM) Calculations. *J. Neural Transm.* **120**, 937–945 (2013).
129. Ranaghan, K. E. & Mulholland, A. J. Computer Simulations of Quantum Tunnelling in Enzyme-Catalysed Hydrogen Transfer Reactions. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* **2**, 78–97 (2010).
130. Kong, Y. S. & Warshel, A. Linear Free Energy Relationships with Quantum Mechanical Corrections: Classical and Quantum Mechanical Rate Constants for Hydride Transfer between NAD<sup>+</sup> Analogs in Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6234–6242 (1995).
131. Kılıç, M. & Ensing, B. First and Second One-Electron Reduction of Lumiflavin in Water—A First Principles Molecular Dynamics Study. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3889–3899 (2013).
132. Karasulu, B., Patil, M. & Thiel, W. Amine Oxidation Mediated by Lysine-Specific Demethylase 1: Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Insights into Mechanism and Role of Lysine 661. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13400–13413 (2013).
133. Yu, T., Higashi, M., Cembran, A., Gao, J. & Truhlar, D. G. Concerted Hydrogen Atom and Electron Transfer Mechanism for Catalysis by Lysine-Specific Demethylase. *J. Phys. Chem. B* **117**, 8422–8429 (2013).
134. Mueller, R. M., North, M. A., Yang, C., Hati, S. & Bhattacharyya, S. Interplay of Flavin's Redox States and Protein Dynamics: An Insight from QM/MM Simulations of Dihyronicotinamide Riboside Quinone Oxidoreductase 2. *J. Phys. Chem. B* **115**, 3632–3641 (2011).
135. Nissen, M. S. *et al.* Crystal Structures of NADH:FMN Oxidoreductase (EmoB) at Different Stages of Catalysis. *J. Biol. Chem.* **283**, 28710–28720 (2008).
136. Tateyama, Y., Blumberger, J., Sprik, M. & Tavernelli, I. Density-Functional Molecular-Dynamics Study of the Redox Reactions of Two Anionic, Aqueous Transition-Metal Complexes. *J. Chem. Phys.* **122**, 234505 (2005).
137. Blumberger, J., Tavernelli, I., Klein, M. L. & Sprik, M. Diabatic Free Energy Curves and Coordination Fluctuations for the Aqueous Ag<sup>+</sup>/Ag<sup>2+</sup> Redox Couple: A Biased Born-Oppenheimer Molecular Dynamics Investigation. *J. Chem. Phys.* **124**, 064507 (2006).
138. Dederichs, P. H., Blügel, S., Zeller, R. & Akai, H. Ground States of Constrained Systems: Application to Cerium Impurities. *Phys. Rev. Lett.* **53**, 2512–2515 (1984).
139. Wu, Q. & Van Voorhis, T. Direct Optimization Method to Study Constrained Systems within Density-Functional Theory. *Phys. Rev. A* **72**, (2005).
140. Becke, A. D. & Edgecombe, K. E. A simple Measure of Electron Localization in Atomic and Molecular Systems. *J. Chem. Phys.* **92**, 5397– (1990).
141. Silvi, B. & Savin, A. Classification of Chemical Bonds Based on Topological Analysis of Electron Localization Functions. *Nature* **371**, 683–686 (1994).
142. Chaudret, R., Cisneros, G. A., Parisel, O. & Piquemal, J.-P. Unraveling Low-Barrier Hydrogen Bonds in Complex Systems with a Simple Quantum Topological Criterion. *Chem. - Eur. J.* **17**, 2833–2837 (2011).
143. Berski, S., Latajka, Z., Silvi, B. & Lundell, J. Electron localization function studies of the nature of binding in neutral rare-gas containing hydrides: HKrCN, HKrNC, HXeCN, HXeNC, HXeOH, and HXeSH. *J. Chem. Phys.* **114**, 4349 (2001).
144. Chesnut, D. B. A Topological Study of Bonding in the Al<sub>2</sub>H<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>H<sub>4</sub> Hydrides. *Chem. Phys.* **321**, 269–276 (2006).
145. Chesnut, D. B. An Electron Localization Function Study of the Lone Pair. *J. Phys. Chem. A* **104**, 11644–11650 (2000).

## Bibliographie

146. Lundell, J., Berski, S. & Latajka, Z. Dihydrogen-Bonded Complexes of Xenon Dihydride with Water: Ab Initio Calculations and Topological Analysis of Electron Localisation Function (ELF). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 5521–5527 (2000).
147. Piquemal, J.-P. *et al.* What can be learnt on biologically relevant systems from the topological analysis of the electron localization function? *Int. J. Quantum Chem.* **108**, 1951–1969 (2008).
148. Chaudret, R., Piquemal, J.-P. & Andrés Cisneros, G. Correlation between Electron Localization and Metal Ion Mutagenicity in DNA Synthesis from QM/MM Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 11239 (2011).
149. De Courcy, B. *et al.* Understanding Selectivity of Hard and Soft Metal Cations within Biological Systems Using the Subvalence Concept. 1. Application to Blood Coagulation: Direct Cation–Protein Electronic Effects versus Indirect Interactions through Water Networks. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 1048–1063 (2010).
150. Fang, D., Chaudret, R., Piquemal, J.-P. & Cisneros, G. A. Toward a Deeper Understanding of Enzyme Reactions Using the Coupled ELF/NCI Analysis: Application to DNA Repair Enzymes. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 2156–2160 (2013).
151. Perdew, J. P., Burke, K. & Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3865–3868 (1996).
152. Bader, R. F. W. in *At. Mol. Quantum Theory* (1990).
153. Noury, S., Krokidis, X., Fuster, F. & Silvi, B. Computational Tools for the Electron Localization Function Topological Analysis. *Comput. Chem.* **23**, 597–604 (1999).
154. Marcus, R. A. On the theory of Electron-Transfer Reactions. VI. Unified treatment for Homogeneous and Electrode Reaction. *J. Chem. Phys.* **43**, 679–700 (1965).
155. Marcus, R. A. & Sutin, N. Electron Transfers in Chemistry and Biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Bioenerg.* **811**, 265–322 (1985).
156. Warshel, A. Dynamics of Reactions in Polar Solvents. Semiclassical Trajectory Studies of Electron-Transfer and Proton-Transfer Reactions. *J. Phys. Chem.* **86**, 2218–2224 (1982).
157. Hwang, J. K. & Warshel, A. Microscopic Examination of Free-Energy Relationships for Electron Transfer in Polar Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 715–720 (1987).
158. Tachiya, M. Relation Between the Electron-Transfer Rate and the Free Energy Change of Reaction. *J. Phys. Chem.* **93**, 7050–7052 (1989).
159. Tachiya, M. Generalization of the Marcus Equation for the Electron-Transfer Rate. *J. Phys. Chem.* **97**, 5911–5916 (1993).
160. Wu, Q. & Van Voorhis, T. Extracting Electron Transfer Coupling Elements from Constrained Density Functional Theory. *J. Chem. Phys.* **125**, 164105 (2006).
161. Lans, I. *et al.* Theoretical Study of the Mechanism of the Hydride Transfer between Ferredoxin–NADP<sup>+</sup> Reductase and NADP<sup>+</sup>: The Role of Tyr303. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20544–20553 (2012).

## Annexe A. Acides Aminés

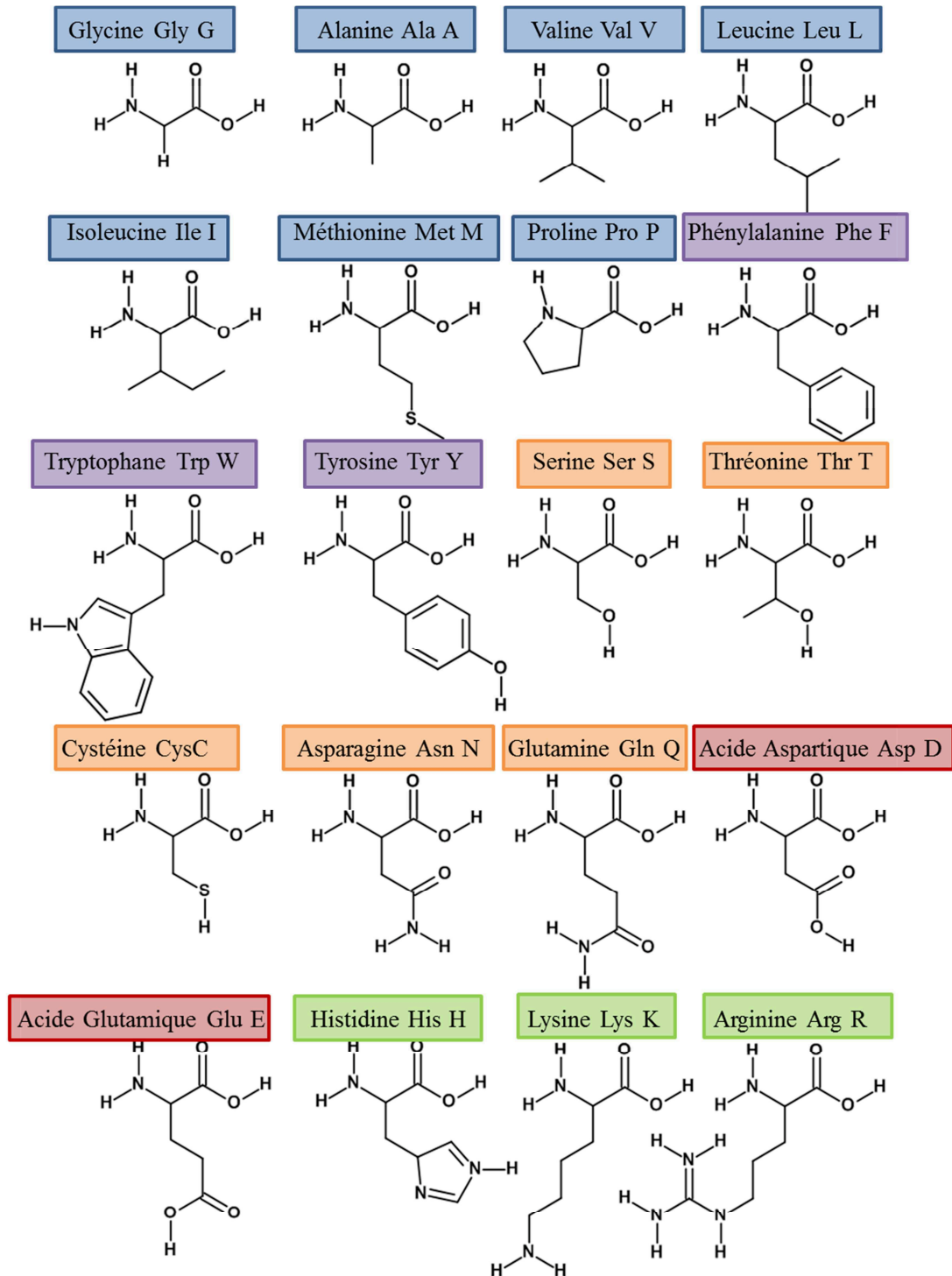


Figure 87 : les vingt acides aminés naturels. Classification : apolaires (bleu), aromatiques (violet), polaires (orange), chargés négativement (rouge), chargés positivement (vert).