



Mécanisme moléculaire des NO-synthases bactériennes

Marine Weisslocker-Schaetzel

► To cite this version:

Marine Weisslocker-Schaetzel. Mécanisme moléculaire des NO-synthases bactériennes. Chimie inorganique. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS399 . tel-01519355

HAL Id: tel-01519355

<https://theses.hal.science/tel-01519355>

Submitted on 6 May 2017

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.

NNT : 2016SACLS399

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°571
Sciences Chimiques : Molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité : Chimie

Par

Marine Weisslocker--Schaetzel

Mécanisme moléculaire des NO-synthases bactériennes

Soutenue à Orsay, le 18 novembre 2016 :

Composition du Jury :

M. Frédéric Banse	Professeur, Université Paris Sud	Président
M. Bruno Guigliarelli	Professeur, Aix-Marseille Université	Rapporteur
M. Jean-Luc Boucher	Chercheur CNRS DR, Université Paris Descartes	Rapporteur
Mme. Christelle Hureau	Chercheuse CNRS CR, LCC Toulouse	Examinatrice
M. Pierre Dorlet	Chercheur CNRS DR, CEA Saclay	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens en premier lieu à adresser mes remerciements aux membres de mon jury : Bruno Guigliarelli, Jean-Luc Boucher, Frédéric Banse et Christelle Hureau. Merci de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse, je vous souhaite une bonne lecture !

Je remercie la Direction des Sciences du Vivant du CEA, et plus particulièrement les responsables du programme Irtélis pour m'avoir accordé une bourse et m'avoir ainsi permis de réaliser ce projet.

Mes remerciements vont également à mon directeur de thèse, Pierre Dorlet, qui m'a encadrée et soutenue au cours de ces trois ans. Merci pour ton aide, ta patience et ton implication dans ce projet. Merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions et de m'avoir initiée aux joies de la recherche et de la spectroscopie RPE.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont contribué à ma formation et à la réalisation de ce projet : Jérôme Santolini pour son expertise et ses discussions passionnantes sur les NOS et leurs mystères, Annie Barrand-Frelet pour son encadrement et ses conseils en biologie moléculaire, et François André pour m'avoir fait découvrir la bio-informatique et l'étendue de ses possibilités. Je remercie également Medhi Lembrouk pour son aide technique et sa bonne humeur ainsi que Zeineb Si Chaib qui a mis en place les protocoles de dynamique moléculaire.

Merci à Brian R. Crane et Dennis J. Stuehr de nous avoir généreusement fourni les plasmides nécessaires à la production des NOS de *Deinococcus radiodurans* et *Geobacillus stearothermophilus* et de leurs partenaires, et des mutants iNOS V346I et bsNOS I224V.

J'adresse mes remerciements à tous les membres passés et présents du LSOD, pour les moments agréables passés ensemble, les discussions scientifiques et les pic-nics (à l'intérieur...) : Annie, Benjamin, Bosco, Déborah, Dorinne, Fares, François, Gabriella, Jérôme, Laura, Marius, Mehdi, Nabila, Pierre, Rym, Sam, Sana, Shaima, Stéphane, Zeineb. Merci également à ceux qui m'ont précédée et en particulier Amandine et Albane : merci d'avoir apporté un si grand soin à la rédaction de vos protocoles expérimentaux qui m'ont été d'une grande aide.

Je remercie aussi l'ensemble du SB2SM et en particulier Ghada Ajlani pour le prêt de ses étuves et de sa table UV, Hervé Bottin pour le prêt de la boîte à gants et Thibault Tubiana pour son tutoriel d'installation de PyMol.

Merci à tous les doctorants du 532/528 que j'ai pu côtoyer de près ou de loin durant mes trois années de thèse : Adrien, Anaïs, Catherine, Céline, Denis, Denise, Esra, Hassina, Kaouter, Kathleen, Laura, Liz, Margaux, Pierre, Qian, Sana, Stéphanie, Than, Thibault et Thomas. Je présente d'avance mes excuses à ceux que j'aurais pu oublier.

Je remercie également mes « camarades de promo », Théo, Clément et Catherine, pour la balade à vélo et les fous rires à Porquerolles et tous les membres de l'iBithèse.

Pour tous les bons moments passés ensemble au cours de ces trois dernières années, voire beaucoup plus pour certains, je remercie la FokeTeam : Christophe, Jiadong, Isa, Julie, Paul, Alice, Ben. Merci pour toutes ces soirées à jouer et à refaire le monde. Merci aussi aux survivantes de la prépa, Marion, Fiona, Laura et Laura pour les colles et les brunchs mémorables et aux « filles », Oriana, Julie et Emilie pour les spas/afterworks/débrief de vie sentimentale !!!!

Merci à tous mes co-improvisateurs, je ne vais citer personne de peur d'en oublier et de faire des jaloux mais vous avez tous contribué à faire de ce cours un vrai moment de détente et de défoulement total qui m'a fait le plus grand bien ces deux dernières années.

Pour leur présence et leur soutien, je remercie ma famille : mes grands-parents, mes parents, ma sœur Lucie et mon frère Eliott. Merci pour tout ce que vous avez fait, merci de m'avoir donné les moyens d'atteindre mes objectifs (même si je n'ai pas encore tout à fait sauvé le monde...) je vous suis reconnaissante et je suis très heureuse de pouvoir partager ce moment avec vous

Merci d'avoir accepté de relire ce manuscrit et d'entrer ainsi, un peu malgré vous, dans l'univers merveilleux des NO-synthèses !

Enfin, un grand merci à Simon pour avoir vécu cette thèse et tant d'autres choses avec moi. Merci d'avoir autant assuré ces derniers mois, d'avoir géré l'intendance et mes pics de panique, mais surtout, merci d'être là, de me soutenir, de me faire rire et de tuer toutes les araignées qui croisent mon chemin depuis bientôt dix ans et pour les soixante-douze prochaines années.

Liste des abréviations

5C	pentacoordonné
6C	hexacoordonné
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
tARN ^{Trp}	ARN de transfert spécifique du tryptophane
ATP	adénosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
BS	bas spin
BSA	albumine de sérum bovin
CaM	calmoduline
cGMP	guanosine monophosphate cyclique
Cit	L-citrulline
CT	extension C-terminale des NOS de mammifères
δ-Ala	acide δ-aminolévulinique
DL50	dose létale médiane
DO	densité optique
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
DTT	dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène-diamine-tétra-acétique
ESEEM	<i>Electron Spin Echo Enveloppe Modulation</i>
ESH	électrode standard à hydrogène
FAD	flavine adénine dinucléotide
Fe ^{II} NO	complexe hème-NO à 7 électrons {FeNO} ⁷
Fe ^{III} NO	complexe hème-NO à 6 électrons {FeNO} ⁶
Fe ^{II} O ₂	sauf précision, désigne indifféremment les états Fe ^{II} O ₂ ou Fe ^{III} O ₂ [*]
FLDR	flavodoxine réductase issue d' <i>Escherichia coli</i>
FMN	flavine mononucléotide
GTP	guanosine triphosphate
H ₂ B	7,8-dihydrobioptérine
H ₄ B	5,6,7,8-(6R)-tétrahydrobioptérine
H ₄ B ⁺⁺	radical cation formé par abstraction d'un électron à partir de H ₄ B
H ₅ B ⁺	forme protonée de H ₄ B
H ₄ F	5,6,7,8-(6S)-tétrahydrofolate
His-tag	étiquette d'affinité composée de 6 résidus histidine
hq	hydroquinone
HS	haut spin
HYSCORE	Hyperfine Sub-level CORrElation
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactoside
KPi	phosphate de potassium inorganique
LB	<i>Luria Broth</i>
MRSA	souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méthicilline
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NAME ou L-NAME	nitro-L-arginine méthyle ester
NED	N-éthylène-diamine
NMMA	N-monométhyle-L-arginine
NOHA	N ^ω -hydroxy-L-arginine
NOHA ^{•+}	radical cation formé par abstraction d'un électron à partir du NOHA
<i>nos</i>	gène codant pour une NOS
Δ <i>nos</i>	mutant de délétion dans lequel le gène <i>nos</i> a été supprimé
baΔ <i>nos</i>	mutant Δ <i>nos</i> de <i>Bacillus anthracis</i>
bsΔ <i>nos</i>	mutant Δ <i>nos</i> de <i>Bacillus subtilis</i>
deiΔ <i>nos</i>	mutant Δ <i>nos</i> de <i>Deinococcus radiodurans</i>
saΔ <i>nos</i>	mutant Δ <i>nos</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>
stΔ <i>nos</i>	mutant Δ <i>nos</i> de <i>Streptomyces turgidiscabies</i>
NOS	NO-synthase
baNOS	NO-synthase issue de <i>Bacillus anthracis</i>
bacNOS	NO-synthase bactérienne
bsNOS	NO-synthase issue de <i>Bacillus subtilis</i>
bsNOS I224V	mutant de bsNOS où l'isoleucine 224 est remplacée par une valine
deiNOS	NO-synthase issue de <i>Deinococcus radiodurans</i>
eNOS	NO-synthase endothéliale
gsNOS	NO-synthase issue de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
iNOS	NO-synthase inductible
iNOS V346I	mutant de iNOS _{soxy} murine où la valine 346 est remplacée par une isoleucine
mNOS	NO-synthase de mammifère
nNOS	NO-synthase neuronale
otNOS	NO-synthase issue de <i>Ostreococcus tauri</i>
saNOS	NO-synthase issue de <i>Staphylococcus aureus</i>
stNOS	NO-synthase issue de <i>Streptomyces turgidiscabies</i>
NOS-LP	NOS-like protein, homologue de NOS de mammifère
NOS _{oxy}	domaine oxygénase de NOS
NOS _{red}	domaine réductase de NOS
P450	cytochrome P450
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PKG	protéine kinase G
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
QMEAN	<i>Quantitative Model Energy ANalysis</i>
QM/MM	<i>Quantum Mechanics/Molecular Mechanics</i>
RNOS	espèces réactives de l'azote et de l'oxygène
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RPE	résonance paramagnétique électronique
SDS	dodécylsulfate de sodium
SOD	superoxyde dismutase
sq	semi-quinone
TB	<i>Terrific Broth</i>
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
TrpRSI	Tryptophane-ARN-synthétase I
TrpRSII	Tryptophane-ARN-synthétase II

UV	rayonnement ultra-violet
WT	<i>wild-type</i> , type sauvage d'une protéine
ZFS	<i>zero-field splitting</i> , éclatement à champ nul

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des abréviations	7
Introduction	21
Chapitre I NO-synthases et NOS-like proteins.....	25
1. NO-synthases de mammifères.....	27
1.1. Rôles du monoxyde d'azote	27
1.1.1. Signalisation	27
1.1.2. Défense immunitaire	28
1.1.3. Processus pathologiques.....	29
1.2. Structure des NOS de mammifères	31
1.2.1. Protéine multi-domaines.....	31
1.2.2. Domaine oxygénase.....	32
1.2.3. Domaine réductase	34
1.2.4. Enzyme entière	35
1.3. Mécanisme catalytique	37
1.3.1. 1 ^{ère} étape : hydroxylation de l'arginine.....	37
1.3.2. 2 ^{ème} étape : oxydation du NOHA.....	39
1.3.3. Transfert d'électron inter-domaine.....	41
1.3.4. Découplage	43
1.4. Régulation de la production de NO [*]	44
1.4.1. Cas de la NOS inductible	44
1.4.2. Cas des NOS constitutives.....	45
1.4.3. Cofacteur H ₄ B et dimérisation.....	46
2. NOS-like proteins bactériennes.....	47
2.1. Découverte des NOS-LP	47
2.1.1. NO-synthases eucaryotes.....	47
2.1.2. NOS-LP procaryotes	48
2.2. Structure des NOS bactériennes	49
2.2.1. Caractéristiques générales	49
2.2.2. Site actif et fixation du substrat	50

2.2.3.	Site de fixation et nature du cofacteur	51
2.2.4.	Stabilité du dimère	53
2.3.	Mécanisme catalytique	55
2.3.1.	1 ^{ère} étape : identique aux mNOS	55
2.3.2.	2 ^{ème} étape : un nouveau mécanisme ?	56
2.3.3.	Réduction de l'hème et partenaire(s ?) redox	57
2.4.	Fonctions <i>in vivo</i>	59
2.4.1.	Production de monoxyde d'azote ?	59
2.4.2.	Réactions de nitration	60
2.4.3.	Virulence et pathogénicité	62
2.4.4.	Résistance au stress	62
2.4.5.	Signalisation intercellulaire	65
2.4.6.	Conclusion	66
3.	Objectifs de cette étude	68

Chapitre II Partie expérimentale.....71

1.	Biologie moléculaire	73
1.1.	Transformation des bactéries pour la production d'ADN	73
1.2.	Production et purification de l'ADN	74
1.3.	Digestion enzymatique et chromatographie sur gel d'agarose	74
1.4.	Vérification de la séquence	75
1.5.	Transformation des bactéries pour la production de protéines	75
2.	Production de protéines	76
2.1.	Production de la NOS de <i>Deinococcus radiodurans</i>	76
2.1.1.	Expression de deiNOS seule	76
2.1.2.	Co-expression avec la tryptophanyl-ARN-synthétase II	77
2.2.	Production de la NOS de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	78
2.3.	Production du mutant I224V de la NOS de <i>Bacillus subtilis</i>	79
2.4.	Production du mutant V346I du domaine oxygénase de la NOS inducible murine	79

3. Tests d'activité enzymatique	80
3.1. Test de Griess – <i>Peroxide shunt</i>	80
3.1.1. Principe du test	80
3.1.2. Etalonnage	80
3.1.3. Protocole expérimental	81
3.1.4. Traitement et analyse des données	82
3.2. Cycle réel – <i>Single turnover</i>	82
3.2.1. Principe du test	82
3.2.2. Mise en place expérimentale	82
3.2.3. Traitement des données	83
4. Electrochimie	84
4.1. Voltampérométrie cyclique	84
4.1.1. Mesure du potentiel de l'électrode de référence	84
4.1.2. Mesure des potentiels des médiateurs	84
4.2. Mesure du potentiel de l'hème	86
4.2.1. Principe de la méthode	86
4.2.2. Choix des médiateurs	86
4.2.3. Mise en place expérimentale	86
4.2.4. Traitement et analyse des résultats	88
5. Préparation des complexes hémiques.....	89
5.1. Préparation de la NOS à l'état Fe^{III}	89
5.2. Préparation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$	89
5.3. Préparation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$	89
6. Spectroscopies.....	91
6.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible- Test « P450 »	91
6.1.1. Suivi de la production de protéine	91
6.1.2. Contrôle des fractions purifiées	91
6.2. Spectroscopie de résonnance paramagnétique électronique (RPE)	92
6.2.1. Principe général	92
6.2.2. Cas du fer	93
6.2.3. Eclatement à champ nul – <i>Zero field splitting</i> (ZFS)	94
6.2.4. Couplage hyperfin	95
6.2.5. RPE impulsionnelle	96
6.2.6. Conditions expérimentales	97

6.2.7.	Simulation	97
7.	Techniques de cinétiques rapides	98
7.1.	Suivi de la réaction par cinétique en flux arrêté – <i>Stopped-flow</i>	98
7.1.1.	Principe.....	98
7.1.2.	Préparation de la protéine	99
7.1.3.	Préparation de l'appareil et enregistrement des données.....	99
7.1.4.	Exploitation des résultats.....	100
7.2.	Piégeage du radical ptérine – <i>Rapid freeze-quench</i>	101
7.2.1.	Principe.....	101
7.2.2.	Préparation de la protéine	102
7.2.3.	Préparation de l'appareil et récupération des échantillons	102
8.	Bio-informatique	104
8.1.	Construction d'une structure de deINOS par homologie	104
8.1.1.	Choix des modèles.....	104
8.1.2.	Construction du monomère	105
8.1.3.	Construction du dimère	105
8.1.4.	Génération de structures multi-modèles	105
8.1.5.	Classement des structures obtenues.....	106
8.2.	Dynamique moléculaire	107
8.2.1.	Choix du champ de force.....	107
8.2.2.	Paramétrage des ligands	107
8.2.3.	Procédure de dynamique moléculaire.....	108
8.2.4.	Analyse des résultats	109

Chapitre III Substitution Val/Ile – Influence de l'environnement distal.....111

1.	Introduction	113
2.	Effets structuraux et électroniques.....	117
2.1.	Equilibre haut-spin/ bas-spin du Fe ^{III}	117
2.1.1.	En absence de substrat et de cofacteur	117
2.1.2.	Influence du H ₄ B seul.....	120
2.1.3.	Influence du substrat.....	122
2.1.4.	Conclusion.....	124

2.2.	Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$	125
2.3.	Potentiel de l'hème	126
2.4.	Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$	127
2.4.1.	En présence de H_4B seul.....	128
2.4.2.	En présence de substrat et de H_4B	130
2.4.3.	En présence de citrulline et H_4B	132
2.4.4.	Conclusion.....	134
2.5.	Conclusion	135
3.	Influence sur le cycle catalytique	136
3.1.	Hydroxylation de l'arginine.....	136
3.1.1.	Intermédiaires réactionnels observés.....	136
3.1.2.	Fixation de l'oxygène	138
3.1.3.	Stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	139
3.1.4.	Piégeage et caractérisation du radical H_4B^{+}	140
3.2.	Oxydation du NOHA.....	143
3.2.1.	Intermédiaires réactionnels observés.....	143
3.2.2.	Fixation de l'oxygène et libération du NO^*	145
3.2.3.	Stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	147
3.2.4.	Piégeage et caractérisation du radical H_4B^{+}	147
3.3.	Influence de la nature du cofacteur.....	151
3.3.1.	Hydroxylation de l'arginine	151
3.3.2.	Oxydation du NOHA.....	153
3.4.	Conclusion	154
4.	Conclusion.....	156

Chapitre IV Etude spectroscopique et cinétique d'une NOS bactérienne originale : deiNOS.....157

1.	Introduction	159
2.	Caractérisation	161
2.1.	L'état Fe^{III}	161
2.1.1.	En absence de substrat et cofacteur	161
2.1.2.	Conversion en Fe^{III} haut-spin	162

2.1.3.	Influence des substrats- Cas de la citrulline	163
2.1.4.	Influence de la nature du cofacteur - Cas du tryptophane	165
2.2.	Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$	166
2.3.	Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$	167
2.3.1.	Influence des substrats - Cas de la citrulline	168
2.3.2.	Influence de la nature du cofacteur - Cas du tryptophane	170
2.3.3.	Etude de l'espèce axiale	172
2.4.	Conclusion	179
3.	Activité.....	180
3.1.	Production de nitrites.....	180
3.1.1.	<i>Peroxide shunt</i>	180
3.1.2.	<i>Single turnover</i> en présence de dioxygène	182
3.2.	Hydroxylation de l'arginine.....	183
3.2.1.	Intermédiaires catalytiques observés	183
3.2.2.	Effets de la nature du cofacteur	184
3.2.3.	Rôle et influence du cofacteur	190
3.3.	Oxydation du NOHA.....	191
3.3.1.	Réaction en présence de H_4B	191
3.3.2.	Réaction en présence de H_4F	193
3.3.3.	Rôle et influence du cofacteur	194
3.4.	Conclusion	196
4.	Structure tridimensionnelle.....	198
4.1.	Construction de la structure	198
4.2.	Dynamique moléculaire.....	201
4.2.1.	Stabilité du dimère en absence de cofacteur.....	201
4.2.2.	Evolution en présence du cofacteur H_4F	205
4.3.	Conclusion	213
5.	Conclusion.....	214

Chapitre V Etude complémentaire de deux NOS-like proteins issues de *Geobacillus stearothermophilus* et *Ostreococcus tauri*215

1. Caractérisation d'une NOS bactérienne thermostable	217
1.1. Introduction	217
1.2. Etude spectroscopique	219
1.2.1. Etat natif Fe ^{III}	219
1.2.2. Complexe Fe ^{II} CO	224
1.2.3. Complexe Fe ^{II} NO	225
1.2.4. Conclusion.....	231
1.3. Etude cinétique	232
1.3.1. Hydroxylation de l'arginine	232
1.3.2. Oxydation du NOHA.....	234
1.3.3. Réactions en présence d'une ptérine oxydée.....	237
1.3.4. Conclusion.....	238
1.4. Conclusion	239
2. Etude partielle d'une NOS de plante.....	240
2.1. Introduction	240
2.2. Caractérisation	241
2.2.1. Etat natif Fe ^{III}	241
2.2.2. Complexe Fe ^{II} CO	244
2.2.3. Complexe Fe ^{II} NO	245
2.2.4. Conclusion.....	246
2.3. Etude cinétique	247
2.3.1. Hydroxylation de l'arginine	247
2.3.2. Oxydation du NOHA.....	249
2.3.3. Conclusion.....	251
2.4. Conclusion	252
Conclusion	253

Bibliographie	257
Annexe 1 Alignement et script Python utilisés pour la construction de la structure de deiNOS	273
Annexe 2 Paramètres de l'hème et de H₄F utilisés pour les calculs de dynamique moléculaire	279
Annexe 3 Spectres HYSCORE bande Q des complexes Fe^{II}NO de deiNOS	289
Annexe 4 Suivi des variations d'énergie, de RMSD, de RMSF et de température au cours des dynamiques moléculaires.....	295
Annexe 5 Revisiting the Val/Ile mutation in mammalian and bacterial NO-Synthases: a spectroscopic and kinetic study	299
Annexe 6 The very first plant NOS-like protein is a genuine NO synthase	321

Introduction

Le monoxyde d'azote (NO[•]) est une petite molécule qui diffuse facilement à travers les membranes biologique[1]. Elle est, de plus, extrêmement réactive par sa nature radicalaire. Elle a donc longtemps été considérée uniquement comme un produit toxique pour les organismes vivants. Cependant, il a été établi à partir de 1987 que les cellules endothéliales de mammifères étaient capables de produire un messenger intercellulaire à partir de L-arginine : le monoxyde d'azote [2-5]. Cette découverte a été récompensée par un Prix Nobel de physiologie ou médecine attribué à Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad en 1998. Elle fut rapidement suivie, en 1989, de la description des enzymes responsables de la production de NO[•] qui ont tout naturellement été baptisées NO-synthases[6-12]. La première purification[13] puis le premier clonage[14] d'une NO-synthase (NOS) ont été réalisés en 1990 et 1991, respectivement.

Les NOS sont des flavohémoprotéines composées d'un domaine oxygénase qui contient le site actif et lie l'hème, le substrat L-arginine et le cofacteur redox essentiel tétrahydrobioptérine (H₄B), et d'un domaine réductase qui lie les cofacteurs flavine adénine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN) ainsi que le co-substrat nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) ; ces deux domaines sont liés par un peptide qui comporte un site de fixation pour la calmoduline[13, 15, 16]. Les NOS catalysent l'oxydation en deux étapes de la L-arginine en N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) puis en L-citrulline et NO[•]. Cette réaction nécessite 1,5 équivalent de NADPH et 2 équivalents de dioxygène[17].

Plus récemment, des homologues de NOS ont été identifiées dans tous les règnes du vivants, et en particulier chez de nombreuses bactéries, majoritairement Gram positives[18, 19]. Ces NOS bactériennes (bacNOS) étant plus robustes et plus faciles à manipuler, elles ont alors été utilisées comme modèle pour l'étude des NOS de mammifères (mNOS). En effet, elles catalysent la même réaction et le site actif et la structure tridimensionnelle sont extrêmement bien conservés entre mNOS et bacNOS[20-24]. Cependant, de nombreuses différences existent entre ces deux familles d'enzymes qui remettent en question l'utilisation des bacNOS comme modèles des mNOS.

Tout d'abord, les bacNOS ne possèdent pas de domaine réductase fusionné et on ne connaît pas actuellement la nature de leur(s) partenaire(s) redox *in vivo*[25, 26]. De plus, leur production de NO[•] *in vitro* est très inférieure à celle des mNOS[22, 24, 27-29] et certaines bactéries possédant une NOS ne peuvent réaliser la biosynthèse du cofacteur essentiel H₄B[30]. Enfin, des différences de comportement durant la deuxième étape du cycle catalytique ont été mises en évidence qui suggèrent que mNOS et bacNOS ne suivraient pas le même mécanisme moléculaire[31].

Ce manuscrit propose une étude de différentes bacNOS afin de confirmer et de mieux comprendre ces différences de comportement et de pouvoir proposer un mécanisme catalytique pour ces enzymes.

Dans un premier temps, on s'est intéressé à l'origine de la faible production de NO[•] des bacNOS. L'unique différence conservée au sein du site actif entre mNOS et bacNOS étant le remplacement d'une valine (V346 chez la NOS inductible murine) par une isoleucine (I224 chez la NOS de *Bacillus subtilis*)[27], on a donc produit les mutants complémentaires V346I de la NOS inductible murine et I224V de la NOS de *Bacillus subtilis*. Ces mutants ont été caractérisés par spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE ; on a également étudié leur mécanisme catalytique par une méthode de cinétique rapide en flux arrêté (*stopped-flow*) et par piégeage d'intermédiaires réactionnels à temps très courts (*freeze-quench*).

Afin de mieux comprendre le mécanisme catalytique des mNOS et en particulier le rôle du cofacteur, on s'est ensuite intéressé à deux NOS bactériennes issues d'organismes qui n'ont pas la machinerie nécessaire à la biosynthèse du cofacteur H₄B : *Deinococcus radiodurans* (deiNOS) et *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS)[30, 32]. Le tétrahydrofolate H₄F a été proposé comme cofacteur pour ces enzymes[28]. On a donc caractérisé ces enzymes et étudié leur mécanisme catalytique en présence de H₄F. On a aussi utilisé une ptérine oxydée inactive d'un point de vue redox pour déterminer l'implication du cofacteur dans les processus de transfert d'électron nécessaires à l'activation de l'oxygène. Dans le cas de deiNOS, on a également travaillé en présence de H₄B, pour comparaison avec les mNOS, et de tryptophane puisque une tryptophanyl-ARN-synthétase (TrpRSII) pourrait être son partenaire *in vivo*[33, 34].

Enfin, ce manuscrit présente une étude spectroscopique et cinétique de la première NOS de plante, issue de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri*.

Chapitre I

NO-synthases et *NOS-like proteins*

1. NO-synthases de mammifères

1.1. Rôles du monoxyde d'azote

1.1.1. Signalisation

Par sa petite taille et sa lipophilie, le monoxyde d'azote diffuse assez librement à travers les membranes biologiques[1]; il est donc parfaitement adapté à la signalisation cellulaire. Chez les mammifères, il est produit par des enzymes appelées NO-synthases, dont il existe trois isoformes - endothéliale, neuronale et inducible - qui diffèrent par leur séquence, leurs fonctions et leurs localisations au sein de l'organisme[35].

L'une des principales fonctions de la NOS endothéliale (eNOS) est la régulation de la pression artérielle[36]. Cette fonction s'exerce *via* l'interaction du NO[•] avec la guanylate cyclase qui induit la production de cGMP et l'activation de la protéine kinase G (PKG), responsable de la relaxation des fibres musculaires lisses[37, 38]. Cette cascade de signalisation induit donc une vasodilatation et une diminution de la pression artérielle. L'activation de la PKG a, de plus, un effet antiprolifératif sur les cellules constituant les parois des vaisseaux sanguins. L'effet antiprolifératif du monoxyde d'azote s'exerce également *via* la dégradation de la cycline A, une enzyme impliquée dans la régulation du cycle cellulaire[37]. Le NO[•] joue aussi un rôle anti-apoptotique au sein des parois vasculaires *via* la nitrosylation inhibitrice de deux protéines pro-apoptotiques, caspase-3 et caspase-8[39] et il est impliqué dans la modulation des canaux ioniques, et donc le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire, *via* des réactions de nitrosation[37].

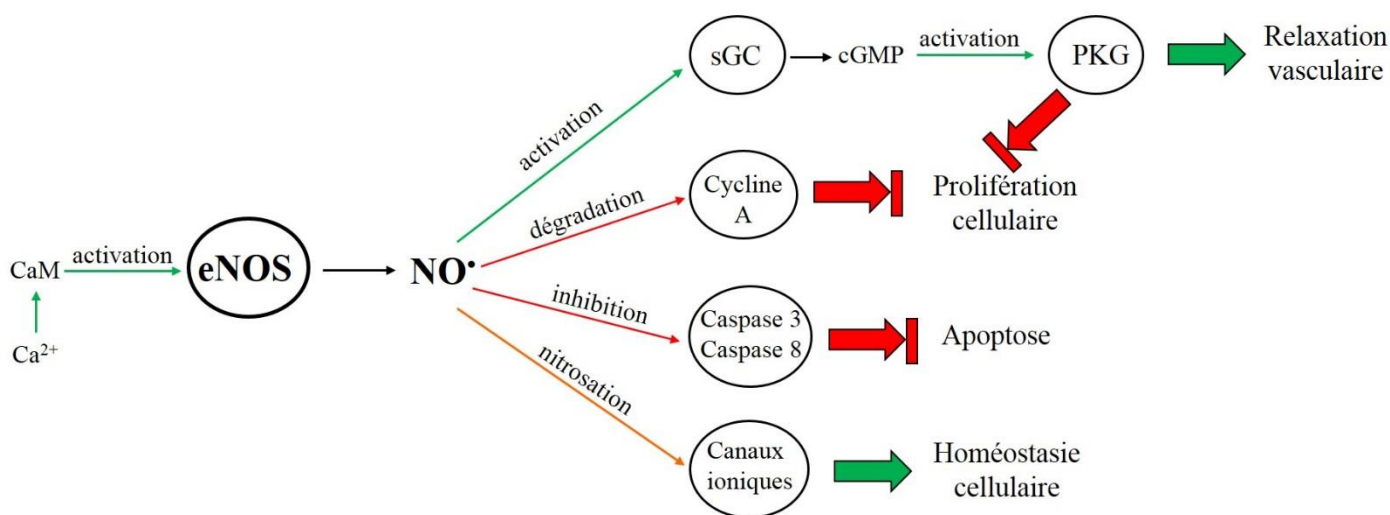


Figure 1- Voies de signalisation impliquant la NOS endothéliale.

La NOS neuronale (nNOS) est localisée, comme son nom l'indique, au niveau des neurones où le NO[•] produit va, comme pour eNOS, activer la production de cGMP par la guanylate cyclase[40]. C'est ce messager secondaire qui va permettre, notamment, la régulation de la plasticité synaptique et de la neurotransmission. Le monoxyde d'azote produit par la NOS neuronale peut également exercer sa fonction de molécule signal *via* des réactions de nitrosylation[41]. Les variants d'épissage de nNOS exprimés dans les muscles artériels lisses participent, avec eNOS, à la régulation de la pression artérielle. De plus, le monoxyde d'azote produit par les variants de nNOS localisés au niveau des neurones et des muscles squelettiques peut diffuser jusqu'aux muscles artériels lisses où il agit comme vasodilatateur[38, 41, 42]. Le NO[•] produit dans les muscles squelettiques intervient aussi dans le processus de contraction musculaire[43]. Enfin, nNOS a été identifiée au sein du réticulum sarcoplasmique cardiaque où elle est impliquée dans la régulation des flux de Ca²⁺ et de la contraction du myocarde[41].

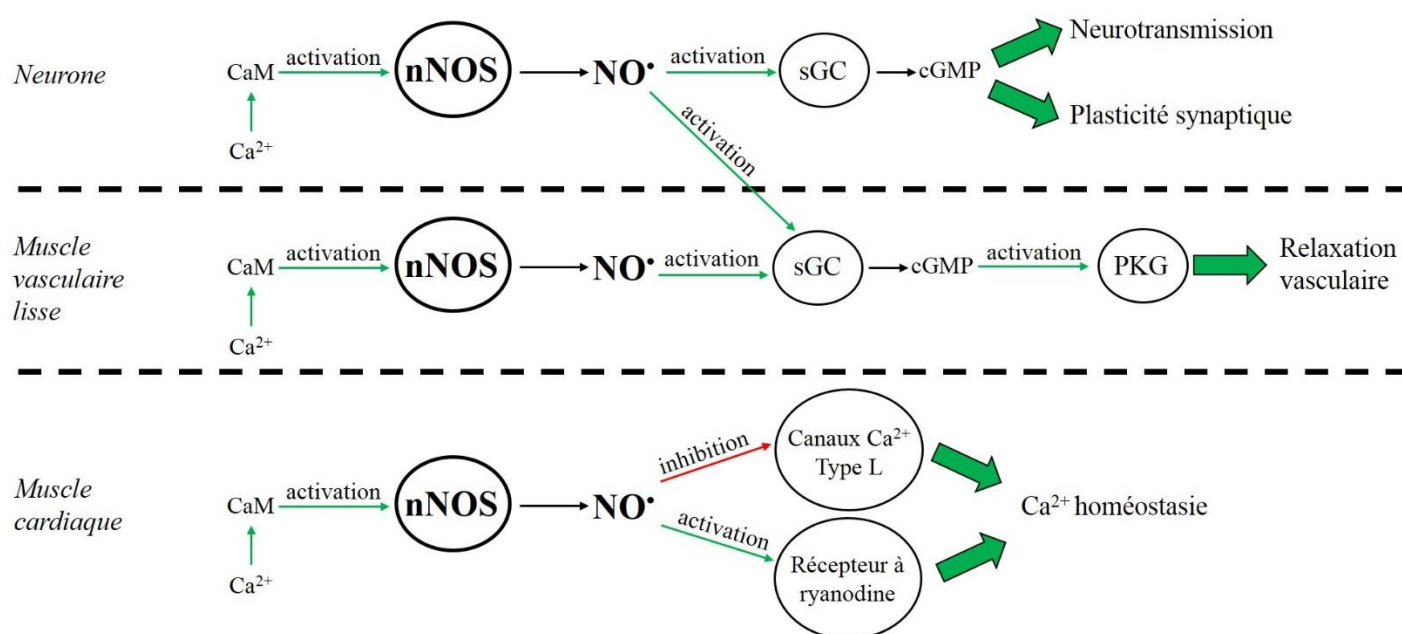


Figure 2- Voies de signalisation impliquant la NOS neuronale.

1.1.2. Défense immunitaire

Lors d'une infection, la NOS inductible (iNOS) est exprimée au sein des macrophages[44] et participe à la réponse immunitaire non spécifique au moyen d'une forte production de monoxyde d'azote[35]. En effet, la synthèse du NO[•] est environ dix fois plus rapide avec iNOS qu'avec les deux autres isoformes[45]. Le NO[•] ainsi libéré en grande quantité dans le milieu intercellulaire inhibe la réplication des organismes pathogènes[46]. Au sein des bactéries, le monoxyde d'azote cible principalement l'ADN, directement en provoquant des cassures double-brins, mais aussi de manière indirecte en inhibant sa synthèse[47]. De plus, il est capable de bloquer la respiration des bactéries ce qui a notamment pour effet d'augmenter la sensibilité de ces dernières au stress oxydant généré par l'hôte et dont il est l'un des

principaux acteurs[38]. Le $\text{NO}^\bullet$ possède également des propriétés antivirales, vis-à-vis notamment des *Herpesviridae*, des *Coronavirus* et des *Picornaviridae*, via la nitrosylation, et donc l'inhibition de protéases indispensables à leur répllication[45]. Le monoxyde d'azote peut aussi interagir avec des lipides[47], ce qui conduit à leur oxydation, et des protéines microbiennes, via un résidu cystéine, un hème ou un *cluster* fer-soufre[45]. Enfin, il a été montré que l'effet cytotoxique du $\text{NO}^\bullet$ pouvait s'exercer sur certaines cellules tumorales[48].

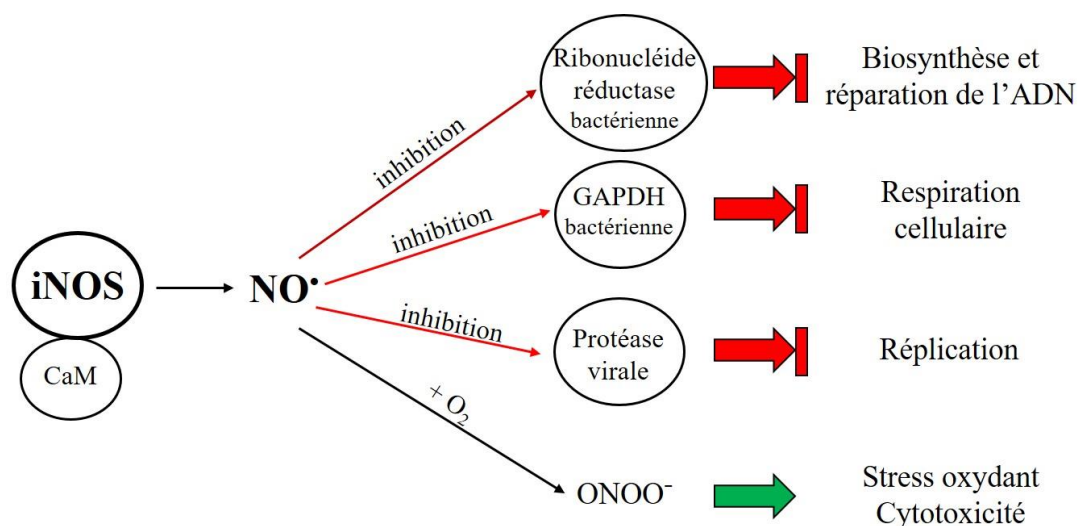


Figure 3- NOS inductible et défense immunitaire.

1.1.3. Processus pathologiques

Lorsque la production de monoxyde d'azote par les NOS n'est plus correctement régulée, ce dernier peut avoir des effets néfastes sur l'organisme.

En effet, le $\text{NO}^\bullet$ peut exercer une activité cytotoxique contre les cellules saines de l'organisme[36], selon des procédés similaires à ceux utilisés pour la défense immunitaire[42], dont la plupart ne mettent pas en jeu le $\text{NO}^\bullet$ lui-même, mais le peroxynitrite[49]. Cette espèce réactive de l'azote et de l'oxygène (RNOS) est formée par la réaction du $\text{NO}^\bullet$ avec l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$; le peroxynitrite peut à son tour se décomposer en divers oxydes d'azote capables de causer des dommages tissulaires. De plus, ces composés peuvent nitrer des résidus tyrosine et conduire à l'inactivation de certaines protéines, comme la superoxyde dismutase[38].

Le monoxyde d'azote est également responsable des lésions neuronales consécutives à un accident vasculaire cérébral[38]. Cette neurotoxicité s'exerce indirectement via la libération excessive de glutamate[42]. On observe aussi un effet délétère du $\text{NO}^\bullet$ suite à une ischémie : iNOS est alors exprimée au niveau du cerveau et sa forte production de $\text{NO}^\bullet$ contribue à la mort neuronale. Cependant, dans le même temps, la production, certes plus faible, de $\text{NO}^\bullet$ par eNOS

est indispensable puisqu'elle permet de maintenir un afflux sanguin suffisant[50]. Bien que son rôle ne soit pas encore bien compris, il a été montré que le NO^{*} était impliqué dans certaines maladies neurodégénératives, comme la chorée de Huntington et la maladie de Parkinson[38, 42, 51].

De nombreux types de cancers impliquent les NOS endothéliale[52] et inducible[53, 54] et le monoxyde d'azote[38]. La surexpression de iNOS a en effet été observée aussi bien dans des cancers du sein et de la prostate que dans certains cancers du tube digestif, de la peau, de la vessie, du larynx ou du système nerveux central[38, 53, 54]. Elle est notamment impliquée dans la carcinogenèse, l'angiogenèse au sein des tumeurs, la formation de métastases et l'agressivité des tumeurs[55, 56]. Par son activité anti-apoptotique, et sa capacité à inhiber la réponse immunitaire secondaire de l'organisme le NO^{*} va, de plus, permettre la survie et la progression des tumeurs[57]. Ce rôle crucial dans le développement d'un grand nombre de cancers a fait de la NOS inducible une cible thérapeutique privilégiée[53].

Enfin, les NO-synthases sont impliquées dans de nombreuses maladies cardio-vasculaires, les trois isoformes étant exprimées au niveau du cœur, dans différents types de tissus[38, 58]. La dérégulation de la production de monoxyde d'azote et des voies de signalisation associées est notamment impliquée dans le développement du diabète et des cardiomyopathies induites par ce dernier[38, 59]. Cette dérégulation est, en partie, due à une modification du niveau d'expression de la NOS endothéliale, à la hausse ou à la baisse, ainsi qu'au découplage de cette dernière, ce qui conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)[59]. L'implication de la NOS neuronale dans les cardiomyopathies, associées ou non au diabète, a été nettement moins étudiée et elle reste très incertaine puisqu'on trouve des études qui montrent une surexpression de cette dernière, alors que d'autres font état d'une diminution ou d'une absence de modification de son profil d'expression[59]. Au contraire, le rôle de la NOS inducible dans les troubles cardio-vasculaires est clairement établi : sa surexpression au niveau des tissus cardiaques conduit à une forte production de monoxyde d'azote susceptible d'entraîner un dysfonctionnement contractile[60]. De plus, dans ces conditions, iNOS peut être fortement découplée, ce qui entraîne la production de RNOS qui provoquent également des dysfonctionnements contractiles et peuvent conduire à un arrêt cardiaque[59].

1.2. Structure des NOS de mammifères

1.2.1. Protéine multi-domaines

Les NO-synthases sont composées de deux domaines fonctionnels, oxygénase et réductase, liés par un peptide d'environ 30 acides aminés qui permet la fixation d'une protéine régulatrice, la calmoduline (Figure 4) [13, 15, 16].

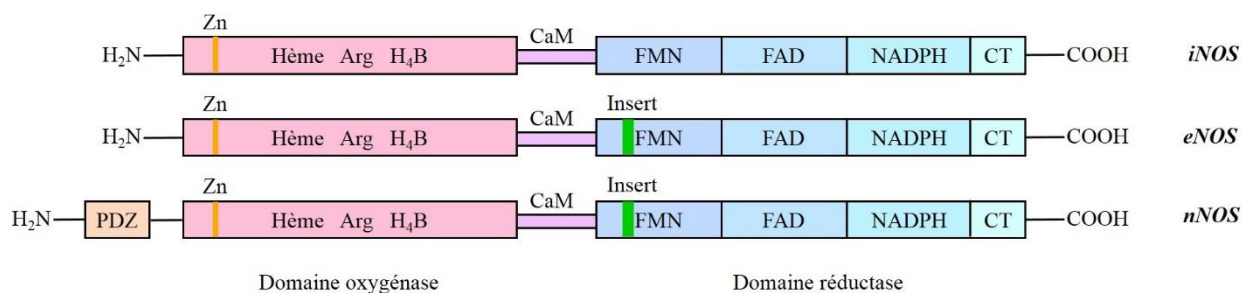


Figure 4 - Représentation schématique de la structure des trois isoformes de NOS de mammifères.

Le domaine oxygénase N-terminal contient le site catalytique et les sites de fixation pour l'hème et pour un cofacteur redox (Figure 5), la tétrahydrobioptérine (H₄B)[35]. Comme pour les cytochromes P450, l'hème est lié à la protéine via un résidu cystéine ; ces deux familles de protéines ne présentent cependant aucune homologie structurale[61, 62]. Dans le cas de la NOS neuronale, le domaine oxygénase est prolongé, à l'extrémité N-terminale, par un domaine PDZ[16].

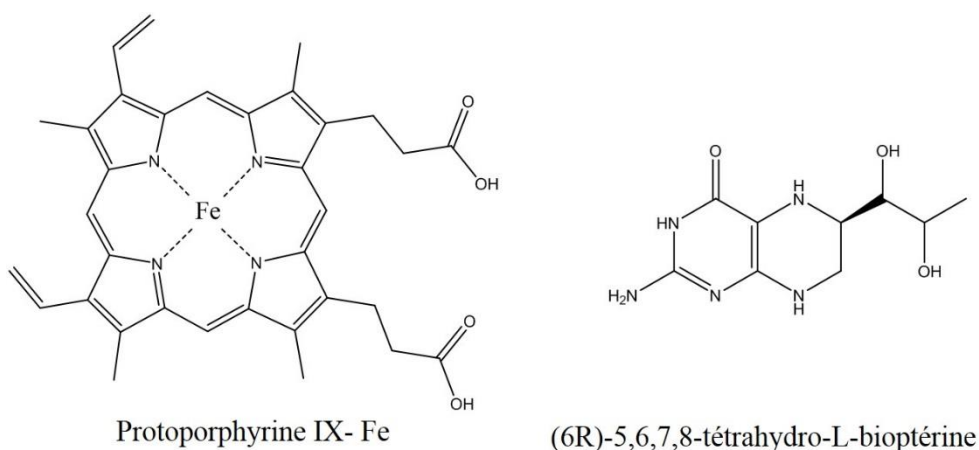


Figure 5- Formules chimiques de l'hème et du cofacteur bioptérine.

Le domaine réductase C-terminal possède des sites de fixation pour les cofacteurs flavines, la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD), ainsi que pour le co-substrat nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH)[14] (Figure 6). Sa séquence et sa structure sont analogues à celles d'autres réductases utilisant le système FMN/FAD/NADPH, et en particulier à la P450 réductase[14].

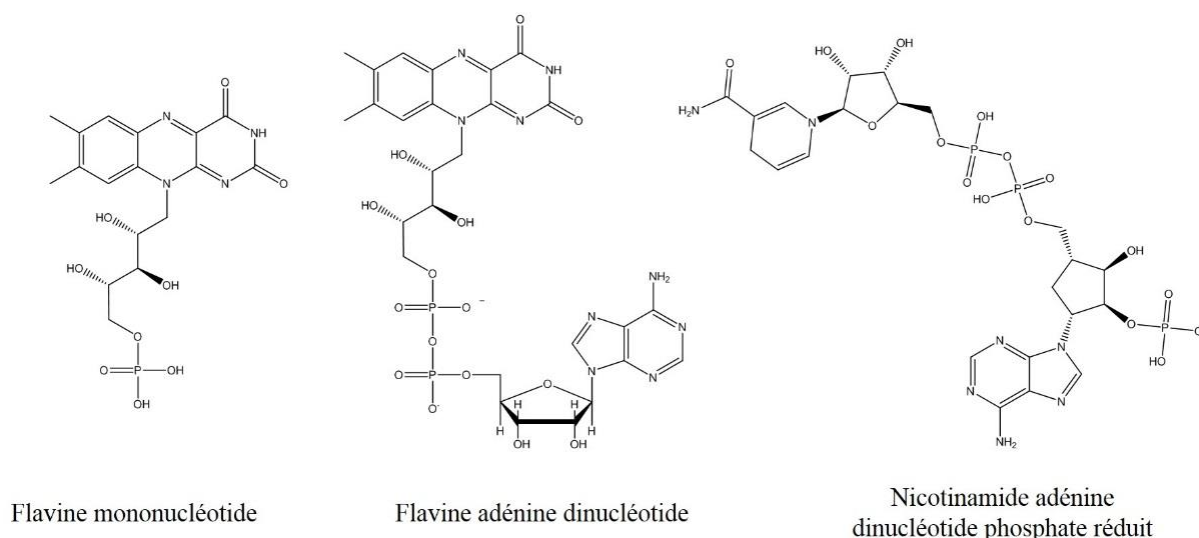


Figure 6- Formules chimiques des cofacteurs FMN et FAD et du co-substrat NADPH.

Le site catalytique, ainsi que les sites de fixation pour les différents cofacteurs sont très conservés entre les isoformes[20, 63, 64], contrairement au site de fixation de la calmoduline[65]. Les NO-synthases sont actives uniquement sous forme d'homodimères[66].

1.2.2. Domaine oxygénase

C'est au sein du domaine oxygénase que se trouve le site actif à hémithiolate (Figure 7) où les NOS catalysent l'oxydation en deux étapes de la L-arginine en N^o-hydroxy-L-arginine (NOHA) puis en L-citrulline et monoxyde d'azote[17]. Il est peu flexible et relativement exposé au solvant[62]. On y trouve, dans l'environnement distal de l'hème, le site de fixation du substrat. Ce dernier est extrêmement conservé entre les trois isoformes[67] : tous les résidus en contact avec l'arginine sont identiques, à l'exception d'un acide aspartique dans iNOS et nNOS, remplacé par une asparagine dans le cas d'eNOS, au niveau du groupement carboxylate de l'arginine. Cette substitution n'a toutefois pas d'effet sur l'affinité de l'arginine pour la protéine, qui est maintenue par un important réseau de liaisons hydrogène[62]. Le canal d'accès du substrat se prolonge du site actif vers l'interface du dimère[68].

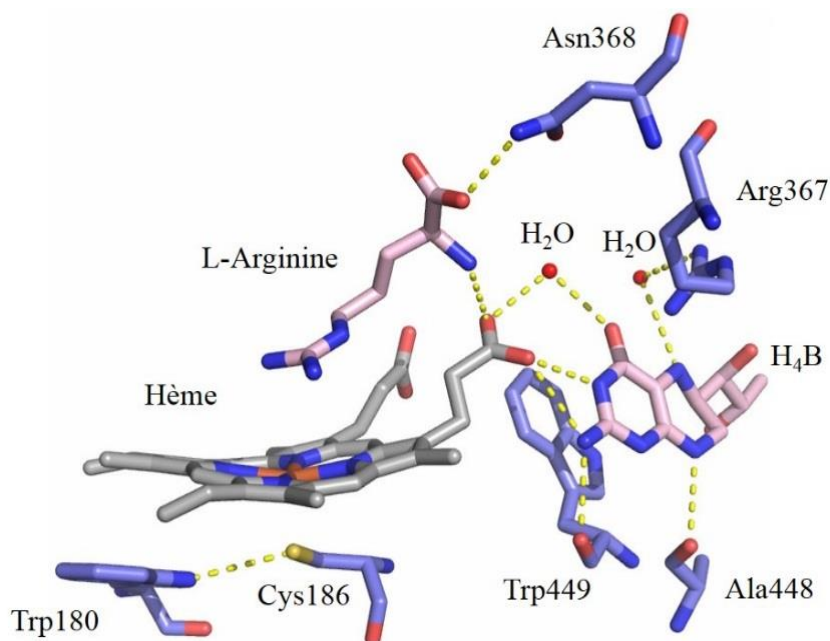


Figure 7- Vue du site actif de eNOS bovine (code PDB 2NSE) représentant l'hème (gris) le substrat arginine (rose) et le cofacteur biophtérine (rose) ainsi que les principaux résidus impliqués dans sa fixation (bleu).
Figure réalisée avec Pymol.

Le domaine oxygénase lie également le cofacteur redox H_4B , indispensable au fonctionnement de l'enzyme[62]. Les structures tridimensionnelles des domaines oxygénases seuls (*ie* sans le domaine réductase) ont montré qu'ils pouvaient, comme les NOS entières, former des dimères contenant deux molécules de H_4B , localisées à l'interface entre les deux monomères (Figure 8)[20, 63, 64, 69]. Elles sont stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène et par interaction π - π avec deux résidus aromatiques : un tryptophane appartenant à l'un des monomères et une phénylalanine appartenant à l'autre[62, 70, 71]. Le cofacteur H_4B a donc besoin du dimère pour se fixer et, dans le même temps, il favorise sa formation et le stabilise[66, 68].

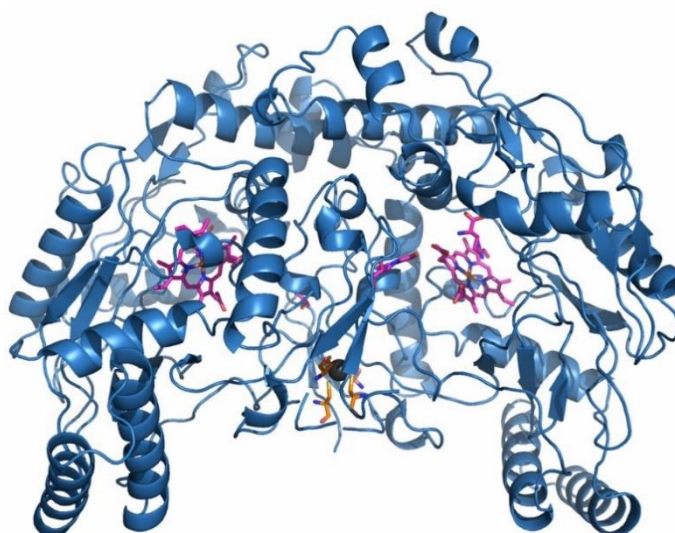


Figure 8- Structure du dimère du domaine oxygénase de eNOS bovine (code PDB 2NSE) montrant notamment l'atome de zinc (noir) et les quatre résidus cystéine impliqués dans sa fixation (orange), ainsi que l'hème, le substrat arginine et le cofacteur biophtérine de chaque monomère (magenta).
Figure réalisée avec Pymol.

Les structures cristallographiques des domaines oxygénases ont également permis de mettre en évidence la présence d'un unique atome de zinc à l'interface entre les deux monomères. Il est lié à quatre résidus cystéine, deux provenant de chaque monomère (Cys96 et Cys101 pour eNOS de *Bos taurus*, Figure 8)[72]. Il joue un rôle structural majeur puisqu'il favorise la formation du dimère et le stabilise. Bien qu'on puisse avoir un dimère en absence de zinc, ce dernier est nécessaire au repliement correct de la protéine[72]. Au niveau du domaine oxygénase, c'est cette zone, à l'interface entre les deux monomères, qui présente le plus de variations entre les trois isoformes de NOS ; ceci explique, en partie, les différences de stabilité observées entre les dimères de nNOS, iNOS et eNOS[64].

1.2.3. Domaine réductase

Le domaine réductase des NO-synthases permet le transfert d'électrons du NADPH vers le site catalytique, *via* le FAD puis le FMN. Ce transfert peut également s'effectuer, de manière moins efficace, lorsque les domaines oxygénase et réductase produits séparément sont mis en contact ; la réductase seule peut aussi transférer des électrons à d'autres accepteurs, comme les cytochromes c[69, 70]. Les sites de fixation du FAD et du FMN sont optimisés de façon à stabiliser les formes semi-quinones des flavines[15, 70]. De plus, la position enfouie du cofacteur FMN le rend inaccessible à tout partenaire redox exogène ; il ne peut être réduit que *via* le FAD.

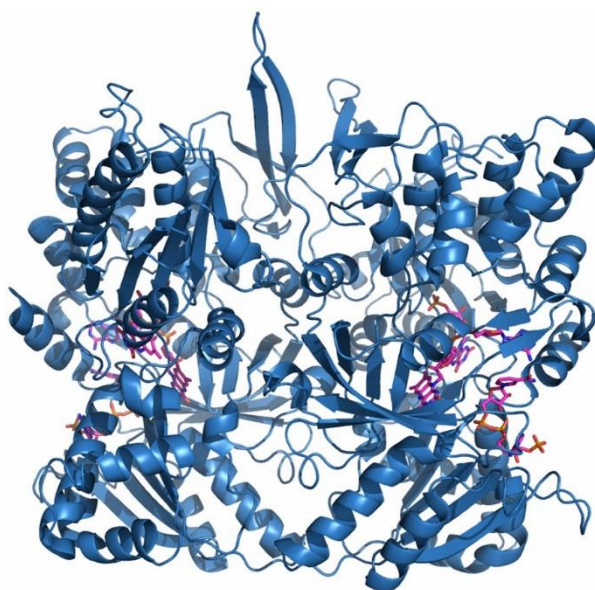


Figure 9- Structure du dimère de la réductase de nNOS de rat (code PDB 1TLL) avec le substrat NADPH et les cofacteurs FMN et FAD (magenta) de chaque monomère.

Figure réalisée avec Pymol.

La résolution de la structure de la réductase de nNOS par cristallographie a également révélé que cette dernière forme un dimère (Figure 9), comme c'est le cas pour le domaine oxygénase. Cependant, la structure obtenue ne permet pas le transfert d'un électron depuis le FMN jusqu'à l'hème[73]. Enfin, l'alignement des séquences des domaines réductase de NOS avec celles d'autres réductases à NADPH/FAD/FMN a mis en évidence la présence d'une extension C-terminale et, pour les NOS constitutives, d'un insert dans le site de fixation du FMN[74]. Ces deux régions sont impliquées dans la régulation de la production de monoxyde d'azote. (Cf. §1.4).

1.2.4. Enzyme entière

Les domaines réductase et oxygénase des NOS sont reliés par un peptide qui comprend un site de fixation pour la calmoduline[13]. Cette petite protéine (17kDa) est sensible au flux de calcium intracellulaire et participe à l'activation de nombreuses protéines[69]. La calmoduline est notamment indispensable aux NO-synthases et permet de déclencher le transfert d'électron de la réductase d'un monomère, vers le site catalytique de l'autre monomère[70]. Différentes régions du domaine réductase interagissent avec la calmoduline ou modifient son affinité pour son site de fixation ; la structure de la réductase est modifiée par la présence de calmoduline[69, 70, 74]. Le domaine oxygénase, au contraire, n'est pas impacté par l'interaction de la NOS avec la calmoduline[70].

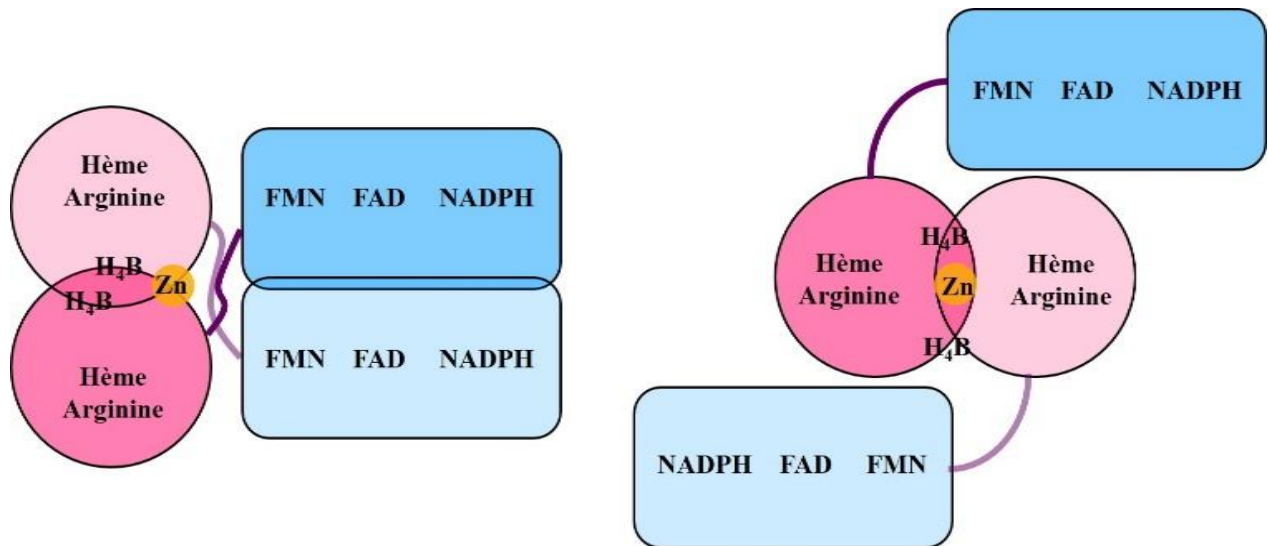


Figure 10- Représentation schématique des modèles de NOS entière proposés par Garcin *et al.* (gauche) et Stuehr *et al.* (droite).

La structure du complexe formé par un peptide contenant le site de fixation de la calmoduline avec cette dernière est disponible pour iNOS (code PDB 3GOF), eNOS (code PDB 1NIW) et nNOS (code PDB 2O60). Elle permet d'expliquer, en partie, le rôle de la calmoduline dans le transfert électronique inter-domaine[75]. On dispose aussi, dans le cas de la NOS inducible, d'une structure qui contient également le domaine de fixation du FMN[76]. Cependant, l'enzyme entière n'a, pour l'instant, pas pu être cristallisée ; on ne connaît donc pas sa structure tridimensionnelle. Des modèles de dimères basés sur les structures des domaines oxygénase et réductase, ont néanmoins été proposés, qui diffèrent notamment par l'existence, ou non, d'une interaction entre les deux domaines réductases (Figure 10)[73, 77].

1.3. Mécanisme catalytique

Les NO-synthases catalysent l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline et monoxyde d'azote en deux étapes : l'hydroxylation de la L-arginine en N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) qui reste lié à l'enzyme, puis l'oxydation du NOHA en L-citrulline, accompagnée de la libération du NO[•]. Cette réaction nécessite trois électrons, soit 1,5 équivalent de NADPH, et deux molécules de dioxygène[17]. Elle requiert également la formation d'un homodimère, et la présence du cofacteur H₄B[66, 70].

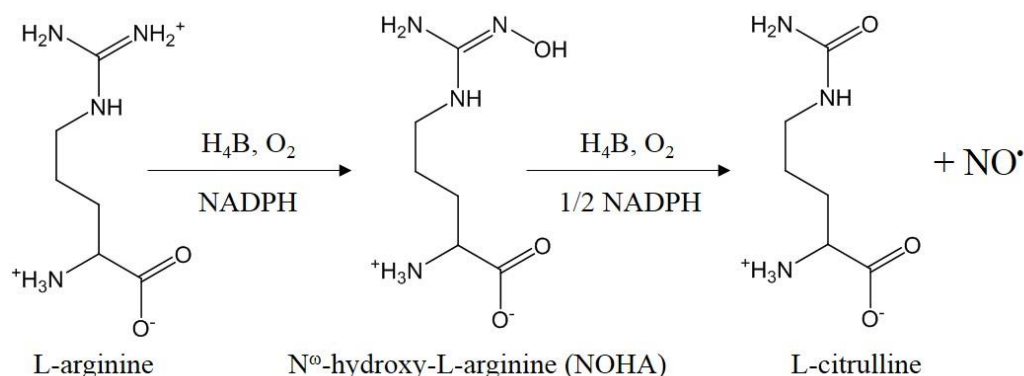


Figure 11- Réaction enzymatique catalysée par les NO-synthases.

1.3.1. 1^{ère} étape : hydroxylation de l'arginine

L'hydroxylation de l'arginine par les NO-synthases correspond à une activité mono-oxygénase, tout comme les réactions catalysées par les cytochromes P450, l'autre grande famille de protéines à hémithiolate. Le mécanisme catalytique des NO-synthases (Figure 12) a donc été basé sur celui, mieux connu, des P450[78]. Le Fe^{III} hémique est tout d'abord réduit en Fe^{II}, par un électron provenant du domaine réductase de l'enzyme[70]. En absence de substrat et de cofacteur, ce Fe^{III} présente un équilibre entre une forme pentacoordonnée de spin 5/2, dite haut-spin (HS) et une forme hexacoordonnée de spin 1/2, dite bas-spin (BS), dans laquelle une molécule d'eau constitue le sixième ligand. La fixation du substrat et du cofacteur déplace cet équilibre en faveur de la forme HS, compétente pour la catalyse [79, 80]. Ce phénomène dépend fortement de l'isoforme considérée et est particulièrement marqué dans le cas de la NOS inductible dont la forme HS présente un potentiel redox nettement plus élevé (environ 100mV) que la forme BS, et est donc plus facilement réductible[81]. Le Fe^{II} hémique obtenu après réduction peut fixer une molécule de dioxygène pour former un complexe Fe^{II}O₂ (ou Fe^{III}O₂[•]) [70].

Un deuxième électron est alors fourni au système par le cofacteur biophtérine, de manière suffisamment rapide pour éviter l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂ et la libération de superoxyde, et conduit à la formation d'un complexe ferrique-peroxo Fe^{III}O₂⁻[16]. S'il a été très tôt établi que

le H₄B était indispensable au fonctionnement des NO-synthases, son rôle exact (structural ou redox) a longtemps été sujet à débat[16]. L'utilisation d'analogues inactifs d'un point de vue redox a permis d'établir un rôle redox du H₄B dans la réaction d'hydroxylation de l'arginine[81]. Une réaction d'oxydation originale de la tétrahydrobioptérine à un électron a alors été proposée[82], cette dernière subissant généralement une oxydation à deux électrons pour former la dihydrobioptérine H₂B[83], et rapidement confirmée par l'observation expérimentale, par *rapid freeze-quench* couplé à la spectroscopie RPE, d'un radical ptérine[84].

Le transfert de deux protons au complexe ferrique-peroxo conduit ensuite à la formation d'un intermédiaire ferrique-dihydroperoxo Fe^{III}OOH₂⁺ puis à la rupture hétérolytique de la liaison O-O pour libérer une molécule d'eau et former un complexe oxoferryl Fe^{IV}O avec un radical cation porté par la porphyrine, communément appelé *Compound I*[68, 85]. C'est cette espèce qui oxyde l'arginine pour former le NOHA, qui reste lié à l'enzyme, et régénérer le Fe^{III} initial[16, 68, 70, 85], qui servira de point de départ à la 2^{ème} étape de la réaction. Le radical bioptérine, stabilisé par la protéine, est réduit ultérieurement par un électron provenant du domaine réductase[68, 85, 86].

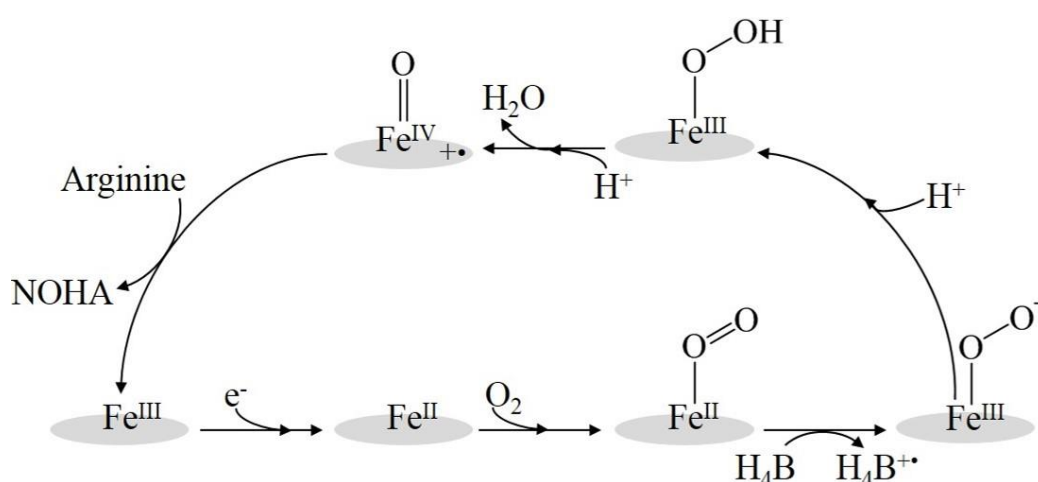


Figure 12- Modèle proposé pour le mécanisme réactionnel d'hydroxylation de l'arginine par les NO-synthases.

Le complexe Fe^{II}O₂ et le radical bioptérine ont été observés expérimentalement et caractérisés[87]. De plus, la formation du radical est cinétiquement couplée à la formation du NOHA et à la disparition du Fe^{II}O₂[85, 87], qui est accélérée d'un facteur 100 par H₄B, comparée à sa vitesse d'auto-oxydation en absence de cofacteur[68, 87]. Ceci confirme le rôle de H₄B, *ie* le transfert rapide d'un électron à l'hème pour coupler l'activation de l'oxygène à l'hydroxylation de l'arginine. La suite du mécanisme catalytique, bien qu'assez largement acceptée, est plus incertaine car aucun des intermédiaires réactionnels présumés n'a pu être observé expérimentalement. Se pose notamment la question de la nature exacte de l'espèce hémique responsable de l'oxydation de l'arginine : si le complexe ferrique-peroxo est peu

réactif vis-à-vis de l'arginine, les complexes ferrique-hydroperoxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ et oxoferryl $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ sont tous deux de bons candidats[68]. Par analogie avec les cytochromes P450, c'est le complexe $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ qui est supposé être l'oxydant final dans cette première étape[68, 78].

La formation de ce complexe oxoferryl implique la libération d'une molécule d'eau à partir de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}_2^+$, et donc le transfert de deux protons au complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_2^-$ [85]. Le transfert d'un proton, couplé ou non au transfert d'électron, par le cofacteur biotérine, situé à proximité de l'hème et possédant plusieurs protons échangeables, a été proposé. Cependant, le radical piégé durant la réaction étant sous la forme protonée $\text{H}_4\text{B}^{+\bullet}$ [88], il est peu probable que le cofacteur biotérine soit impliqué dans un transfert de proton. On ne peut toutefois pas exclure cette hypothèse car il est possible que ce dernier se lie aux NOS sous forme protonée H_5B^+ [85]. L'arginine elle-même, dont le groupement guanidinium pointe vers l'hème ($< 5 \text{ \AA}$) est un possible donneur de proton[20]. Plusieurs modèles ont été proposés pour ce transfert de proton dont le mécanisme reste à déterminer [89, 90]. Enfin, on pourrait avoir un transfert de proton vers le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_2^-$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ *via* une molécule d'eau située dans l'environnement distal et indispensable à l'hydroxylation de l'arginine [85, 91].

1.3.2. 2^{ème} étape : oxydation du NOHA

Comme pour la première étape, la réaction d'oxydation du NOHA est initiée par la réduction du Fe^{III} en Fe^{II} , grâce à un électron provenant du domaine réductase, suivie de la fixation d'une molécule de dioxygène et de la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_2^{\bullet}$)[70]. Pour la suite de la réaction, on ne dispose que de peu d'informations et plusieurs modèles ont été proposés, concernant notamment les processus de transfert d'électron. En effet, il est nécessaire de fournir un électron supplémentaire au système pour activer l'oxygène et permettre l'oxydation du NOHA mais, d'un point de vue formel, l'oxydation du NOHA en citrulline et monoxyde d'azote ne nécessite qu'un seul électron (Figure 11)[16, 92]. Si la plupart des modèles proposent un mécanisme de type ping-pong, où une entité est successivement oxydée puis réduite au cours du cycle catalytique, l'identité de cette dernière a longtemps fait débat[85].

Un mécanisme impliquant le NOHA comme donneur d'électron (ou d'hydrogène $\text{H}^{\bullet}$) a tout d'abord été proposé, dans lequel le radical cation $\text{NOHA}^{+\bullet}$ réagit avec le complexe ferrique-peroxo pour former un intermédiaire tétraédrique[16, 70]. Le réarrangement et l'oxydation de ce complexe conduisent à la formation du $\text{NO}^{\bullet}$ et de la citrulline, et à la régénération du Fe^{III} initial[16, 70]. Par analogie avec la réaction d'hydroxylation de l'arginine, le cofacteur H_4B a également été proposé comme donneur, puis accepteur d'électron [68, 85, 93]. En effet, comme dans la première étape, on observe un radical biotérine, dont la formation est cinétiquement couplée à la disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ [31, 93]. Ce radical biotérine doit ensuite être réduit pour conduire à la production de monoxyde d'azote $\text{NO}^{\bullet}$, et pas d'anion nitroxyle NO^- [16, 68, 85]. Après formation du radical biotérine, et donc du complexe ferrique-peroxo, le transfert d'un proton conduit à la formation du complexe ferrique-hydroperoxo qui va pourvoir

attaquer le NOHA[68, 85]. On obtient alors un complexe tétraédrique qui se réarrange, selon un mécanisme à déterminer, pour former un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ qui ne peut libérer de monoxyde d'azote, en raison de la forte affinité de ce dernier pour le Fe^{II} . Il est donc oxydé, par le cofacteur biophtérine, en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ qui se dissocie pour libérer du $\text{NO}^{\bullet}$ et régénérer le Fe^{III} initial[68, 85](Figure 13).

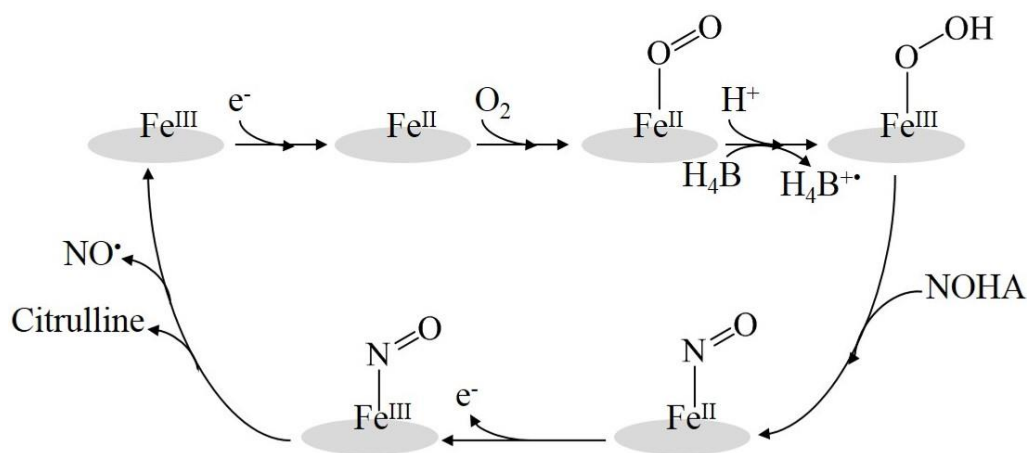


Figure 13- Modèle proposé pour le mécanisme d'oxydation du NOHA par les NO-synthases.

Les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ sont les seuls intermédiaires hémiques à avoir été observés au cours du cycle catalytique et, bien que le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ soit souvent considéré comme l'espèce réactive vis-à-vis du NOHA, le passage par un complexe oxoferryl, comme dans la première étape, ne peut être exclu[68]. Concernant les processus de transfert de proton, dont le nombre dépend de la nature de l'espèce oxydante, on trouve deux donneurs potentiels à proximité de l'hème, le substrat NOHA et le cofacteur biophtérine[85], la molécule d'eau distale indispensable pour l'hydroxylation de l'arginine n'étant pas nécessaire pour l'oxydation du NOHA[91]. Le radical ptérine observé au cours de la réaction étant sous forme protonée $\text{H}_4\text{B}^{\bullet+}$, un transfert de proton depuis le cofacteur est toutefois peu probable[31, 88]. Le nombre de donneurs de proton potentiels étant plus limité que dans la première étape, il est donc plus difficile d'envisager le passage par un complexe oxoferryl dont la formation s'accompagne de la libération d'une molécule d'eau et nécessite donc une double protonation[31, 85]. Enfin, le mécanisme de réduction du radical $\text{H}_4\text{B}^{\bullet+}$, qui doit être suffisamment rapide pour permettre la production de monoxyde d'azote et éviter la libération d'anion nitroxyde, reste à déterminer : la réduction du radical par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pour régénérer le cofacteur et former un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, décrite précédemment, semble incompatible avec certaines données expérimentales. En effet, les vitesses de disparition du radical $\text{H}_4\text{B}^{\bullet+}$ et de formation du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ sont très différentes (8 s^{-1} et 37 s^{-1} , respectivement, dans le cas de iNOS, à 10°C)[93]. De plus, seules de très faibles quantités de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ ont pu être détectées, par *rapid freeze-quench* couplé à la spectroscopie RPE, et leur variation en fonction de la durée de la réaction n'est pas corrélée

avec celle du radical biophtérine[31]. Différents mécanismes alternatifs ont été proposés, principalement issus de calculs de modélisation moléculaire et parfois très éloignés de celui présenté Figure 13[94-97].

1.3.3. Transfert d'électron inter-domaine

Chacune des deux étapes du cycle catalytique des NO-synthases commence par la réduction du Fe^{III} en Fe^{II} par un électron issu de l'oxydation du NADPH. Cet électron est transmis du NADPH à l'hème *via* le FAD puis le FMN. Ce transfert électronique est l'étape cinétiquement limitante[98] ; il a lieu du domaine réductase d'un des monomères vers le domaine oxygénase de l'autre monomère, ce qui explique que les NOS ne soient pas actives sous forme monomérique[99].

Au cours de la réaction catalytique, le couple FAD-FMN passe d'un état réduit à un électron (FAD-FMNH^{*} semi-quinone) à un état réduit à 3 électrons (FAD hydroquinone - FMNH^{*}), après réduction du FAD par le NADPH[100]. On a ensuite un transfert d'électron inter-flavine pour former le couple FADH^{*} semiquinone – FMN hydroquinone[100](Figure 14). Pour que ce transfert inter-flavine puisse avoir lieu, le domaine FMN doit être dans une conformation dite « acceptrice d'électron ». Cette conformation correspond à la structure cristallographique obtenue par Garcin *et al.* dans laquelle le FMN est situé à l'interface entre les domaines FMN et FAD. Les deux flavines sont alors suffisamment proches l'une de l'autre pour permettre un transfert électronique direct et efficace[73]. De plus, les deux cofacteurs sont relativement enfouis au sein de la protéine et protégés du solvant par l'extrémité C-terminale du domaine réductase (CT), afin d'éviter toute réaction redox non spécifique[73]. En présence de NADPH, et en absence de calmoduline, le domaine FMN est bloqué dans cette conformation acceptrice d'électron[101].

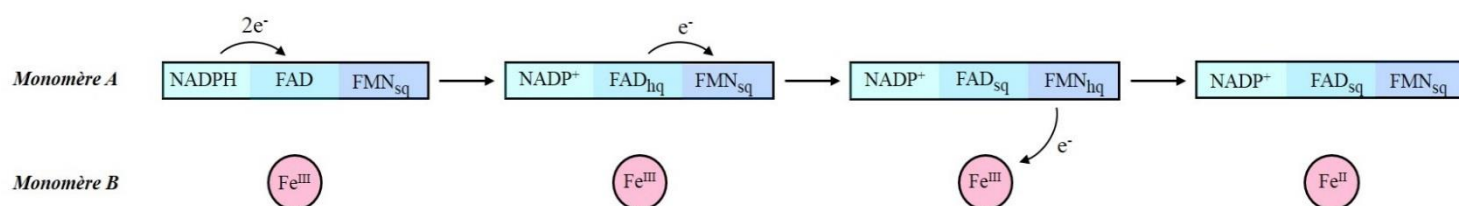


Figure 14 - Transfert électronique du NADPH à l'hème, *via* les cofacteurs FAD et FMN.
sq : semi-quinone ; hq : hydroquinone.

La fixation de la calmoduline favorise le transfert d'électron inter-flavine et permet le mouvement du domaine FMN vers le domaine oxygénase de l'autre monomère, pour former un complexe dit « donneur d'électron »[69, 100, 102]. C'est ce déplacement important du domaine FMN qui limite la vitesse du transfert électronique[100]. Contrairement au complexe

accepteur d'électron, on ne dispose pas de structure cristallographique pour ce complexe donneur. Un état supplémentaire, dans lequel la calmoduline interagit avec le domaine oxygénase a notamment été proposé comme intermédiaire entre les complexes accepteur et donneur d'électron[69](Figure 15).

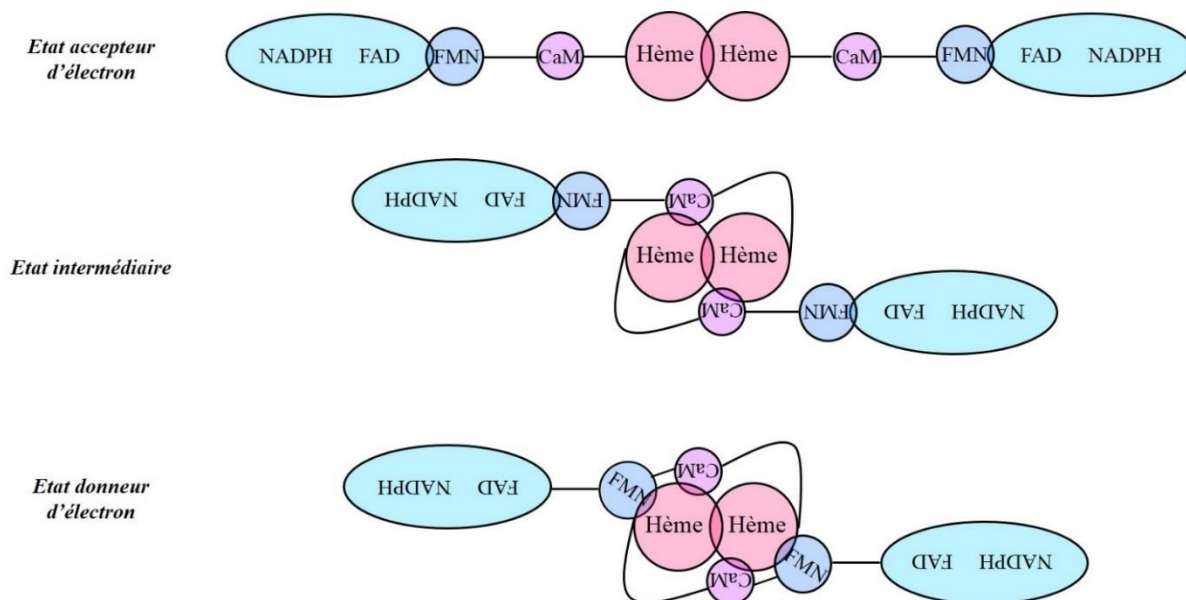


Figure 15- Représentation schématique des conformations impliquées dans le transfert d'électron inter-domaine.

Ce modèle de transfert électronique inter-domaine qui implique de larges mouvements du domaine FMN est confirmé par différentes études cinétiques et spectroscopiques[103-107]. Les données cristallographiques concernant le domaine FMN montrent qu'il existe dans différentes conformations et confirment donc sa grande flexibilité[73, 76]. De plus, des études en solution ont montré l'existence d'un quasi-continuum de conformations entre l'état accepteur et l'état donneur d'électron[108, 109]. De nombreux modèles, issus de la chimie computationnelle, ont été proposés pour comprendre l'interaction entre les domaines oxygénase et réductase[76, 103, 110]. Des expériences de mutagenèse dirigée et d'échange hydrogène/deutérium couplé à de la spectrométrie de masse ont permis de montrer que, au sein du dimère, le domaine oxygénase interagit bien avec le domaine FMN de l'autre monomère, ainsi qu'avec la calmoduline[111]. Elles ont également montré que ce sont les mêmes résidus du domaine FMN qui sont impliqués dans l'interaction avec le domaine FAD et le domaine oxygénase. On dispose, de plus, de modèles pour le complexe donneur d'électron immédiatement avant et immédiatement après le transfert d'électron du FMN vers le fer[112]. Toutefois, le processus de transfert électronique inter-domaine ne peut être modélisé dans son ensemble car il se déroule sur une échelle de temps (quelques dizaines de millisecondes) qui dépasse de loin les capacités de calcul actuelles[112].

1.3.4. Découplage

Le couplage entre l'oxydation du NADPH et la production de monoxyde d'azote est assuré par la calmoduline. En effet, en absence de cette dernière, le transfert d'électron vers l'hème est extrêmement lent[113] et ce dernier reste donc très majoritairement à l'état Fe^{III} , totalement inerte vis-à-vis de l'oxygène[101].

Le couplage entre l'activation du dioxygène et l'oxydation du substrat, arginine ou NOHA, est, quant à lui, garanti par la présence du cofacteur biptérine et sa capacité à fournir un électron suffisamment rapidement pour empêcher l'auto-oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ [31, 68, 85, 87, 93]. En absence de ptérine, ou en présence d'une ptérine inactive d'un point de vue redox (dihydrobiptérine H_2B , par exemple), l'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ mène à la libération d'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, générateur de stress oxydant [16, 81, 114]. De plus, la production simultanée de superoxyde et de monoxyde d'azote conduit à la formation de peroxynitrite, hautement cytotoxique (Cf. § 1.1.3). Lors de la 2^{ème} étape du cycle catalytique, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ peut conduire à la libération d'anion nitroxyde NO^- s'il n'est pas réduit suffisamment rapidement[16]. Ce dernier peut réagir avec l'oxygène et former du peroxynitrite, bien que la réaction soit nettement plus lente que dans le cas du $\text{NO}^{\cdot}$ [16].

Le déficit de H_4B est donc la principale cause de découplage et de production d'espèces réactives de l'azote et de l'oxygène par les NO-synthases. Cependant, en absence totale de ptérine, le dimère formé par les NOS et nécessaire à la réduction du Fe^{III} en Fe^{II} est moins stable, en particulier pour la NOS inductible[70], et le transfert d'électron inter-domaine est moins efficace, ce qui limite la production de RNOS [16, 81, 115]. De même, en absence de substrat, le Fe^{III} possède une molécule d'eau comme sixième ligand et se trouve donc majoritairement à l'état bas-spin, qui n'est pas favorable au transfert d'électron inter-domaine [80, 115].

1.4. Régulation de la production de NO[•]

Selon sa concentration et l'endroit où il est produit, le monoxyde d'azote peut jouer des rôles très différents, voire opposés (Cf. §1.1). Il est donc primordial que sa production par les NO-synthases soit précisément régulée, afin de prévenir tout effet délétère pour l'organisme.

1.4.1. Cas de la NOS inductible

La NOS inductible est principalement régulée au niveau transcriptionnel[116]. En effet, son expression est induite par de très nombreux facteurs de transcription, dont la nature dépend du type de cellule et de l'espèce concernés[60]. On peut notamment citer les composants des membranes bactériennes ou fongiques, ainsi que les cytokines produites lors d'une infection, et l'interféron γ , produit par les cellules immunitaires activées[45]. Il existe néanmoins certains mécanismes de régulation post-transcriptionnels [59, 60] et post-traductionnels, notamment *via* l'interaction inhibitrice avec certaines protéines [45, 60].

Une fois produite, la NOS inductible synthétise du NO[•] de manière continue, jusqu'à ce qu'elle soit dégradée[117, 118]. En effet, son interaction avec la calmoduline, nécessaire à la synthèse du NO[•], est pratiquement irréversible, et virtuellement indépendante de la concentration intracellulaire en Ca²⁺[119, 120]. De plus, les gènes impliqués dans la biosynthèse du cofacteur H₄B sont activés concomitamment à celui responsable de l'expression de iNOS[70].

Il existe tout de même des mécanismes de contrôle de la production de monoxyde d'azote par la NOS inductible, dont le NO[•] lui-même est le principal acteur. En effet, ce dernier inhibe iNOS, de manière réversible, par la formation de complexes Fe^{II}NO ou Fe^{III}NO dont la dissociation est lente et dépend de la quantité de NO[•] déjà présent en solution[70]. Le NO[•] peut également effectuer une S-nitrosation sur les résidus cystéine qui forment le site de fixation du zinc ce qui conduit à sa libération et à une déstabilisation du dimère, indispensable au fonctionnement de l'enzyme [121, 122].

L'activité de iNOS est, de plus, régulée par la disponibilité du substrat arginine et donc, de manière indirecte, par les processus impliqués dans le transport de cette dernière, ainsi que par l'activité des autres enzymes utilisant l'arginine comme substrat[60]. Enfin, la vitesse de production de NO[•] par la NOS inductible est limitée, de manière intrinsèque, par la présence de l'extension C-terminale (CT) (Figure 4) : elle augmente d'environ 20% quand on supprime cette extension[62].

1.4.2. Cas des NOS constitutives

Contrairement à la NOS inductible, les NOS endothéliale et neuronale sont exprimées de manière constitutive et sont donc principalement régulées aux niveaux post-transcriptionnel et post-traductionnel. En effet, eNOS et nNOS possèdent toutes deux des sites de phosphorylation situés au sein de l'insert du domaine FMN et de l'extrémité C-terminale CT (Figure 4)[65, 123]. La phosphorylation de la sérine C-terminale (S1179 pour eNOS bovine) est particulièrement critique dans le cas de la NOS endothéliale et elle est contrôlée par diverses voies de signalisation, dépendant ou non de la concentration intracellulaire en calcium [37, 62, 123]. Pour être active, eNOS subit une myristoylation co-traductionnelle sur la glycine N-terminale (G2 chez eNOS bovine) suivie d'une palmitoylation sur deux cystéines N-terminales (C15 et C26 chez eNOS bovine)[37, 123]. Cette dernière ne peut avoir lieu que si eNOS est associée à une membrane, ce qui constitue un élément de contrôle supplémentaire[123]. Ces modifications régulent également la localisation de eNOS au sein des cellules[37]. Dans le cas de nNOS, c'est le domaine PDZ N-terminal qui permet le contrôle de la localisation cellulaire[124]. Il existe aussi une régulation épigénétique de l'expression des NOS constitutives (cNOS), et en particulier de eNOS, via la modification d'histones et la méthylation de son promoteur[59]. Des trois isoformes de NO-synthases, la NOS endothéliale est celle dont la régulation implique la plus grande variété d'acteurs et de mécanismes[123].

De plus, l'activité des cNOS est régulée par l'interaction, inhibitrice ou activatrice, avec de nombreuses protéines. Ainsi, l'interaction avec la cavéoline-1 pour eNOS et avec la cavéoline-3 pour nNOS, par exemple, inhibe la synthèse de monoxyde d'azote [37, 65, 70]. Au contraire, l'interaction de eNOS avec la *heat shock protein* 90 (HSP90) facilite la fixation de la calmoduline et donc l'activation de l'enzyme[37, 70]. En effet, contrairement à la NOS inductible, les NOS constitutives ne sont pas liées à la calmoduline de manière irréversible, et la fixation de cette dernière dépend de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} [13, 40, 65]. La production de NO^* peut donc, à tout moment, être ajustée via la modulation des flux de calcium. Les variations de séquences du domaine de fixation de la calmoduline n'expliquent que partiellement les différences d'affinité observées entre les trois isoformes[62]. L'insert présent au sein du domaine FMN des cNOS est également impliqué puisque sa suppression augmente l'affinité de la calmoduline et diminue la concentration en calcium nécessaire à sa fixation[62] : des modèles indiquent qu'il formerait une boucle, adjacente au site de fixation de la calmoduline[65, 74]. Cependant, aucune des chimères (comportant le site de fixation de la calmoduline de iNOS) ni aucun des mutants de délétion (qui ne contiennent pas l'insert au sein du domaine FMN) ne présente une affinité pour la calmoduline indépendante de la concentration de Ca^{2+} , comme c'est le cas pour iNOS, ce qui indique qu'il existe d'autres éléments impliqués dans l'interaction cNOS/CaM[62].

Enfin, la vitesse de production de NO^* est contrôlée de manière intrinsèque par la présence d'une extension C-terminale (CT), qui est plus longue que pour la NOS inductible (33 et 42 acides aminés pour nNOS et eNOS, respectivement, contre seulement 21 pour iNOS)[65].

En absence de calmoduline, la suppression de cette dernière permet d'augmenter, la vitesse de transfert électronique inter-flavine et vers un partenaire redox exogène, comme le cytochrome c [65]; on observe alors une faible production de NO^{*} (environ 6% de celle des WT en présence de CaM) [62, 113]. En présence de calmoduline, on retrouve les vitesses de transfert électronique des types sauvages (3s⁻¹ pour nNOS et 3.10⁻³s⁻¹ pour eNOS), mais on a une production de NO^{*} plus faible (33% de celle du WT pour eNOS et 45% pour nNOS)[62, 65, 113]. Cela suggère que la vitesse de réduction de l'hème chez les cNOS est limitée, de façon à optimiser la production et la libération de NO^{*}[125]. En effet, dans le cas de nNOS, qu'une réduction plus rapide de l'hème conduit à une augmentation de la production de NO^{*} mais à une diminution de sa libération dans le milieu, car il forme alors avec l'hème des complexes Fe^{II}NO ou Fe^{III}NO dont la dissociation est encore plus lente que dans le cas de iNOS[65] : à l'état stationnaire, ces complexes inactifs représentent environ 75% des enzymes[125].

1.4.3. Cofacteur H₄B et dimérisation

En plus d'assurer le couplage entre la réduction de l'hème et la production de monoxyde d'azote, et de limiter la formation de RNOS[16, 70, 81, 114], le cofacteur biophtérine est impliqué dans la régulation de l'activité des NO-synthases. En effet, les NOS ne sont actives que sous forme d'homodimère[62, 66] et le cofacteur biophtérine joue un rôle primordial dans la formation et la stabilisation de ce dernier[62, 87]. La fixation de H₄B protège également l'extrémité N-terminale de la protéolyse[87]. Or, c'est là qu'on trouve le site de fixation du zinc, qui participe lui-aussi à la stabilisation du dimère[62, 72].

Les dimères de eNOS, nNOS et iNOS ne présentent pas la même résistance face à des agents dénaturants, tels que le SDS ou l'urée. Dans tous les cas, on retrouve le même ordre de stabilité : iNOS < nNOS < eNOS[126]. Ces différences de stabilité peuvent notamment être expliquées par des différences de surface d'interaction entre les trois isoformes [20, 62-64]. Elles permettent, de plus, de concevoir des inhibiteurs sélectifs de la NOS inductible, basés sur le blocage de la dimérisation[62].

On note également que la fixation du cofacteur H₄B et du substrat arginine est coopérative et qu'elle permet la conversion du Fe^{III} BS en Fe^{III} HS, compétent pour la catalyse[87]. De plus, la présence de H₄B diminue la vitesse de fixation de certains ligands inhibiteurs de l'hème, comme le monoxyde de carbone, et stabilise la liaison thiolate[87]. Enfin, on remarque que, comparée aux autres enzymes qui utilisent la biophtérine comme cofacteur, l'affinité des NOS pour H₄B est particulièrement élevée, ce qui souligne le rôle crucial que joue ce cofacteur dans l'activité des NO-synthases[87]. Son implication dans l'étape d'activation de l'oxygène est une spécificité des NOS puisque, pour les cytochromes P450, c'est la réductase qui fournit cet électron[61].

2. NOS-like proteins bactériennes

2.1. Découverte des NOS-LP

Suite au séquençage massif de génomes, des protéines homologues aux NO-synthases ont pu être identifiées dans plusieurs centaines d'organismes, répartis dans tous les règnes du vivant. Cependant, ces enzymes n'exercent pas nécessairement une activité « NO synthase » et, dans ce cas-là, on parle plutôt de protéines semblables aux NOS, ou *NOS-like proteins* (NOS-LP).

2.1.1. NO-synthases eucaryotes

Les NO-synthases sont assez largement réparties au sein du règne animal, aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés[127]. On trouve ainsi des NOS chez les mammifères, mais également chez des oiseaux (*Gallus gallus*), des reptiles (*Aspidoscelis uniparens*) ou des poissons (*Cyprinus carpio*). Concernant les invertébrés, des NOS ont été identifiées chez des insectes (*Drosophila melanogaster*), des mollusques, terrestres (*Limax valentianus*) ou marins (*Sepia officinalis*), des crustacés (*Portunus trituberculatus*, *Penaeus monodon*), et même certains cnidaires (*Discosoma striata*)[61].

Concernant les plantes, la présence de NO-synthases, homologues aux enzymes animales, a longtemps fait débat. En effet, le monoxyde d'azote est impliqué dans de nombreux processus physiologiques, dont le développement et la réponse à différents types de stress. Il existe donc chez les plantes de nombreuses voies de synthèse du NO^{*}, enzymatiques ou non, et la présence de ce dernier n'est donc pas nécessairement lié à la présence d'une NOS-LP[128]. La première NOS-LP identifiée dans le règne végétal est celle d'une algue verte unicellulaire, *Ostreococcus tauri*, qui possède, comme les NOS de mammifères, un domaine oxygénase et un domaine réductase[129] (Figure 16). Actuellement, on recense 19 algues vertes contenant une séquence homologue à celle du domaine oxygénase des NOS de mammifères (NOSoxy) ; elles possèdent également une séquence homologue au domaine réductase des NOS de mammifères (NOSred), ou à une partie de celui-ci, qui est fusionné au domaine oxygénase pour 14 d'entre elles[128]. On trouve aussi une NOSoxy chez une algue brune (*Sargassum muticum*) et une NOS entière chez une algue rouge (*Rhodochaete parvula*)[128]. Aucune séquence homologue à celle des NOS de mammifères n'a pu être identifiée parmi les génomes de plantes terrestres actuellement disponibles (base de données 1KP)[128].

Chez les autres eucaryotes, peu de protéines homologues aux NOS de mammifères (mNOS) sont actuellement recensées et, pour la plupart, leur caractérisation demeure incomplète. On peut tout de même noter la présence d'une NOS-LP plus particulièrement étudiée chez une amibe (*Physarum polycephalum*)[130, 131] et l'identification d'une séquence homologue à celle des NOS de mammifère dans des génomes de champignons (*Aspergillus oryzae*)[61, 128]. Ces dernières n'ont toutefois pas été caractérisées et on ne connaît donc ni leur structure, ni leur(s) activité(s).

2.1.2. NOS-LP procaryotes

2.1.2.1. Cas des archées

Aucun homologue de NOS entière n'a, à ce jour, été identifié chez une archée. On trouve tout de même une séquence homologue à celle de NOSoxy chez *Natronomonas pharaonis*[132], ainsi que chez quatre autres archées. Aucune de ces enzymes n'a fait l'objet d'une caractérisation et on ne sait donc pas si elles exercent effectivement une activité « NO synthase ».

2.1.2.2. Cas des bactéries

Comme pour les plantes, il existe, chez la plupart des bactéries, de nombreuses voies de production du monoxyde d'azote, notamment *via* la nitrate réductase[18]. La présence de NO[•] n'implique donc pas nécessairement la présence d'une NOS-LP. Certaines bactéries présentent néanmoins des activités très similaires à celles des mNOS : *Nocardia* dont la production de citrulline nécessite la présence d'arginine et de NADPH et diminue en présence d'inhibiteurs de mNOS [18, 19, 133] et *Salmonella typhimurium* qui possède une enzyme produisant du NO[•] et de la citrulline[19, 134]. Cependant, ni *Salmonella typhimurium*, ni aucune des espèces de *Nocardia* séquencées ne possède de gène homologue à celui des mNOS[19].

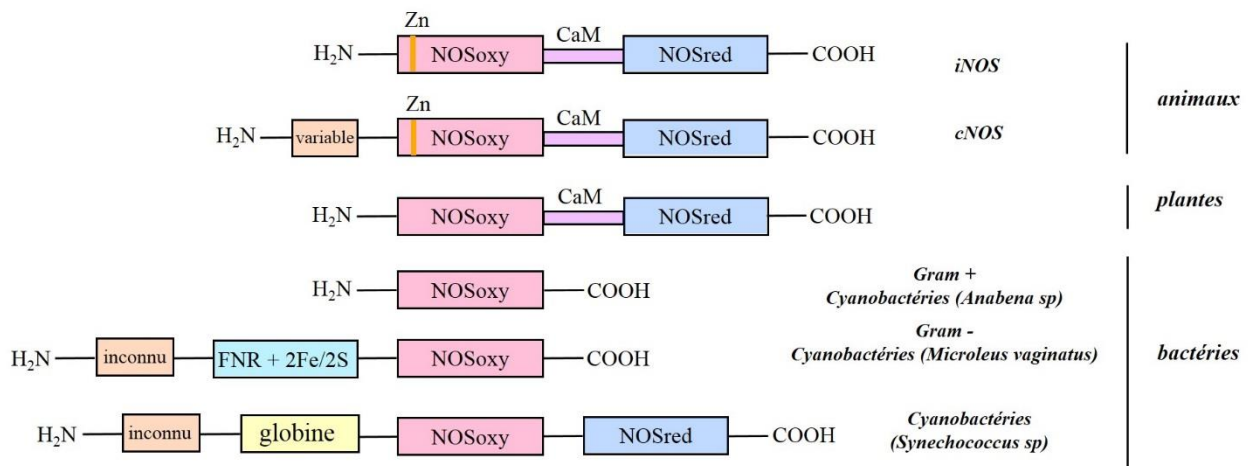


Figure 16- Organisation des NOS-like proteins identifiées chez les animaux, les plantes et les bactéries.

Depuis les 20 dernières années, des séquences homologues à NOSoxy ont toutefois été identifiées dans différentes bactéries[30, 135, 136]. Il s'agit principalement de bactéries Gram positives, appartenant aux genres *Bacillus*, *Deinococcus*, *Geobacillus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus* et *Streptomyces*[19, 61] (Figure 16). Certaines de ces enzymes ont été caractérisées et on a pu mettre en évidence leur capacité à produire du NO[•], *in vitro*[22, 24, 137] ou *in vivo*[138-140]. Chez certaines cyanobactéries, des NOS entières (*Synechococcus* sp) ou

avec un domaine réductase modifié (*Microcoleus vaginatus*), ainsi que des domaines oxygénases seuls (*Anabena sp*) ont été identifiés ; on a également pu mettre en évidence la présence d'un domaine globine chez *Synechococcus sp* (Figure 16). Concernant les bactéries Gram négatives, une seule NOS-LP, entière, a été identifiée, chez *Sorangium cellulosum*, et caractérisée[141].

2.2. Structure des NOS bactériennes

On ne s'intéresse, dans la suite de ce chapitre, qu'aux NOS-LP bactériennes issues de bactéries Gram positives et composées uniquement d'un domaine oxygénase. On utilisera alors simplement les termes « NOS bactériennes » ou « bacNOS » pour désigner ces enzymes.

2.2.1. Caractéristiques générales

Parmi toutes les bacNOS identifiées, seules quelques-unes ont été purifiées et caractérisées ; il s'agit principalement des bacNOS issues de *Bacillus anthracis* (baNOS)[142], *Bacillus subtilis* (bsNOS)[24], *Deinococcus radiodurans* (deiNOS)[22], *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS)[23] et *Staphylococcus aureus* (saNOS)[137]. Toutes sont capables de lier les substrats arginine et NOHA, ainsi que le cofacteur H₄B. Elles présentent environ 40% d'identité de séquence entre elles, et avec les domaines oxygénase des NOS de mammifères ; certaines zones sont particulièrement conservées, notamment au niveau du site actif et de l'interface de dimérisation[21, 23, 142].

On dispose de structures cristallographiques pour trois bacNOS : bsNOS, gsNOS et saNOS. Toutes trois sont sous forme de dimère et présentent un repliement semblable à celui des mNOS[21, 23, 143](Figure 17). On retrouve en effet un cœur composé principalement de feuillets β , et entouré d'hélices α , ainsi que la forme caractéristique du site actif des NOS, souvent comparé à un gant de baseball[71]. La plupart des délétions mises en évidence par l'alignement des séquences sont situées dans des boucles, flexibles et relativement exposées au solvant, et n'ont donc que peu d'influence sur la structure globale de la protéine[143].

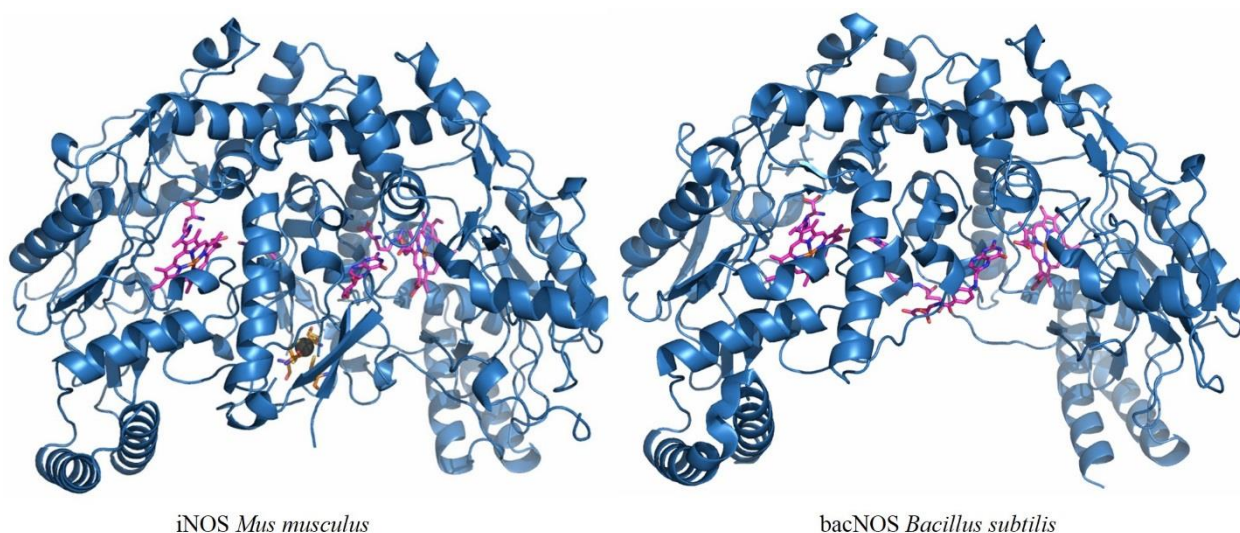


Figure 17- Structures des dimères de *Mus musculus* iNOS (gauche) et de bsNOS (droite) montrant notamment l'hème, le substrat et le cofacteur en magenta, les quatre résidus cystéines qui lient le zinc (iNOS C104 et C109) en orange et le zinc en noir (iNOS).

Figures réalisées avec Pymol à partir des structures PDB 1NOD et 3E7M pour iNOS et 1M7V pour bsNOS.

2.2.2. Site actif et fixation du substrat

Le site actif des NO-synthases est extrêmement bien conservé entre les enzymes de mammifères et leurs homologues bactériennes, que ce soit au niveau de la séquence en acides aminés ou de la structure tridimensionnelle.

Les résidus en interaction avec l'hème (Van der Waals, liaisons hydrogène) sont conservés entre les mNOS et les bacNOS (Figure 18) [21, 23, 143]. En particulier, on retrouve, dans l'environnement proximal de l'hème, une cystéine (C72 pour bsNOS et C194 pour iNOS de *Mus musculus*) qui lie l'atome de fer, ainsi qu'un résidu tryptophane (W66 pour bsNOS et W188 pour iNOS de *Mus musculus*) qui forme une liaison hydrogène avec la cystéine [21, 23, 143]. Cette liaison permet de moduler la densité électronique présente sur le fer et influence fortement le potentiel redox de l'hème et donc sa réactivité [144-147].

La structure de bsNOS, résolue en présence d'arginine et de NOHA, montre que le site de fixation du substrat ainsi que l'orientation de ce dernier, avec le motif guanidinium qui pointe vers l'hème, sont semblable à ceux des mNOS [21]. La plupart des interactions des substrats avec les acides aminés du site actif, ainsi qu'avec les groupements propionates de l'hème sont aussi conservés [21]. Dans le cas de saNOS, cristallisée en présence d'un inhibiteur (SEITU) qui occupe le site de fixation de l'arginine, on a également un mode de fixation semblable à celui observé pour iNOS et eNOS [143]. La structure de gsNOS, quant à elle, montre un site actif plus compact que dans le cas de bsNOS [23].

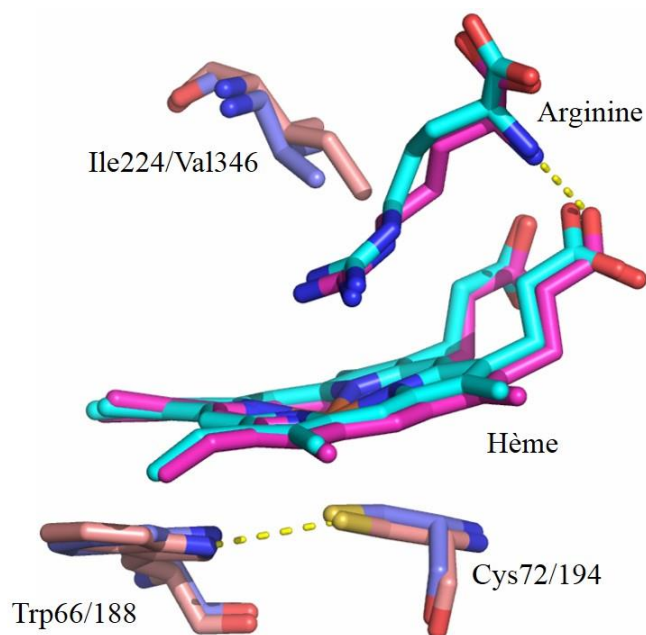


Figure 18- Superposition des sites actifs bsNOS (1M7V, en bleu) et de iNOS (1NOD, en rose).
 Les liaisons hydrogène représentées en pointillés jaunes sont issues de la structure de bsNOS.
 Figure réalisée avec Pymol.

Au niveau du site actif, il existe une unique différence conservée entre les NOS bactériennes et mammifères : au-dessus de l'hème, les NOS de mammifères possèdent une valine (V346 pour iNOS de *Mus musculus*), alors que les NOS bactériennes possèdent un résidu isoleucine (I224 pour bsNOS) qui porte un groupement méthyl supplémentaire[27]. Cette substitution Val/Ile étant l'unique différence, du point de vue de la séquence, entre les sites actifs de mNOS et bacNOS, elle a fait l'objet de nombreuses études. Elles seront détaillées au chapitre III de cette thèse qui porte sur l'étude des mutants croisés bsNOS I224V et iNOS V346I.

2.2.3. Site de fixation et nature du cofacteur

De nombreux résidus impliqués dans la fixation du cofacteur biptérine, *via* des liaisons hydrogène ou des interactions de Van der Waals, sont conservés entre les mNOS et leurs homologues bactériennes. Parmi les résidus conservés, on trouve notamment ceux qui forment des liaisons hydrogène avec le noyau ptérine bicyclique de H₄B[21, 23, 143](Figure 19). Le résidu tryptophane en interaction $\pi - \pi$ avec ce noyau ptérine (W335 pour bsNOS et W457 pour iNOS) est aussi conservé (Figure 19) et la phénylalanine (F337 pour bsNOS et F470 pour iNOS) du monomère adjacent, également en interaction $\pi - \pi$ avec H₄B, est remplacée par une tyrosine chez saNOS et un tryptophane chez deiNOS qui sont tous deux aromatiques et peuvent donc participer à la stabilisation du cofacteur[143]. En effet, les NOS bactériennes sont capables de

fixer le cofacteur H₄B avec, pour certaines, une affinité d'ordre de grandeur comparable à celui des NOS de mammifères[22-24, 148, 149].

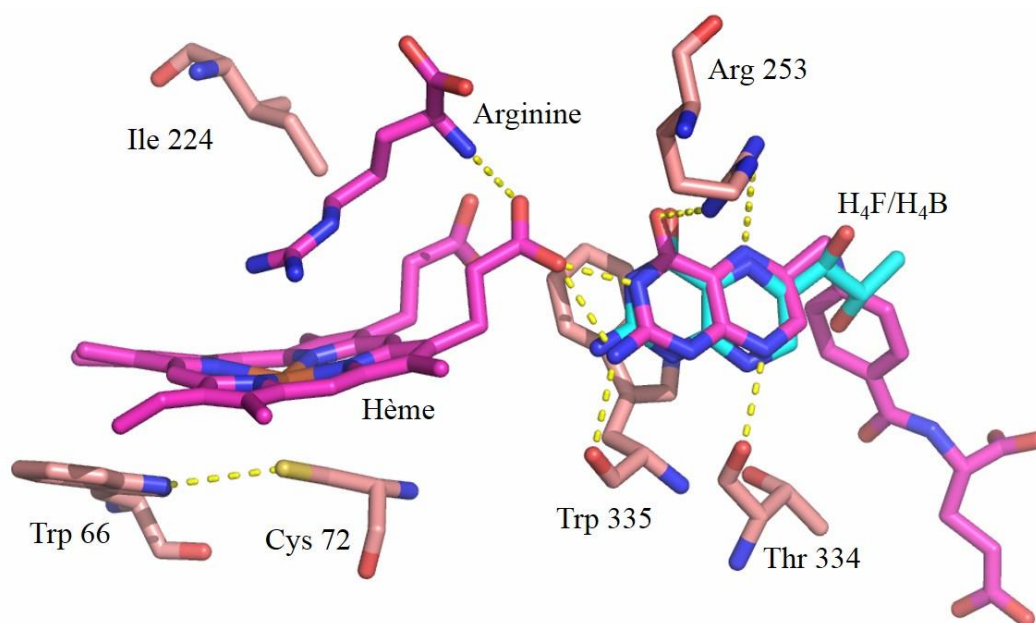


Figure 19- Fixation du cofacteur tétrahydrofolate (H₄F) au sein de bsNOS (1M7V).
 Les pointillés jaunes représentent des liaisons hydrogènes. Le cofacteur H₄B issu de iNOS 1NOD (cyan) est également représenté pour comparaison.
 Figure réalisée avec Pymol.

La partie du site de fixation de la biopptérine en interaction avec la chaîne latérale de cette dernière n'est, quant à elle, pas conservée entre mNOS et bacNOS[21, 23, 143]. De plus, les bacNOS ne comportant pas l'extension N-terminale impliquée notamment dans la fixation du zinc, leur site de fixation du cofacteur est plus ouvert et plus exposé au solvant que celui des mNOS[21, 23, 143]. Il peut donc accommoder des molécules plus volumineuses que H₄B. Ainsi, saNOS a été cristallisée en présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) qui occupe le site de fixation de H₄B grâce à la structure bicyclique et partiellement aromatique de l'adénine et malgré une chaîne latérale encombrante[143]. De même, le site de fixation du cofacteur de bsNOS peut accommoder le tétrahydrofolate (H₄F), qui possède le même noyau ptérine que H₄B mais une chaîne latérale plus volumineuse (Figure 20). Au niveau du noyau ptérine, il forme les mêmes interactions avec les acides aminés environnants que H₄B (Figure 19) et présente une surface enfouie semblable à celle observée pour H₄B au sein de iNOS[21]. L'extension N-terminale des mNOS les empêche d'accueillir la chaîne latérale du H₄F[24].

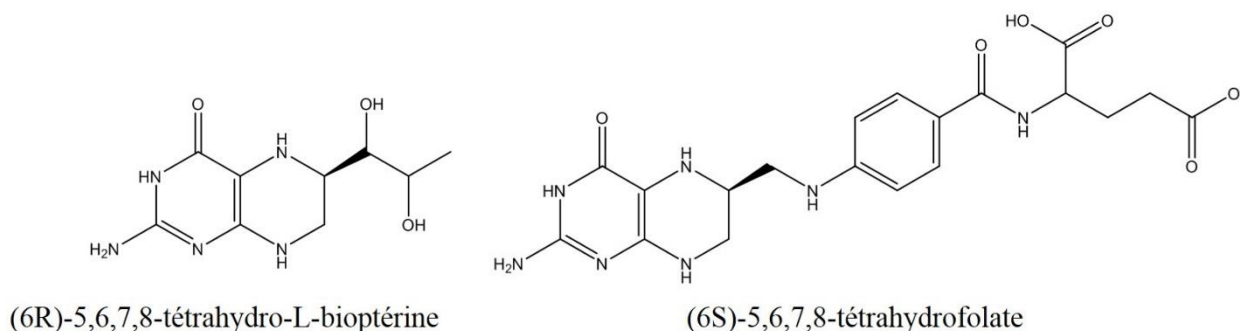


Figure 20- Formules chimiques des cofacteurs tétrahydrobioptérine (gauche) et tétrahydrofolate (droite).

La versatilité du site de fixation du cofacteur des bacNOS semble indiquer que, contrairement à celui des mNOS, il n'est pas parfaitement optimisé pour la fixation de la tétrahydrobioptérine. De plus, certaines bactéries contenant une NOS-LP ne possèdent pas les enzymes nécessaires à la biosynthèse du H₄B. C'est notamment le cas de *Deinococcus radiodurans*[30]. Il a donc été suggéré que les bacNOS pourraient utiliser le tétrahydrofolate à la place (Figure 20) : ce cofacteur est présent chez la plupart des bactéries et il peut se fixer aux bacNOS[21, 22, 149]. Son noyau ptérine lui confère également des propriétés redox et il a été montré qu'il permettait la production de NO[•] par la bacNOS de *Deinococcus radiodurans*[28].

2.2.4. Stabilité du dimère

Tout comme les mNOS, les bacNOS cristallisées en présence d'un cofacteur et d'un ligand au sein du site actif (substrat, inhibiteur) sont sous forme dimérique[21, 23, 143]. Il a également été montré qu'elles formaient des dimères stables en solution, en présence de substrat (Arg ou NOHA) et d'un cofacteur (H₄B ou H₄F)[22, 24, 137]. Les structures cristallographiques indiquent que les dimères de bacNOS sont semblables à ceux des mNOS : les monomères adoptent la même conformation et le même mode d'association et les feuilletts β situés à l'interface de dimérisation sont conservés[21, 23, 143]. Cependant, la surface d'interaction entre les deux monomères est nettement plus faible dans le cas des bacNOS (1115 Å² pour bsNOS et 2115 Å² pour iNOS) et leur orientation l'un par rapport à l'autre est légèrement différente[21, 143]. De plus, les bacNOS ne possèdent pas l'extension N-terminale impliquée dans la fixation du zinc et indispensable à la stabilité du dimère des mNOS. Ainsi, iNOSoxy Δ 114, dont la partie N-terminale tronquée est tout de même plus longue que celle de bsNOS, est inactive et ne peut former de dimère stable[150].

Lorsqu'elles sont purifiées en absence de substrat et de cofacteur, les NOS de mammifères forment, en solution, un dimère dit *loose* ; l'ajout d'arginine et de H₄B induit un changement de conformation qui conduit au dimère fonctionnel, dit *tight*[151]. Ce dimère *loose* est plus sensible à la protéolyse[150], il se dissocie plus facilement en présence de détergents que le dimère *tight*[115, 152] et son hème est plus exposé au solvant[153]. Dans le cas de

bsNOS, en absence de substrat et de cofacteur, les dimères *tight* et *loose* sont en équilibre et ont pu être co-cristallisés, ce qui suggère une plus grande stabilité de bsNOS, comparée aux mNOS[154]. On dispose donc d'une structure tridimensionnelle pour le dimère *loose* de bsNOS (code PDB 2AMO) qui présente des caractéristiques compatibles avec les propriétés des dimères *loose* de mNOS. Tout d'abord, on constate que l'hème est effectivement plus exposé au solvant que dans la structure du dimère *tight*. De plus, en présence de substrat et de cofacteur, on observe une conversion complète en dimère *tight*, en solution comme au sein du cristal. La réduction du fer hémique permet aussi d'induire ce changement conformationnel[154]. On remarque également que le dimère est plus étendu, avec les deux hèmes plus éloignés l'un de l'autre (Figure 21) et une surface d'interaction bien plus faible ($480\text{\AA}^2$ vs $1115\text{\AA}^2$ pour le dimère *tight*), plus désordonné et plus flexible, et que l'extrémité N-terminale est plus exposée au solvant, ce qui expliquerait qu'il se dissocie plus facilement et soit plus sensible à la protéolyse[154].

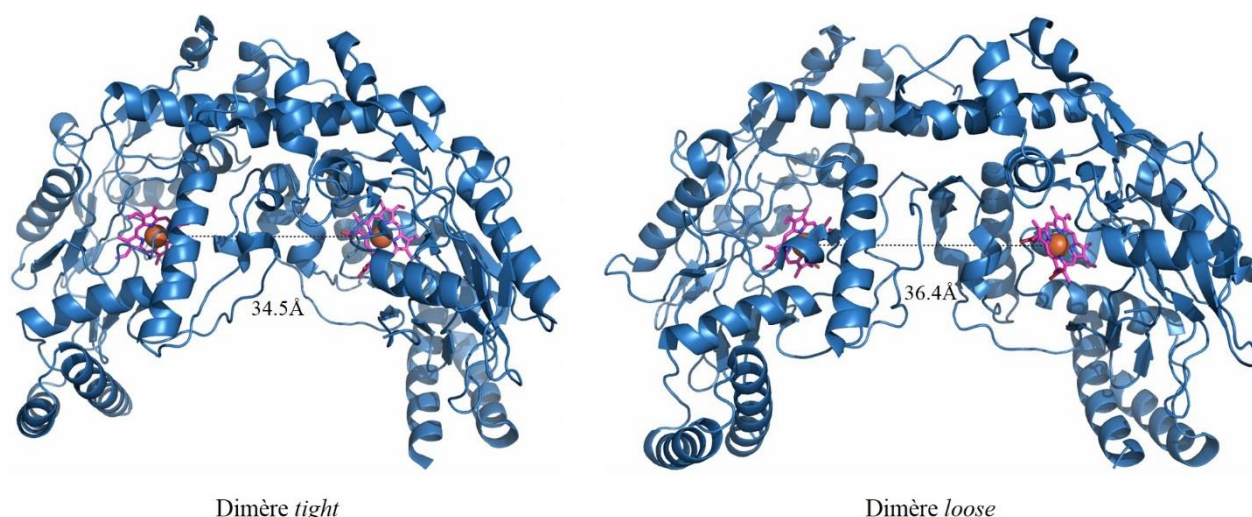


Figure 21- Structures des dimères *tight* (gauche) et *loose* (droite) de bsNOS, montrant la distance Fe-Fe.
Figures réalisées avec Pymol à partir des structures PDB 1M7V (dimère *tight*) et 2AMO (dimère *loose*).
Pour plus de lisibilité, l'arginine et le H_4F présents dans le dimère *tight* (gauche) ne sont pas représentés sur cette figure.

En présence de substrat et de cofacteur, les NOS bactériennes forment des dimères d'une stabilité comparable à celle des dimères de mNOS[21, 22, 137]. De plus, certaines d'entre elles sont capables de former un dimère stable en absence de substrat et de cofacteur[24, 142, 155] alors que dans ces conditions, les mNOS n'existent que sous forme de dimère *loose*, facilement dissociable. Cela est d'autant plus surprenant que plusieurs résidus impliqués dans la stabilisation du dimère chez les mammifères, comme les cystéines qui fixent le zinc, sont absents des bacNOS[21, 23, 143]. Les résidus et les mécanismes garants de l'intégrité du dimère des bacNOS restent donc à déterminer.

2.3. Mécanisme catalytique

Comme pour les mNOS, l'état natif des bacNOS correspond à un Fe^{III} , qui doit donc être réduit en Fe^{II} pour pouvoir lier l'oxygène. Les bacNOS ne comportant pas de domaine réductase, elles ne peuvent fonctionner de manière autonome et possèdent donc, *in vivo*, un ou plusieurs partenaire(s) redox qui ne sont, à ce jour, pas clairement identifiés[25, 26]. Malgré cela, on considère généralement que les bacNOS catalysent la même réaction que leurs homologues mammifères : l'oxydation en deux étapes de la L-arginine en N^{ω} -hydroxy-L-arginine (NOHA) puis en L-citrulline et monoxyde d'azote.

2.3.1. 1^{ère} étape : identique aux mNOS

Les NOS bactériennes présentant un site actif extrêmement semblable à celui des NOS de mammifères, il a naturellement été postulé qu'elles réalisaient l'hydroxylation de l'arginine selon le même mécanisme (Figure 12). La fixation du dioxygène par le Fe^{II} conduit à la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ qui est réduit par le cofacteur biotépine pour former un radical $\text{H}_4\text{B}^{\bullet}$ ainsi qu'un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_2^-$. L'oxygène distal subit alors une double protonation qui permet la rupture hétérolytique de la liaison O-O, accompagnée de la libération d'une molécule d'eau, et la formation du *Compound I*. L'oxydation de l'arginine par ce dernier conduit à la formation du NOHA et du Fe^{III} final[85]. Les mécanismes de régénération du cofacteur et de réduction du Fe^{III} natif en Fe^{II} , qui impliquent un électron provenant du domaine réductase chez les mNOS, seront abordés au paragraphe 2.3.3.

Les données expérimentales actuellement disponibles sont compatibles avec ce mécanisme catalytique. En effet, comme pour les mNOS, l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2/\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_2^-$ a pu être observé et caractérisé[22, 24, 148]. On a également montré que sa disparition était accélérée par la présence d'un cofacteur H_4B ou H_4F [22, 24, 28, 147, 148], ce qui indique qu'ils seraient tous deux compétents pour transférer un électron à l'hème et éviter ainsi l'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et la libération de superoxyde. Le rôle redox du H_4B a aussi été confirmé par l'observation d'un radical biotépine protoné H_4B^+ [31]. Comme pour les mNOS, la suite du mécanisme est plus incertaine puisque le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est le dernier intermédiaire catalytique observé en solution avant la formation du Fe^{III} final[22, 24, 148]. Un complexe ferrique-hydroperoxo a néanmoins pu être observé, après cryo-réduction (77K) de gsNOS en présence d'oxygène, qui se convertit en Fe^{III} -NOHA à plus haute température[156]. Cela tend à confirmer le passage par un intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ en solution mais ne permet pas de conclure quant à la formation du *Compound I*.

La formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$, et *a fortiori* d'un *Compound I*, nécessite la protonation de l'oxygène distal du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Le radical biotépine observé étant sous forme H_4B^+ , le transfert d'un proton provenant du cofacteur est peu probable, bien qu'on ne puisse, comme par les mNOS, pas totalement l'exclure[31]. De plus, le fait qu'un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ puisse se former à 77K, où la mobilité est extrêmement réduite, implique un transfert

de proton à courte distance[156]. Or, il a été montré que l'oxygène distal du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ était impliqué dans un réseau de liaisons hydrogène, avec une molécule d'eau et le substrat arginine, et pouvait donc aisément capter un proton[29]. La protonation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ *via* cette molécule d'eau distale, et le passage par un *Compound I*, apparaît donc comme le scénario le plus probable pour l'hydroxylation de l'arginine par les NOS bactériennes[157].

2.3.2. 2^{ème} étape : un nouveau mécanisme ?

Le mécanisme moléculaire d'oxydation du NOHA par les bacNOS est actuellement assez mal défini, et, contrairement à la 1^{ère} étape, il n'existe pas de consensus concernant la nature des intermédiaires réactionnels et des éventuels donneurs de proton(s) et d'électron(s). Comme pour les mNOS, le Fe^{II} fixe le dioxygène pour former un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ dont l'activation, par réduction, conduit à la formation d'un complexe hémique capable d'oxyder le NOHA pour donner la citrulline et un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. Ce dernier est alors oxydé en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ capable de libérer le monoxyde d'azote et de reformer le Fe^{III} natif[85](Figure 13). Seuls les intermédiaires $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ ont pu être observés en solution[23, 24, 28, 148] et on n'a donc aucune certitude concernant la nature de l'espèce oxydante et la formation catalytique d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. Un complexe ferrique-peroxo a toutefois été observé après cryo-réduction (77K) de gsNOS, saturée en NOHA et H_4B , en présence d'oxygène et il se convertit en complexe ferrique-hydroperoxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ à 160K[156]. La caractérisation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence de NOHA montre que c'est l'oxygène proximal qui forme une liaison hydrogène avec le NOHA (directement ou *via* une molécule d'eau), ce qui n'est pas favorable à la rupture hétérolytique de la liaison O-O observée dans la 1^{ère} étape, et à la formation du *Compound I*[29]. De plus, la molécule d'eau distale impliquée dans la protonation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ dans la première étape est, comme chez les mNOS, absente en présence de NOHA[157]. L'attaque du NOHA par un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ est donc, comme pour les mNOS, l'hypothèse la plus probable. Les expériences de cryo-réduction sur gsNOS ont mis en évidence la formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ qui résulterait de la fixation du nitroxyde $\text{NO}^\cdot$ produit en même temps que la citrulline, sur le Fe^{III} [156]. Un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ a aussi été piégé en solution pendant la réaction de bsNOS (Fe^{II}) avec le dioxygène, en présence de NOHA et de H_4B , mais en très faible quantité[31]. Les données expérimentales indiquent qu'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ peut effectivement se former au cours de la réaction d'oxydation du NOHA, mais elles ne permettent pas d'affirmer qu'il s'agit effectivement d'un intermédiaire catalytique.

L'origine de l'électron nécessaire à l'activation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ reste également à déterminer (la question de la réduction du Fe^{III} natif en Fe^{II} sera traitée au paragraphe 2.3.3). Contrairement aux mNOS, on n'a jamais pu observer de radical biophtérine pendant l'oxydation du NOHA par une bacNOS, ce qui, toutefois, ne permet pas d'exclure sa formation[31]. En effet, il est possible qu'un radical se forme mais que sa disparition soit trop rapide et qu'il ne s'accumule donc pas suffisamment dans le milieu pour être détecté. Etant donnée sa vitesse de formation chez bsNOS

(basée sur la vitesse de disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ mesurée expérimentalement), il faudrait qu'il disparaisse environ dix fois plus rapidement que dans le cas de iNOS pour que sa concentration maximale reste en-dessous du seuil de détection[31]. Tous les intermédiaires réactionnels observés disparaissant plus lentement dans le cas de bsNOS que dans celui de iNOS[24, 27], cette hypothèse semble peu probable, à moins d'envisager un mécanisme complètement différent. Il a ainsi été montré que, lors de la dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, le NO^* pouvait former un adduit avec le radical ptérine[158]. Dans ce cas, la disparition du radical ptérine se ferait à la même vitesse que celle du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et serait donc assez lente pour permettre l'accumulation et la détection de celui-ci[24]. La formation de cet adduit ne permet donc pas d'expliquer le fait qu'on n'observe pas de radical ptérine lors de la 2^{ème} étape du cycle catalytique des bacNOS. On peut également supposer qu'on ne forme pas de radical ptérine et que le cofacteur n'est donc indispensable que pour l'hydroxylation de l'arginine. Il a cependant été montré que, comme pour les mNOS, l'ajout d'un cofacteur ptérine H_4B ou H_4F permet d'accélérer la disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, ce qui suggère qu'il serait impliqué dans le processus de transfert d'électron et d'activation de l'oxygène[22, 24, 29]. De plus, en absence de cofacteur, ou en présence d'un cofacteur oxydé et donc inactif d'un point de vue redox, on ne détecte pas de complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, ce qui indique que l'enzyme ne produit pas de NO^* , et on ne forme pas de citrulline. [24, 28, 29, 147]. On peut donc envisager un mécanisme catalytique dans lequel le cofacteur ne réduirait pas directement le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, mais servirait de relais dans le processus de transfert d'électron.

Enfin, si, au cours du cycle catalytique, le système ne cède pas l'électron qu'il a reçu pour l'activation de l'oxygène, la réaction d'oxydation du NOHA ne conduit pas à la formation de monoxyde d'azote NO^* , mais de nitroxyle NO^* . Or, la production de NO^* par les bacNOS a été mise en évidence *in vitro*, ce qui implique l'existence d'un second processus de transfert d'électron sur lequel on ne possède actuellement que très peu d'informations[24].

2.3.3. Réduction de l'hème et partenaire(s ?) redox

Les NOS bactériennes ne possédant pas de domaine réductase, leur activité requiert la présence d'un partenaire redox, capable de fournir l'électron nécessaire à la réduction du Fe^{III} hémique en Fe^{II} .

Les résidus impliqués dans l'interaction entre les domaines oxygénase et réductase des mNOS étant assez bien conservés chez les bacNOS, différentes équipes ont cherché à savoir si un transfert d'électron entre le domaine réductase d'une mNOS (NOSred) et l'hème d'une bacNOS était possible. Plusieurs types de constructions ont été mis en place pour tester cette hypothèse. Dans le cas de deiNOS, on a utilisé un mutant de nNOS qui ne peut se dimériser mais peut former un hétérodimère avec le type sauvage, de façon à former un hétérodimère deiNOS/nNOS[22]. Même en absence de calmoduline, ce dimère est actif et produit de la citrulline et du monoxyde d'azote. Le transfert d'électron n'étant pas possible entre les

domaines réductase et oxygénase d'un même monomère, l'activité observée n'a pu être réalisée qu'au sein du site actif de deiNOS. La production de citrulline par deiNOS, ainsi que par bsNOS, a également été observée lorsque nNOSred libre est introduite dans le milieu réactionnel ce qui suggère que le partenaire redox *in vivo* des bacNOS serait assez semblable au domaine réductase des mNOS[22, 24].

Les recherches de partenaires redox *in vivo* se sont concentrées sur bsNOS : c'est la bacNOS la mieux caractérisée et le génome de *Bacillus subtilis* est l'un des rares (parmi ceux des bactéries contenant une NOS-LP) à avoir été entièrement séquencé[135]. Ce dernier contient environ 90 gènes codant pour des réductases parmi lesquelles on trouve notamment une NADPH-P450 réductase homologue de NOSred (CysJ), deux flavodoxines (YkuN et YkuP), et une flavodoxine réductase (YumC)[25, 26, 159]. Il a été montré, *in vitro*, qu'en présence d'une flavodoxine réductase exogène (FLDR d'*Escherichia coli*), de YkuN, de bsNOS et des substrats et cofacteurs de ces enzymes, on avait une réduction efficace de l'hème et une production catalytique de NO[•]. YkuP supporte aussi la catalyse mais est moins efficace que YkuN[25]. Le remplacement de la FLDR d'*E. coli* par YumC augmente l'efficacité de la catalyse[159]. Il existe donc chez *Bacillus subtilis*, un système autonome à trois composants, YumC, YkuN et bsNOS, qui catalyse la même réaction que les NOS de mammifères : l'oxydation du NADPH et de l'arginine en citrulline et NO[•], en présence des cofacteurs H₄B, FAD et FMN[159]. La fusion de bsNOS et YkuN permet d'augmenter l'activité d'un facteur huit ce qui indique que, comme pour mNOS, c'est le transfert électronique entre le FMN (ici YkuN) et l'hème qui est l'étape limitante[159]. Enfin, l'ajout de YumC en excès entraîne une diminution de l'activité ce qui indique qu'on a une compétition entre YumC et bsNOS pour l'interaction avec YkuN. On peut donc envisager, comme pour les mNOS, un site unique sur YkuN (le domaine FMN) qui lui permet d'interagir soit avec YumC (le domaine FAD), soit avec bsNOS (le domaine oxygénase)[159].

Cependant, la délétion de YkuN, YkuP ou CysJ n'affecte pas la production de nitrites par *Bacillus subtilis*, ce qui indique qu'aucun d'eux n'est indispensable au fonctionnement de bsNOS et suggère que les bacNOS pourraient fonctionner sans partenaire redox dédié[26]. Ceci ne limiterait pas nécessairement l'activité de l'enzyme puisque *Bacillus subtilis* possède environ 40 réductases dont les fonctions sont actuellement inconnues[26, 135]. Cette hypothèse semble également confirmée par l'absence d'homologue de NOSred dans les génomes de certaines bactéries possédant une bacNOS, comme *Deinococcus radiodurans*[30], et par le fait que toutes les bacNOS ne sont pas actives en présence de nNOSred[155]. De plus, chez les bactéries, les gènes codant pour des protéines qui fonctionnent ensemble sont généralement regroupés au sein d'un même opéron et on trouve le gène codant pour les bacNOS dans une grande variété d'opérons[26]. Enfin, il a été montré que bsNOS pouvait être active au sein d'*E. coli*, alors que cette dernière ne possède pas de NOS[26].

Il semble donc que les bacNOS possèdent un site d'interaction bien plus versatile que celui des mNOS leur permettant d'interagir avec une grande variété de partenaires redox, homologues ou non des réductases de NOS de mammifères.

2.4. Fonctions *in vivo*

2.4.1. Production de monoxyde d'azote ?

La synthèse de monoxyde d'azote par des bacNOS a été démontrée dans différentes conditions, *in vitro*. En conditions de *single-turnover*, ie quand le fer hémique est réduit chimiquement, qu'il n'y a pas d'excès de réducteur dans le milieu et donc que chaque enzyme ne peut effectuer qu'un seul cycle catalytique, bsNOS, deiNOS, gsNOS et saNOS saturées en NOHA et H₄B/H₄F réagissent avec le dioxygène et produisent du NO[•][23, 24, 28, 148, 160]. On observe cependant une plus grande proportion de découplage (0.84 citrulline/hème pour bsNOS vs 0.98 citrulline/hème pour iNOSoxy)[27] et la libération du NO[•] par les bacNOS (0,23s⁻¹ pour bsNOS et 0,04s⁻¹ pour gsNOS) est dix à cinquante fois plus lente que pour les mNOS (2,3s⁻¹ pour iNOS)[160], ce qui suggère que les bacNOS pourraient séquestrer le NO[•] produit afin de former d'autres oxydes d'azote (NO⁻, NO₂⁻) ou de réaliser des réactions de nitration ou nitrosation. Pour bsNOS et deiNOS, saturées en H₄B, la production de NO[•] à partir de NOHA ou d'arginine a également été rapportée en conditions de *multiple-turnover*, ie en présence d'un partenaire redox (nNOSred ou YkuN/YumC) et de NADPH en excès qui permettent à l'enzyme d'effectuer plusieurs cycles catalytiques[22, 25]. On ne peut toutefois pas conclure directement quant au fonctionnement *in vivo* de deiNOS, puisque *Deinococcus radiodurans* ne possède pas d'homologue de nNOSred et ne peut réaliser la biosynthèse du cofacteur H₄B[22, 30].

La production de monoxyde d'azote *in vivo* et dépendante de la présence du gène *nos* a été observée pour *Bacillus subtilis*[161], *Bacillus anthracis*[140], *Deinococcus radiodurans*[162] et *Staphylococcus aureus*[163]. Cela nécessite l'utilisation d'une sonde intracellulaire car le NO[•] est très réactif, et donc instable en milieu aqueux. Il a de plus été montré, notamment pour *Streptomyces turgidiscabies* et *Deinococcus radiodurans*, que les effets de la délétion du gène *nos* étaient compensés par l'ajout d'un donneur de NO[•] dans le milieu de culture[162, 164]. Si ces résultats confirment que les bacNOS synthétisent du NO[•] *in vivo*, on ne connaît ni ses cibles biologiques, ni son mode d'action, et l'étude de mutants de délétion Δnos suggère une grande variété de fonctions pour les bacNOS, dont certaines sont présentées dans les paragraphes suivants.

2.4.2. Réactions de nitration

2.4.2.1. Cas de *Streptomyces turgidiscabies*

Streptomyces turgidiscabies est une bactérie à l'origine de la gale commune de la pomme de terre. Sa pathogénicité s'exerce *via* une famille de phytotoxines di-peptidiques, les thaxtomines. Elle possède un gène codant pour une bacNOS (stNOS) qui se trouve au sein de son îlot de pathogénicité, avec les gènes impliqués dans la biosynthèse des thaxtomines[165]. L'implication de stNOS dans la synthèse de l'une d'entre elles, la thaxtomine A (Figure 22), a donc été envisagée. En effet, le mutant de délétion *stΔnos* n'est pas pathogène pour la pomme de terre et ne produit que très peu de thaxtomine A (1% de la production du WT)[165], et la synthèse de la thaxtomine A est inhibée en présence de nitro-L-arginine méthyle ester (NAME) et de N-monométhyl-L-arginine (NMMA), deux inhibiteurs des mNOS[164]. De plus, l'utilisation d'arginine marquée ^{15}N a permis de montrer, *in vivo*, que stNOS était responsable de la nitration régiosélective (100%) en position 4 du motif tryptophanyl de la thaxtomine A. Cette réaction est originale puisque la plupart des réactions de nitration se font *via* l'oxydation d'une amine, et la nitration du tryptophane par le peroxyxynitrite (un possible produit secondaire de stNOS) conduit à un mélange de produits, le régioisomère 6-nitrotryptophane (Figure 22) étant majoritaire[165]. La sélectivité de la réaction suggère donc une nitration enzymatique du tryptophane et il a en effet été démontré que *Streptomyces turgidiscabies* possède un cytochrome P450 capable de réaliser cette réaction[166]. Le gène codant pour ce cytochrome est également situé au sein de l'îlot de pathogénicité et son expression est sous l'action du même promoteur que *stnos*. Un mécanisme a alors été proposé dans lequel le cytochrome fixerait le L-tryptophane et le NO^* qui serait alors oxydé par le dioxygène et formerait le NO_2 capable de nitrer le tryptophane au sein du site actif[166]. Le rôle de stNOS dans la synthèse de cette phytotoxine se limiterait donc à la production du NO^* ; la restauration de la production de thaxtomine A par le mutant *stΔnos* en présence de donneurs de NO^* confirme cette hypothèse[164, 165].

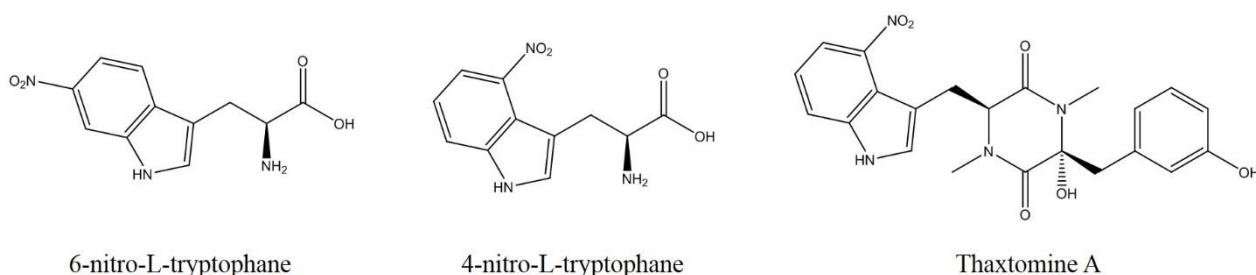


Figure 22- Formules chimiques du 6-nitrotryptophane, du 4-nitrotryptophane et de la thaxtomine A.

On trouve aussi un gène *nos* chez deux autres espèces de *Streptomyces* à l'origine de la gale commune de la pomme de terre, *Streptomyces acidiscabies* (GenBank AY204508) et

Streptomyces scabies (GenBank AY204509), qui produisent également de la thaxtomine A[165]. La présence d'un cytochrome P450 capable de nitrer spécifiquement le tryptophane reste toutefois à démontrer.

2.4.2.2. Cas de *Deinococcus radiodurans*

Dans le génome de *Deinococcus radiodurans*, on trouve deux gènes codant pour des tryptophanyl-ARN-synthétases (TrpRS) : TrpRSI, semblables aux autres TrpRS (40% d'identité de séquence) et TrpRSII qui ne présente que 28% d'identité de séquence avec les autres TrpRS connues[30, 34]. En plus de lier le tARN^{Trp}, comme toutes les TrpRS, la TrpRSII de *Deinococcus radiodurans* forme, *in vivo*, un complexe 1:1 avec deiNOS, ce qui n'est pas le cas de la TrpRSI. La formation de ce complexe TrpRSII:deiNOS permet d'augmenter la solubilité de deiNOS, son affinité pour l'arginine et son activité (production de nitrites)[34]. En plus de la production de nitrites, ce complexe catalyse la nitration régiosélective (100%) du tryptophane en position 4 (Figure 22) ; deiNOS seule peut également effectuer cette réaction mais de manière moins efficace[33].

Cette régiosélectivité, ainsi que le fait que la production de 4-nitrotryptophane ne soit affectée ni par la présence de superoxyde dismutase (SOD), ni par la présence de cystéine (peroxynitrite *scavenger*) indiquent que l'agent nitrant n'est pas le peroxynitrite et suggèrent une réaction enzymatique[33]. De plus, les cinétiques de saturation indiquent que le tryptophane se lie à deiNOS. Etant donné qu'un équivalent de H₄B suffit à inhiber complètement la production de 4-nitrotryptophane et que les interactions π - π qui stabilisent H₄B peuvent être conservées par le tryptophane (Figure 23), il a été proposé que le tryptophane utilise le site de fixation de la ptérine[33].

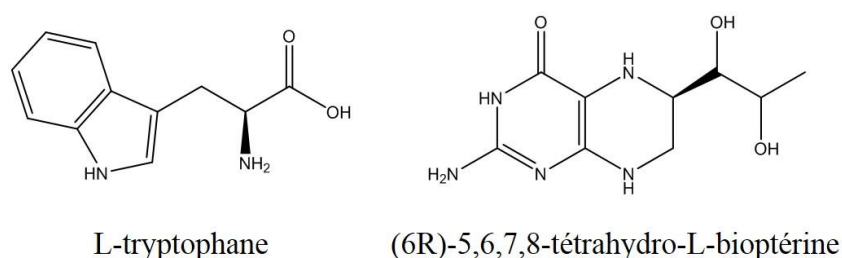


Figure 23- Formules chimiques du tryptophane et du cofacteur tétrahydrobioptérine.

L'ajout d'adénosine triphosphate (ATP) permet d'augmenter la production de 4-nitrotryptophane par le complexe TrpRSII:deiNOS mais n'a pas d'effet sur l'activité de deiNOS seule et n'interagit pas avec cette dernière. Comme l'ATP se fixe à TrpRSII et est nécessaire à l'adénylation du tryptophane, cela suggère que le 5'-adényl-tryptophane pourrait être un meilleur substrat pour la nitration que le tryptophane[33]. Dans tous les cas, le mécanisme de cette réaction reste, comme pour la nitration de la thaxtomine A par stNOS, à déterminer. De

plus, on ne connaît pas actuellement le rôle de ce 4-nitrotryptophane et rien n'indique qu'il soit incorporé dans des protéines ; il serait donc un intermédiaire dans la synthèse de métabolites secondaires[167].

2.4.3. Virulence et pathogénicité

Bacillus anthracis et *Staphylococcus aureus* sont des bactéries pathogènes potentiellement mortelles pour l'Homme. Toutes deux possèdent une bacNOS et il a été montré que cette dernière favorisait leur virulence et leur pouvoir pathogène.

Ainsi, des études sur des souches de *Staphylococcus aureus*, résistantes ou non à la méthicilline, ont montré, dans les deux cas, une sensibilité accrue des mutants de délétion *saΔnos* à l'action des neutrophiles[163,168]. De même, l'infection de souris par des spores de mutants *Δnos* de *Bacillus anthracis* (*baΔnos*) est plus lente que l'infection par des spores WT[169]. La dose létale (DL50) de spores de *baΔnos* est également plus élevée, de trois ordres de grandeur, que celle du WT, et la délétion du gène *nos* sensibilise la forme végétative de *Bacillus anthracis* à l'action des macrophages de l'hôte infecté[140]. De plus, l'ajout d'un inhibiteur de NOS dans le milieu favorise la survie des macrophages. L'un des modes d'action de *baNOS* passe par la S-nitrosylation de protéines nécessaires à la survie des macrophages, et impliquées notamment dans la réponse au stress et la respiration cellulaire[170].

Ces résultats indiquent que *Bacillus anthracis* utilise le NO[•] pour attaquer les macrophages de l'hôte. Or, lors d'une infection, les macrophages produisent, *via* l'induction d'iNOS, une grande quantité de NO[•] pour se défendre (Cf. §1.1.2). Il a toutefois été montré que la production de NO[•] par les macrophages et par *Bacillus anthracis* intervenait à différents stades de l'infection[140]. En effet, la production de NO[•] par *baNOS* intervient immédiatement après l'infection et est maximale au bout de deux à quatre heures. Comme elle nécessite l'induction et la production de iNOS, la production de NO[•] par les macrophages intervient plus tardivement, environ 18 heures après le début de l'infection.

Enfin, il semblerait que le monoxyde d'azote soit également impliqué dans la virulence de *Streptomyces turgidiscabies*. En effet, *stNOS* produit bien plus de NO[•] que ce qui est nécessaire pour la biosynthèse de la thaxtomine A[18]. Ce dernier peut donc diffuser hors de la bactérie, vers le site d'infection. Or, chez les plantes, le NO[•] promeut la croissance de certains types de tissus, comme les racines, qui constituent un site d'infection privilégié pour *Streptomyces turgidiscabies*. Ainsi, le monoxyde d'azote produit par le pathogène favorise-t-il la croissance des tissus infectés et facilite donc la colonisation de l'hôte[18].

2.4.4. Résistance au stress

2.4.4.1. Stress oxydant

Lors d'une infection, les cellules du système immunitaire libèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et du superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Le peroxyde d'hydrogène peut aisément traverser les membranes biologiques et il forme des radicaux hydroxyles $HO^{\cdot}$, via la réaction de Fenton (Figure 24). Ces derniers ciblent l'ADN et provoquent des cassures double-brin[18]. L'anion superoxyde diffuse plus difficilement à travers les membranes mais il peut former, par réaction avec le monoxyde d'azote, un composé fortement cytotoxique, le peroxynitrite (Cf. §1.1.3). Ces ROS induisent donc un stress oxydant chez les bactéries.

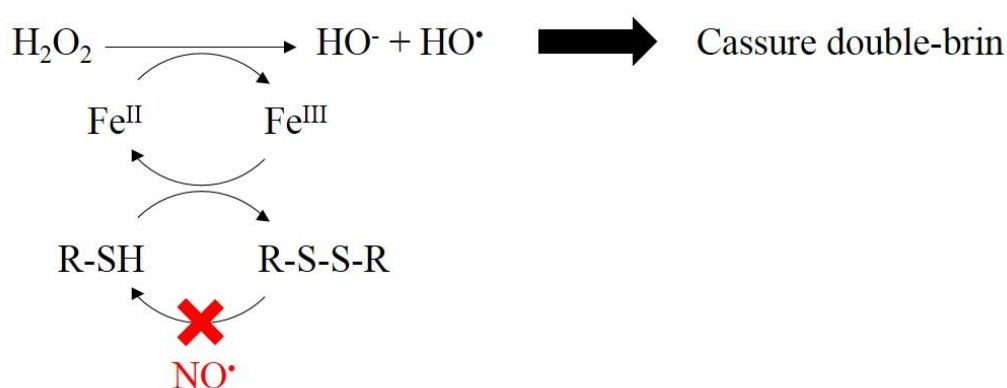


Figure 24- Inhibition de la réaction de Fenton par le $NO^{\cdot}$.
Figure réalisée à partir de la référence [18].

Il a été montré que les bacNOS de *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* étaient impliquées dans la protection de ces organismes vis-à-vis du stress oxydant. En effet, l'ajout de L-NAME, un inhibiteur de NOS, dans le milieu de culture diminue la survie de *Staphylococcus aureus* en présence d'une concentration élevée de peroxyde d'hydrogène[168]. De plus, les mutants de délétion de *Bacillus anthracis*, *baΔnos*, et de *Staphylococcus aureus*, *saΔnos*, sont plus sensibles à H_2O_2 que les types sauvages[140, 163,168]. L'ajout de $NO^{\cdot}$ dans le milieu quelques secondes avant la mise en contact de ces mutants avec H_2O_2 permet de retrouver le niveau de résistance des WT[140, 163,168]. Bien qu'il ait été montré que le $NO^{\cdot}$ pouvait activer des gènes de protection contre les ROS, ces résultats indiquent qu'il possède également un autre mode d'action, plus immédiat[140]. En effet, le $NO^{\cdot}$ produit par baNOS, bsNOS et saNOS peut inhiber la réaction de Fenton en bloquant la réduction des ponts disulfures en thiols, nécessaire à sa catalyse (Figure 24). De plus il participe à la détoxification des ROS en activant la catalase et la superoxyde dismutase[138, 140, 163].

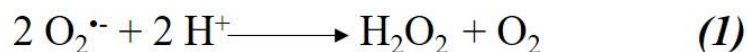


Figure 25- Réactions de dismutation du superoxyde (1) et du peroxyde d'hydrogène (2).

2.4.4.2. Stress antibiotique

Les NOS bactériennes sont également impliquées dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques. En effet, le mutant de délétion *bsΔnos* de *Bacillus subtilis*, une bactérie non pathogène pour l'Homme, présente une sensibilité accrue à un large spectre d'antibiotiques, comparé au WT[171]. L'effet protecteur du NO[•] ne serait pas uniquement dû à son pouvoir de détoxification des ROS : il peut aussi réagir avec certains antibiotiques pour former des composés moins toxiques pour la bactérie[171]. Dans le cas de *Bacillus licheniformis*, il a été montré que les bactéries dont on a stimulé la production de NO[•] présentent une meilleure résistance à certains antibiotiques, dont l'ampicilline, qui n'est plus observée en présence de NMMA, un inhibiteur connu des mNOS[172].

Cet effet protecteur de la NOS a également été observé chez *Staphylococcus aureus*, et en particulier chez une souche résistante à la méthicilline (MRSA) qui est à l'origine de nombreuses infections contractées en milieu hospitalier. Cette souche MRSA a développé des résistances à de nombreux antibiotiques, et la délétion du gène *nos* restaure sa sensibilité à au moins deux d'entre eux : la vancomycine et la daptomycine[163]. Ces résultats indiquent que la combinaison d'un inhibiteur de saNOS et d'un antibiotique constituerait une thérapie efficace pour lutter contre ces infections nosocomiales. Etant donnée l'implication de baNOS dans la protection de *Bacillus anthracis* vis-à-vis du stress oxydant et son mécanisme d'action semblable à celui de saNOS, on peut supposer qu'elle serait aussi impliquée dans sa résistance à certains antibiotiques. La combinaison d'un inhibiteur de baNOS et d'une antibiothérapie permettrait donc de lutter efficacement contre la maladie de l'anthrax. Des inhibiteurs efficaces de bacNOS ont ainsi été développés[173-175]. Cependant, pour qu'ils puissent être utilisés en médecine humaine, ils doivent être extrêmement sélectifs des bacNOS par rapport aux mNOS, ce qui représente un défi majeur, étant données les similitudes observées entre mNOS et bacNOS.

2.4.4.3. Stress radiatif UV et γ

Deinococcus radiodurans est une bactérie polyextrêmophile et l'un des organismes les plus radio-résistants connus. Elle présente, en particulier, une résistance exceptionnelle aux UV et aux radiations ionisantes, et il semblerait que deiNOS soit impliquée dans ces mécanismes de protection. En effet, après une forte exposition aux UV (dose mortelle pour *E. coli*) ou à des radiations γ (18h, 3000Gy), la croissance du mutant de délétion dei Δ nos est nettement plus lente que celle du WT[162,176]. Il est néanmoins important de noter que le taux de survie n'est pas affecté par la délétion du gène *nos*. Dans les deux cas, cette délétion peut être compensée par l'ajout de donneurs de NO $\cdot$ dans le milieu de culture[162,176]. L'ajout de L-citrulline, produite par les NOS concomitamment au NO $\cdot$, n'a aucun effet.

Concernant l'exposition aux UV, l'effet positif du NO $\cdot$ sur la reprise de la croissance post-exposition est observé, que celui-ci soit ajouté 10 minutes avant, pendant, ou jusqu'à 8h après l'exposition. Cela suggère que le NO $\cdot$ n'est pas produit immédiatement en réaction aux radiations, et que son mode d'action ne passe pas (uniquement) par la suppression des ROS, puisque ces dernières sont éliminées dans les secondes qui suivent la fin de l'exposition aux UV[162]. En effet, il semblerait que deiNOS ne soit exprimée qu'en réponse à certains types de stress puisqu'on ne détecte pratiquement pas de NO $\cdot$ dans les cellules avant irradiation, et l'expression de deiNOS augmente dans l'heure qui suit l'exposition aux UV ; elle ne commence à diminuer qu'au bout de 9h, quand la phase logarithmique de croissance est pratiquement atteinte[162]. Les enzymes de réparation de l'ADN présentent un profil d'expression semblable. De plus, il a été montré que le monoxyde d'azote induit l'expression d'un gène *obgE* : ces gènes sont courants chez les bactéries, et ils codent généralement pour des GTPases impliquées dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire[177]. Ces résultats indiquent que, comme pour les mammifères, le NO $\cdot$ produit par deiNOS est impliqué dans des processus de signalisation.

L'effet des donneurs de NO $\cdot$ sur la croissance post-exposition de dei Δ nos suggère que, comme les UV, les rayons γ induisent l'expression de deiNOS, bien que son profil d'expression n'ait pas été réalisé. Un nouveau mode d'action du NO $\cdot$, potentiellement complémentaire de celui décrit au paragraphe précédent, a tout de même été proposé[176]. En effet, des différences dans l'expression de nombreux caroténoïdes, molécules organiques aux propriétés antioxydantes, ont été observées entre le mutant dei Δ nos et le WT. On constate une diminution de la production totale de caroténoïdes, ainsi qu'une modification de leur distribution, en particulier pour la deinoxanthine et certains de ses dérivés, qui sont propres à *Deinococcus radiodurans*[176]. Toutes ces différences entre le WT et le mutant sont compensées par l'ajout de donneurs de NO $\cdot$ dans le milieu de culture de dei Δ nos. Aucune différence n'est toutefois observée entre le WT et le mutant de délétion concernant l'expression des gènes que l'on sait être impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes et le rôle de deiNOS dans le mécanisme à l'origine de la résistance de *Deinococcus radiodurans* aux rayons γ reste donc à déterminer[176].

2.4.5. Signalisation intercellulaire

Le NO^{*} diffuse librement à travers les membranes biologiques et, chez les mammifères, il est impliqué dans des voies de signalisation intercellulaire. De plus, chez certaines bactéries, il est à l'origine de cascades de signalisation impliquées dans le contrôle de certains comportements collectifs comme la mobilité ou la formation de biofilms[178]. Or, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* peuvent, dans certaines conditions, former des biofilms. Il a donc été supposé que la production de NO^{*} par bsNOS et saNOS pourrait être impliquée dans la régulation de la formation/dispersion de ces biofilms. L'étude des mutants bs Δ nos et sa Δ nos a montré que la délétion du gène *nos* n'avait, dans les deux cas, aucun effet sur la formation de biofilms[161,168]. Dans le cas de *Bacillus subtilis*, le processus de dispersion du biofilm, formé par le mutant bs Δ nos ou le WT, a également été étudié : la délétion du gène *nos* augmente la dispersion d'un facteur dix. L'ajout de neutraliseurs de NO^{*} (*scavengers*) en présence du WT n'augmente la dispersion que d'un facteur quatre, et l'ajout de donneurs de NO^{*} en présence du mutant n'a aucun effet. Ces résultats indiquent que le NO^{*} ne joue pas le rôle de messenger intercellulaire mais que ce serait plutôt sa concentration intracellulaire qui régulerait le processus de dispersion[161].

Généralement, le NO^{*} sert de signal dans le processus de respiration anaérobie des oxydes d'azote, lors du passage d'un milieu aérobie à un milieu anaérobie[179]. Les biofilms formés par *Bacillus subtilis* étant imperméables au dioxygène, leur dispersion peut être considérée comme une réponse de l'organisme au stress anoxique. On peut donc envisager un rôle pour bsNOS dans l'orientation de la bactérie, soit vers la respiration anaérobie, soit vers la dissociation du biofilm[161]. Toutefois, rien n'indique que cette orientation soit concertée et on ne peut donc pas affirmer, à ce jour, que le NO^{*} produit par les bacNOS soit impliqué dans la communication intercellulaire.

2.4.6. Conclusion

Contrairement à leurs homologues mammifères, les NOS bactériennes ne semblent pas exercer une fonction vitale pour l'organisme. En effet, les mutants de délétion Δ nos de *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Deinococcus radiodurans*, *Staphylococcus aureus* et *Streptomyces turgidiscabies* sont viables et ne présentent aucun retard de croissance, en conditions de culture optimales[33, 138, 140, 163, 165]. Les mutants ba Δ nos, bs Δ nos, dei Δ nos et sa Δ nos présentent tout de même une sensibilité accrue à différents types de stress (on n'a pas de données concernant la résistance au stress de st Δ nos). On peut donc postuler que les bacNOS, de manière générale, exercent une fonction de protection et confèrent aux bactéries une certaine résistance à différents types de stress ; tous ne sont toutefois pas concernés, la délétion du gène *nos* ne compromettant pas la résistance des bactéries aux stress acide ou salin. De plus, le rôle de la NOS et son mode d'action varient d'un organisme à l'autre, *Deinococcus radiodurans*

présentant un comportement assez différent de celui des autres organismes étudiés. Cela peut s'expliquer d'une part par la parenté entre les genres *Bacillus* et *Staphylococcus* qui appartiennent au même ordre, et d'autre part par le caractère polyextrêmophile de *Deinococcus radiodurans*. En effet, on peut aisément concevoir que son extrême résistance, aussi bien au vide qu'à la dessiccation ou au stress thermique ou radiatif, résulte du développement de mécanismes de protection spécifiques à chaque type de stress. Les mécanismes de défense de *Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, parmi lesquels on trouve la production de NO[•] par leurs bacNOS respectives, sont certes moins efficaces mais beaucoup plus versatiles.

Si les bacNOS sont globalement impliquées dans la résistance au stress et la pathogénicité des bactéries, l'étude de quelques enzymes seulement a suffi à mettre en évidence la diversité des modes d'action du NO[•]. De plus, le NO[•] n'est pas nécessairement le produit final de la réaction catalysée par les bacNOS et peut n'être qu'un intermédiaire pour effectuer des réactions de nitration, comme c'est le cas pour deiNOS[33, 34] et stNOS[164, 165], ou éventuellement de nitrosation, bien qu'on n'en ait pour l'instant aucun exemple. On peut donc en conclure qu'il n'existe pas une fonction unique pour les bacNOS mais plutôt un ensemble de fonctions qui varie selon l'organisme considéré.

3. Objectifs de cette étude

On a vu dans les paragraphes précédents que, malgré leur apparente similarité, les NOS de mammifère et les NOS bactériennes présentent des comportements assez différents. En effet, certaines NOS bactériennes forment des dimères particulièrement stables, comparés à ceux des NOS de mammifères[20, 21, 154], et il semblerait que ces deux sous-familles d'enzymes ne suivent pas tout à fait le même mécanisme catalytique[31,180]. De plus, les études menées *in vivo* sur certaines NOS bactériennes suggèrent que ces dernières pourraient exercer différentes fonctions et ne formeraient donc pas un groupe homogène[33, 34, 138, 140, 162, 164, 165, 171,176].

Dans le cadre de cette thèse, on a donc caractérisé différentes NOS, principalement d'origine bactérienne, afin de mieux comprendre leur mécanisme catalytique, en lien avec leurs fonctions *in vivo*. On s'est également intéressé à l'origine des différences entre NOS de mammifères et NOS bactériennes.

L'origine de ces différences reste actuellement mal connue bien que le remplacement d'un résidu valine de l'environnement distal des NOS de mammifères par une isoleucine chez les enzymes bactériennes permette d'en expliquer une partie[27, 181,182]. Le chapitre III de cette thèse propose donc une caractérisation approfondie des mutants croisés sur cette position particulière : iNOS V346I et bsNOS I224V. On s'intéresse dans un premier temps à l'impact de ces mutations sur la structure et les propriétés électroniques du site actif. On utilise donc les spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE pour caractériser différents complexes hémiques et sonder ainsi l'environnement distal de l'hème. On réalise ensuite une étude cinétique sur ces deux mutants, ainsi que sur les types sauvages, afin de déterminer l'influence de la nature de l'acide aminé valine ou isoleucine sur l'ensemble du cycle catalytique. La nature du cofacteur redox utilisé par les NOS bactériennes, H₄B ou H₄F, n'étant pas certaine à ce jour[28, 147], on s'intéresse également à l'effet de celui-ci sur les cinétique de bsNOS WT et du mutant I224V.

Le chapitre IV de cette thèse présente une étude spectroscopique et cinétique de la NOS bactérienne de *Deinococcus radiodurans*. Cette dernière a fait l'objet de plusieurs études visant à déterminer sa fonction *in vivo*, mais elle n'a été que peu caractérisée[22, 28, 162,176]. On s'intéresse plus particulièrement aux effets structuraux de différents cofacteurs, les ptérines H₄B et H₄F et l'acide aminé tryptophane, ainsi qu'à leur capacité à supporter l'activation de l'oxygène par deiNOS. On compare ces résultats à ceux obtenus pour les NOS de mammifères, notamment iNOS, ainsi que pour d'autres NOS bactériennes. Enfin, on utilise la modélisation et la dynamique moléculaire pour construire un modèle tridimensionnel de deiNOS et tenter de déterminer le mode de fixation du cofacteur H₄F.

Le dernier chapitre présente l'étude complémentaire de deux NO-synthases : la NOS issue de la bactérie thermophile *Geobacillus stearothermophilus*[23, 156,183-186], et la première NOS de plante caractérisée, issue de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri*. On réalise une caractérisation partielle de ces enzymes par spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE puis une étude cinétique. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus pour les NOS bactériennes et pour les NOS de mammifères et nous permettent notamment de mieux appréhender la diversité des NOS-like proteins.

Chapitre II

Partie expérimentale

1. Biologie moléculaire

Les plasmides nécessaires à la production de gsNOS et deiNOS, ainsi que de la ferrochélatase d'*E. coli* et de la TrpRSII de *Deinococcus radiodurans*, nous ont été donnés par Brian R. Crane ; ceux nécessaires à l'expression des mutants iNOS V346I et bsNOS I224V proviennent du laboratoire de Dennis J. Stuehr. Lors de la réception, les séquences des gènes d'intérêt ont été vérifiées, avant de commencer la production de protéines.

Gène	Vecteur	antibiotique
iNOSoxy V346I	pCWori	ampicilline
bsNOS I224V	pET15B	ampicilline
deiNOS	pET15B	ampicilline
TrpRSII	pACYCduet	chloramphénicol
gsNOS	pET28	kanamycine
Ferrochélatase	pACYCduet	chloramphénicol

Table 1 - Constructions utilisées pour la production de protéines.

1.1. Transformation des bactéries pour la production d'ADN

La transformation est réalisée dans des souches d'*E. coli* DH5 α chimiocompétentes, préparées au laboratoire et conservées à -80°C ; ces souches non utilisables pour la production de protéines permettent d'obtenir d'importantes quantités d'ADN.

Un aliquot (40 μ L) de bactéries compétentes est dégelé sur glace puis incubé avec 1 μ L à 2 μ L de solution d'ADN pendant 30 minutes. La membrane bactérienne est ensuite perméabilisée par choc thermique (1 minute à 42°C puis 2 minutes sur glace) afin de permettre la pénétration du plasmide. Du milieu de culture LB (« Luria Broth » Sigma) est alors ajouté pour obtenir un volume final de 500 μ L et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 1h, sous agitation (750rpm, thermomixer Eppendorf), en absence de tout antibiotique. Cette solution est ensuite répartie sur deux boîtes de Pétri (150 μ L et 350 μ L) contenant un milieu de culture gélifié (LB + agar) ainsi qu'un antibiotique, ampicilline (50 μ g/mL), kanamycine (25 μ g/mL) ou chloramphénicol (35 μ g/mL) selon le gène de résistance porté par le plasmide utilisé (Table 1). Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C puis conservées au réfrigérateur (4°C) jusqu'à utilisation. La présence d'un antibiotique dans le milieu de culture permet de sélectionner uniquement les bactéries recombinantes qui possèdent le plasmide d'intérêt.

1.2. Production et purification de l'ADN

Un clone unique, prélevé sur une boîte de Pétri, est mis en culture dans un falcon de 50mL contenant 10mL de milieu LB et l'antibiotique associé au plasmide d'intérêt ; les concentrations utilisées sont les mêmes que pour la préparation des milieux LB gélifiés. L'incubation est réalisée à 37°C, pendant une nuit, sous agitation (150rpm, Innova). Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation (4000g, 10min, température ambiante).

Le kit Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel est utilisé pour extraire et purifier l'ADN. Le culot bactérien est resuspendu dans un tampon de lyse qui permet la rupture des membranes bactériennes qui sont ensuite éliminées par centrifugation. L'ADN plasmidique est séparé des autres composants par passage sur une colonne d'affinité puis élué et conservé à -20°C.

1.3. Digestion enzymatique et chromatographie sur gel d'agarose

Des enzymes de restriction (*New England Biolabs*) sont utilisées pour digérer l'ADN fin d'estimer la concentration de nos solutions et de vérifier que le plasmide a bien la longueur attendue. Cette digestion enzymatique est effectuée soit avec une enzyme dont le site de restriction n'est présent qu'une seule fois dans la séquence du plasmide, de préférence dans le gène d'intérêt, afin de le linéariser, soit avec une enzyme dont le site de restriction est présent deux fois, dans la séquence du gène d'intérêt et dans celle du vecteur.

La digestion est effectuée dans 20 µL de milieu réactionnel contenant du tampon adapté à l'enzyme de restriction utilisée (fourni par *New England Biolabs*) et 10-20 U de celle-ci. L'ensemble est incubé 1h30 à 2h à 37°C.

Pendant ce temps, le gel d'agarose est préparé en dissolvant au micro-onde ≈0.4 g d'agarose dans 50mL (8% final) de tampon de migration (TAE 1X) préparé à partir de tampon TAE 50X (2M Tris, 1M acide acétique glacial, 50mM EDTA pH 8, ajusté à 1L à l'eau distillée) puis 8 µL de bromure d'éthidium (BET) sont ajoutés juste avant de couler le gel.

Dans chaque tube de digestion sont ajoutés 2µL de tampon de charge (SDS 5%, EDTA pH 8 0,1M, glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,4%) avant dépôt dans les puits du gel (11µL/puits). Le premier puits contient 5 µL de marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, Eurogentec) qui permet d'estimer la taille des fragments d'ADN ainsi que la quantité présente dans chaque bande. Après migration dans du tampon TAE 0.5X, la révélation est effectuée sous UV.

1.4. Vérification de la séquence

Les échantillons à concentration et à profil enzymatique adéquats sont envoyés à séquencer chez Eurofins MWG. Ensuite, les séquences sont analysées par le programme *water*[187] qui permet d'aligner la séquence obtenue avec celle déposée dans GenBank. Le programme *transeq* permet de traduire ces séquences en acides aminés. Ces deux programmes sont disponibles gratuitement en ligne. On vérifie en particulier la présence de l'étiquette d'affinité et, pour les mutants de iNOS et bsNOS, celle de la mutation.

1.5. Transformation des bactéries pour la production de protéines

La souche d'*E. coli* DH5 α n'étant pas adéquate pour la production de protéines en grande quantité, l'ADN obtenu précédemment et vérifié est utilisé pour transformer des souches d'*E. coli* BL21 DE3 chimiocompétentes, commerciales ou préparées au laboratoire.

Quand un seul plasmide est transformé, le protocole suivi est celui décrit au paragraphe 1.1. Dans le cas de gsNOS, qui est co-exprimée avec la ferrochélatase d'*E. coli* insérée dans un plasmide différent, ou de la co-expression de deiNOS et de la TrpRSII, quelques modifications sont effectuées. Pour ne sélectionner que les bactéries qui ont intégré les deux plasmides d'intérêt, les deux antibiotiques correspondants sont ajoutés dans le milieu LB gélifié mais en diminuant toutefois leurs concentrations d'un facteur deux par rapport à l'antibiotique utilisé seul, afin de ne pas exercer un stress trop important sur les bactéries et de leur permettre de se développer.

Après transformation, un clone unique est mis en culture (avec un ou deux antibiotiques) et vérifié de la même manière qu'après transformation dans DH5 α . Un stock est effectué dans 40% de glycérol et conservé à -80°C avant utilisation pour la production de protéines.

2. Production de protéines

2.1. Production de la NOS de *Deinococcus radiodurans*

2.1.1. Expression de deiNOS seule

La NO-synthase bactérienne issue de *Deinococcus radiodurans* (deiNOS) a été produite dans une souche d'*Escherichia coli* (BL21-DE3) contenant un vecteur d'expression (pET15B) dans lequel le gène codant pour l'expression de deiNOS a été inséré. L'expression de ce gène est sous le contrôle d'un promoteur à l'isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Une étiquette d'affinité composée de 6 histidines (His-tag), nécessaire à la purification de la protéine, est fusionnée à l'extrémité N-terminale de deiNOS. Le vecteur d'expression contient également un gène de résistance à l'ampicilline. Le protocole utilisé a été mis en place par l'équipe de Brian R. Crane[22].

Dans un erlenmeyer de 2L, sont introduits 1mL de stock glycérol (600 μ L de préculture + 400 μ L de glycérol, conservé à -80°C), 400mL de milieu de culture TB (« Terrific Broth » de Sigma + 10% glycérol) et 400 μ L d'ampicilline à 125mg/mL (125mg/L final). La culture est incubée une nuit à 37°C, sous agitation (150 rpm) puis réinoculée dans 8 erlenmeyers de 2L, contenant chacun : 450mL de milieu TB + 500 μ L d'ampicilline à 125mg/mL (125mg/L final) + 50mL de la culture précédente. Ce milieu est incubé à 37°C, sous agitation (150rpm), jusqu'à ce que la densité optique à 600nm soit comprise entre 0,8 et 1 (chemin optique : 1cm). Les erlenmeyers sont alors placés dans un incubateur à 16°C, toujours sous agitation (150rpm), jusqu'à ce que la température du milieu atteigne 16°C. Dans chaque erlenmeyer sont alors ajoutés 50 μ L d'IPTG 1M (100 μ M final) pour induire la production de la protéine et 500 μ L d'acide δ -aminolévulinique 400mM (400 μ M final), un précurseur de l'hème. Ces cultures sont incubées 24h à 16°C, sous agitation (150rpm).

Pour récupérer les bactéries, les cultures sont centrifugées (6000rpm, 4°C, 20 minutes). Les culots bactériens sont resuspendus sur glace, avec 150mL de tampon A pH 7.4 (25mM Tris pH 7,4, 10% glycérol, 500mM NaCl, 5mM arginine ou 500 μ M NOHA), contenant 5mM d'imidazole et auquel sont ajoutés extemporanément 1mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), 150 μ L de PI₁ (5mg/mL d'aprotinine + 1mg/mL de leupeptine), 750 μ L de PI₂ (5mg/mL de pepstatine + 24mg/mL de péfabloc dans du DMSO) et 1mg/mL de lysozyme. Après passage à l'homogénéisateur, 50U/mL de DNase sont ajoutés et incubés 10 minutes sur glace puis l'homogénat est passé au disrupteur à 0,7kbar. Le disrupteur est thermostaté à 4°C. Avant la purification par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine chargée en nickel (His-bind, Novagen), le lysat est centrifugé (20 000 rpm, 4°C, 45min) pour éliminer les débris bactériens. Le surnageant contient alors deiNOS ainsi que la plupart des protéines solubles d'*E. coli*.

La résine His-Bind Novagen utilisée est stockée dans un mélange 50% eau/50% éthanol. La résine est rincée à l'eau puis chargée en nickel par passage sur la colonne de 200mL de sulfate de nickel 50mM. Un dernier rinçage à l'eau permet d'éliminer le nickel en excès qui ne

se serait pas fixé sur la résine. Elle est ensuite conditionnée dans du tampon A pH 7,4 contenant 5mM d'imidazole. Le surnageant précédent est chargé sur la résine. L'étiquette histidine portée par deiNOS chélate le nickel fixé sur la résine. La résine est lavée avec 200mL de tampon A pH 7,4 contenant 60mM d'imidazole pour éliminer les protéines qui auraient naturellement une affinité pour le nickel. La protéine est éluée avec un tampon A pH 7,4 contenant 300mM d'imidazole, 500μM de H₄B ou H₄F et 3mM de dithiothréitol (DTT) qui protège le cofacteur de l'oxydation. L'ajout de substrat et de cofacteur permet de stabiliser la protéine qui, sinon, précipite facilement, en particulier en présence d'une concentration aussi élevée d'imidazole. Cependant, cette concentration est nécessaire pour décrocher totalement deiNOS de la résine. La solution de protéine récupérée en sortie de colonne est concentrée dans des Microcon 30kDa (Millipore, Bedford, MA, USA) puis reconditionnée avec un tampon B (Tris 50mM, 150mM NaCl, 5mM arginine ou 500μM NOHA, 500μM H₄B ou H₄F) pour éliminer une partie de l'imidazole. Cette solution concentrée, généralement entre 100μM et 200μM, est aliquotée et stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.2. Co-expression avec la tryptophanyl-ARN-synthétase II

Les souches d'*E. coli* (BL21-DE3) utilisées contiennent, en plus du vecteur utilisé pour la production de deiNOS seule, un vecteur d'expression pACYCduet dans lequel a été inséré le gène codant pour TrpRSII. Son expression est sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Ce vecteur contient également un gène de résistance au chloramphénicol. Contrairement à deiNOS, aucune étiquette d'affinité n'est fusionnée au gène de TrpRSII.

Le protocole suivi est proche de celui utilisé pour la production de deiNOS seule, avec toutefois quelques changements, permettant notamment d'améliorer le rendement final et la solubilité de la protéine[33]. Comme les deux vecteurs utilisés confèrent des résistances différentes, de l'ampicilline (100mg/L) et du chloramphénicol (50mg/L) sont ajoutés au milieu de culture TB. De plus, lors de la réinoculation, les cultures sont davantage diluées(12,5mL de culture dans 485mL de TB). Le tampon A est remplacé par un tampon A' (HEPES 25mM, NaCl 500mM, sucrose 250mM) dont le pH est ajusté à 7,5 et le tampon B est remplacé par un tampon de solubilisation SB pH 7,5 (Tris 50mM, NaCl 200mM, Arg 300mM, Trp 20mM). Ce tampon permet de concentrer la protéine jusqu'à 800μM sans qu'elle ne précipite.

2.2. Production de la NOS de *Geobacillus stearothermophilus*

Afin d'optimiser le rendement, la NOS de *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS) est co-exprimée avec la ferrochélatase d'*E. coli*[23]. Cette enzyme, impliquée dans la synthèse de l'hème, réalise notamment l'insertion du fer dans la protoporphyrine IX. Le gène codant pour l'expression de gsNOS est inséré dans un vecteur d'expression (pET28) contenant un gène de résistance à la kanamycine. Comme pour deiNOS, l'expression du gène de gsNOS est sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG et une étiquette d'affinité composée de 6 histidines est fusionnée à son extrémité N-terminale. Le gène codant pour la ferrochélatase d'*E. coli* est inséré dans le vecteur d'expression pACYCduet qui contient un gène de résistance au chloramphénicol. Son expression est également sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG.

Les souches d'*E. coli* BL21 DE3 utilisée pour la production de gsNOS sont co-transformées avec les deux plasmides décrits précédemment, et le protocole expérimental est semblable à celui utilisé pour la production de deiNOS, à quelques différences près. Tout d'abord, pour s'assurer que les bactéries conservent les deux plasmides d'intérêt, la culture est réalisée en présence de kanamycine (50mg/L) et de chloramphénicol (25mg/L). Comme pour la co-expression de deiNOS et de TrpRSII, les cultures sont diluées au 40^{ème} lors de la réinoculation. De plus, du chlorure de fer est ajouté dans le milieu de culture (FeCl_3 , 100 μM) en plus de l'acide δ -aminolévulinique pour optimiser la synthèse de l'hème, environ 20 minutes avant l'induction. Cette dernière se fait à 37°C par ajout de 100 μM d'IPTG. Concernant la lyse cellulaire et la purification de la protéine, le mode opératoire est le même que pour deiNOS ; seule la composition des tampons est modifiée. En effet, comme gsNOS est plus stable que deiNOS, il n'est pas nécessaire d'ajouter de substrat ou de cofacteur lors la production. Le tampon A utilisé ne contient donc ni arginine, ni NOHA. De même, le tampon d'élution ne contient ni H_4B , ni H_4F .

La concentration de la solution protéique obtenue est d'environ 80 μM ; elle doit être reconditionnée avant utilisation pour éliminer l'imidazole. L'ajout d'un substrat pendant le reconditionnement permet de concentrer davantage la protéine.

2.3. Production du mutant I224V de la NOS de *Bacillus subtilis*

Le mutant I224V de la NO-synthase bactérienne issue de *Bacillus subtilis* (bsNOS I224V) est produit selon un protocole semblable à celui utilisé pour deiNOS. L'induction se fait à 20°C et nécessite 1mM d'IPTG. Le tampon A ne contient ni substrat, ni cofacteur et a une composition légèrement différente (100mM Tris, 250mM NaCl, 10% glycérol) mais le pH est identique (7,4). Avant la purification, il y a une étape supplémentaire de précipitation des protéines par ajout de sulfate d'ammonium. Cet ajout se fait lentement et sous agitation pour éviter la création de pH locaux trop acides. Il est suivi d'une dernière étape de centrifugation (30min, 4°C, 16000rpm). Le culot obtenu est resuspendu dans 50mL de tampon A avant d'être chargé sur la colonne. La concentration en imidazole du tampon d'élution n'est que de 240mM. L'étape de conditionnement est remplacée par une dialyse dans des membranes d'ester de cellulose qui laissent passer toute espèce de poids moléculaire inférieur à 25kDa (Spectra /Por CE, Spectrum), afin d'éliminer l'imidazole. La solution protéique concentrée est introduite dans ces boudins de dialyse et mise en contact avec 2L de tampon de dialyse (tampon A + 1mM PMSF dans l'éthanol), sous une légère agitation, en chambre froide, pendant 48h. Le tampon est changé après 24h.

2.4. Production du mutant V346I du domaine oxygénase de la NOS inductible murine

Le gène codant pour l'expression de V346I iNOSoxy a été inséré non pas dans pET15B, mais dans un autre vecteur d'expression : pCWori. Ce dernier contient également un gène de résistance à l'ampicilline et l'expression du gène est, comme pour les autres NOS, sous le contrôle d'un promoteur à l'IPTG. Cependant, pour ce vecteur, l'His-tag est fusionnée à l'extrémité C-terminale de la protéine.

Le protocole suivi est très semblable à celui utilisé pour la production de I224V bsNOS. L'induction se fait sur 72h au lieu de 24h et 500µM H₄B et 3mM DTT sont ajoutés aux tampons d'élution et de dialyse. Ceci permet un meilleur repliement de la protéine et stabilise le dimère qui est moins robuste que celui de bsNOS.

3. Tests d'activité enzymatique

3.1. Test de Griess – *Peroxide shunt*

3.1.1. Principe du test

Pour vérifier l'intégrité des protéines produites, on réalise l'oxydation du NOHA par la NOS, en présence de peroxyde d'hydrogène, qui sert à la fois de source d'électrons et de protons. Dans ces conditions, on forme des ions nitroxyles $\text{NO}^\cdot$, ainsi qu'un mélange de L-citrulline et de cyano-ornithine. En présence d'oxygène, $\text{NO}^\cdot$ réagit à nouveau avec l'enzyme pour former un mélange de nitrites NO_2^- et de nitrates NO_3^- . Le test de Griess permet de doser, par colorimétrie, les nitrites formés. Après avoir stoppé la réaction, un mélange de sulfanilamide et de N-(1-naphtyl)-éthylènediamine (NED) est ajouté au milieu réactionnel. Le sulfanilamide réagit de manière stœchiométrique avec les nitrites en solution pour former un composé diazonium qui réagit à son tour avec le NED pour former un composé diazo de couleur rose intense[188] (Figure 26). On mesure l'absorbance de ce composé à 548 nm. Cette dernière est alors convertie en concentration en nitrites grâce à une gamme d'étalonnage au nitrite de sodium. Ce test est réalisé en présence de différentes concentrations de cofacteur (H_4B ou H_4F) qui n'a ici qu'un rôle structural.

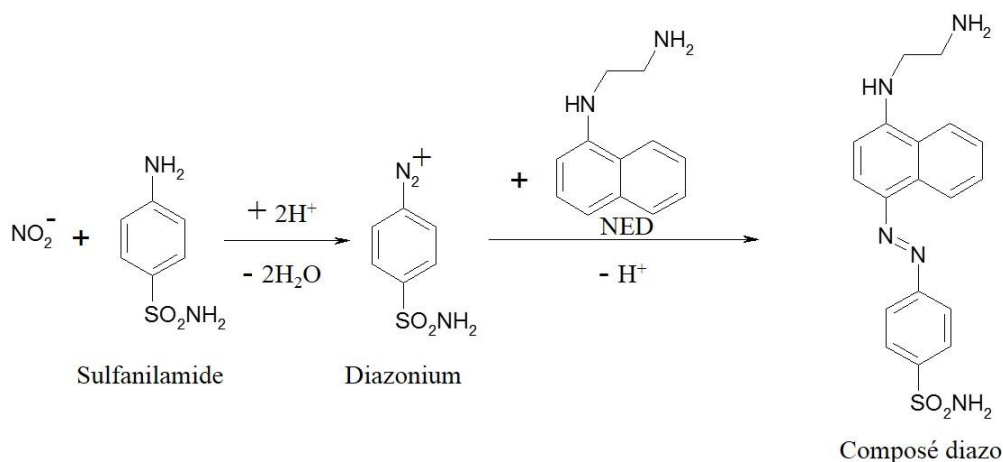


Figure 26- Réaction mise en jeu lors du test de Griess.

3.1.2. Etalonnage

Avant de faire les expériences avec la protéine, on réalise une courbe d'étalonnage afin de pouvoir relier la DO mesurée à 548nm à la concentration en nitrites de la solution. Une solution de sulfanilamide 10g/L dans HCl 1% et une solution de NED 1g/L sont préparées. Le mélange 1:1 de ces deux solutions constitue le réactif de Griess. Une solution stock de nitrite de sodium 1mM est préparée ; des dilutions successives permettent ensuite de préparer 12 solutions de nitrite de concentrations différentes, comprise entre 5 μM et 100 μM . Dans 12

cuvettes en plastique sont ajoutés 500µL de réactif de Griess préparé extemporanément. Dans chaque cuvette, sont ajoutés 500µL de l'une des solutions de nitrite. Une cuvette de référence avec 500µL d'eau et 500µL de réactif de Griess, est également préparée. Après 15 minutes d'attente pour être sûr que l'équilibre est atteint, la DO à 548nm est mesurée. Comme le composé diazo est sensible à la lumière, les cuvettes sont maintenues dans le noir pendant l'attente. Pour chaque échantillon trois à cinq mesures successives sont effectuées.

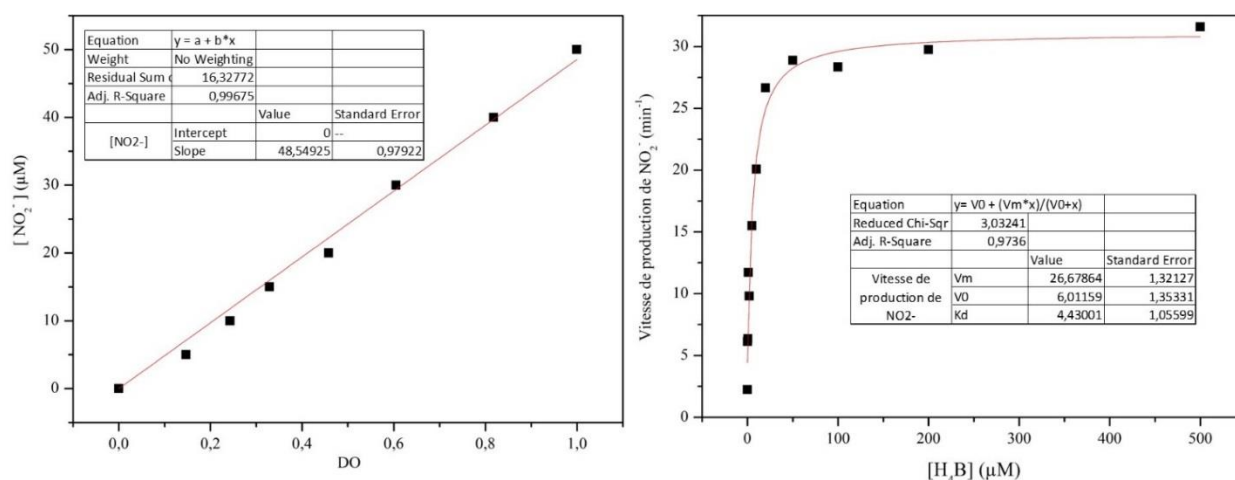


Figure 27- Courbe d'étalonnage pour le test de Griess (gauche) et exemple de traitement de données (droite).
L'expérience représentée sur le cadre de droite a été réalisée avec iNOS WT.

La concentration en nitrite est ensuite tracée en fonction de la DO à 548nm puis une régression linéaire est effectuée. On a généralement une ordonnée à l'origine proche de zéro, comme attendu, et une pente d'environ 50µM de nitrite/unité de DO (Figure 27, gauche).

3.1.3. Protocole expérimental

La protéine (0,3µM à 5µM final) est conditionnée dans un tampon dit « oxygénase », composé d'albumine de sérum bovin (BSA, 0,1mg/mL), de dithiothréitol (DTT, 1mM), de superoxide dismutase (SOD, 25U/mL), et de glycérol (10% volumique), dans un tampon phosphate (KPi 0,1M) pH 7,4. La concentration de NOS (0,3 à 15µM) est choisie en fonction de son activité supposée, de façon à ce que la concentration de nitrites finale soit dans la gamme de validité de la courbe d'étalonnage. La protéine est ensuite incubée 30 minutes à 30°C en présence d'un cofacteur (H₄B ou H₄F, 0 à 500µM) puis un large excès de NOHA (11mM) et de H₂O₂ (≈30mM) est ajouté et l'échantillon est incubé 10 minutes à 30°C. La réaction est alors arrêtée par ajout de catalase. L'échantillon (500µL) est introduit dans une cuvette en plastique contenant 500µL de réactif de Griess préparé extemporanément avec les solutions de sulfanilamide et de NED utilisées lors de l'étalonnage. On procède ensuite à la mesure suivant le même protocole que pour l'étalonnage.

3.1.4. Traitement et analyse des données

La moyenne des mesures successives est calculée et convertie en concentration en nitrites. La concentration de NOS et le temps de réaction effectif (entre l'ajout de H₂O₂ et l'ajout de catalase) sont ensuite utilisés pour calculer la vitesse V de production de nitrite en moles de nitrite produites par mole d'enzyme et par minute et on trace cette vitesse en fonction de la concentration en cofacteur. La courbe ainsi obtenue (Figure 27, droite) est modélisée par une courbe de saturation hyperbolique dont l'équation (Équation 1) donne accès à plusieurs paramètres : la constante de dissociation apparente du cofacteur (K_d, en μM), l'activité non spécifique de la protéine (V₀, en absence de cofacteur) et la vitesse maximale de production de nitrites (V_{max}). Ce test nous renseigne donc à la fois sur une activité de la protéine, mais également sur l'importance du rôle structural du cofacteur.

$$V = V_0 + \frac{V_m * [cofacteur]}{K_m + [cofacteur]}$$

Équation 1-Vitesse de production de nitrites en fonction de la concentration en cofacteur.

3.2. Cycle réel – *Single turnover*

3.2.1. Principe du test

Dans le cas où le test de Griess n'est pas concluant, on effectue un test d'activité qui ne passe pas par le *peroxide shunt*, mais utilise directement le dioxygène de l'air. Cela permet de savoir si la production de la protéine est intrinsèquement faible ou si l'utilisation de H₂O₂ est inadaptée pour cette protéine. Pour ce test, la protéine saturée en NOHA et éventuellement en cofacteur, est réduite au dithionite de sodium, sous atmosphère inerte puis exposée à l'air. Le dioxygène de l'air va pouvoir se fixer au Fe^{II} et oxyder le NOHA pour former du NO[•] et de la L-citrulline. Le NO[•] ainsi formé est instable en solution aqueuse aérobie ; il est oxydé en nitrite. Ce dernier peut alors être détecté et quantifié grâce au réactif de Griess (Figure 26).

3.2.2. Mise en place expérimentale

La protéine est conditionnée dans un tampon Tris 0,1M pH 7,4 contenant 500μM de NOHA et, éventuellement, 500μM de cofacteur (H₄B ou H₄F) et 3mM DTT. Après reconditionnement, le volume de solution protéique est ajusté à 450μL avec du tampon Tris 0,1M pH 7,4 puis cette dernière est transférée dans une cuvette en quartz. La cuvette est bouchée par un septum puis connectée à une rampe vide/argon (Air Products). On réalise 5*20 cycles vide/argon, pour anaérobiser la solution. Entre chaque série de cycles, la protéine est maintenue sous argon.

Pendant le conditionnement, une solution anaérobie de dithionite de sodium 100mM est préparée. Pour cela 20mg de dithionite de sodium (pureté 82%), conservé sous vide, sont introduits dans un pilulier puis ce dernier est fermé et mis sous argon pendant au moins une heure. A l'aide d'une seringue étanche aux gaz, ou *gas-tight*, 1mL de tampon Tris 0,1M pH 7,4 anaérobie est ensuite ajouté. La solution de dithionite est maintenue sous argon jusqu'à utilisation.

La protéine est ensuite réduite avec la solution de dithionite de sodium. A l'aide d'une seringue *gas-tight*, 25µL de solution de dithionite sont prélevés et ajoutés progressivement dans la cuvette de quartz contenant la protéine. Après chaque ajout, un spectre d'absorption UV-visible de la protéine est enregistré pour suivre la réduction du Fe^{III} en Fe^{II}. On considère que la réduction est complète quand l'ajout de dithionite ne modifie plus le spectre.

Le septum peut alors être retiré. Le volume de solution est ajusté à 500µL avec du tampon Tris 0,1M pH 7,4 puis la solution est transférée dans une cuvette en plastique en prenant soin d'y injecter de l'air. En effet, du fait de sa densité, l'argon forme une couche protectrice à la surface de la solution protéique qui l'isole de l'air ambiant et empêche donc la réaction de la NOS avec le dioxygène. L'avancement de la réaction est régulièrement vérifié, grâce à la réapparition du Fe^{III}, par spectroscopie d'absorption UV-visible. Quand elle est terminée, 500µL de réactif de Griess sont ajoutés dans la cuvette. Après environ 15 minutes cinq spectres successifs (350-750nm) sont enregistrés.

3.2.3. Traitement des données

Après l'ajout du réactif de Griess, on voit apparaître une bande assez large, centrée autour de 548nm, due à la formation du composé diazo. Ce dernier conduit à la précipitation de la protéine et on ne voit plus la bande de Soret de l'hème. On considère donc que la contribution de la protéine à la densité optique à 548nm est négligeable devant celle du composé diazo. Les cinq spectres enregistrés sont alors moyennés et la concentration en nitrites est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage réalisée pour le test de Griess. Les spectres de Fe^{III} enregistrés avant la réduction de la protéine puis juste avant l'ajout du réactif de Griess, permettent de calculer la concentration de la protéine. Comme on est en conditions de *single-turnover*, chaque enzyme ne peut produire au maximum qu'une seule molécule de NO[•], donc qu'un seul ion nitrite. On peut donc calculer la proportion d'enzymes qui a effectué un cycle catalytique.

4. Electrochimie

4.1. Voltampérométrie cyclique

On cherche à mesurer le potentiel des couples redox qui vont servir de médiateurs pour les expériences de spectroélectrochimie. Les valeurs obtenues seront alors comparées à celles de la littérature. Cela permet d'une part de vérifier l'intégrité des médiateurs et, d'autre part, de contrôler le potentiel de l'électrode de référence.

4.1.1. Mesure du potentiel de l'électrode de référence

Lors des expériences de spectroélectrochimie pour mesurer le potentiel de l'hème des différentes NOS, on utilisera une électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3M. Comme le potentiel de cette électrode peut dévier légèrement au cours du temps, il est régulièrement mesuré à l'aide d'une électrode de référence au calomel saturée (Hg/Hg₂Cl₂/KCl saturé), plus stable dans le temps. Les deux électrodes sont plongées dans le tampon d'électrolyse utilisé par la suite (KPi 0,1M, NaCl 0,1M pH 7,4) et la différence de potentiel entre elles est mesurée. A 22°C, on a une différence de potentiel de -35mV. Sachant que l'électrode au calomel saturée à un potentiel de +245mV par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH), on en déduit que notre électrode de référence a un potentiel de +210mV par rapport à l'ESH, conformément à ce qui est annoncé par le fabricant.

4.1.2. Mesure des potentiels des médiateurs

La cellule d'électrochimie (Figure 28) est remplie de tampon d'électrolyse (KPi 0,1M, NaCl 0,1M, pH 7,4), puis les trois électrodes nécessaires à la mesure y sont plongées : l'électrode de travail (carbone vitreux), l'électrode de référence (Ag/AgCl/KCl 3M) qui sera également utilisée pour les expériences de spectroélectrochimie, et la contre-électrode (Pt). La solution est anaérobisée par bullage et circulation d'azote. Un premier balayage aller et retour, de 0V à -1V, à 0,1V/s en absence de médiateur est alors réalisé pour vérifier que la solution est bien anaérobie, le dioxygène étant réduit autour de -0,6V (par rapport à l'électrode Ag/AgCl/KCl). Dans la partie supérieure de la cellule d'électrochimie, 1mM de médiateur est alors ajouté. Puis plusieurs balayages successifs entre 0V et -0,8V à -1,2V, à 0,1V/s sont effectués pour s'assurer de la reproductibilité de la mesure.

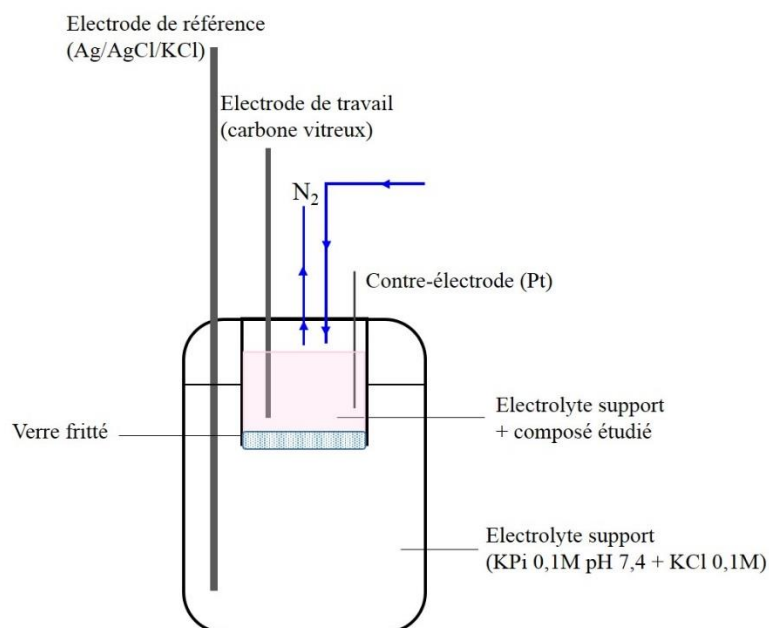


Figure 28 - Dispositif expérimental utilisé pour les expériences de voltampérométrie cyclique.

Sur chaque voltampérogramme apparaissent une vague de réduction, au potentiel E_{red} , et une vague d'oxydation, au potentiel E_{ox} . Le potentiel du couple redox étudié est alors $E^0 = (E_{red} + E_{ox})/2$. Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous (Table 2). Les valeurs de potentiels redox mesurées pour la phénosafranine et le méthylviologène sont en accord avec la littérature alors qu'on a un écart d'environ 25mV pour le benzylviologène[147,189]. Cependant, la mesure est parfaitement reproductible et c'est donc la valeur mesurée ici que l'on va utiliser comme référence lors des expériences de spectroélectrochimie en présence de la protéine.

Médiateur	E^0 vs Ag/AgCl/KCl	E^0 vs ESH mesurée	E^0 vs ESH reportée ^a
Phénosafranine	-457 ± 5 mV	-247 ± 5 mV	-252 mV
Benzylviologène	-537 ± 4 mV	-327 ± 4 mV	-354 ± 4 mV
Méthylviologène	-653 ± 6 mV	-443 ± 6 mV	-445 ± 5 mV

Table 2- Potentiels redox des médiateurs, mesurés par voltampérométrie cyclique.
Les valeurs reportées sont issues des références [189] et [147].

4.2. Mesure du potentiel de l'hème

4.2.1. Principe de la méthode

On cherche à mesurer le potentiel redox du couple hème-Fe^{III}/hème-Fe^{II} pour les différentes NOS étudiées. Pour cela, on réalise l'électrolyse de la protéine à différents potentiels, et on suit l'évolution de son état d'oxydation par spectroscopie d'absorption UV-visible. Pour chaque potentiel imposé, on estime que l'équilibre est atteint quand on ne voit plus de variation du spectre. Etant donné que l'hème est enfoui au sein de la protéine et que cette dernière, de par sa taille, ne peut diffuser librement, le transfert d'électrons direct de l'électrode vers l'hème n'est pas possible. On ajoute donc dans le milieu des petites molécules redox, appelées médiateurs, qui assurent le transport des électrons entre l'hème et les électrodes.

4.2.2. Choix des médiateurs

On a à notre disposition trois médiateurs qui couvrent la gamme de potentiels dans laquelle on s'attend à trouver ceux des différentes NOS : la phénosafranine, le benzylviologène et le méthylviologène (Table 2). Leurs formes réduites et oxydées ont des spectres d'absorption différents, ce qui permet également de suivre l'évolution de leur état d'oxydation. Comme on ne connaît pas *a priori* la valeur du potentiel du couple hème-Fe^{III}/hème-Fe^{II} pour chaque NOS, on réalise une première expérience en présence des trois médiateurs. On peut ensuite renouveler l'expérience en ne gardant que le (ou les) médiateur(s) nécessaire(s). Cela permet alors de travailler sur une gamme de potentiels plus étroite et de simplifier l'analyse des spectres d'absorption UV-visible.

4.2.3. Mise en place expérimentale

On utilise une cuvette de quartz surmontée d'une pièce de verre bouchée par un septum percé de façon à laisser juste passer les différentes électrodes ainsi qu'une arrivée d'azote (Figure 29). La cuvette est remplie de tampon d'électrolyse (KPi 0,1M pH 7,4, KCl 0,1M) dans lequel sont ajoutés 30µM de chacun des médiateurs utilisés, environ 20µM de NOS, saturée en substrat et cofacteur, et 3mM de DTT. L'électrolyse est réalisée directement dans le spectrophotomètre. Ce dernier est thermostaté à 20°C et un petit barreau aimanté permet de maintenir une agitation durant toute la durée de l'expérience.

Le montage utilisé comporte trois électrodes : une grille d'or fixée sur un support en plastique comme électrode de travail, un fil de platine comme contre-électrode et une électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3M ($E^0 = +210 \text{ mV vs ESH}$). Ce montage est introduit dans la cuvette, de sorte que toutes les électrodes trempent dans la solution, sans gêner le passage du faisceau. Pour anaérobiser la solution, de l'azote est mis à buller jusqu'à ce que le potentiel de la solution soit stable. Ce potentiel est mesuré par un voltmètre branché entre l'électrode de

travail et l'électrode de référence. Il reste branché durant toute l'expérience pour vérifier le potentiel imposé par le potentiostat.

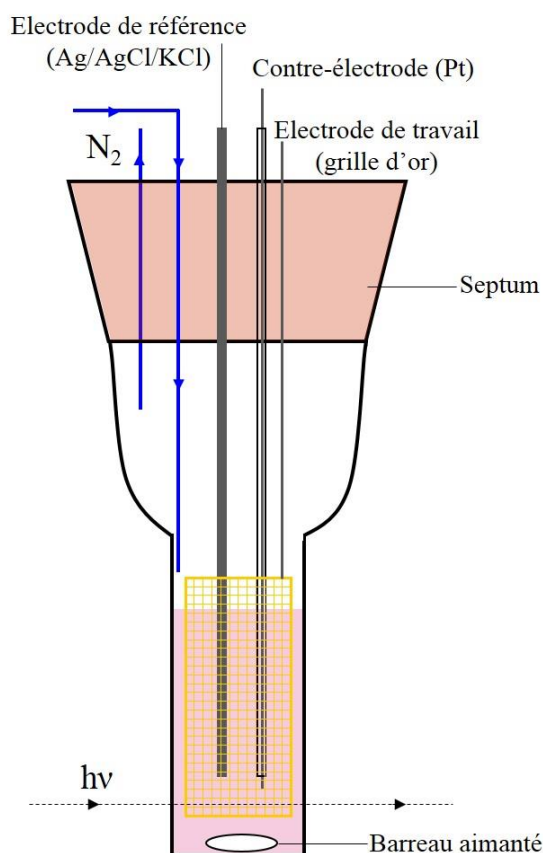


Figure 29- Dispositif expérimental utilisé pour la mesure du potentiel de l'hème.

Avant de commencer les mesures, l'arrivée d'azote est placée au-dessus de la solution pour ne pas avoir de bulles. Pour chaque potentiel imposé, une série de spectres est enregistrée, généralement un spectre toutes les deux ou trois minutes, jusqu'à ce que plusieurs spectres consécutifs soient superposables. On considère alors que l'équilibre est atteint et un nouveau potentiel est imposé à la solution. Les spectres sont enregistrés entre 330nm et 820nm. Aucune des espèces présentes en solution n'absorbe à 820nm, ce qui permet de corriger d'éventuelles dérives de la ligne de base. En-dessous de 330nm, le détecteur est saturé, notamment à cause de la très forte absorbance de H_4B ou H_4F .

Bien que la phénosafranine apparaisse comme un médiateur réversible en voltampérométrie cyclique, sa forme réduite précipite partiellement au cours de l'expérience. On ne peut donc travailler qu'en réduction quand elle est présente dans le milieu, et pas en oxydation.

4.2.4. Traitement et analyse des résultats

Comme le zéro du spectrophotomètre n'est pas tout à fait stable sur la durée de l'expérience, généralement entre 6 et 8 heures, la valeur de la densité optique (DO) à 820nm est soustraite à tous les spectres. On s'intéresse ensuite à la variation de la DO à l'équilibre en fonction du potentiel pour les longueurs d'ondes suivantes : 396nm, 412nm, 520nm, 600nm et 740nm. Les courbes obtenues sont modélisées par une ou deux sigmoïdes pour obtenir le potentiel de réduction de l'hème et des médiateurs.

A 396nm, on suit la disparition du Fe^{III} HS puis la formation de la forme réduite du méthylviologène, avec une légère contribution de celle du benzylviologène. A 412nm, on suit la formation du Fe^{II} . Les différents médiateurs utilisés contribuent également à la variation de la DO à 412nm mais, si on travaille avec une concentration de NOS assez élevée (environ 20 μM), ces dernières peuvent être négligées. A 520nm, les formes Fe^{II} et Fe^{III} de la NOS ont des absorbances semblables. On peut donc suivre la réduction de la phénosafranine (diminution de la DO) et celle du méthylviologène (augmentation de la DO). Comme ces deux médiateurs ont des potentiels assez différents, les phases de diminution et d'augmentation de la DO sont bien distinctes. A 600nm, on trouve un point isobestique de la transition hème- Fe^{III} HS $\rightarrow$ hème- Fe^{II} , et l'absorbance de la phénosafranine est nulle. On peut donc suivre la réduction du benzylviologène et du méthylviologène qui correspondent toutes deux à une augmentation de la DO. On suit aussi ces deux transitions à 740nm où ni la protéine, ni la phénosafranine n'absorbent. La mesure systématique du potentiel des médiateurs permet de s'assurer de la validité de chaque expérience, ainsi que de la reproductibilité du système. Les valeurs obtenues par spectroélectrochimie sont comparées avec celles mesurées par voltampérométrie cyclique.

5. Préparation des complexes hémiques

5.1. Préparation de la NOS à l'état Fe^{III}

En l'absence de substrat et de cofacteur, les NOS présentent un mélange de Fe^{III} haut-spin et de Fe^{III} bas-spin. La proportion de chacune de ces deux espèces dépend de la NOS considérée. Pour obtenir un Fe^{III} haut-spin pur, on cherche donc à saturer le site actif en substrat et en cofacteur. La protéine est conditionnée dans des MicroCon 30kDa (Millipore, Bedford, MA, USA) par 3 à 5 cycles dilution/centrifugation (4°C , 20 min, 5400 g) avec un tampon Tris 100mM pH 7,4 contenant 10% de glycérol et dans lequel est ajouté un substrat (arginine 5mM ou NOHA 500 μM), un cofacteur (H_4B ou H_4F 500 μM) et du DTT (3mM) pour protéger le cofacteur de l'oxydation. La concentration finale est ajustée en diluant la protéine reconditionnée avec ce même tampon. Celle-ci dépend de la méthode utilisée pour caractériser le complexe formé : environ 10-15 μM pour la spectroscopie d'absorption UV-visible et autour de 150 μM pour la RPE.

Des échantillons saturés en cofacteur (H_4B ou H_4F) et en citrulline, qui est le produit final de la réaction, ont également été préparés. Contrairement à l'arginine et au NOHA, la citrulline n'est pas substrat des NOS et son affinité pour le site actif de ces dernières est beaucoup plus faible. On procède donc comme décrit ci-dessus mais avec une concentration en citrulline dans le tampon de reconditionnement de 200mM. Des échantillons sans substrat ni produit, mais toujours saturés en cofacteur, qui correspondent à l'état final de l'enzyme, une fois que le $\text{NO}^{\bullet}$ et la citrulline ont été libérés dans le milieu, ont aussi été préparés.

5.2. Préparation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$

Ces complexes sont préparés à partir d'échantillons de Fe^{III} , reconditionnés ou bruts, directement dans une cuvette de quartz. Tout d'abord le Fe^{III} est réduit en Fe^{II} en ajoutant une pointe de spatule de dithionite, qui est alors en large excès. Le CO gaz pur (Messer) est ensuite mis à buller directement dans la cuvette. Le CO a une très bonne affinité pour le Fe^{II} et le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ ainsi formé est suffisamment stable pour pouvoir travailler à l'air.

5.3. Préparation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$

Contrairement au $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$, le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ n'est pas stable en présence d'oxygène : il est rapidement oxydé en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ puis le $\text{NO}^{\bullet}$ réagit avec le dioxygène. On travaille donc sous atmosphère d'argon.

On utilise des échantillons de Fe^{III} reconditionnés et anaérobisés comme décrit aux §5.1 et 3.2.2, respectivement.

Pendant le reconditionnement, les solutions de dithionite et de $\text{NO}^{\bullet}$ anaérobies sont préparées. Dans un pilulier sont introduits 20mg de dithionite de sodium (pureté 82%). Pour

éviter qu'il ne s'oxyde, le dithionite est conservé dans un dessiccateur après ouverture. Le pilulier est ensuite scellé. Un second pilulier, vide, est également scellé, qui servira à préparer une solution saturée de NO[•]. Une circulation d'argon dans les piluliers est mise en place pendant au moins une heure. Avec une seringue *gas-tight*, 1mL de tampon (KPi 0,1M, pH 7,4) est introduit dans chaque pilulier. Du NO[•] pur (Air liquide) est mis à buller dans ce tampon pendant une dizaine de minutes. On a alors une solution saturée de NO[•] et une solution de dithionite à 100mM.

Tout d'abord, le Fe^{III} est réduit en Fe^{II} puis la solution de NO[•] est ajoutée. Ces deux étapes sont suivies par spectroscopie d'absorption visible. Comme les échantillons destinés à être caractérisés par RPE sont trop concentrés (100-150μM) pour suivre l'évolution de la bande de Soret, on s'intéresse aux bandes de transfert de charges. Lors de la réduction, la bande de transfert de charge du Fe^{III} à 650nm disparaît au profit de celle du Fe^{II} autour de 550nm. La formation du complexe Fe^{II}NO est ensuite caractérisée par le déplacement de cette bande de 550nm à 580nm.

La solution protéique est enfin introduite dans un tube RPE préalablement rempli d'argon, à l'aide d'une seringue *gas-tight* puis immédiatement congelée dans l'azote liquide. L'échantillon est conservé dans l'azote liquide.

6. Spectroscopies

6.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible - Test « P450 »

Ce test est effectué sur des fractions collectées à différentes étapes de la production de protéine et de la purification, ainsi que sur la fraction finale concentrée, avant congélation. Il permet d'une part de vérifier la présence ou l'absence de NOS et donc de contrôler le bon déroulement des différentes étapes de la production. D'autre part, le test réalisé sur la protéine purifiée et concentrée permet de contrôler son intégrité et de mesurer sa concentration. Tous les spectres présentés sont normalisés par division du signal par le maximum d'absorption.

6.1.1. Suivi de la production de protéine

On commence par un spectre UV-visible (300-750nm) de la fraction brute, éventuellement diluée. Si la NOS est présente, on doit voir un pic assez large, entre 396 et 421 nm dû à la forme oxydée de l'hème (Fe^{III}). Cependant, ce pic n'est pas spécifique des NO-synthases et d'autres protéines peuvent avoir un spectre similaire. Un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ est alors préparé comme décrit précédemment ; sa bande de Soret à 444-445nm est caractéristique des NOSs[27].

6.1.2. Contrôle des fractions purifiées

On commence par un spectre de la fraction purifiée telle que récupérée après la dialyse ou le reconditionnement. Elle est tout de même diluée afin de ne pas saturer le récepteur du spectrophotomètre. La position du Soret sur ce premier spectre nous indique s'il reste de l'imidazole dans le site actif (427nm) et si le Fe^{III} est plutôt haut-spin (396nm) ou bas-spin (421nm) en l'absence de substrat et de cofacteur. En effet, même dans les cas où ceux-ci sont ajoutés dans les tampons, les concentrations utilisées ne permettent pas nécessairement de saturer la protéine. On procède ensuite comme décrit précédemment pour former les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$. On utilise la bande de Soret (444-445nm) pour calculer la concentration en NOS ($\epsilon = 74\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Celle-ci se situe généralement entre 100 μM et 500 μM , deiNOS ayant les rendements les plus faibles, malgré la présence de substrat et de cofacteur dans les tampons. Dans certains cas, on a un épaulement autour de 420 nm qui correspond à une forme dégradée du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et peut être le signe d'un repliement imparfait de la protéine. Toutefois, cette fragilité de la protéine et ce repliement imparfait peuvent être dus en grande partie à l'absence de substrat et de cofacteur, nécessaires pour rigidifier le site actif et stabiliser le dimère.

La protéine est reconditionnée dans un tampon Tris 0,1M pH 7,4 dans lequel sont ajoutés de l'arginine (5mM), du H_4B (500 μM) et du DTT (3mM) pour protéger H_4B de l'oxydation. Une fois reconditionnée, la protéine est transférée dans une cuvette de quartz puis

diluée pour éviter la saturation du détecteur. On enregistre un spectre (300-750nm) puis on prépare le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et on enregistre un nouveau spectre. Avec le spectre de Fe^{III} on vérifie que l'ajout de substrat et de cofacteur permet de convertir la totalité du Fe^{III} bas-spin en Fe^{III} haut-spin, qui est la forme active de l'enzyme. On attend donc un maximum d'absorption vers 397nm. La présence de substrat et de cofacteur permet également de stabiliser le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et donc de supprimer, ou au moins de réduire, l'épaule autour de 420nm. Cependant, la protéine ayant été diluée et reconcentrée plusieurs fois, la concentration de la solution présente dans la cuvette n'est pas la même que celle du stock. On ne peut donc pas utiliser ces spectres pour déterminer ou confirmer sa concentration.

6.2. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

Dans le cadre de ce travail, la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) a été utilisée pour caractériser les complexes hémiques Fe^{III} HS, Fe^{III} LS et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ des différentes NOS étudiées. Elle a également permis d'analyser le contenu des échantillons de *freeze-quench*.

6.2.1. Principe général

La RPE permet de détecter et de caractériser les composés paramagnétiques, c'est-à-dire qui possèdent au moins un électron célibataire[190]. Il peut s'agir, par exemple, de radicaux libres ou de complexes de métaux de transition. Un électron célibataire possède un moment cinétique de spin $S = 1/2$, associé à deux états quantiques $m_s = \pm 1/2$. En l'absence de champ magnétique extérieur, les niveaux d'énergie associés à ces deux états quantiques sont dégénérés et constituent un doublet de Kramer. L'application d'un champ magnétique permet de lever cette dégénérescence. C'est ce qu'on appelle « l'effet Zeeman ». Les niveaux d'énergie associés aux états $m_s = +1/2$ et $m_s = -1/2$ sont centrés sur le niveau d'énergie de l'électron en absence de champ magnétique. Ils sont séparés d'une énergie $\Delta E = g\beta B$, où B est la valeur du champ magnétique, β le magnéton de Bohr électronique ($9,2740 \cdot 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$) et g le facteur de Landé, caractéristique du centre paramagnétique étudié. Lors d'une expérience de RPE, on cherche à mesurer cette énergie ΔE pour en déduire la valeur de g de l'espèce étudiée.

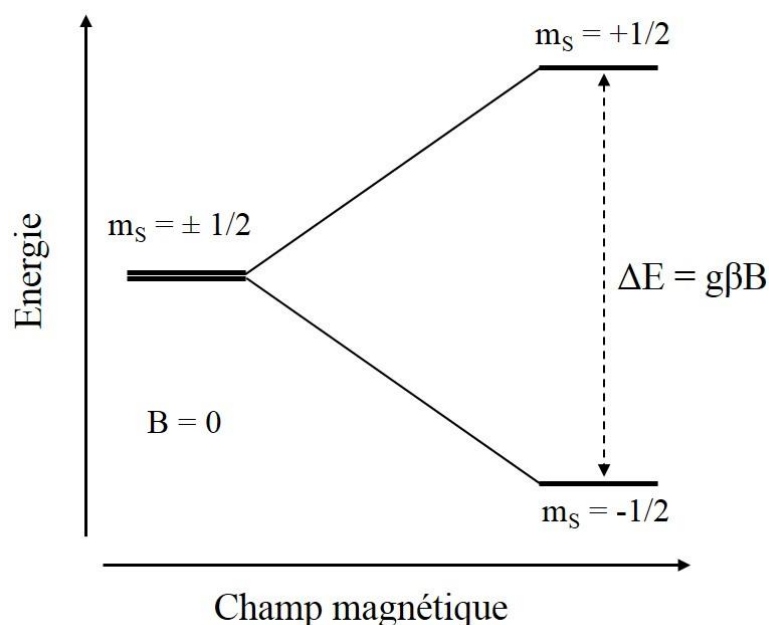


Figure 30-Levée de dégénérescence du doublet de Kramer sous l'effet d'un champ magnétique pour un spin $S=1/2$.

En pratique, l'échantillon est placé dans un champ magnétique B_0 que l'on fait varier, et il reçoit une onde électromagnétique de fréquence fixe ν . Lorsqu'on a $h\nu = \Delta E = g\beta B_0$, où h est la constante de Planck ($6,62607 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$), l'onde électromagnétique est absorbée et on dit qu'on a résonance. La valeur du champ magnétique permet alors de calculer la valeur du facteur g . Comme le champ magnétique est modulé, on n'observe pas directement le signal d'absorption, mais sa dérivée première.

Dans le cas général, le facteur g est en fait représenté par une matrice diagonale $[3 \times 3]$ dont les valeurs principales sont notées g_x, g_y, g_z (ou g_1, g_2, g_3). Lorsque le système étudié est isotrope, ces trois valeurs sont égales et on peut donc considérer le facteur g comme un scalaire. Si $g_x = g_y \neq g_z$, on parle de système axial et on note alors $g_x = g_y = g_{\perp}$ et $g_z = g_{\parallel}$; quand les trois valeurs g_x, g_y , et g_z sont différentes, on a un système rhombique. Lorsque l'élargissement des raies est trop important, *i.e.* de l'ordre de l'écart entre deux valeurs de g ou supérieur, les différentes valeurs de g ne sont pas résolues sur le spectre expérimental.

6.2.2. Cas du fer

Les propriétés électroniques du fer dépendent de son état d'oxydation, mais également de son environnement. On s'intéresse ici au Fe^{III} , qui est l'état stable du fer hémique des NOS en milieu aérobie, et au Fe^{II} , qui est seul capable de fixer le dioxygène et constitue donc le point de départ de leur cycle catalytique. La théorie du champ de ligands permet de décrire ces deux espèces. Un champ local, de symétrie octaédrique, conduit à une levée de dégénérescence partielle des orbitales d du fer en deux sous-groupes, notés e_g et t_{2g} . Le groupe e_g est le plus haut en énergie et est composé des orbitales d_{z^2} et $d_{x^2-y^2}$. Les orbitales d_{xy}, d_{yz} et d_{zx} constituent le

groupe t_{2g} et sont stabilisées par le champ de ligands. Ces deux groupes d'orbitales sont séparés d'une énergie Δ qui dépend de l'intensité du champ de ligands.

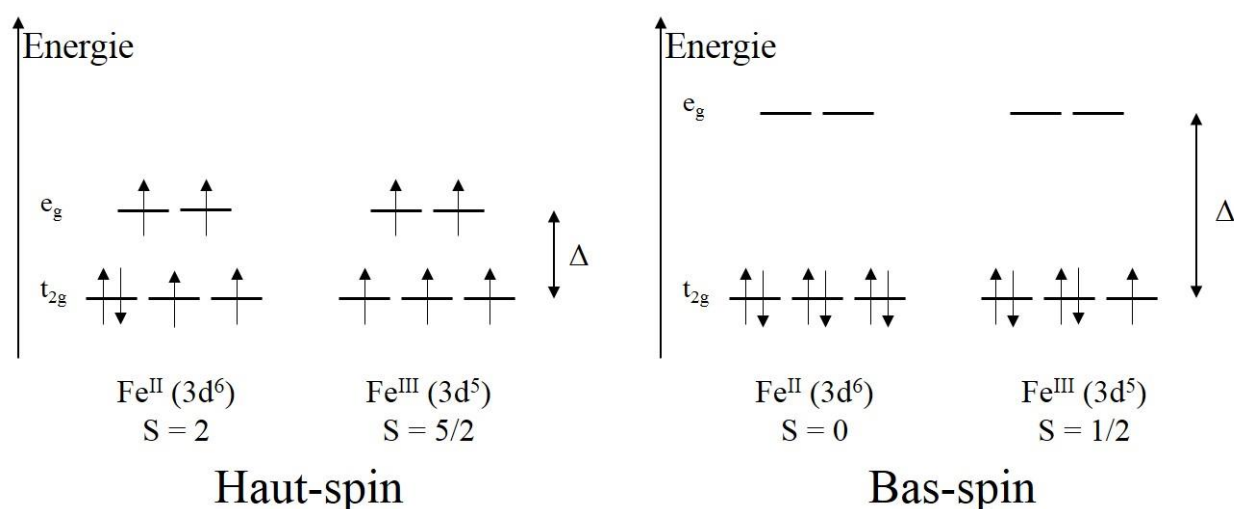


Figure 31- Représentation schématique des états haut-spin et bas-spin du fer.

Si le champ de ligands est fort (Figure 31, droite), alors Δ est supérieure à l'énergie d'appariement des électrons. Les électrons de valence du Fe^{II} ($3d^6$) et du Fe^{III} ($3d^5$) se répartissent donc dans les orbitales de plus basse énergie. On a donc un spin électronique $S=0$ pour le Fe^{II} et $S=1/2$ pour le Fe^{III} . Ces complexes sont dits à spin faible, ou bas-spin (BS). Dans le cas d'un champ de ligands faible (Figure 31, gauche), avec Δ inférieure à l'énergie d'appariement, les électrons de valence se répartissent sur les cinq orbitales d du fer. On a alors des complexes dits à spin fort, ou haut-spin (HS), avec $S = 2$ pour le Fe^{II} et $S = 5/2$ pour le Fe^{III} . Malgré un spin électronique non nul dans l'état HS, le Fe^{II} n'est généralement pas observable par RPE.

6.2.3. Eclatement à champ nul –Zero field splitting (ZFS)

Dans sa configuration HS, le Fe^{III} possède trois doublets de Kramer : $m_s = \pm 5/2$, $m_s = \pm 3/2$ et $m_s = \pm 1/2$. La différence d'énergie à champ nul (*Zero-field splitting*, ZFS) entre ces trois doublets, caractérisée par les paramètres D et E , est prépondérante devant l'effet Zeeman et gouverne donc la forme du spectre RPE. Les transitions permises, c'est-à-dire celles qui respectent la règle de sélection $\Delta m_s = \pm 1$, peuvent être, en théorie, intradoublet ou interdoublet. Cependant, en bande X ($\nu \approx 9.4\text{GHz}$), seul le doublet $m_s = \pm 1/2$ donne un spectre. En effet, pour le Fe^{III} HS, le ZFS est souvent trop important pour pouvoir observer les transitions interdoublés permises. L'allure du spectre est celle d'un système rhombique de spin $S=1/2$.

auquel on peut attribuer trois valeurs de g dites effectives, g_1^{eff} , g_2^{eff} et g_3^{eff} , qui correspondent aux transitions effectivement observées sur le spectre expérimental.

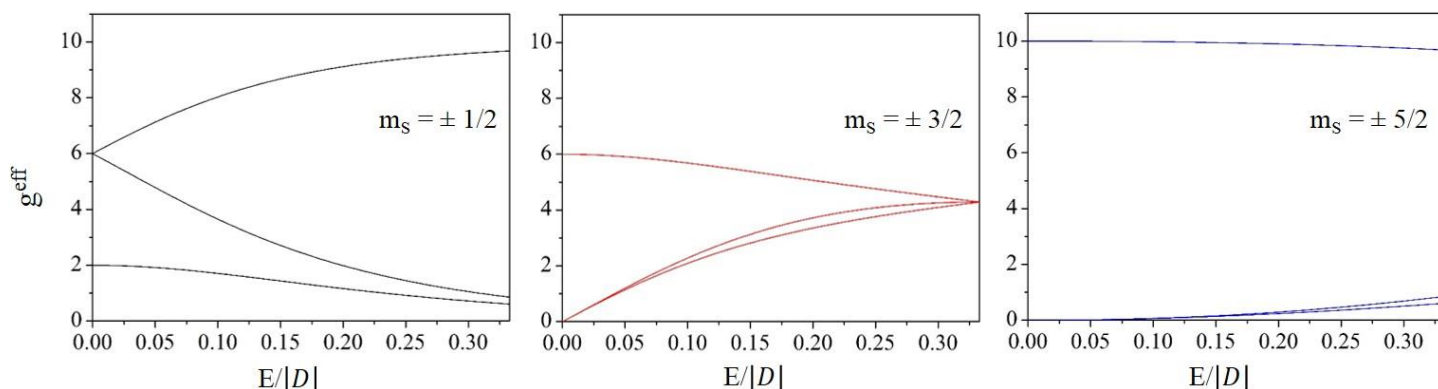


Figure 32- Valeurs de g effectives pour les trois doublets de Kramer du Fe^{III} HS en fonction des paramètres E et D . Ces rhombogrammes sont calculés pour $g=2.00$.

La mesure de ces valeurs de g effectives permet, grâce aux rhombogrammes ci-dessus (Figure 32) d'estimer le rapport E/D , qui renseigne sur l'environnement du centre paramagnétique étudié. Dans le cas des NOS, on peut parfois observer, sur les spectres de Fe^{III} HS enregistrés à 10K, une transition due au doublet $m_s = \pm 3/2$. Celle-ci permet alors d'estimer la valeur du paramètre D . De façon générale, quand D est élevé (comme c'est le cas pour les Fe^{III} HS), on ne peut déterminer que le rapport E/D .

6.2.4. Couplage hyperfin

Lorsqu'un atome possédant un spin nucléaire non nul I se trouve à proximité d'un centre paramagnétique, il peut interagir avec ce dernier ; c'est le couplage hyperfin, caractérisé par le tenseur A . Pour chaque valeur de g , on observe un éclatement en $2I+1$ raies. Ainsi, le couplage hyperfin d'un spin électronique avec le spin nucléaire d'un atome d'hydrogène ^1H ($I=1/2$) donnera un éclatement en deux raies du spectre RPE ; le couplage hyperfin avec le spin électronique d'un azote ^{14}N ($I=1$) donnera un éclatement en trois raies (Figure 33).

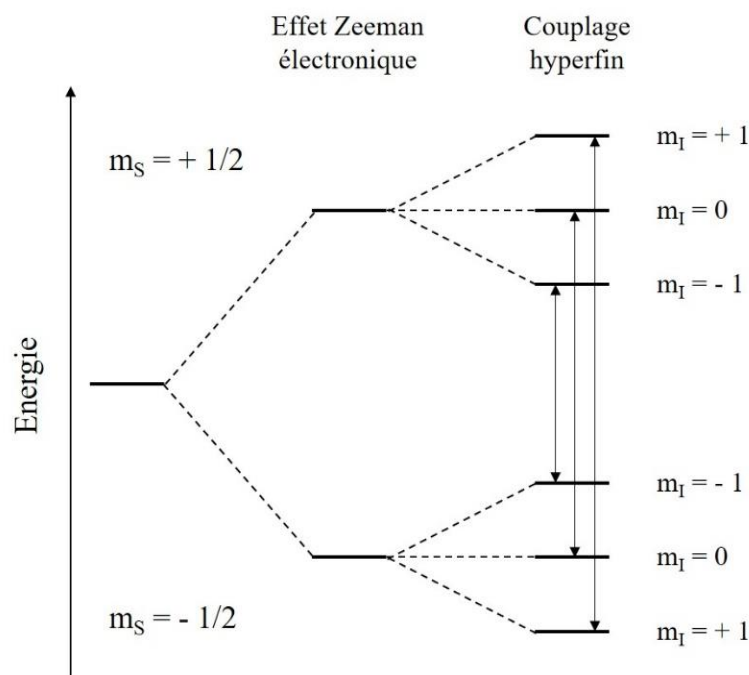


Figure 33- Niveaux d'énergie et transitions RPE permises pour un spin électronique $S=1/2$ en interaction hyperfine avec un noyau de spin $I=1$.

L'espace entre les raies dépend de la force du couplage. Les couplages hyperfins non résolus contribuent à l'élargissement des raies. Pour être permise, une transition doit respecter les deux règles de sélection $\Delta m_s = \pm 1$ et $\Delta m_I = 0$.

6.2.5. RPE impulsionnelle

Dans de nombreux cas, les couplages entre le centre paramagnétique étudié et les atomes de spin nucléaire non nul environnants, notamment ^1H et ^{14}N , ne sont pas résolus sur le spectre RPE enregistré en onde continue. Pour détecter ces couplages, on peut alors utiliser une technique de RPE pulsée appelée ESEEM (*Electron Spin Echo Envelope Modulation*) dont il existe plusieurs variantes. Dans le cadre de ce travail, on s'intéresse à deux d'entre elles : ESEEM à deux impulsions et une technique bidimensionnelle à quatre impulsions, le HYSCORE (*Hyperfine Sub-level CORrelation*).

Ces différentes séquences d'impulsions génèrent un écho dont on mesure l'intensité en fonction des temps séparant les impulsions : τ pour l'ESEEM à deux impulsions, et t_1 et t_2 pour le HYSCORE (Figure 34). La variation d'intensité de cet écho en fonction du temps est modulée par les fréquences de couplage des noyaux en interaction avec le centre paramagnétique étudié. On obtient un spectre en fréquence en réalisant une transformée de Fourier du signal enregistré.

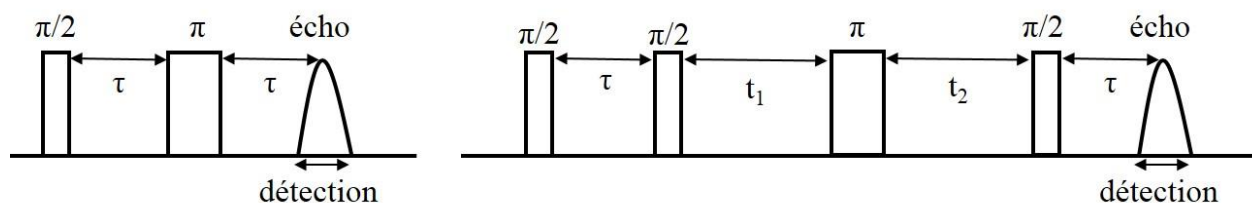


Figure 34- Séquences d'impulsions pour l'ESEEM 2-impulsions (gauche) et le HYSCORE (droite).

En utilisant la séquence à deux impulsions, on s'intéresse également à la variation de l'intégrale de cet écho en fonction du champ magnétique. On peut alors enregistrer le spectre RPE d'absorption du composé étudié.

6.2.6. Conditions expérimentales

Les spectres bande X en mode continu ont été enregistrés sur deux spectromètres Brüker (Elexys 500), munis soit d'une cavité standard, soit d'une cavité haute-sensibilité. Selon le spectromètre et la cavité utilisés, la fréquence des micro-ondes est de 9.38GHz, 9.42GHz ou 9.50GHz. Un cryostat à flux d'hélium (Oxford) et une résistance de chauffage permettent de réguler la température et de la maintenir à une valeur fixée. Les différents spectres présentés dans cette étude n'ayant pas tous été enregistrés à la même fréquence, on a choisi de les tracer en fonction des valeurs de g , et non pas du champ magnétique. Les spectres RPE des différents complexes étudiés ont été enregistrés en conditions non saturantes, sauf cas contraire, précisé dans la légende de la figure concernée. Lorsque plusieurs spectres sont présentés sur la même figure, ils sont normalisés par division par le maximum en valeur absolue du signal.

Les spectres en bande Q ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker (Elexys SuperQ-FT), au Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines à Marseille (UMR 7281), en collaboration avec Guillaume Gerbaud de l'équipe Biophysique des métalloprotéines, dirigée par Bruno Guigliarelli. Cette collaboration a été réalisée dans le cadre de l'IR-RPE (CNRS 3443).

6.2.7. Simulation

On cherche à déterminer les paramètres de l'Hamiltonien par simulation des spectres expérimentaux. Pour cela, on utilise le logiciel EasySpin[191], qui fonctionne sous Matlab, et des routines écrites au laboratoire. Quand cela est possible, les valeurs de ces paramètres sont tout d'abord estimées sur le spectre expérimental puis optimisées par le logiciel, ou ajustées manuellement. Les valeurs de g mesurées directement sur les spectres expérimentaux seront données avec 3 chiffres significatifs ; celles obtenues par simulations seront données avec 4 chiffres significatifs.

7. Techniques de cinétiques rapides

7.1. Suivi de la réaction par cinétique en flux arrêté – *Stopped-flow*

7.1.1. Principe

Cette technique de cinétique rapide permet de suivre l'évolution de la composition du milieu réactionnel au cours du temps. L'appareil (Bio-logic SFM300) est composé de trois seringues et de deux chambres de mélange[192]. Dans la première chambre, on mélange le contenu des seringues 1 et 2 et on peut laisser vieillir ce milieu, avant de le mélanger, dans la deuxième chambre, avec le contenu de la seringue 3. Dans cette dernière, un détecteur à barrette de diodes permet d'enregistrer un spectre d'absorption UV-visible (300-750nm) toutes les 3ms et de suivre ainsi l'évolution de la réaction.

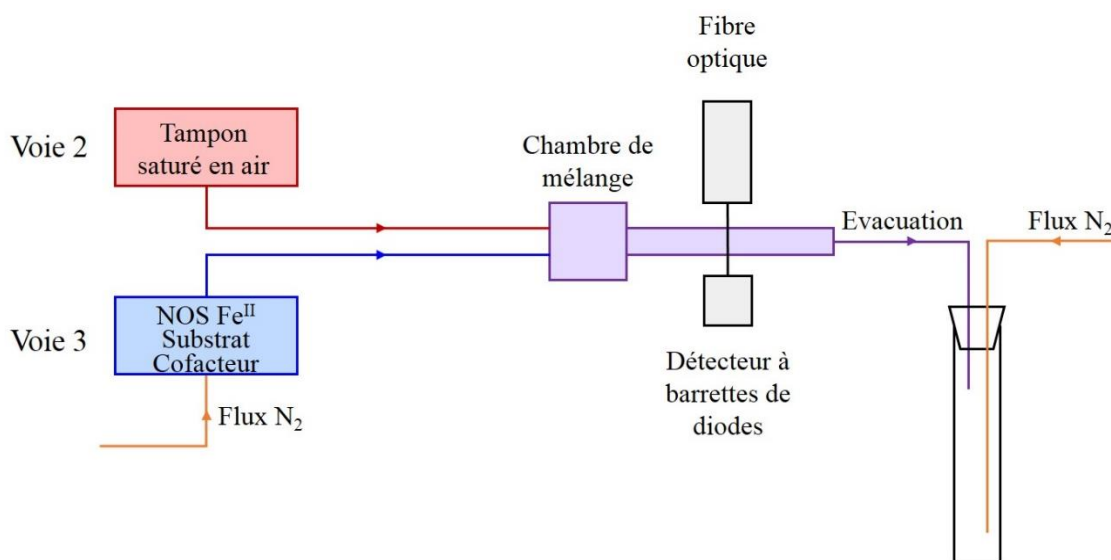


Figure 35- Schéma de fonctionnement de l'appareil Bio-logic SFM 300, en configuration *stopped-flow*.

Dans notre cas (Figure 35), on n'utilise que les seringues 2 et 3 et donc uniquement la 2^{ème} chambre de mélange ; la seringue 2 contient un tampon oxygéné, et la seringue 3 contient une solution anaérobie de protéine réduite saturée en substrat (arginine ou NOHA) et cofacteur. La seringue 3, ainsi que le chemin d'accès jusqu'à la chambre de mélange sont anaérobisés afin d'éviter la réoxydation prématurée du fer hémique. Lors du mélange équimolaire des deux solutions, le dioxygène, en large excès par rapport à la protéine, réagit avec le Fe^{II} et on peut alors suivre la formation et la disparition de différents intermédiaires hémiques, jusqu'à l'apparition du Fe^{III} final, qui est l'espèce stable en présence d'oxygène. On est ici en conditions de *single-turnover* : chaque protéine ne peut effectuer qu'un seul cycle catalytique. En effet, on travaille en l'absence de réducteur, et le Fe^{III} n'est pas réactif vis-à-vis du dioxygène.

7.1.2. Préparation de la protéine

Le volume de solution protéique à dégeler est choisi de façon à pouvoir préparer 1,8mL d'une solution de NOS à environ 25 μ M. Lors du mélange avec le tampon oxygéné, la concentration en NOS sera alors d'environ 12 μ M, ce qui permet d'avoir un bon rapport signal/bruit, tout en restant dans la zone de linéarité du récepteur. Comme les spectres enregistrés sont utilisés pour calculer les vitesses de formation et de disparition des différents intermédiaires réactionnels, il est en effet indispensable que la densité optique mesurée soit directement proportionnelle à la concentration des espèces étudiées.

La protéine est reconditionnée dans des MicroCon 30kDa (Millipore, Bedford, MA, USA) et on réalise 3 à 5 cycles dilution/centrifugation (4°C, 20 min, 5400 g) avec un tampon Tris 0,1M pH 7,4 contenant 10% de glycérol et dans lequel sont ajoutés un substrat (arginine 5mM ou NOHA 500 μ M), un cofacteur (H₄B ou H₄F 500 μ M) et du DTT (3mM) pour protéger le cofacteur de l'oxydation. La protéine concentrée et saturée en substrat et cofacteur est anaérobisée dans une cuvette de quartz comme décrit précédemment (Cf. §3.2.2).

Pendant le reconditionnement, du tampon Tris 0,1M pH 7,4, qui servira à préparer la solution de dithionite et à nettoyer les différentes seringues *gas-tight* utilisées, et du tampon de conditionnement sont anaérobisés. Une solution de dithionite ($\approx$ 33mM) est également préparée: 11mg de dithionite (neuf ou conservé sous vide) sont pesés dans un pilulier qui est scellé avant d'être mis sous argon. L'argon circule dans le pilulier pendant au moins deux heures puis 2mL de tampon Tris 0,1M pH 7,4 anaérobie, sont ajoutés à l'aide d'une seringue *gas-tight*. Cette solution est laissée sous argon jusqu'à utilisation. Une fois la solution protéique anaérobisée, le volume de tampon de conditionnement anaérobie nécessaire pour atteindre 1,8 mL y est ajouté.

On procède alors à la réduction du Fe^{III} en Fe^{II}, avec suivi par spectroscopie UV-visible selon le protocole utilisé pour les tests d'activité en *single-turnover* (§3.2.2). Quand l'ajout de dithionite ne modifie plus le spectre, on attend quelques minutes et on enregistre un dernier spectre pour s'assurer que l'équilibre est bien atteint. Une seringue *gas-tight* est alors utilisée pour introduire la protéine réduite dans le réservoir 3 de l'appareil.

7.1.3. Préparation de l'appareil et enregistrement des données

Les voies 2 et 3 sont lavées à l'eau puis au tampon Tris 0,1M pH 7,4. La voie 3, qui accueillera la protéine réduite, est ensuite anaérobisée. On choisit cette voie pour la protéine car c'est la plus courte ; on a donc un volume mort plus faible. Le réservoir est bouché à l'aide d'un septum et de l'azote est mis à circuler dans le piston pendant au moins une heure puis le piston est mis en contact avec le reste du circuit. La voie 3 est ensuite rincée avec du tampon Tris 0,1M pH 7,4 anaérobie puis avec la solution de dithionite pour éliminer les dernières traces de dioxygène et enfin de nouveau avec du tampon anaérobie pour enlever l'excès de dithionite. Quand la protéine est prête le tampon oxygéné (Tris 0,1M pH 7,4) est sorti du réfrigérateur et

introduit dans le réservoir. L'appareil (pistons, capillaires et chambre de mélange) est thermostaté à 4°C.

Le logiciel BioKine[190] est utilisé pour contrôler l'appareil et enregistrer les spectres. Pour réaliser le mélange du tampon oxygéné (88µL) avec la solution contenant la protéine (88µL), on utilise le débit maximal autorisé par l'appareil (7mL/s) afin de réduire autant que possible le temps de mélange. On peut ensuite enregistrer jusqu'à 750 spectres (300-750nm), l'intervalle entre deux spectres étant un multiple de 3ms. Il y a 1,1ms de temps mort entre la mise en contact des solutions et le début de l'enregistrement.

Les premiers mélanges permettent de s'assurer de la propreté de la chambre de mélange et de chasser les éventuelles bulles d'air qui faussent les volumes de mélange et peuvent perturber les spectres. Lors des mélanges suivants, on enregistre les spectres. Avec un spectre toutes les 3ms, on suit l'évolution du milieu réactionnel pendant 2,25s. Si la réaction n'est pas complètement terminée, on peut choisir un intervalle plus long entre les spectres. Comme l'oxygène diffuse à travers les solutions, on peut observer une réoxydation progressive du Fe^{II} , ce qui limite la durée utile de l'expérience. Selon la stabilité du Fe^{II} , qui dépend de la NOS étudiée ainsi que du substrat utilisé, on obtient donc entre 5 et 15 jeux de données exploitables pour chaque expérience.

7.1.4. Exploitation des résultats

Dans un premier temps, on cherche à identifier les intermédiaires réactionnels observés. Pour cela, on compare les spectres UV-visible enregistrés avec ceux de complexes connus (Fe^{II} , Fe^{III} , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$). Pour calculer les vitesses de formation et de disparition de ces intermédiaires, on s'intéresse à l'évolution de l'absorbance à différentes longueurs d'ondes : 396nm, 440nm et 650nm. On utilise le logiciel Origin pour modéliser chacune de ces courbes par une ou deux exponentielles. On utilise généralement 5 jeux de données (correspondant chacun à un mélange) par expérience et, on réalise au moins deux expériences pour chaque condition étudiée (NOS, substrat, cofacteur).

7.2. Piégeage du radical ptérine – *Rapid freeze-quench*

7.2.1. Principe

On utilise le même appareil que pour les expériences de *stopped-flow* mais selon un montage légèrement différent (Figure 36)[192]. Après le mélange de la solution anaérobie de protéine réduite avec le tampon aérobie, on laisse vieillir le milieu réactionnel pendant un temps déterminé, avant de l'éjecter, dans un falcon rempli d'isopentane à son point de fusion (130K) pour stopper la réaction. Lors de son éjection, le liquide est nébulisé en très petites gouttelettes, de sorte que le temps de congélation au contact de l'isopentane est négligeable devant le temps de réaction. Ce temps de réaction comprend le temps de vieillissement dans l'appareil, ainsi que le temps mis par le liquide nébulisé pour atteindre la surface de l'isopentane (temps de vol).

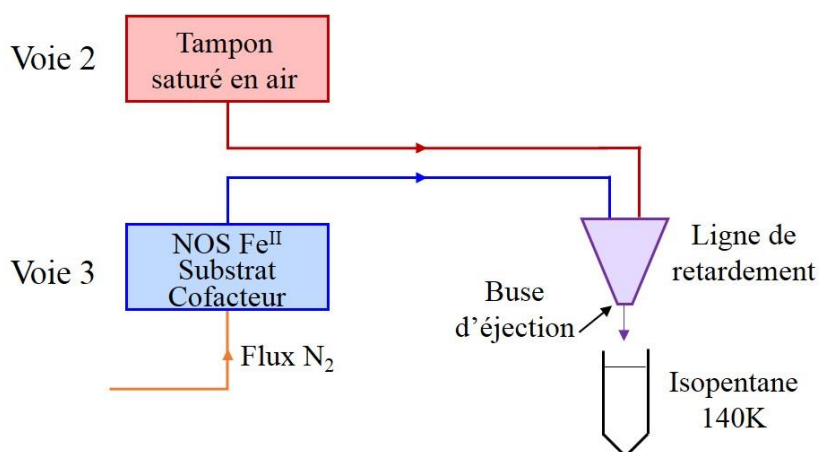


Figure 36- Schéma de fonctionnement de l'appareil Bio-logic SFM-300 en configuration *freeze-quench*.

Le milieu réactionnel gelé est maintenu dans l'isopentane liquide à 140K et transféré dans un tube RPE pour analyse. En plus des éventuels intermédiaires hémiques ayant une signature RPE (Fe^{II}, Fe^{II}O₂, Fe^{II}NO, Fe^{III} LS, Fe^{III} HS), on cherche en particulier à observer la formation d'un radical biptérine qui, d'après le modèle actuel, est couplée à la disparition du complexe Fe^{II}O₂, aussi bien dans la 1^{ère} que dans la 2^{ème} étape du cycle catalytique des NOS. On utilise donc les cinétiques de formation et de disparition de ce complexe obtenues grâce aux expériences de *stopped-flow* pour choisir les temps de réaction.

7.2.2. Préparation de la protéine

Le volume de solution protéique à dégeler est choisi de façon à pouvoir préparer 1,3 mL d'une solution de NOS à environ 200 μ M. Lors du mélange avec le tampon oxygéné, la concentration en NOS sera alors d'environ 100 μ M. Cette concentration permet d'obtenir un rapport signal/bruit tout à fait satisfaisant pour les spectres RPE des intermédiaires hémiques. Concernant le radical bioptérine, son signal est bien plus étroit, donc plus intense, et il peut être détecté à des concentrations plus faibles. On doit donc, dans ces conditions, être capable de détecter sa présence, même s'il s'accumule peu dans le milieu réactionnel.

On procède comme pour le *stopped-flow*, à quelques différences près. Comme on travaille avec une concentration de protéine plus importante, on prépare une solution de dithionite plus concentrée (100mM) afin de ne pas trop diluer la protéine lors de la réduction.

Afin d'éviter les réactions parasites, on va chercher à éliminer au moins en partie, les excès de DTT, dithionite, substrat et cofacteur. Pendant le conditionnement de la protéine, des colonnes de dessalage (*Protein desalting spin columns*, Thermo Scientific) sont lavées en boîte à gants, avec du tampon KPi 0,1M pH7,4 anaérobie. Chaque colonne est remplie avec 400 μ L de tampon puis centrifugée (1min, 1500g). L'opération est répétée trois fois. Une fois la protéine réduite, la cuvette de quartz est introduite dans la boîte à gants. La protéine est passée sur les colonnes de dessalage (110 μ L/colonne) et centrifugée (30s, 1500g) pour récupérer la solution protéique. Elle est introduite dans une cuvette en quartz de 2mL munie d'un pas de vis. Le volume de solution est ajusté à 1,3 mL avec du tampon KPi 0,1M, pH 7,4 anaérobie et du glycérol anaérobie (10% volumique final). Un bouchon et une rondelle en caoutchouc sont placés sur la cuve qui est alors fermée avec le bouchon à vis, de la façon la plus hermétique possible. La cuvette peut alors être sortie de la boîte à gants. Un spectre d'absorption (500-750nm) est enregistré pour vérifier que la protéine est toujours réduite puis, à l'aide d'une seringue *gas-tight*, elle est introduite dans le réservoir 3 de l'appareil.

7.2.3. Préparation de l'appareil et récupération des échantillons

L'appareil est préparé comme pour les expériences de *stopped-flow* : lavé à l'eau puis au tampon, thermostaté à 4°C ; la voie 3 est anaérobisée par circulation d'azote. La seringue 2 est remplie de tampon saturé en air et la seringue 3 contient la protéine réduite. Des falcons d'isopentane sont également préparés et gardés dans l'azote liquide.

Le logiciel BioKine[190] est utilisé pour programmer les séquences de tirs. Les solutions contenues dans chaque seringue sont poussées jusque dans la chambre de mélange où elles entrent en contact. Le mélange passe ensuite par une ligne de retardement puis est évacué vers une poubelle, ou éjecté à travers le nébuliseur et récolté dans un falcon d'isopentane. On choisit les volumes de solution utilisés et leur débit (identique pour les deux voies), ainsi que le volume de la ligne de retardement. Ces trois paramètres déterminent le temps de vieillissement. Le débit choisi détermine la vitesse d'éjection du milieu réactionnel, et donc le temps de vol

entre la sortie de l'appareil et la surface de l'isopentane, distants d'environ 10cm. Lors de l'éjection, le milieu réactionnel est nébulisé en très petites gouttelettes, ce qui nous permet de négliger le temps de congélation lors du calcul du temps total de réaction (Table 3). On a choisi de toujours travailler avec 80µL de protéine et 80µL de tampon et de ne modifier que le débit et le volume de la ligne de retardement pour modifier les temps de réaction.

Volume de la ligne de retardement (µL)	Débit (mL/s)	Temps de vieillissement (ms)	Temps de vol (ms)	Temps de réaction total (ms)
93,6	4,571	21	4	25
93,6	1,882	50	10	60
189,5	1,455	130	13	143
189,5	0,667	284	29	313

Table 3- Exemples de calculs de temps de réaction pour les expériences de freeze-quench, selon la ligne de retardement et le débit utilisés.

Comme pour le *stopped-flow*, les premiers tirs sont jetés. De plus, deux tirs successifs sont systématiquement programmés et le premier est jeté pour évacuer les éventuels restes du mélange précédent. Pour chaque temps de réaction, deux à trois tirs sont récoltés dans le même falcon. Cela permet de préparer deux tubes RPE à partir du même échantillon. Une fois les tirs effectués, le falcon est immédiatement replongé dans l'azote liquide.

Un tube RPE est fixé à un entonnoir en téflon et plongé dans un Dewar rempli d'isopentane liquide mais froid (140K). La température du bain d'isopentane est contrôlée en permanence pour pouvoir le refroidir si besoin. L'échantillon est déposé dans l'entonnoir puis broyé et tassé au fond du tube. L'isopentane contenu dans le tube est aspiré et ses parois extérieures sont essuyées avant qu'il soit plongé dans l'azote liquide pour conservation.

8. Bio-informatique

Parmi les NO-synthases bactériennes étudiées dans le cadre de cette thèse, seule celle issue de *Deinococcus radiodurans* n'a pas été cristallisée. On ne dispose donc pas de structure tridimensionnelle de deiNOS qui pourrait nous aider à expliquer certaines de ses caractéristiques. Cependant, les structures d'autres NOS bactériennes, ainsi que celles des domaines oxygénases de NOS de mammifères sont disponibles. Comme toutes partagent une certaine identité de séquence, en particulier au niveau du site actif et du site de fixation du cofacteur, on utilise des structures existantes homologues comme modèles pour essayer de reconstruire celle de deiNOS[193,194].

8.1. Construction d'une structure de deiNOS par homologie

8.1.1. Choix des modèles

A la date du 28 septembre 2016, il existe 486 structures de NOS répertoriées dans la *Protein Data Bank* parmi lesquelles on trouve 56 structures de NOS bactériennes : 54 structures de la NOS de *Bacillus subtilis* (bsNOS), dont certains mutants, une structure de la NOS de *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS) et une structure de la NOS de *Staphylococcus aureus* (saNOS). Leurs séquences sont alignées avec celle de deiNOS, avec Clustal Ω , pour déterminer leurs pourcentages d'identité et de similarité. On aligne également une NOS inducible de mammifère (iNOS), issue de *Mus musculus*, car elle a davantage de similarité de séquence avec les NOS bactériennes que les NOS endothéliale et neuronale.

Protéine	Code PDB	Substrat	Cofacteur	Résolution (Å)	identité avec deiNOS
iNOS	1NOD	Arginine	H ₄ B	2,60	39,1%
gsNOS	2FLQ	Arginine	-	3,20	42,9%
bsNOS	1M7V	Arginine	H ₄ F	1,95	40,9%
saNOS	1MJT	Inhibiteur	-	2,40	38%

Table 4- Caractéristiques des structures cristallographiques de NOS utilisées pour la modélisation par homologie de deiNOS.

Les alignements sont réalisés dans Seaview, avec le programme d'alignement multiple *Clustal Omega*. Comme saNOS n'a pas été cristallisée en présence d'un substrat, mais seulement d'un inhibiteur, on ne l'utilisera pas comme modèle, malgré une identité de séquence

avec deiNOS comparable à celles des trois autres. Pour bsNOS, iNOS et gsNOS, on choisit une structure parmi celles disponibles, dont les caractéristiques sont résumées Table 4.

8.1.2. Construction du monomère sous Modeller

On ne s'intéresse pour l'instant qu'à la chaîne A de chaque dimère. Les alignements obtenus précédemment avec *Clustal Omega* sont repris et retravaillés. On commence par vérifier la position dans l'alignement des acides aminés que l'on sait être conservés - notamment la cystéine qui lie le fer, le tryptophane qui interagit avec le cofacteur par π -stacking et l'isoleucine (valine chez iNOS) dont on étudie l'influence (Cf. chapitre 3). On regarde également si les gaps créés lors de l'alignement sont judicieux et notamment s'ils n'interrompent pas une structure secondaire.

Pour faciliter l'ajout des ligands (hème, substrat et cofacteur) dans le monomère, les fichiers PDB sont modifiés pour que chaque chaîne soit immédiatement suivie de ses ligands.

8.1.3. Construction du dimère sous Modeller

Pour construire le dimère de deiNOS, on garde le même alignement que pour le monomère, en répétant la séquence. Les deux chaînes sont séparées par un slash dans le fichier d'alignement (.ali utilisé par Modeller) et les ligands affectés à chaque monomère sont appelés à la fin de chaque chaîne. Dans le fichier .ali, la lettre h désigne l'hème et les symboles « . » les ligands cocrystallisés dans l'ordre de la numérotation du fichier PDB (Cf. Annexe 1)

8.1.4. Génération de structures multi-modèles

On cherche maintenant à utiliser les trois modèles en même temps pour construire une structure de deiNOS. Pour cela, un alignement multiple des séquences d'iNOS, gsNOS et bsNOS par rapport à deiNOS est réalisé. Comme précédemment, le programme d'alignement multiple *Clustal Omega* est utilisé et les alignements sont retravaillés. Ici, on se contente de tronquer les séquences pour éliminer les extrémités qui ne sont pas alignées avec deiNOS, notamment pour iNOS qui est significativement plus longue. Cela permet d'éviter des segments d'acides aminés isolés en N-terminal ou en C-terminal. Le fichier d'alignement ainsi obtenu et utilisé pour construire des structures de deiNOS est disponible en annexe 1.

L'hème et le substrat arginine sont présents dans les trois structures utilisées comme modèles, ils sont invoqués dans toutes les séquences utilisées pour la reconstruction et on génère ainsi une première série de 100 structures dimériques contenant uniquement l'hème et le substrat arginine. Pour ajouter un cofacteur, il est appelé dans la séquence de deiNOS et dans la séquence de la protéine dans laquelle il se trouve (iNOS 1NOD pour H4B et bsNOS 1M7V pour H4F). Une série de 100 structures est générée pour chaque condition. Les scripts python utilisés par Modeller 9.14 sont disponibles en annexe 1.

8.1.5. Classement des structures obtenues

Plusieurs indicateurs sont utilisés pour classer les structures obtenues et pouvoir choisir la ou les meilleures. Tout d'abord, il existe un score interne à Modeller ; il s'agit de la « fonction objective » que Modeller cherche à optimiser lors du calcul d'une structure. Pour les cent structures générées, on fait également calculer par Modeller le score *Discrete Optimized Protein Energy*, ou DOPE, pour chaque structure obtenue. Cette méthode d'évaluation statistique des structures protéiques a été mise au point par Shen et Sali en 2006 et incorporée à Modeller[195]. Ces fonctions dépendant notamment de la taille de la protéine et du, ou des modèles utilisés pour construire la structure, les scores obtenus pour les différentes séries de 100 structures ne sont pas comparables. Chaque série est donc traitée de manière indépendante.

Protéine	Code PDB	QMEAN
iNOS	1NOD	0,782
bsNOS	1M7V	0,725
gsNOS	2FLQ	0,707

Table 5- Scores QMEAN des trois structures utilisées comme modèle pour construire la structure de deiNOS.

Pour chaque série, les dix structures ayant les meilleurs DOPE scores sont sélectionnées et on vérifie que leur valeur de fonction objective se situe aussi parmi les plus basses. Pour ces dix structures, un troisième indicateur est utilisé, externe à Modeller cette fois-ci, le score QMEAN[196] (*Qualitative Model Energy Analysis*). Les scores sont calculés sur un serveur dédié, mis en place par l'Institut Suisse de Bio-informatique Swiss-Model[197]. Cette fonction prend en compte différents aspects géométriques de la structure pour lui attribuer un score compris entre 0 et 1. Afin d'avoir un score de référence pour évaluer la qualité des structures construites par Modeller, le score QMEAN des trois structures PDB utilisées comme modèles a d'abord été calculé.

8.2. Dynamique moléculaire

Ce protocole a été mis en place par Zeineb Si Chaib, dans le cadre de son stage de Master 1, encadrée par Pierre Dorlet et François André. Les simulations ont toutes été réalisées avec le logiciel GROMACS, version 5.1.2 [198-200].

8.2.1. Choix du champ de force

Le champ de force choisi dans le cadre de cette étude est CHARMM27 (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) : dans une étude récente réalisée avec CHARMM sur la NOS inductible, les auteurs présentent notamment les paramètres complets permettant le paramétrage de l'hème, dans l'état Fe^{II} ou Fe^{III} , sous le champ de force CHARMM[112].

8.2.2. Paramétrage des ligands

Afin que GROMACS puisse effectuer les différentes étapes du calcul, il doit connaître les paramètres associés à tous les constituants du système. Pour les 20 acides aminés protéinogènes, ces informations sont répertoriées dans les fichiers associés par défaut au champ de force CHARMM27. Pour les ligands, en revanche, on doit déterminer ces paramètres topologiques et énergétiques (atomes d'hydrogène, charges partielles, liaisons covalentes, *Cf.* Annexe 2).

8.2.2.1. Hème

Le champ de force CHARMM27 contient déjà la majorité des paramètres de l'hème. Il manque cependant les données concernant les atomes d'hydrogène car ceux-ci ne sont pas présents dans les structures cristallographiques. Ces paramètres sont donc ajoutés au fichier «aminoacids.hdb » (Hydrogen DataBase) qui contient toutes les informations permettant de construire les atomes d'hydrogène lors de la génération de la topologie de la protéine et de ses ligands par GROMACS (*Cf.* §8.2.3). Les paramètres de la liaison Fe-S (longueur, angles $\text{C}_{\beta\text{cystéine}}\text{-S-Fe}$ et $\text{S-Fe-N}_{\text{pyrrole}}$, et angles dièdres) n'étant pas non plus définis, ils sont ajoutés au fichier « ffbonded.itp » qui recense les différents types d'interactions et leurs caractéristiques, dans le cadre du champ de force CHARMM27. Enfin, les paramètres de charges définis par Feng *et al.*[112] sont utilisés pour l'hème et pour la cystéine proximale.

8.2.2.2. Arginine

Le substrat arginine étant un acide aminé protéinogène, ses paramètres sont déjà définis dans les fichiers de CHARMM. On doit donc simplement préciser au logiciel qu'il s'agit d'un ligand et non d'un résidu de la protéine ; on utilise pour cela l'option « chainesep ».

8.2.2.3. Cofacteur H₄F

Contrairement à l'hème, aucune donnée concernant le cofacteur H₄F n'est présente dans les fichiers associés à CHARMM27. Le service en ligne SwissParam[201] de l'Institut Suisse de Bio-informatique a été utilisé pour générer une topologie de H₄F et pouvoir ensuite construire son fichier de paramétrage. Comme pour l'hème, les données concernant les atomes d'hydrogène ont été ajoutées au fichier «aminoacids.hdb ». Une structure optimisée de H₄F, comprenant les atomes d'hydrogène, a également été calculée grâce au logiciel ORCA. En plus des positions des atomes, ce dernier calcule aussi les charges partielles (charges de Mülliken) portées par chaque atome. Ce sont les charges de Mülliken calculées par ORCA qui seront utilisées par la suite.

8.2.3. Procédure de dynamique moléculaire

8.2.3.1. Génération de la topologie

La première étape de la procédure consiste à générer la topologie de la protéine, avec l'hème, le substrat arginine et le cofacteur H₄F. Cela consiste principalement à ajouter les atomes d'hydrogène, ces derniers n'étant pas présents dans le fichier de structure généré par Modeller. Par défaut, le pH de simulation est fixé à 7 ; les groupements amine des acides aminés sont donc tous protonés, et les groupements carboxylate sont tous déprotonés. Pour les résidus acides ou basiques, les informations contenues dans le fichier « aminoacids.hdb » permettent de déterminer l'état de protonation des chaînes latérales. Les paramètres utilisés pour l'hème et le cofacteur H₄F sont listés en annexe 2.

8.2.3.2. Solvation et neutralisation du système

Une fois la topologie de la protéine obtenue, le système est solvaté. Les structures cristallographiques qui ont permis la reconstruction du modèle contiennent des molécules d'eau mais ces dernières n'ont pas été prises en compte pour générer celle de deiNOS. La protéine est donc plongée dans une boîte cubique de (10,90*10,90*10,90) nm³, remplie de molécules d'eau. Les simulations ont été menées en solvant explicite, *ie* en considérant des molécules d'eau discrètes. Le modèle de molécules d'eau recommandé pour le champ de force CHARMM27 est le modèle TIP3P ; c'est celui qui a été utilisé dans cette étude. Il s'agit d'un des modèles de molécule d'eau les plus simples : on considère une molécule rigide dont la longueur de liaison O-H (0,957 Å), l'angle H-O-H (104,52°) et les charges partielles portées par l'oxygène (-0,834) et les deux atomes d'hydrogène (+0,417) sont fixées.

Une fois la protéine solvatée, la charge totale du système est calculée, et des ions Na⁺ ou Cl⁻ sont ajoutés afin de le neutraliser. Dans le cas de deiNOS, on a une charge totale de -4, due aux deux groupements carboxylate COO⁻ portés par chaque molécule de H₄F ; la neutralisation du système requiert donc le remplacement de quatre molécules d'eau par des ions Na⁺ ou K⁺.

Une première minimisation d'énergie est ensuite réalisée qui permet la diffusion des molécules d'eau, notamment au sein des cavités de la protéine.

8.2.3.3. Equilibrage

Avant de lancer la production de dynamique moléculaire à proprement parler, une phase d'équilibrage du système est nécessaire. Cette dernière a été réalisée en deux étapes (2*100ps) durant lesquelles la protéine reste gelée : la première permet de stabiliser la température du système ($\approx 300\text{K}$) et la seconde la pression à l'intérieur de la boîte de simulation ($\approx 1\text{bar}$).

8.2.3.4. Dynamique moléculaire

On a produit des simulations de dynamique moléculaire de 5ns ou 10ns, en absence ou en présence du cofacteur H_4F . Dans tous les cas, les paramètres du système (position des atomes, énergie, température, *etc.*) sont enregistrés toutes les 20ps : on a donc 250 ou 500 états du système.

8.2.4. Analyse des résultats

Les fichiers de trajectoires (.trr) sont visualisés sous VMD. Cela nous permet, dans un premier temps, de contrôler l'évolution de la structure et du positionnement du cofacteur H_4F au cours du temps, et de repérer les acides aminés situés à proximité de ce dernier et donc susceptibles de participer à sa fixation. On s'intéresse également à l'évolution de la distance entre les deux atomes de fer et entre les résidus de deux hélices α , et du rayon de giration de la protéine, qui caractérisent la compacité du dimère et nous renseignent donc sur sa stabilité.

Chapitre III

Substitution Val/Ile – Influence de l’environnement distal

1. Introduction

Les NOS-LP bactériennes sont très semblables à leurs homologues mammifères, aussi bien en ce qui concerne leur repliement tridimensionnel que leur séquence en acides aminés, en particulier au niveau du site actif [21, 23, 143]. De plus, elles possèdent une bonne affinité pour le substrat arginine et le cofacteur biotépine H₄B et forment, comme les mNOS, des dimères stables en solution[21, 23, 143, 151]. Enfin, des études *in vitro* ont montré qu'elles pouvaient catalyser l'hydroxylation de l'arginine en NOHA et l'oxydation du NOHA en citrulline et NO[•] [22-24, 137]. La production de monoxyde d'azote par des bacNOS a également été démontrée *in vivo*[138-140, 161-163]. Cette grande ressemblance avec les NOS de mammifères, ainsi que leur facilité de manipulation et leur plus grande stabilité, ont conduit les NOS bactériennes, et en particulier celle de *Bacillus subtilis* (bsNOS), à être utilisées comme modèle pour l'étude des enzymes de mammifères.

Il existe tout de même des différences notables entre mNOS et bacNOS. Tout d'abord, contrairement aux mNOS, les bacNOS ne possèdent pas de domaine réductase fusionné[18, 19] ; on ne peut donc étudier leur mécanisme catalytique qu'en conditions de *single-turnover*, ou en présence d'une réductase libre. Comme on ne connaît pas, actuellement, leur(s) partenaire(s) redox *in vivo*[25, 159], on ne peut cependant pas garantir que le système ainsi constitué corresponde à une réalité biologique. De plus, certaines bactéries possédant une bacNOS n'ont pas la machinerie nécessaire à la synthèse du cofacteur H₄B [30], indispensable à la production de NO[•][22, 24, 137, 147]. L'utilisation du tétrahydrofolate H₄F, qui possède également un noyau ptérine et est présent chez la plupart des bactéries, a été proposée[28]. Toutefois, aucune production homologue de bacNOS, suivie de l'extraction et de la purification de l'enzyme, n'a, à ce jour, été réalisée, qui permettrait de vérifier la présence d'un cofacteur et de l'identifier. Enfin, les études réalisées *in vitro* ont montré que la production de NO[•] par les bacNOS était très inférieure à celle des mNOS[22-24, 137, 160], dans les mêmes conditions, et certains résultats expérimentaux, notamment le fait qu'un radical ptérine n'ait jamais été observé lors de l'oxydation du NOHA par une bacNOS[31], suggèrent qu'on pourrait avoir des différences entre le mécanisme catalytique généralement proposé pour les mNOS (Figure 37), et celui des bacNOS. L'ensemble de ces informations remet en cause l'utilisation des bacNOS comme modèle pour l'étude des mNOS.

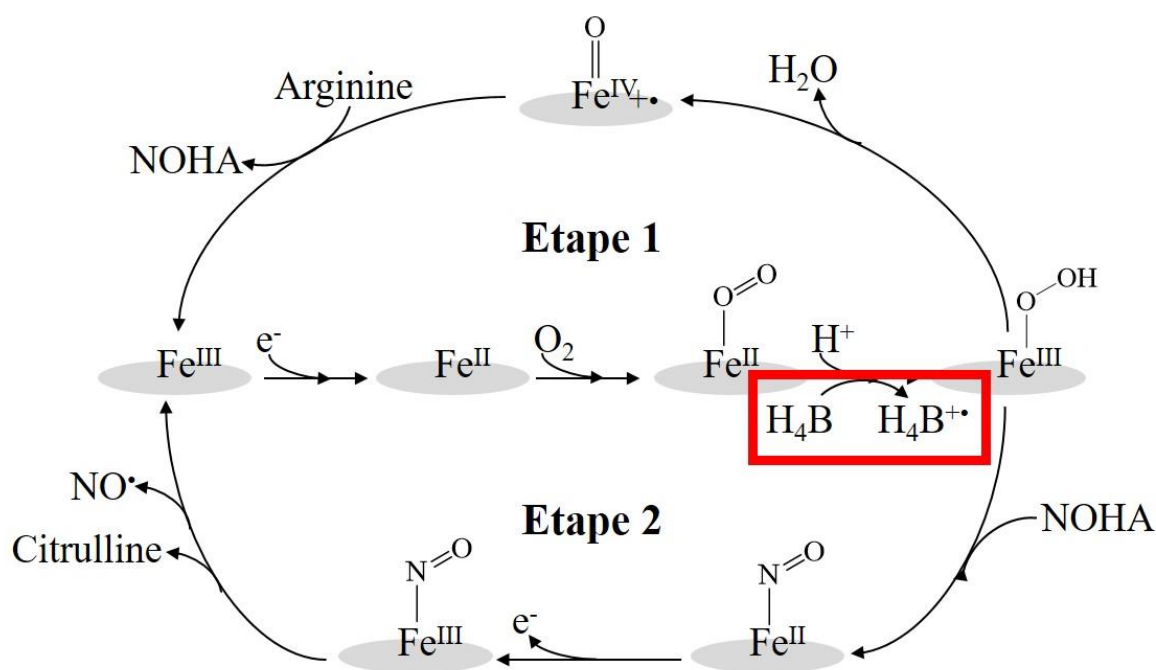


Figure 37- Rôle du cofacteur biptérine dans le mécanisme catalytique des NO-synthases.

Ces différences de comportement étaient plutôt inattendues, compte-tenu de la conservation, entre mNOS et bacNOS, de la quasi-totalité des résidus constituant le site actif de l'enzyme. L'alignement des séquences des différentes NOS bactériennes et mammifères permet tout de même d'identifier, parmi ceux-là, deux acides aminés variables. Le premier est impliqué dans la fixation du cofacteur. Il s'agit, chez la NOS inductible de *Mus musculus* (iNOS), de l'isoleucine I456[71] ; dans le cas de bsNOS le résidu correspondant est une thréonine (T334)[21]. Cependant, cet acide aminé forme une liaison hydrogène avec le cofacteur *via* la liaison peptidique ; il est donc peu probable que la chaîne latérale ait une influence marquée sur le mécanisme catalytique. De plus, ce résidu n'est pas conservé non plus au sein des mNOS et des bacNOS : on trouve ainsi, par exemple, une sérine pour la NOS de *Deinococcus radiodurans* (deiNOS)[22] et une alanine pour la NOS endothéliale bovine[63]. S'il peut être à l'origine de petites différences entre les trois isoformes de mNOS ou entre des bacNOS issues de divers organismes, il n'est probablement pas responsable des différences de comportement observées entre les mNOS et leurs homologues bactériennes. Le second résidu variable est situé dans l'environnement distal de l'hème, à proximité du site de fixation du substrat : on trouve une valine (V346) chez iNOS, et une isoleucine (I224) chez bsNOS. Cette substitution est extrêmement conservée ; toutes les NOS de mammifères possèdent une valine à cette position et, à l'exception de quelques cyanobactéries, toutes les NOS bactériennes connues possèdent une isoleucine[27]. Bien que ces deux acides aminés soient assez semblables (Figure 38), cette substitution ayant lieu au sein d'un site actif par ailleurs extrêmement conservé, elle pourrait être à l'origine de la très faible production de NO[•] des bacNOS. Cette

substitution conservée permettrait également de concevoir des inhibiteurs sélectifs des bacNOS par rapport aux mNOS[173,174], et donc susceptibles d'être utilisés en médecine humaine pour lutter contre certaines infections, notamment celles causées par *Bacillus anthracis* et *Staphylococcus aureus*, qui possèdent une NOS dont l'inhibition permet de restaurer la sensibilité de ces pathogènes à certains antibiotiques[163, 171,175].

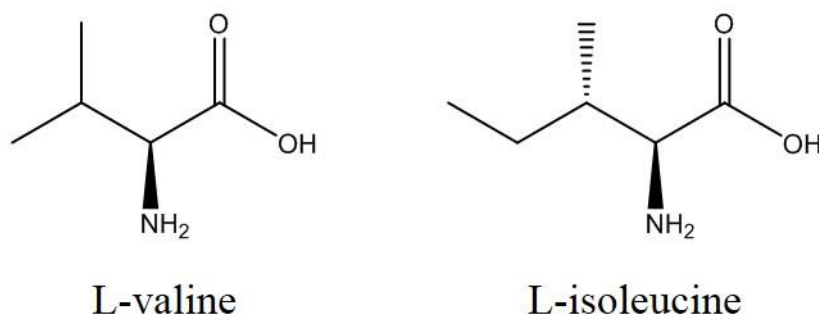


Figure 38 - Formules chimiques des acides aminés protéinogènes L-valine (gauche) et L-isoleucine (droite).

Une mutation ponctuelle a donc été introduite sur les gènes codant pour bsNOS et pour le domaine oxygénase de iNOS, et les mutants croisés bsNOS I224V et iNOSoxy V346I ont été produits, purifiés et étudiés[27, 181,182]. Il a ainsi été montré que cette substitution était effectivement impliquée dans les différences de production de NO[•] observées entre iNOS et bsNOS : toutes les transitions observables par *stopped-flow* dans la deuxième étape du cycle catalytique (Figure 37) sont plus rapides pour le mutant bsNOS I224V que pour bsNOS WT, et plus lentes pour iNOS V346I que pour iNOS WT[27]. Cependant, les mutations Val→Ile et Ile→Val ne permettent pas de compenser totalement l'écart observé entre iNOS WT et bsNOS WT, ce qui indique que d'autres facteurs sont également impliqués. La gêne stérique provoquée par le groupement méthyle supplémentaire porté par l'isoleucine, comparée à la valine, a été évoquée pour expliquer l'impact de la mutation sur la libération du NO[•]. Des mesures de vitesse de recombinaison géminée après photolyse du complexe Fe^{III}NO, menées sur iNOS WT et sur le mutant iNOS V346I confirment cette hypothèse[182].

Dans le cadre de cette étude, on s'intéresse aux types sauvages de iNOS et bsNOS, ainsi qu'aux deux mutants iNOS V346I et bsNOS I224V décrits précédemment. On cherche tout d'abord à identifier et comprendre les effets de la substitution Val/Ile sur la structure de ces enzymes, et plus particulièrement de leurs sites actifs, ainsi que sur les propriétés électroniques de l'hème qui sont cruciales pour comprendre le mécanisme catalytique des NO-synthases. On utilise donc les spectroscopies d'absorption UV-visible et de résonance paramagnétique électronique (RPE) afin de caractériser différents complexes hémiques et de déterminer l'influence du résidu valine ou isoleucine sur leur environnement. La mesure, par

spectroélectrochimie, du potentiel de l'hème vient compléter cette étude spectroscopique. On cherche ensuite à déterminer l'impact de cette substitution Val/Ile sur le cycle catalytique des NOS afin de confirmer et de préciser son rôle dans les différences de comportement observées entre bsNOS et iNOS. On utilise donc des techniques de cinétiques rapides, le *stopped-flow* et le *freeze-quench*, pour tenter d'identifier, piéger et caractériser différents intermédiaires réactionnels. On s'intéresse en particulier au radical ptérine dont la formation lors de la deuxième étape du cycle catalytique des bacNOS fait débat (Figure 37).

2. Effets structuraux et électroniques

2.1. Equilibre haut-spin/ bas-spin du Fe^{III}

A l'état Fe^{III}, le fer hémique peut se trouver dans deux états de spin distincts : un état de spin $S = 1/2$, dit bas-spin (BS) et un état de spin $S = 5/2$, dit haut-spin (HS). L'état HS est caractéristique d'un complexe pentacoordonné (5C), dans lequel le fer est coordonné par les quatre atomes d'azote de l'hème, ainsi que par le soufre de la cystéine proximale (C194 pour iNOS et C72 pour bsNOS)[20, 21]. L'état BS est, quant à lui, caractéristique d'un complexe hexacoordonné (6C) dans lequel le fer possède un ligand distal, probablement une molécule d'eau[202]. L'équilibre HS/BS est primordial puisque, dans le cas des mNOS, seul le Fe^{III} HS peut être réduit en Fe^{II} par le domaine réductase, et est donc compétent pour la catalyse[203].

2.1.1. En absence de substrat et de cofacteur

2.1.1.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible

On s'est tout d'abord intéressé aux enzymes purifiées en absence de substrat et de cofacteur. Les spectres d'absorption UV-visible obtenus pour les types sauvages de iNOSoxy (noté simplement iNOS dans la suite de ce chapitre) et bsNOS, ainsi que pour les mutants I224V et V346I sont représentés Figure 39. On note tout d'abord que le pic à 427nm, caractéristique du complexe Fe^{III}-imidazole des NOS, n'est présent sur aucun des spectres, ce qui indique que les protéines ont été correctement dialysées et donc qu'il n'y a ni substrat, ni imidazole au sein du site actif[22, 27]. On remarque également que les spectres de iNOS WT (en rouge) et de bsNOS WT (en bleu marine) sont très différents : iNOS présente un maximum d'absorption à 421nm, caractéristique d'un Fe^{III} très majoritairement BS, alors que bsNOS présente un maximum d'absorption à 397nm, généralement observé pour un Fe^{III} HS[80,202]. Les spectres des deux mutants sont, au contraire, très semblables : ils présentent un maximum d'absorption à 397nm et un épaulement vers 420nm qui suggèrent un mélange de Fe^{III} HS et de Fe^{III} BS. Les mutations Val→Ile et Ile→Val semblent donc avoir des effets opposés puisqu'elles favorisent respectivement la formation de Fe^{III} HS et BS. On ne peut cependant pas conclure quant aux proportions HS/BS de chaque enzyme.

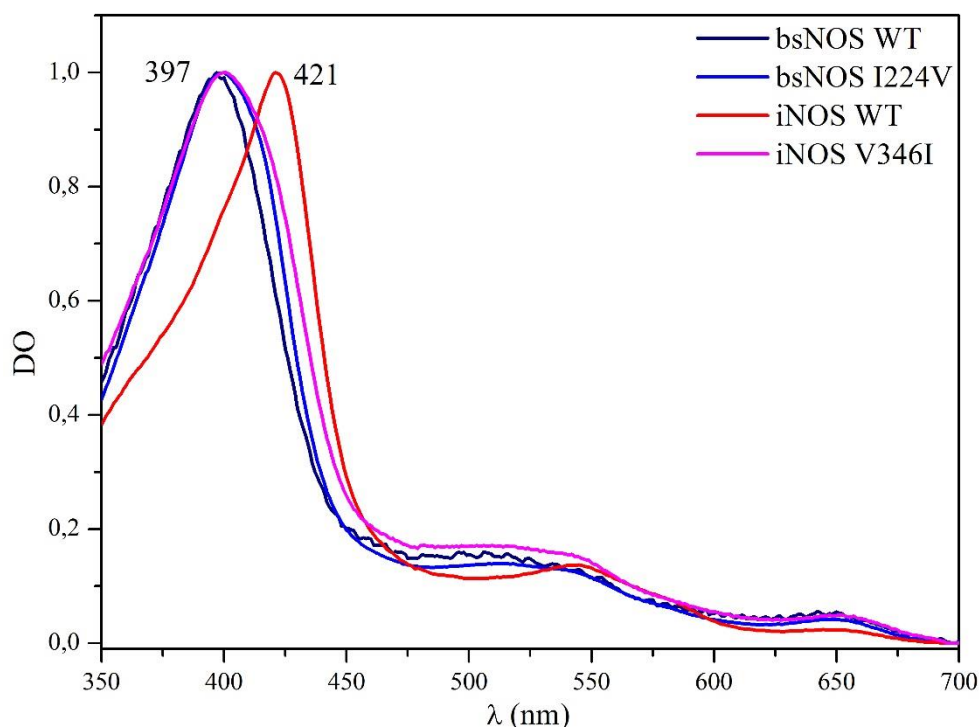


Figure 39- Spectres d'absorption UV-visible de l'état natif Fe^{III} , en absence de substrat et de cofacteur.
 Conditions expérimentales : Tris 25mM pH 7,4, NaCl 500mM, glycérol 10% ; chemin optique 1cm.
 Tous les spectres ont été normalisés.

2.1.1.2. Spectroscopie RPE

Ces complexes ont ensuite été caractérisés par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). Cette technique permet de détecter les espèces paramagnétiques, comme le Fe^{III} , de déterminer leur état de spin et de sonder leur environnement. Les spectres RPE bande X obtenus à 10K pour les complexes Fe^{III} des types sauvages et des mutants de iNOS et bsNOS, en absence de substrat et cofacteur, sont représentés Figure 40. Le cadre de gauche représente les spectres enregistrés entre 0 et 5000G, et le cadre de droite présente un zoom sur les spectres du Fe^{III} BS, dans la zone $g=2$. Les spectres du Fe^{III} HS et du Fe^{III} BS sont très différents : le premier est dominé par l'éclatement à champ nul (*Zero Field Splitting*, ZFS) et présente donc des signaux caractéristiques à bas champ, alors que le second est dominé par l'effet Zeeman.

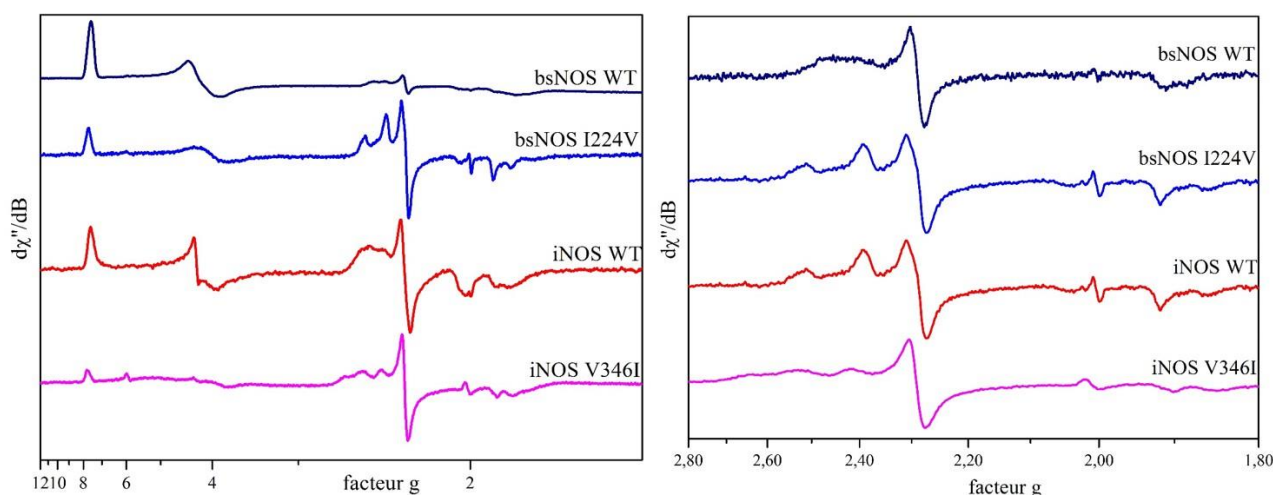


Figure 40 – Spectres RPE bande X de l'état natif Fe^{III} , en absence de substrat et de cofacteur.

On a représenté les spectres larges (gauche) et les spectres centrés sur le Fe^{III} BS (droite).

Les spectres ont tous été normalisés.

Conditions expérimentales typiques pour les spectres larges : fréquence 9,4GHz, température 10K, puissance micro-ondes 63μW (sauf iNOS WT 1mW), modulation d'amplitude 2mT.

Conditions expérimentales typiques pour les spectres centrés : fréquence 9,4GHz, température 10K, puissance micro-ondes 1μW, modulation d'amplitude 1mT.

Les spectres des formes sauvages de iNOS et bsNOS présentent tous deux un mélange de Fe^{III} HS et BS. Cependant, comme on avait déjà pu le remarquer sur les spectres UV-visible, le Fe^{III} de bsNOS WT est très majoritairement HS, contrairement à celui de iNOS WT. Dans le cas des deux mutants, iNOS V346I et bsNOS I224V, on retrouve également un mélange de Fe^{III} HS et BS. Toutefois, comme les Fe^{III} HS et BS ont des propriétés de saturation très différentes, on ne peut pas conclure quant à la proportion de chacune des espèces, en particulier dans le cas de iNOS WT où le Fe^{III} BS est très fortement saturé.

Il n'y a que pour bsNOS WT (Figure 40, spectre bleu) que l'on peut mesurer précisément les trois valeurs de g effectives du Fe^{III} HS sur le spectre et que l'on peut simuler ce dernier, afin d'obtenir la valeur du paramètre E/D, caractéristique du ZFS (Table 6, gauche). Pour les trois autres enzymes, on peut tout de même mesurer la valeur de g_1^{eff} et on note que, pour iNOS comme pour bsNOS, elle est plus élevée pour les mutants que pour les WT, ce qui indique que le spectre serait plus anisotrope (Table 6, gauche). La présence d'un signal important vers $g=4,3$, caractéristique d'un Fe^{III} HS non hémique, nous empêche de mesurer la valeur de g_2^{eff} sur les spectres de iNOS WT (Figure 40, spectre rouge) et V346I (Figure 40, spectre magenta).

Protéine	g_1^{eff} ($g_{1\text{sim}}$)	g_2^{eff} ($g_{2\text{sim}}$)	g_3^{eff} ($g_{3\text{sim}}$)	E/D
bsNOS WT	7,56 (1,995)	4,15 (1,992)	1,84 (1,967)	0,074
bsNOS I224V	7,69	4,03	ND	ND
iNOS WT	7,62	ND	ND	ND
iNOS V346I	7,76	ND	ND	ND

Protéine	g_1	g_2	g_3
bsNOS WT	2,39	2,29	1,92
bsNOS I224V	2,52 2,44 2,39	2,29	1,86 1,92
iNOS WT	2,51 2,42	2,29	1,86 1,91
iNOS V346I	2,65 2,53 2,41	2,29	1,84 1,90

Table 6- Paramètres RPE des Fe^{III} HS (gauche) et BS (droite) en absence de substrat et de cofacteur.
 Les valeurs de g (BS) et de g effectif (HS) sont mesurées sur les spectres.
 La valeur de E/D est obtenue par simulation du spectre expérimental.
 Les valeurs de g utilisées pour la simulation du Fe^{III} HS sont indiquées entre parenthèses.

Concernant les Fe^{III} BS, les spectres de iNOS WT et V346I, ainsi que de bsNOS I224V, présentent un mélange de deux, voire trois, espèces rhombiques, autour de $g = 2,29$, et avec des valeurs de g similaires pour les trois enzymes (Table 6, droite). On remarque toutefois que le spectre de iNOS est assez mal résolu, ce qui suggère que la protéine est moins rigide et sans doute mal repliée. Il a en effet été montré que le cofacteur biophtérine était nécessaire au repliement correct des NOS de mammifères[66, 68]. L'espèce la moins anisotrope ($g_1 = 2,39$; $g_2 = 2,29$; $g_3 = 1,92$) est également visible sur le spectre de bsNOS WT, bien qu'elle ne représente qu'une faible proportion du signal. La spectroscopie RPE permet donc une caractérisation plus fine des complexes ferriques des NOS que la spectroscopie UV-visible. Cette dernière ayant néanmoins permis de confirmer l'absence d'imidazole au sein du site actif, on peut en conclure que les différentes espèces observées correspondent à différentes conformations du Fe^{III} , en équilibre les unes avec les autres.

2.1.2. Influence du H_4B seul

Dans le cas de la NOS inductible, l'ajout du cofacteur biophtérine permet la stabilisation du dimère et la conversion du Fe^{III} BS en Fe^{III} HS, compétent pour la catalyse[66, 79, 80]. On a donc cherché à savoir si c'était aussi le cas pour iNOS V346I et bsNOS I224V, bsNOS WT étant déjà très majoritairement sous la forme HS en absence de ptérine. Les spectres RPE bande X des complexes Fe^{III} en présence de H_4B et en absence de substrat sont représentés Figure 41.

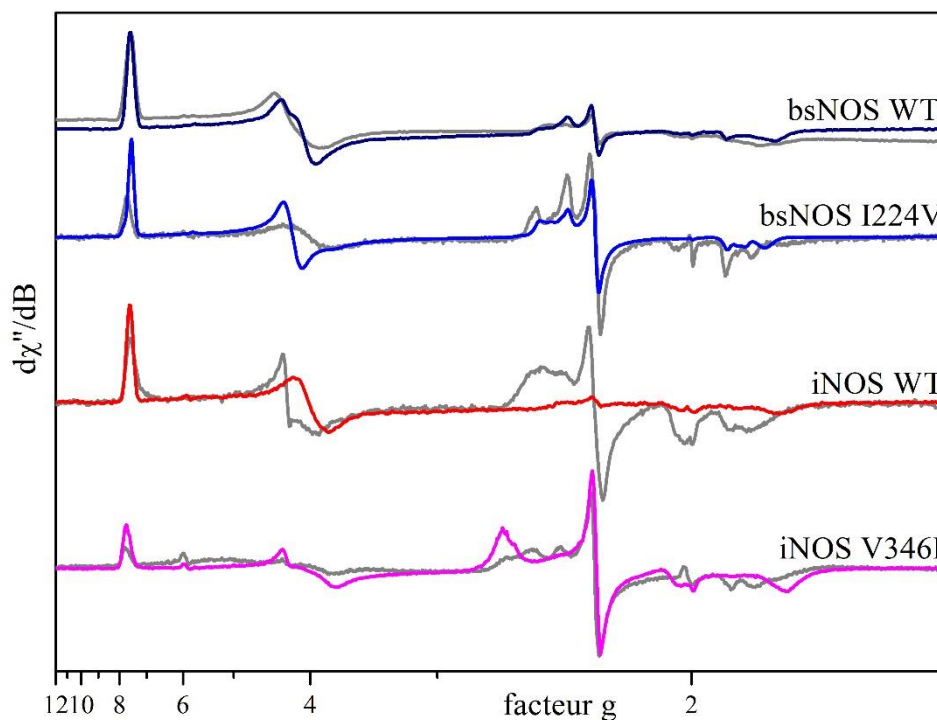


Figure 41- Spectres RPE bande X des complexes Fe^{III} en présence de H_4B .
Conditions expérimentales typiques: fréquence 9,4GHz, température 10K, puissance micro-ondes 63μW, modulation d'amplitude 2mT. Les spectres ont tous été normalisés.
Les spectres en absence de substrat et de cofacteurs sont représentés en gris.

Si on a bien une conversion totale du Fe^{III} BS de iNOS WT en Fe^{III} HS, ce n'est, en revanche, pas le cas pour le mutant V346I qui présente toujours un mélange de Fe^{III} HS et BS. On remarque tout de même que la proportion relative de Fe^{III} HS est légèrement plus importante qu'en absence de H_4B , et qu'il n'y a plus qu'une seule espèce de Fe^{III} BS. Le cofacteur bioptérine permet donc, chez le mutant, de rigidifier le site actif et de stabiliser une unique conformation du Fe^{III} BS, mais pas de déplacer la molécule d'eau à l'origine de ce dernier.

L'ajout de H_4B n'a que peu d'influence sur le spectre de bsNOS WT qui est toujours dominé par un Fe^{III} HS, avec une petite proportion de Fe^{III} BS, identique à celui observé en absence de H_4B . Concernant le Fe^{III} HS, les valeurs de g effectives, mesurées sur le spectre, ainsi que le paramètre E/D, obtenu par simulation du spectre expérimental, indiquent qu'il est plus anisotrope qu'en absence de cofacteur (Table 7). La fixation de ce dernier induit donc une modification de l'environnement du fer. Pour le mutant I224V, comme pour iNOS V346I, on n'a qu'une conversion partielle du Fe^{III} BS en Fe^{III} HS qui présente des raies plus fines que celui observé en absence de ptérine. Comme pour le WT, le Fe^{III} BS est identique à celui observé en absence de ptérine (Table 7).

Protéine	g_1^{eff} ($g_{1\text{sim}}$)	g_2^{eff} ($g_{2\text{sim}}$)	g_3^{eff} ($g_{3\text{sim}}$)	E/D	Protéine	g_1	g_2	g_3
bsNOS WT	7,64 (2,002)	3,97 (1,995)	1,78 (1,961)	0,082	bsNOS WT	2,39	2,29	1,92
bsNOS I224V	7,56 (1,996)	4,20 (1,990)	1,83 (1,967)	0,073	bsNOS I224V	2,39 2,50	2,29	1,92 1,87
iNOS WT	7,63 (1,988)	4,01 (1,981)	1,80 (1,945)	0,080	iNOS WT	2,42	2,29	1,90
iNOS V346I	7,73	ND	ND	ND	iNOS V346I	2,66	2,29	1,78

Table 7- Paramètres RPE des Fe^{III} HS (gauche) et BS (droite) en présence du cofacteur H_4B .

Les valeurs de g (BS) et de g effectif (HS) sont mesurées sur les spectres.

Les valeurs de E/D sont obtenues par simulation des spectres expérimentaux.

Les valeurs de g utilisées pour la simulation des Fe^{III} HS sont indiquées entre parenthèses.

Alors que les spectres de Fe^{III} HS des types sauvages de bsNOS et iNOS sont assez semblables, celui du mutant bsNOS I224V est nettement moins anisotrope. Ceci suggère une conformation nouvelle du Fe^{III} , qui ne serait ni celle de iNOS, ni celle de bsNOS. De même, l'incapacité du H_4B à convertir le Fe^{III} BS en Fe^{III} HS chez les mutants, suggère que l'environnement distal de l'hème est différent de celui de chacun des deux WT, et que ce dernier n'est pas contrôlé uniquement par la nature des acides aminés directement à proximité de l'hème, mais également par le repliement global de la protéine.

2.1.3. Influence du substrat

On a aussi cherché à caractériser les complexes Fe^{III} en présence de substrat, arginine ou NOHA, et de cofacteur H_4B , qui constituent le point de départ de chacune des deux étapes du cycle catalytique.

2.1.3.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres obtenus en présence d'arginine ou de NOHA, et de H_4B sont identiques pour les quatre enzymes considérées (Figure 42). Ils présentent une bande de Soret à 396nm et une bande de transfert de charge à 650nm, caractéristiques du Fe^{III} HS des NOS. L'ajout du substrat et du cofacteur permet donc la conversion du Fe^{III} BS des mutants bsNOS I224V et iNOS V346I en Fe^{III} HS, compétent pour la catalyse[27].

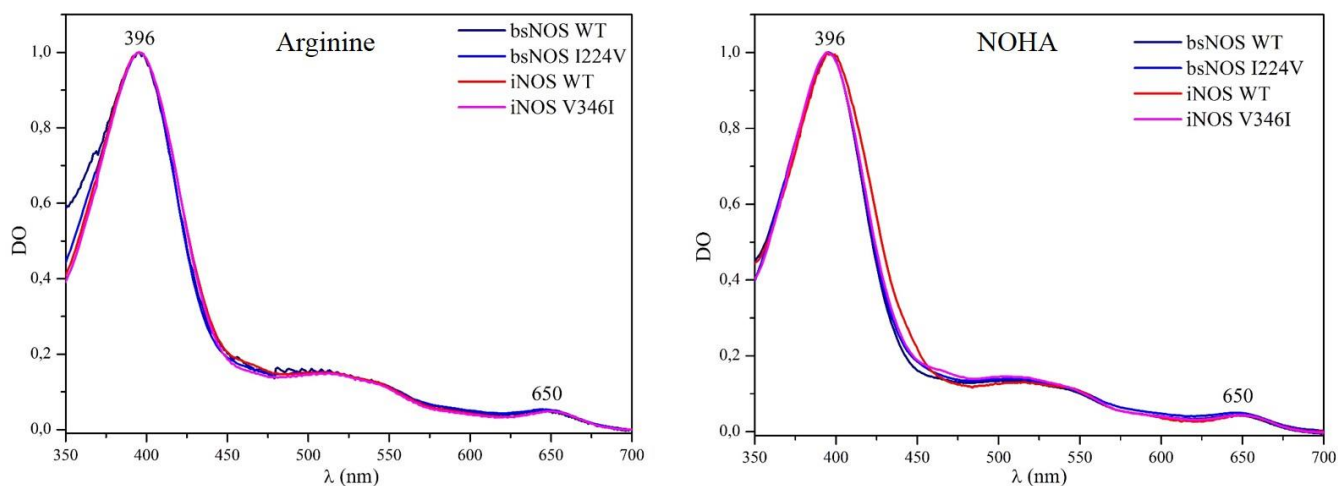


Figure 42- Spectres UV-visible du complexe Fe^{III} , en présence de H_4B et d'arginine (gauche) ou de NOHA (droite).
Conditions expérimentales : Tris 100mM pH 7,4, DTT 3mM, Arg 5mM ou NOHA 500 μM , H_4B 500 μM , glycérol 10% ; chemin optique 1cm.
Tous les spectres ont été normalisés.

2.1.3.2. Spectroscopie RPE

On a également caractérisé ces complexes par RPE, afin de pouvoir mettre en évidence des variations subtiles de l'environnement électronique qui n'apparaîtraient pas sur les spectres UV-visible.

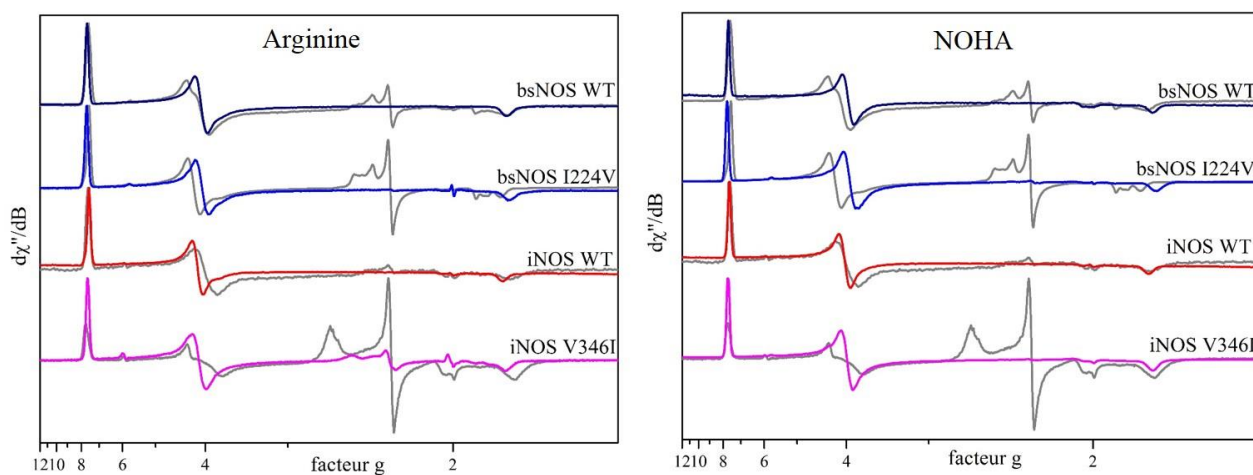


Figure 43 - Spectres RPE bande X des complexes Fe^{III} en présence de H_4B et d'arginine (gauche) ou de NOHA (droite).
Conditions expérimentales typiques: fréquence 9,4GHz, température 10K, puissance micro-ondes 1mW, modulation d'amplitude 2mT. Les spectres ont tous été normalisés.
Les spectres en absence de substrat et de cofacteurs sont représentés en gris.
Des spectres à basse puissance autour de $g = 2,29$ ont été enregistrés afin de vérifier l'absence de Fe^{III} BS.

On constate, pour les types sauvages comme pour les mutants, une conversion complète du Fe^{III} BS en Fe^{III} HS en présence de H_4B et d'arginine ou de NOHA ; il n'y a que pour iNOS V346I en présence d'arginine et de H_4B que l'on détecte une faible proportion de Fe^{III} BS (Figure 43). Le Fe^{III} HS étant l'espèce compétente pour la catalyse, cela indique que la mutation ne compromet pas, *a priori*, l'activité de l'enzyme.

Arginine + H_4B	g_1^{eff} ($g_{1\text{sim}}$)	g_2^{eff} ($g_{2\text{sim}}$)	g_3^{eff} ($g_{3\text{sim}}$)	E/D	NOHA + H_4B	g_1^{eff} ($g_{1\text{sim}}$)	g_2^{eff} ($g_{2\text{sim}}$)	g_3^{eff} ($g_{3\text{sim}}$)	E/D
bsNOS WT	7,64 (1,999)	4,07 (1,987)	1,80 (1,972)	0,080	bsNOS WT	7,67 (1,990)	3,97 (1,980)	1,78 (1,971)	0,083
bsNOS I224V	7,67 (1,992)	4,05 (1,988)	1,79 (1,972)	0,081	bsNOS I224V	7,75 (1,994)	3,95 (1,983)	1,77 (1,964)	0,084
iNOS WT	7,54 (1,993)	4,12 (1,987)	1,82 (1,957)	0,075	iNOS WT	7,62 (1,990)	4,03 (1,978)	1,80 (1,967)	0,080
iNOS V346I	7,60 (1,995)	4,10 (1,990)	1,81 (1,980)	0,079	iNOS V346I	7,70 (1,990)	3,99 (1,990)	1,78 (1,967)	0,082

Table 8- Paramètres RPE des Fe^{III} HS en présence de H_4B et d'arginine (gauche) ou de NOHA (droite).
Les valeurs de g effectives sont mesurées sur les spectres.
Les valeurs de E/D sont obtenues par simulation des spectres expérimentaux.
Les valeurs de g utilisées pour la simulation des Fe^{III} HS sont indiquées entre parenthèses.

Les spectres de Fe^{III} HS en présence d'arginine ou de NOHA ne sont pas superposables à ceux enregistrés en l'absence de substrat, ce qui indique que la présence d'un substrat au sein du site actif modifie l'environnement électronique du fer. La nature du substrat a aussi une influence puisque, pour les WT comme pour les mutants, les spectres des échantillons saturés en NOHA et H_4B sont plus anisotropes que ceux des échantillons saturés en arginine et H_4B (Table 8). La spectroscopie RPE permet également de mettre en évidence des différences entre les NOS bactériennes et mammifères : en présence de H_4B seul, ou accompagné d'arginine ou de NOHA, bsNOS WT présente un spectre plus anisotrope que iNOS WT. Enfin, on observe un effet de la mutation Val/Ile sur l'anisotropie des spectres, les mutants présentant des spectres plus anisotropes que leurs WT respectifs.

2.1.4. Conclusion

La formation du Fe^{III} BS est liée à la présence d'une molécule d'eau au sein du site actif, qui joue le rôle de ligand distal dans le complexe hexacoordonné du fer[202]. On peut donc supposer que le groupement méthyle supplémentaire porté par l'isoleucine, par rapport à la valine, bloque l'accès de cette molécule d'eau au fer et favorise donc la formation d'un complexe pentacoordonné HS[27]. Cela permet d'expliquer la forte proportion de Fe^{III} HS observée pour bsNOS WT, en absence de substrat et de cofacteur, comparé à iNOS WT. La suppression de cette gêne stérique dans le mutant bsNOS I224V permettrait donc à une

molécule d'accéder au site actif qui favoriserait la formation d'un complexe ferrique 6C BS, et ne pourrait être déplacée que par la fixation du substrat. Dans le cas du mutant iNOS V346I, il semblerait que l'ajout de ce groupe méthyle ne suffise pas à limiter l'accès au site actif et l'ajout de H₄B seul ne permet pas, contrairement à iNOS WT, de déplacer cette molécule d'eau pour former un complexe HS[79]. La gêne stérique provoquée par l'ajout de ce groupement méthyle supplémentaire chez iNOS V346I aurait donc un effet déstabilisant global sur la protéine ; bsNOS WT possédant une isoleucine, les effets de son remplacement par une valine moins volumineuse, sont moins marqués, et s'exercent probablement plus localement.

2.2. Complexe Fe^{II}CO

Le fer ferreux hémique possède une forte affinité pour le monoxyde de carbone CO et le complexe Fe^{II}CO ainsi formé est stable en présence de dioxygène. Son spectre d'absorption UV-visible présente une bande de Soret intense vers 450nm, qui a donné leur nom aux cytochromes P450[61, 204,205]. Dans le cas des NOS, ce maximum d'absorption est légèrement décalé vers le bleu, à 444-445nm. C'est une espèce diamagnétique qui ne possède donc pas de signature RPE.

Les différentes NOS et NOS-LP caractérisées possédant toutes un spectre d'absorption UV-visible de Fe^{II}CO pratiquement identique, on ne s'attend pas à observer de différences entre les WT et les mutants[22, 24, 27,206]. Cette mesure nous permet toutefois de vérifier l'intégrité de la protéine, de calculer sa concentration et d'estimer qualitativement sa stabilité.

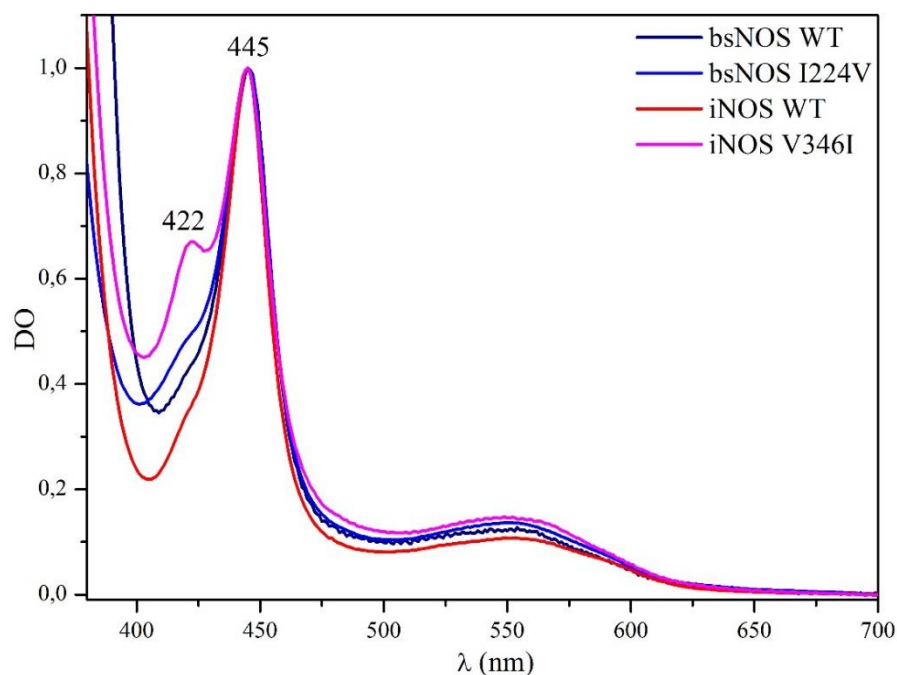


Figure 44 - Spectres d'absorption UV-visible des complexes Fe^{II}CO en présence d'arginine et de H₄B.
Conditions expérimentales : Tris 100mM pH 7,4, DTT 3mM, Arg 5mM ou NOHA 500μM, H₄B 500μM, glycérol 10% ; chemin optique 1cm. Tous les spectres ont été normalisés.

Les spectres d'absorption UV-visible présentés Figure 44 ont été enregistrés après purification et dialyse des protéines, en présence d'arginine et de H₄B, et normalisés. Les quatre spectres présentent un maximum d'absorption à 445nm, et une bande α - β à 550nm, ainsi qu'un épaulement plus ou moins marqué vers 420nm. Ce dernier est caractéristique d'un complexe Fe^{II}CO dégradé, et probablement dû à la perte de la liaison thiolate[205]. Il est particulièrement présent sur le spectre du mutant iNOS V346I ce qui suggère une protéine moins robuste, en accord avec les données expérimentales sur les différents complexes de Fe^{III} décrits aux paragraphes précédents.

2.3. Potentiel de l'hème

Les caractéristiques redox de l'hème, et en particulier le potentiel du couple hème-Fe^{III} / hème-Fe^{II}, influencent fortement l'activité catalytique des NO-synthases. Ce potentiel est notamment fonction de la force de la liaison thiolate entre la cystéine proximale(C194 pour iNOS et C72 pour bsNOS) et le fer hémique[147,207]. Cette cystéine forme une liaison hydrogène avec un résidu tryptophane (W188 chez iNOS et W66 chez bsNOS) et la modification de la force de cette liaison, *via* la mutation du tryptophane, impacte fortement le potentiel redox de l'hème[144, 146,208-210]. Cependant, bien que iNOS WT et bsNOS WT possèdent toutes deux un résidu Trp en interaction avec la cystéine responsable de la liaison du fer, leurs potentiels redox respectifs diffèrent de près de 100mV[147,189].

Protéine	Potentiel vs ESH (mV)
bsNOS WT ^a	-361
bsNOS I224V	-348 ± 19
iNOS WT ^b	-263 ± 10
iNOS V346I	-235 ± 15

Table 9- Potentiel redox mesurés par spectroélectrochimie en présence d'arginine et de H₄B ou H₄F.
Conditions expérimentales pour les mutants : tampon d'électrolyse KPi 0,1M pH 7,4, KCl 0,1M ; température 20°C ; électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3M ; électrode de travail Au ; contre-électrode Pt.
a Valeur issue de la référence [188] mesurée en présence d'arginine et H₄B.
Conditions expérimentales : tampon d'électrolyse KPi 0,1M pH 7,0, NaCl 0,125M ; température 25°C.
b Valeur issue de la référence [147], mesurée en présence d'arginine et H₄F.
Conditions expérimentales : tampon d'électrolyse KPi 0,1M pH 7,0, NaCl 0,125M ; température 15°C ; réduction effectuée par ajouts successifs de dithionite de sodium ; potentiel mesuré avec une microélectrode Ag/AgCl/KCl saturé.

Etant donné que la mutation Val/Ile semble avoir un effet sur les propriétés électroniques de l'hème, on a cherché à savoir si elle était impliquée dans la différence de potentiel redox observée entre iNOS et bsNOS. On a donc mesuré le potentiel redox des mutants

iNOS V346I et bsNOS I224V. Les résultats obtenus sont reportés Table 9. Les valeurs de potentiels redox mesurées pour les mutants sont légèrement moins négatives que celles de leurs WT respectifs. Cependant, l'écart entre les potentiels des mutants et ceux des types sauvages est de l'ordre de l'erreur expérimentale et on ne peut donc pas conclure à un impact de la mutation Val/Ile sur le potentiel redox de l'hème. On ne devrait donc pas avoir d'effet drastique de cette mutation sur les étapes de transfert d'électron du cycle catalytique de l'enzyme.

2.4. Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$

Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ est une sonde paramagnétique souvent utilisée pour étudier l'environnement distal des hémoprotéines par spectroscopie RPE[211-220]. Concernant les NO-synthases, cette sonde est d'autant plus adaptée que le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pourrait être un intermédiaire catalytique dans l'étape d'oxydation du NOHA (Cf. Figure 37 et Chapitre I §1.3.2) et ces complexes ont donc été assez largement caractérisés, aussi bien pour des NOS de mammifères que pour des NOS-LP bactériennes[213,216]. Ils présentent généralement un spectre RPE rhombique sur lequel les trois valeurs de g sont assez nettement séparées, et le couplage hyperfin avec le noyau ^{14}N du $\text{NO}^{\bullet}$ est au moins partiellement résolu (Figure 45, spectre rouge). On peut également observer, dans certains cas, une proportion non négligeable de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné qui a perdu sa liaison thiolate (Figure 45, spectre noir). On dispose en outre de structures cristallographiques des complexes FeNO de bsNOS (code PDB 2FC1)[221], de la NOS endothéliale bovine (code PDB 1FOP)[222] et de la NOS neuronale de rat (code PDB 2G6K)[223], en présence d'arginine et de H_4B .

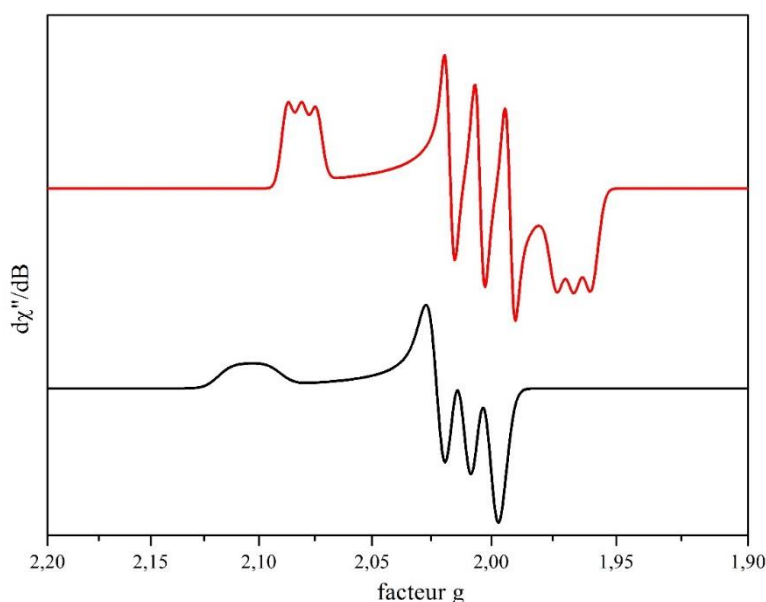


Figure 45 - Simulations représentant les spectres caractéristiques des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de NOS hexacoordonné (rouge) et pentacoordonné (noir).

Etant donnée la position de la mutation Val/Ile, au-dessus de l'hème et donc, *a priori*, à proximité du NO^{*}, l'utilisation du complexe Fe^{II}NO est particulièrement bien adaptée à la caractérisation des mutants iNOS V346I et bsNOS I224V. On a donc étudié ces complexes et, en particulier, l'influence de la mutation en présence du cofacteur H₄B, et en présence ou en absence d'arginine, de NOHA ou de citrulline, le produit final de la réaction catalysée par les NOS.

2.4.1. En présence de H₄B seul

Les complexes Fe^{II}NO ont tout d'abord été préparés en présence du cofacteur H₄B uniquement. Ce dernier permet notamment de stabiliser la protéine, en particulier dans le cas de iNOS WT et V346I, et d'éviter ainsi qu'elle ne précipite lors des différents traitements nécessaires à la formation du complexe Fe^{II}NO. Les spectres RPE bande X obtenus pour les mutants et les types sauvages sont représentés Figure 46, ainsi que leurs simulations.

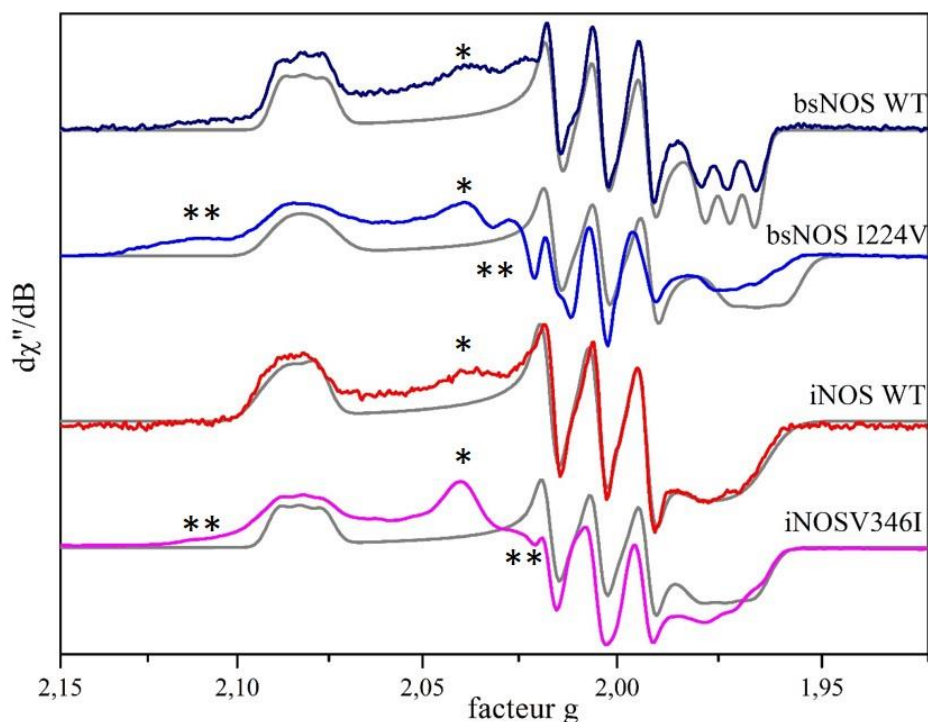


Figure 46- Spectres RPE bande X des complexes Fe^{II}NO en présence de H₄B.
Conditions expérimentales typiques: fréquence 9,4GHz, température 40K, puissance micro-ondes 63μW, modulation d'amplitude 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.
 * espèce axiale minoritaire
 ** Fe^{II}NO pentacoordonné.

Concernant les WT, on a, dans les deux cas, un spectre rhombique caractéristique des Fe^{II}NO de NOS, sur lequel les trois valeurs de g sont nettement séparées. On observe également un éclatement en trois raies de la raie centrale, dû au couplage hyperfin avec le noyau d'azote du NO^{*}, de spin nucléaire I = 1 ; ce dernier est d'intensité semblable pour iNOS WT et bsNOS

WT (Table 10). Cependant, dans le cas de bsNOS, ce couplage hyperfin est résolu pour les trois valeurs de g , ce qui n'est pas le cas pour iNOS où il participe donc à l'élargissement des raies (Table 10). Enfin, on remarque un signal supplémentaire vers $g=2,04$ (*) que l'on retrouve sur la plupart des spectres de $Fe^{II}NO$ de NOS, mais aussi d'autres hémoprotéines, et qui est généralement attribué à une seconde espèce axiale minoritaire, dont la partie négative, large, serait masquée par le spectre de l'espèce rhombique majoritaire[212, 213,217-219].

Protéine	g_1 A_1 (MHz)	g_2 A_2 (MHz)	g_3 A_3 (MHz)	Espèce axiale $g_{\perp}$
bsNOS WT	2,082 28	2,004 55	1,972 29	2,038
bsNOS I224V	2,082 28	2,004 57	1,965 33	2,039
iNOS WT	2,084 30	2,005 58	1,974 36	2,037
iNOS V346I	2,082 26	2,004 55	1,972 34	2,039

Table 10- Paramètres RPE des complexes $Fe^{II}NO$ en présence de H_4B seul.

Les valeurs de g_1, g_2, g_3, A_1, A_2 et A_3 sont issues des simulations représentées Figure 46.

Les valeurs de $g_{\perp}$ sont mesurées directement sur les spectres.

Le spectre du mutant iNOS V346I est globalement assez semblable à celui de iNOS WT, avec des valeurs de g et de couplage hyperfin A , obtenues par simulation des spectres expérimentaux, très proches (Table 10). On note tout de même la présence d'un signal vers $g=2,1$ (**) caractéristique d'un $Fe^{II}NO$ pentacoordonné qui a donc perdu sa liaison thiolate avec la cystéine C194 et une proportion plus importante de l'espèce axiale minoritaire (*). Enfin, le spectre est légèrement déformé au niveau de la raie centrale ce qui indique la présence d'une espèce supplémentaire ou d'une impureté dans l'échantillon. Ces données montrent que, en présence de H_4B seul, le mutant iNOS V346I est déstabilisé comparé au WT. Cet effet de la mutation est encore plus marqué dans le cas de bsNOS. En effet, sur le spectre du mutant bsNOS I224V, on perd la résolution du couplage hyperfin sur les valeurs de g extrêmes et on détecte du $Fe^{II}NO$ pentacoordonné (**), comme pour le mutant de iNOS. On a dans ces cas-là un mélange de trois espèces dont les spectres sont partiellement superposés et donc difficiles à simuler. Les petites variations de valeurs de g obtenues pour l'espèce majoritaire ne sont donc pas nécessairement significatives.

On retrouve ici un comportement que l'on avait déjà observé pour les complexes Fe^{III} en présence de H_4B seul : les deux mutations Val→Ile et Ile→Val ont un effet déstabilisant sur la protéine.

2.4.2. En présence de substrat et de H₄B

On a montré précédemment (Cf. §2.1.3) que l'ajout du substrat, en plus du cofacteur, stabilisait les mutants iNOS V346I et bsNOS I224V et permettait la conversion complète du Fe^{III} BS en Fe^{II} HS, compétent pour la catalyse. Les complexes Fe^{II}NO des mutants étant déstabilisés en présence de H₄B seul, on a donc préparé des complexes Fe^{II}NO saturés en cofacteur H₄B et en substrat. Les spectres RPE bande X obtenus pour les types sauvages et pour les mutants, ainsi que leurs simulations, sont représentés Figure 47. On s'intéresse dans un premier temps aux spectres des complexes saturés en arginine et H₄B (gauche).

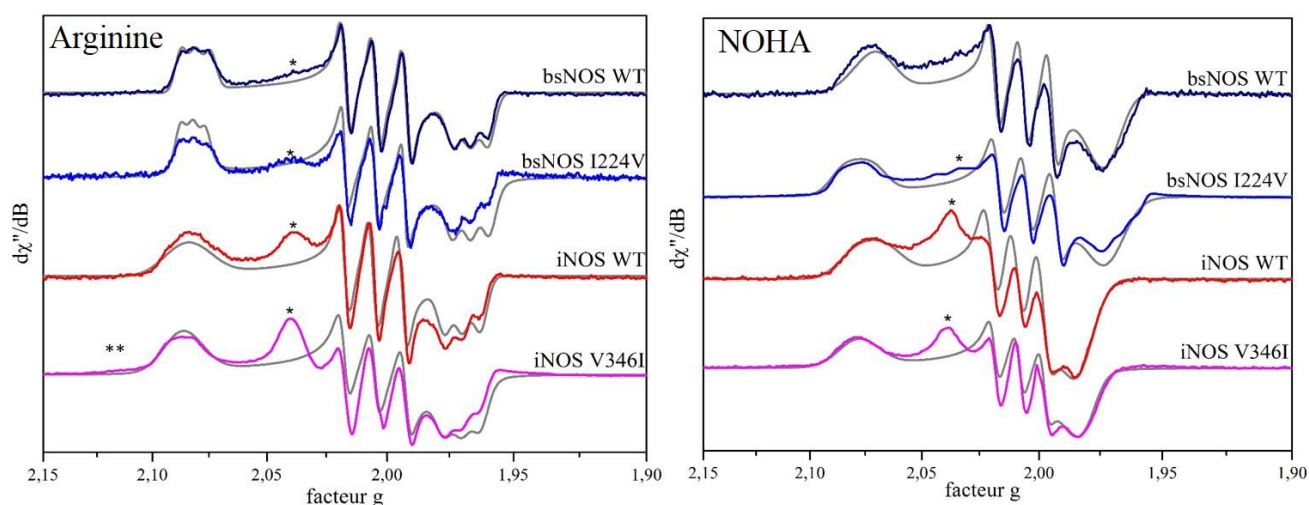


Figure 47- Spectres RPE bande X des complexes Fe^{II}NO en présence de H₄B et d'arginine (gauche) ou de NOHA (droite).

Conditions expérimentales typiques: fréquence 9,4GHz, température 40K, puissance micro-ondes 63μW, modulation d'amplitude 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris

* espèce axiale minoritaire.

** Fe^{II}NO pentacoordonné.

Dans le cas de bsNOS, les spectres du mutant I224V et du WT sont extrêmement semblables : on n'observe pas de Fe^{II}NO pentacoordonné, le couplage hyperfin est parfaitement résolu et les valeurs de g et de constantes de couplage obtenues par simulation sont pratiquement identiques (Table 11, gauche). L'espèce axiale est légèrement plus visible sur le spectre du mutant que sur celui du type sauvage mais elle reste, dans tous les cas, très largement minoritaire (Figure 47, gauche). La présence d'arginine permet donc de stabiliser la protéine et occulte complètement l'effet de la mutation.

Concernant iNOS, on remarque tout d'abord que le couplage hyperfin est résolu pour la valeur de g centrale, mais également pour le g₃, ce qui n'était pas le cas en absence d'arginine. Cette dernière permet donc de rigidifier et de structurer la protéine. Le spectre du mutant est assez semblable à celui du WT, avec des valeurs de g et des constantes de couplage similaires (Table 11, gauche). On note tout de même, chez le mutant, une proportion d'espèce axiale (*) plus importante et la présence de Fe^{II}NO pentacoordonné (**), ainsi qu'une légère déformation

du spectre, en particulier au niveau de la raie centrale (Figure 47, gauche). On a malgré tout des spectres très semblables entre les mutants et leurs WT respectifs ce qui indique que la mutation n'a pas d'effet sur la structure lorsque l'arginine est présente, ou que ce dernier est trop faible pour être détecté.

Les spectres des mutants bsNOS I224V et iNOS V346I sont semblables à ceux de leurs WT respectifs et les principales différences observées entre iNOS WT et bsNOS WT, à savoir la résolution du couplage hyperfin et la proportion de l'espèce axiale (*), se retrouvent chez les mutants. On peut donc en conclure que la substitution Val/Ile n'est pas à l'origine de ces différences et qu'elles résultent plutôt d'un effet de structure global.

+Arginine +H ₄ B	g ₁ A ₁ (MHz)	g ₂ A ₂ (MHz)	g ₃ A ₃ (MHz)	Espèce axiale g _⊥	+NOHA +H ₄ B	g ₁ A ₁ (MHz)	g ₂ A ₂ (MHz)	g ₃ A ₃ (MHz)	Espèce axiale g _⊥
bsNOS WT	2,081 29	2,005 59	1,967 33	-	bsNOS WT	2,073 22	2,007 58	1,974 20	-
bsNOS I224V	2,080 26	2,004 58	1,966 34	2,038	bsNOS I224V	2,078 36	2,005 57	1,973 20	2,044
iNOS WT	2,084 30	2,005 56	1,972 34	2,039	iNOS WT	2,073 40	2,009 52	1,984 14	2,037
iNOS V346I	2,085 17	2,005 58	1,970 37	2,040	iNOS V346I	2,078 36	2,005 57	1,973 20	2,039

Table 11- Paramètres RPE des complexes Fe^{II}NO en présence de H₄B et d'arginine (gauche) ou de NOHA (droite).
Les valeurs de g₁, g₂, g₃, A₁, A₂ et A₃ sont issues des simulations représentées Figure 47.
Les valeurs de g_⊥ sont mesurées directement sur les spectres.

On s'intéresse ensuite aux complexes Fe^{II}NO en présence de H₄B et du second substrat des NO-synthases, le NOHA. Il a été précédemment établi que la nature du ligand au sein du site actif, avait un effet important sur l'allure des spectres RPE de Fe^{II}NO[213,214], et on remarque, en effet, que les spectres des complexes Fe^{II}NO saturés en NOHA (Figure 47, droite) sont assez différents de ceux des complexes saturés en arginine (Figure 47, gauche), pour les WT comme pour les mutants. On observe, dans tous les cas, une diminution de l'anisotropie et une perte de résolution du couplage hyperfin, qui n'est résolu, en présence de NOHA, que pour la valeur de g centrale. Le couplage hyperfin contribue alors, pour les valeurs de g extrêmes, à l'élargissement des raies, les valeurs de A₁ et A₃ obtenues par simulation sont peu précises et ne seront donc pas discutées (Table 11, droite).

Les spectres des types sauvages sont assez semblables, bien que le spectre de iNOS soit un peu moins anisotrope que celui de bsNOS et présente, comme en présence d'arginine, une plus grande proportion d'espèce axiale (*) (Figure 47, droite). Il est donc assez surprenant de constater que les spectres des deux mutants présentent des valeurs de g identiques et ne ressemblent à aucun des spectres de WT (Table 11, droite). Ils sont plus anisotropes que leurs WT respectifs, en particulier iNOS V346I qui présente une valeur de g_{max} supérieure, et une

valeur de $g_{\min}$ inférieure à celles de iNOS WT. On note également l'absence de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné qui indique une stabilisation de la liaison thiolate.

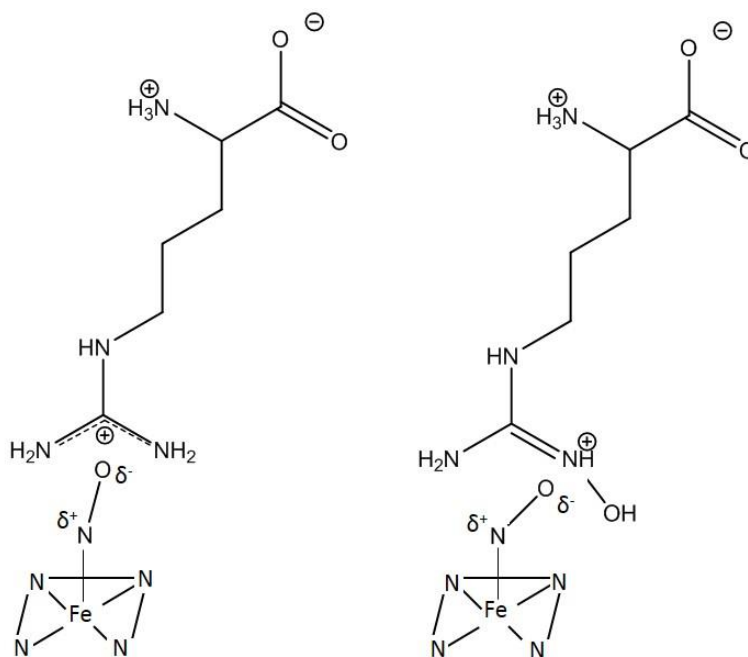


Figure 48- Représentation schématique des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence d'arginine (gauche) et de NOHA (droite).
Figure inspirée de la référence [212].

La structure cristallographique de bsNOS suggère un contact entre l'isoleucine 224 et le substrat ; le NOHA étant plus encombrant que l'arginine, de par son groupement hydroxyle supplémentaire, on peut donc concevoir que l'effet de la mutation Val/Ile soit plus marqué en présence de NOHA que d'arginine. Il a également été montré que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ serait plus linéaire en présence d'arginine que de NOHA[213]. Cette différence de géométrie serait due à une différence dans la localisation de la charge positive du motif guanidinium du substrat, en interaction avec l'oxygène du NO^+ : on aurait une charge localisée sur l'azote N^+ dans le cas du NOHA, alors qu'elle serait plus délocalisée dans le cas de l'arginine (Figure 48) [213]. L'impact de la mutation sur l'anisotropie des spectres reste toutefois difficile à expliquer et à rationaliser en termes de modifications structurales. On retrouve tout de même le fait que les deux mutations Val→Ile et Ile→Val ont des effets semblables, et pas opposés, comme on aurait pu s'y attendre *a priori*.

2.4.3. En présence de citrulline et H_4B

Etant données les différences de comportement observées en présence d'arginine ou de NOHA, on a préparé des complexes de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence de citrulline, le produit final de la réaction catalysée par les NO-synthases. Les spectres RPE bande X obtenus en présence de concentration saturantes de H_4B et de citrulline sont présentés Figure 49.

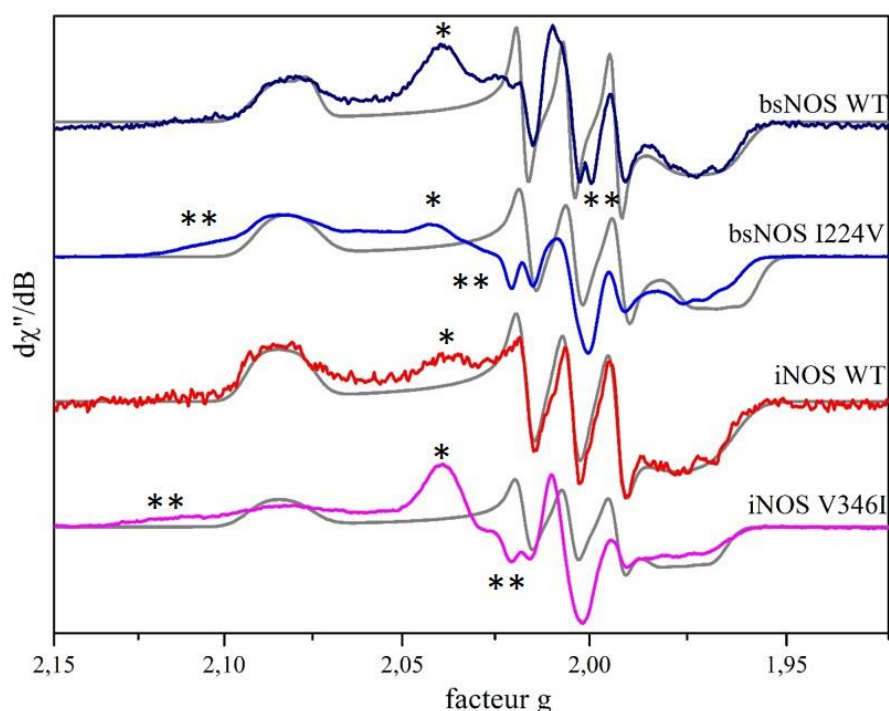


Figure 49 - Spectres RPE bande X des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence de citrulline et de H_4B .
Conditions expérimentales typiques: fréquence 9,4GHz, température 40K, puissance micro-ondes 63μW, modulation d'amplitude 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris
 * espèce axiale minoritaire.
 ** $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné.

Comparé à ceux en présence de H_4B seul ou accompagné d'un substrat, le spectre de bsNOS WT en présence de H_4B et citrulline comporte une proportion importante d'espèce axiale (*) et probablement un peu de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné (**), et il est déformé, en particulier au niveau de la raie centrale. De plus, le couplage hyperfin avec le noyau d'azote du $\text{NO}^{\bullet}$ n'est résolu que sur la raie centrale (Figure 49). On retrouve toutefois des valeurs de g assez proches de celles obtenues en présence de H_4B seul. Cette déformation est davantage marquée pour le mutant bsNOS I224V dont le spectre présente un signal supplémentaire important à $g=2$, et est donc difficile à simuler. On note également la présence d'une proportion importante de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné (**), alors qu'on n'en détecte que très peu sur le spectre du WT (Figure 49).

Protéine	g_1 $A_1(\text{MHz})$	g_2 $A_2(\text{MHz})$	g_3 $A_3(\text{MHz})$	Espèce axiale $g_{\perp}$
bsNOS WT	2,083 30	2,005 57	1,971 37	2,040
bsNOS I224V	2,082 28	2,005 57	1,967 33	2,041
iNOS WT	2,084 30	2,005 57	1,974 37	2,036
iNOS V346I	2,084 28	2,005 57	1,971 33	2,039

Table 12 - Paramètres RPE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence de H_4B et de citrulline.
Les valeurs de g_1 , g_2 , g_3 , A_1 , A_2 et A_3 sont issues des simulations représentées Figure 49.
Les valeurs de $g_{\perp}$ sont mesurées directement sur les spectres.

Le spectre de iNOS WT est le seul qui ne soit pas déformé (Figure 49). Cependant, comme ses paramètres A et g sont les mêmes que pour le spectre en présence de H_4B seul, on peut s'interroger sur la présence de citrulline, qui ne possède qu'une faible affinité pour le site actif. Tout comme le mutant bsNOS I224V, le mutant iNOS V346I présente une certaine proportion de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné (**). Il est de plus tellement déformé par la présence d'un signal important vers $g=2$ (Figure 49) qu'on ne peut rien affirmer concernant la position des raies ou l'intensité du couplage hyperfin.

Ces résultats montrent que non seulement la citrulline ne permet pas de stabiliser les NOS, mais qu'ajoutée en grande quantité, comme c'est le cas lors de la préparation de ces complexes, elle aurait même un effet déstabilisant. On peut expliquer ce comportement par le fait que le site actif des NOS ne soit pas optimisé pour accueillir la citrulline ; il est même au contraire conçu pour la libérer dans le milieu dès qu'elle est produite, afin de pouvoir fixer une nouvelle molécule d'arginine et commencer un nouveau cycle catalytique. Le fait de forcer la présence de citrulline au sein du site actif, en reconditionnant la protéine en présence d'une forte concentration de citrulline ($\approx 200\text{mM}$), peut donc le déformer et déstabiliser la protéine. Cet effet déstabilisant semble davantage marqué pour les mutants iNOS V346I et bsNOS I224V que pour les types sauvages.

2.4.4. Conclusion

Les spectres de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ des NOS sont plus anisotropes et le couplage hyperfin est mieux résolu que pour les hémoprotéines à ligand histidine comme l'hémoglobine[217,218]. On peut donc observer des variations très fines sur les spectres et détecter ainsi des modifications subtiles de l'environnement et de la structure électronique de l'hème. On parvient en effet à différencier les quatre enzymes étudiées, mais également à déterminer la nature du ligand présent au sein du site actif.

Comme dans le cas des Fe^{III} , on a un effet déstabilisant de la mutation plus important en absence de substrat qu'en présence d'arginine ou de NOHA. Cependant, sur les spectres de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, cet effet est encore visible pour le mutant iNOS V346I, même en présence d'arginine ce qui confirme que la mutation a plus d'impact sur la stabilité de iNOS que de bsNOS. On note également un effet de cette dernière sur l'anisotropie des spectres de complexes saturés en NOHA et H_4B . L'étude des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ permet une analyse plus fine de l'environnement de l'hème et donc de l'influence de la mutation Val/Ile.

Si la mutation Val/Ile a une influence sur les spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, en particulier en présence de NOHA, la nature du substrat présent au sein du site actif reste l'élément déterminant pour l'allure du spectre et la position des raies. Cet effet du substrat est nettement plus marqué que pour les complexes de Fe^{III} , ce qui suggère, tout comme les structures cristallographiques, une interaction directe entre le substrat et le $\text{NO}^{\bullet}$ [221-223]. Cette modulation des propriétés électroniques de l'hème en fonction de la nature du substrat appuie l'hypothèse de deux mécanismes moléculaires différents pour l'hydroxylation de l'arginine et l'oxydation du NOHA. (Cf. Chapitre I § 1.3 et Chapitre III § 3.1 et § 3.2).

2.5. Conclusion

D'un point de vue structural, la caractérisation des différents complexes Fe^{III} et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ indique que les deux mutations Val→Ile et Ile→Val ont des effets semblables. L'effet le plus notable est la déstabilisation des protéines, en particulier en absence de substrat. En présence de substrat et de cofacteur, les effets sont nettement moins marqués, même si de légères différences entre les WT et les mutants restent détectables par RPE, en particulier en présence de NOHA. Leurs causes précises sont plus difficiles à déterminer, mais elles traduisent de petits changements de la structure d'ensemble transmis au site actif *via* le réseau étendu de liaisons hydrogène.

On ne voit cependant pas d'influence de la mutation sur les spectres d'absorption UV-visible des complexes Fe^{III} et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ en présence d'arginine et de H_4B et les potentiels redox des mutants sont très proches de ceux de leurs WT respectifs. On n'a donc pas une modification drastique de l'environnement et des propriétés électroniques de l'hème, dès lors qu'on se trouve en présence de substrat et de cofacteur. La réaction catalytique ayant nécessairement lieu en présence de substrat et de cofacteur, on ne s'attend donc qu'à un faible impact de la mutation Val/Ile sur la stabilité des intermédiaires réactionnels hémiques des mutants iNOS V346I et bsNOS I224V.

3. Influence sur le cycle catalytique

Malgré une forte ressemblance au niveau structural et un site actif extrêmement conservé, les bacNOS ont une activité catalytique *in vitro* très inférieure à celle des mNOS[22, 24]. La substitution Val/Ile étant l'unique différence conservée au sein du site actif, il a été proposé qu'elle pourrait être responsable de la faible production de NO[•] par les bacNOS[24, 27]. Des études précédentes, en particulier sur la deuxième étape du cycle catalytique, ont en effet montré que la mutation Ile→Val, chez bsNOS, permettait d'accélérer la catalyse, sans toutefois retrouver les vitesses mesurées pour iNOS. De même, la mutation Val→Ile, ralentit la production de NO[•] par la NOS inducible[27]. Les études cinétiques précédentes ont été réalisées à 10°C. On a choisi de travailler ici à plus basse température (4°C), afin de ralentir les cinétiques et de regarder les effets de la mutation sur les intermédiaires observés ; on s'intéresse en particulier à la formation d'un radical bioptérine.

3.1. Hydroxylation de l'arginine

3.1.1. Intermédiaires réactionnels observés

Les expériences de *stopped-flow* pour iNOS WT et V346I et bsNOS WT et I224V ont été réalisées à 4°C. La protéine reconditionnée en présence d'arginine et de H₄B est anaérobisée puis réduite et transférée dans l'appareil de *stopped-flow*. Après son mélange à un tampon saturé en air, l'évolution du milieu réactionnel est suivie par spectroscopie UV-visible, avec une résolution temporelle de 3 ms. L'état Fe^{III} n'étant pas réactif vis-à-vis de l'oxygène, et en absence de réducteur en excès dans le milieu, chaque enzyme ne peut effectuer qu'un unique cycle catalytique ; on dit alors qu'on est en conditions de *single-turnover*.

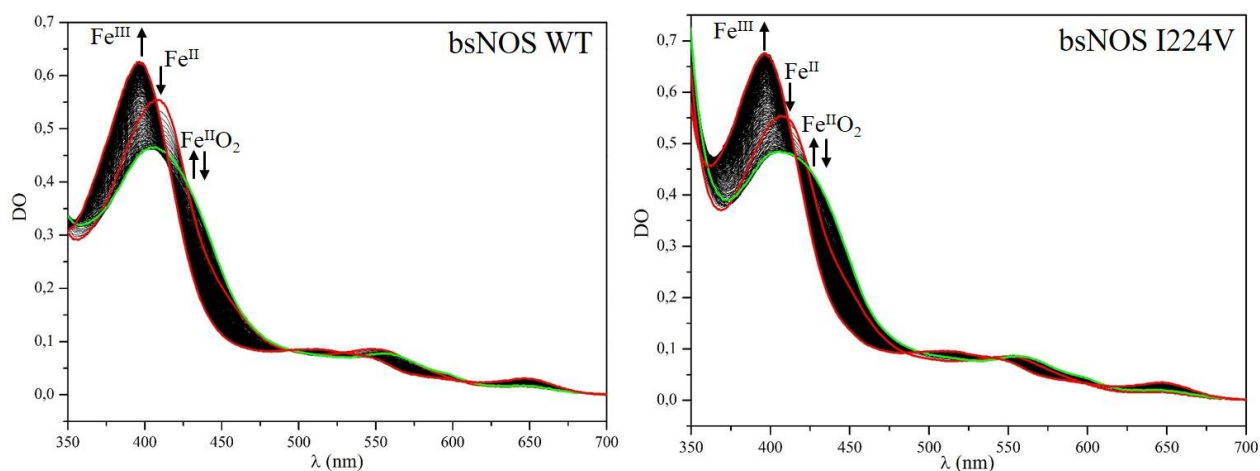


Figure 50 - Spectres UV-visible obtenus lors des expériences de *stopped-flow* pour bsNOS WT (gauche) et I224V (droite), en présence d'arginine et de H₄B.

Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.

Les spectres présentant le maximum de Fe^{II}O₂ sont représentés en vert.

On s'intéresse tout d'abord au cas de bsNOS. Les spectres obtenus pour le WT (gauche) et le mutant I224V (droite), lors d'une expérience de *stopped-flow* représentative, sont présentés Figure 50. Dans les deux cas, on n'observe qu'un seul intermédiaire réactionnel entre le Fe^{II} initial et le Fe^{III} final (spectres rouges) : le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, formé lors de la fixation du dioxygène[224]. Ce dernier s'accumule peu dans le milieu ; on n'a pas de spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ pur, mais seulement des spectres d'un mélange $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ / Fe^{III} , caractérisés par la présence d'un épaulement vers 427nm (Figure 50, spectres verts). Ce dernier est un peu plus marqué pour le mutant I224V que pour bsNOS WT.

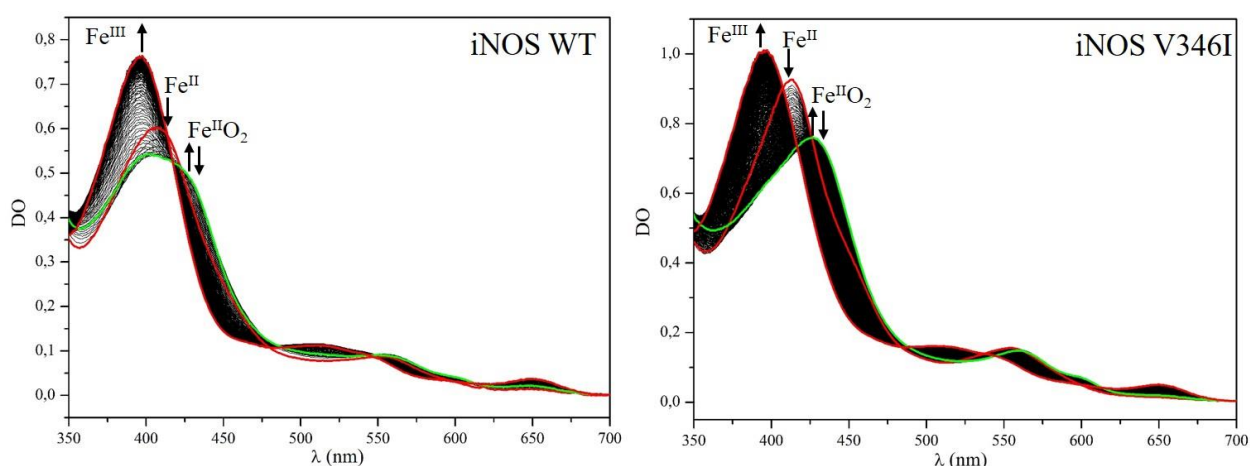


Figure 51- Spectres UV-visible obtenus lors des expériences de *stopped-flow* pour iNOS WT (gauche) et V346I (droite), en présence d'arginine et de H_4B .

Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.

Les spectres présentant le maximum de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ sont représentés en vert.

Dans le cas de iNOS (Figure 51), WT et mutant V346I, on observe les trois mêmes états que dans le cas de bsNOS, à savoir le Fe^{II} initial (spectres rouges), l'intermédiaire réactionnel $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (spectres verts) et le Fe^{III} final (spectres rouges). On note tout de même que le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ s'accumule davantage, en particulier dans le cas du mutant V346I. On obtient, en effet, un spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ pratiquement pur, caractérisé par un maximum d'absorption à 427nm ; la densité optique pratiquement nulle à 650nm confirme l'absence de Fe^{III} (Figure 51, droite, spectre vert).

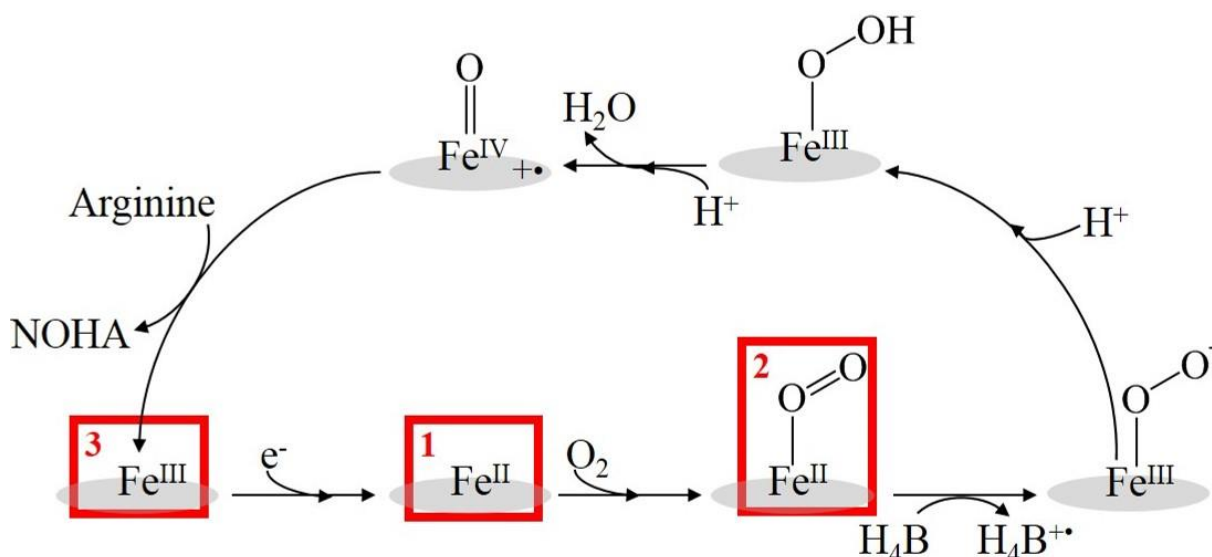


Figure 52- Mécanisme catalytique d'hydroxylation de l'arginine par les NOS.
Les intermédiaires observés en stopped-flow sont encadrés en rouge.

On observe donc, dans tous les cas, un unique intermédiaire réactionnel $Fe^{II}O_2$, comme c'était le cas pour les expériences réalisées pour iNOS et bsNOS WT, à 10°C[27,181]. La différence de température ne permet donc pas l'observation d'intermédiaire supplémentaire ce qui indique que l'étape limitante reste l'activation de l'oxygène, *via* la réduction du $Fe^{II}O_2$. On note également qu'on n'a pas d'impact drastique de la mutation Val/Ile, et les résultats obtenus ici sont *a priori* en accord avec le mécanisme catalytique généralement admis pour l'hydroxylation de l'arginine par les NO-synthases (Figure 52).

3.1.2. Fixation de l'oxygène

Dans les expériences de *stopped-flow*, on part d'une enzyme réduite à l'état Fe^{II} ; la première transition observée correspond donc à la fixation du dioxygène et à la formation du complexe $Fe^{II}O_2$. Cette vitesse a été calculée en modélisant les variations d'absorbance en fonction du temps à 396nm (décroissance) et 440nm (croissance) par des fonctions mono-exponentielles (Table 13). La corrélation entre la diminution de l'absorbance à 396nm (disparition du Fe^{II}) et son augmentation à 440nm (formation du $Fe^{II}O_2$), ainsi que la présence d'un point isobestique (425nm), visible surtout dans le cas du mutant iNOS V346I, confirment l'absence d'intermédiaire entre les états Fe^{II} et $Fe^{II}O_2$.

Constantes cinétiques (s ⁻¹)	Fe ^{II} $\longrightarrow$ Fe ^{II} O ₂	Fe ^{II} O ₂ $\longrightarrow$ Fe ^{III}
bsNOS WT	66 ± 16	4,3 ± 2,2
bsNOS I224V	143 ± 54	6,1 ± 2,2
iNOS WT	209 ± 61	18,6 ± 1,8
iNOS V346I	13,8 ± 1,4	1,52 ± 0,29

Table 13 - Constantes cinétiques issues des expériences de *stopped-flow* (4°C) pour l'hydroxylation de l'arginine en présence du cofacteur H₄B.

Les valeurs reportées dans ce tableau pour bsNOS WT et I224V et iNOS WT correspondent aux moyennes (± écart-type) de 8 à 10 tirs de stopped-flow, issus de deux séries d'expériences indépendantes.

Dans le cas du mutant iNOS V346I on a utilisé 20 tirs de stopped-flow, issus de quatre séries d'expériences indépendantes réalisées avec des échantillons provenant de deux lots de production distincts.

La fixation du dioxygène est environ 4 fois plus rapide dans le cas de iNOS WT que de bsNOS WT (Table 13). Le site actif de iNOS étant plus enfoui et moins exposé au solvant que celui de bsNOS, ce résultat suggère l'existence d'un canal d'accès au site actif propre au dioxygène, dans lequel serait situé le résidu Val346/Ile224. Le groupe méthyle supplémentaire porté par l'isoleucine, chez bsNOS WT, gênerait donc l'accès du dioxygène à l'hème ce qui expliquerait la vitesse de formation du Fe^{II}O₂ plus faible[27]. On constate en effet une nette accélération de la fixation du dioxygène chez le mutant bsNOS I224V, et un fort ralentissement dans le cas de iNOS V346I (Table 13). L'effet de la mutation est nettement plus marqué dans le cas de iNOS (diminution d'un facteur 15) que de bsNOS (augmentation d'un facteur 2), conformément à ce qu'on a observé lors de la caractérisation des différents complexes (Cf. §2).

3.1.3. Stabilité du complexe Fe^{II}O₂

La corrélation entre la diminution de l'absorbance à 440nm (disparition du Fe^{II}O₂) et son augmentation à 396nm (formation du Fe^{III}), ainsi que la présence d'un point isobestique (416nm), confirment l'absence d'intermédiaire observable entre les états Fe^{II}O₂ et Fe^{III}.

Tout comme la fixation du dioxygène, la disparition du Fe^{II}O₂ est environ 4 fois plus rapide pour iNOS WT que pour bsNOS WT. Etant donné qu'elle est due à la réduction du complexe par le cofacteur bioptérine, on peut en conclure que le transfert d'électron entre H₄B et l'hème est plus efficace chez iNOS que chez bsNOS (Table 13). La vitesse de disparition du Fe^{II}O₂ mesurée ici pour bsNOS WT est tout de même environ 10 fois plus élevée que celle mesurée en absence de cofacteur[24]. Ceci suggère que H₄B est bien impliqué dans la réduction du Fe^{II}O₂ et qu'on observe bien l'activation de l'oxygène par bsNOS, et pas (uniquement) l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂ qui conduit également à la formation du Fe^{III}[24].

Le mutant bsNOS I224V présente une vitesse de disparition du Fe^{II}O₂ très proche de celle du WT. La mutation n'étant pas située à proximité directe du cofacteur ou de son site de

fixation, il est assez logique qu'elle n'ait que peu d'effet sur le processus de transfert d'électron du H₄B vers l'hème. Son impact dans le cas de iNOS sur la stabilité du complexe Fe^{II}O₂, qui disparaît environ 10 fois plus rapidement pour le WT que pour le mutant V346I, est donc assez surprenant. D'après la vitesse d'auto-oxydation du Fe^{II}O₂ pour iNOS V346I, mesurée à 10°C[181], la transition observée ici correspond bien à l'activation de l'oxygène par le cofacteur biptérine et pas à l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂.

Ces résultats suggèrent que la mutation Val→Ile (iNOS) aurait un impact sur la structure globale de la protéine, et en particulier sur le site de fixation du H₄B, alors que l'effet de la mutation Ile→Val (bsNOS) s'exercerait plus localement. On retrouve ici l'hypothèse formulée lors de l'étude spectroscopique mais, alors que l'impact de la mutation sur la structure globale de iNOS semblait assez faible en présence de substrat, on observe une diminution drastique de la vitesse de disparition du Fe^{II}O₂, et donc d'activation de l'oxygène.

3.1.4. Piégeage et caractérisation du radical H₄B[•]

Des expériences de *freeze-quench* ont été réalisées pour les mutants iNOS V346I et bsNOS I224V, les types sauvages ayant déjà été étudiés[31,225]. Le principe est semblable à celui du *stopped-flow*, mais au lieu de suivre l'évolution de la réaction, on l'arrête, après un temps déterminé, en nébulisant le milieu réactionnel dans l'isopentane à 140K, puis on le transfère dans un tube RPE. On travaille également à 4°C pour le mélange, puisqu'on utilise les résultats obtenus en *stopped-flow* pour choisir les temps de réaction. On cherche à piéger le cofacteur biptérine formé lors de l'activation de l'oxygène, donc on arrête la réaction entre le maximum de formation du Fe^{II}O₂ et la fin de la réaction, à savoir le retour complet au Fe^{III} (Figure 52).

Les spectres RPE bande X obtenus pour les types sauvages et pour les mutants sont représentés Figure 53. On observe, pour les WT comme pour les mutants, un mélange de radical ptérine (à g=2) et de Fe^{III} HS. La position des raies, et en particulier la valeur de g₁^{eff}, indique qu'il y a du NOHA au sein du site actif ; les enzymes dans l'état Fe^{III} ne sont donc pas issues de l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂ mais ont bien effectué un cycle catalytique. La proportion de Fe^{III} nous renseigne donc sur l'état d'avancement de la réaction.

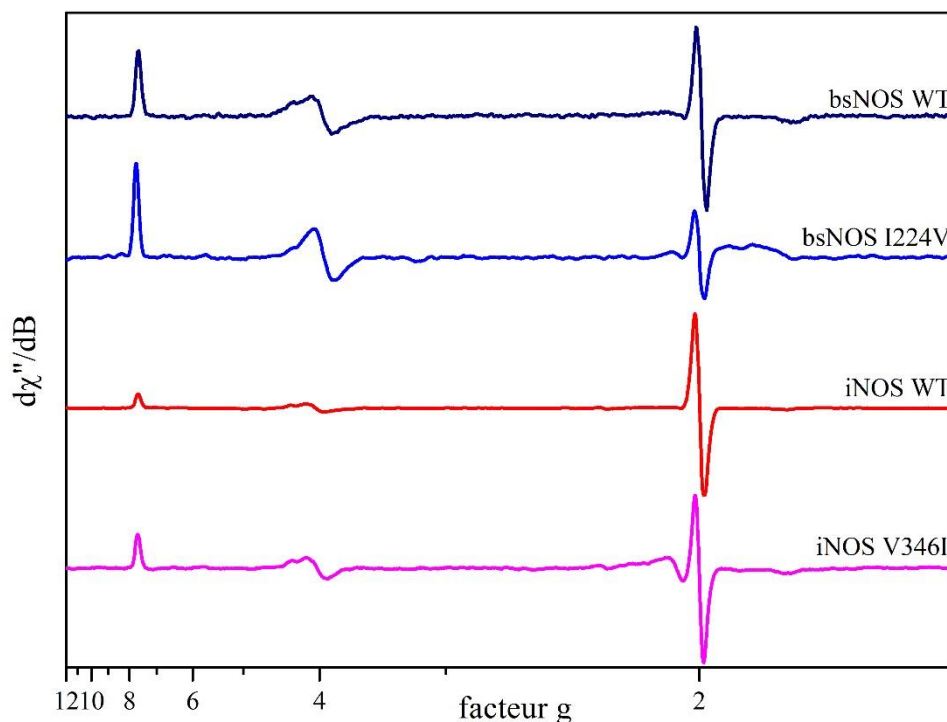


Figure 53 - Spectres RPE bande X des échantillons de *freeze-quench* obtenus en présence d'arginine et de H_4B . Ces spectres ont été enregistrés de façon à faire ressortir le Fe^{III} HS, le signal du radical ptérine à $g=2$ est donc saturé.

Conditions d'enregistrement typiques : fréquence 9,4GHz, température 10K, puissance micro-ondes 1mW, modulation d'amplitude 2mT.

Temps de piégeage : iNOS WT, 120ms (10°C) ; iNOS V346I 600ms (4°C) ; bsNOS WT, 35 ms (10°C) ; bsNOS I224V, 50ms (4°C).

Les temps de piégeage utilisés pour les WT correspondent aux maxima de formation du radical, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour les mutants.

Dans le cas de bsNOS WT et I224V, on a une proportion assez importante de Fe^{III} HS par rapport au radical, malgré des temps de piégeage extrêmement courts, ce qui suggère que ce dernier a une durée de vie très courte et est rapidement re-réduit en H_4B par une entité dont l'identité reste à déterminer. Dans les conditions de l'expérience, en l'absence de tout partenaire redox potentiel, le solvant est le candidat le plus probable, d'autant plus que le site actif de bsNOS y est fortement exposé[21]. On a peu d'effet de la mutation Ile→Val sur les temps de réaction et la quantité de radical piégé ; ce résultat n'est pas surprenant étant donné son impact très limité sur la vitesse de disparition du $Fe^{II}O_2$, et donc de formation du radical ptérine.

Au contraire, sur les spectres de iNOS WT et V346I, le radical prédomine malgré des temps de piégeage plus longs que pour bsNOS. Sa durée de vie est également beaucoup plus longue puisque, dans le cas du mutant V346I, on le détecte encore après 1,3s alors que la réaction est pratiquement terminée. Cela suggère qu'il est fortement stabilisé par la protéine et qu'il est peu accessible au solvant ce qui est parfaitement compatible avec l'hypothèse, généralement admise, d'une réduction ultérieure du radical ptérine par un électron provenant du domaine réductase[68, 85]. Néanmoins, dans les conditions de l'expérience, ie en absence

du domaine réductase, le radical ptérine est probablement réduit de manière non spécifique par le solvant.

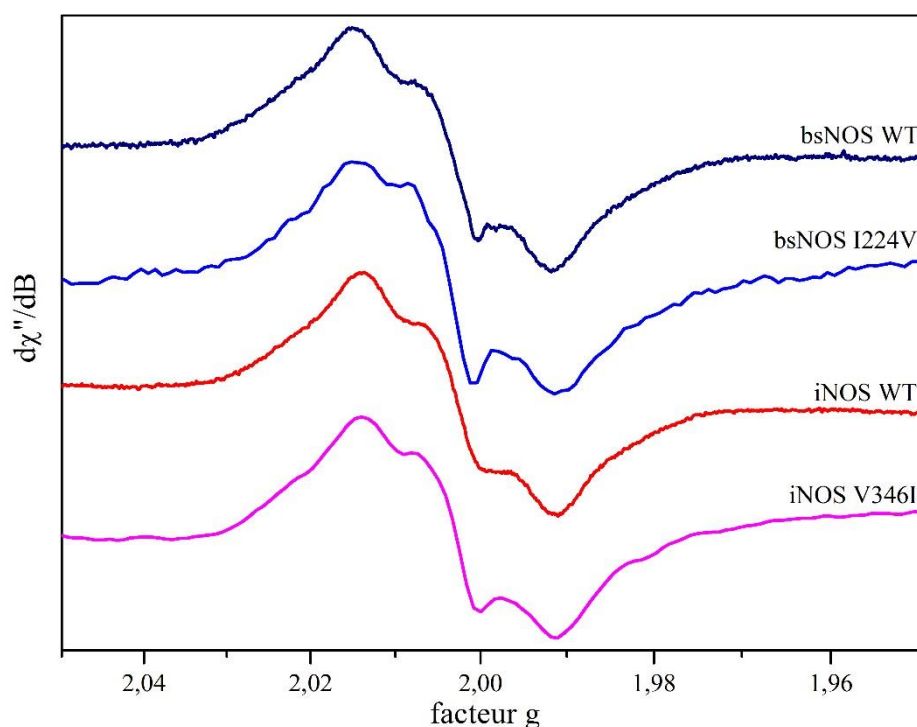


Figure 54 - Spectres RPE bande X des radicaux piégés par *freeze-quench* en présence d'arginine et de H₄B. Conditions d'enregistrement typiques : fréquence 9,4GHz, température 50K, puissance micro-ondes 1mW, modulation d'amplitude 0,5mT. Temps de piégeage : iNOS WT, 120ms (10°C) ; iNOS V346I 600ms (4°C) ; bsNOS WT, 35 ms (10°C) ; bsNOS I224V, 50ms (4°C).

Ces résultats nous permettent, dans un premier temps, de confirmer que les vitesses de disparition du Fe^{II}O₂ mesurées par *stopped-flow* correspondent bien à sa réduction par le cofacteur biptérine et pas à son auto-oxydation. Malgré l'important ralentissement du transfert électronique du H₄B vers l'hème, observé pour le mutant iNOS V346I, ce dernier reste suffisamment efficace pour limiter l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂. L'enregistrement de spectres RPE à plus haute température (40K à 70K) et centrés sur le signal du radical ptérine nous permet de faire apparaître sa structure hyperfine et de comparer la forme et la position des spectres des mutants à ceux des types sauvages. Comme on peut le voir Figure 54, les spectres du radical ptérine obtenus pour les mutants iNOS V346I et bsNOS I224V sont extrêmement semblables à ceux des WT. Le radical formé lors de l'activation de l'oxygène est donc également sous forme protonée H₄B⁺ [31, 88] ce qui, ajouté aux résultats de *stopped-flow*, montre que les mutants et les WT suivent le même mécanisme moléculaire pour l'hydroxylation de l'arginine.

3.2. Oxydation du NOHA

3.2.1. Intermédiaires réactionnels observés

On a effectué les expériences de *stopped-flow* à 4°C, pour les deux WT et les deux mutants, en présence de NOHA et du cofacteur H₄B, afin d'étudier la deuxième étape du cycle catalytique des NO-synthases : l'oxydation du NOHA et la production de monoxyde d'azote.

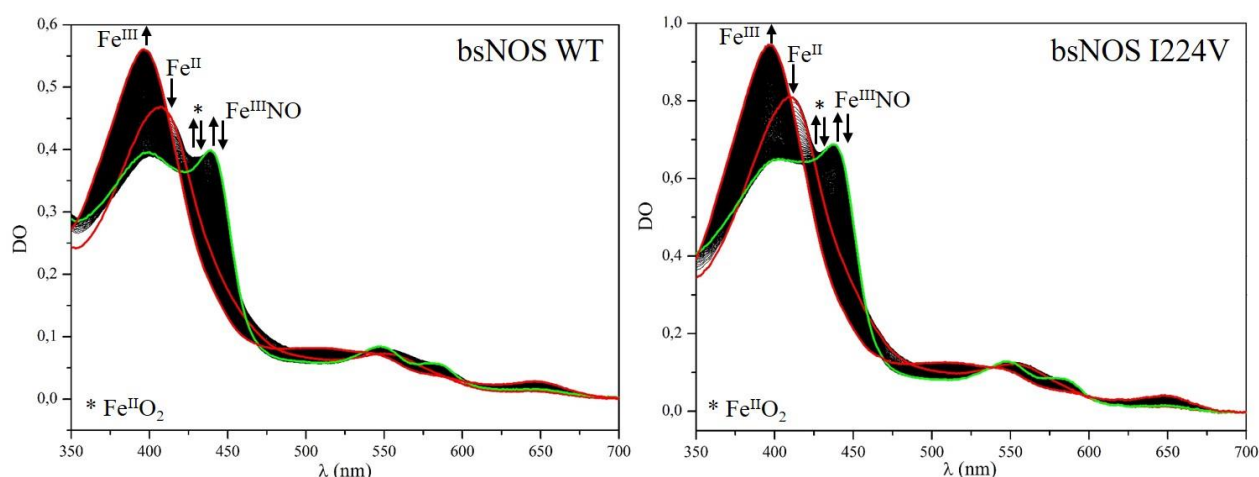


Figure 55- Spectres UV-visible obtenus lors des expériences de *stopped-flow* pour bsNOS WT (gauche) et I224V (droite), en présence de NOHA et de H₄B.

Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.

Les spectres présentant le maximum de Fe^{III}NO sont représentés en vert.

Les spectres obtenus pour bsNOS WT et pour le mutant I224V sont, comme pour la première étape, extrêmement semblables. En plus du Fe^{II} initial et du Fe^{III} final (Figure 55, spectres rouges), on détecte la formation puis la disparition de deux intermédiaires réactionnels : le complexe Fe^{II}O₂ (Figure 55,*) et le complexe Fe^{III}NO (Figure 55, spectres verts) qui se dissocie pour former le Fe^{III} final et libérer le NO*[27,226]. Ce dernier est caractérisé par un maximum d'absorption à 440nm et deux bandes assez marquées vers 550nm et 580nm.

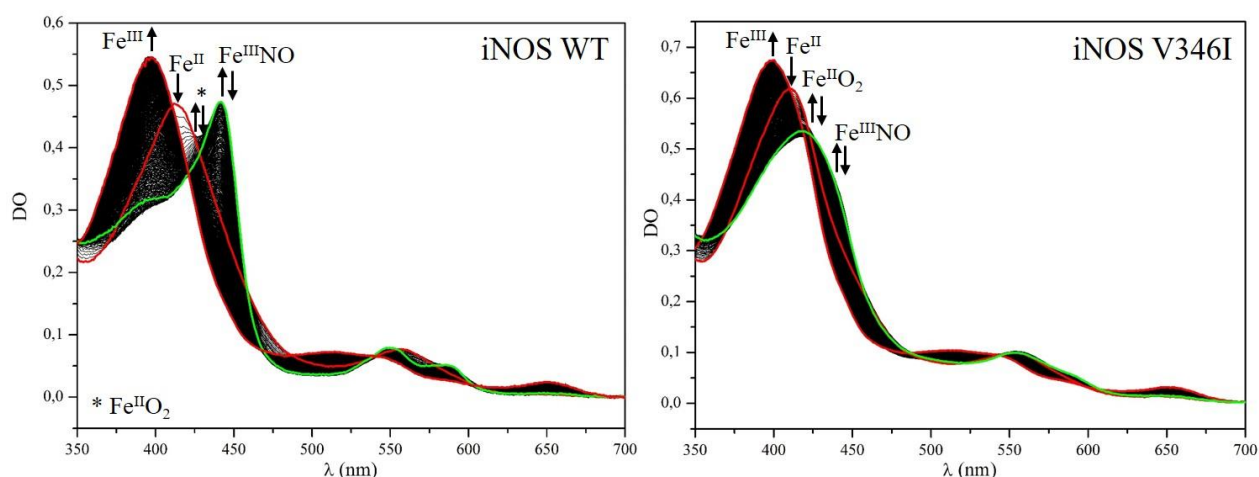


Figure 56 - Spectres UV-visible obtenus lors des expériences de *stopped-flow* pour iNOS WT (gauche) et V346I (droite), en présence de NOHA et de H_4B .
Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.
Les spectres présentant le maximum de $Fe^{III}NO$ sont représentés en vert.

Dans le cas de iNOS (Figure 56), WT et mutant V346I, on observe les deux mêmes intermédiaires que pour bsNOS, à savoir les complexes $Fe^{II}O_2$ (*) et $Fe^{III}NO$ (spectres verts). On remarque tout de même que, dans le cas du mutant, le $Fe^{III}NO$ s'accumule peu dans le milieu et qu'on ne le détecte donc que sous la forme d'un épaulement sur un spectre qui correspond probablement à un mélange $Fe^{II}O_2$ / $Fe^{III}NO$ / Fe^{III} . Ceci indique qu'il se dissocie pratiquement au fur et à mesure de sa formation, contrairement à ce qui se passe pour iNOS WT. La mutation Val→Ile modifierait donc le rapport entre les vitesses de formation et de dissociation du $Fe^{III}NO$ (Cf. § 3.2.2 et §3.2.3).

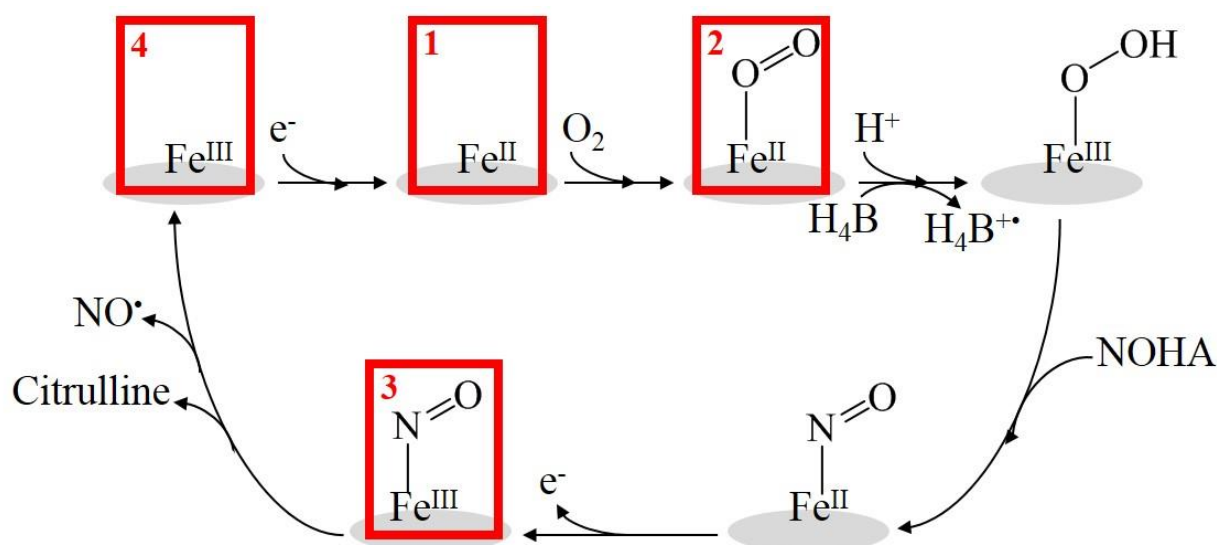


Figure 57 - Mécanisme catalytique d'oxydation du NOHA par les NOS.
Les intermédiaires observés en *stopped-flow* sont encadrés en rouge.

Comme pour la première étape, on observe, à 4°C, les mêmes intermédiaires que ceux décrits précédemment à 10°C, ce qui indique que l'activation de l'oxygène est l'étape limitante pour l'oxydation du NOHA et que la stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ détermine la vitesse de production effective de monoxyde d'azote par l'enzyme[27]. La présence de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ indique que la catalyse a bien eu lieu et que les mutants sont donc capables, comme les types sauvages, de produire du $\text{NO}^{\bullet}$ *in vitro*. Ces données sont également compatibles avec le mécanisme catalytique généralement proposé pour l'oxydation du NOHA par les NO-synthases (Figure 57).

3.2.2. Fixation de l'oxygène et libération du $\text{NO}^{\bullet}$

Contrairement à la première étape, on ne peut pas utiliser l'augmentation de l'absorbance à 440nm pour suivre la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ car cette dernière est principalement due à la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ dont le coefficient d'extinction molaire à 440nm est nettement plus élevé. On suit donc uniquement la disparition du Fe^{II} , *via* la diminution de l'absorbance à 396nm, modélisée par une fonction mono-exponentielle. La libération du $\text{NO}^{\bullet}$ correspond à la dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et à l'apparition du Fe^{III} . On calcule donc sa vitesse en modélisant les variations d'absorbance à 440nm (diminution) et 396nm (augmentation) par des fonctions mono-exponentielles.

Constantes cinétiques (s^{-1})	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$	$\longrightarrow$	Fe^{III}
bsNOS WT		$29,0 \pm 2,1$		$18,3 \pm 3,5$		$0,39 \pm 0,06$	
bsNOS I224V		$38,7 \pm 4,1$		$22,5 \pm 3,3$		$0,60 \pm 0,03$	
iNOS WT		84 ± 6		$43,3 \pm 4,5$		$1,08 \pm 0,04$	
iNOS V346I		$9,8 \pm 1,7$		$7,7 \pm 1,7$		$0,41 \pm 0,03$	

Table 14- Constantes cinétiques issues des expériences de *stopped-flow* (4°C) pour l'oxydation du NOHA en présence du cofacteur H_4B .

Les valeurs reportées dans ce tableau pour bsNOS WT et I224V et iNOS WT correspondent aux moyennes ($\pm$ écart-type) de 8 à 10 tirs de stopped-flow, issus de deux séries d'expériences indépendantes.

Dans le cas du mutant iNOS V346I on a utilisé 20 tirs de stopped-flow, issus de quatre séries d'expériences indépendantes réalisées avec des échantillons provenant de deux lots de production distincts.

Concernant la vitesse de fixation du dioxygène, on remarque qu'elle est, dans tous les cas, environ deux fois plus lente que pour l'étape d'hydroxylation de l'arginine. La nature du substrat présent au sein du site actif a donc un impact sur son accessibilité pour le dioxygène : le groupement hydroxyle porté par le NOHA gênerait donc sa fixation sur le Fe^{II} hémique. Comme pour la première étape, la mutation Ile $\rightarrow$ Val (bsNOS) accélère légèrement la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ alors que la mutation Val $\rightarrow$ Ile (iNOS) la ralentit de manière drastique. Cet

effet est toutefois un peu moins marqué qu'en présence d'arginine, notamment dans le cas de iNOS où la fixation du dioxygène chez le mutant V346I n'est ralentie que d'un facteur 8 (15 pour la première étape) par rapport au WT. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà publiés et confirment l'hypothèse d'un canal d'accès du dioxygène au site actif, à l'embouchure duquel on trouverait la valine 346 (iNOS) ou l'isoleucine 224 (bsNOS)[24, 27,181]. Cette hypothèse permet également d'expliquer l'influence du substrat puisque ce dernier est positionné au-dessus de l'hème, en contact avec le résidu Val346/Ile224 (Figure 58).

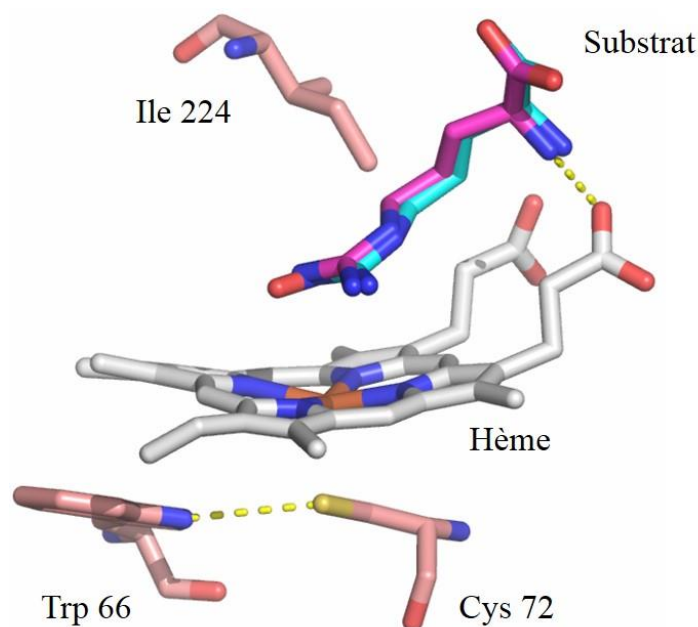


Figure 58- Position du substrat arginine (magenta) ou NOHA (cyan) au sein du site actif de bsNOS.
 Figure réalisée avec Pymol à partir des structures pdb 1M7V (Arg) et 1M7Z (NOHA).
 Les pointillés jaunes représentent des liaisons hydrogène.

Conformément à ce qui avait été observé à 10°C, on note aussi un effet de la mutation Val/Ile sur la vitesse de libération du NO[•] : elle est accélérée pour bsNOS I224V et ralentie pour iNOS V346I, comparé à leurs WT respectifs[27]. Cela suggère que la sortie du NO[•] pourrait s'effectuer *via* le même canal que l'entrée du dioxygène. Si la mutation Val→Ile provoque une gêne stérique suffisante pour ramener la vitesse de libération du NO[•] du mutant iNOS V346I à celle de bsNOS WT, celle du mutant bsNOS I224V reste nettement inférieure à celle de iNOS WT. On a donc, une fois encore, un effet de la mutation plus marqué pour iNOS que pour bsNOS, cohérent avec l'idée d'un impact du groupe méthyle supplémentaire porté par l'isoleucine, comparée à la valine, sur la structure globale de la protéine.

3.2.3. Stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$

Contrairement à la fixation du dioxygène, on constate que l'étape d'activation de l'oxygène, *ie* la disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, est plus rapide en présence de NOHA que d'arginine (Table 14)[27]. Concernant les types sauvages, cet effet de la nature du substrat est plus marqué pour bsNOS que pour iNOS. L'effet de la mutation Val/Ile est, en revanche, nettement plus marqué pour iNOS que pour bsNOS. En effet, comme pour la première étape, l'écart entre les vitesses de disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ pour bsNOS WT et I224V, est de l'ordre de l'incertitude des mesures et n'est donc pas significatif.

Dans le cas de iNOS, la mutation Val→Ile conduit à un ralentissement de la vitesse d'activation de l'oxygène d'un facteur 5-6 (Table 14). On a donc, comme pour la fixation de l'oxygène, un effet moins marqué en présence de NOHA que d'arginine. Ce résultat est parfaitement compatible avec l'hypothèse, formulée au §3.1.3, d'un ralentissement du transfert d'électron du H_4B vers l'hème dû à la déformation du site de fixation de la ptérine du mutant iNOS V346I. On remarque également que, pour le mutant iNOS V346I, les vitesses de formation et de disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ sont très proches (Table 14), ce qui explique qu'on peine à le discerner sur les spectres de *stopped-flow* (Figure 56). De plus, l'écart entre les vitesses de formation et de disparition du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ est nettement plus important pour iNOS WT que pour le mutant, ce qui est parfaitement cohérent avec l'allure des spectres représentés Figure 56.

On peut supposer que, comme le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ pourrait adopter une conformation différente en présence d'arginine et de NOHA, qui aurait un impact sur son potentiel redox. Cela permettrait d'expliquer les différences de vitesse d'activation de l'oxygène observées entre la première et la deuxième étape. De plus, la mesure du potentiel redox du couple hème- Fe^{III} / hème- Fe^{II} de iNOS WT dans différentes conditions a montré qu'il était sensible, entre autre, à la nature du ligand, arginine ou différents analogues, présent au sein du site actif[189]. Cette modulation du potentiel redox des différents complexes hémiques par le substrat confirme l'hypothèse d'un mécanisme réactionnel sensiblement différent pour les deux étapes catalytiques des NO-synthases (Figure 37)[68, 85].

3.2.4. Piégeage et caractérisation du radical $\text{H}_4\text{B}^{\bullet}$

On a réalisé les expériences de *freeze-quench* pour les mutants bsNOS I224V et iNOS V346I, les expériences sur les types sauvages ayant été précédemment effectuées au laboratoire[31]. Comme pour la première étape, la formation du radical ptérine serait due à la réduction, par H_4B , du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, et donc corrélée à la disparition de ce dernier. L'oxydation ultérieure du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ par ce radical conduirait alors à la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et à la régénération du cofacteur biptérine sous sa forme réduite H_4B (Figure 57). On cherche donc, pour piéger le radical biptérine, à arrêter la réaction entre le maximum de formation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et celui du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$.

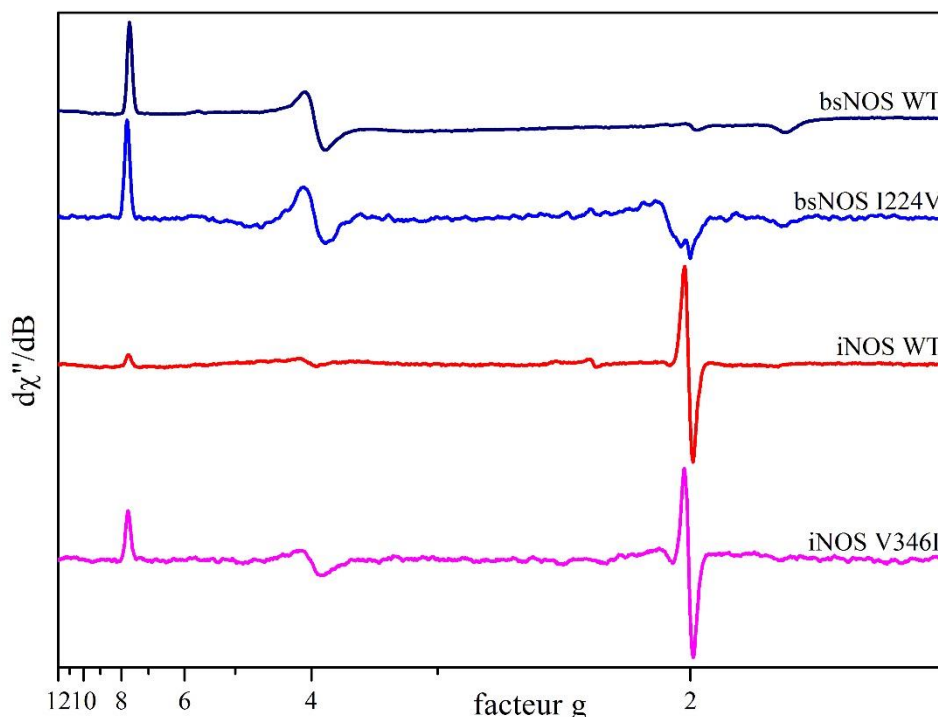


Figure 59 - Spectres RPE bande X des échantillons de *freeze-quench* obtenus en présence de NOHA et de H₄B. Ces spectres ont été enregistrés de façon à faire ressortir le Fe^{III} HS et le signal du radical ptérine vers $g=2$ est donc saturé.

Conditions d'enregistrement typiques : fréquence 9,4GHz, température 10K, puissance micro-ondes 1mW, modulation d'amplitude 2mT.

Temps de piégeage : iNOS WT, 60ms (10°C) ; iNOS V346I 280ms (4°C) ; bsNOS WT, 80 ms (10°C) ; bsNOS I224V, 127ms (4°C).

Le temps de piégeage utilisé pour iNOS WT correspond au maximum de formation du radical, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour le mutant.

Les spectres RPE obtenus pour les WT et les mutants sont représentés Figure 59. Pour iNOS WT et V346I, on observe un peu de Fe^{III} HS, ainsi qu'un signal intense vers $g=2$, caractéristique d'un radical organique ; l'enregistrement de spectres centrés sur ce signal, en conditions non saturantes confirme qu'il s'agit bien, dans les deux cas, d'un radical ptérine (Figure 60). Dans le cas de bsNOS, au contraire, on ne voit pas de radical, mais seulement du Fe^{III} HS. Le signal présent vers $g=2$ sur le spectre RPE du mutant bsNOS I224V est visible sur de nombreux spectres (Cf. par exemple Figure 40) et est probablement dû à la présence de cuivre dans l'échantillon ; une partie de ce signal provient de la cavité elle-même puisqu'on l'observe même en absence d'échantillon. Pour le mutant I224V, comme pour le WT[31], de nombreux autres temps de piégeage ont été testés, y compris des temps plus courts et plus longs que ceux déterminés par l'analyse des expériences de *stopped-flow*, sans qu'un radical ptérine puisse être observé. Ces résultats indiquent que la mutation Val/Ile ne modifie pas notre capacité à piéger un radical ptérine.

Le fait qu'un radical ptérine soit piégé pour le mutant iNOS V346I, malgré une vitesse de formation bien plus lente que pour iNOS WT, suggère que la mutation Val→Ile ralentit également la réaction de réduction du radical ptérine qui conduit à sa disparition. Cette

hypothèse est cohérente avec le fait que toutes les transitions observables par *stopped-flow* sont nettement plus lentes pour iNOS V346I que pour iNOS WT. La comparaison des spectres centrés sur le signal du radical avec ceux obtenus pour la première étape indique qu'il s'agit, ici aussi, d'un radical protoné $H_4B^{+•}$ [31, 88]. Le mécanisme d'activation de l'oxygène et le rôle du cofacteur sont donc identiques chez iNOS WT et V346I, pour la première et la deuxième étape du cycle catalytique. Cependant, la durée de vie du radical $H_4B^{+•}$ est nettement plus courte que lors de la première étape, notamment pour le mutant V346I [93], ce qui suggère qu'on aurait en revanche, deux mécanismes différents pour la réduction du radical ptérine. Comme l'oxydation du NOHA en citrulline et $NO^•$ ne requiert, formellement, qu'un seul électron, l'électron fourni par H_4B pour l'activation de l'oxygène est excédentaire. Une réduction catalytique du radical a donc été proposée pour la 2^{ème} étape (Figure 57) afin d'expliquer le fait que iNOS forme du $NO^•$ et pas du NO^- . Ceci expliquerait donc la disparition plus rapide du radical $H_4B^{+•}$, comparée à la 1^{ère} étape du cycle catalytique.

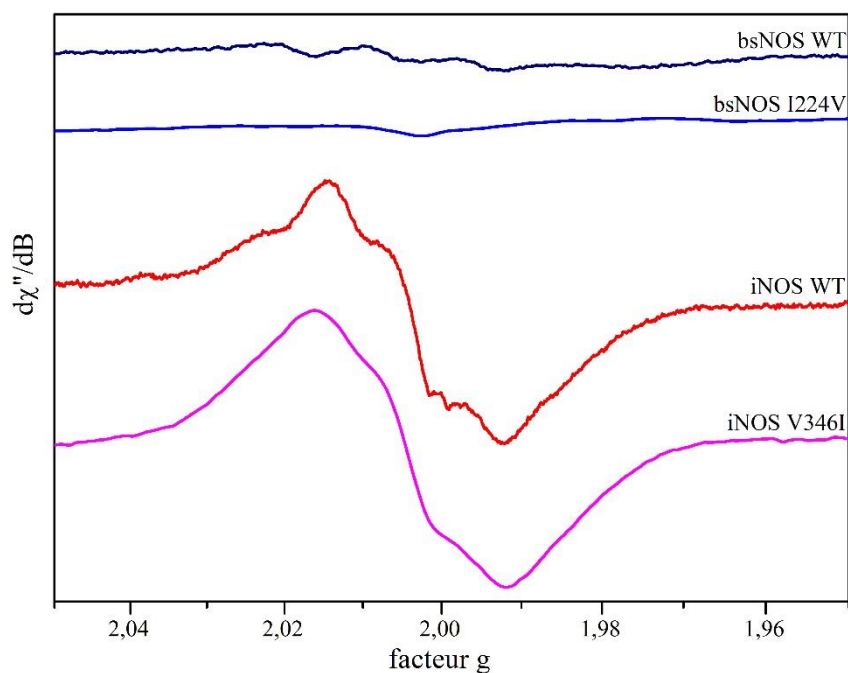


Figure 60- Spectres RPE centrés sur $g=2$ des échantillons de freeze-quench obtenus en présence de NOHA et de H_4B .
Conditions d'enregistrement typiques : fréquence 9,4GHz, température 50K, puissance micro-ondes 1mW, modulation d'amplitude 0,5mT.
Temps de piégeage : iNOS WT, 60ms (10°C) ; iNOS V346I 313ms (4°C) ; bsNOS WT, 80 ms (10°C) ; bsNOS I224V, 127ms (4°C).

Dans le cas de bsNOS, en revanche, ce résultat n'est pas surprenant, étant donné que les cinétiques du type sauvage et du mutant I224V, et en particulier les vitesses de disparition du $Fe^{II}O_2$, sont assez semblables. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer l'absence de radical dans les échantillons de *freeze-quench* de bsNOS WT [31] (*Cf.* Chapitre I) : (1) une formation du radical suivie d'une disparition rapide qui empêcherait son accumulation dans le

milieu et donc son observation ou (2) un mécanisme d'activation de l'oxygène différent de celui proposé pour les mNOS (Figure 57) qui n'impliquerait pas la formation d'un radical ptérine. Etant donné que les effets de la mutation Ile → Val sont assez faibles, il est fort probable que le mutant bsNOS I224V suive le même mécanisme catalytique que bsNOS WT. Les hypothèses permettant d'expliquer l'absence de radical ptérine chez bsNOS WT s'appliquent donc également au mutant.

L'hypothèse d'une réduction du radical ptérine trop rapide pour permettre son accumulation et sa détection permet d'expliquer les résultats de *freeze-quench* tout en conservant l'idée d'un mécanisme unique pour les NOS de mammifères et les NOS-LP bactériennes. Etant donnée sa vitesse de formation (Table 14), et compte-tenu de la concentration d'enzyme utilisée et de la sensibilité de la spectroscopie RPE, on devrait avoir une disparition du radical 8 à 10 fois plus rapide pour bsNOS WT que pour iNOS WT pour expliquer la non-observation du signal[31, 93].

Supposons dans un premier temps que, comme dans la première étape, le radical est réduit ultérieurement. Dans nos conditions expérimentales, cette réduction est nécessairement effectuée par le solvant et devrait donc procéder à la même vitesse pour les deux étapes du cycle catalytique. Comme on piège un radical ptérine chez bsNOS dans la 1^{ère} étape, on devrait donc également pouvoir le piéger dans la 2^{ème} étape, d'autant plus que sa formation est 2 à 3 fois plus rapide (Table 13 et Table 14). Cela suggère donc un mécanisme de disparition du radical ptérine spécifique à chaque étape du cycle catalytique.

Supposons maintenant qu'on a, comme pour iNOS, une réduction catalytique du radical bioptérine formé lors de l'activation de l'oxygène. Etant donné que toutes les transitions observées par *stopped-flow* sont plus lentes pour bsNOS que pour iNOS (Table 13 et Table 14), l'hypothèse d'une réduction du radical ptérine 10 fois plus rapide pour bsNOS que pour iNOS est donc peu plausible. Il est donc fort probable que iNOS et bsNOS suivent des mécanismes différents pour l'oxydation du NOHA.

La formation de Fe^{III}NO observée par *stopped-flow* indique que la réaction catalytique, et donc la réduction du Fe^{II}O₂ car ce dernier n'est pas réactif vis-à-vis du NOHA, a effectivement lieu ; on ne peut donc pas imputer l'absence de radical ptérine à l'absence de catalyse et à l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂. Il est toutefois possible que le cofacteur ptérine ne soit pas impliqué dans cette réaction. Des mécanismes incluant une activation de l'oxygène par le NOHA lui-même, suivie de la réduction nécessaire à la formation de NO[•], ont ainsi été proposés, qui expliqueraient donc l'absence de radical ptérine[16, 70, 157]. Cependant, l'absence de catalyse en présence de ptérine oxydée, plaide pour un rôle redox du cofacteur dans l'étape d'oxydation du NOHA[147]. On peut donc envisager, pour bsNOS, une réduction de Fe^{II}O₂ par le cofacteur ptérine suivie très rapidement par un transfert d'électron du NOHA au radical ainsi formé.

3.3. Influence de la nature du cofacteur

Les expériences de cinétiques rapides précédentes ont toutes été réalisées en présence du cofacteur biptérine H_4B . Cependant, si *Bacillus subtilis* possède effectivement la machinerie nécessaire à la biosynthèse de H_4B , ce n'est pas le cas de toutes les bactéries possédant une NOS[30]. Pour ces dernières, l'utilisation d'une autre ptérine, plus répandue, le tétrahydrofolate (H_4F) a été proposée, qui pourrait être le cofacteur naturel de toutes les bacNOS, y compris bsNOS[22, 28, 147]. En effet, les différentes études *in vitro* menées sur bsNOS ont été effectuées sur des protéines produites de manière hétérologue chez *Escherichia coli* et on ne peut donc pas être certain que H_4B soit bien le cofacteur naturel de cette enzyme.

Les NOS de mammifères ne fixent pas le cofacteur H_4F : leur site actif étant moins ouvert que celui des NOS bactériennes, notamment à cause de leur extension N-terminale et de l'atome de zinc situé à l'interface du dimère, elles ne peuvent accommoder la chaîne latérale du H_4F , plus volumineuse que celle de H_4B [20, 24, 72]. On a donc effectué les expériences de *stopped-flow* en présence de H_4F et d'arginine ou de NOHA, uniquement pour bsNOS WT et pour le mutant I224V.

3.3.1. Hydroxylation de l'arginine

On suit le même protocole expérimental que pour les expériences de *stopped-flow* réalisées en présence de H_4B , en remplaçant simplement ce dernier par H_4F , dans le tampon de conditionnement de la protéine. Les spectres obtenus pour bsNOS WT (gauche) et pour le mutant bsNOS I224V (droite) sont représentés Figure 61.

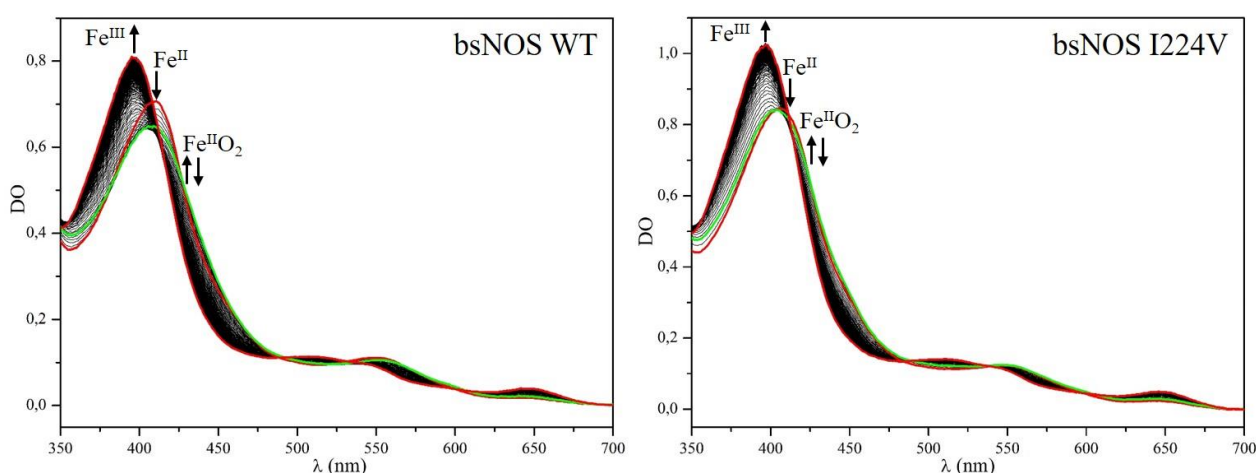


Figure 61- Spectres UV-visible obtenus lors des expériences de *stopped-flow* pour bsNOS WT (gauche) et I224V (droite), en présence d'arginine et de H_4F .

Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.

Les spectres présentant le maximum de $Fe^{II}O_2$ sont représentés en vert.

On observe, comme en présence de H₄B, un unique intermédiaire réactionnel entre le Fe^{II} initial et le Fe^{III} final : le complexe Fe^{II}O₂. Ce dernier n'est cependant visible que sur un faible nombre de spectres, pendant les premières dizaines de millisecondes. Ceci suggère que la disparition de Fe^{II}O₂ est très rapide et ne serait donc pas due à son auto-oxydation mais bien à sa réduction par le cofacteur H₄F.

Constantes cinétiques (s ⁻¹)	Fe ^{II} $\longrightarrow$	Fe ^{II} O ₂ $\longrightarrow$	Fe ^{III}
bsNOS WT	191 ± 54	25,1 ± 2,6 (0,84) 0,82 ± 0,16 (0,16)	
bsNOS I224V	≥ 100	39,9 ± 5,1 (0,74) 2,4 ± 0,4 (0,26)	

Table 15- Constantes cinétiques issues des expériences de *stopped-flow* (4°C) pour l'hydroxylation de l'arginine en présence du cofacteur H₄F.

Les valeurs reportées dans ce tableau correspondent aux moyennes (± écart-type) de 8 à 10 tirs de stopped-flow, issus de deux séries d'expériences indépendantes.

Les proportions de chaque phase sont indiquées entre parenthèses.

On note tout d'abord que la fixation du dioxygène, calculée par modélisation de la variation d'absorbance à 396nm (décroissance) et 440nm (croissance) est particulièrement rapide, et donc difficile à déterminer avec précision (Table 15). Elle est plus rapide qu'en présence de H₄B, ce qui suggère que la fixation de H₄F pourrait déformer légèrement le site actif et le rendre plus accessible au dioxygène. L'incertitude élevée sur ces valeurs de vitesse de fixation de l'oxygène ne permet pas de conclure quant à l'effet de la mutation Ile→Val.

Concernant la disparition du Fe^{II}O₂, on a modélisé les variations d'absorbance à 396nm (croissance) et 440nm (décroissance) par une double exponentielle, le résultat obtenu avec une fonction mono-exponentielle n'étant pas satisfaisant (Table 15). On retrouve toutefois, dans le cas du mutant, le point isobestique à 416nm caractéristique de la transition Fe^{II}O₂→Fe^{III}, ce qui indique qu'on n'observe pas d'intermédiaire supplémentaire (Figure 61). On aurait donc plutôt deux voies de disparition de Fe^{II}O₂ : activation de l'oxygène par le cofacteur H₄F et auto-oxydation du complexe Fe^{II}O₂. Cette hypothèse semble confirmée par l'écart entre les deux constantes cinétiques qui est de l'ordre de celui généralement observé entre les vitesses de disparition du Fe^{II}O₂ mesurées en présence et en absence du cofacteur H₄B (ou en présence d'un analogue inactif d'un point de vue redox)[24, 147].

La présence du point isobestique à 416 nm étant moins nette chez bsNOS WT, on peut envisager le passage par un intermédiaire supplémentaire, probablement un Fe^{III} dans une conformation différente de l'état final. La formation du NOHA serait donc suivie d'un réarrangement conduisant à l'état Fe^{III} HS final. Ce réarrangement contribuerait donc, avec l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂, à la phase lente de formation du Fe^{III} final.

D'après les résultats obtenus en présence de H₄B, il est toutefois peu probable que bsNOS WT et le mutant bsNOS I224V suivent deux mécanismes différents. Le fait qu'on ait, malgré tout, un point isobestique à 416nm pour le mutant ne serait donc dû qu'à la modification des rapports entre les vitesses des différentes transitions, la mutation Ile→Val accélérant les deux phénomènes à l'origine de la formation du Fe^{III} final (Table 15).

3.3.2. Oxydation du NOHA

Les spectres de *stopped-flow* obtenus en présence de NOHA et de H₄F pour bsNOS WT et I224V sont présentés Figure 62. Comme en présence de H₄B, on observe deux intermédiaires réactionnels entre le Fe^{II} initial et le Fe^{III} HS final ; les complexes Fe^{II}O₂ et Fe^{III}NO. La présence de Fe^{III}NO confirme la capacité de H₄F à supporter la production de NO[•] par bsNOS, WT et mutant I224V[147]. Les spectres de bsNOS WT et I224V sont très semblables entre eux, et à ceux obtenus en présence de H₄B.

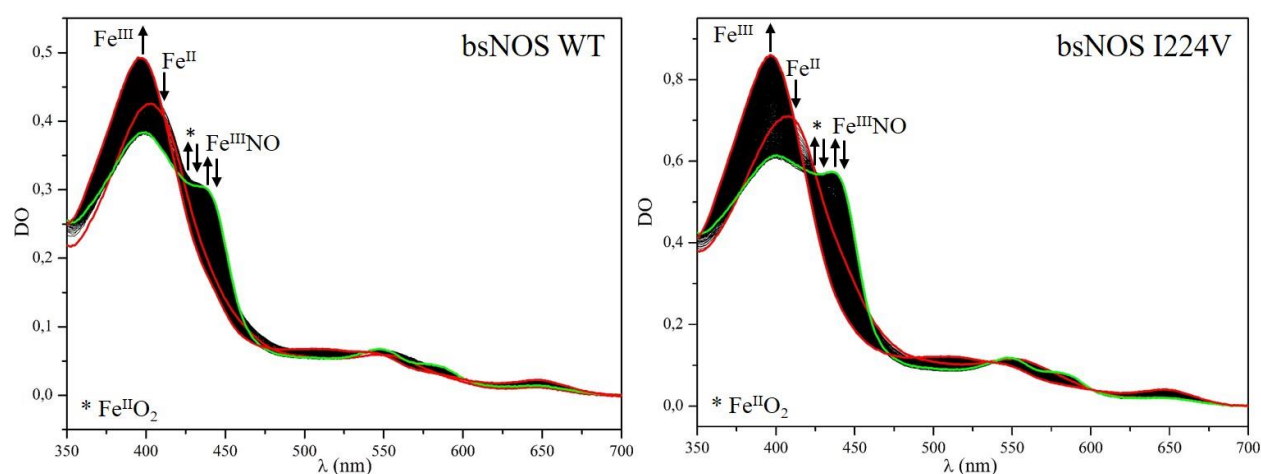


Figure 62- Spectres UV-visible obtenus lors des expériences de *stopped-flow* pour bsNOS WT (gauche) et I224V (droite), en présence de NOHA et de H₄F.

Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.

Les spectres présentant le maximum de Fe^{III}NO sont représentés en vert.

Concernant la fixation du dioxygène et la formation du Fe^{III}NO, on retrouve des vitesses, certes un peu plus élevées, mais très similaires à celles mesurées en présence de H₄B (Table 16). Comme pour la première étape, l'effet de la mutation sur la vitesse d'activation de l'oxygène est toutefois plus marqué avec le H₄F. On note également que, contrairement à ce qui a été observé en présence de H₄B pour iNOS et pour bsNOS, la vitesse de disparition du Fe^{II}O₂ en présence de NOHA est semblable, voire un peu plus faible qu'en présence d'arginine. Il semblerait donc que l'effet accélérateur du H₄F, comparé au H₄B, ne s'exerce pas (ou très peu) en présence de NOHA et que c'est majoritairement ce dernier qui détermine la vitesse de

réduction du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. L'hypothèse de l'implication directe du NOHA dans l'activation de l'oxygène, évoquée au §3.2.4, permettrait d'expliquer ce comportement.

La libération du monoxyde d'azote, quoiqu'un peu plus lente en présence de H_4F , est également peu affectée par la nature du cofacteur (Table 16). Si on considère, comme cela a été évoqué précédemment, que le dioxygène et le monoxyde d'azote empruntent le même canal, leurs vitesses de fixation et de libération, respectivement, devraient varier dans le même sens. Le ralentissement de la libération du $\text{NO}^{\bullet}$ en présence de H_4F suggère donc que ce dernier pourrait modifier, et en l'occurrence augmenter, l'affinité du $\text{NO}^{\bullet}$ pour le Fe^{III} . On aurait donc une interaction H_4F -hème légèrement différente de l'interaction H_4B -hème, ce qui est cohérent avec l'effet de la nature du cofacteur sur la réduction du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ observé en présence d'arginine.

Constantes cinétiques (s^{-1})	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$	$\longrightarrow$	Fe^{III}
bsNOS WT			$31,5 \pm 1,5$		$22,8 \pm 1,2$		$0,20 \pm 0,05$
bsNOS I224V			$43,0 \pm 5,4$		$32,8 \pm 2,4$		$0,36 \pm 0,04$

Table 16- Constantes cinétiques issues des expériences de *stopped-flow* (4°C) pour l'hydroxylation de l'arginine en présence du cofacteur H_4F .

Les valeurs reportées dans ce tableau correspondent aux moyennes ($\pm$ écart-type) de 8 à 10 tirs de *stopped-flow*, issus de deux séries d'expériences indépendantes.

Si la production de $\text{NO}^{\bullet}$ est un peu plus lente qu'en présence de H_4B , l'hydroxylation de l'arginine est en revanche nettement plus rapide ce qui suggère que, contrairement aux mNOS, bsNOS n'utiliserait pas H_4B mais H_4F comme cofacteur *in vivo*. On peut alors supposer que toutes les bacNOS utiliseraient le même cofacteur, différent de celui utilisé par les enzymes mammifères (Cf. Chapitres IV et V).

3.4. Conclusion

Pour la première étape de la catalyse, ie l'hydroxylation de l'arginine, on observe les mêmes intermédiaires réactionnels pour les quatre enzymes et on parvient également à piéger, dans tous les cas, un radical ptérine protoné H_4B^{+} . Les seules différences observées entre les WT et les mutants concernent donc les vitesses de formation et de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, ce qui correspond aussi aux différences observées entre iNOS WT et bsNOS WT. Contrairement à ce qu'on a vu sur les spectres RPE de Fe^{III} et de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, les mutations Val $\rightarrow$ Ile et Ile $\rightarrow$ Val ont, sur les cinétiques, des effets opposés. On retrouve tout de même le fait que la mutation a plus d'impact sur iNOS que sur bsNOS.

Concernant la deuxième étape, ie l'oxydation du NOHA et la production de $\text{NO}^{\bullet}$, on observe également les mêmes intermédiaires réactionnels pour les quatre enzymes. Comme pour la première étape, les mutations Val $\rightarrow$ Ile et Ile $\rightarrow$ Val ont des effets opposés sur les

cinétiques et iNOS est plus fortement impactée que bsNOS. En revanche, on ne parvient à piéger un radical ptérine que pour iNOS WT et V346I ; ce dernier est également sous forme protonée H_4B^{+} .

Dans le cas de iNOS, les données sont compatibles avec le mécanisme catalytique proposé Figure 57, et indiquent un mécanisme d'activation de l'oxygène commun aux deux étapes de la catalyse. Pour bsNOS, au contraire, on aurait deux mécanismes distincts, celui de la première étape étant identique au mécanisme catalytique de iNOS. Si on n'a que peu d'informations concernant le mécanisme d'oxydation du NOHA par bsNOS, il semblerait que le substrat et le cofacteur - dont la nature, H_4B ou H_4F , reste à confirmer - soient tous deux impliqués dans des processus redox[147, 157].

Dans tous les cas, les résultats obtenus confirment l'hypothèse d'un mécanisme catalytique différent pour les NOS bactériennes. Etant donné que les mutants suivent le même mécanisme que leurs WT respectifs, cette différence de comportement ne peut être imputée à la substitution Val/Ile, et serait plutôt la conséquence d'un ensemble de différences entre iNOS et bsNOS, réparties sur la totalité de la structure, et pas seulement dans l'environnement immédiat de l'hème.

4. Conclusion

La caractérisation des complexes Fe^{III} , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de bsNOS et iNOS WT, ainsi que des mutant bsNOS I224V et iNOS V346I, par spectroscopie d'absorption UV-visible et par RPE montre que, en absence de substrat, la mutation Val/Ile déstabilise aussi bien iNOS V346I que bsNOS I224V, comparés à leurs WT respectifs. En revanche, lorsque le substrat arginine est présent, elle n'a que très peu d'impact sur la structure du site actif et l'environnement de l'hème. L'étude des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ confirme ces résultats, ce qui suggère que l'arginine est capable de compenser la perturbation introduite par la mutation Val/Ile. Le second substrat des NO-synthases, le NOHA, permet également de stabiliser la protéine. Dans ce cas, on observe toutefois une modification de l'environnement électronique de l'hème qui suggère que la mutation Val/Ile pourrait perturber le réseau distal de liaisons hydrogène de iNOS et bsNOS.

Si les effets de la mutation sur la structure du site actif et les propriétés électroniques de l'hème sont assez subtils, cette dernière a un impact fort sur les cinétiques d'hydroxylation de l'arginine et d'oxydation du NOHA, en particulier dans le cas de iNOS. Elle ne modifie pas, en revanche, la nature des intermédiaires réactionnels observés, ce qui indique que les différences de comportement entre iNOS WT et bsNOS WT lors de la deuxième étape de la catalyse ne sont pas dues à la substitution Val/Ile conservée entre les mNOS et les bacNOS. Il s'agirait donc plutôt d'un effet global de la nature de la protéine qui impliquerait, de plus, un mécanisme réactionnel différent pour bsNOS et iNOS.

Le fait que les structures tridimensionnelles de bsNOS WT et de iNOS WT, mais également d'autres mNOS et NOS bactériennes, obtenues par cristallographie, soient extrêmement semblables, suggère qu'on aurait plutôt un effet dynamique, qui impliquerait donc l'ensemble de la protéine, et pas seulement les résidus situés dans l'environnement immédiat de l'hème. Ceci permettrait d'expliquer qu'on ait des mécanismes réactionnels différents, les bacNOS ne présentant, sur l'ensemble de leur séquence, qu'environ 40% d'homologie avec leurs homologues mammifères. Toutefois, les différentes bacNOS ne présentant qu'environ 40% d'homologie entre elles, il se pourrait donc qu'elles ne suivent pas toutes le même mécanisme réactionnel (*Cf.* Chapitre IV). Cette hypothèse serait compatible avec la grande diversité de fonctions et de modes d'action rapportés pour les quelques NOS bactériennes actuellement caractérisées (*Cf.* Chapitre I).

Chapitre IV

Etude spectroscopique et cinétique d'une NOS bactérienne originale : deiNOS.

1. Introduction

Au cours des deux dernières décennies, le séquençage massif de génomes a permis l'identification de NOS-LP dans tous les règnes du vivant, et en particulier chez plusieurs centaines de bactéries, très majoritairement Gram positives. Malgré le nombre important de bacNOS identifiées et leur répartition dans la plupart des *phyla*, seules six d'entre elles ont été clonées, produites, purifiées et partiellement caractérisées, dont cinq issues d'espèces de *Firmicutes* : *Bacillus subtilis*[24], *Bacillus anthracis*[142], *Bacillus cereus*[155], *Geobacillus stearothermophilus*[23] et *Staphylococcus aureus*[137]. Bien que certaines différences aient pu être observées et que leurs caractérisations ne soient pas complètes, ces enzymes semblent présenter des comportements assez similaires, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, ce qui n'est pas surprenant étant donnée la proximité phylogénétique de ces cinq organismes. Elles ne sont donc probablement pas représentatives de la diversité des NOS bactériennes. La sixième bacNOS à avoir été étudiée est issue de *Deinococcus radiodurans*[22] et, bien qu'elle appartienne indubitablement à la même famille d'enzymes, elle se distingue tout de même assez nettement des cinq autres bacNOS.

On note tout d'abord que *Deinococcus radiodurans* n'appartient pas au *phylum* des *Firmicutes*, mais à celui des *Deinococcus-Thermus*, et qu'elle peut se développer dans des milieux bien plus variés que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ou même *Geobacillus stearothermophilus*, puisqu'il s'agit d'une bactérie polyextrêmophile et de l'un des organismes les plus résistants connus à ce jour. Elle possède, en particulier, une extraordinaire tolérance à différents types de radiations et notamment aux rayonnements ionisants : elle peut subir une dose de 5000Gy sans perte de viabilité, ce qui correspond à environ 10 fois la dose mortelle pour *Escherichia coli* et 1000 fois celle capable de tuer un être humain[176]. Cette résistance est due en grande partie à sa formidable capacité de réparation des cassures double-brin au sein de son génome. Les mécanismes et voies de signalisation à l'origine de la résistance de *Deinococcus radiodurans* n'ont pas encore été totalement élucidés mais plusieurs études semblent toutefois indiquer que deiNOS serait impliquée dans la protection de *Deinococcus radiodurans* vis-à-vis des radiations UV et γ [162,176].

De plus, *Deinococcus radiodurans* ne possède pas la machinerie nécessaire à la biosynthèse du cofacteur H₄B[30, 135], contrairement à *Bacillus subtilis*. Cette dernière est réalisée à partir de la guanosine triphosphate (GTP) et nécessite l'intervention successive de trois enzymes : la GTP-cyclohydrolase I, la 6-pyrovoyl tétrahydroptérine synthase et la sépiaptérine réductase[227]. Or, deux d'entre elles ne possèdent pas d'homologue au sein du génome de *Deinococcus radiodurans* : la 6-pyrovoyl tétrahydroptérine synthase et la sépiaptérine réductase. Une voie alternative de biosynthèse de H₄B qui passe par la formation de sépiaptérine a été identifiée chez certaines bactéries, mais elle nécessite également l'intervention de la sépiaptérine réductase[227].

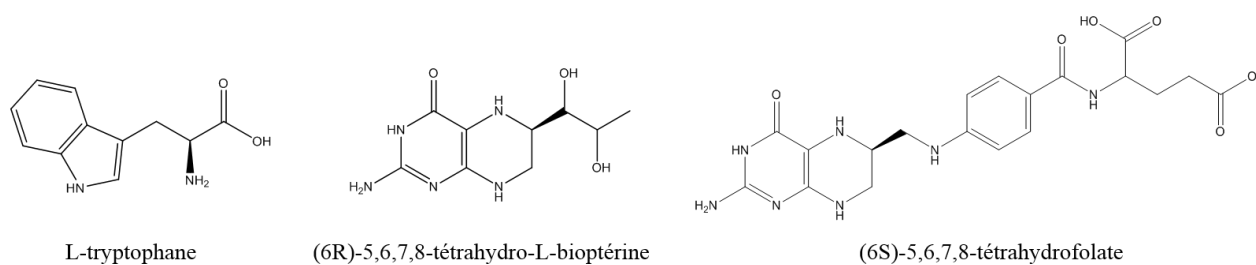


Figure 63- Formules chimiques du tryptophane (gauche) de la tétrahydrobioptérine (centre) et du tétrahydrofolate (droite).

Le remplacement du cofacteur H₄B par le tétrahydrofolate H₄F a donc été proposé pour deiNOS (Figure 63). Ce cofacteur possède le même noyau ptérine que H₄B et il a été montré, *in vitro*, qu'il possédait une bonne affinité pour deiNOS ; il permet également de supporter la production de NO[•][28]. Le tryptophane (Figure 63) a aussi été proposé comme cofacteur pour deiNOS suite à la mise en évidence de la formation d'un complexe 1:1 avec une tryptophane-ARN synthétase (TrpRSII) ; il permettrait de supporter la production de nitrites ainsi que la formation d'un produit de nitration, le 4-nitro-tryptophane[33, 34].

Malgré ces différentes études réalisées sur deiNOS, son mécanisme catalytique est très mal connu. De plus, la nature de son cofacteur et l'influence de celui-ci sur sa structure, son activité catalytique, et donc sa fonction *in vivo*, font toujours débat. On a, dans un premier temps, utilisé les spectroscopies UV-visible et RPE afin d'étudier les propriétés structurales et électroniques de son site actif, et l'influence de la nature du substrat et du cofacteur présents sur ces dernières. On s'est également intéressé au cycle catalytique de deiNOS et on a utilisé des techniques de cinétiques rapides, notamment le *stopped-flow*, afin de mieux comprendre son fonctionnement. Comme on ne dispose pas de données cristallographiques pour deiNOS, on a construit un modèle de structure tridimensionnelle afin de mieux tenter d'expliquer les différences observées par rapport à bsNOS.

2. Caractérisation

2.1. L'état Fe^{III}

La NOS de *Deinococcus radiodurans* a été produite en absence et en présence de substrat, arginine ou NOHA, et de cofacteur, H_4B , H_4F ou Trp. On a caractérisé les enzymes obtenues à l'état Fe^{III} , après purification et reconditionnement, par spectroscopie d'absorption UV-visible et par RPE.

2.1.1. En absence de substrat et cofacteur

En absence de substrat et de cofacteur, deiNOS est assez instable, même à basse température (4°C), et précipite facilement. Les échantillons obtenus et utilisés pour enregistrer les spectres de Fe^{III} présentés Figure 64 sont donc peu concentrés.

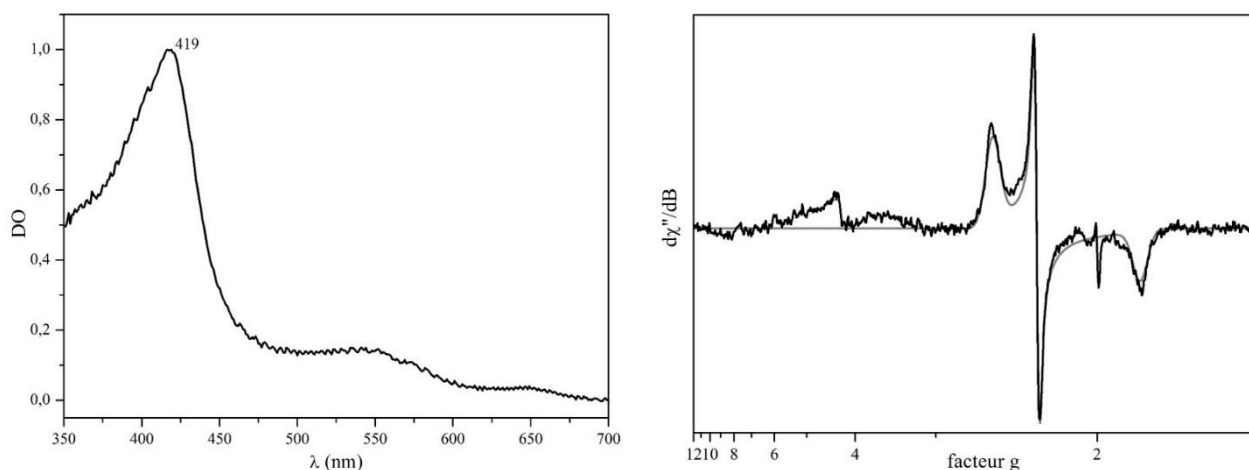


Figure 64- Spectres UV-visibles (gauche) et RPE (droite) de deiNOS purifiée en absence de substrat et de cofacteur. Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10% ; chemin optique 1cm. Le spectre est normalisé. Conditions d'enregistrement RPE : fréquence 9,49GHz, température 10K, puissance micro-onde 0,25mW, amplitude de modulation 2mT. Le spectre est normalisé. Le spectre simulé est représenté en gris.

Le spectre UV-visible (Figure 64, gauche) présente un maximum d'absorption à 419nm, caractéristique d'un Fe^{III} majoritairement dans l'état bas-spin, en absence d'imidazole[22, 80,202]. Ce résultat est confirmé par la spectroscopie RPE (Figure 64, droite) : on observe un signal rhombique autour de $g=2,29$. L'absence de pic à bas champ (valeur de g élevée) indique qu'il n'y a pas de Fe^{III} haut-spin : le fer hémique est hexacoordonné et une molécule d'eau constitue très probablement le ligand distal. Le site actif de deiNOS est donc probablement assez ouvert et exposé au solvant ce qui déstabilise la protéine. Ce comportement est différent de celui observé pour les autres bacNOS étudiées et ressemble davantage à celui des mNOS[22, 24, 79, 80, 183,228] (Cf. Chapitres III et V).

2.1.2. Conversion en Fe^{III} haut-spin

On s'est ensuite intéressé aux enzymes purifiées et reconditionnées en présence de substrat et de cofacteur. Le reconditionnement permet, d'une part, d'éliminer l'imidazole utilisé en grande quantité (300mM) pour la purification et présent au sein du site actif et de le remplacer par le substrat, et, d'autre part, de saturer l'enzyme en cofacteur H₄B ou H₄F.

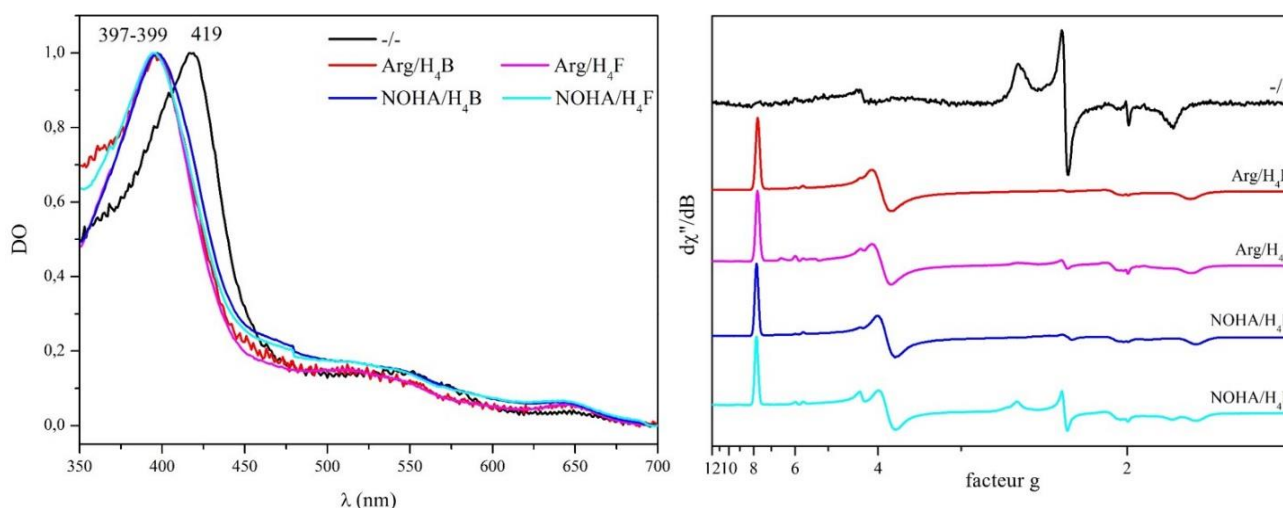


Figure 65- Spectres UV-visibles (gauche) et RPE (droite) du complexe Fe^{III} en absence et en présence de substrat (Arg ou NOHA) et de cofacteur (H₄B ou H₄F).

Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, H₄F ou H₄B 500μM, DTT 3mM, Arg 5mM ou NOHA 500μM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés.

Conditions d'enregistrement RPE (sauf -/-, Cf. Figure 64) : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW, amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés.

Sur les spectres UV-visible (Figure 65, gauche), la bande de Soret à 394-397nm nous indique que, dans tous les cas, on a bien un Fe^{III} très majoritairement dans l'état HS et que les enzymes sont donc *a priori* fonctionnelles[80, 81,202]. L'ajout du substrat et du cofacteur permet donc de déplacer la molécule d'eau distale et de stabiliser l'enzyme, qui peut alors être davantage concentrée. On note tout de même que les spectres RPE des complexes Fe^{III} de deiNOS présentent un signal vers g=2,29 qui indique la présence de Fe^{III} BS (Figure 65, droite), en particulier celui enregistré en présence de NOHA et H₄F (Figure 65, droite, spectre cyan) sur lequel les trois valeurs de g du Fe^{III} BS sont visibles. Ces résultats suggèrent un site actif plus accessible au solvant en présence de H₄F que de H₄B.

2.1.3. Influence des substrats- Cas de la citrulline

Bien que les quatre combinaisons substrat/cofacteur utilisées dans le cadre de cette étude permettent effectivement une conversion du Fe^{III} BS en Fe^{III} HS, on peut néanmoins observer certaines différences sur les spectres RPE (Figure 66).

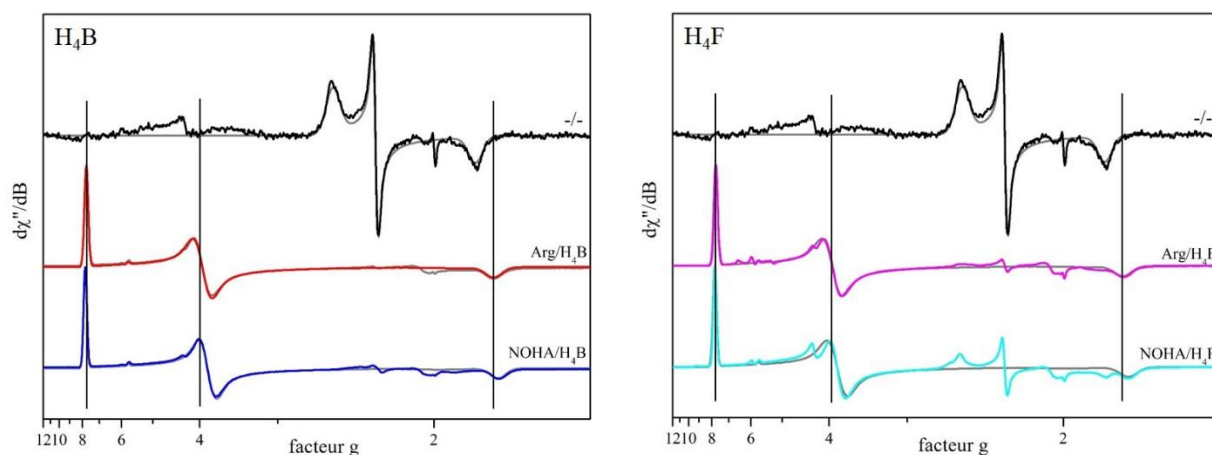


Figure 66- Influence de la nature du substrat, Arg (rouge) ou NOHA (bleu), et du cofacteur, H4B (gauche) ou H4F (droite), sur les spectres RPE de Fe^{III} .

Conditions d'enregistrement (sauf -/-, Cf. Figure 64) : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW, amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés.

Les spectres simulés sont représentés en gris.

Les barres verticales marquent la position des raies des spectres enregistrés en présence d'arginine.

Les spectres enregistrés en présence d'arginine et de NOHA ne sont pas superposables, que ce soit en présence de H4B (Figure 66, gauche) ou de H4F (Figure 66, droite). Comme pour les autres NOS caractérisées, bacNOS ou mNOS[31, 146, 156] (Cf. Chapitres III et V), les spectres en présence de NOHA sont plus anisotropes que ceux en présence d'arginine (Table 17). On note, de plus, que l'anisotropie est plus importante chez deiNOS que chez n'importe laquelle des autres bacNOS actuellement caractérisées[31, 146, 156].

deiNOS	g_1^{eff} ($g_{1\text{sim}}$)	g_2^{eff} ($g_{2\text{sim}}$)	g_3^{eff} ($g_{3\text{sim}}$)	E/D
Arg/H4B	7,76 (2,001)	3,96 (2,000)	1,77 (1,982)	0,087
Arg/H4F	7,76 (2,001)	3,96 (2,001)	1,77 (1,984)	0,087
NOHA/H4B	7,83 (2,013)	3,88 (2,008)	1,76 (1,980)	0,091
NOHA/H4F	7,85 (2,009)	3,84 (2,002)	1,75 (1,985)	0,091

Table 17- Paramètres RPE des complexes de Fe^{III} HS en présence de substrat et de cofacteur.

Les valeurs de g^{eff} sont mesurées directement sur les spectres.

Les valeurs de E/D sont obtenues par simulation.

Les valeurs de g utilisées pour les simulations sont indiquées entre parenthèses.

La nature du cofacteur, en revanche, n'a que très peu d'influence sur la position des raies. En effet, les paramètres obtenus pour les deux spectres enregistrés en présence d'arginine sont identiques. On note toutefois qu'en présence de NOHA, on a des valeurs de g effectives légèrement différentes selon la nature du cofacteur. Bien que le substrat soit déterminant, on ne peut donc pas exclure une légère modification de l'environnement de l'hème selon que H₄B ou H₄F soit présent, qui ne serait détectable qu'en présence de NOHA. L'effet de l'arginine sur la structure du site actif et l'environnement électronique de l'hème serait, quant à lui, prédominant et occulterait donc celui du cofacteur.

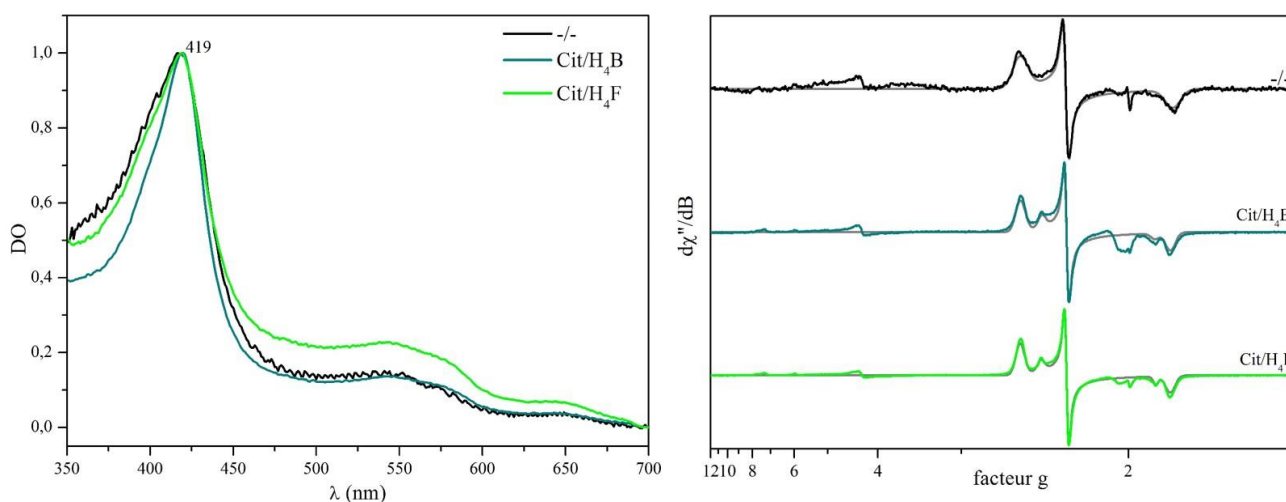


Figure 67 - Spectres UV-visible (gauche) et RPE (droite) du Fe^{III} en présence du produit citrulline et du cofacteur H₄B ou H₄F.

Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, H₄F ou H₄B 500μM, DTT 3mM, Cit 200mM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés.

Conditions d'enregistrement RPE (sauf -/-, Cf. Figure 64) : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 16μW, amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés.

Les spectres simulés sont représentés en gris.

On a également caractérisé l'état natif Fe^{III} en présence de cofacteur et de citrulline, le produit final de la réaction catalysée par les NO-synthases. L'ajout de citrulline au sein du site actif conduit à la formation d'un complexe Fe^{III} BS dont le spectre UV-visible présente un maximum à 417nm, que ce soit en présence de H₄B ou de H₄F (Figure 67, gauche). De même, les spectres RPE des deux complexes sont pratiquement identiques : on observe un mélange de deux espèces de Fe^{III} BS (Figure 67, droite). L'espèce majoritaire est identique pour les complexes préparés en présence de H₄B ou H₄F, et très semblable à celle observée en absence de substrat et de cofacteur (Table 18), avec toutefois des raies plus fines, qui indiquent que l'enzyme est plus rigide, et la structure mieux définie. La présence d'une seconde espèce minoritaire montre que deux conformations coexistent en solution, probablement dues à deux positions différentes de la citrulline au sein du site actif.

deiNOS	g_1	g_2	g_3	%
-/-	2,564	2,294	1,843	100%
Cit/H ₄ B	2,552	2,284	1,846	83%
	2,420		1,900	17%
Cit/H ₄ F	2,554	2,283	1,846	83%
	2,425		1,897	17%

Table 18- Paramètres RPE des complexes de Fe^{III} LS, obtenus par simulation.

On retrouve donc le fait que la nature du ligand présent au sein du site actif détermine presque exclusivement l'état de spin et la position des raies sur le spectre RPE, avec le NOHA ayant un effet moins prononcé que l'arginine, qui permet donc de détecter des modifications plus subtiles de l'environnement hémique (Cf. Chapitre III).

2.1.4. Influence de la nature du cofacteur - Cas du tryptophane

Suite à la découverte d'une forte interaction *in vivo* entre deiNOS et la TrpRSII, le tryptophane a été proposé comme cofacteur possible [33, 34] : il pourrait s'insérer au sein du site de fixation de la ptérine et être stabilisé grâce à une interaction π - π avec un résidu tryptophane (Trp308) et former, comme H₄B et H₄F, une liaison hydrogène avec la sérine 307 (voir §4.1, Figure 87). On a donc produit et purifié deiNOS en présence de Trp et d'arginine.

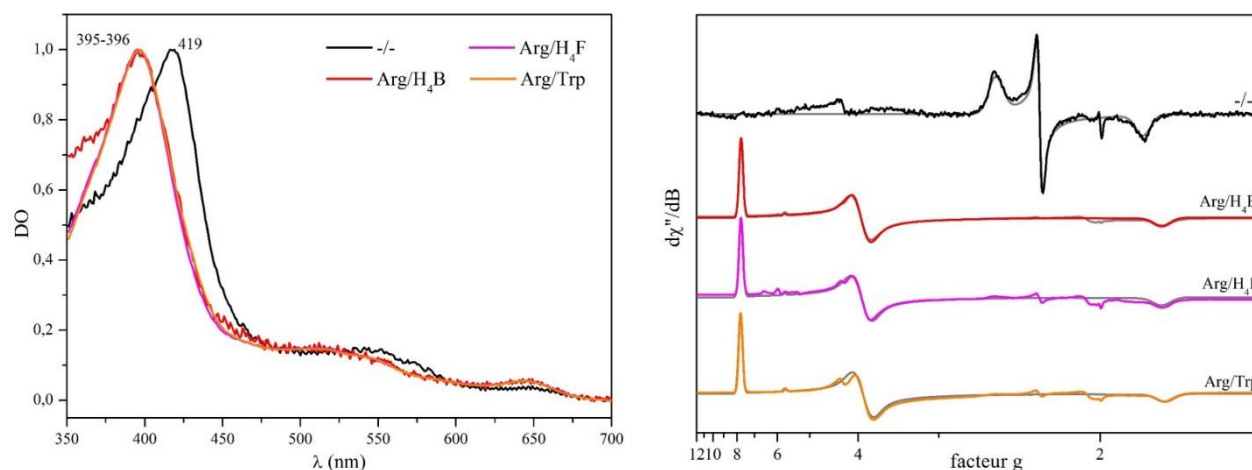


Figure 68- Spectres UV-visible (gauche) et RPE (droite) du Fe^{III} en absence et en présence d'Arg et de H₄B, H₄F, ou Trp. Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, H₄F ou H₄B 500μM ou Trp 20mM, DTT 3mM, Arg 5mM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés. Conditions d'enregistrement RPE (sauf -/-, Cf. Figure 64) : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW, amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.

Les spectres UV-visible et RPE de l'état natif Fe^{III} nous indiquent que, comme en présence des cofacteurs H₄F et H₄B, on forme, en présence d'arginine et de tryptophane, un Fe^{III} presque exclusivement HS (Figure 68, spectres jaunes). Si les valeurs de g effectives mesurées sur le spectre ne sont pas exactement les mêmes qu'avec H₄B ou H₄F, ces différences demeurent très faibles et ne se traduisent pas par une variation du paramètre E/D obtenu par simulation (Table 19). Il semblerait donc que le Trp permette de stabiliser deiNOS dans une conformation très semblable à celle observée avec H₄B et H₄F, ce qui suggère qu'il occuperait effectivement le site de fixation du cofacteur ptérine. Etant donné que le tryptophane possède également des propriétés redox, il serait donc correctement positionné au sein du site actif pour participer au transfert d'électron nécessaire à l'activation de l'oxygène. Le potentiel redox du complexe Fe^{II}O₂ n'ayant pas été déterminé, on ne peut toutefois pas savoir *a priori* s'il peut effectivement être réduit par le tryptophane.

deiNOS	g_1^{eff} ($g_{1\text{sim}}$)	g_2^{eff} ($g_{2\text{sim}}$)	g_3^{eff} ($g_{3\text{sim}}$)	E/D
Arg/H ₄ B	7,76 (2,001)	3,96 (2,000)	1,77 (1,982)	0,087
Arg/H ₄ F	7,76 (2,001)	3,96 (2,001)	1,77 (1,984)	0,087
Arg/Trp	7,78 (1,990)	3,92 (1,990)	1,77 (1,990)	0,087

Table 19- Paramètres RPE des complexes de Fe^{III} HS en présence d'Arg et de H₄B, H₄F, ou Trp.

Les valeurs de g^{eff} sont mesurées directement sur les spectres.

Les valeurs de E/D sont obtenues par simulation.

Les valeurs de g utilisées pour les simulations sont indiquées entre parenthèses.

2.2. Complexe Fe^{II}CO

Pour chaque condition de purification et de reconditionnement, on a préparé un complexe Fe^{II}CO dont les spectres d'absorption UV-visible sont présentés Figure 69. On retrouve, dans tous les cas, la bande de Soret à 445nm, caractéristique des complexes Fe^{II}CO de NOS[22, 24, 27,206]. On observe également un épaulement, voire un second maximum, vers 420nm, qui correspond à un complexe dégradé[205]. Sur certains spectres, il représente une proportion non négligeable du signal total ce qui suggère qu'on aurait une protéine assez fragile et une liaison thiolate moins robuste que celle de bsNOS ou gsNOS (*Cf.* Chapitres III et V).

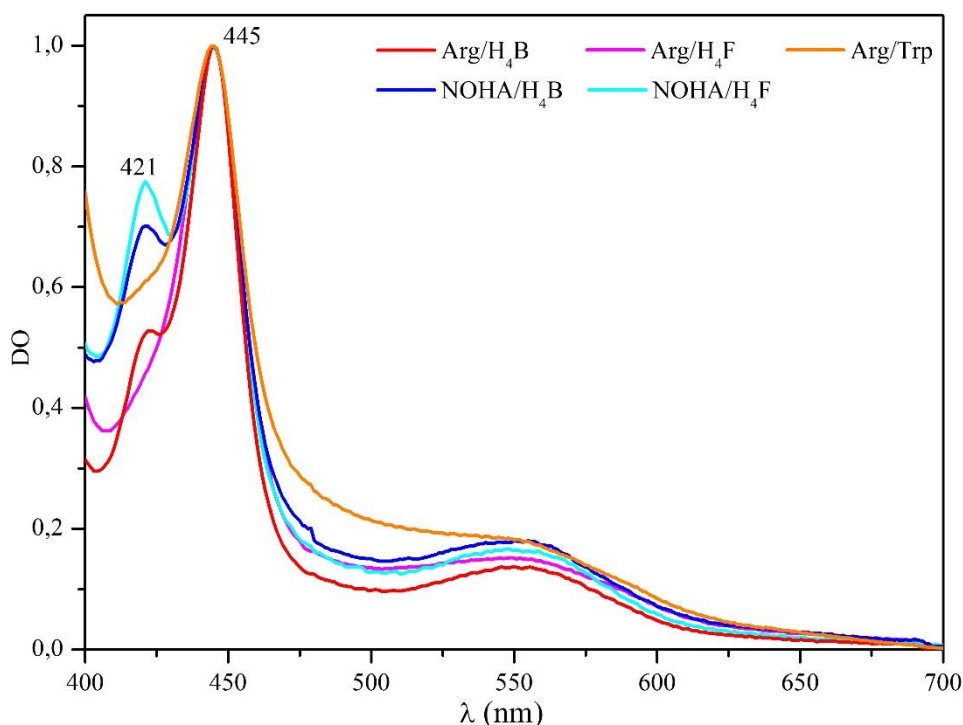


Figure 69 - Spectres UV-visibles des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ en présence de substrat et de cofacteur.
Conditions expérimentales: tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, H_4F ou H_4B 500 μM ou Trp 20mM, DTT 3mM, Arg 5mM ou NOHA 500 μM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés.

Dans le cas du tryptophane (spectre orange), on n'a qu'un léger épaulement vers 420nm, mais on note une dérive de la ligne de base en fonction de la longueur d'onde, caractéristique d'une contribution importante de la diffusion à la densité optique totale, qui indique qu'une partie de la protéine a précipité et suggère donc que Trp ne serait finalement pas aussi efficace que H_4B ou H_4F pour stabiliser de*n*OS, même en présence d'arginine.

2.3. Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$

Les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ sont fréquemment utilisés pour sonder le site actif des hémoprotéines, et en particulier des NO-synthases[213,216] ; ils sont particulièrement sensibles à l'environnement structural et électronique de l'hème et permettent de mettre en évidence des modifications subtiles de ce dernier (*Cf.* Chapitre III). On a donc préparé des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de de*n*OS, en présence d'arginine, de NOHA ou de citrulline et de cofacteur H_4F et H_4B . Comme pour les Fe^{III} , on s'est également intéressé au complexe saturé en arginine et Trp.

2.3.1. Influence des substrats - Cas de la citrulline

Pour les NO-synthases, il a été montré que la nature du ligand au sein du site actif était déterminante pour l'allure du spectre et la position des raies[213,214]. Concernant les complexes préparés en présence d'arginine et de H₄B (Figure 70, gauche, spectre rouge) ou de H₄F (Figure 70, droite, spectre magenta), on a des spectres assez semblables à ceux généralement observés pour les NOS[146, 213,216]. On retrouve, en effet, un spectre rhombique où les trois valeurs de g sont nettement séparées et où le couplage hyperfin avec le noyau ¹⁴N du NO[•] est entièrement résolu. Les valeurs de g et les constantes de couplage (Table 20) sont très proches de celles mesurées pour iNOS ou bsNOS (Cf. Chapitre III)[146,216].

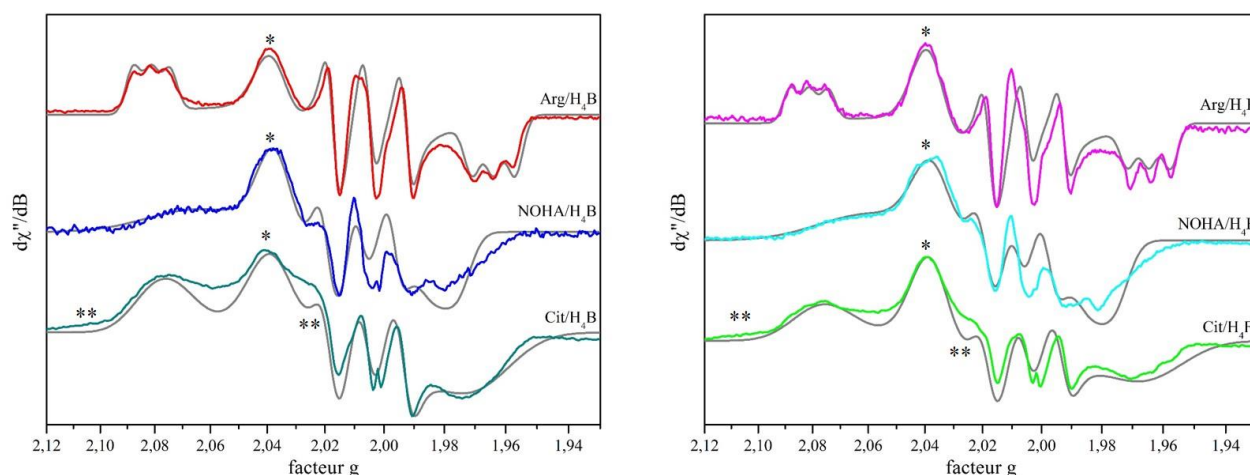


Figure 70- Spectre RPE des complexes Fe^{II}/NO en présence d'arginine (rouge), de NOHA (bleu) ou de citrulline (vert) et de cofacteur H₄B (gauche) ou H₄F (droite).

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 40K, puissance micro-onde 63μW, amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.

* espèce axiale minoritaire.

** Fe^{II}/NO pentacoordonné.

On retrouve également l'allure attendue pour les spectres des complexes saturés en NOHA et en H₄B (Figure 70, gauche, spectre bleu) ou H₄F (Figure 70, droite, spectre cyan), avec une diminution de l'anisotropie et une perte de résolution du couplage hyperfin, comparé aux complexes préparés en présence d'arginine. Pour ce dernier, on trouve, par simulation, une valeur légèrement plus faible qu'en présence d'arginine, avec un écart plus important que pour iNOS et bsNOS. Concernant l'anisotropie du spectre, l'effet du NOHA est nettement plus important que pour bsNOS, et les spectres de deiNOS ressemblent davantage à ceux des NOS de mammifères, et en particulier de la NOS inductible (Cf. Chapitre III).

Il est important de noter qu'en présence de substrat et de cofacteur, on ne détecte pas de Fe^{II}/NO pentacoordonné, ce qui indique que la liaison thiolate est maintenue, malgré la réduction par le dithionite puis l'ajout de fortes concentrations de NO[•] nécessaires à la préparation du complexe, contrairement à ce qu'on observe sur les spectres de Fe^{II}/CO. On peut expliquer cette

différence par le fait que l'ajout de dithionite est rapide et non contrôlé lors de la préparation des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$. On a donc une variation importante du pH local qui peut être à l'origine de la rupture partielle de la liaison fer-soufre.

Substrat/Cofacteur	Espèce rhombique majoritaire				Espèce axiale supplémentaire		
	g_1 $A_1(\text{MHz})$	g_2 $A_2(\text{MHz})$	g_3 $A_3(\text{MHz})$	%	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	%
Arg/ H_4B	2,081 30	2,005 58	1,965 33	93%	2,036	2,014	7%
Arg/ H_4F	2,081 29	2,005 59	1,964 33	87%	2,036	2,014	13%
NOHA/ H_4B	2,068 17	2,008 54	1,980 25	87%	2,035	2,014	13%
NOHA/ H_4F	2,063 18	2,009 50	1,980 25	88%	2,035	2,014	12%
Cit/ H_4B	2,073 30	2,005 58	1,969 30	89%	2,035	2,014	11%
Cit/ H_4F	2,075 30	2,005 55	1,965 30	87%	2,035	2,014	13%

Table 20- Paramètres RPE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, obtenus par simulation.

Suite à l'étude du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ obtenu en présence d'arginine et de H_4F , la valeur de $g_{\parallel}$ de l'espèce axiale a été fixée à 2,014 pour ces simulations. Etant données sa position et la faible proportion de l'espèce axiale, des variations de l'ordre de 10^{-3} autour de cette valeur n'ont que très peu d'effet sur l'allure du spectre simulé.

Enfin, on s'est intéressé aux complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ préparés en présence de citrulline et de cofacteur H_4B (Figure 70, gauche, spectre vert) ou de H_4F (Figure 70, droite, spectre vert). Bien que ces derniers soient un peu déformés, on retrouve l'allure attendue pour des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ avec des spectres rhombiques dont les trois valeurs de g sont suffisamment distinctes pour être mesurées et simulées ; elles sont intermédiaires entre celles obtenues en présence d'arginine et celles obtenues en présence de NOHA (Table 20). On a donc trois positions ou environnements distincts du NO^* , selon la nature du ligand présent au sein du site actif. Concernant le couplage hyperfin avec le noyau ^{14}N du NO^* , on a une résolution un peu meilleure en présence de H_4F que de H_4B , ce qui suggère une protéine mieux repliée, ou plus rigide. Les constantes de couplage mesurées sur la raie centrale sont du même ordre que celles obtenues en présence des substrats. On note également la présence de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné (**) dû à la rupture de la liaison thiolate ce qui indique que contrairement à l'arginine ou au NOHA, la citrulline ne permet pas de maintenir l'intégrité du site actif lors des traitements nécessaires à la préparation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$.

On remarque enfin que, dans tous les cas, on observe très nettement la seconde espèce axiale (*), souvent présente sur les spectres de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ d'hémoprotéines[211-220, 229,230]. Elle

est ici suffisamment marquée pour être prise en compte dans les simulations, même si elle ne représente que 7% à 13% du signal total, sur les spectres présentés Figure 70. Bien qu'elle soit généralement plus importante chez deiNOS que chez les autres NOS actuellement caractérisées, la proportion d'espèce axiale peut varier d'un échantillon à l'autre (Cf. §2.3.3).

2.3.2. Influence de la nature du cofacteur - Cas du tryptophane

On a également cherché à savoir si on pouvait, grâce aux complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, détecter une influence de la nature du cofacteur sur l'environnement de l'hème.

Comme pour les complexes de Fe^{III} , on n'observe aucune différence entre les spectres des complexes saturés en H_4B et H_4F , lorsque l'arginine est aussi présente. En revanche, le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ préparé en présence d'arginine et de tryptophane est très différent des autres (Figure 71, spectre jaune). Il correspond pratiquement à un spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné (**) pur ; on ne peut cependant pas exclure la présence d'une faible proportion d'espèce axiale (*). La présence d'un signal de cuivre important ne permet pas de simuler correctement ce spectre. Etant donné que la protéine précipite fortement lors de la préparation des échantillons saturés en tryptophane, on peut en déduire que le spectre présenté Figure 71 est probablement celui d'un complexe au moins partiellement dégradé. On retrouve donc le fait que le tryptophane ne permet pas de stabiliser convenablement deiNOS, contrairement à H_4F et H_4B , bien que ce dernier ne puisse en aucun cas être son cofacteur naturel.

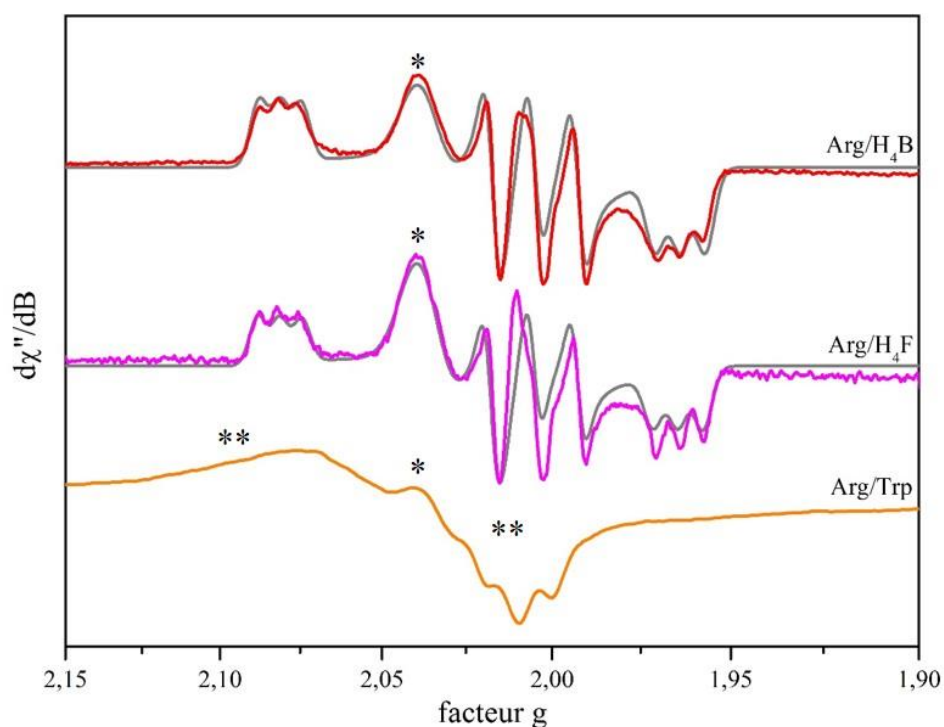


Figure 71 - Spectres RPE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence d'arginine et de cofacteur H_4B , H_4F , ou Trp. Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 40K, puissance micro-onde $63\mu\text{W}$ amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.
 * espèce axiale minoritaire.
 ** $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné.

Concernant les spectres des complexes saturés en NOHA, on remarque une légère diminution de la valeur de g_1 en présence de H_4F , comparé à H_4B , ce qui suggère qu'on aurait un effet de la nature du cofacteur sur l'environnement distal de l'hème, qui serait plus marqué en présence de NOHA que d'arginine (Table 20). Ce résultat est cohérent avec ce qu'on observe sur les spectres de Fe^{III} , et on peut envisager que la chaîne latérale assez encombrante du H_4F lui impose une position différente de celle adoptée par H_4B , qui pourrait se traduire par une modification du réseau de liaisons hydrogène. On note également de faibles variations entre les complexes saturés en H_4B et H_4F , en présence de citrulline, en particulier sur la valeur de g_3 .

2.3.3. Etude de l'espèce axiale

2.3.3.1. Caractérisation des espèces rhombique et axiale

Comme évoqué précédemment, deiNOS semble avoir une forte propension à former, en plus de l'espèce rhombique majoritaire, une seconde espèce de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, en particulier en présence d'arginine et de H_4F . Cette dernière possède un spectre RPE axial dont seul le g perpendiculaire est généralement observé expérimentalement vers 2,04. Dans le cas de deiNOS, on a ainsi obtenu des échantillons dont la plupart contiennent un mélange des espèces axiale et rhombique dans diverses proportions (Figure 72, spectre violet). On a, en particulier, obtenu un échantillon contenant uniquement l'espèce axiale (Figure 72, spectre rouge), et un échantillon contenant uniquement l'espèce rhombique (Figure 72, spectre bleu). On ne sait toutefois pas ce qui conditionne la formation de l'une ou l'autre de ces espèces, ces différents échantillons ayant été obtenus à partir du même lot de production de protéines et en suivant le même protocole.

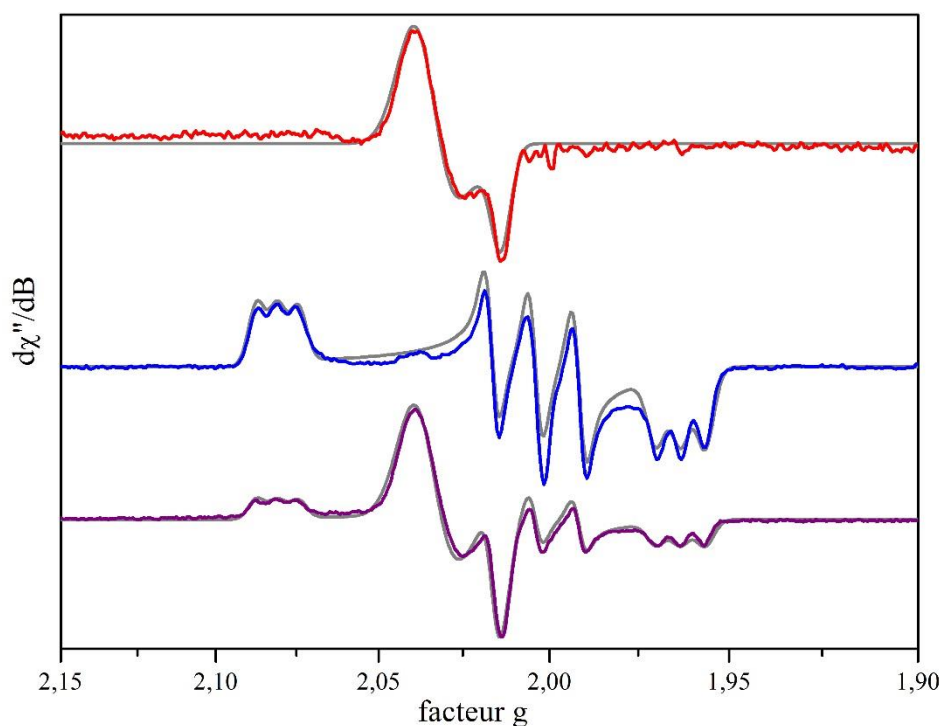


Figure 72 - Spectres RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence d'arginine et de H_4F .

Différents échantillons ont été obtenus, qui contiennent l'espèce axiale pure (rouge), l'espèce rhombique pure (bleu) ou un mélange des deux (violet).

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 40K, puissance micro-onde 0,25mW amplitude de modulation 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris. La simulation du spectre du mélange est une combinaison linéaire des deux autres.

On a donc pu simuler séparément ces deux espèces et obtenir ainsi des valeurs de g plus précises que pour les spectres de mélange. Le fait que le spectre de mélange puisse être parfaitement bien simulé par une combinaison linéaire des simulations obtenues pour les deux

spectres pris séparément indique qu'il s'agit bien des mêmes espèces et qu'elles coexistent en solution. La forte proportion d'espèce axiale obtenue pour certains échantillons montre également que celle-ci correspond bien à un complexe hémique et non pas à un complexe formé avec le fer libre généralement présent en faible quantité dans les échantillons.

deiNOS Arg/H ₄ F	g ₁ A ₁ (MHz)	g ₂ A ₂ (MHz)	g ₃ A ₃ (MHz)	%	g	g _⊥	%
axiale	-	-	-		2,014	2,036	
rhombique	2,081 30	2,004 59	1,963 32		-	-	
mélange	2,081 30	2,004 59	1,963 32	69%	2,014	2,036	31%

Table 21- Paramètres RPE des espèces rhombique et axiale du complexe Fe^{II}NO en présence d'arginine et de H₄F. Il s'agit des échantillons dont les spectres sont présentés Figure 72.

De nombreux échantillons du complexe Fe^{II}NO de deiNOS ont été préparés en présence d'arginine et de H₄F pour tenter de déterminer les facteurs contrôlant cette répartition, les trois spectres présentés Figure 72 ayant été préparés en suivant, *a priori*, le même protocole expérimental. On s'est tout d'abord intéressé à la réduction du Fe^{III} en Fe^{II}. On a ainsi préparé des complexes en effectuant une réduction lente et progressive par ajouts successifs de très petits volumes de solution de dithionite, ou, au contraire en ajoutant rapidement une quantité importante de dithionite, ce qui crée une concentration locale élevée. Cette dernière conduit à une précipitation partielle de la protéine, mais on n'a pas observé de variation significative et reproductible de la proportion d'espèce axiale. La nature du réducteur utilisé ainsi que sa présence ou non en excès ne semblent pas non plus modifier la répartition entre les deux espèces de Fe^{II}NO. De même, la quantité de NO[•] ajoutée, son mode d'ajout (ajout d'une solution saturée ou bullage de NO[•] gaz directement dans la solution de NOS réduite), et le moment où on l'ajoute (avant ou après la réduction du fer) impactent la stabilité de l'enzyme et le rendement de complexe obtenu, mais on n'observe pas de corrélation avec la proportion d'espèce axiale. Enfin, on a préparé des échantillons qu'on a ensuite laissé évoluer à température ambiante (toujours sous atmosphère inerte) entre 1 minute (temps nécessaire au transfert de l'échantillon dans un tube RPE et à sa congélation) et 20 minutes. Le complexe est stable sur ce laps de temps puisqu'on ne détecte pas de Fe^{III} et que la protéine ne semble pas précipiter ; on n'a pas d'évolution du ratio entre l'espèce axiale et l'espèce rhombique. Si on a ainsi pu éliminer un certain nombre de possibilités, on ne connaît pas, à ce jour, les facteurs qui gouvernent la répartition entre ces deux espèces de Fe^{II}NO.

2.3.3.2. Etude en température

Des études en température ont déjà été menées sur des échantillons de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ contenant un mélange de l'espèce rhombique et de l'espèce axiale, aussi bien pour des NOS que pour d'autres hémoprotéines[211-220, 229,230]. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les changements observés avec la température : la conversion progressive de l'espèce rhombique en l'espèce axiale ou l'existence de deux espèces distinctes qui évoluent toutes deux avec la température, mais de manière indépendante. Etant donné qu'on a ici une anisotropie de g importante, due au ligand cystéine, et une proportion élevée d'espèce axiale, on peut suivre de manière assez précise l'évolution des spectres de l'espèce rhombique et de l'espèce axiale. On a ainsi enregistré des spectres RPE de l'échantillon présenté Figure 72, entre 10K et 220K (Figure 73).

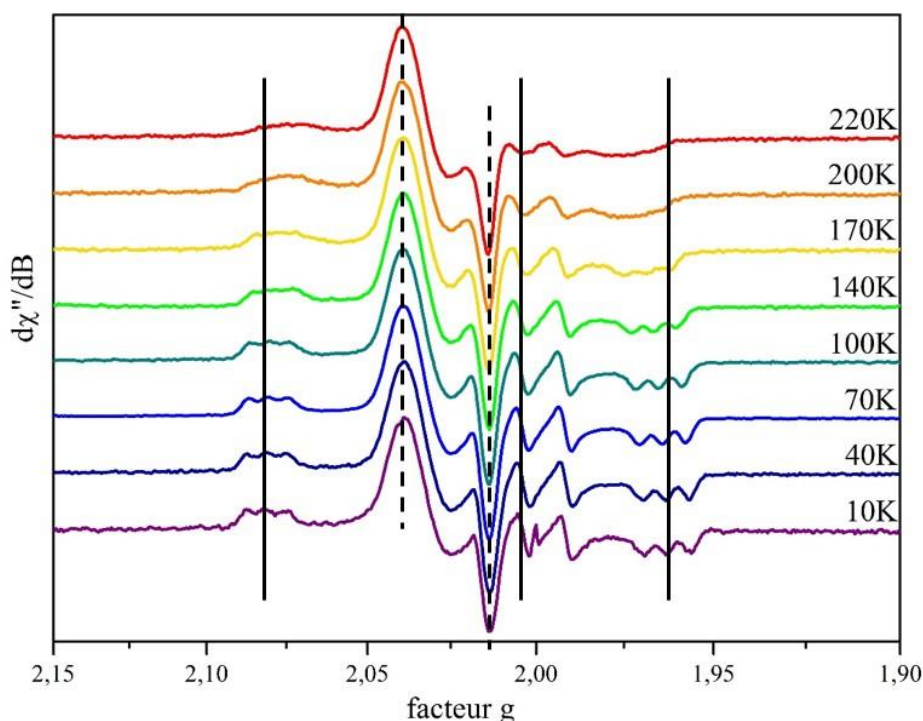


Figure 73 - Evolution du spectre RPE du mélange axiale/rhombique du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ (Arg/ H_4F) en fonction de la température.

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, amplitude de modulation 2mT. La puissance micro-ondes est adaptée de façon à optimiser le rapport signal/bruit pour chaque température.

Les spectres sont normalisés.

Les traits pleins marquent les positions des raies de l'espèce rhombique à 10K, les pointillés, celles de l'espèce axiale.

Il n'y a pas de différence entre le spectre enregistré à 10K et celui enregistré à 40K. A partir de 70K, l'anisotropie de l'espèce rhombique commence à diminuer, puis on a une augmentation progressive de la largeur de raies qui conduit à une perte de la résolution du couplage hyperfin. Cette évolution est due aux mouvements du NO^* (rotation, variation de l'angle Fe-N-O et de la longueur de la liaison Fe-N), rendus possibles par l'augmentation de la

température. L'espèce axiale au contraire ne semble que peu affectée par l'augmentation de la température : on n'observe qu'un faible déplacement des pics et le signal ne semble pas s'élargir. C'est probablement cette différence de comportement entre les deux espèces qui a conduit à proposer l'hypothèse d'une conversion de l'espèce rhombique en l'espèce axiale avec la température[215], ce qui n'est, ici, clairement pas le cas. On a donc bien deux espèces distinctes qui évoluent de manière indépendante entre 10K et 220K et suivent toutes deux une loi de Curie[216].

Pour les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ des NOS, la nature du ligand présent au sein du site actif a un impact très fort sur le spectre de l'espèce rhombique, alors que celui de l'espèce axiale semble peu affecté. On peut proposer qu'elle correspondrait à une conformation dans laquelle le NO^+ n'interagirait pas avec le groupement (hydroxy-)guanidinium du substrat. Etant donnée la proximité entre le substrat et aussi bien l'azote que l'oxygène du NO^+ , dans les structures cristallographiques[221-223], cette absence d'interaction n'est envisageable qu'en considérant une conformation alternative du substrat, dans laquelle le motif guanidinium ne pointerait pas vers l'hème. Cependant, une telle conformation serait incompatible avec l'oxydation du substrat et n'a jamais été observée expérimentalement. Ce spectre axial ne correspond pas non plus à un $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné puisque ce dernier est caractérisé, notamment par un signal vers $g=2,1$ et possède un couplage hyperfin partiellement résolu (*Cf.* Chapitre III Figure 45). Une espèce hémique de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ connue présentant un spectre axial est le complexe formé avec l'hémine libre en solution aqueuse qui correspond probablement à un complexe hexacoordonné dans lequel le sixième ligand est une molécule d'eau[216]. Son spectre est tout de même beaucoup plus large, probablement à cause de l'absence de protéine qui confère une grande liberté de mouvement au complexe, et ses valeurs de g sont assez éloignées de celles du complexe de deiNOS. On ne peut toutefois pas exclure la possibilité d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ qui posséderait une molécule d'eau comme ligand proximal, suite à la rupture de sa liaison thiolate et dont le spectre serait fortement modifié par l'environnement protéique, comparé à celui de l'hémine libre.

2.3.3.3. RPE multi-fréquence

Si les valeurs de g sont des caractéristiques intrinsèques de l'espèce paramagnétique étudiée, le champ de résonance est, quant à lui, fonction de la fréquence du spectromètre utilisé. En travaillant à plus haute fréquence, et donc à plus haut champ, on augmente la résolution en valeurs de g ; le spectre est alors réparti sur une plage de champ plus large. On s'est intéressé à la RPE pulsée en bande Q d'une part car le signal du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ est très faible en RPE pulsée bande X ; et d'autre part, pour tenter de séparer les valeurs de g des espèces rhombique et axiale et de pouvoir ainsi mieux caractériser cette dernière. Les spectres RPE bande Q (34GHz) des complexes de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de deiNOS préparés en présence d'arginine ou de NOHA, et de H_4F sont présentés Figure 74.

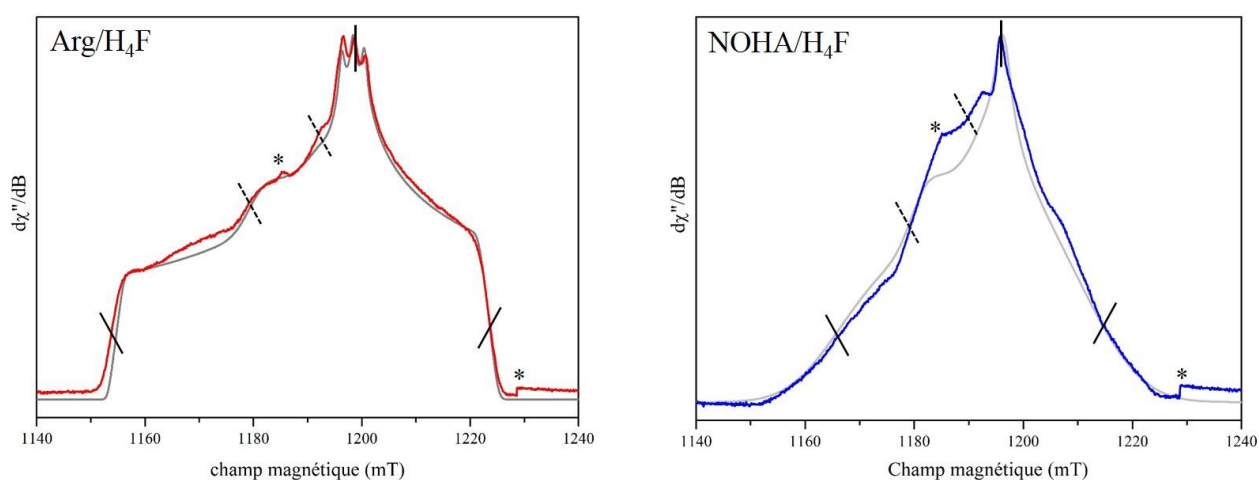


Figure 74 - Spectres RPE bande Q des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de deiNOS préparés en présence d'arginine (gauche) ou de NOHA (droite) et de H_4F .

Conditions d'enregistrement : ESEEM à 2 impulsions, température 20K, fréquence 33,67GHz, τ 200ns.

Les spectres simulés sont représentés en gris.

Les positions correspondant aux valeurs de g principales de l'espèce rhombique sont marquées par un trait plein et celles de l'espèce axiale par un trait pointillé.

Les astérisques marquent les artefacts dus à la soustraction du spectre du tube vide.

On note tout d'abord que l'on retrouve bien le mélange d'espèces axiale et rhombique observé en bande X et que l'augmentation de la fréquence a permis de séparer le $g_{\parallel}$ de l'espèce axiale du g_2 de l'espèce rhombique dans les deux cas. La bande Q semble donc bien adaptée pour l'étude des échantillons de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}^*$. Cependant, dans les échantillons présentés ici, l'espèce axiale ne représente qu'une faible proportion du signal total (Table 22) et il n'a donc pas été possible pour l'instant de la caractériser davantage.

Substrat/Cofacteur	Espèce rhombique majoritaire				Espèce axiale supplémentaire		
	g_1 A(MHz)	g_2 A(MHz)	g_3 A(MHz)	%	$g_{ }$	$g_{\perp}$	%
Arg/H ₄ F	2,081 29	2,005 59	1,964 33	97%	2,014	2,036	3%
NOHA/H ₄ F	2,063 10	2,009 20	1,980 15	94%	2,014	2,035	6%

Table 22 - Paramètres RPE utilisés pour la simulation des spectres bandes Q des complexes Fe^{II}NO de deiNOS saturés en substrat et H₄F.

On perd une partie de la résolution du couplage hyperfin avec le noyau ¹⁴N du NO*, qui n'est plus visible que sur la raie centrale en présence d'arginine. Ceci est notamment dû à la distribution en valeurs de g, dont l'effet augmente avec le champ magnétique. De plus, on n'a utilisé qu'une seule valeur de τ pour enregistrer ces spectres ce qui peut conduire à une déformation de ces derniers. Dans le cas du complexe saturé en NOHA, on observe une raie centrale particulièrement fine, incompatible avec la valeur de constante de couplage hyperfin mesurée en bande X qui a donc été ajustée lors de la simulation (Table 22). Pour le spectre en présence d'arginine, au contraire, les valeurs de g et les constantes de couplage mesurées en bande X permettent de simuler correctement le spectre expérimental bande Q ce qui indique que celui-ci n'est pas déformé (Table 22).

On remarque enfin que, malgré le gain de résolution en valeur de g, le spectre de l'espèce minoritaire est toujours axial. L'hypothèse d'un complexe qui serait effectivement de symétrie axiale, ie un Fe^{II}NO linéaire, est cependant peu probable puisque cette géométrie est généralement plutôt observée pour le complexe oxydé Fe^{III}NO[207,231].

2.3.3.4. HYSCORE

On a enregistré des spectres HYSCORE des échantillons présentés au paragraphe précédent afin d'identifier d'éventuelles interactions entre le centre paramagnétique et des atomes d'azote ¹⁴N (I=1) ou d'hydrogène ¹H (I=1/2), trop faibles pour être résolues sur le spectre d'absorption ; le couplage hyperfin avec l'azote du NO* est, quant à lui, trop fort pour être observé. Pour chaque valeur de champ, seules les molécules adoptant une orientation particulière par rapport à ce dernier vont contribuer au signal observé ; en se limitant à une seule valeur de champ, on risque donc ne pas pouvoir détecter d'éventuelles interactions anisotropes. On a donc enregistré des spectres HYSCORE à différentes valeurs de champ magnétique, de façon à couvrir l'intégralité du spectre : tous les 5mT, de 1155mT à 1225mT pour le complexe saturé en arginine et de 1165mT à 1225mT pour celui saturé en NOHA. Comme l'espèce axiale n'absorbe que sur une plage de champ magnétique assez faible, cela nous permettrait également, le cas échéant, de séparer sa contribution de celle de l'espèce rhombique majoritaire.

Dans tous les cas, on trouve des pics de corrélation uniquement dans le cadran (+ ; +) ce qui indique que les couplages détectés sont faibles par rapport à la fréquence de Larmor du noyau concerné ; dans un champ magnétique de 1,2T, celle-ci est de 51MHz pour ^1H et de 3,7MHz pour ^{14}N . Les spectres obtenus à 1195mT, proche du maximum d'absorption de l'espèce rhombique majoritaire, sont présentés Figure 75 ; ceux obtenus pour les autres valeurs de champ magnétique sont présentés en annexe 3. On n'observe pas de modification de la position des pics de corrélation en fonction du champ magnétique, ce qui indique notamment qu'on ne détecte pas de contribution de l'espèce axiale. En revanche, les intensités des différents pics observés varient en fonction du champ magnétique ce qui modifie sensiblement l'allure des spectres.

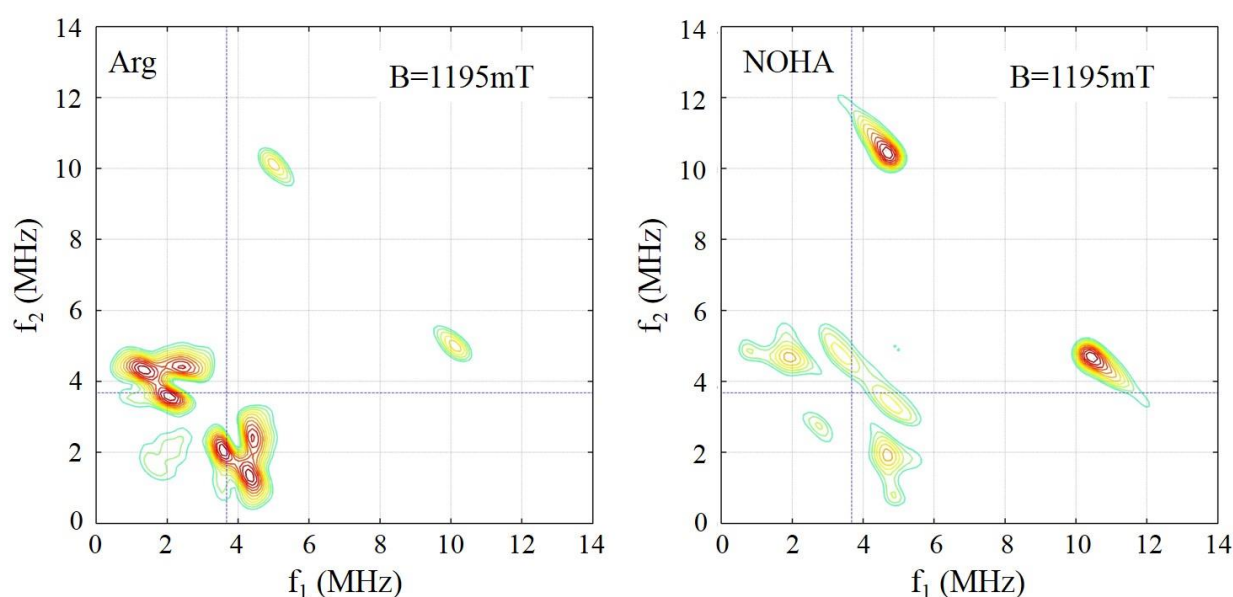


Figure 75 - Cadrons (+ ; +) des spectres HYSCORE à 1195mT des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ saturés en H_4F et en arginine (gauche) ou NOHA (droite).

Conditions expérimentales : fréquence 33,68GHz, température 20K, puissance micro-onde 7,924mW, champ magnétique 1195mT, impulsion $\pi/2$ 20ns, impulsion π 36ns, t_1 32ns, t_2 52ns, incrément 16ns, τ 136ns durée d'intégration 96ns, intervalle entre deux tirs 510 μ s.

Les lignes pointillées marquent la fréquence de Larmor de ^{14}N .

La majorité des pics observés sont situés autour de 4MHz et sont dus à des atomes d'azote (^{14}N). Sachant qu'il ne peut s'agir de l'azote du NO^* , on a alors deux candidats possibles : les azotes des pyrroles de l'hème et ceux du motif (hydroxy)guanidinium du substrat. Une étude réalisée sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de l'hémoglobine [215] rapporte des constantes de couplage hyperfin pour les azotes des pyrroles qui sont parfaitement compatibles avec nos spectres et permettent de retrouver la totalité des pics de corrélation observés, d'après les premières tentatives de simulation. On ne détecte donc pas de couplage avec le motif (hydroxy)guanidinium du substrat qui est *a priori* nettement plus faible. L'optimisation des

simulations pour les spectres obtenus pour les différents champs magnétiques est actuellement en cours afin de déterminer les constantes de couplage hyperfin et de couplage quadrupolaire. Comme on ne voit que les azotes des pyrroles, d'autres méthodes doivent être envisagées afin de compléter la caractérisation de ces complexes. Concernant l'espèce axiale, on ne détecte pas de couplage avec l'azote du NO[•] en bande X ce qui indique qu'il est nettement plus faible que pour l'espèce rhombique et pourrait éventuellement être observé en HYSCORE bande Q, si on obtient à nouveau un échantillon en contenant une proportion importante (Cf. Figure 72).

2.4. Conclusion

L'étude des complexes Fe^{III}, Fe^{II}CO et Fe^{II}NO de deiNOS indique qu'elle ressemblerait davantage à iNOS qu'à bsNOS. En effet, elle est peu stable en absence de substrat et de cofacteur et présente un complexe Fe^{III} très majoritairement BS. De plus, pour les complexes Fe^{II}NO, elle tend à former une proportion d'espèce axiale plus importante que bsNOS, en particulier en présence d'arginine et de H₄F. Cela nous a permis de mieux caractériser cette espèce souvent observée dans les complexes Fe^{II}NO d'hémoprotéines et de montrer qu'elle coexiste avec l'espèce rhombique majoritaire et qu'on n'a pas de conversion entre ces deux espèces avec la température. Malgré de nombreuses tentatives, il n'a malheureusement pas été possible d'identifier les paramètres qui gouvernent la formation de l'espèce axiale, et sa nature reste à déterminer. L'utilisation de la spectroscopie HYSCORE en bande Q nous a permis d'identifier des interactions entre l'espèce rhombique majoritaire et les azotes des pyrroles de l'hème et semble donc bien adaptée à l'étude des complexes Fe^{II}NO de NOS. Cette technique pourrait donc nous permettre de caractériser au moins partiellement l'espèce axiale minoritaire, à condition que l'on parvienne à obtenir à nouveau un échantillon où elle représente une proportion importante du signal total.

3. Activité

Une étude menée sur deiNOS en présence du cofacteur H₄F a montré que ce dernier était capable de supporter la production de NOHA à partir d'arginine, puis de citrulline et de NO[•], à partir du NOHA[28]. Si la production de NO[•] par deiNOS en présence de H₄F, de l'ordre de 0,3 NO[•]/hème, est proche de celle observée pour iNOSoxy, elle est en revanche extrêmement faible en présence du cofacteur H₄B. De plus, contrairement aux autres NOS et NOS-LP caractérisées, la formation du complexe Fe^{III}NO, qui se dissocie pour libérer le NO[•] et reformer le Fe^{III} natif, n'a pas été observée expérimentalement[28]. On note enfin qu'une réaction de deiNOS avec le tryptophane, associée à la formation d'un complexe avec la TrpRSII a également été observée *in vitro*[33]. Il semblerait donc que deiNOS ait un mécanisme catalytique différent de ceux de iNOS ou de bsNOS, par exemple. On s'est donc intéressé à l'activité de deiNOS en présence de différents substrats/cofacteurs, afin de tenter de mieux comprendre son fonctionnement.

3.1. Production de nitrites

On cherche tout d'abord à mesurer la production de nitrites par deiNOS, grâce à l'utilisation du réactif de Griess[188]. Cette méthode étant nettement plus simple à mettre en place que la mesure directe de la production de NO[•], elle est fréquemment utilisée pour estimer l'activité des NOS[24, 33, 143,232]. Cependant, elle ne permet pas de faire la différence entre la production de monoxyde d'azote NO[•] et de nitroxyle NO⁻, tous deux conduisant *in fine* à la formation de nitrite NO₂⁻.

3.1.1. Peroxide shunt

On cherche ici à mesurer la vitesse de production de NO⁻, détectés sous forme de nitrites, à partir du NOHA, *via* une réaction dite de *peroxide shunt*. Les vitesses de production de nitrites (en moles de nitrites produites par mole d'enzyme et par minute) par deiNOS *via* la réaction de *peroxide shunt*, en fonction de la concentration en H₄B (gauche) ou H₄F (droite) sont représentées Figure 76.

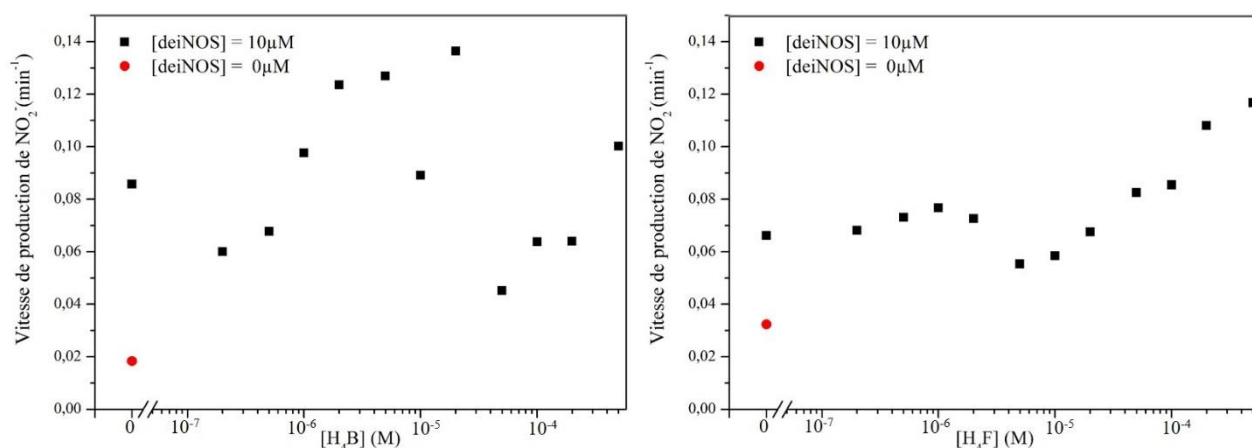


Figure 76- Production de nitrites par deiNOS en présence de H₂O₂ et de NOHA et de H₄B (gauche) ou H₄F (droite).
Le cercle rouge correspond à la production basale, en absence d'enzyme, et correspond donc à une vitesse de production en mol.min⁻¹.

On note tout d'abord que, quelle que soit la concentration de cofacteur utilisée, la production de nitrites reste extrêmement faible, de l'ordre de 0,1min⁻¹. Par comparaison, elle atteint environ 1min⁻¹ pour bsNOS et 50min⁻¹ dans le cas de iNOS[180]. On remarque également que la concentration de cofacteur n'a que peu d'influence sur la production de nitrites. La faible production de nitrites nous indique soit que l'enzyme est dégradée et non fonctionnelle, soit que H₂O₂ n'est pas compétent pour oxyder le NOHA au sein du site actif de deiNOS, comme cela semble être le cas pour d'autres bacNOS[24, 143]. Cela pourrait aussi expliquer que la production ne soit pratiquement pas affectée par la présence ou l'absence d'un cofacteur.

3.1.2. Single turnover en présence de dioxygène

Afin de vérifier que les enzymes purifiées sont bien fonctionnelles, on a cherché à mesurer l'activité de deiNOS lorsque le dioxygène est utilisé comme oxydant, et non le peroxyde d'hydrogène. Les spectres UV-visibles enregistrés après l'ajout du réactif de Griess sont présentés Figure 77.

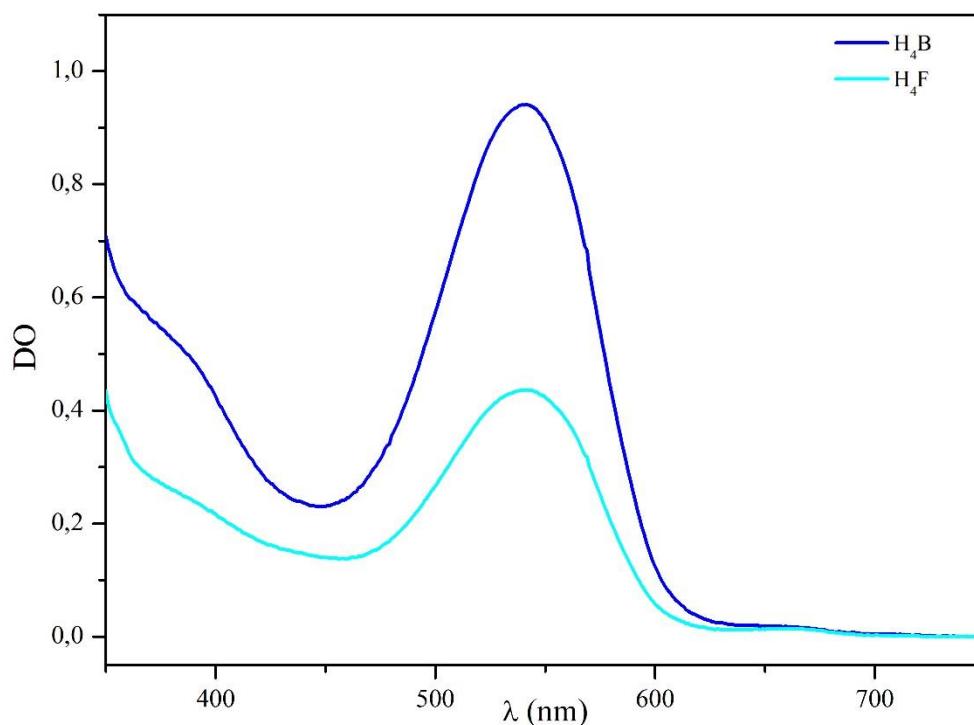


Figure 77 - Spectres UV-visible obtenus après réduction puis exposition à l'air, en présence de NOHA et H₄B (bleu) ou H₄F (cyan), et ajout du réactif de Griess.

On a une bande large et assez intense à 548nm, caractéristique du composé diazo formé par réaction du réactif de Griess avec les ions nitrites. On a donc une concentration de nitrites de 17μM en présence de H₄B (spectre bleu) et de 10μM en présence de H₄F (spectre cyan). Etant donné que la concentration d'enzyme est de 20μM dans les deux cas, on a donc un rendement de production de nitrites par deiNOS de 85% en présence de H₄B et de 50% en présence de H₄F, ce qui indique que l'enzyme est bien fonctionnelle. Ceci confirme également que, comme cela semble être le cas pour les autres bacNOS, l'utilisation de H₂O₂ ne permet pas l'oxydation du NOHA par deiNOS[24, 33, 143].

3.2. Hydroxylation de l'arginine

On s'intéresse à présent au cycle catalytique réel de deiNOS, et donc, tout d'abord, à la réaction d'hydroxylation de l'arginine. On réalise des expériences de *stopped-flow* afin de déterminer la nature des intermédiaires réactionnels observables et de calculer leurs vitesses de formation et de disparition. Ces expériences sont effectuées en présence de différents cofacteurs.

3.2.1. Intermédiaires catalytiques observés

Lors de la réaction de deiNOS saturée en arginine et cofacteur (H_4B ou H_4F) avec le dioxygène (Figure 78), on observe, entre le Fe^{II} initial et le Fe^{III} final (spectres rouges), la formation et la disparition du complexe $Fe^{II}O_2$ (spectres verts) qui résulte de la fixation du dioxygène. Cependant, on ne trouve pas le point isobestique vers 416nm, caractéristique de la transition $Fe^{II}O_2 \rightarrow Fe^{III} HS$. Ceci indique la présence d'un intermédiaire supplémentaire dont la nature reste à déterminer.

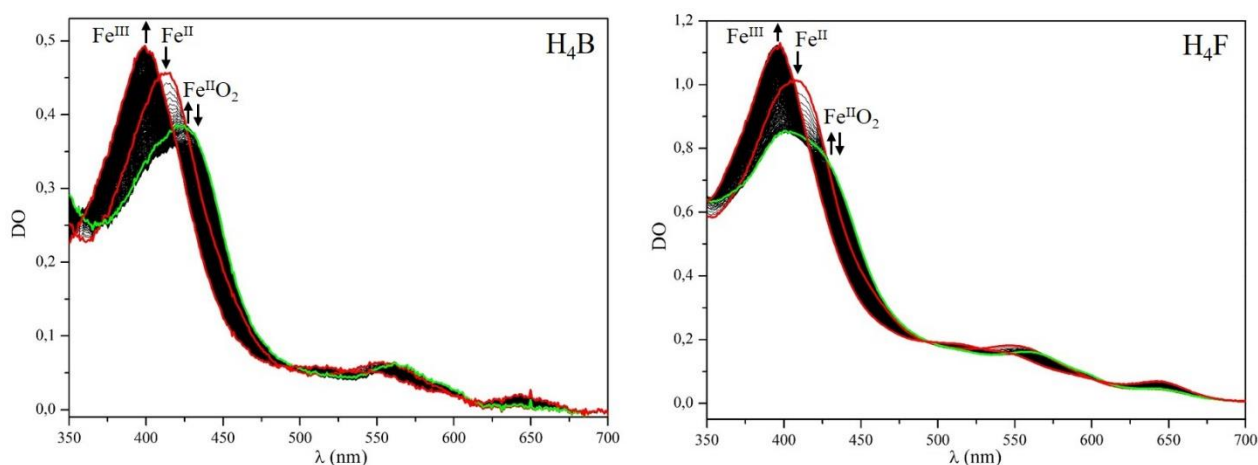


Figure 78- Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence d'arginine et de cofacteur H_4B (gauche) ou H_4F (droite).
Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.
Les spectres présentant le maximum de $Fe^{II}O_2$ sont représentés en vert.

On note que les spectres enregistrés en présence de H_4B (Figure 78, gauche) ou de H_4F (Figure 78, droite) ont une allure un peu différente. On a en effet un spectre de $Fe^{II}O_2$ pratiquement pur en présence de H_4B (Figure 78, gauche, spectre vert), ce qui n'est pas le cas avec H_4F (Figure 78, droite, spectre vert). Ceci indique que le rapport entre les vitesses de formation et de disparition du $Fe^{II}O_2$ dépend de la nature du cofacteur.

3.2.2. Effets de la nature du cofacteur

3.2.2.1. Cas des ptérines réduites H₄B et H₄F

On suit la variation de la DO à 396nm et 440nm que l'on modélise par des fonctions mono-exponentielles (disparition du Fe^{II} et formation du Fe^{II}O₂) ou bi-exponentielles (disparition du Fe^{II}O₂ et formation du Fe^{III} final), afin de calculer les vitesses de formation et de disparition des différents intermédiaires observés (Table 23).

Concernant la fixation du dioxygène, on trouve des vitesses similaires en présence de H₄B et de H₄F. Ce résultat est cohérent avec le fait qu'en présence d'arginine, on n'observe pas d'effet structural de la nature du cofacteur. On note également que la fixation du dioxygène reste suffisamment lente pour être suivie durant l'expérience de *stopped-flow*, ce qui n'était pas le cas pour une étude publiée, réalisée à 10°C, où cette réaction avait entièrement lieu durant le temps mort de l'appareil[28]. L'utilisation d'un tampon saturé en dioxygène plutôt qu'en air ne modifie pas ces cinétiques, ce qui indique que c'est l'accès au site actif qui limite la fixation du dioxygène, et pas la concentration de ce dernier en solution ; il est dans tous les cas en large excès par rapport à l'enzyme. Enfin, ces vitesses sont de l'ordre de celles généralement observées pour les NO-synthases[24, 148,181].

Constantes cinétiques (s ⁻¹)	Fe ^{II}	→	Fe ^{II} O ₂	→	?	→	Fe ^{III}
Arg/H ₄ B		100 ± 29		3,6 ± 1,6		0,96 ± 0,38	
Arg/H ₄ F		92 ± 34		4,7 ± 1,7		0,69 ± 0,20	
Arg/H ₂ B		25 ± 9		2,2 ± 0,5		0,11 ± 0,03	
Arg/Trp		36 ± 9			0,63 ± 0,04		

Table 23- Constantes cinétiques issues du *stopped-flow* (4°C) pour la réaction d'hydroxylation de l'arginine.

Pour la diminution de la DO à 440nm et son augmentation à 396nm, après la formation du Fe^{II}O₂, on obtient une corrélation bien meilleure avec une fonction bi-exponentielle que mono-exponentielle. L'absence de point isobestique évoquée au paragraphe précédent indique qu'on a bien deux transitions successives avec un intermédiaire dont on ne peut déterminer le spectre d'absorption car il n'apparaît que sous forme de mélange avec le Fe^{II}O₂ et le Fe^{III} final. L'allure de ces spectres de mélange nous indique tout de même que son maximum d'absorption est situé entre 396nm (Fe^{III} HS) et 427nm (Fe^{II}O₂). Etant donné que la disparition de cet intermédiaire est très lente (Table 23), il est peu probable qu'il s'agisse d'un des intermédiaires catalytiques (Fe^{III}OOH ou Fe^{IV}O par exemple) nécessaires à l'oxydation de l'arginine, car ces espèces sont extrêmement réactives et ne s'accumulent donc pas dans le milieu (Figure 79). Il pourrait, en revanche, s'agir du Fe^{III} formé concomitamment au NOHA : le NOHA récemment formé étant encore partiellement lié au fer, on aurait un complexe de Fe^{III} hexacoordonné et

donc BS ($\lambda_{\text{max}} = 421\text{nm}$), qui se réarrangerait pour former le complexe $\text{Fe}^{\text{III}} \text{HS} - \text{NOHA}$ qui constitue le point de départ de la 2^{ème} étape du cycle catalytique. Etant donné qu'on travaille avec un large excès d'arginine, on peut également envisager un départ du NOHA, suivi de la fixation de l'arginine et du réarrangement de la protéine. Cet intermédiaire existerait donc pour toutes les NOS mais, dans la plupart des cas, il se réarrangerait trop rapidement, par rapport à sa vitesse de formation, pour s'accumuler dans le milieu réactionnel et donc être observable sur les spectres de *stopped-flow* (Cf. Chapitre III §3.3.2)[24, 148,181]. Bien qu'ici les écarts soient assez faibles, les vitesses de formation et de disparition calculées pour cet intermédiaire (Table 23) indiquent qu'il s'accumule davantage en présence de H_4F que de H_4B , ce qui est en accord avec les résultats obtenus pour bsNOS (Cf. Chapitre III §3.3).

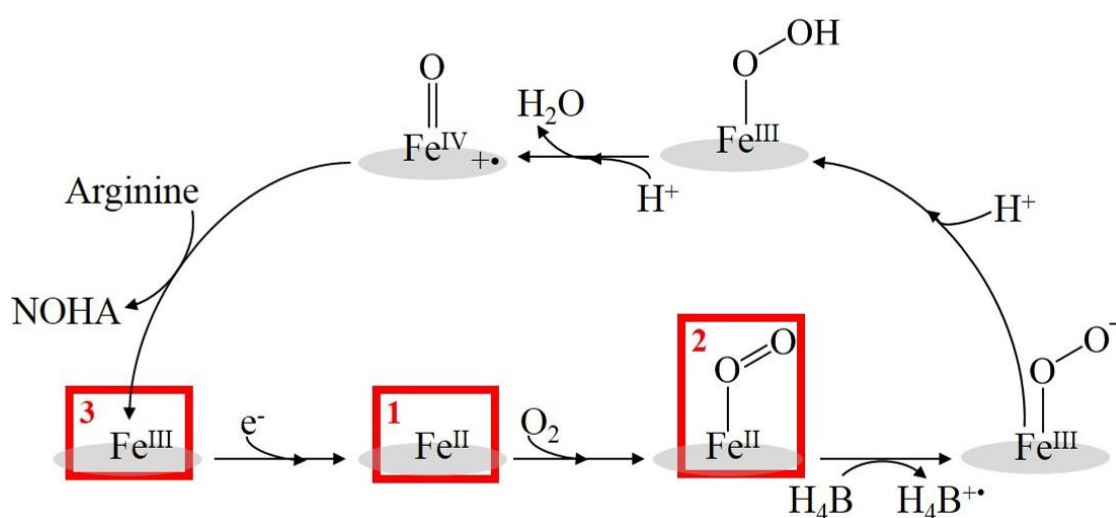


Figure 79- Mécanisme catalytique généralement proposé pour l'hydroxylation de l'arginine par les NOS.
Les intermédiaires observés en *stopped-flow* sont encadrés en rouge.

De même, la vitesse de disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ n'est que peu impactée par la nature du cofacteur et les valeurs calculées ici sont proches de celles obtenues à 10°C en présence de H_4F [28]. Cette dernière étude ayant mis en évidence la production de NOHA, il s'agit bien de la vitesse d'activation de l'oxygène, et pas de l'auto-oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Ces résultats indiquent donc que, pour deiNOS, H_4B et H_4F seraient tous deux également compétents pour activer l'oxygène et supporter la catalyse.

Ce comportement diffère de celui observé pour bsNOS où la réduction du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est significativement plus rapide avec H_4F que H_4B ce qui suggère que ces deux enzymes pourraient suivre des mécanismes légèrement différents. On peut aussi proposer que les sites de fixation de la ptérine de bsNOS et deiNOS soient optimisés pour H_4B et H_4F , respectivement ; deiNOS serait donc peu impactée par l'utilisation d'un analogue moins encombrant alors que la présence de la longue chaîne latérale de H_4F perturberait davantage la structure et l'activité de bsNOS.

3.2.2.2. Cas d'une ptérine sous forme oxydée H₂B

Le rôle redox du cofacteur biptérine, qu'il s'agisse de H₄B ou H₄F, n'ayant, à ce jour, pas été démontré pour deiNOS, on a reproduit les expériences de *stopped-flow* précédentes en utilisant la forme oxydée dihydrobiptérine H₂B du cofacteur H₄B. Cette dernière étant inactive d'un point de vue redox, elle ne peut jouer qu'un rôle structural. Contrairement aux expériences réalisées en absence totale de cofacteur[24], la présence de H₂B devrait donc assurer la stabilité de l'enzyme et garantir l'intégrité du site actif. Les spectres de *stopped-flow* obtenus à 4°C en présence de H₂B et d'arginine sont présentés Figure 80.

Comme pour les expériences effectuées avec les ptérines réduites, on observe la formation puis la disparition du complexe Fe^{II}O₂, ainsi que le passage par l'intermédiaire supplémentaire avant la formation du Fe^{III} final. On note cependant une dérive de la ligne de base en fonction de la longueur d'onde caractéristique des phénomènes de diffusion. On a donc des particules en suspension dans la solution ce qui indique une précipitation partielle de la protéine. Il semblerait donc que H₂B ne permette pas de stabiliser deiNOS aussi efficacement que H₄B.

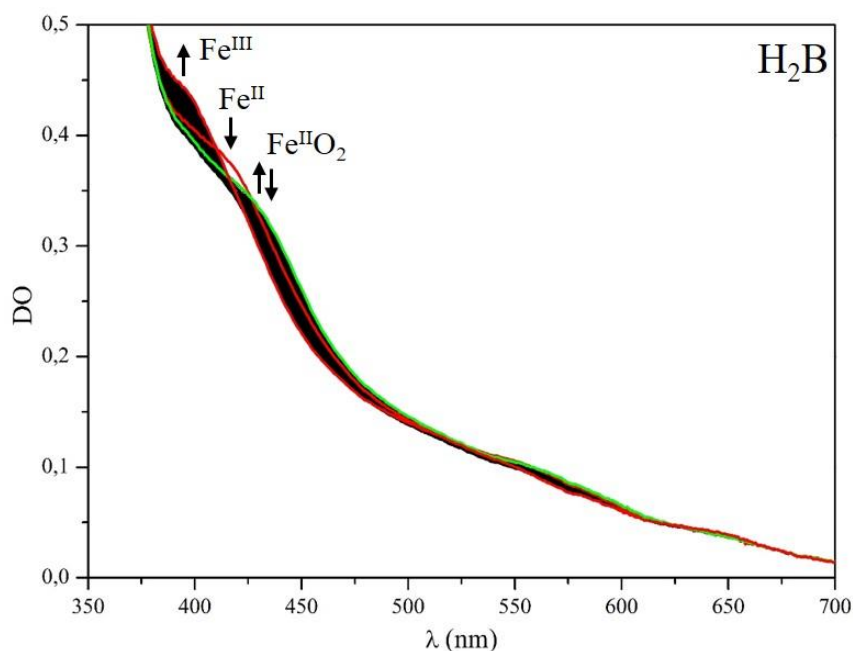


Figure 80- Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence d'arginine et du cofacteur oxydé H₂B.
Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.
Le spectre présentant le maximum de Fe^{II}O₂ est représenté en vert.

Par sa structure électronique, H₂B absorbe à des longueurs d'ondes plus élevées que H₄B ou H₄F, et perturbe donc davantage le spectre de la protéine. Ajouté à la contribution de la diffusion, cela rend le suivi de la DO à 396nm, et sa modélisation, assez difficiles, en particulier lors de la transition Fe^{II} → Fe^{II}O₂ durant laquelle l'amplitude de variation est assez faible. La vitesse de formation du Fe^{II}O₂ (disparition du Fe^{II}) est donc calculée uniquement à partir de la

DO à 440nm. En revanche, pour la formation du Fe^{III} final, on a une variation plus importante de la DO à 396nm que l'on peut donc utiliser pour déterminer la constante cinétique associée à cette transition.

On remarque tout d'abord que la fixation du dioxygène est nettement plus lente qu'en présence de H_4B (Table 23) ce qui est surprenant étant donné que le cofacteur ne joue, *a priori*, son rôle redox qu'une fois le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ formé (Figure 79). Ce résultat suggère donc une modification assez significative de la structure de deiNOS, due à l'état redox du cofacteur, qui impacterait le canal d'accès de l'oxygène. Ceci est à rapprocher de l'effet déstabilisant de H_2B comparé à H_4B .

Concernant la disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, on a une vitesse légèrement inférieure à celle mesurée en présence de la ptérine réduite H_4B (Table 23), alors que les vitesses d'auto-oxydation généralement reportées sont inférieures aux vitesses d'activation de l'oxygène d'au moins un ordre de grandeur[24, 28]. Ce résultat est en accord avec une étude sur deiNOS, réalisée à 10°C en absence totale de ptérine[24] et suggère qu'on observerait la même réaction en présence de H_4B et de H_2B .

Sachant que H_2B est incapable de réduire le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, on peut donc supposer que c'est également le cas de H_4B . Ceci implique soit que deiNOS ne peut pas oxyder l'arginine et qu'on n'observe alors que des réactions d'auto-oxydation, ce qui serait en contradiction avec les études précédentes, soit que la catalyse procède selon un mécanisme différent de celui généralement admis pour les NOS (Figure 79) et qui ne ferait pas intervenir le cofacteur dans le transfert d'électron nécessaire à l'activation de l'oxygène. On peut ainsi proposer, un rôle direct du substrat dans le processus d'activation de l'oxygène. Cependant, comme deux électrons sont formellement nécessaires à la formation du NOHA, l'arginine ne peut servir que de relais ; le donneur d'électron ne pouvant être, dans les conditions de l'expérience, qu'un résidu de la protéine.

Il est également possible que, pour deiNOS, les vitesses d'activation de l'oxygène par le cofacteur, et d'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ soit assez similaires et que ce soit donc bien ces deux phénomènes que l'on observe en présence de H_4B et de H_2B respectivement. On aurait donc, même en présence d'une ptérine réduite, une proportion non négligeable d'auto-oxydation et donc de production de ROS. Un tel comportement serait davantage compatible avec une participation à la défense immunitaire non spécifique de l'organisme qu'avec l'implication dans diverses cascades de signalisation proposée pour deiNOS. On ne peut toutefois pas exclure qu'il existe *in vivo* des mécanismes de régulation capables de limiter la production de ROS par deiNOS et de favoriser l'oxydation du substrat.

Enfin, on peut supposer que l'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ serait plus rapide en présence de H_2B que de H_4B . Ceci serait dû à une plus grande accessibilité du solvant au site actif, suggérée par la déstabilisation de l'enzyme et sa précipitation partielle en présence de H_2B (Figure 80), qui déstabiliserait le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et accélérerait donc son auto-oxydation.

Le fait qu'on observe également un intermédiaire entre le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et le Fe^{III} final ne nous permet pas de conclure quant à l'éventuelle formation de NOHA. En effet, si la spectroscopie UV-visible permet de différencier les Fe^{III} HS et BS, on ne peut généralement pas déterminer la nature du ligand présent au sein du site actif (Figure 65, gauche). On peut donc avoir le même intermédiaire Fe^{III} BS qu'avec H_4B , dont le NOHA juste formé constituerait le ligand distal, ou envisager la formation transitoire d'un Fe^{III} BS due à une modification du réseau de liaison hydrogène, suite à la réaction de Fe^{II} avec le dioxygène. Dans les deux cas, un réarrangement lent conduirait ensuite au Fe^{III} HS final.

Si elles nous indiquent que l'état d'oxydation du cofacteur a un impact sur la stabilité de l'enzyme, les expériences de *stopped-flow* réalisées en présence de H_2B ne nous permettent pas de conclure quant au rôle du cofacteur dans l'étape d'hydroxylation de l'arginine par deiNOS. Malgré un comportement assez original par rapport aux autres NOS[23, 24, 148], les résultats obtenus pour deiNOS restent *a priori* compatibles avec le mécanisme catalytique proposé Figure 79.

3.2.2.3. Cas du tryptophane

Suite à la découverte d'une interaction forte entre deiNOS et la TrpRSII de *Deinococcus radiodurans*, conduisant à la formation d'un complexe stable en solution, la production de 4-nitrotryptophane par ce complexe a été mise en évidence[33, 34]. Dans ce cadre, il a été proposé que le tryptophane s'insérerait au niveau du site de fixation de la ptérine pour y subir cette nitration régiosélective qui n'est pas observée en absence d'enzyme. Etant donnée la différence d'affinité pour ce site entre le tryptophane et le cofacteur H_4B , le produit de nitration n'est observé qu'en absence de ptérine et un rôle redox du tryptophane a alors été envisagé. On a donc effectué des expériences de *stopped-flow* en présence de Trp, et en absence d'autre cofacteur H_4B , H_4F ou H_2B , afin de déterminer s'il était capable de catalyser l'hydroxylation de l'arginine et pourrait donc être le véritable cofacteur *in vivo* de deiNOS.

On remarque tout d'abord qu'on a une très forte contribution de la diffusion aux spectres de *stopped-flow* (Figure 81), bien plus qu'en présence de H_2B , ce qui confirme que le Trp ne permet pas une stabilisation efficace de l'enzyme, même en présence d'un large excès d'arginine. Son utilisation comme cofacteur par deiNOS, à la place du H_4F semble donc peu plausible, à moins que ce ne soit l'interaction avec le partenaire protéique TrpRSII qui permette la stabilisation de deiNOS[33].

On observe une fixation de l'oxygène plus lente (Table 23) qu'en présence de H_4B ou H_4F , ce qui pourrait, comme dans le cas de H_2B , être la conséquence d'une déformation de l'enzyme due à la présence d'un cofacteur non adapté au site de fixation.

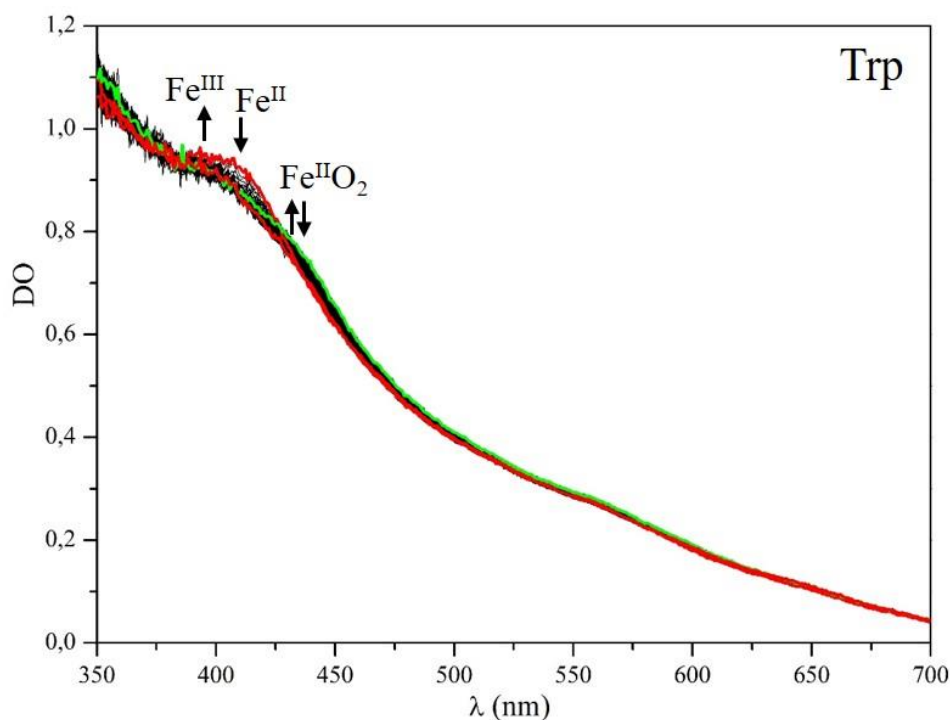


Figure 81 - Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence d'arginine et de tryptophane.
Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.
Le spectre présentant le maximum de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est représenté en vert.

Contrairement aux résultats obtenus en présence d'une ptérine, et malgré des spectres très bruités, il semblerait qu'on ait ici un point isobestique à 416nm (Figure 81), malgré des spectres fortement perturbés par la contribution de la diffusion, qui indique l'absence d'intermédiaire observable entre le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et le Fe^{III} final. Le fait qu'on puisse modéliser la diminution de la DO à 440nm et son augmentation à 396nm par une fonction mono-exponentielle unique confirme ce résultat. L'absence de cet intermédiaire est probablement due à sa formation significativement plus lente (disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, Table 23) qui empêcherait donc son accumulation dans le milieu réactionnel.

On note également que la disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est nettement plus lente qu'en présence des ptérines, et en particulier de la ptérine oxydée H_2B , ce qui suggère qu'on n'a pas de transfert d'électron du tryptophane vers le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. En effet, lors d'une étude précédente, du NOHA a pu être détecté suite à la réaction de deiNOS réduite saturée en arginine avec l'oxygène en présence de H_4B ou H_4F mais pas avec le tryptophane[28]. Ce résultat pourrait toutefois être dû aussi bien à la déstabilisation de l'enzyme qu'aux propriétés redox du tryptophane. L'éventuelle utilisation du Trp comme cofacteur nécessiterait donc la présence d'une entité supplémentaire capable de stabiliser deiNOS et d'améliorer son affinité pour le tryptophane, les concentrations utilisées pour pouvoir saturer l'enzyme ($\approx 20\text{mM}$) n'étant pas atteintes en milieu physiologique. L'interaction entre deiNOS et TrpRSII pourrait également modifier le

potentiel redox du Trp ou du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et permettre ainsi au tryptophane de catalyser efficacement la réaction d'hydroxylation de l'arginine[33].

3.2.3. Rôle et influence du cofacteur

Mis à part le tryptophane qui déstabilise fortement l'enzyme, la nature du cofacteur utilisé pour réaliser les expériences de *stopped-flow* en présence d'arginine, n'a que très peu d'impact sur le comportement de deiNOS. On note que les résultats obtenus ici en présence de tryptophane sont en contradiction avec ceux publiés par Buddha *et al.* en 2004[33, 34]; en revanche, ils sont parfaitement compatibles avec ceux rapportés par Reece *et al.* en 2009[28]. Il semblerait donc que le comportement de deiNOS soit particulièrement sensible à toute modification des conditions expérimentales (tampon, température, *etc.*); les différences observées pourraient également être dues à un repliement plus ou moins correct de la protéine selon le protocole suivi pour sa production puis sa purification.

Pour les deux ptérines réduites H_4B et H_4F , ce résultat n'est pas surprenant : si on considère que le site de fixation de la ptérine est optimisé pour H_4F , l'accommodation de la chaîne latérale plus courte de H_4B ne devrait pas causer de déformation de la structure. Ceci indique aussi que les éventuelles interactions entre l'enzyme et la chaîne latérale de H_4F ne sont pas indispensables à la stabilité du dimère et au maintien de l'intégrité du site actif. On note tout de même qu'on a une activation de l'oxygène un peu plus rapide en présence de H_4F qui permettrait de limiter le taux d'auto-oxydation de l'enzyme. On a, de plus, un réarrangement de l'intermédiaire Fe^{III} BS plus lent avec H_4F qui indique que l'enzyme serait plus rigide qu'en présence de H_4B .

Des expériences de *freeze-quench* ont été réalisées pour tenter de piéger un radical ptérine afin de déterminer le rôle du cofacteur dans l'étape d'hydroxylation de l'arginine par deiNOS. A ce jour, on n'a pas réussi à piéger et caractériser un radical ptérine. Cependant, le peu d'enzyme disponible, dû aux rendements de production et de purification peu élevés, et la difficulté d'obtenir des solutions protéiques concentrées ne nous ont pas permis de tester suffisamment de temps de piégeage pour pouvoir conclure à son éventuelle formation.

Le comportement de l'enzyme en présence de la ptérine oxydée et inactive d'un point de vue redox, H_2B , est plus inattendu. Contrairement aux autres NOS, on n'observe pas d'accélération significative de la disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence de H_4B , comparé à H_2B , ce qui remet en question, pour deiNOS, l'implication du cofacteur dans l'activation de l'oxygène, voire la nature de la réaction effectivement catalysée par l'enzyme *in vivo*. On peut ainsi envisager que deiNOS serait plutôt impliquée dans la production de ROS ou que son activité pourrait être modulée par l'interaction avec différents partenaires, comme la TrpRSII[33, 34]. Elle pourrait ainsi exercer, selon les cas, une activité NO-synthase ou oxygénase, ou encore participer à des réactions de nitration ou de nitrosation[28, 33, 162, 176,233].

3.3. Oxydation du NOHA

Si la production de NO[•] par deiNOS a été démontrée *in vitro*, en conditions de *single-turnover* en présence de NOHA et de H₄B ou H₄F[22, 28], et également *in vivo*[28,176], on ne possède toutefois que très peu d'informations sur le déroulement de cette réaction et, contrairement à bsNOS ou saNOS, la formation du complexe Fe^{III}NO n'a jamais été observée[24, 27, 148].

3.3.1. Réaction en présence de H₄B

En présence du cofacteur H₄B, on observe les mêmes transitions (Figure 82) que pour les NOS de mammifères et les autres NOS bactériennes actuellement caractérisées : la fixation du dioxygène qui conduit à la disparition du Fe^{II} initial (spectre rouge) et à la formation du complexe Fe^{II}O₂ (*), suivie de la réduction de ce dernier et de la formation du complexe Fe^{III}NO (spectre vert) qui se dissocie pour libérer le NO[•] et former le Fe^{III} HS final (spectre rouge)[24, 27, 148]. Ceci confirme que deiNOS est capable d'utiliser le cofacteur H₄B pour la production de NO[•], bien que ce ne soit pas son cofacteur naturel[22, 28].

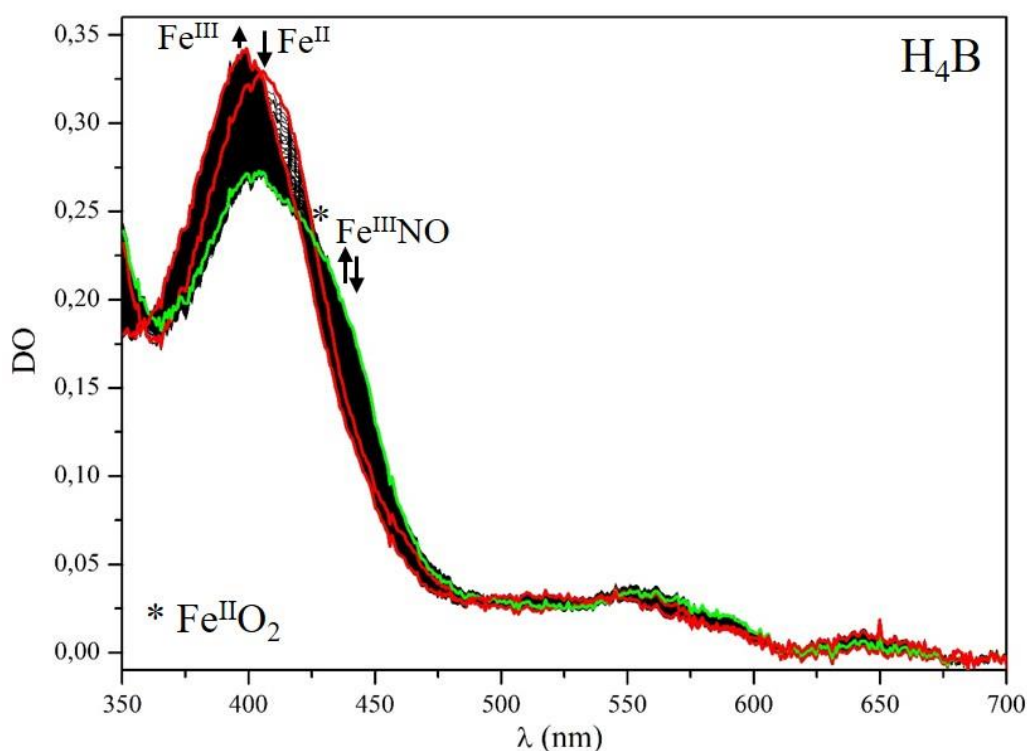


Figure 82- Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence de NOHA et de H₄B.

Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.

Le spectre correspondant au maximum de formation du complexe Fe^{III}NO est représenté en vert.

Contrairement à la 1^{ère} étape, on n'observe pas d'intermédiaire supplémentaire avant la formation du Fe^{III} final, bien que la présence de citrulline, tout comme l'absence de substrat, favorise l'état BS (Figure 64, Figure 68). Ceci suggère que le NOHA présent dans le milieu remplace la citrulline au sein du site actif avant que le complexe Fe^{III}NO ne se dissocie (Figure 83). Etant données la forte différence d'affinité pour le site actif entre le NOHA et la citrulline, et la concentration élevée de NOHA utilisée pour reconditionner la protéine (≈ 20 équivalents), un échange rapide de ligand est tout à fait possible.

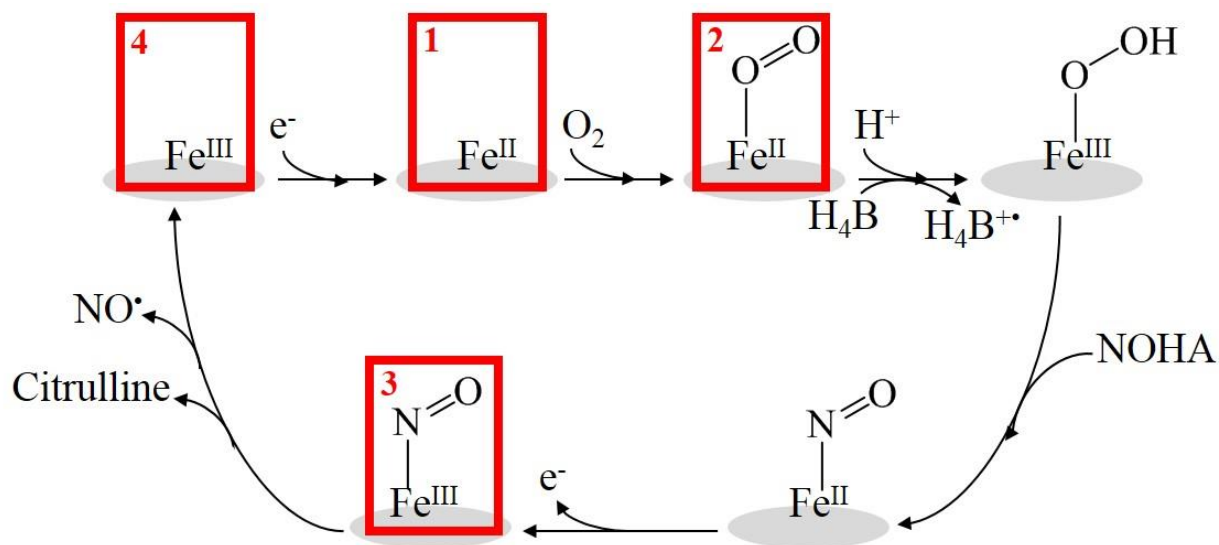


Figure 83 - Mécanisme catalytique généralement proposé pour l'oxydation du NOHA par les NOS de mammifère.
Les intermédiaires observés en stopped-flow sont encadrés en rouge.

3.3.2. Réaction en présence de H_4F

On observe, en présence de H_4F (Figure 84), les mêmes espèces hémiques qu'en présence de H_4B , *ie* le Fe^{II} initial (spectre rouge), les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (*) et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ (spectre vert) et le Fe^{III} HS final (spectre rouge). On retrouve le fait que le cofacteur H_4F est compétent pour supporter l'oxydation du NOHA et la production de $\text{NO}^\bullet$ par deiNOS, et pourrait donc effectivement être le cofacteur naturel de cette enzyme[28].

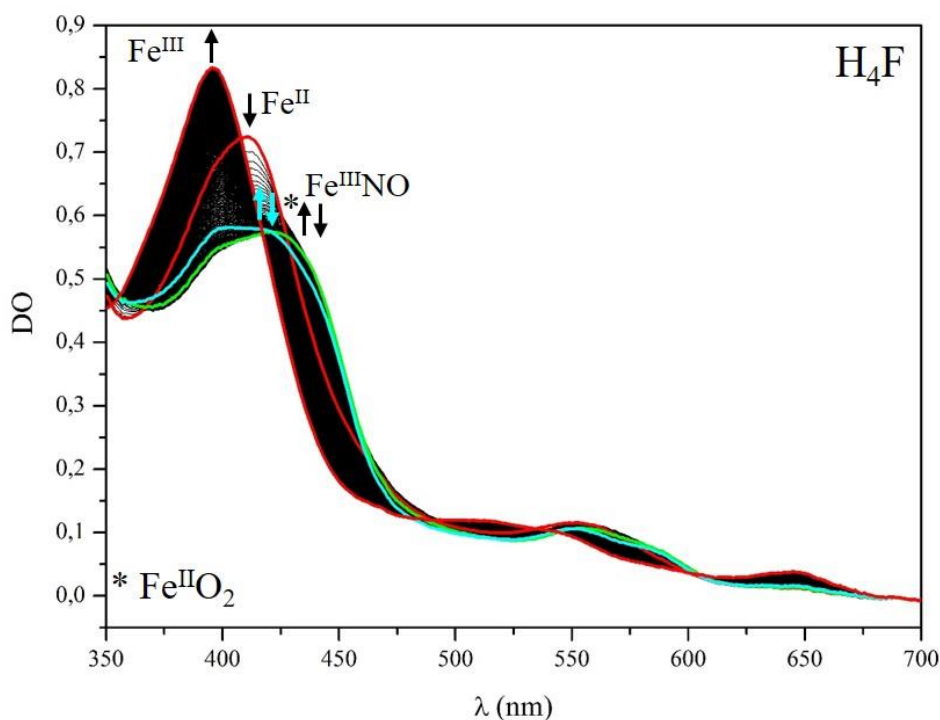


Figure 84 - Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence de NOHA et de H_4F .

Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.

Le spectre correspondant au maximum de formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ est représenté en vert.

Un spectre caractéristique de l'état pseudo-stationnaire est représenté en bleu.

On remarque la présence d'un intermédiaire supplémentaire, par rapport à la réaction avec H_4B , avant le retour au Fe^{III} HS. Ce dernier a une durée de vie longue puisqu'on observe un état pseudo-stationnaire (spectre bleu) durant plusieurs secondes. Il pourrait s'agir d'un Fe^{III} en présence de citrulline, ou simplement de solvant, qui serait donc BS dans les deux cas ; la fixation du NOHA, présent en large excès dans la solution, permettrait alors la formation du Fe^{III} HS final. Etant donné que la citrulline est produite avant la libération du $\text{NO}^\bullet$ (Figure 83) et que son affinité pour le site actif est très faible, l'hypothèse d'un Fe^{III} BS en absence de tout substrat ou produit semble plus plausible. Cela expliquerait également le fait qu'on n'observe pas cet intermédiaire dans le cas de bsNOS ou de iNOS, dont le complexe Fe^{III} est majoritairement HS, même en absence de substrat.

Pour cette seconde étape de la catalyse, qui est critique puisqu'elle détermine la nature de l'oxyde d'azote ($\text{NO}^\bullet$, NO^- , voire peroxynitrite) produit, on a donc une différence de comportement entre les deux cofacteurs H_4B et H_4F . Etant donné que H_4B ne peut être le cofacteur de deiNOS, cela suggère que le comportement original observé en présence de H_4F pourrait correspondre à son comportement *in vivo*, en lien avec sa(ses) fonction(s) biologique(s).

3.3.3. Rôle et influence du cofacteur

Comme pour les autres NOS, on a une fixation de l'oxygène nettement plus lente en présence de NOHA qu'en présence d'arginine[24, 27,181] (Table 24). On note également qu'elle est légèrement plus rapide avec H_4F que H_4B , ce qui suggère que le cofacteur aurait un impact sur la structure du site actif lorsque le NOHA est présent. On avait, en effet, observé de petites différences sur les spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, et dans une moindre mesure de Fe^{III} , préparés en présence de NOHA et de H_4B ou H_4F (Figure 70). L'impact du cofacteur reste toutefois très faible et c'est la nature du substrat présent au sein du site actif qui détermine majoritairement les caractéristiques spectrales et cinétiques de l'enzyme.

Constantes cinétiques (s^{-1})	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$	$\longrightarrow$	?	$\longrightarrow$	Fe^{III}
NOHA/ H_4B			$18,7 \pm 1,3$		$17,2 \pm 0,7$		$0,42 \pm 0,02$		
NOHA/ H_4F			$25,9 \pm 3,6$		$17,6 \pm 3,1$		$0,5 \pm 0,1$		$0,14 \pm 0,03$ (70%)
							$0,03 \pm 0,01$		(30%)

Table 24- Constantes cinétiques issues du *stopped-flow* pour la réaction d'oxydation du NOHA.

On retrouve également le fait que la réduction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est accélérée en présence du NOHA, comparé à la réaction en présence d'arginine[24, 27,181]. Le fait que la nature du cofacteur n'ait aucun impact sur la vitesse de disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ alors qu'il est censé en être directement responsable est plus surprenant (Figure 83). Ce résultat est d'autant plus inattendu qu'on observe un effet du cofacteur sur toutes les autres transitions. On peut donc supposer soit qu'il n'est pas impliqué dans le transfert d'électron nécessaire à la réduction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, soit que l'effet du substrat est prédominant et masque donc son influence. Dans tous les cas, cela suggère que le substrat serait impliqué dans l'étape d'activation de l'oxygène, comme cela a déjà été proposé pour bsNOS[157]. Des expériences de *freeze-quench* ont été effectuées pour tenter de piéger et de caractériser un éventuel radical ptérine et pouvoir ainsi conclure quant à l'implication du cofacteur dans l'étape d'activation de l'oxygène. Les premiers résultats obtenus ne sont pas concluants, notamment à cause des difficultés liées à la

concentration de l'enzyme et une adaptation du protocole expérimental au cas particulier de deiNOS est donc actuellement à l'étude.

Pour l'étape de dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, et donc de libération du monoxyde d'azote, on observe, en revanche, des comportements assez différents selon qu'on utilise H_4B ou H_4F comme cofacteur (Table 24) ; le comportement observé en présence de H_4F n'a pas été décrit pour d'autres NOS et semble donc propre à deiNOS[24, 27, 148]. Comme pour les autres expériences de *stopped-flow*, on a utilisé les variations d'absorbance à 396nm et 440nm pour calculer la vitesse de dissociation du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et donc de libération du $\text{NO}^{\bullet}$. On les a modélisées par des fonctions bi-exponentielles et, dans les deux cas, la phase lente représente environ 30% de l'amplitude totale, avec une constante cinétique de $0,03 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$. Concernant la phase rapide qui représente 70% de l'amplitude totale, on obtient deux constantes différentes à 396nm et 440nm (Table 24), ce qui est cohérent avec la présence d'un intermédiaire supplémentaire entre le $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et le Fe^{III} final (Figure 84). On propose donc un schéma réactionnel qui comprend deux voies de dissociation du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$: une voie directe très lente (minoritaire) et une voie plus rapide qui passe par un intermédiaire supplémentaire (majoritaire) (Table 24).

On s'intéresse tout d'abord à la voie de disparition majoritaire. On aurait dans ce cas-là, une dissociation du complexe un peu plus rapide qu'en présence de H_4B qui serait suivie d'un échange de ligand/réarrangement permettant la formation du Fe^{III} HS final. Comme cela a été proposé au paragraphe 3.2.2, on peut supposer que la protéine serait plus rigide en présence de H_4F que de H_4B et que les processus nécessitant des mouvements assez importants seraient donc ralentis par la présence de H_4F . Cela expliquerait que cette transition ne soit pas détectable en présence de H_4B . Pour les enzymes suivant cette voie, on a donc une synthèse de la citrulline et une libération du $\text{NO}^{\bullet}$ plus rapide en présence de H_4F que de H_4B ; un temps plus long est toutefois nécessaire pour que l'enzyme soit prête à effectuer un nouveau cycle catalytique. Cependant, comme il semblerait que les bacNOS n'aient pas de partenaire redox dédié et que la réduction du Fe^{III} hémique en Fe^{II} soit donc l'étape limitante[26], ce réarrangement ne devrait pas limiter l'activité de deiNOS.

La voie minoritaire concerne tout de même une proportion non négligeable d'enzymes et doit donc être prise en compte pour décrire le mécanisme catalytique de deiNOS. On note qu'on a une dissociation du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ extrêmement lente (Table 24) qui semble peu compatible avec une production catalytique de $\text{NO}^{\bullet}$; cette séquestration du $\text{NO}^{\bullet}$ au sein du site actif semble davantage adaptée à une modification ultérieure de ce dernier afin d'effectuer des réactions de nitration ou de nitrosation, par exemple. De plus, la longue durée de vie de ce complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ permettrait, par exemple, la fixation du substrat de nitr(os)ation au sein du site actif de deiNOS laissé vacant par le départ de la citrulline ou à la place du cofacteur H_4F qui n'est alors plus nécessaire[33, 34].

La coexistence de ces deux voies de disparition du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ suggère que deiNOS pourrait exercer plusieurs fonctions *in vivo*, qui seraient favorisées par son interaction avec différents partenaires (formation d'un homodimère, d'un complexe avec TrpRSII, etc.)

3.4. Conclusion

Les résultats obtenus grâce aux expériences de *stopped-flow* nous permettent de proposer un mécanisme catalytique pour deiNOS légèrement différent de celui habituellement admis pour les NO-synthases (Figure 85).

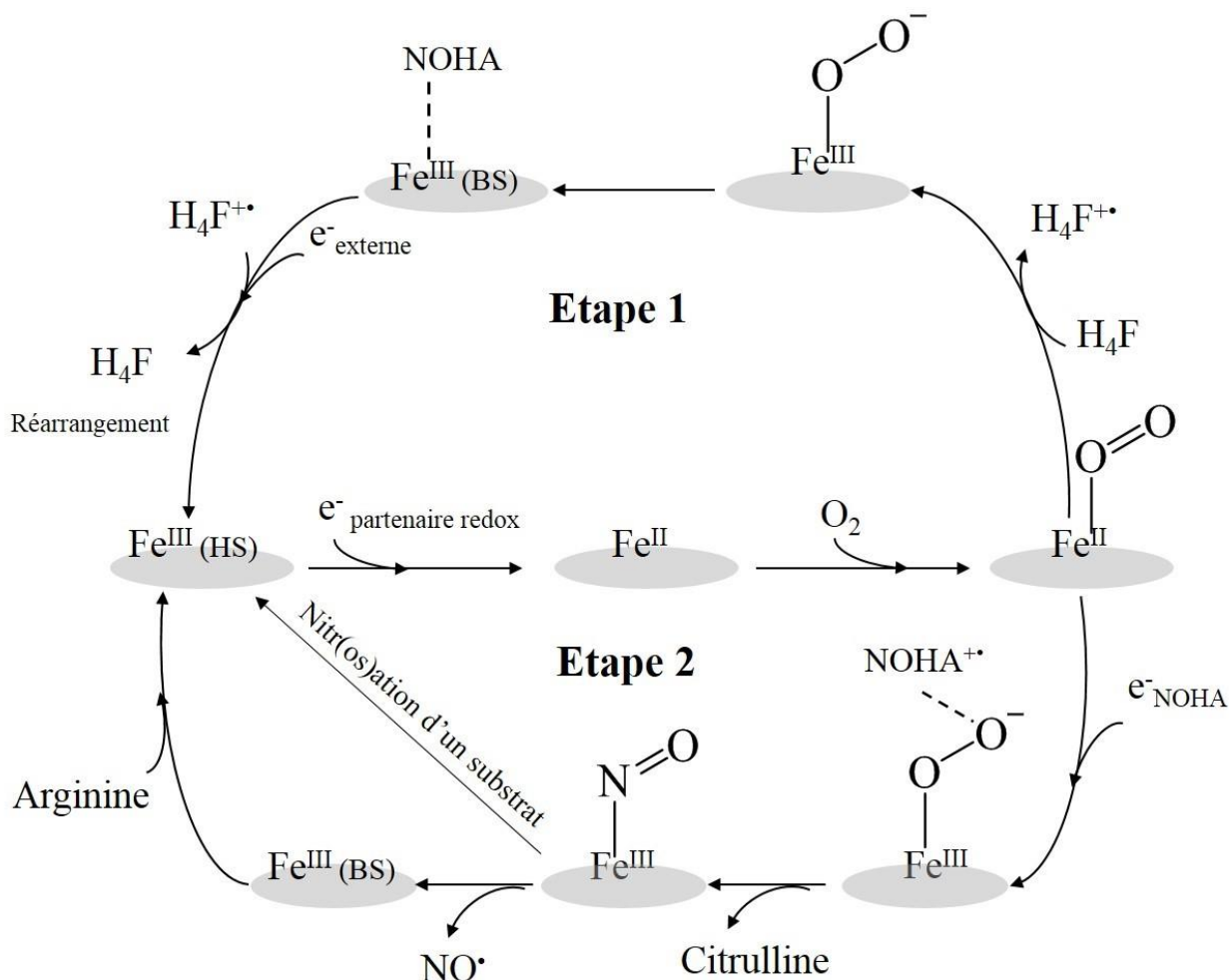


Figure 85 - Proposition de mécanisme catalytique pour la bacNOS de *Deinococcus radiodurans*.

Pour la première étape de la catalyse, *ie* l'hydroxylation de l'arginine, la similarité des vitesses de disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ mesurées en présence d'une ptérine réduite, H_4B ou H_4F , et d'une ptérine oxydée, H_2B , suggère que le cofacteur ne serait pas impliqué dans le transfert d'électron permettant l'activation de l'oxygène et nécessaire à la poursuite de la catalyse. Il jouerait donc un rôle purement structural. Une différence aussi importante entre le mécanisme catalytique de deiNOS et celui d'autres bacNOS, serait cohérente avec les fonctions *in vivo* décrites pour deiNOS[33, 162,176] qui sont variées et assez éloignées de celles décrites pour les bacNOS issues de *Bacillus subtilis*[138,171], *Bacillus anthracis*[140], ou encore *Staphylococcus aureus*[163,168], et avec le fait que *Deinococcus radiodurans* soit assez éloignée, d'un point de vue phylogénétique, des autres bacNOS caractérisées. L'absence totale de rôle redox pour le cofacteur reste cependant difficile à rationaliser, d'autant plus que les

expériences de *stopped-flow* sont réalisées en absence de tout partenaire redox possible. L'hypothèse la plus probable reste donc tout de même, comme pour iNOS et bsNOS, la réduction du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ par le cofacteur bioptérine et la formation d'un radical $\text{H}_4\text{B}^{\cdot+}/\text{H}_4\text{F}^{\cdot+}$. Etant donné qu'on n'a que très peu d'informations sur les événements intervenants après la fixation du dioxygène, que ce soit pour deiNOS ou pour n'importe quelle NOS, mammifère ou bactérienne, les détails du mécanisme réactionnel conduisant ensuite à la formation du NOHA, et les éventuels intermédiaires formés ne seront pas discutés ici.

Pour la seconde étape de la catalyse, on ne peut, pour l'instant, pas conclure de manière définitive quant au rôle du cofacteur. Le fait que ni la formation de $\text{NO}^{\cdot}$, ni celle de citrulline n'aient été observées en présence de tryptophane, et en absence de ptérine, suggère un rôle redox du cofacteur dans la réaction d'oxydation du NOHA[28]. Au contraire, le fait qu'en présence de Trp on observe la formation de 4-nitro-tryptophane, même en absence de la TrpRSII, suggère que l'activation de l'oxygène est possible en absence de ptérine[33]. D'après les résultats obtenus ici pour la 1^{ère} étape, le Trp ne serait pas compétent pour réduire le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ ce qui suggère un rôle redox pour le substrat. Cela expliquerait notamment les différences de vitesse de réduction du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ observées en présence d'arginine et de NOHA[147].

De nombreuses informations manquent encore à ce jour qui permettraient de confirmer, ou d'infirmer, et de préciser le mécanisme catalytique proposé Figure 85. L'utilisation du *freeze-quench* devrait permettre d'obtenir certaines réponses, notamment en ce qui concerne l'éventuelle formation d'un radical ptérine et la nature de l'intermédiaire supplémentaire observé lors de l'oxydation du NOHA en présence de H_4F , à condition de réussir à concentrer davantage l'enzyme. Les résultats obtenus ici semblent toutefois confirmer que bacNOS et mNOS ne fonctionnent pas de la même façon et auraient donc probablement des fonctions, voire des activités, différentes. Ils suggèrent également que les bacNOS ne forment pas un ensemble homogène et qu'elles pourraient être bien plus versatiles que leurs homologues mammifères.

4. Structure tridimensionnelle

L'étude spectroscopique et cinétique menée sur deiNOS nous a permis de montrer qu'elle présentait un certain nombre de caractéristiques originales, comme la propension à former un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ axial ou l'existence de deux voies de disparition du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, malgré une forte homologie avec bsNOS, entre autres, en particulier au niveau du site actif et du site de fixation du cofacteur. De plus, elle est peu stable en solution, alors que bsNOS est extrêmement robuste. La comparaison des séquences en acides aminés ne permettant pas, à elle seule, d'expliquer ces différences de comportement, on s'est intéressé à la structure tridimensionnelle de deiNOS. Celle-ci n'ayant pas été cristallisée, on a cherché à construire un modèle par homologie, basé sur les structures cristallographiques disponibles pour iNOS, bsNOS et gsNOS. On a ensuite utilisé ce modèle comme base pour des simulations de dynamique moléculaire, en absence ou en présence du cofacteur H_4F , afin d'évaluer la stabilité du dimère de deiNOS et de tenter de repérer les résidus impliqués dans la fixation de H_4F .

4.1. Construction de la structure

Après avoir réalisé un alignement de la séquence de deiNOS avec celles de bsNOS, iNOS et gsNOS, on a utilisé Modeller (9.14) pour calculer, par homologie avec celles de bsNOS (1M7V)[21], iNOS (1NOD)[20] et gsNOS (2FLQ)[23], 100 structures possibles pour deiNOS[193,194]. On a sélectionné une structure (Figure 86, rose) représentant un bon compromis entre le DOPE score[195], la fonction utilisée par Modeller pour la minimisation de l'énergie et le QMEAN [196](Cf. Chapitre II). Il s'agit d'un dimère ; chaque monomère contient l'hème, lié à la protéine *via* une liaison thiolate avec le résidu cystéine C63 (C72 chez bsNOS), le substrat arginine et le cofacteur H_4F .

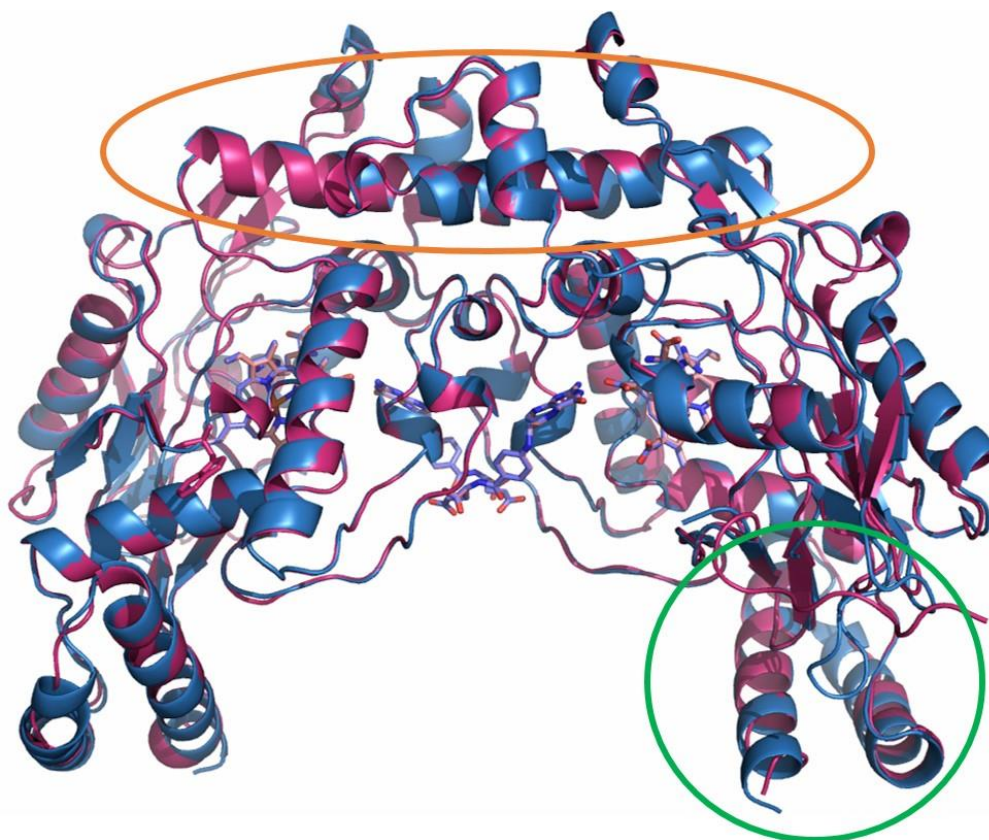


Figure 86 - Superposition des structures de deiNOS (rose) et bsNOS (bleu) faisant apparaître l'hème, le substrat arginine et le cofacteur H_4F .
 La structure de deiNOS a été obtenue par homologie, en utilisant iNOS (1NOD), bsNOS (1M7V) et gsNOS (2FLQ) comme modèles.
 Elle représente le meilleur compromis entre les trois types de scores utilisés pour classer les structures générées par Modeller (Cf. Chapitre II).
 Figure réalisée avec PyMol.

La superposition de la structure obtenue pour deiNOS (rose) avec celle de bsNOS (bleu, 1M7V) indique que les écarts entre les deux structures apparaissent principalement sur les segments les plus flexibles et que la plupart des éléments de structure secondaire sont conservés (Figure 86). On retrouve, en particulier l'interaction entre deux hélices α (entourées en orange), appartenant chacune à un monomère différent, qui sont impliquées dans la cohésion du dimère[20, 21, 23, 154]. On remarque cependant que les deux hélices α N-terminales (cercle vert) sont plus courtes chez deiNOS que chez bsNOS. Cela est dû à la présence, dans la séquence de deiNOS, de résidus proline (P4 et P11 pour la 1^{ère} hélice, P27 et P30 pour la 2^{nde}) qui sont incompatibles avec la formation d'hélices. Cette perte partielle de structure secondaire pourrait être à l'origine de l'instabilité de deiNOS en solution, comparée à bsNOS. L'analyse des structures de iNOS et gsNOS semble confirmer cette hypothèse. En effet, chez iNOS, qui nécessite l'ajout de H_4B pour former un dimère stable, contrairement à bsNOS, la 1^{ère} hélice est raccourcie par la présence de deux résidus proline ; elle est tout de même plus longue que chez deiNOS, et la seconde hélice n'est pas modifiée, comparé à bsNOS. Quant à gsNOS,

protéine thermostable et particulièrement robuste, elle possède deux hélices α comparables à celles présentes dans la structure de bsNOS, en plus d'une extension N-terminale qui assure sa thermostabilité[23] mais qui n'apparaît pas dans la structure obtenue par cristallographie (2FLQ).

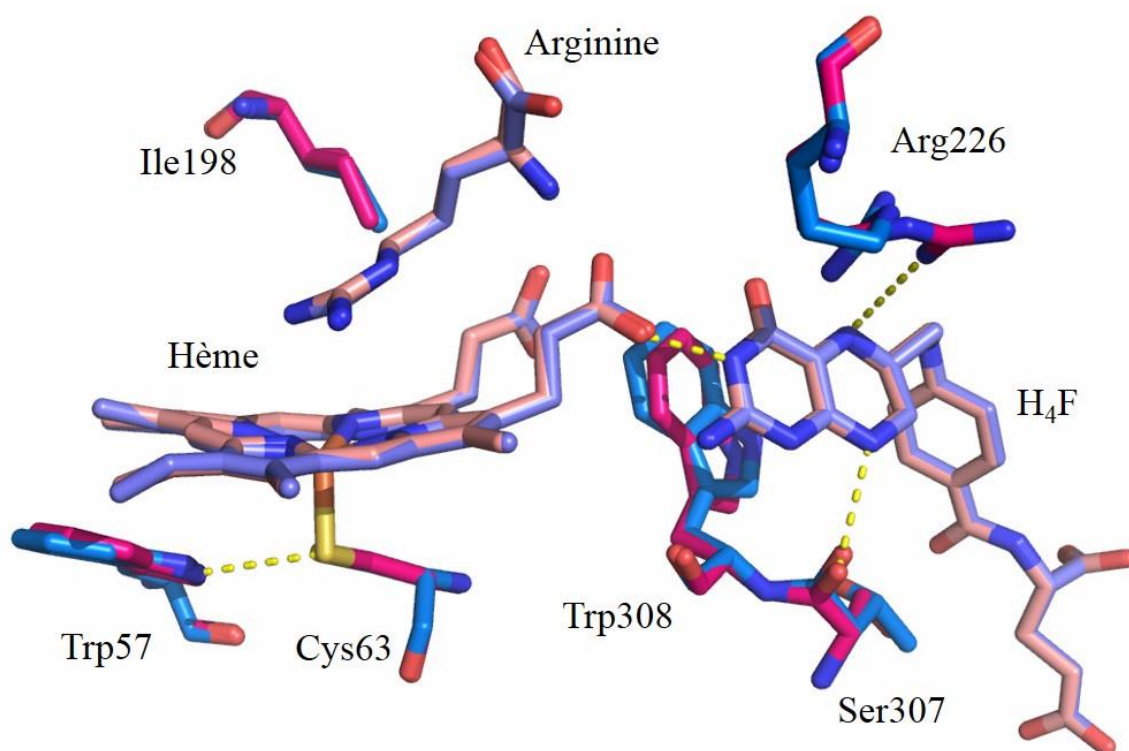


Figure 87- Superposition des sites actifs de bsNOS (1M7V, bleu) et deiNOS (rose).
 La structure de deiNOS a été obtenue par homologie, en utilisant iNOS (1NOD), bsNOS (1M7V) et gsNOS (2FLQ) comme modèle. Il s'agit de la même structure que celle présentée Figure 86.
 Les pointillés représentent des liaisons hydrogène issues de la structure de deiNOS.
 Les étiquettes correspondent également aux résidus de deiNOS.
 Figure réalisée avec PyMol.

On s'est ensuite intéressé au site actif et à la fixation du cofacteur H₄F (Figure 87). Concernant l'environnement proximal de l'hème, on remarque que les résidus cystéine de bsNOS et deiNOS sont parfaitement superposés et qu'on a donc bien maintenu la liaison thiolate. On retrouve aussi le résidu tryptophane (W57) dont la position permet la formation d'une liaison hydrogène avec la cystéine (C63) : cette interaction permet de contrôler la densité électronique du fer et est critique pour assurer une catalyse efficace[144-147]. La conformation de l'hème et la position du substrat sont également très proches de celles de bsNOS. Concernant le site de fixation du cofacteur, on retrouve l'interaction π - π avec le résidu tryptophane (W308) ainsi que les liaisons hydrogène avec l'un des propionates de l'hème, avec la liaison peptidique entre Ser307 et Trp308 (T334 et W335 pour bsNOS) et avec le motif guanidinium de l'arginine R226, malgré une conformation un peu différente de celle de bsNOS.

On retrouve donc, pour deiNOS, les principales caractéristiques structurales des NO-synthases, que ce soit en termes de repliement global de la protéine, de structure secondaire ou d'interaction avec les ligands[20, 21, 23]. Ce résultat était prévisible, étant donné que la structure de deiNOS a été construite par homologie, à partir de celles de bsNOS, iNOS et gsNOS. Il est également important de noter que les structures obtenues par cristallographie, tout comme le modèle calculé pour deiNOS, ne sont représentatives que d'un état particulier et ne permettent donc pas d'appréhender l'ensemble des conformations présentes en solution. Les petites différences concernant des objets assez flexibles, comme les zones non structurées de la protéine ou les chaînes latérales de certains acides aminés, ne sont donc pas nécessairement significatives.

On a donc effectué des calculs de dynamique moléculaire, à partir de la structure générée par Modeller, qui nous donne accès à une plus grande variété de conformations et nous permet de suivre l'évolution des différentes interactions protéine-protéine et protéine-ligand, et de vérifier la stabilité de la structure au cours du temps. Cela permet aussi de tester la robustesse de la structure calculée et d'obtenir une structure relaxée dans un solvant.

4.2. Dynamique moléculaire

Tout comme les structures obtenues par cristallographie, notre modèle de deiNOS ne contient que les coordonnées des atomes lourds (C, N, O, S et Fe) ; la procédure de dynamique moléculaire commence donc par la génération d'un fichier de topologie qui contient les coordonnées de tous les atomes, y compris ceux d'hydrogène. Après solvation de la protéine, le système est neutralisé par l'ajout d'ions Na^+ ou Cl^- puis on effectue une première minimisation de l'énergie. Deux étapes d'équilibrage de la température et de la pression sont ensuite nécessaires avant de pouvoir commencer la dynamique moléculaire proprement dite[199,200].

4.2.1. Stabilité du dimère en absence de cofacteur

On s'est tout d'abord intéressé au comportement de deiNOS en absence de cofacteur et on a donc retiré H_4F du fichier de coordonnées généré avec Modeller. C'est ce fichier modifié qui a ensuite été utilisé pour le calcul de la dynamique moléculaire ; celle-ci est limitée à 10ns. Au cours de la dynamique, la protéine se déforme progressivement et les deux monomères semblent s'écarter l'un de l'autre. La comparaison entre la structure obtenue après 10ns et celle issue de Modeller (donc avant la dynamique moléculaire) (Figure 88) montre en effet que les deux atomes de fer sont nettement plus éloignés l'un de l'autre (40,5 Å vs 34,5Å avant la dynamique). On remarque également que le dimère n'est plus symétrique et qu'il est plus lâche ; certaines hélices α en particulier sont fortement déplacées (Figure 88, cercles verts). Enfin, on note une perte de structure secondaire au niveau de l'interface entre les deux monomères

(Figure 88, cercle bleu). Ces différents éléments semblent indiquer que le dimère est assez instable en absence de cofacteur, conformément à ce qu'on a observé par spectroscopie.

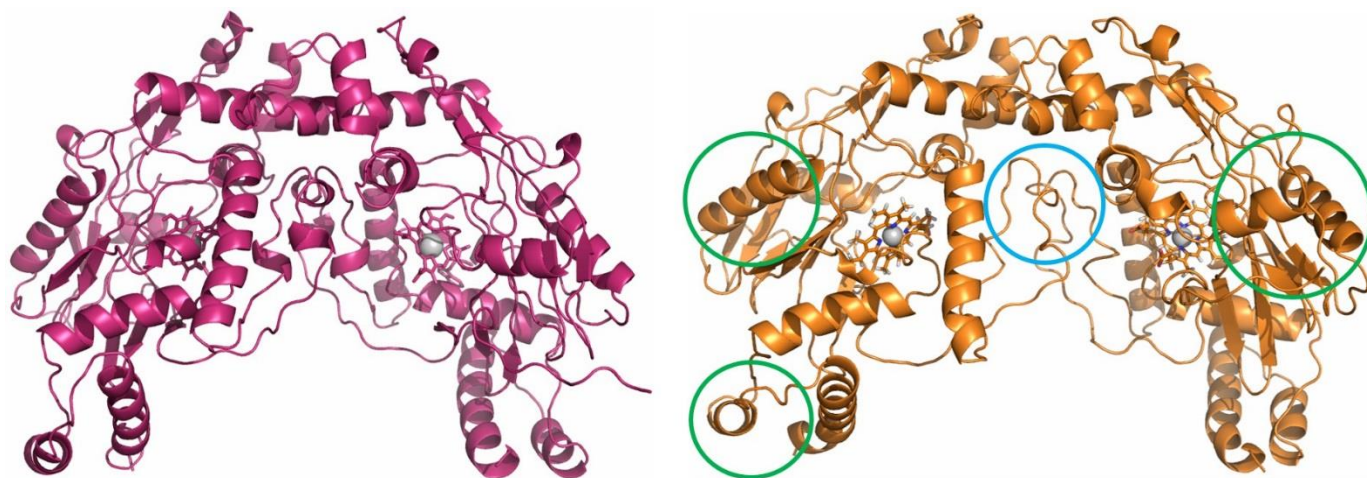


Figure 88- Comparaison des structures obtenues pour deiNOS avant (gauche, rose) et après (droite, orange) la dynamique moléculaire (10ns) en absence de cofacteur.
 Les deux structures sont à la même échelle et elles sont présentées selon la même orientation.
 Figure réalisée avec PyMol.

On note tout de même que l'état final de la dynamique moléculaire n'est pas forcément représentatif de l'ensemble des conformations adoptées par la protéine. On a donc suivi l'évolution de différentes distances interatomiques au cours de la dynamique moléculaire. On a également suivi les variations de RMSD, d'énergie, de température et de pression (Annexe 4) afin de vérifier la stabilité du système au cours de la simulation. Cela nous permet notamment de vérifier si la durée choisie pour la dynamique moléculaire est assez longue pour permettre à la protéine d'atteindre un état d'équilibre.

On s'est tout d'abord intéressé à la distance Fe-Fe : elle augmente assez fortement au début de la dynamique puis se stabilise après environ 3,5ns autour de 41Å (Figure 90, rouge). Cet éloignement entre les deux monomères est associé à une perte de compacité de la protéine, caractérisée par l'augmentation du rayon de giration (Figure 90, noir). On a donc un dimère de type « loose » qui rappelle celui obtenu pour bsNOS en absence de substrat et de cofacteur[154]. On remarque tout de même que, dans le cas de deiNOS, la distance entre les deux atomes de fer ($\approx 41\text{\AA}$) est nettement plus élevée que pour bsNOS (36,4Å) malgré la présence d'arginine ; la présence du cofacteur H₄F semble donc cruciale pour garantir l'intégrité du dimère de deiNOS. Le fait que la distance Fe-Fe se stabilise après quelques nanosecondes suggère toutefois que cet état est relativement stable et que le dimère ne se dissocie donc pas.

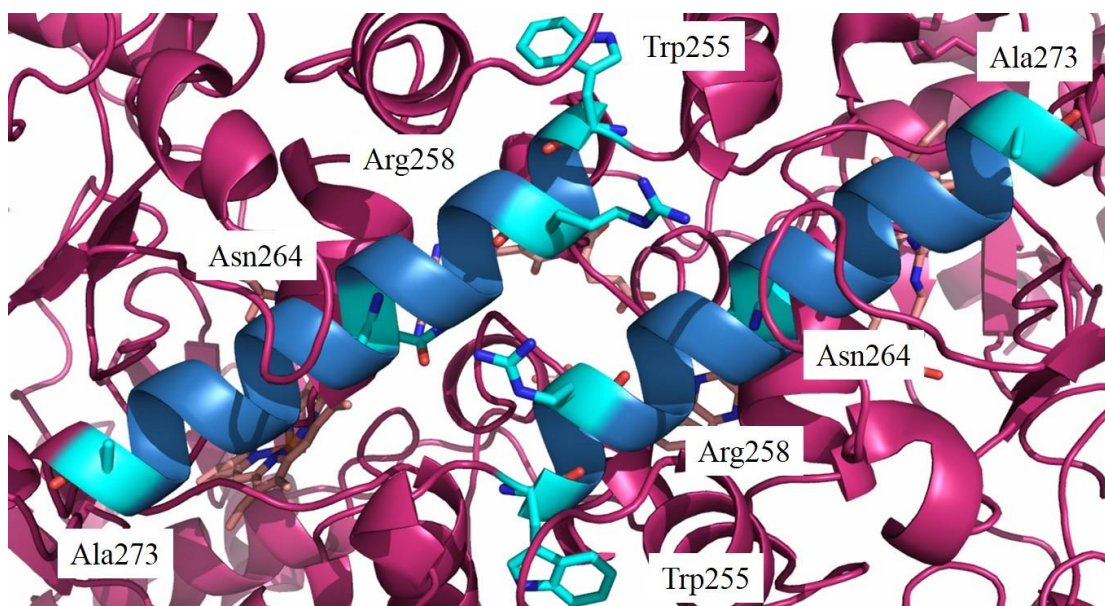


Figure 89 - Vue rapprochée des deux hélices α impliquées dans la cohésion du dimère.
 Il s'agit d'une vue de dessus de la structure de deiNOS représentée Figure 86.
 Les deux hélices d'intérêt sont représentées en bleu.
 Les résidus utilisés pour suivre l'évolution de la distance entre les deux hélices sont représentés en cyan.

Afin de vérifier cette apparente cohésion du dimère, malgré une déformation assez importante, on a suivi l'évolution de la distance entre deux hélices α impliquées dans l'interaction entre les deux monomères (Figure 86, entourées en orange). On a choisi quatre résidus répartis sur toute la longueur de l'hélice (Trp 255, Arg 258, Asn 264 et Ala 273, Figure 89, cyan) et on a suivi l'évolution de la distance entre le carbone $C\alpha$ du résidu d'un monomère et celui du résidu correspondant situé sur l'autre monomère (Figure 90, bleu).

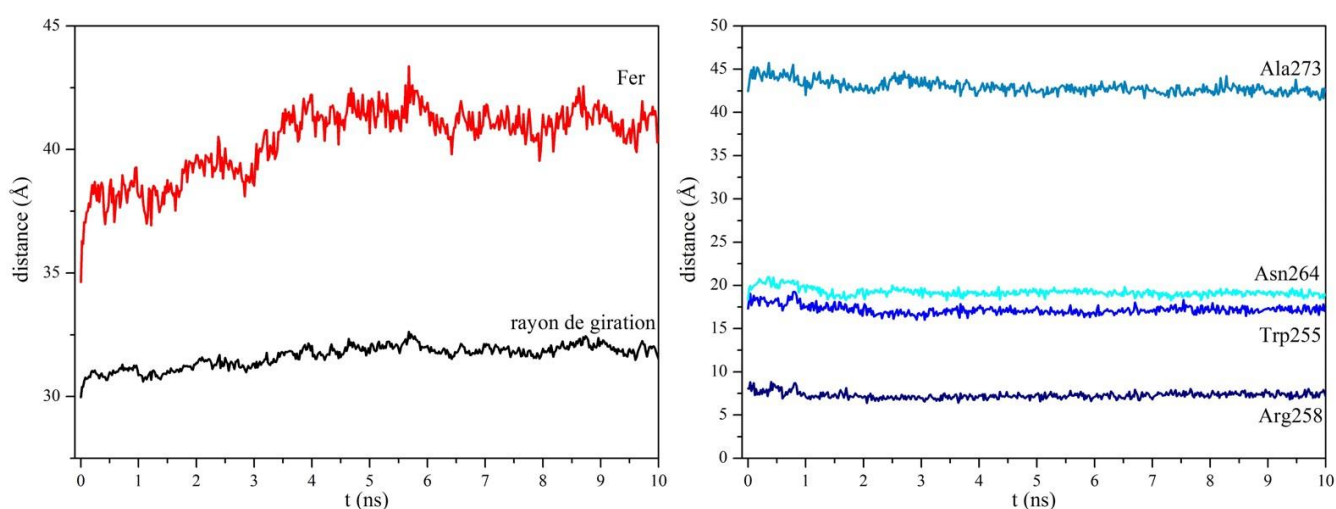


Figure 90- Suivi de distances interatomiques et du rayon de giration de la protéine au cours de la dynamique moléculaire en absence de cofacteur.
 Le rayon de giration est représenté en noir et la distance Fer-Fer en rouge (gauche).
 Le cadre de droite présente les distances entre les $C\alpha$ des résidus des hélices α , représentés Figure 89.

Les distances entre les deux résidus arginine (bleu marine) et entre les deux résidus tryptophane (bleu) ne varient pratiquement pas au cours de la dynamique moléculaire. Ces derniers étant situés au cœur de la zone d'interaction entre les deux hélices α , cela indique que celle-ci est maintenue au cours de la dynamique moléculaire. La distance entre les deux asparagines situées au milieu des hélices fluctue légèrement pendant les deux premières nanosecondes de la dynamique avant de se stabiliser autour de 18Å, ce qui est très proche de sa valeur initiale ; sur la structure, cette variation se traduit par une légère déformation des hélices. On note enfin que les variations de distance entre les deux résidus alanine sont plus marquées, ce qui indique une certaine flexibilité de l'extrémité C-terminale de ces hélices. Cela n'est pas surprenant étant donné que ces résidus ne sont pas impliqués dans l'interaction entre les deux monomères. De manière globale, les positions relatives des deux hélices α varient peu au cours de la dynamique moléculaire et se stabilisent après environ 3ns.

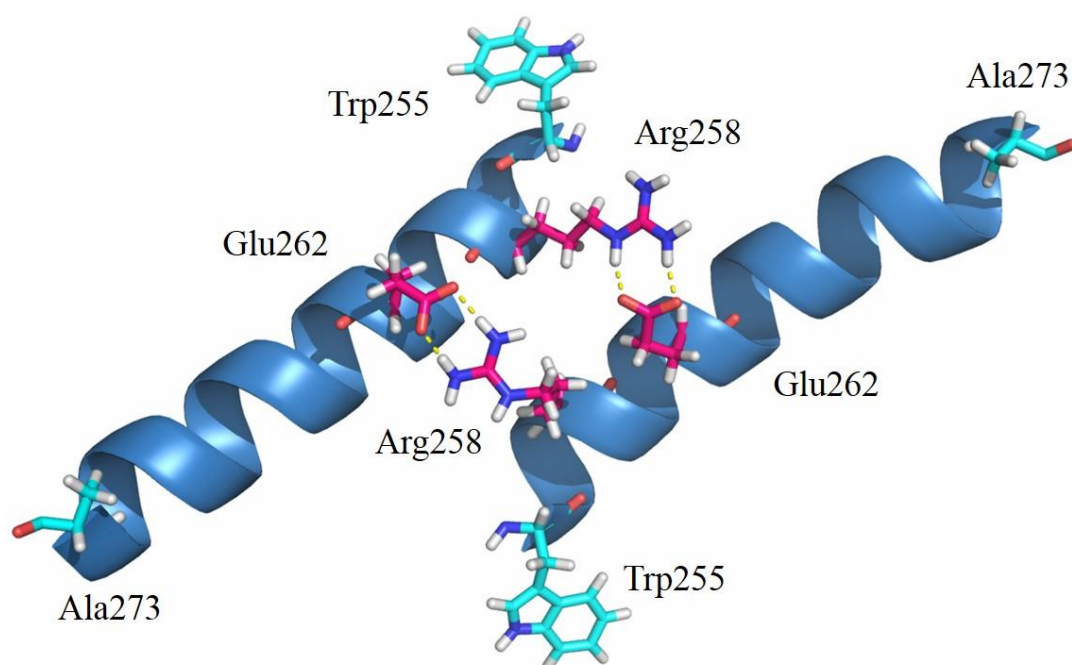


Figure 91- Interactions entre les hélices α responsables de la cohésion du dimère.

On a représenté en cyan les premiers et derniers résidus de chaque hélice et en magenta les résidus impliqués dans l'interaction.

Les liaisons hydrogène/ioniques sont représentées en pointillés jaunes.

Figure réalisée avec Pymol à partir de la dernière structure de la dynamique moléculaire.

L'analyse de la structure finale révèle également la présence d'une interaction particulièrement robuste entre l'arginine 258 d'un monomère et le glutamate 262 de l'autre monomère qui expliquerait qu'on n'observe pas de dissociation du dimère malgré l'absence de cofacteur (Figure 91). Étant donné que l'arginine et le glutamate sont tous deux chargés à pH physiologique, respectivement positivement et négativement, cette interaction présente un caractère ionique qui explique sa grande stabilité. Elle n'est cependant pas propre à deiNOS puisque le résidu glutamate est présent chez bsNOS[21], iNOS[20] et gsNOS[23] et qu'on

retrouve aussi le résidu arginine chez iNOS ; ce dernier est remplacé par une lysine chez gsNOS, également protonée à pH physiologique, et une glutamine chez bsNOS qui possède une fonction amine capable d'interagir avec le groupement carboxylate porté par le glutamate (Cf. alignement en annexe 1).

Ces résultats de dynamique moléculaire indiquent que l'interaction entre les deux hélices α est particulièrement stable et qu'elle est de plus suffisamment forte pour empêcher la dissociation du dimère malgré son relâchement et la perte partielle de structure secondaire au niveau de l'interface entre les deux monomères. On remarque enfin que l'hème semble très exposé au solvant (Figure 88), ce qui pourrait expliquer que deiNOS précipite assez facilement en absence de cofacteur.

4.2.2. Evolution en présence du cofacteur H₄F

On a ensuite produit des dynamiques moléculaires en présence du cofacteur H₄F, afin d'observer son influence sur la stabilité du dimère et de tenter de mettre en évidence les résidus impliqués dans sa fixation.

4.2.2.1. Structure du cofacteur

Le noyau ptérine du cofacteur H₄F issu de la structure 1M7V de bsNOS, et donc présent dans la structure calculée pour deiNOS, est pratiquement plan, ce qui n'est pas cohérent avec la présence sur le second cycle de deux carbones tétraonaux, dont un asymétrique (*)[87]. Il est donc probable qu'il s'agisse plutôt du cofacteur oxydé H₂F, qui ne possède, sur ce second cycle, qu'un seul carbone tétraogonal (Figure 92). Cette oxydation du cofacteur H₄F en H₂F pourrait être due à l'irradiation du cristal avec les rayons X nécessaires à la mesure.

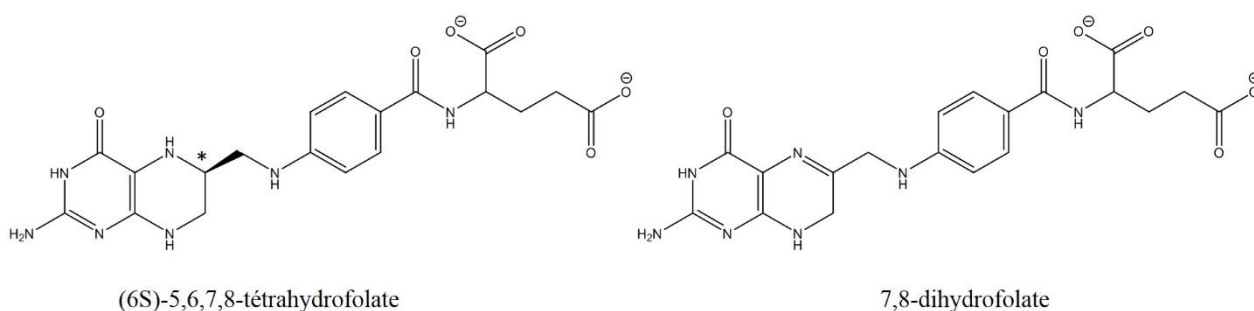


Figure 92- Formules chimiques du tétrahydrofolate (H₄F, gauche) et de sa forme oxydée dihydrofolate (H₂F, droite).

Etant donné qu'il semble avoir un impact sur la structure et la stabilité de deiNOS (Cf. § 3.2.2.2), il est important de déterminer l'état redox du cofacteur avant de procéder aux calculs de dynamique moléculaire. On utilise donc le logiciel ORCA pour calculer une structure optimisée pour H₄F et pour H₂F. Afin de pouvoir réinsérer le cofacteur optimisé au sein du site actif de deiNOS, on effectue un calcul à partir du H₄F du monomère A et un autre à partir de celui du monomère B. Les hydrogènes étant absents du fichier de structure, on utilise le logiciel Chimera pour les ajouter et choisir ainsi l'état redox du cofacteur. Les structures obtenues pour H₂F (gauche) et H₄F (droite) sont présentées Figure 93.

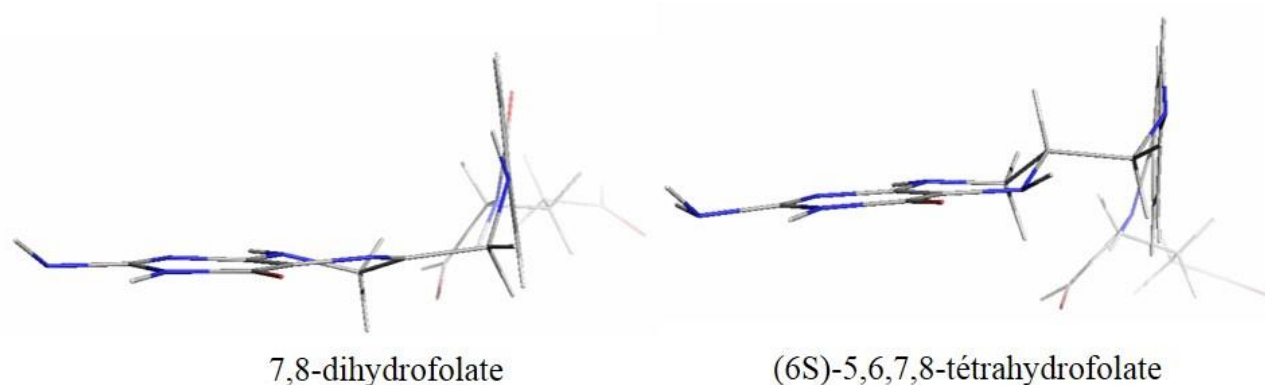


Figure 93- Structure des cofacteurs H₂F (gauche) et H₄F (droite) après optimisation par ORCA.

La principale différence entre ces deux structures se situe au niveau de l'atome de carbone qui fait le lien entre le noyau ptérine et la chaîne latérale : on retrouve, comme attendu, un carbone trigonal plan pour H₂F, dû à la liaison double C=N, et deux carbones tétraonaux pour H₄F. En conséquence, le motif ptérine de H₂F est pratiquement plan alors que celui de H₄F adopte une conformation de type demi-chaise. Ces résultats sont en accord avec les structures cristallographiques obtenues pour différentes ptérines réduites et oxydées[87]. Si on compare maintenant ces deux structures optimisées avec celle du cofacteur issu de la structure de deiNOS, on remarque qu'elle se rapproche davantage de celle de H₂F que de H₄F, en ce qui concerne le noyau ptérine ; il s'agit donc probablement de la forme oxydée.

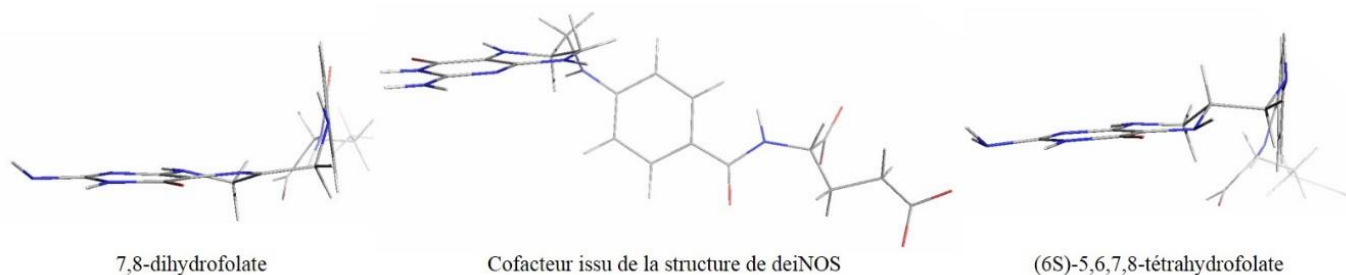


Figure 94 - Comparaison des structures des cofacteurs optimisées avec ORCA avec celle issue de la structure de deiNOS.

On retrouve également la courbure de la chaîne latérale vers le noyau ptérine observée en solution pour H₄B[87], ce qui n'est pas le cas pour la structure issue de la cristallographie. On peut donc supposer que la position particulière de la chaîne latérale du cofacteur au sein de la protéine serait due à des interactions stabilisantes avec différents résidus situés à proximité. Les dynamiques moléculaires réalisées en présence du cofacteur H₄F devraient nous permettre de retrouver ces interactions.

4.2.2.2. Structure globale et stabilité du dimère

Lors de l'optimisation de la structure du cofacteur H₄F par ORCA, on observe un déplacement assez important du motif ptérine. Lorsqu'on introduit ce cofacteur optimisé dans la structure calculée par Modeller, ce dernier se trouve alors nettement plus loin de l'hème et ne peut donc plus former la liaison hydrogène avec l'un des groupements propionate, généralement observée dans les structures cristallographiques[20, 21 ,23]. La poursuite de la dynamique moléculaire à partir de cette structure ne permet pas de retrouver cette interaction et conduit à la sortie du cofacteur du site actif. Afin de maintenir H₄F à proximité de l'hème, en accord avec les résultats expérimentaux décrits précédemment, on a donc réalisé une dynamique moléculaire directement à partir de la structure générée par Modeller. Les protons étant explicitement pris en compte, H₄F devrait retrouver une conformation proche de celle obtenue avec ORCA au cours du calcul. Ce point sera discuté au paragraphe suivant.

Comme en absence de H₄F, on effectue une dynamique moléculaire sur 10ns. La structure finale est représentée Figure 95, avec la structure de départ. On note tout d'abord que les deux hèmes sont plus éloignés qu'avant la dynamique puisqu'on a une distance Fe-Fe finale d'environ 37 Å, contre 34,5Å avant la dynamique. On a toutefois un dimère plus compact qu'en absence de cofacteur ce qui est cohérent avec l'effet stabilisant de H₄F observé expérimentalement. On remarque tout de même une certaine perte de structure secondaire au niveau de l'interface entre les deux monomères (Figure 95, cercle bleu) et des hélices α N-terminales (Figure 95, cercle rouge). Enfin le déplacement (Figure 95, cercle orange, gauche) et le raccourcissement (Figure 95, cercle orange, droite) de l'hélice α et des feuillets β situés à proximité de l'hème augmentent l'exposition du site actif. Ceci pourrait expliquer la différence de stabilité entre bsNOS et deiNOS, même en présence de substrat et de cofacteur et appuie l'hypothèse d'un partenaire *in vivo* qui stabiliserait l'enzyme et pourrait également être impliqué dans la catalyse grâce à un hème relativement accessible[34].

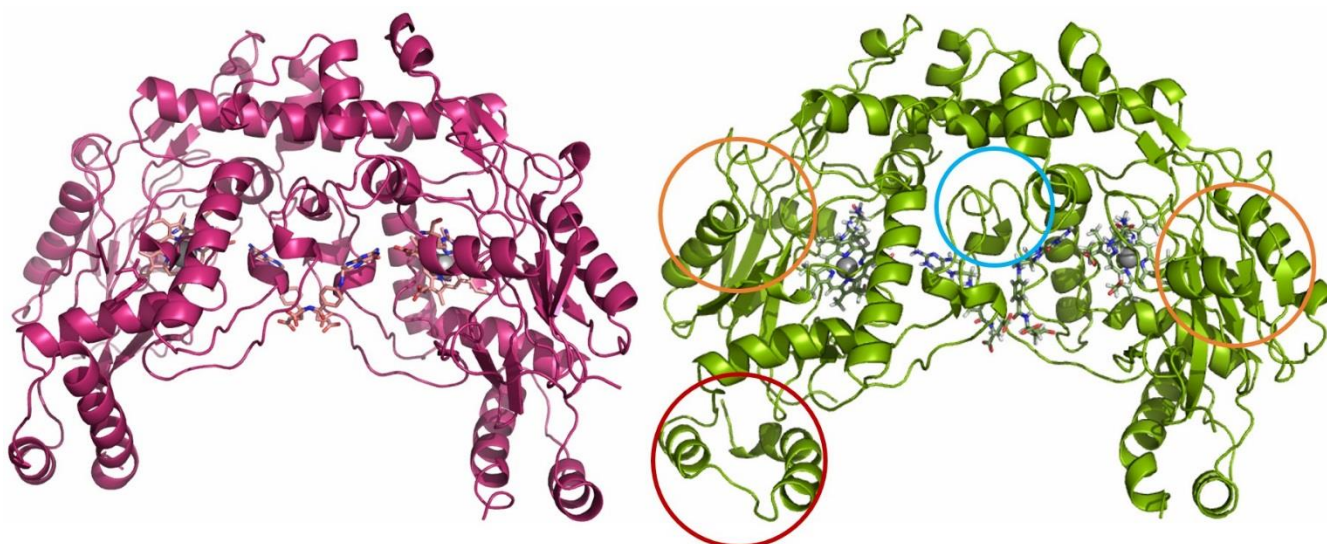


Figure 95 - Comparaison des structures obtenues pour deiNOS avant (gauche, rose) et après (droite, vert) la dynamique moléculaire (10ns) en présence de cofacteur.
L'hème, l'arginine et le cofacteur H₄F sont également représentés.
Figure réalisée avec PyMol.

Afin d'avoir une vision plus globale de l'évolution de la structure au cours de la dynamique, on a suivi l'évolution du rayon de giration ainsi que de la distance entre les deux atomes de fer et entre les résidus des hélices α impliquées dans la cohésion du dimère (Figure 89). On a également vérifié la stabilité du système et l'évolution du RMSD, de l'énergie, de la température et de la pression au cours de la simulation est présentée en annexe 4. Afin de faciliter la comparaison entre les deux dynamiques moléculaires en absence et en présence de H₄F, on a utilisé les mêmes échelles pour représenter l'évolution de ces distances.

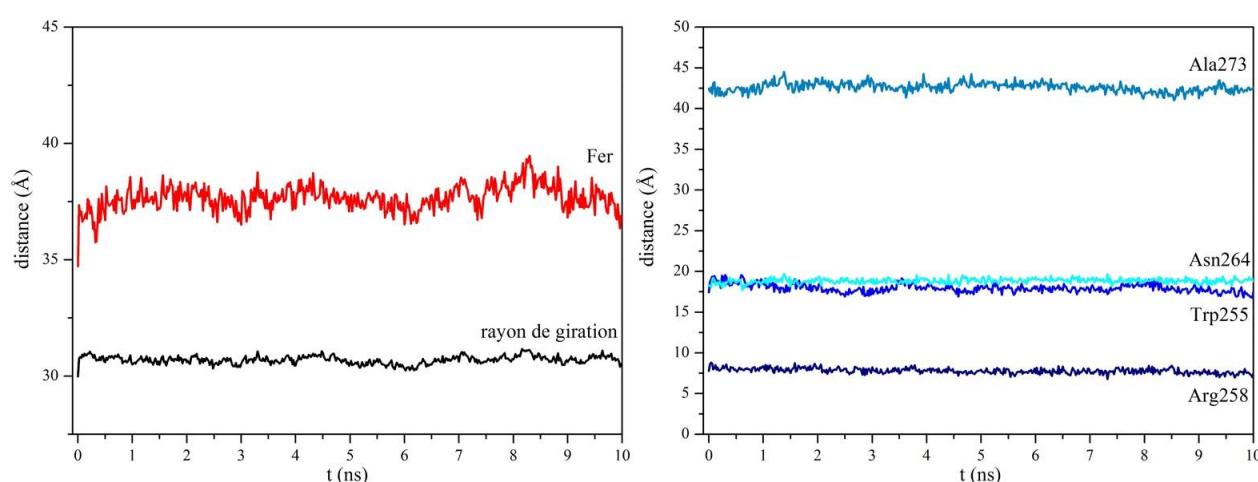


Figure 96 - Suivi de distances interatomiques et du rayon de giration de la protéine au cours de la dynamique moléculaire en présence de cofacteur.
Le rayon de giration est représenté en noir et la distance Fer-Fer en rouge (gauche).
Le cadre de droite présente les distances entre les Ca des résidus des hélices α , représentés Figure 89

Concernant la distance Fe-Fe, on retrouve l'augmentation rapide en tout début de dynamique, mais comme le rayon de giration, celle-ci se stabilise très rapidement, après moins d'une nanoseconde d'évolution (environ 3,5ns en absence de cofacteur) ce qui indique que la protéine est rigidifiée par la présence du cofacteur, conformément aux résultats obtenus par spectroscopie. Le rayon de giration plus faible ($\approx 31\text{\AA}$ vs $\approx 32,5\text{\AA}$ en absence de cofacteur) et la plus grande proximité entre les deux hèmes (Fe-Fe $\approx 37,5\text{\AA}$ vs $\approx 41\text{\AA}$ en absence de cofacteur) confirment la compacité du dimère observée sur la dernière structure (Figure 95).

Les distances entre les résidus des deux hélices α évoluent très peu au cours de la dynamique et on retrouve l'interaction entre le glutamate 262 d'un monomère et l'arginine 258 de l'autre monomère. Il n'y a que peu de différences par rapport à la dynamique réalisée en absence de cofacteur ce qui n'est pas surprenant étant donné qu'il est situé assez loin de ces hélices. On retrouve également la déformation des hélices α N-terminales (Figure 95, cercle rouge) et le déplacement de certaines hélices situées au-dessus de l'hème (Figure 95, cercles oranges) qui rend ce dernier plus accessible au solvant que dans la structure initiale. L'impact du cofacteur sur la stabilité de l'enzyme est donc lié à des effets à plus courte distance, comme par exemple le maintien partiel de la structure secondaire au niveau de l'interface entre les deux monomères (Figure 88 et Figure 95, cercles bleus). Des calculs de dynamique moléculaire à partir des structures cristallographiques de bsNOS, iNOS et gsNOS nous permettraient de déterminer si ce comportement en solution est propre à deiNOS.

4.2.2.3. Fixation de H₄F

Lors des différentes étapes précédant la dynamique moléculaire proprement dite (Cf. Chapitre II), on remarque déjà des différences de comportement entre les deux monomères, bien que le dimère initial soit pratiquement symétrique.

Dans le cas du monomère A (Figure 97), on observe une modification non négligeable de la position du cofacteur par rapport à l'hème qui tend à s'en éloigner après chaque étape (sauf la solvation). On a en particulier une augmentation de la distance entre l'azote du cycle du motif ptérine et l'oxygène de groupement propionate qui forment une liaison hydrogène dans les structures cristallographiques. Ainsi, ces deux atomes sont distants de $3,4\text{\AA}$ avant même le début de la dynamique moléculaire, et l'atome d'oxygène du propionate de l'hème n'est absolument pas dans l'axe de la liaison N-H (Figure 97, gauche, bleu). La dynamique ne permet pas de se rapprocher de la position cristallographique puisqu'on termine avec une distance d'environ $4\text{\AA}$ entre l'oxygène du propionate et les hydrogènes portés par chacun des deux azotes du motif ptérine qui, de plus, ne pointent pas dans une direction favorable à une interaction entre l'hème et le cofacteur (Figure 97, droite, violet).

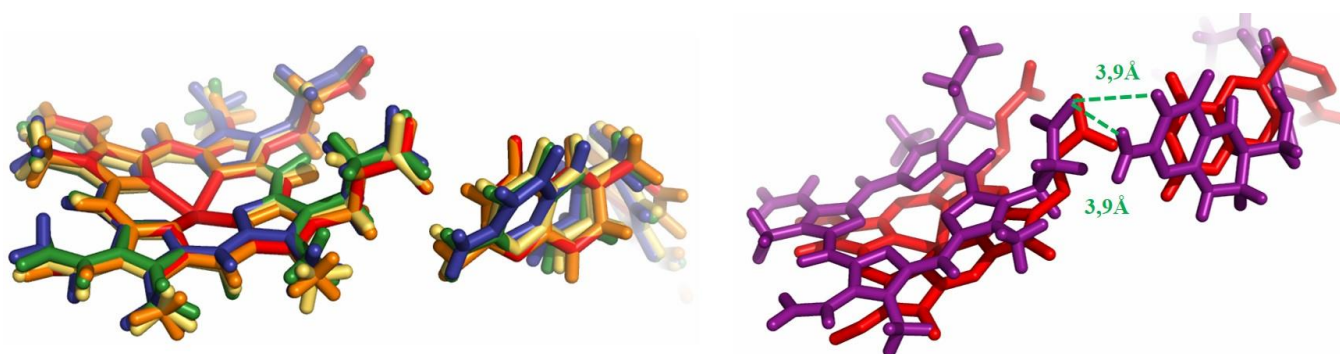


Figure 97 - Evolution des positions relatives de l'hème et du cofacteur H₄F au cours des différentes étapes de la dynamique moléculaire pour le monomère A.

La figure de gauche présente l'hème et le cofacteur issus des structures obtenues avec Modeller (rouge) puis après solvation (orange), minimisation de l'énergie (jaune), équilibration de la température du système (vert) et de sa pression (bleu).

La figure de droite présente l'hème et le cofacteur issus des structures obtenues avec Modeller (rouge) et après la dynamique moléculaire (violet). Les distances entre l'oxygène du propionate et les deux hydrogènes du motif ptérine susceptibles d'interagir avec ce dernier, après la dynamique sont représentées en vert.

Figure réalisée avec PyMol.

Concernant le monomère B (Figure 98), on observe également une modification de la position du cofacteur en particulier lors de l'équilibration de la pression (Figure 98, gauche, bleu). Cependant, contrairement au monomère A, il reste à proximité de l'hème et son interaction avec celui-ci est même renforcée puisqu'il peut à présent former des liaisons hydrogène avec les deux oxygènes du groupement propionate. On a donc un point de départ de la dynamique proprement dite plus favorable au maintien de H₄F à proximité de l'hème. En effet, sur la dernière structure obtenue (Figure 98, droite, violet) on trouve des distances entre un oxygène du groupement propionate et deux hydrogènes du motif ptérine (portés par un azote) plus courtes que dans le cas du monomère A. On note tout de même que le cofacteur s'est éloigné de l'hème au cours de la dynamique et que l'orientation du noyau ptérine est assez différente ce qui suggère une interaction π - π avec un résidu aromatique qui le stabiliserait dans cette position.

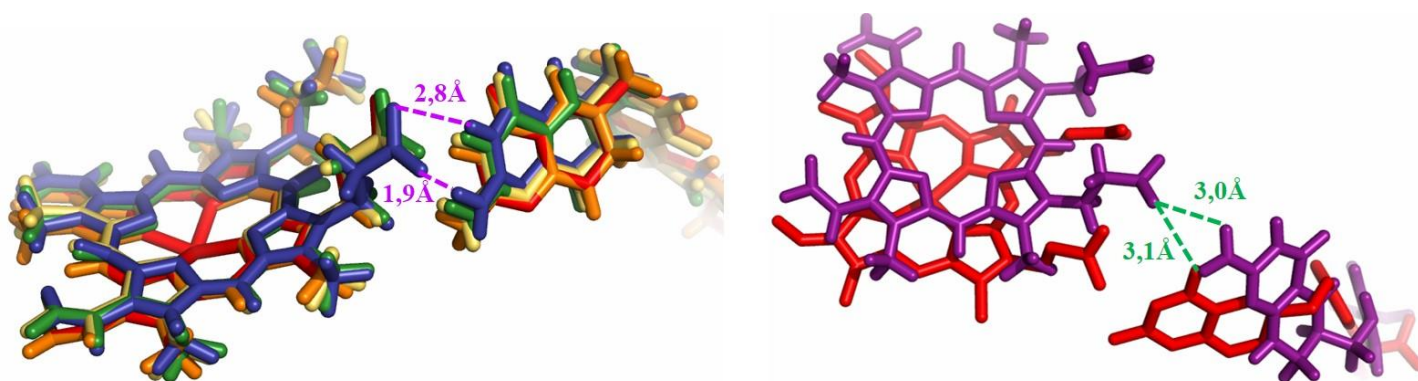


Figure 98 - Evolution des positions relatives de l'hème et du cofacteur H₄F au cours des différentes étapes de la dynamique moléculaire pour le monomère A.

La figure de gauche présente l'hème et le cofacteur issus des structures obtenues avec Modeller (rouge) puis après solvation (orange), minimisation de l'énergie (jaune), équilibrage de la température du système (vert) et de sa pression (bleu). Les distances entre les oxygènes du propionate et les deux hydrogènes du motif ptérine susceptibles d'interagir avec ces derniers, après l'équilibrage de la pression sont représentées en fuchsia.

La figure de droite présente l'hème et le cofacteur issus des structures obtenues avec Modeller (rouge) et après la dynamique moléculaire (violet). Les distances entre l'oxygène du propionate et les deux hydrogènes du motif ptérine susceptibles d'interagir avec ce dernier, après la dynamique sont représentées en vert.

Figure réalisée avec PyMol.

On a donc cherché à identifier les résidus en interaction avec le motif ptérine de H₄F ainsi que ceux impliqués dans la stabilisation de sa chaîne latérale (Figure 99). Concernant le noyau ptérine, on retrouve l'interaction avec le résidu tryptophane (Trp308) présent au sein du site actif et conservé chez l'ensemble des NOS et avec un second tryptophane (Trp321) appartenant à l'autre monomère et qui est remplacé par une phénylalanine chez iNOS, bsNOS et gsNOS. Quant à la chaîne latérale, elle est stabilisée par une interaction π - π entre son motif ptérine et un résidu tryptophane de l'autre monomère (Trp306) et par des liaisons hydrogène, voire des interactions ioniques, entre ses deux motifs carboxylates et une lysine (Lys305) et une arginine (Arg324) de l'autre monomère ; l'azote de la liaison peptidique entre Lys305 et Trp306 peut également former une liaison hydrogène avec l'un des groupements carboxylates de H₄F. Parmi ces trois résidus, seul le tryptophane (Trp306) est conservé à la fois chez les mNOS que les bacNOS[20, 21, 23]. L'arginine (Arg324) est remplacée par une sérine, polaire et susceptible de former une liaison hydrogène, chez bsNOS et gsNOS et un glutamate chez iNOS, peu propice à l'interaction avec le groupement carboxylate du cofacteur ; ceci suggère que les bacNOS seraient effectivement optimisées pour la fixation de H₄F et la stabilisation de sa longue chaîne latérale. Enfin, la lysine (Lys305) est remplacée chez iNOS, bsNOS et gsNOS par un acide aspartique (*Cf.* alignement en annexe 1). Il semblerait donc que, parmi les bacNOS, deiNOS soit la plus adaptée à l'utilisation du cofacteur H₄F, ce qui n'exclut pas toutefois qu'il soit aussi le cofacteur naturel de bsNOS ou gsNOS.

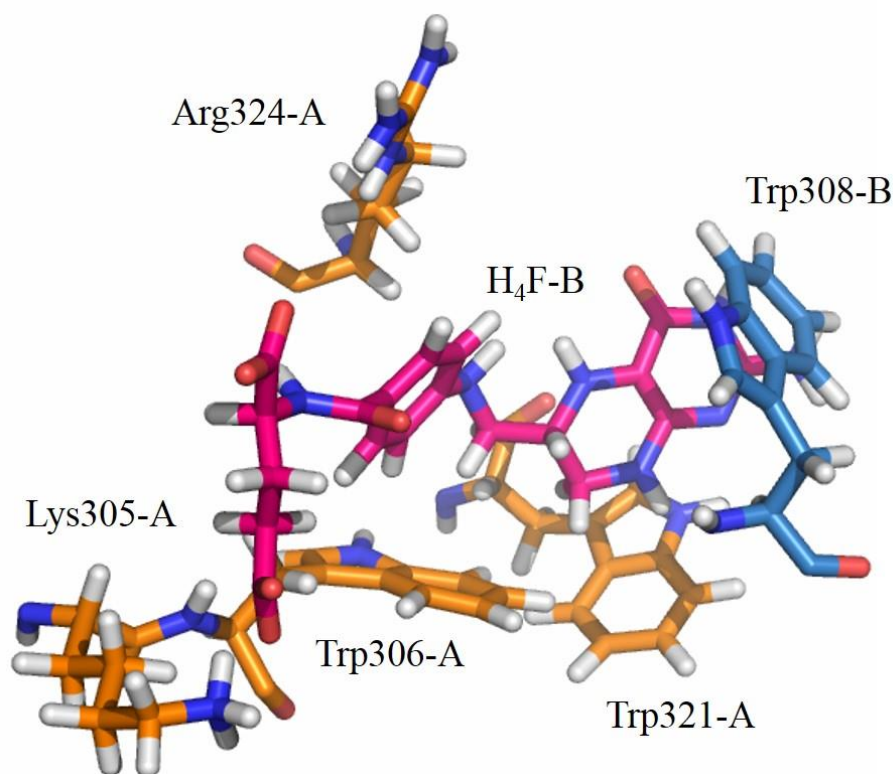


Figure 99 - Résidus impliqués dans la fixation du cofacteur H_4F .

Le cofacteur H_4F du monomère B est représenté en rose, les résidus du monomère B en bleu et ceux du monomère A en orange. Malgré des positions du cofacteur et des acides aminés différentes, on retrouve des interactions semblables pour le H_4F du monomère A.

Figure réalisée avec PyMol à partir de la dernière structure de la dynamique moléculaire.

On note que la chaîne latérale de H_4F -B interagit uniquement avec des résidus du monomère A (et vice-versa) ; cette implication du second monomère dans la stabilisation de la chaîne latérale du cofacteur est probablement à l'origine de son éloignement de l'hème. On peut donc envisager que cet éloignement du cofacteur qui reste tout de même au sein de la structure, représente ce qui se passe effectivement en solution. Cela expliquerait notamment que l'activation de l'oxygène soit plus lente que pour les NOS de mammifères. Il est toutefois possible que cette position originale du cofacteur soit due au fait que sa structure initiale correspond à celle du folate oxydé H_2F qui n'a pas le même mode de fixation que H_4F (Cf. §3.2.2), la dynamique n'étant apparemment pas assez longue pour lui permettre d'adopter la conformation demi-chaise caractéristique des ptérines réduites[87]. On peut donc envisager de réaliser de nouveaux calculs de dynamique moléculaire à partir de la structure optimisée du cofacteur, en imposant des contraintes de distances de façon à maintenir la liaison hydrogène entre le groupement carboxylate de l'hème et le noyau ptérine. Enfin, l'utilisation d'une approche multi-échelle de type QM/MM lors de l'optimisation de la structure du cofacteur permettrait de prendre en compte ses interactions avec l'hème et certains acides aminés,

notamment W308 et W321 (Figure 99) et donc d'obtenir une structure de départ plus réaliste pour la dynamique moléculaire.

4.3. Conclusion

L'utilisation des outils informatiques nous a permis de construire une structure tridimensionnelle du dimère de deiNOS et de retrouver l'importance du cofacteur dans sa stabilité, observée expérimentalement.

L'analyse de la structure finale après 10ns de dynamique moléculaire en présence de H₄F révèle une importante asymétrie du dimère et une position du cofacteur assez éloignée de celle de la structure cristallographique de bsNOS. Une meilleure optimisation du cofacteur avant le début de la dynamique devrait nous permettre de déterminer si cette position peut correspondre à une réalité biologique. L'analyse approfondie de la dynamique moléculaire devrait aussi nous permettre de retrouver les molécules d'eau cristallographiques impliquées dans le réseau de liaisons hydrogène. On envisage également d'effectuer des calculs de dynamique moléculaire à partir des structures cristallographiques de bsNOS et gsNOS pour savoir si on retrouve cette position du cofacteur ou si elle est propre à deiNOS. En effet, il est possible que la structure cristallisée ne soit pas représentative de celles adoptées par l'enzyme en solution.

Concernant la stabilité du dimère de deiNOS, des analyses sont actuellement en cours afin de déterminer le type d'interactions à l'origine de sa formation et les résidus impliqués dans sa cohésion ; la comparaison avec les structures de bsNOS et gsNOS devrait alors nous permettre de mieux comprendre les différences de stabilité observées entre ces trois enzymes. On cherche également à repérer des sites possibles pour l'interaction avec la TrpRSII dont la structure a été résolue, ou avec une éventuelle réductase. Cela devrait notamment nous permettre de savoir si le dimère de deiNOS a une réalité biologique puisque contrairement aux mNOS, il n'y a *a priori* aucune raison pour que les bacNOS ne soient pas actives sous forme monomérique. De plus, la formation d'un complexe 1:1 avec la TrpRSII montre que l'homodimère n'est pas l'état le plus favorable pour deiNOS ; son observation *in vitro* pourrait donc être simplement due à l'absence d'autre partenaire protéique.

5. Conclusion

L'étude spectroscopique et cinétique réalisée sur deiNOS nous a montré qu'elle possède des caractéristiques structurales et électroniques semblables à celles des autres NOS caractérisées et qu'elle est capable de catalyser l'hydroxylation de l'arginine et l'oxydation du NOHA en présence de H₄B comme de H₄F. En absence de cofacteur, elle présente un Fe^{III} très majoritairement BS et son dimère est peu stable ce qui la rapproche davantage de iNOS que de bsNOS et suggère donc que les bacNOS ne formeraient pas un groupe homogène. De plus, ses spectres de Fe^{II}NO tendent à présenter une plus forte proportion d'espèce axiale que n'importe quelle autre NOS[156, 213,216]. Comme on ne connaît pas l'origine de cette espèce, ce résultat est assez difficile à interpréter en termes de structure mais il montre tout de même que deiNOS présente un comportement original.

Ce caractère unique de deiNOS se retrouve lors de l'étude de son cycle catalytique puisqu'on observe un intermédiaire supplémentaire lors de l'oxydation du NOHA en présence du cofacteur H₄F. Bien que celui-ci n'ait pour l'instant pas pu être identifié avec certitude, sa présence suggère qu'on pourrait avoir un mécanisme moléculaire légèrement différent de celui des autres bacNOS qui serait à rapprocher des fonctions *in vivo* actuellement décrites pour deiNOS. En effet, il semblerait que contrairement aux autres bactéries possédant une NOS, *Deinococcus radiodurans* n'utilise pas la sienne pour la détoxification des ROS mais plutôt comme intermédiaire dans différentes cascades de signalisation[162,176] ou pour des réactions de nitrosation[33]. Ces deux fonctions assez différentes sont parfaitement cohérentes avec l'existence de deux voies de libération du NO^{*}, la plus lente permettant sa séquestration en vue, par exemple, de la nitration du tryptophane observée en présence de TrpRSII[33, 34].

Enfin, la relative instabilité de la protéine observée expérimentalement et confirmée par les calculs de dynamique moléculaire, même en présence de substrat et de cofacteur, pose la question de l'existence de partenaires protéiques *in vivo* et de la pertinence biologique du dimère de deiNOS. Une réponse partielle pourrait être apportée par la construction d'un modèle tridimensionnel pour le complexe deiNOS:TrpRSII, à partir de notre modèle de deiNOS et de la structure cristallographique de TrpRSII[234], et l'évaluation de sa stabilité. Ce modèle nous permettrait également de déterminer le(s) site(s) de fixation du tryptophane au sein de ce complexe. Concernant le(s) partenaire(s) redox de deiNOS, une analyse de son génome devrait permettre d'identifier plusieurs candidats, homologues ou non au domaine réductase des mNOS, afin de tester ensuite leur activité *in vitro* puis *in vivo*, via la génération de mutants de délétion.

Chapitre V

**Etude complémentaire de deux NOS-like
proteins issues de *Geobacillus*
stearothermophilus et *Ostreococcus tauri*.**

1. Caractérisation d'une NOS bactérienne thermostable

1.1. Introduction

Geobacillus stearothermophilus est un organisme thermophile présent dans les sols, les sédiments océaniques et certaines sources chaudes et qui possède une protéine homologue au domaine oxygénase des NOS de mammifères, gsNOS[23]. Comparée aux autres NOS bactériennes, celle-ci possède une extension N-terminale de 13 acides aminés qui lui confère une certaine thermostabilité : sa température de dénaturation est de 80°C, contre 60°C pour la NOS de *Bacillus subtilis*. Il a également été montré qu'elle formait un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ particulièrement stable, ce qui suggère que toutes ses cinétiques pourraient être ralenties, comparé aux autres bacNOS précédemment caractérisées[23]. L'utilisation de gsNOS pourrait donc permettre d'identifier des intermédiaires réactionnels généralement trop instables pour être observés et donc de mieux comprendre le mécanisme catalytique des NO-synthases qui comporte actuellement de nombreuses inconnues.

L'utilisation de la cryoréduction a permis de mettre en évidence des différences de comportement selon que la réaction a lieu en présence d'arginine ou de NOHA[156,235]. En présence d'arginine, la fixation du dioxygène sur l'hème ferreux est suivie de la formation d'un complexe hydroperoxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$, l'hydrogène étant porté par l'oxygène distal. Le fait que cette protonation se fasse à basse température (77K) indique que le donneur de proton est extrêmement proche de l'hème. Bien que la présence du substrat modifie le réseau de liaisons hydrogène, celui-ci n'est pas directement impliqué dans ce processus de transfert de proton puisque le complexe hydroperoxo est également observé en absence de substrat[156]. Ceci est cohérent avec une double protonation de l'oxygène distal, suivie de la libération d'une molécule d'eau et de la formation du *Compound I*, qui est généralement considéré comme l'oxydant final dans la réaction d'hydroxylation de l'arginine par les NOS. Les résultats obtenus en présence de NOHA sont, quant à eux, incompatibles avec la formation d'un composé de type *Compound I* et suggèrent plutôt l'utilisation d'un complexe hydroperoxo comme oxydant final[156]. L'utilisation d'analogues du NOHA simplement ou doublement méthylés au niveau du motif guanidinium indique que celui-ci est impliqué dans le réseau de liaisons hydrogène nécessaire à la protonation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et à la production de citrulline[235].

On note toutefois que, dans les expériences de cryoréduction décrites ci-dessus, on observe une production de NOHA (en présence d'arginine) ou de citrulline (en présence de NOHA) même en absence de tout cofacteur, contrairement aux réactions effectuées en solution[23, 156,235]. Cette technique ne permet donc pas d'étudier le rôle du cofacteur et l'étape d'activation de l'oxygène proprement dite.

Dans le cadre de cette étude, on a tout d'abord cherché à étudier l'influence des substrats et du cofacteur sur l'environnement structural et électronique de l'hème. Pour cela

on a caractérisé les complexes Fe^{III} , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de gsNOS, préparés en absence et en présence de substrat et de cofacteur, par spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE. On a également réalisé une étude cinétique par *stopped-flow* afin de compléter les études précédentes en solution et en cryoréduction, et de mieux comprendre le mécanisme catalytique de gsNOS et des NOS bactériennes en général.

Le génome de *Geobacillus stearothermophilus* a récemment été entièrement séquencé et il semble qu'il ne contienne pas d'homologue de la 6-pyrovoyl tétrahydroptérine synthase et de la sépiaptérine réductase nécessaires à la biosynthèse de H_4B [32]. Il est donc probable que gsNOS utilise plutôt le cofacteur H_4F , comme cela a déjà été proposé pour deiNOS. De plus, gsNOS ne possède pas une très bonne affinité pour H_4B [186] ; c'est pourquoi on a choisi H_4F pour réaliser cette étude spectroscopique et cinétique de gsNOS.

1.2. Etude spectroscopique

1.2.1. Etat natif Fe^{III}

On s'est tout d'abord intéressé à l'état natif Fe^{III}. La protéine étant suffisamment stable pour être produite et purifiée en absence de substrat et de cofacteur, on a ainsi pu préparer des complexes protéiques avec différentes combinaisons de substrats, produit et cofacteur.

1.2.1.1. En absence du substrat et de cofacteur

Le spectre d'absorption UV-visible du complexe Fe^{III} de gsNOS préparé en absence de substrat et de cofacteur présente un maximum à 404nm, caractéristique d'un mélange de Fe^{III} HS et BS ; la présence de Fe^{III} BS est confirmée par un épaulement à 421nm (Figure 100, gauche)[80,202].

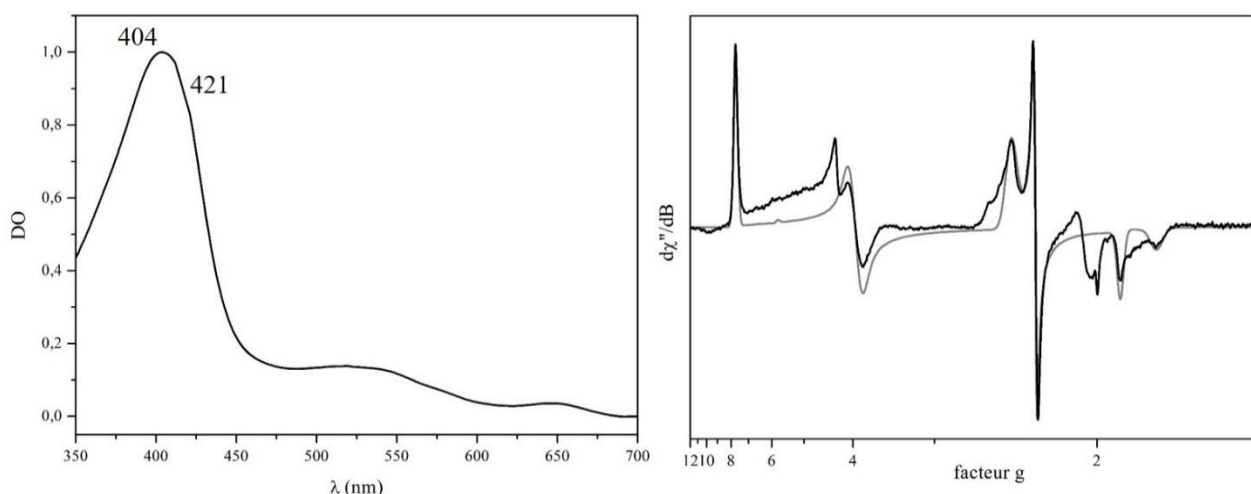


Figure 100- Spectres d'absorption UV-visible (gauche) et RPE (droite) du complexe Fe^{III} en absence de substrat et de cofacteur.

Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10% ; chemin optique 1cm. Spectre normalisé.

Conditions d'enregistrement RPE : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW, amplitude de modulation 2mT. Le spectre simulé est représenté en gris.

Le Fe^{III} BS est saturé, mais non déformé : un spectre centré sur la zone g=2 a été enregistré en conditions non saturantes et utilisé pour déterminer les paramètres RPE du Fe^{III} BS.

Ces données sont confirmées par le spectre RPE du complexe (Figure 100, droite) sur lequel on observe des signaux caractéristiques du Fe^{III} HS, vers g=8, g=4 et g=1,8 (Table 25, gauche), ainsi que de Fe^{III} BS autour de g=2,29[23]. De plus, la présence d'un épaulement sur les deux valeurs de g extrêmes du Fe^{III} BS indique qu'on a deux voire trois conformations ou espèces différentes ; seule l'espèce majoritaire a toutefois été prise en compte dans la simulation (Table 25, droite). Les conditions d'enregistrement choisies sont optimales pour l'observation du Fe^{III} HS mais saturantes pour le BS ; on ne peut donc pas conclure quant à la proportion de

chacune de ces espèces. Enfin, le dédoublement du pic vers $g=4$ indique qu'on a une proportion assez importante de fer non hémique dans l'échantillon.

Substrat/Cofacteur	Valeurs mesurées			Paramètres de simulation			
	g_1^{eff}	g_2^{eff}	g_3^{eff}	g_1	g_2	g_3	E/D
-/-	7,72	3,96	1,78	2,002	2,000	1,974	0,086
Arg/-	7,65	4,07	1,80	2,001	2,000	1,982	0,081
-/H ₄ F	7,69	3,97	1,79	2,001	2,000	1,979	0,083
Arg/H ₄ F	7,65	4,04	1,79	1,995	1,993	1,982	0,082
NOHA/H ₄ F	7,76	3,92	1,77	1,997	1,995	1,984	0,087

Substrat/Cofacteur	g_1	g_2	g_3
-/-	2,427	2,290	1,912
-/H ₄ F	2,494 2,398	2,297 2,290	1,876 1,914
Cit/H ₄ F	2,512 2,421	2,292 2,280	1,867 1,906

Table 25 - Paramètres RPE des complexes de Fe^{III} HS (gauche) et BS (droite).

Les valeurs de g des Fe^{III} BS sont issues des simulations représentées sur les figures 100 à 103.

Le Fe^{III} BS étant dû à la présence d'une molécule d'eau comme sixième ligand distal, ces résultats indiquent que, contrairement à bsNOS, le site actif de gsNOS est relativement accessible au solvant en absence de substrat et de cofacteur[21, 24]. La présence de plusieurs conformations de Fe^{III} BS suggère également une certaine flexibilité de la protéine. On note cependant que gsNOS ne précipite pas en solution, comme c'est par exemple le cas pour deiNOS, et que les raies du Fe^{III} BS sont plus fines et mieux définies que dans le cas de iNOS, préparé et enregistré dans les mêmes conditions. L'exposition du site actif de gsNOS au solvant ne semble donc compromettre ni son intégrité, ni la stabilité globale de l'enzyme.

1.2.1.2. Effets du cofacteur seul

On a cherché à savoir si, comme pour iNOS, la présence du cofacteur seul permettait la conversion complète du mélange de Fe^{III} HS et BS en Fe^{III} HS pur[31,189]. Le spectre d'absorption UV-visible du complexe Fe^{III} saturé en cofacteur H₄F et en absence de substrat est présenté Figure 101 (gauche, spectre orange). Le maximum d'absorption à 401nm indique qu'on a encore un mélange de Fe^{III} HS et BS puisque le maximum d'absorption pour les Fe^{III} HS de NOS se situe généralement vers 397nm[80].

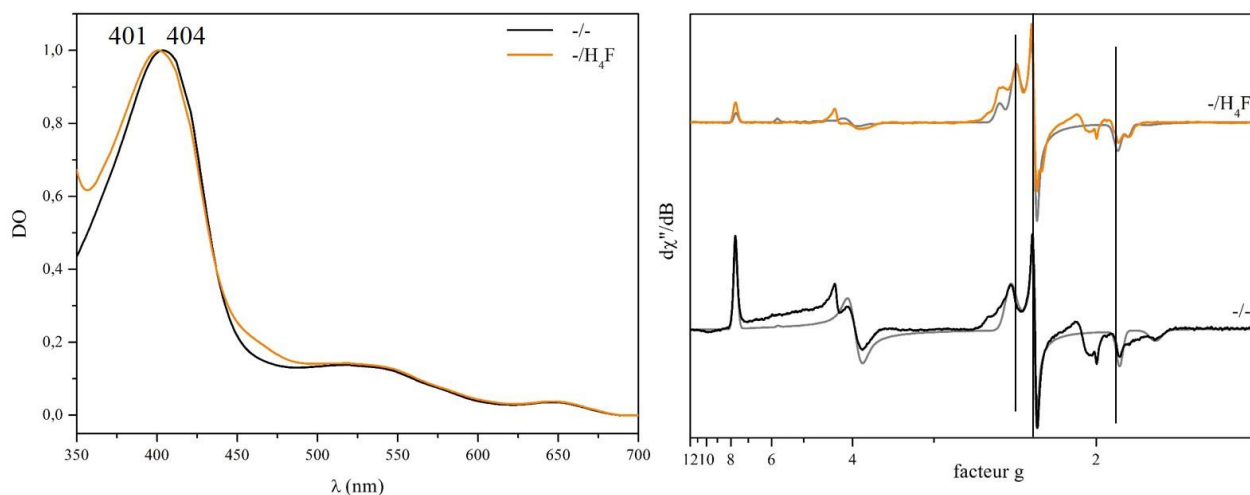


Figure 101 - Effets du cofacteur H₄F sur les spectres d'absorption UV-visible (gauche) et RPE (droite) du complexe Fe^{III}. Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, H₄F 500μM, DTT 3mM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés. Conditions d'enregistrement RPE : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW, amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris. Les Fe^{III} BS sont saturés, mais non déformés : des spectres centrés sur la zone g=2 ont été enregistrés en conditions non saturantes et utilisés pour déterminer les paramètres RPE des Fe^{III} BS.

Le spectre RPE du complexe (Figure 101, droite, spectre orange) confirme la présence du mélange de Fe^{III} HS et BS. Comme pour le complexe en absence de substrat et de cofacteur, on a deux voire trois espèces de Fe^{III} BS différentes, mais elles sont, ici, mieux définies, ce qui indique que la protéine est plus rigide, et deux d'entre elles ont donc été prises en compte dans la simulation. Aucune ne correspond exactement à l'espèce majoritaire observée en absence de substrat et de cofacteur (Table 25, droite) ; on a donc une légère modification de la structure du site actif lors de la fixation du cofacteur, même s'il ne permet pas le déplacement de la molécule d'eau distale. La saturation du signal de Fe^{III} BS ne nous permet pas de déterminer les proportions de Fe^{III} HS et BS dans l'échantillon. On note toutefois que le cofacteur H₄F seul ne permet pas la conversion en Fe^{III} HS, compétent pour la catalyse.

1.2.1.3. Effets de l'arginine seule

Contrairement au complexe préparé en présence de H₄F seul, le complexe Fe^{III} saturé en arginine, en absence de cofacteur, présente un spectre UV-visible (Figure 102, gauche, spectre magenta) caractéristique des Fe^{III} HS de NOS, avec une bande de Soret à 398nm. Il semble donc que le substrat seul soit capable de déplacer la molécule d'eau distale pour former un complexe Fe^{III} pentacoordonné HS, compétent pour la catalyse[156].

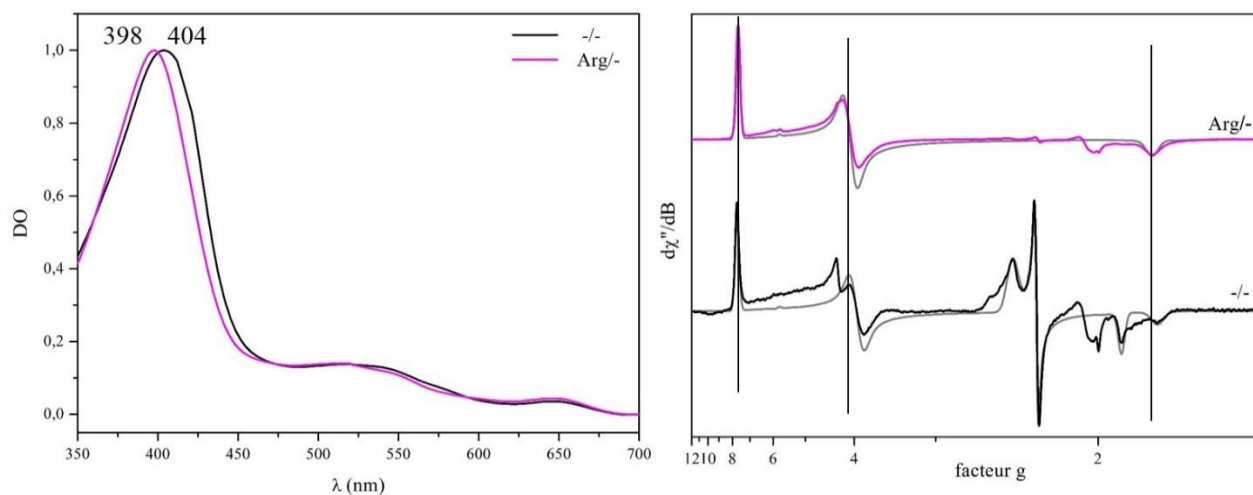


Figure 102 - Effets de l'arginine sur les spectres d'absorption UV-visible (gauche) et RPE (droite) du complexe Fe^{III} .
Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, Arg 5mM; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés.
Conditions d'enregistrement RPE : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW, amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.
Le Fe^{III} BS est saturé, mais non déformé : un spectre centré sur la zone $g=2$ a été enregistré en conditions non saturantes et utilisé pour déterminer les paramètres RPE du Fe^{III} BS.

Cette conversion totale en Fe^{III} HS est confirmée par la spectroscopie RPE puisqu'on n'observe pratiquement aucun signal de Fe^{III} BS dans la zone $g=2$ (Figure 102, droite, spectre magenta). On remarque également, vers $g=6$, un petit pic dû au doublet $m_s = \pm 3/2$. De plus, les Fe^{III} HS en présence et en absence d'arginine sont différents ce qui indique que le substrat modifie légèrement la structure du site actif lors de sa fixation (Table 25). Il semble donc que, contrairement à ce qui se passe pour iNOS ou deNOS, la présence du cofacteur ne soit pas nécessaire pour stabiliser l'état HS du Fe^{III} hémique (Cf. Chapitres III et IV)[31,189]. Dans le cas de gsNOS, ce dernier n'aurait donc éventuellement qu'un rôle redox, et pas structural.

1.2.1.4. Complexe saturé en substrat et cofacteur – Cas de la citrulline

Enfin, on a préparé des complexes Fe^{III} saturés en cofacteur H_4F et en arginine ou NOHA qui correspondent respectivement à l'état initial pour la première et la deuxième étape du cycle catalytique de gsNOS. On a aussi préparé un échantillon saturé en H_4F et en citrulline, le produit final de la réaction.

On note tout d'abord que les complexes de Fe^{III} saturés en cofacteur et en substrat sont très majoritairement à l'état HS, compétent pour la catalyse (Figure 103, spectres rouge et bleu)[156,186]. Concernant l'échantillon saturé en arginine et H_4F , on a des valeurs de g effectives très proches de celles mesurées en présence d'arginine seule ce qui confirme un rôle structural négligeable pour le cofacteur dans le cas de gsNOS (Table 25, gauche)[156]. Elles sont également assez semblables à celles du complexe Fe^{III} saturé en arginine et H_4B de bsNOS ($g_1^{\text{eff}} = 7,64$; $g_2^{\text{eff}} = 4,07$; $g_3^{\text{eff}} = 1,80$). Le spectre du complexe saturé en NOHA est plus

anisotrope que celui saturé en arginine, comme cela est généralement le cas pour les NOS (Table 25, gauche)[31, 156]. On remarque sur ces deux spectres, la présence du pic dû au doublet $m_s = \pm 3/2$ vers $g = 6$

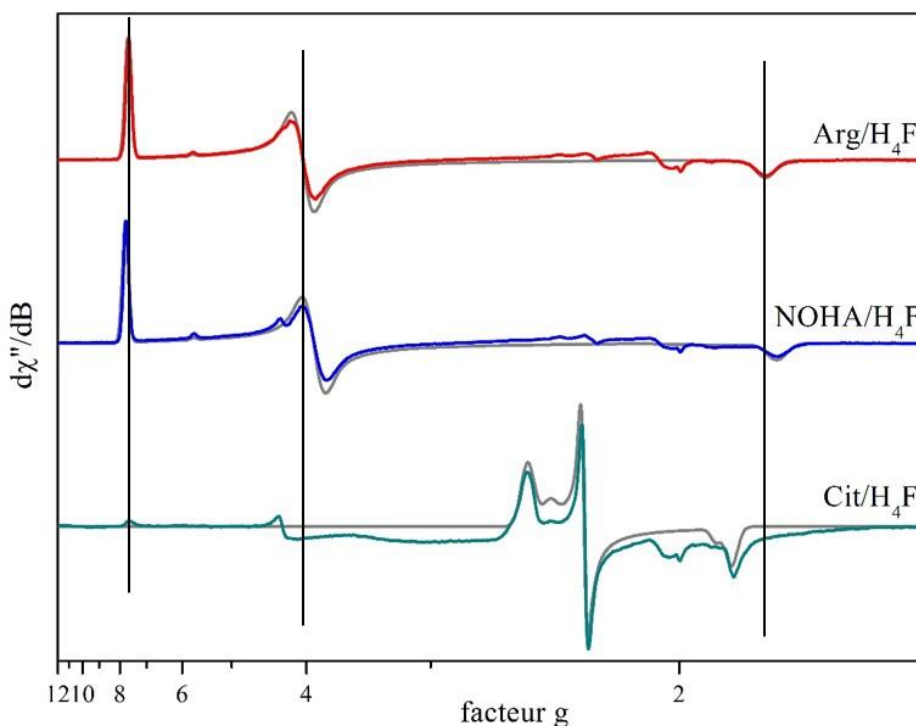


Figure 103 - Spectres RPE du complexe Fe^{III} en présence du cofacteur H_4F et d'arginine (rouge), de NOHA (bleu) ou de citrulline (vert).

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW (Arg et NOHA) ou 63 μ W (Cit), amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.

Concernant le complexe Fe^{III} préparé en présence de citrulline et de cofacteur H_4F , on a un mélange de deux espèces de Fe^{III} BS (Figure 103, spectre vert) qui ne correspondent à aucune des espèces observées dans les échantillons précédents (Table 25, droite). L'ajout de la citrulline induit donc une modification significative de l'environnement distal du fer puisqu'elle favorise la formation du BS et que ce dernier est dans une conformation différente de celle observée en absence de substrat/produit.

Les valeurs de g obtenues ici pour les différents complexes de Fe^{III} sont en accord avec celles rapportées précédemment[156]. Les petites variations observées sont très probablement dues aux différences de composition des tampons notamment en ce qui concerne le pH et la proportion et la nature du cryoprotecteur.

1.2.1.5. Conclusion

Tout comme iNOS et deNOS, gsNOS présente une proportion non négligeable de Fe^{III} BS en absence de substrat et de cofacteur. Cependant, elle est nettement plus stable que ces dernières et, contrairement à iNOS, l'ajout d'un cofacteur n'a que peu d'impact sur son équilibre HS/BS. De plus, l'arginine seule permet une conversion totale en Fe^{III} HS qui n'est que peu modifié par l'ajout de H_4F et elle présente des spectres en présence de substrat et cofacteur assez semblables à ceux de bsNOS[31, 146]. Si ces résultats indiquent que gsNOS se rapprocherait plutôt de bsNOS que de deNOS ou des NOS de mammifères, ils suggèrent également que chaque NOS bactérienne pourrait avoir ses caractéristiques propres, malgré une forte homologie entre ces différentes enzymes.

1.2.2. Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$

On a préparé des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ de gsNOS afin de vérifier l'intégrité de la protéine et d'estimer qualitativement sa stabilité et la robustesse de sa liaison thiolate. Les spectres obtenus en absence (noir) et en présence (rouge) d'arginine et de H_4F sont présentés Figure 104.

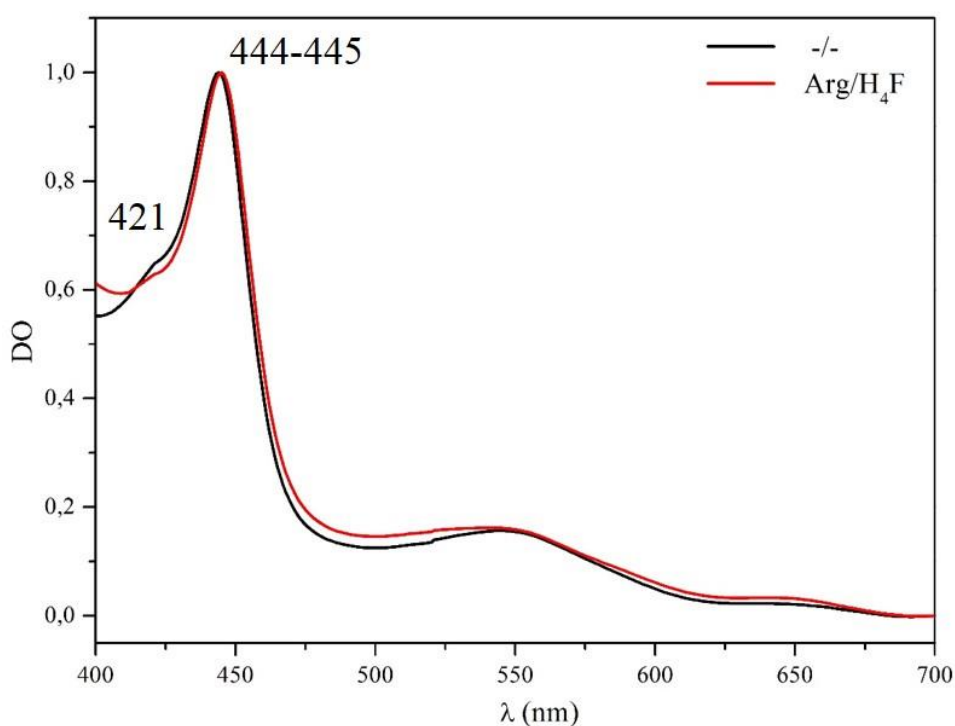


Figure 104 - Spectre d'absorption UV-visible du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ en absence (noir) ou en présence (rouge) d'arginine et de H_4F .

Conditions expérimentales UV-visible : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, Arg 5mM, H_4F 500μM, DTT 3mM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés.

On retrouve le spectre caractéristique des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ de NO-synthases avec notamment une bande de Soret à 444-445nm[22, 24, 173,206]. On observe également, dans les deux cas, un épaulement vers 420nm, caractéristique d'un complexe dégradé qui aurait perdu sa liaison thiolate[205]. Ce dernier ne représente qu'une faible proportion du signal total ce qui suggère une liaison plutôt robuste, et la présence de substrat et de cofacteur ne semble pas avoir d'impact majeur sur la proportion de complexe dégradé. Ce comportement est assez proche de celui observé pour bsNOS.

1.2.3. Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$

Comme on l'a vu dans les chapitres précédents, les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ sont plus sensibles à de petites modifications de l'environnement de l'hème que les complexes Fe^{III} [213,216]. On a donc préparé différents complexes de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de gsNOS en absence ou en présence de substrat et de cofacteur afin de confirmer ou d'infirmer les similitudes observées avec bsNOS et les rôles respectifs de l'arginine et du H_4F dans la stabilisation de la protéine.

1.2.3.1. En absence du substrat et de cofacteur

Le spectre RPE bande X du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de gsNOS préparé en absence de substrat et de cofacteur est représenté Figure 105, avec sa simulation. On a pu observer, lors de la préparation de cet échantillon, une précipitation partielle de la protéine. Bien que gsNOS soit relativement stable en absence de substrat et de cofacteur, elle n'est donc pas suffisamment robuste pour supporter les traitements (réduction au dithionite puis ajout de fortes concentrations de $\text{NO}^{\bullet}$) nécessaires à la formation de ce complexe.

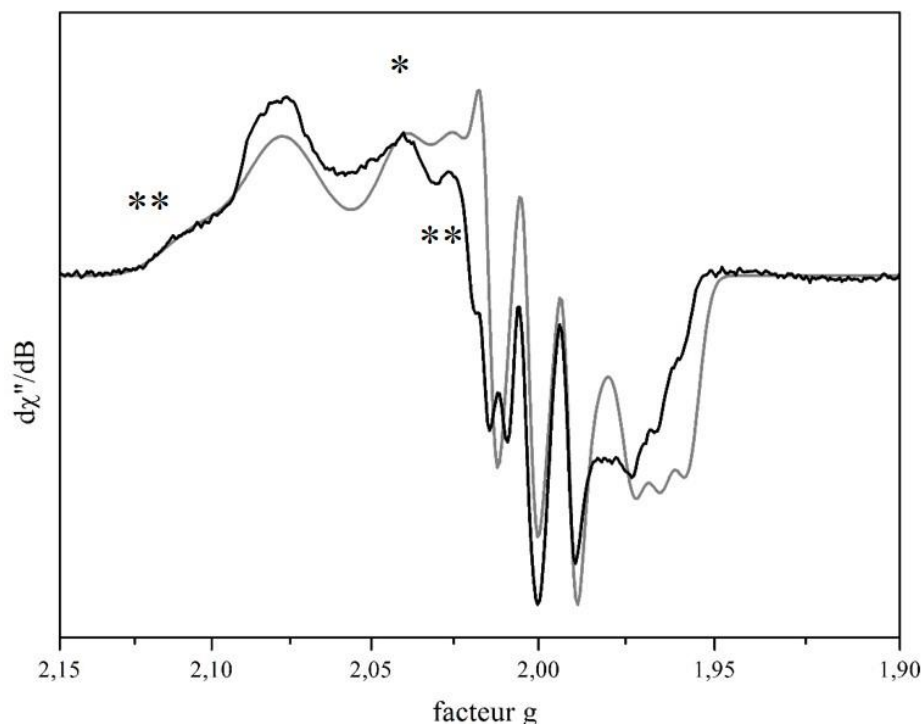


Figure 105 - Spectre RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en absence de substrat et de cofacteur.

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 40K, puissance micro-onde 63μW, amplitude de modulation 0,5mT. Spectre normalisé. Le spectre simulé est représenté en gris.

** espèce axiale minoritaire.*

*** $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné.*

Le spectre représenté Figure 105 correspond au mélange de trois espèces différentes de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, ce qui rend sa simulation assez délicate (Table 26). La présence de plusieurs espèces en proportions non négligeables suggère une certaine flexibilité de l'enzyme et une assez large distribution de conformations pour le monoxyde d'azote. L'espèce rhombique majoritaire est semblable à celle généralement observée pour les $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ des NOS et correspond à un complexe hexacoordonné[213,216]. Le couplage hyperfin avec le noyau ^{14}N du $\text{NO}^{\bullet}$ n'est que partiellement résolu ce qui confirme la flexibilité de l'enzyme, ou du moins de son site actif. On observe également une petite proportion de l'espèce axiale décrite au chapitre précédent (*) ainsi qu'une part assez importante de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné qui a donc perdu sa liaison thiolate avec la cystéine proximale (**). Ceci indique que la protéine est déstabilisée et est à rapprocher de la précipitation observée lors de la préparation de l'échantillon.

1.2.3.2. Effets du cofacteur seul

Bien qu'il ne permette pas la conversion du Fe^{III} BS en HS, le cofacteur H_4F semble capable de stabiliser et de rigidifier l'enzyme. Ceci est confirmé par le spectre RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ saturé en H_4F , en absence de substrat (Figure 106, spectre orange) : il est mieux défini que celui du complexe préparé en absence de H_4F et le couplage hyperfin avec l'azote du $\text{NO}^\bullet$ est parfaitement résolu. De plus, on n'observe pas de précipitation de l'enzyme lors de la préparation de l'échantillon.

On retrouve l'espèce axiale minoritaire (*) ainsi qu'un signal caractéristique du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné (**). Ce dernier est toutefois nettement moins présent qu'en absence de H_4F ce qui suggère que le cofacteur permet de limiter l'exposition de l'hème et de protéger, au moins partiellement, la liaison thiolate[23].

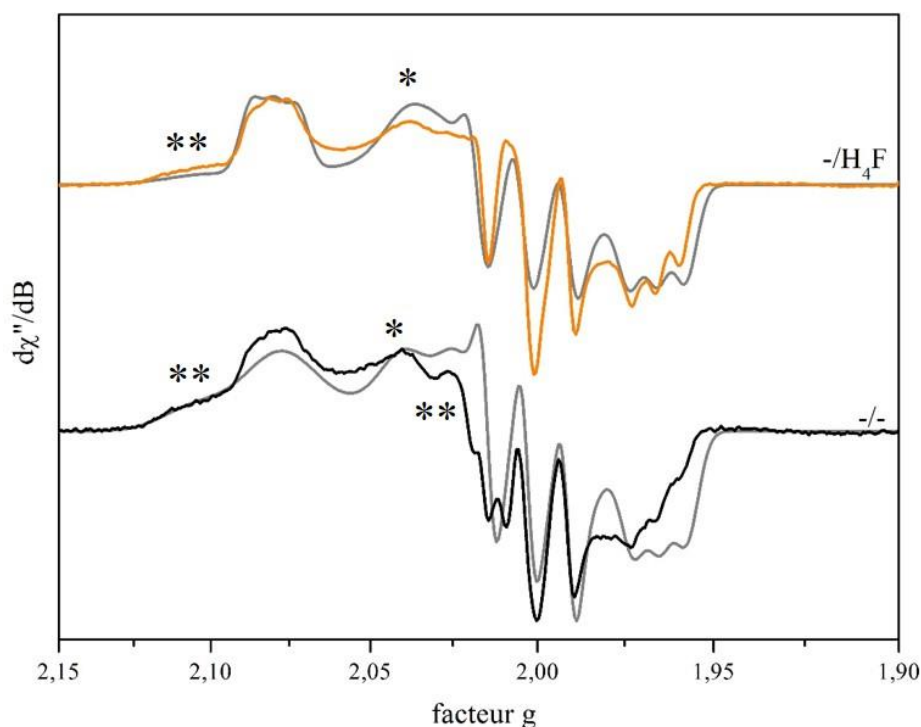


Figure 106 - Effets du cofacteur H_4F sur le spectre RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de gsNOS.

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 40K, puissance micro-onde $63\mu\text{W}$, amplitude de modulation 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.

** espèce axiale minoritaire.*

*** $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné.*

Les trois valeurs de g de l'espèce majoritaire sont pratiquement identiques à celles du complexe préparé en absence de cofacteur (Table 26), ce qui confirme que H_4F permet de stabiliser et rigidifier l'enzyme, sans toutefois modifier significativement la structure du site actif et l'environnement électronique de l'hème. Elles sont assez semblables à celles obtenues pour iNOS et bsNOS en présence du cofacteur H_4B , malgré des valeurs de g_1 et surtout de g_3 légèrement plus faibles (iNOS 1,974 ; bsNOS 1,972)[216].

Substrat/Cofacteur	Espèce rhombique majoritaire				Complexe pentacoordonné			Espèce axiale supplémentaire		
	g_1 A_1 (MHz)	g_2 A_2 (MHz)	g_3 A_3 (MHz)	%	$g_{ }$ $A_{ }$ (MHz)	$g_{\perp}$ $A_{\perp}$ (MHz)	%	$g_{\perp}$	$g_{ }$	%
-/-	2,079 20	2,003 55	1,965 36	75%	2,110 51	2,010 25	22%	2,040	2,014	3%
Arg/-	2,080 30	2,004 59	1,966 35	100%	-	-	-	-	-	-
-/ H_4F	2,080 33	2,004 62	1,965 38	80%	2,100 51	2,010 25	16%	2,037	2,014	4%
Arg/ H_4F	2,080 30	2,005 59	1,967 31	95%	-	-	-	2,035	2,014	5%
NOHA/ H_4F	2,050 20	2,007 58	1,983 20	87%	-	-	-	2,031	2,014	13%

Table 26 - Paramètres RPE des complexes $Fe^{II}NO$ de gsNOS.

Ces paramètres sont issus des simulations représentées sur les figures 105 à 108.

Etant donné que le couplage hyperfin n'est pas résolu pour g_1 en absence de cofacteur, il participe à l'élargissement des raies et la valeur obtenue par simulation n'est donc pas nécessairement significative. Concernant la raie centrale, même si on a une certaine déformation due à l'importante contribution du $Fe^{II}NO$ pentacoordonné, l'augmentation de la force du couplage hyperfin en présence de H_4F pourrait être attribuée à une légère contraction du site actif lors de la fixation du cofacteur.

1.2.3.3. Effets de l'arginine seule

Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de gsNOS saturé en arginine présente un spectre rhombique pratiquement pur (Figure 107, spectre magenta): on n'observe ni $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné, ni espèce axiale. Ce résultat confirme le rôle structural du substrat et sa capacité à rigidifier et stabiliser l'enzyme, de manière bien plus efficace que le cofacteur H_4F . On note cependant que, sur la valeur de g la plus élevée, le couplage hyperfin avec l'azote du $\text{NO}^{\bullet}$ est un peu moins bien résolu qu'en présence de H_4F .

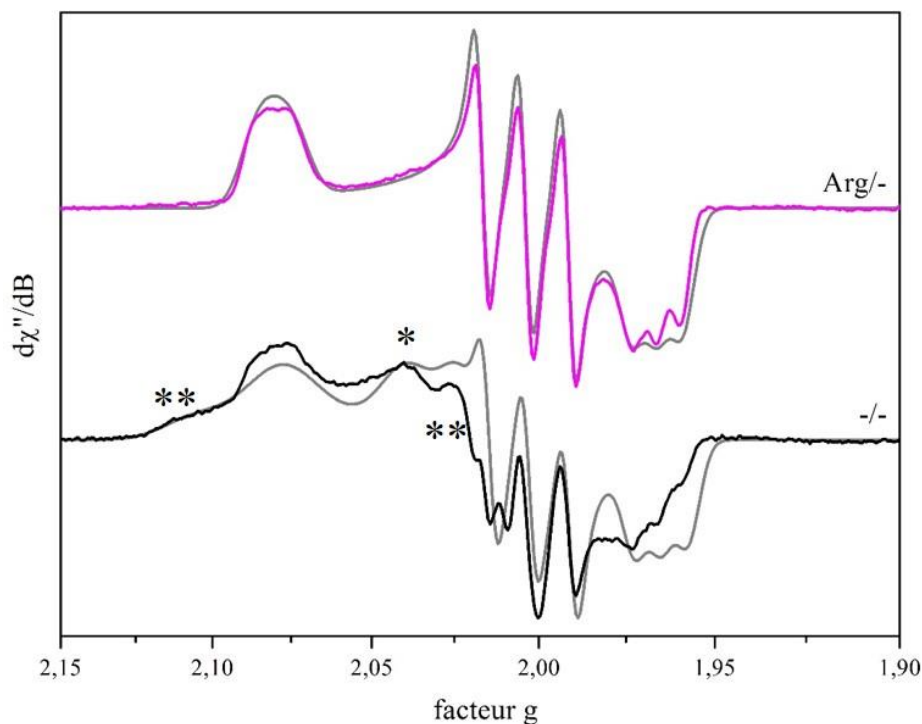


Figure 107 - Effets de l'arginine sur le spectre RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de gsNOS.

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 40K, puissance micro-onde 63 μ W, amplitude de modulation 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.

** espèce axiale minoritaire.*

*** $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné.*

L'absence de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné montre que la fixation de l'arginine au sein du site actif permet de renforcer et de protéger la liaison thiolate et donc probablement de garantir l'intégrité du site actif au cours du cycle catalytique. Le fait que les paramètres de simulation de l'espèce rhombique soient semblables à ceux obtenus pour les deux spectres précédents (Table 26) suggère qu'on n'aurait pas d'interaction forte entre l'arginine et le $\text{NO}^{\bullet}$, malgré leur proximité au sein de la structure[23].

1.2.3.4. Complexe saturé en substrat et cofacteur

Les spectres RPE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de gsNOS préparés en présence du cofacteur H_4F , et d'arginine (spectre rouge) ou de NOHA (spectre bleu) sont présentés Figure 108, avec leurs simulations.

Comme on pouvait s'y attendre, le spectre du complexe saturé en arginine et H_4F est très semblable à celui du complexe préparé en présence d'arginine seule. Les paramètres de simulation sont pratiquement identiques (Table 26) et l'absence de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ pentacoordonné confirme l'intégrité du site actif. On note tout de même que le couplage hyperfin sur la raie correspondant à la valeur de g maximale (g_1) est un peu mieux résolu qu'en absence de H_4F . Bien que l'effet de l'arginine soit prédominant, le cofacteur H_4F aurait donc également un léger impact sur l'environnement distal de l'hème. Les valeurs de g et de constantes de couplage obtenues ici pour gsNOS sont très semblables à celles obtenues pour iNOS, bsNOS et deiNOS en présence d'arginine et de cofacteur H_4B ou H_4F (Cf. Chapitres III et IV)[216].

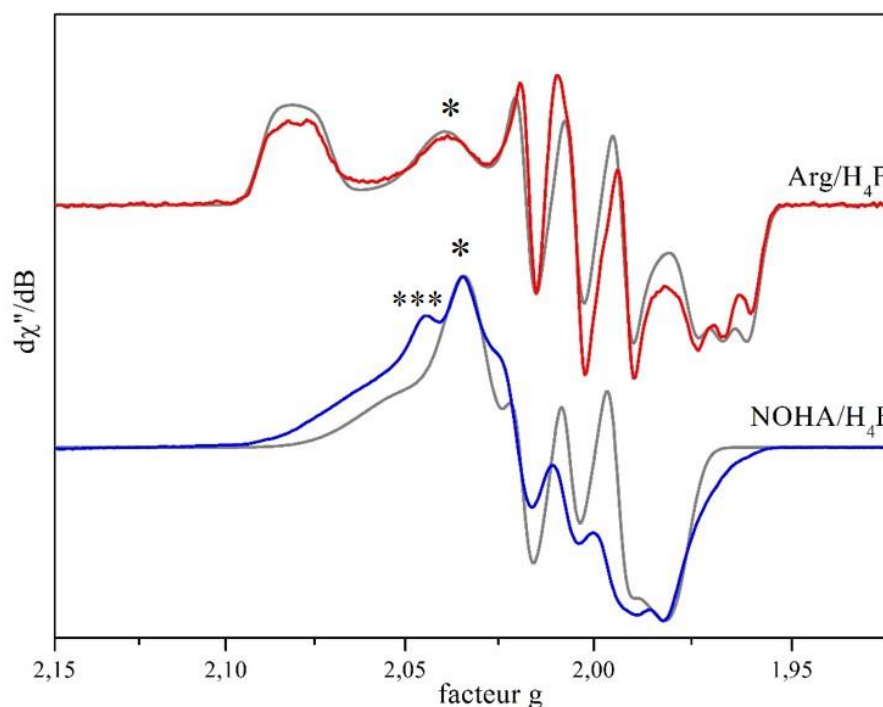


Figure 108 - Spectres RPE du complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en présence du cofacteur H_4F et d'arginine (rouge) ou de NOHA (bleu). Conditions d'enregistrement : fréquence 9,38GHz, température 40K, puissance micro-onde $63\mu\text{W}$, amplitude de modulation 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.

* espèce axiale minoritaire.

*** espèce supplémentaire

Le spectre du complexe saturé en NOHA et H₄F présente un mélange de trois espèces de Fe^{II}NO : l'espèce rhombique majoritaire, l'espèce axiale (*) et une troisième espèce non identifiée (***). Concernant l'espèce rhombique, on retrouve la diminution d'anisotropie caractéristique de la présence de NOHA ; elle est cependant un peu plus marquée que pour les autres NOS, mammifères ou bactériennes[213,216]. Cet effet important du NOHA suggère une interaction plus forte de ce dernier avec le NO[•] qui pourrait être due à la compacité du site actif de gsNOS, comparé par exemple à celui de bsNOS[21, 23].

1.2.4. Conclusion

Les complexes Fe^{III}, Fe^{II}CO et Fe^{II}NO de gsNOS présentent des caractéristiques assez semblables à celles des autres NOS bactériennes[29, 31,216]. Ceci n'est pas surprenant étant donné que sa structure ressemble fortement à celles de bsNOS et saNOS[21, 23, 143]. On note tout de même qu'elle présente des spectres de Fe^{II}NO particulièrement bien définis, en accord avec la compacité de son site actif et sa thermostabilité[23]. Enfin, l'étude des complexes Fe^{III} et Fe^{II}NO indique que l'arginine a un impact sur la structure du site actif beaucoup plus important que le cofacteur H₄F. On peut donc supposer que, comme pour bsNOS, il ne jouerait pas de rôle structural ; l'étude cinétique devrait nous permettre de déterminer son éventuelle implication dans le mécanisme catalytique de gsNOS.

1.3. Etude cinétique

Les études précédemment réalisées *in vitro*, à 4°C, indiquent que gsNOS forme, en présence d'arginine, un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ particulièrement stable comparé aux autres NOS, que ce soit en absence ou en présence de H_4B [23]. La dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, et donc la production de $\text{NO}^\bullet$ par gsNOS, est également beaucoup plus lente que pour iNOS (x50) ou bsNOS (x5)[23, 24, 27, 160]. Le caractère thermophile de *Geobacillus stearothermophilus* et le fait que la température optimale de fonctionnement de gsNOS soit donc plus élevée que pour les autres NOS actuellement caractérisées expliqueraient ces cinétiques particulièrement lentes à basse température. On a donc réalisé une étude cinétique de gsNOS par *stopped-flow*, en présence de H_4F et d'une ptérine oxydée H_2B , inactive d'un point de vue redox, afin de compléter les données actuellement disponibles et de préciser le rôle éventuel du cofacteur.

1.3.1. Hydroxylation de l'arginine

1.3.1.1. Intermédiaires réactionnels observés

Le mélange de gsNOS réduite saturée en arginine et H_4F avec un tampon saturé en air est réalisé à 4°C. On enregistre ensuite un spectre d'absorption UV-visible toutes les 3ms, après un temps mort de 1,1ms. Le faisceau de spectres obtenu est représenté Figure 109.

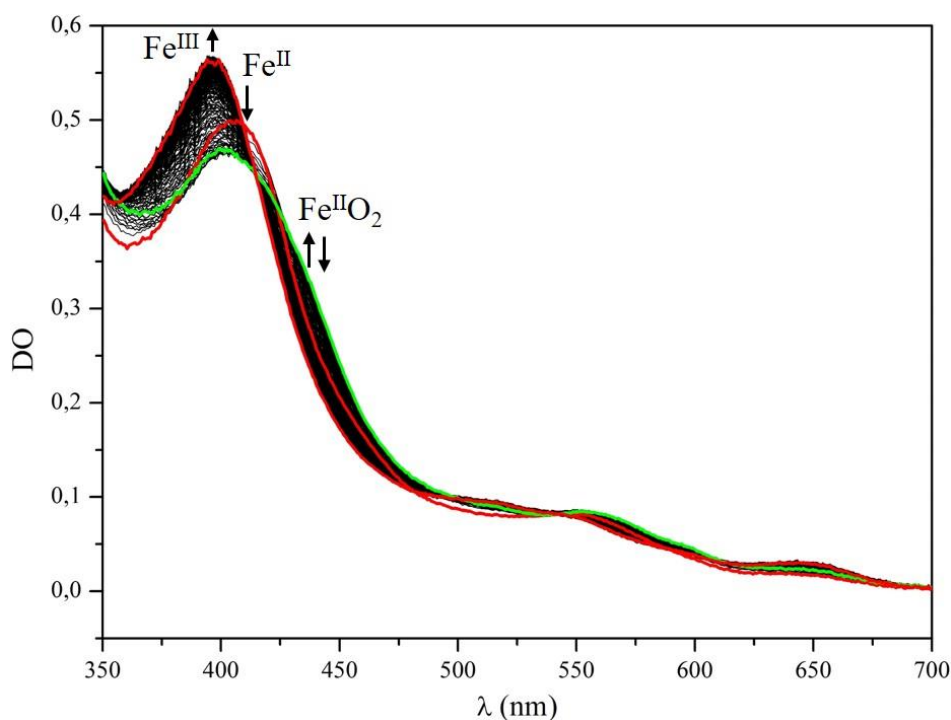


Figure 109 - Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence d'arginine et de H_4F .
Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.
Le spectre présentant le maximum de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est représenté en vert.

On observe les mêmes transitions que pour les autres NOS étudiées par *stopped-flow* : la formation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ *via* la fixation du dioxygène sur le Fe^{II} initial (spectre rouge)[186], et la formation du Fe^{III} HS final (spectre rouge). On retrouve le point isobestique à 416nm caractéristique de la transition $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$, ce qui indique l'absence d'intermédiaire observable supplémentaire. Contrairement à ce qui a été décrit en présence de H_4B , on n'a pas, ici, de spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ pur, mais seulement un mélange avec le Fe^{III} (spectre vert)[23]. Ceci indique que sa disparition est plus rapide et suggère que H_4F serait plus efficace que H_4B pour transférer un électron à l'hème et réduire le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

1.3.1.2. Fixation du dioxygène

On retrouve ici la fixation très rapide du dioxygène généralement observée en présence d'arginine. La constante cinétique obtenue pour gsNOS est du même ordre de grandeur que celles mesurées pour bsNOS, saNOS et deiNOS[24, 29]. Le résidu histidine (H134) responsable de la libération particulièrement lente du NO^* observée pour gsNOS[160] ne gênerait donc pas l'accès de l'oxygène au site actif. Cela suggère que son effet sur la libération du NO^* serait plutôt dû à une interaction directe avec ce dernier qu'à une gêne stérique.

1.3.1.3. Stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$

On a utilisé les variations d'absorbance à 396nm (croissance) et 440nm (décroissance) pour calculer la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$; comme décrit précédemment, ces dernières ont été modélisées par des fonctions bi-exponentielles (Table 27). La phase rapide est largement majoritaire et correspond très probablement à l'activation de l'oxygène par le cofacteur H_4F . Bien que la concentration en cofacteur H_4F utilisée pour le conditionnement de la protéine (500 μM) garantisse sa saturation, il est tout de même possible que la phase lente corresponde à l'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Le comportement observé ici pour gsNOS est assez semblable à celui de bsNOS dans les mêmes conditions, malgré une disparition du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ ralentie d'un facteur 3 (Table 27).

Constantes cinétiques (s^{-1})	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$\longrightarrow$	Fe^{III}
gsNOS		142 ± 32		$8,27 \pm 0,39$ (88%) $0,79 \pm 0,25$ (12%)	
bsNOS		191 ± 54		$25,1 \pm 2,6$ (84%) $0,82 \pm 0,16$ (16%)	

Table 27 - Constantes cinétiques obtenues pour l'hydroxylation de l'arginine (4°C) en présence du cofacteur H_4F .

Les valeurs obtenues pour bsNOS dans les mêmes conditions sont rappelées pour comparaison.

On retrouve les proportions des deux phases obtenues pour les expériences réalisées en présence de H_4B , mais avec des constantes de vitesses environ 10 fois plus élevées[23]. L'accélération de l'activation de l'oxygène (phase rapide) peut être due à un transfert électronique plus efficace de la part de H_4F , cohérent avec son utilisation comme cofacteur *in vivo*, *Geobacillus stearothermophilus* ne possédant pas les enzymes nécessaires à la biosynthèse de H_4B . L'effet sur la phase lente est plus difficile à rationaliser puisque le cofacteur n'intervient pas lors de l'auto-oxydation du $Fe^{II}O_2$. On peut toutefois proposer une modification de la structure due à la chaîne latérale plus volumineuse de H_4F , comparé à H_4B , qui rendrait l'hème plus accessible au solvant ou modifierait le réseau de liaisons hydrogène et déstabiliserait donc le complexe $Fe^{II}O_2$.

1.3.2. Oxydation du NOHA

1.3.2.1. Intermédiaires réactionnels observés

Les spectres d'absorption UV-visible enregistrés suite au mélange de gsNOS réduite, saturée en NOHA et H_4F , avec un tampon saturé en air, sont présentés Figure 110. En plus du Fe^{II} initial (spectre rouge) et du Fe^{III} HS final (spectre rouge) on observe, comme pour la plupart des NOS[24, 27-29], deux intermédiaires réactionnels : les complexes $Fe^{II}O_2$ et $Fe^{III}NO$.

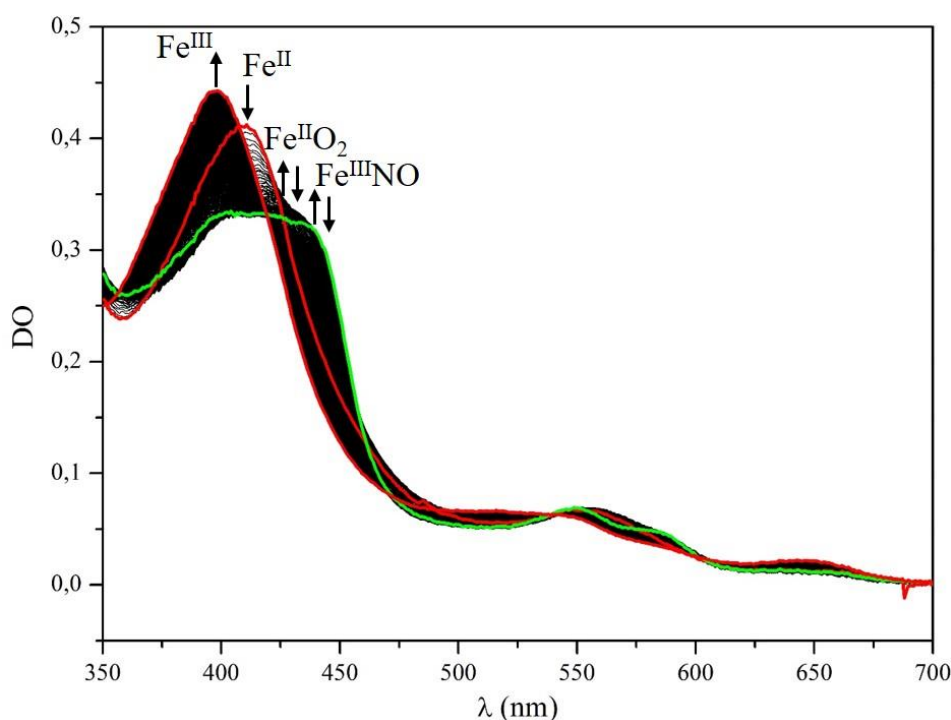


Figure 110 - Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence de NOHA et de H_4F .
 Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.
 Le spectre présentant le maximum de $Fe^{III}NO$ est représenté en vert.

Bien qu'il ne soit présent qu'en mélange avec d'autres espèces, le $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est assez nettement discernable sur ces spectres. La formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ indique que la catalyse a bien lieu et que H_4F pourrait donc effectivement être le cofacteur naturel de gsNOS.

L'absence de point isobestique lors de la transition $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} \text{HS}$ suggère la présence d'un intermédiaire supplémentaire qui serait formé lors de la dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$. On peut donc supposer qu'il s'agirait, comme pour deiNOS, d'un complexe Fe^{III} -citrulline BS ; le départ rapide de la citrulline serait alors suivi de la fixation de NOHA, présent en excès dans le milieu, et d'un réarrangement assez lent de la protéine conduisant au $\text{Fe}^{\text{III}} \text{HS}$ final.

1.3.2.2. Fixation du dioxygène et stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$

Pour calculer la vitesse de fixation du dioxygène, on modélise la diminution de l'absorbance à 396nm, liée à la disparition du Fe^{II} , par une fonction mono-exponentielle. On a une formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ plus lente qu'en présence d'arginine, conformément à ce qu'on attend pour une NOS[27, 29,181], et la constante cinétique calculée pour gsNOS est assez proche de celles obtenues pour bsNOS et deiNOS (Cf. Chapitres III et IV).

Constantes cinétiques (s^{-1})	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$	$\longrightarrow$	?	$\longrightarrow$	Fe^{III}
gsNOS			$39,9 \pm 2,9$		$20,9 \pm 1,7$		$0,69 \pm 0,05$		$0,047 \pm 0,004$
bsNOS			$31,5 \pm 1,5$		$22,8 \pm 1,2$		$0,20 \pm 0,05$		

Table 28 - Constantes cinétiques obtenues pour l'oxydation du NOHA (4°C) en présence du cofacteur H_4F .
Les valeurs obtenues pour bsNOS dans les mêmes conditions sont rappelées pour comparaison.

On utilise la variation de l'absorbance à 440nm, due principalement à la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ pour calculer la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$; celle-ci est modélisée par une fonction mono-exponentielle.

On remarque tout d'abord que la réduction du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ est accélérée d'un facteur 2 par rapport à la réaction en présence d'arginine ; cet effet du substrat est observé pour la plupart des autres NOS caractérisées[27, 29,181]. Contrairement à la première étape, la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ en présence de NOHA est très proche de celles observées pour les bacNOS de *Bacillus subtilis* et *Deinococcus radiodurans* dans les même conditions (Table 28, Cf. Chapitre III et IV). Il semblerait donc que ce soit principalement le NOHA qui impose la vitesse de disparition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, ce qui appuie l'hypothèse d'un rôle direct du substrat dans l'étape d'activation de l'oxygène[157].

1.3.2.3. Libération du NO[•]

Les variations d'absorbance à 396nm (augmentation) et 440nm (diminution) nous permettent de suivre la disparition du complexe Fe^{III}NO et la formation du Fe^{III} HS final. Elles sont modélisées par des fonctions bi-exponentielles qui traduisent le passage par un intermédiaire supplémentaire, probablement un Fe^{III} BS en présence de citrulline ou en absence de substrat/produit. La disparition très lente de cet intermédiaire est parfaitement compatible avec un réarrangement du site actif impliquant des mouvements importants de la protéine. Concernant la dissociation du complexe Fe^{III}NO proprement dite, on trouve une vitesse un peu plus élevée que pour bsNOS ou deiNOS dans les mêmes conditions ; elle est environ 10 fois plus rapide que celle mesurée en présence de H₄B[23]. Tout comme les résultats obtenus pour l'hydroxylation de l'arginine, ceci suggère que la catalyse serait plus efficace en présence de H₄F que de H₄B et que gsNOS pourrait donc effectivement utiliser H₄F comme cofacteur *in vivo*.

Il est tout de même important de noter qu'il existe des différences entre les procédures expérimentales utilisées dans les études réalisées précédemment avec H₄B et celles mises en place dans le cadre de ce travail qui pourraient être en partie responsables des différences apparentes de comportement observées pour gsNOS, en particulier pour l'étape de libération du NO[•]. Ainsi, l'écart important entre deux spectres consécutifs (500ms) dans les expériences en conditions de *single turnover* menées par J. Sudhamsu et B. Crane[23] ne permet-il pas de suivre l'éventuelle formation de l'intermédiaire Fe^{III} BS ; l'allure des spectres enregistrés est toutefois compatible avec la séquence réactionnelle proposée ici.

1.3.3. Réactions en présence d'une ptérine oxydée

Afin de vérifier le rôle redox du cofacteur H₄F et d'étudier l'impact du substrat sur l'auto-oxydation du complexe Fe^{II}O₂, on a reproduit les expériences de *stopped-flow* précédentes en remplaçant le cofacteur H₄F par la ptérine oxydée H₂B.

1.3.3.1. Intermédiaires observés

Contrairement aux réactions en présence de H₄F, les spectres obtenus en présence d'arginine (Figure 111, gauche) et de NOHA (Figure 111, droite) sont très similaires : on observe un unique intermédiaire, le complexe Fe^{II}O₂, entre le Fe^{II} initial et le Fe^{III} final.

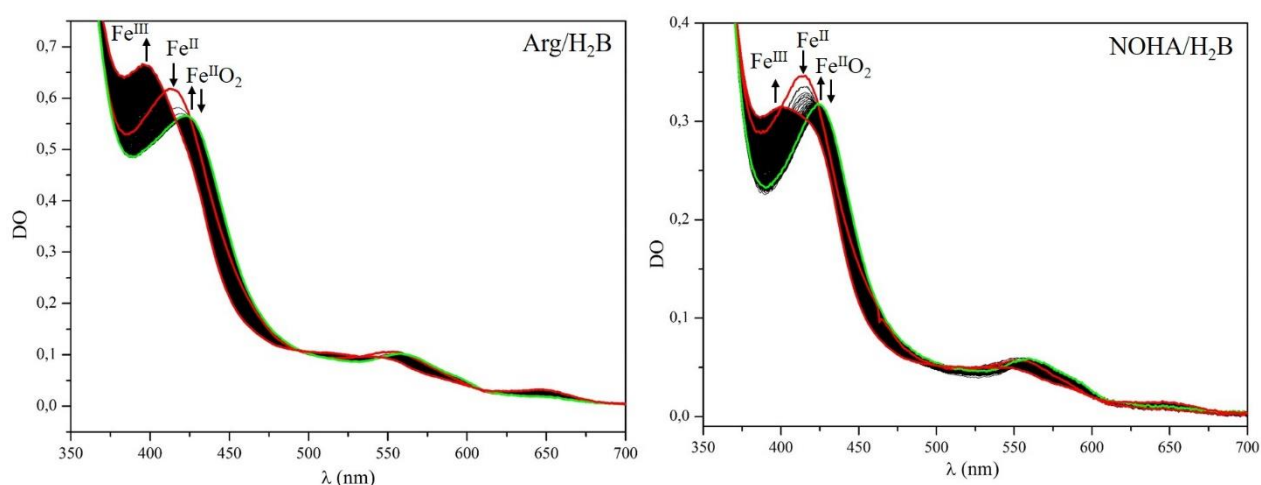


Figure 111 - Spectres de *stopped-flow* obtenus en présence de H₄F et d'arginine (gauche) ou de NOHA (droite).
Les premiers et derniers spectres sont représentés en rouge.
Les spectres présentant le maximum de Fe^{II}O₂ sont représentés en vert.

Dans les deux cas, on obtient un spectre de Fe^{II}O₂ pratiquement pur (spectres verts) [186] ce qui indique qu'il se forme entièrement avant de commencer à disparaître et suggère donc une vitesse de disparition particulièrement faible, compatible avec son auto-oxydation. L'absence de catalyse est confirmée par le fait qu'on ne détecte pas de formation de Fe^{III}NO en présence de NOHA. Malgré un temps de réaction assez long (18,75s), on observe encore un peu de Fe^{II}O₂ sur le dernier spectre enregistré en présence de NOHA qui ne disparaît complètement qu'après environ une minute, conformément aux données déjà publiées[23].

1.3.3.2. Fixation du dioxygène et auto-oxydation du complexe Fe^{II}O₂

En présence d'arginine, la fixation du dioxygène est fortement ralentie comparée à la réaction en présence de H₄F ; cet effet est nettement moins marqué en présence de NOHA. L'impact du substrat sur la vitesse de formation du complexe Fe^{II}O₂ est donc beaucoup plus faible qu'avec H₄F et, compte-tenu des incertitudes expérimentales, les deux vitesses sont

pratiquement identiques. On observe un effet semblable pour deiNOS lorsqu'on remplace H₄B par H₂B ce qui suggère que celui-ci serait dû davantage à l'état redox du cofacteur utilisé qu'à la composition de sa chaîne latérale (Cf. Chapitre IV).

Comme la géométrie du noyau ptérine dépend fortement de son état d'oxydation (Cf. Chapitre IV §4.2.2.1), on peut envisager des modes de fixation légèrement différents pour les ptérines réduites et oxydées qui induiraient des petites modifications de la structure, transmises jusqu'au canal d'accès du dioxygène par un réseau étendu de liaisons hydrogène.

Constantes cinétiques (s ⁻¹)	Fe ^{II}	→	Fe ^{II} O ₂	→	Fe ^{III}
Arg/H ₂ B			33,9 ± 5,6		0,09 ± 0,02
NOHA/H ₂ B			26,7 ± 2,8		0,15 ± 0,03

Table 29 - Constantes cinétiques pour la réaction de gsNOS réduite avec l'oxygène en présence de ptérine oxydée H₂B.

On utilise les variations d'absorbance à 396nm et 440nm, modélisées par des fonctions mono-exponentielles, pour calculer la vitesse de disparition du complexe Fe^{II}O₂. Celle-ci est environ 100 fois plus lente qu'avec H₄F, que ce soit en présence d'arginine ou de NOHA. Ceci confirme qu'on observe bien l'auto-oxydation du Fe^{II}O₂ et donc que le cofacteur H₄F est impliqué dans le transfert d'électron nécessaire à l'activation de l'oxygène, pour les deux étapes du cycle catalytique.

On n'a que très peu d'écart entre les vitesses d'auto-oxydation en présence d'arginine et de NOHA ; en absence de cofacteur redox, la nature du substrat n'impacte donc pas, ou peu, la stabilité du complexe Fe^{II}O₂.

Pour la réaction en présence d'arginine, on retrouve une valeur proche de celle publiée par J. Sudhamsu et B. Crane ce qui suggère que nos expériences sont comparables, malgré une procédure légèrement différente[23]. Les différences de vitesse observées pour l'hydroxylation de l'arginine seraient donc bien dues à la nature du cofacteur utilisé, H₄B ou H₄F ; ce comportement rappelle celui décrit pour bsNOS au Chapitre III.

1.3.4. Conclusion

Les résultats obtenus ici montrent que H₄F est capable de supporter la production de NO^{*} par gsNOS et qu'il pourrait donc être son cofacteur naturel *in vivo*. De plus, il est nécessaire à l'activation de l'oxygène, aussi bien pour l'étape d'hydroxylation de l'arginine que pour l'oxydation du NOHA. Le comportement de gsNOS est similaire à celui de bsNOS ce qui suggère que ces deux enzymes suivraient le même mécanisme réactionnel. De plus, *Geobacillus stearothermophilus* et *Bacillus subtilis* sont assez proches d'un point de vue phylogénétique puisqu'elles appartiennent toutes deux à la famille des *Bacillaceae*.

Pour la 1^{ère} étape, des expériences de *freeze-quench* devraient nous permettre de confirmer la formation d'un radical ptérine et de vérifier son état de protonation. Pour la 2^{ème} étape, il est en revanche peu probable qu'on parvienne à piéger un radical ptérine étant donné qu'il n'a jamais pu être observé pour bsNOS et que ces deux enzymes ont des profils cinétiques semblables[31].

1.4. Conclusion

La caractérisation par spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE des complexes Fe^{III} , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ indique que gsNOS est assez semblable à bsNOS[24, 146,216], ce qui n'est pas surprenant étant donnée la parenté entre *Geobacillus stearothermophilus* et *Bacillus subtilis*.

Étant donnée la ressemblance marquée entre gsNOS et bsNOS, il paraît peu probable que ces enzymes fonctionnent avec des cofacteurs différents. Le fait que *Geobacillus stearothermophilus* ne possède *a priori* pas la machinerie nécessaire à la biosynthèse de H_4B suggère donc que H_4F serait également le cofacteur naturel de bsNOS.

L'étude de gsNOS confirme donc les différences observées entre mNOS et bacNOS qui constituent deux groupes distincts puisqu'elles n'utiliseraient pas le même cofacteur et suivraient très probablement des mécanismes catalytiques différents dont les détails sont encore mal connus, malgré les réponses apportées par la cryoréduction et la bio-informatique.

On peut à présent envisager plusieurs pistes pour tenter de lever certaines de ces incertitudes. Tout d'abord, la production homologue de bacNOS permettrait de vérifier la présence d'un cofacteur *in vivo* et de déterminer sa nature. Enfin, l'étude de nouvelles NOS issues d'organismes répartis sur l'ensemble du règne bactérien, permettrait d'avoir des informations plus représentatives de la diversité de cette famille d'enzymes.

2. Etude partielle d'une NOS de plante

2.1. Introduction

La présence d'enzymes homologues aux NOS de mammifères dans le règne végétal est longtemps restée incertaine. En effet, il existe de nombreuses voies de synthèse du NO[•] chez les plantes et celui-ci est impliqué notamment dans le développement de l'organisme et dans la réponse à certains types de stress. Sa production n'implique donc pas nécessairement la présence d'une enzyme de type NO-synthase[128].

Récemment, l'analyse de l'ensemble des génomes disponibles de plantes a toutefois permis l'identification d'enzymes homologues aux NOS de mammifères chez une quinzaine d'algues unicellulaires, dont *Ostreococcus tauri*[128]. Cette dernière a été plus particulièrement étudiée et il a été montré qu'elle synthétisait effectivement du NO[•] en présence d'arginine[129]. Comme les NOS de mammifères, la NOS d'*Ostreococcus tauri* (otNOS) possède un domaine oxygénase et un domaine réductase, liés par un peptide permettant la fixation de la calmoduline et pourrait donc être impliquée dans différentes voies de signalisation[128]. Sa surexpression en réponse à une forte intensité lumineuse indique notamment un rôle dans la protection de l'organisme mais son mode d'action reste à déterminer[129] ; on ne dispose en effet que de peu d'informations sur sa structure et son mécanisme catalytique.

Les résultats présentés dans cette thèse sur otNOS s'inscrivent dans le cadre d'un projet mené au laboratoire par Jérôme Santolini et visant à mieux comprendre sa biochimie et son histoire évolutive. Un important travail de bio-informatique a été effectué par Jérôme Santolini et François André qui a permis la construction d'un arbre phylogénétique des NOS incluant otNOS et d'une structure tridimensionnelle du domaine oxygénase de otNOS. Celui-ci a également été produit et purifié au laboratoire par Medhi Lembrouk afin de pouvoir être caractérisé et étudié *in vitro*. Dans un premier temps, on a cherché à sonder le site actif de otNOS pour comparer ses caractéristiques à celle des NOS d'origine mammifère ou bactérienne. On a donc caractérisé l'état natif Fe^{III} de l'enzyme, ainsi que les complexes Fe^{II}CO et Fe^{II}NO par spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE. Dans un second temps, on s'est intéressé au cycle catalytique de otNOS et on a donc utilisé le *stopped-flow* pour suivre les réactions d'hydroxylation de l'arginine et d'oxydation du NOHA et calculer les vitesses de formation et de disparition des différents intermédiaires réactionnels observés. Bien qu'*Ostreococcus tauri* ne possède pas la machinerie nécessaire à sa biosynthèse[236], on a choisi d'utiliser le cofacteur H₄B pour cette étude, afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus pour les mNOS qui ne peuvent fixer le H₄F.

2.2. Caractérisation

Le domaine oxygénase de otNOS a été produit pour la première fois au laboratoire et caractérisé par spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE. On s'est intéressé à l'état natif Fe^{III} , ainsi qu'aux complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$.

2.2.1. Etat natif Fe^{III}

On a préparé des complexes de Fe^{III} de otNOS en absence et en présence de substrat et de cofacteur afin de déterminer l'influence de ces derniers sur la stabilité de l'enzyme et l'état de spin du Fe^{III} .

2.2.1.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible des complexes Fe^{III} de otNOS en présence d'arginine seule (spectre magenta), ie tel que purifié, et en présence du cofacteur H_4B et d'arginine (spectre rouge) ou de NOHA (spectre bleu) sont présentés Figure 112.

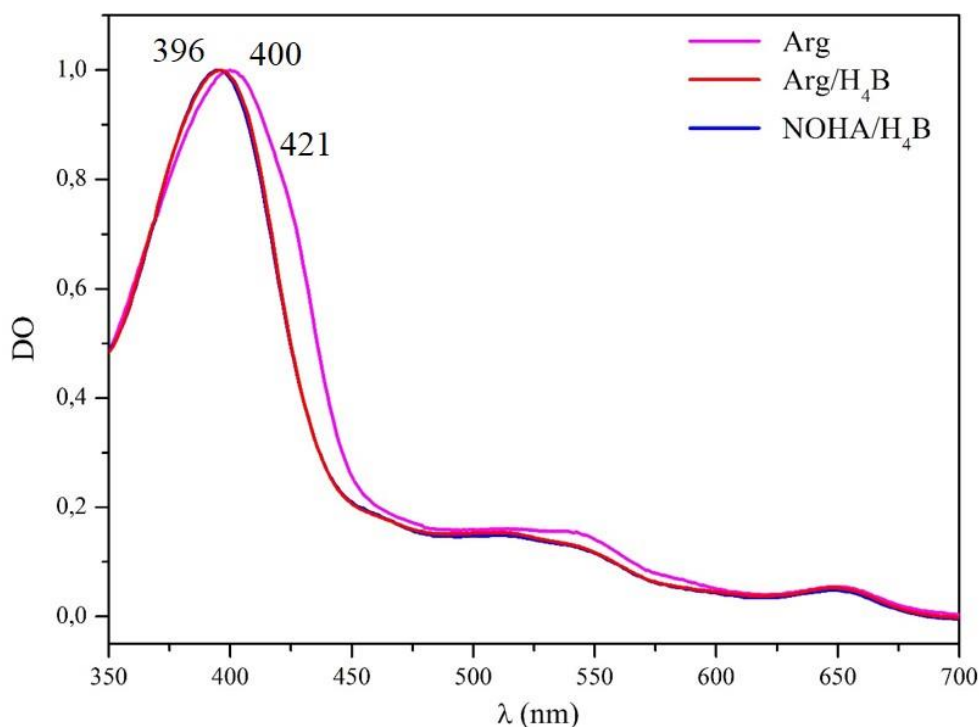


Figure 112 - Spectres d'absorption UV-visible du complexe Fe^{III} de otNOS en présence d'arginine seule (magenta) ou de H_4B et d'arginine (rouge) ou de NOHA (bleu)
Conditions expérimentales : tampon Tris 0,1M pH 7,4, glycérol 10%, Arg 5mM ou NOHA 500 μM , H_4B 500 μM , DTT 3mM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés.

Le spectre obtenu pour l'enzyme purifiée en présence d'arginine (Figure 112, spectre magenta) présente un maximum d'absorbance à 400nm et un épaulement vers 421nm caractéristique d'un mélange de Fe^{III} HS et BS[80,202]. La fixation de l'arginine seule ne

permet donc pas le déplacement de la molécule d'eau distale qui constitue le ligand axial du complexe hexacoordonné BS, ce qui suggère que, comme pour iNOS, la formation du dimère *tight* compétent pour la catalyse nécessiterait la présence du cofacteur[20,189].

En effet, on n'observe plus l'épaule vers 421nm sur le spectre du complexe Fe^{III} saturé en arginine et H_4B (Figure 112, spectre rouge) et il présente la bande de Soret à 396nm caractéristique du Fe^{III} HS des NOS[80], tout comme celui du complexe saturé en NOHA et H_4B (Figure 112, spectre bleu). Ceci indique que otNOS peut fixer le cofacteur H_4B et que ce dernier permet la formation du Fe^{III} HS pur, en présence d'un substrat. Ces complexes sont donc *a priori* compétents pour la catalyse.

2.2.1.2. Spectroscopie RPE

On a également caractérisé les complexes Fe^{III} en absence (spectre noir) et en présence de H_4B et d'arginine (spectre rouge) ou de NOHA (spectre bleu) par spectroscopie RPE (Figure 113) qui permet la détection de petites modifications de l'environnement de l'hème. Le complexe en absence de substrat et de cofacteur a été obtenu à partir de l'enzyme purifiée en présence d'arginine, suite à de nombreux cycles dilution/concentration avec un tampon ne contenant ni substrat, ni cofacteur.

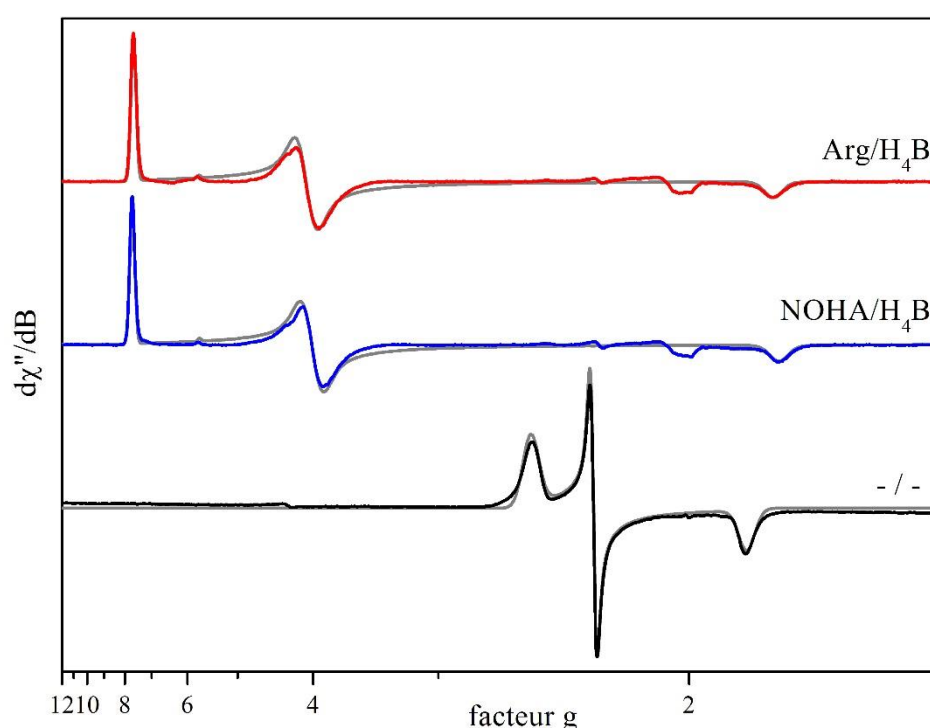


Figure 113 - Spectres RPE du complexe Fe^{III} de otNOS en absence (noir) et en présence de H_4B et d'arginine (rouge) ou de NOHA (bleu).

Conditions d'enregistrement : fréquence 9,4GHz, température 10K, puissance micro-onde 1mW (Arg et NOHA) ou 16μW (-/-), amplitude de modulation 2mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris.

En absence de substrat et de cofacteur, on observe un spectre caractéristique des Fe^{III} BS des NOS ; l'absence de signal vers $g = 8$ indique qu'on n'a pas, ou très peu, de Fe^{III} HS. Bien que le complexe en présence d'arginine seule présente encore une certaine proportion de Fe^{III} BS (Figure 112), cette dernière permet une conversion partielle du Fe^{III} BS en Fe^{III} HS. On retrouve ici le comportement observé pour iNOS et pour deNOS[24, 31,189]. On note cependant que le spectre de otNOS en absence de substrat et de cofacteur est bien défini et ne comporte qu'une seule espèce de Fe^{III} BS (Table 30), et pas un mélange comme c'est le cas pour iNOS et deNOS en absence de substrat et de cofacteur ; la mesure des valeurs de g montre de plus qu'elle est très semblable à l'une des espèces présente chez iNOS (Cf. Chapitre III). Ceci indique qu'on a une conformation unique pour le Fe^{III} BS et suggère donc une certaine stabilité de la protéine et un site actif particulièrement rigide, malgré son exposition au solvant. On peut également supposer que le site actif de otNOS serait plus compact que pour les mNOS ou les bacNOS ce qui limiterait le nombre de conformations accessibles au Fe^{III} .

Fe^{III} HS		Valeurs mesurées			Paramètres de simulation			
Protéine	Subst./Cofact.	g_1^{eff}	g_2^{eff}	g_3^{eff}	g_1	g_2	g_3	E/D
otNOS	Arg/ H_4B	7,65	4,07	1,80	2,001	1,980	1,965	0,077
	NOHA/ H_4B	7,69	4,00	1,79	1,999	1,981	1,955	0,080
bsNOS	Arg/ H_4B	7,64	4,07	1,80	1,999	1,987	1,972	0,080
	NOHA/ H_4B	7,67	3,97	1,78	1,990	1,980	1,971	0,083
iNOS	Arg/ H_4B	7,54	4,12	1,82	1,993	1,987	1,957	0,075
	NOHA/ H_4B	7,62	4,03	1,80	1,990	1,978	1,967	0,080

Fe^{III} BS	Protéine	g_1	g_2	g_3
-/-	otNOS	2,53	2,29	1,86
-/-	iNOS	2,51 2,42	2,29	1,86 1,91

Table 30 – Paramètres RPE des complexes de Fe^{III} HS (gauche) et BS (droite) de otNOS.
Ces paramètres correspondent aux spectres présentés Figure .
Les paramètres obtenus pour iNOS et bsNOS (Chapitre III) sont rappelés à titre de comparaison.

L'absence de signal dans la zone $g = 2$ sur les spectres enregistrés en présence de substrat et de cofacteur confirme la conversion totale du Fe^{III} BS en Fe^{III} HS compétent pour la catalyse. Ces spectres sont extrêmement semblables à ceux obtenus pour iNOS et bsNOS[31] (Table 30) et on retrouve l'anisotropie plus importante en présence de NOHA que d'arginine, observée aussi bien chez les mNOS que chez les bacNOS[31, 156].

2.2.2. Complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$

Le spectre d'absorption UV-visible du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ des NOS présente généralement une bande de Soret étroite et intense vers 444-445nm et parfois un épaulement plus ou moins marqué autour de 420nm attribué à un complexe dégradé pentacoordonné[22, 24, 205,206]. La Figure 114 présente les spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ de otNOS préparés en présence d'arginine seule (spectre magenta) ou après ajout de H_4B (spectre rouge).

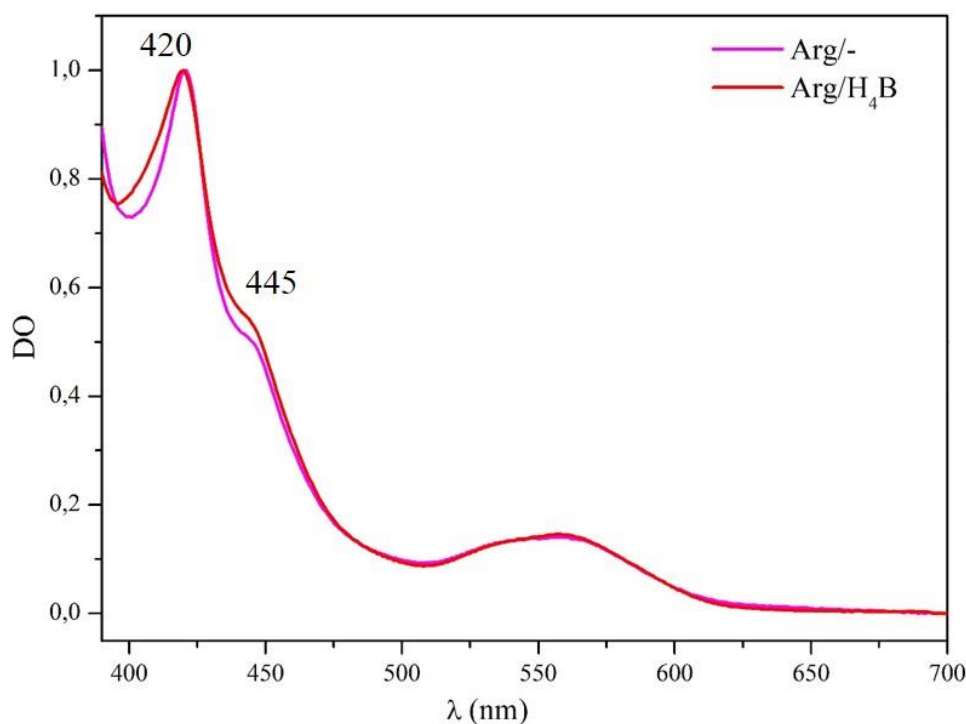


Figure 114- Spectres d'absorption UV-visible du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ de otNOS en présence d'arginine et en absence (magenta) ou en présence (rouge) de H_4B .
Conditions expérimentales : tampon Tris 0,1M pH 7,4, NaCl 250mM, glycérol 10%, Arg 10mM ; chemin optique 1cm. Les spectres sont normalisés.

Le spectre du complexe préparé en présence d'arginine seule présente un maximum d'absorbance à 420nm ce qui montre que la majorité des enzymes ont perdu leur liaison thiolate et donc que celle-ci est particulièrement fragile. La présence d'un épaulement vers 445nm montre qu'on a tout de même une certaine proportion de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ hexacoordonné. L'ajout du cofacteur H_4B a peu d'impact sur la stabilité de la liaison thiolate ; on observe tout de même une légère augmentation de la proportion de complexe hexacoordonné intact. Ce comportement n'a été observé ni pour des NOS d'origine mammifère, ni pour des NOS d'origine bactérienne ce qui suggère que les NOS de plantes pourraient constituer un groupe distinct des deux autres, avec leurs caractéristiques propres.

2.2.3. Complexe Fe^{II}NO

La caractérisation du complexe Fe^{II}NO par spectroscopie RPE permet de sonder le site actif de l'enzyme, et en particulier l'environnement distal de l'hème, et de détecter de petites modifications de sa structure[213,216]. Les spectres des complexes Fe^{II}NO saturés en arginine et H₄B de iNOS, bsNOS et otNOS sont représentés Figure 115 avec leurs simulations.

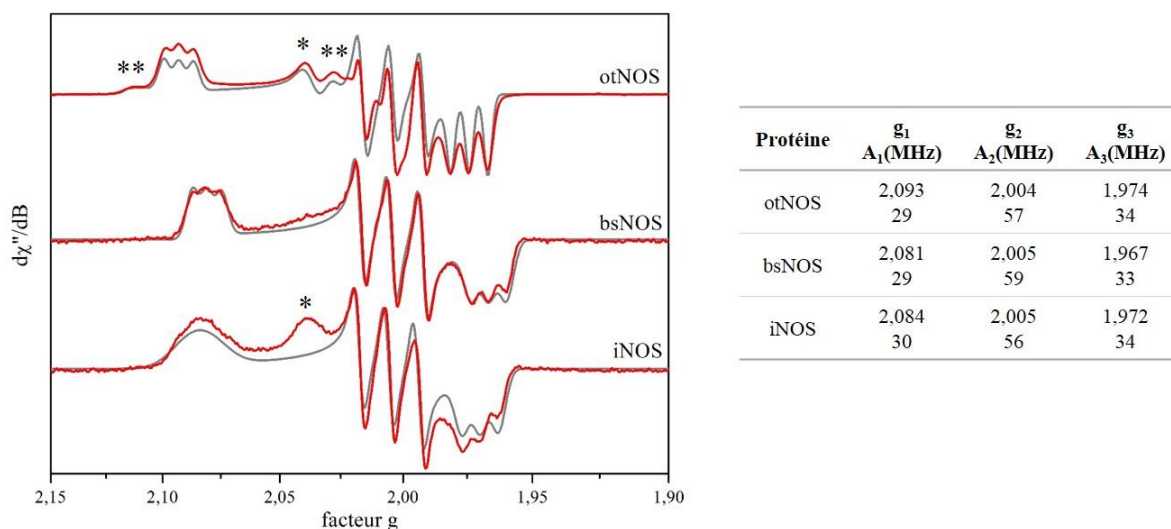


Figure 115 - Spectres RPE (gauche) et paramètres de simulation (droite) des complexes Fe^{II}NO de otNOS, iNOS et bsNOS en présence d'arginine et de H₄B.

Conditions d'enregistrement typiques: fréquence 9,4GHz, température 40K, puissance micro-ondes 63μW, modulation d'amplitude 0,5mT. Les spectres sont normalisés. Les spectres simulés sont représentés en gris. Seuls les paramètres relatifs à l'espèce rhombique sont présentés ici.

* espèce axiale minoritaire.

** Fe^{II}NO pentacoordonné.

Le spectre du complexe de otNOS est assez semblable à ceux généralement observés pour les NOS, avec les trois valeurs de g assez nettement séparées et le couplage hyperfin avec le noyau ¹⁴N du NO[•] particulièrement bien résolu. Etant donné que la force du couplage est la même que pour iNOS et bsNOS, cette meilleure résolution indique une forte rigidité du site actif, déjà évoquée au § 2.2.1. On note également la présence de l'espèce axiale minoritaire (*) et de Fe^{II}NO pentacoordonné (**). Ce dernier est dû à la rupture de la liaison thiolate et n'est généralement pas observé lorsque le substrat et le cofacteur sont tous deux présents[213,216]. Bien que cette forme dégradée reste minoritaire, sa présence confirme que otNOS possède une liaison Fe-S particulièrement fragile. Cet effet a été précédemment observé pour des mutants de iNOS et bsNOS et traduit un affaiblissement de la liaison hydrogène entre la cystéine proximale (C125 pour otNOS) et le résidu tryptophane adjacent (W119 pour otNOS)[146, 147,210].

On remarque également que les valeurs de g obtenues pour otNOS sont un peu différentes de celles obtenues pour iNOS et bsNOS et en particulier g_1 qui est plus élevée. Ce complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ présente ainsi le spectre le plus anisotrope observé pour une NOS, en présence d'arginine et de H_4B [156, 213, 216], ce qui indique une liaison Fe-S plus faible et suggère, une fois de plus, que les NOS de plantes seraient différentes à la fois des mNOS et des bacNOS.

2.2.4. Conclusion

L'équilibre HS/BS du Fe^{III} de otNOS est semblable à celui observé pour iNOS et deiNOS puisque la conversion totale en Fe^{III} HS requiert la présence du substrat et du cofacteur[22, 31,189]. Cependant, otNOS est stable même en absence de substrat et de cofacteur et son site actif est plus rigide que celui de iNOS, malgré l'absence du site de fixation du zinc présent à l'interface du dimère des NOS de mammifères qui augmente sa stabilité[20, 72,236] ; cette rigidité du site actif se traduit également par une excellente résolution du couplage hyperfin sur le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$. Il existe donc, chez otNOS, des éléments qui permettent une certaine rigidification du site actif et qu'on ne retrouve ni chez les mNOS, ni chez les bacNOS. La résolution de sa structure permettrait certainement d'apporter certains éléments de réponse.

La caractérisation des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ a mis en évidence la relative fragilité de la liaison Fe-S. La force de cette liaison module les propriétés électrodonneuses du fer et donc les vitesses d'activation de l'oxygène et d'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, déterminantes pour l'efficacité de la catalyse[146, 147,210]. L'environnement de l'hème de otNOS, aussi bien distal que proximal, étant *a priori* identique à celui de iNOS, cet affaiblissement de la liaison thiolate reste difficile à expliquer.

L'ensemble des données présentées ici suggère donc que otNOS, et potentiellement les NOS de plantes en général, ne se comporteraient ni comme les NOS de mammifères, ni comme leurs homologues bactériennes.

2.3. Etude cinétique

On a utilisé le *stopped-flow* pour étudier le cycle catalytique de otNOS. Afin de pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenus pour des NOS d'origine mammifère ou bactérienne, on a suivi le même protocole expérimental que pour les autres NOS étudiées dans le cadre de cette thèse (Cf. Chapitre II §7.1.4).

2.3.1. Hydroxylation de l'arginine

2.3.1.1. Intermédiaires réactionnels observés

Les spectres enregistrés après le mélange à 4°C de otNOS réduite saturée en arginine et H₄B et d'un tampon saturé en air sont présentés Figure 116.

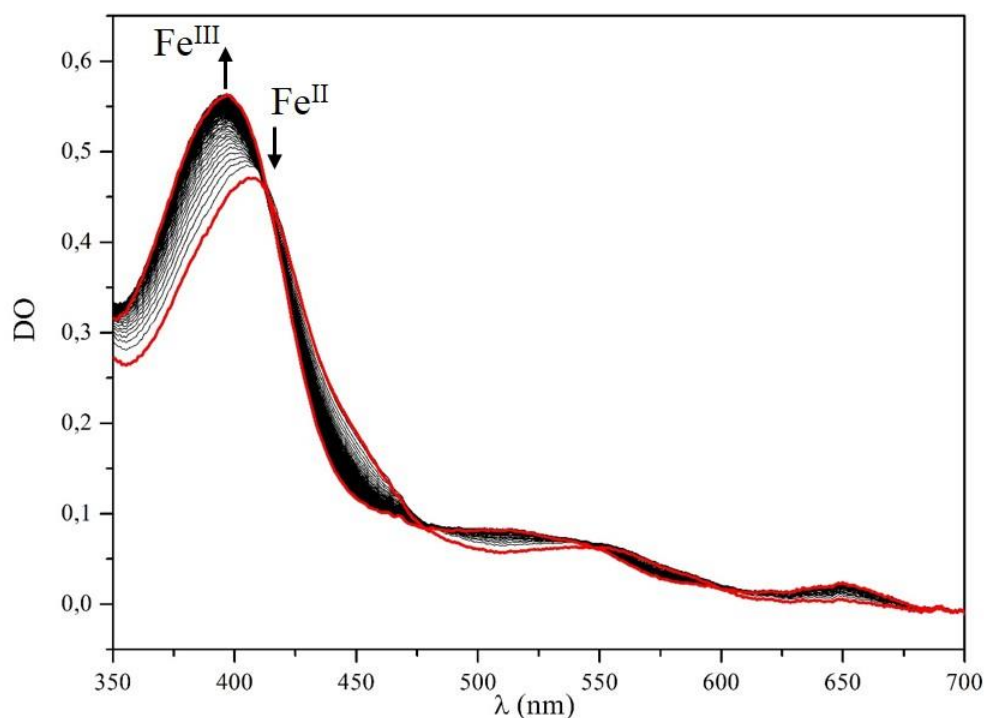


Figure 116 - Spectres de *stopped-flow* obtenus pour otNOS en présence d'arginine et de H₄B.
Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.

On n'observe ici aucun intermédiaire réactionnel entre le Fe^{II} initial et le Fe^{III} final. Etant donné que l'oxydation du Fe^{II} nécessite la fixation du dioxygène, et donc la formation du complexe Fe^{II}O₂, cela indique que sa disparition est extrêmement rapide. Le fait que le complexe Fe^{II}O₂ ne s'accumule pas dans le milieu implique qu'il disparaît au fur et à mesure de sa formation ; on ne peut donc pas mesurer sa vitesse de disparition. Cela montre également que, contrairement aux autres NOS, ce n'est pas l'activation de l'oxygène qui limite la vitesse globale de la réaction, mais la fixation du dioxygène[24, 27-29,181].

2.3.1.2. Fixation du dioxygène et stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$

On utilise les variations d'absorbance à 440nm et 396nm pour suivre, respectivement, la disparition du Fe^{II} initial et la formation du Fe^{III} HS final ; celles-ci sont modélisées par des fonctions bi-exponentielles. La présence de deux phases (Table 31) suggère qu'on pourrait avoir deux voies d'accès de l'oxygène au site actif : *via* un canal d'accès dédié ou *via* la face exposée au solvant qui serait donc plus accessible que pour les autres NOS. L'écart type important sur la phase rapide, malgré une bonne résolution temporelle, indique une forte hétérogénéité de l'échantillon.

Si la fixation de l'oxygène est plus lente que pour iNOS ou bsNOS, on a, en revanche, une réaction globale nettement plus rapide (Table 31) ; on ne peut toutefois pas savoir s'il s'agit de l'hydroxylation de l'arginine ou de l'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

Constantes cinétiques (s^{-1})	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$\longrightarrow$	Fe^{III}
otNOS			38 ± 21 (70%) $3,0 \pm 0,6$ (30%)		
bsNOS		66 ± 32		$4,3 \pm 2,2$	
iNOS		209 ± 61		$18,6 \pm 1,8$	

Table 31 - Constantes cinétiques obtenues pour l'hydroxylation de l'arginine (4°C) en présence du cofacteur H_4B .

Les valeurs obtenues pour iNOS et bsNOS dans les mêmes conditions sont rappelées pour comparaison.

Le ralentissement de la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ indique que le site actif de otNOS serait particulièrement difficile d'accès. Cela pourrait être dû en partie à sa flexibilité réduite et appuie également l'hypothèse d'un site actif particulièrement compact. Cette difficulté d'accès expliquerait aussi qu'on voit apparaître une seconde voie de formation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, plus lente.

Comme cela a été observé sur des mutants de iNOS et de bsNOS dont la force de la liaison thiolate a été modifiée[146, 147,210], une disparition plus rapide du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ ne correspond pas nécessairement à une catalyse plus efficace. En effet, l'affaiblissement de la liaison Fe-S accélère à la fois l'activation de l'oxygène et l'auto-oxydation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ qui peut alors devenir prédominante. De plus si les transferts de proton consécutifs à l'activation de l'oxygène, et nécessaires à la poursuite du cycle catalytique, ne sont pas suffisamment rapides, cette dernière n'est plus couplée à l'oxydation du substrat et on observe alors une forte production de ROS.

On ne peut pas, à ce stade, conclure quant à la nature de la réaction observée ici ; cela nécessiterait, par exemple, l'analyse du milieu réactionnel après réaction pour déterminer si on a formé du NOHA et dans quelle proportion.

2.3.2. Oxydation du NOHA

On réalise également des expériences de *stopped-flow* en présence de NOHA et de H₄B afin d'étudier la deuxième étape du cycle catalytique. On cherche en particulier à savoir si H₄B supporte la production de NO[•] et, le cas échéant, à déterminer sa vitesse de libération.

2.3.2.1. Intermédiaires réactionnels observés

La Figure 117 présente les spectres enregistrés suite au mélange de otNOS réduite saturée en NOHA et cofacteur avec un tampon saturé en air. Suite à la disparition du Fe^{II} initial (spectre rouge), on observe la formation du complexe Fe^{III}NO (spectre vert) qui se dissocie pour libérer le NO[•] et former le Fe^{III} HS final (spectre rouge). La transition du Fe^{II} au Fe^{III}NO fait apparaître plusieurs points isobestiques qui confirment l'absence d'accumulation du complexe Fe^{II}O₂.

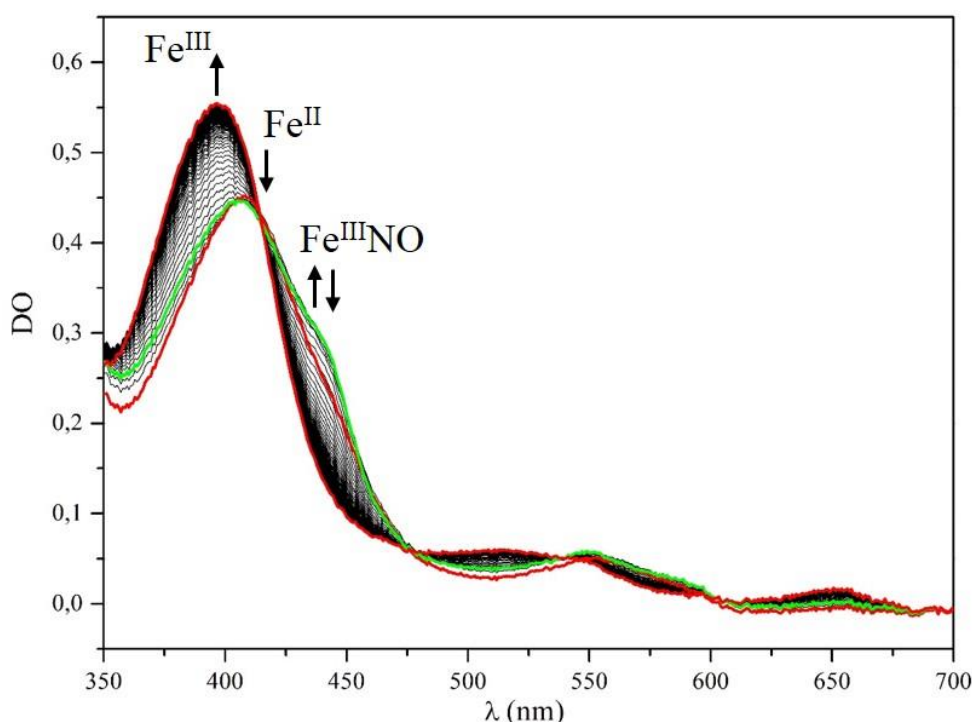


Figure 117 - Spectres de *stopped-flow* obtenus pour otNOS en présence de NOHA et de H₄B.
Les premier et dernier spectres sont représentés en rouge.
Le spectre présentant le maximum de Fe^{III}NO est présenté en vert.

Comme pour la première étape, on a une disparition du Fe^{II}O₂ extrêmement rapide et c'est donc sa formation qui limite la vitesse d'oxydation du substrat. La formation du Fe^{III}NO indique que la catalyse a bien eu lieu et donc que la disparition du Fe^{II}O₂ est bien due à son activation. Cela montre que H₄B supporte l'oxydation du NOHA et la formation de NO[•] par otNOS ; il est donc assez probable qu'il permette aussi l'activation de l'oxygène dans la 1^{ère} étape.

2.3.2.2. Fixation du dioxygène et stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$

Comme on n'a pas d'accumulation de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, on ne peut pas calculer sa vitesse de disparition. On peut toutefois observer la formation du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ à partir du Fe^{II} initial ; celle-ci étant limitée par la vitesse de fixation du dioxygène on a donc accès à la vitesse de formation du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

Constantes cinétiques (s^{-1})	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$	$\longrightarrow$	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$	$\longrightarrow$	Fe^{III}
otNOS		> 100		> 100		$39,1 \pm 4,5$ (88%) $0,44 \pm 0,16$ (12%)	
bsNOS		$29,0 \pm 2,1$		$18,3 \pm 3,5$		$0,39 \pm 0,06$	
iNOS		84 ± 6		$43,3 \pm 4,5$		$1,08 \pm 0,04$	

Table 32 - Constantes cinétiques obtenues pour l'oxydation du NOHA (4°C) en présence du cofacteur H_4B .
Les valeurs obtenues pour iNOS et bsNOS dans les mêmes conditions sont rappelées pour comparaison.

Cependant, le maximum de formation du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ est atteint après seulement une dizaine de millisecondes ; comme on a une résolution temporelle de 3ms, on ne dispose donc que de trois points pour modéliser la variation d'absorbance à 440nm, ce qui n'est pas suffisant pour obtenir une constante de vitesse fiable. On n'a donc qu'une limite inférieure pour ces deux vitesses qui indique que la fixation de l'oxygène et son activation sont nettement plus rapides pour otNOS que pour iNOS ou bsNOS[27].

2.3.2.3. Libération du $\text{NO}^{\bullet}$

La modélisation des variations d'absorbance à 396nm et 440nm par des fonctions bi-exponentielles nous permet de calculer la vitesse de libération du $\text{NO}^{\bullet}$ par otNOS.

On s'intéresse dans un premier temps à la phase rapide, très largement majoritaire. La vitesse de production de $\text{NO}^{\bullet}$ est extrêmement rapide : elle est ainsi 100 à 200 fois plus rapide que pour bsNOS et 20 à 40 fois plus rapide que pour iNOS (Table 32)[27]. Il s'agit de la production de $\text{NO}^{\bullet}$ *in vitro* la plus rapide actuellement mesurée[160]. L'origine de la phase lente minoritaire est difficile à déterminer. Elle pourrait être due à une certaine hétérogénéité de l'échantillon qui conduirait dans certains cas à la séquestration du $\text{NO}^{\bullet}$ au sein du site actif.

2.3.3. Conclusion

Les expériences de *stopped-flow* menées sur otNOS montrent notamment qu'elle est capable de produire du NO[•] *in vitro*, en présence de H₄B. Sa vitesse de libération du NO[•] étant particulièrement élevée, cela suggère que otNOS aurait bien une activité NO-synthase *in vivo*. En effet, elle est tellement rapide qu'on ne peut pas envisager de réaction de nitration enzymatique comme pour stNOS ou deiNOS[33, 164]. Comme elle semble présenter aussi une activation de l'oxygène extrêmement rapide, on a probablement peu de production de ROS.

On note également que le comportement de otNOS est assez original puisque, contrairement aux mNOS et aux bacNOS, la réduction du complexe Fe^{II}O₂ n'est pas l'étape cinétiquement déterminante[24, 27, 29, 70, 85, 125, 181]. En effet, celle-ci est, pour otNOS, plus rapide que la fixation de l'oxygène, comme le montre l'absence d'accumulation du Fe^{II}O₂ dans le milieu. On peut donc supposer qu'elle procéderait selon un mécanisme différent de ceux proposés jusqu'à présent. Cela pose en particulier la question du rôle du cofacteur dans le cycle catalytique, ainsi que de sa nature puisque *Ostreococcus tauri* ne possède pas la machinerie nécessaire à la biosynthèse de H₄B et pourrait donc utiliser H₄F, comme cela a été proposé pour certaines bacNOS[22, 28].

2.4. Conclusion

Que ce soit d'un point de vue structural ou cinétique, otNOS ne se comporte ni comme une mNOS, ni comme une bacNOS et formerait donc un groupe à part. Elle possède notamment une liaison thiolate particulièrement fragile, ce qui se traduit par une activation de l'oxygène extrêmement rapide. Comme la vitesse de libération du NO[•] après dissociation du complexe Fe^{III}NO est aussi très élevée, il semblerait que otNOS soit optimisée pour produire de grandes quantités de NO[•]. De plus, elle possède, comme les mNOS, un domaine réductase fusionné à son domaine oxygénase ce qui suggère qu'on pourrait également avoir une réduction du Fe^{III} hémique rapide et efficace. La production et la purification de l'enzyme entière sont nécessaires à l'étude de cette réaction et permettraient d'étudier l'enzyme en conditions de *multiple turnover* et donc de connaître sa répartition entre les différents états (Fe^{III}, Fe^{II}, Fe^{II}O₂, Fe^{III}NO, Fe^{II}NO) et sa vitesse de production de NO[•] à l'état stationnaire. La caractérisation d'autres NOS de plantes permettrait de déterminer s'il s'agit d'une caractéristique commune à ces enzymes ou propre à otNOS.

Le mécanisme d'activation de l'oxygène par otNOS ainsi que la nature de son cofacteur restent toutefois à déterminer. Tout comme les bacNOS, otNOS ne possède pas d'extension N-terminale et les analyses de bio-informatique effectuées au laboratoire suggèrent que son site actif serait assez ouvert ; il pourrait donc, *a priori*, accommoder le cofacteur H₄F. On peut également envisager l'utilisation du tryptophane, comme proposé pour deiNOS[33, 34], ou d'autres composés hétérocycliques qui pourraient s'insérer dans le réseau de liaisons hydrogène du site de fixation de H₄B.

Enfin, on peut se poser la question de la fonction *in vivo* de otNOS. La forte capacité de production de NO[•] observée suggère une implication dans la défense et la protection de l'organisme, confirmée par l'augmentation de la production de NO[•] par *Ostreococcus tauri* en réponse à un stress lumineux[129]. Cependant, il existe d'autres voies de synthèse du NO[•] chez les plantes, notamment *via* la nitrite réductase, et on ne sait donc pas si otNOS a une fonction qui lui est propre ou si elle participe simplement à la production du NO[•] nécessaire à l'organisme. La présence du domaine réductase et du site de fixation pour la calmoduline suggèrent que, comme eNOS et nNOS, l'activité de otNOS pourrait être sensible aux flux de Ca²⁺ et nécessiter la modification post-traductionnelle de certains acides aminés ; on peut donc aussi envisager un rôle dans la signalisation cellulaire pour otNOS. L'identification de *NOS-like proteins* chez des plantes et la production et la caractérisation de otNOS offrent de nouvelles perspectives et ces nouvelles NOS pourraient permettre de mieux comprendre l'histoire évolutive de cette famille d'enzymes.

Conclusion

Depuis leur découverte il y a une quinzaine d'années, les NOS bactériennes ont été très largement utilisées comme modèles pour l'étude de leurs homologues mammifères. Plus récemment, la mise en évidence d'importantes différences de comportement entre mNOS et bacNOS a remis en cause leur utilisation comme modèle[31]. L'origine de ces différences ainsi que leurs conséquences en termes de mécanisme catalytique restent toutefois mal comprises. Celles-ci sont pourtant cruciales pour comprendre le fonctionnement de ces enzymes et leur rôle *in vivo*.

Dans le chapitre III de ce manuscrit, on s'est intéressé à l'unique différence structurale conservée entre NOS de mammifères et leurs homologues bactériennes : le remplacement d'une valine dans l'environnement distal de l'hème par une isoleucine. L'étude des mutants complémentaires sur cette position de iNOS et bsNOS nous a permis de confirmer l'implication de ce résidu dans les différences de vitesses de production de NO^{*} observées entre mNOS et bacNOS[27]. Nous avons également montré que la nature de l'enzyme restait malgré tout un facteur déterminant pour la structure du site actif et les résultats obtenus indiquent que mNOS et bacNOS suivraient des mécanismes moléculaires différents pour la réaction d'oxydation du NOHA. Ces observations sont confirmées par l'étude de la bacNOS de *Geobacillus stearothermophilus* présentée dans la première partie du chapitre V.

L'étude approfondie de la bacNOS de *Deinococcus radiodurans* présentée au chapitre IV met en évidence le comportement original de cette dernière et indique donc que les bacNOS ne formeraient pas un groupe homogène. Les caractérisations spectroscopiques et cinétiques posent aussi la question de la nature du (ou des) cofacteur(s) naturel(s) de deiNOS et son instabilité, confirmée par les calculs de modélisation moléculaire, suggère l'existence d'un partenaire *in vivo*. La structure tridimensionnelle que nous avons construite nous a permis de comprendre le rôle du cofacteur H₄F dans la stabilisation du dimère et d'identifier les résidus impliqués dans sa fixation. De plus, elle pourra servir de base pour identifier d'éventuels partenaires protéiques et comprendre leur interaction avec deiNOS.

Les études cinétiques menées en présence de différents cofacteurs sur bsNOS, deiNOS et gsNOS indiquent que H₄F pourrait être le cofacteur naturel des NOS bactériennes et qu'il serait impliqué dans le processus d'activation de l'oxygène lors des deux étapes du cycle catalytique. Elles montrent, de plus, l'impact fort de la nature du cofacteur sur la stabilité et le fonctionnement de ces enzymes, en particulier pour deiNOS. Son identification, ainsi que celle des différents partenaires protéiques *in vivo* (réductases, chaperonnes, *etc.*), permettrait donc de lever de nombreuses interrogations concernant les NOS bactériennes.

Enfin, la caractérisation de la première NOS de plante issue de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri*, présentée dans la deuxième partie du chapitre V, indique que cette dernière exercerait très probablement une fonction NO synthase *in vivo*. Elle présente en effet des cinétiques extrêmement rapides, dues en partie à une liaison thiolate particulièrement fragile. Les résultats obtenus montrent également que otNOS ne se comporte ni comme une mNOS, ni comme une bacNOS et suggèrent donc que les NOS de plantes pourraient constituer un groupe à part.

Bibliographie

1. Moeller, M. N., Lancaster, J. R., Jr., Denicola, A. 2008. The interaction of reactive oxygen and nitrogen species with membranes. In Free radical effects on membranes. S. Matalon, and R. P. Patel, editors. 23-+.
2. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric-oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**,9265-9269.
3. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric-oxide release accounts for the biological-activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**,524-526.
4. Palmer, R. M. J., Ashton, D. S., Moncada, S. (1988). Vascular endothelial-cells synthesize nitric-oxide from L-arginine. *Nature* **333**,664-666.
5. Schmidt, H., Nau, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K. E., Klein, M. M., Niroomand, F., Bohme, E. (1988). Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric-oxide. *European Journal of Pharmacology* **154**,213-216.
6. Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. J., Moncada, S. (1989). Formation of nitric-oxide from L-arginine in the central nervous-system - a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate-cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**,5159-5162.
7. Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, P., Bohme, E. (1989). Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor - a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial-cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **164**,678-685.
8. Mulsch, A., Bassenge, E., Busse, R. (1989). Nitric-oxide synthesis in endothelial cytosol - evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **340**,767-770.
9. Palacios, M., Knowles, R. G., Palmer, R. M. J., Moncada, S. (1989). Nitric-oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate-cyclase in adrenal-glands. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **165**,802-809.
10. Palmer, R. M. J., Moncada, S. (1989). A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric-oxide by vascular endothelial-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **158**,348-352.
11. Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Gross, S. S., Thiel, B. A., Levi, R., Nathan, C. F. (1989). Synthesis of nitrogen-oxides from L-arginine by macrophage cytosol - requirement for inducible and constitutive components. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **161**,420-426.
12. Tayeh, M. A., Marletta, M. A. (1989). Macrophage oxidation of L-arginine to nitric-oxide, nitrite, and nitrate - tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *Journal of Biological Chemistry* **264**,19654-19658.
13. Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric-oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**,682-685.
14. Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric-oxide synthase structurally resembles cytochrome-p-450 reductase. *Nature* **351**,714-718.
15. Masters, B. S. S., McMillan, K., Sheta, E. A., Nishimura, J. S., Roman, L. J., Martasek, P. (1996). Cytochromes p450 .3. Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: Structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO center dot as a cellular signal. *Faseb Journal* **10**,552-558.
16. Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**,593-615.
17. Griffith, O. W., Stuehr, D. J. (1995). Nitric oxides synthases - properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Physiology* **57**,707-736.
18. Sudhamsu, J., Crane, B. R. (2009). Bacterial nitric oxide synthases: What are they good for? *Trends in Microbiology* **17**,212-218.

19. Crane, B. R., Sudhamsu, J., Patel, B. A. 2010. Bacterial nitric oxide synthases. In Annual review of biochemistry, vol 79. R. D. Kornberg, C. R. H. Raetz, J. E. Rothman, and J. W. Thorner, editors. 445-470.
20. Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C. Q., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., Tainer, J. A. (1998). Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* **279**,2121-2126.
21. Pant, K., Bilwes, A. M., Adak, S., Stuehr, D. J., Crane, B. R. (2002). Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **41**,11071-11079.
22. Adak, S., Bilwes, A. M., Panda, K., Hosfield, D., Aulak, K. S., McDonald, J. F., Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Crane, B. R., Stuehr, D. J. (2002). Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**,107-112.
23. Sudhamsu, J., Crane, B. R. (2006). Structure and reactivity of a thermostable prokaryotic nitric-oxide synthase that forms a long-lived oxy-heme complex. *Journal of Biological Chemistry* **281**,9623-9632.
24. Adak, S., Aulak, K. S., Stuehr, D. J. (2002). Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**,16167-16171.
25. Wang, Z.-Q., Lawson, R. J., Buddha, M. R., Wei, C.-C., Crane, B. R., Munro, A. W., Stuehr, D. J. (2007). Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **282**,2196-2202.
26. Gusarov, I., Starodubtseva, M., Wang, Z.-Q., McQuade, L., Lippard, S. J., Stuehr, D. J., Nudler, E. (2008). Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *Journal of Biological Chemistry* **283**,13140-13147.
27. Wang, Z. Q., Wei, C. C., Sharma, M., Pant, K., Crane, B. R., Stuehr, D. J. (2004). A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. *Journal of Biological Chemistry* **279**,19018-19025.
28. Reece, S. Y., Woodward, J. J., Marletta, M. A. (2009). Synthesis of nitric oxide by the nos-like protein from *Deinococcus radiodurans*: A direct role for tetrahydrofolate. *Biochemistry* **48**,5483-5491.
29. Chartier, F. J. M., Couture, M. (2007). Substrate-specific interactions with the heme-bound oxygen molecule of nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **282**,20877-20886.
30. White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., Moffat, K. S., Qin, H. Y., Jiang, L. X., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J. J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K. S., Aravind, L., Daly, M. J., Minton, K. W., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Nelson, K. E., Salzberg, S., Smith, H. O., Venter, J. C., Fraser, C. M. (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* r1. *Science* **286**,1571-1577.
31. Brunel, A., Santolini, J., Dorlet, P. (2012). Electron paramagnetic resonance characterization of tetrahydrobiopterin radical formation in bacterial nitric oxide synthase compared to mammalian nitric oxide synthase. *Biophysical Journal* **103**,109-117.
32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP008934.1
33. Buddha, M. R., Tao, T., Parry, R. J., Crane, B. R. (2004). Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry* **279**,49567-49570.
34. Buddha, M. R., Keery, K. M., Crane, B. R. (2004). An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**,15881-15886.
35. Knowles, R. G., Moncada, S. (1994). Nitric-oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**,249-258.
36. Clementi, E. (2003). The contribution of Salvador Moncada to our understanding of the biology of nitric oxide. *Iubmb Life* **55**,563-565.
37. Sessa, W. C. (2004). eNOS at a glance. *Journal of Cell Science* **117**,2427-2429.

38. Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* **87**,315-424.
39. Stamler, J. S., Lamas, S., Fang, F. C. (2001). Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**,675-683.
40. Brecht, D. S., Hwang, P. M., Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric-oxide synthase indicating a neural role for nitric-oxide. *Nature* **347**,768-770.
41. Mungrue, I. N., Brecht, D. S. (2004). nNOS at a glance: Implications for brain and brawn. *Journal of Cell Science* **117**,2627-2629.
42. Christopherson, K. S., Brecht, D. S. (1997). Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *Journal of Clinical Investigation* **100**,2424-2429.
43. Kobzik, L., Reid, M. B., Brecht, D. S., Stamler, J. S. (1994). Nitric-oxide in skeletal-muscle. *Nature* **372**,546-548.
44. Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D., Wishnok, J. S. (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate - nitric-oxide is an intermediate. *Biochemistry* **27**,8706-8711.
45. Lowenstein, C. J., Padalko, E. (2004). iNOS (nos2) at a glance. *Journal of Cell Science* **117**,2865-2867.
46. Nathan, C., Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**,8841-8848.
47. Fang, F. C. (1997). Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation* **99**,2818-2825.
48. Albina, J. E., Reichner, J. S. (1998). Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**,39-53.
49. Szabo, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters* **140**,105-112.
50. Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in Neurosciences* **20**,132-139.
51. Hannibal, L. (2016). Nitric oxide homeostasis in neurodegenerative diseases. *Curr. Alzheimer Res.* **13**,135-149.
52. Ying, L., Hofseth, L. J. (2007). An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Research* **67**,1407-1410.
53. Janakiram, N. B., Rao, C. V. (2012). iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: Promise and progress. *Future Medicinal Chemistry* **4**,2193-2204.
54. Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A. R., Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: A review. *World Journal of Surgical Oncology* **11**.
55. Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Switzer, C., Flores-Santana, W., Isenberg, J. S., Ambs, S., Roberts, D. D., Wink, D. A. (2008). Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **19**,73-76.
56. Ziche, M., Morbidelli, L. (2000). Nitric oxide and angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology* **50**,139-148.
57. Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain, R. K. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* **6**,521-534.
58. Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., Hobai, I. A., Lemmon, C. A., Burnett, A. L., O'Rourke, B., Rodriguez, E. R., Huang, P. L., Lima, J. A. C., Berkowitz, D. E., Hare, J. M. (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* **416**,337-340.
59. Khanna, S., Singh, G. B., Khullar, M. (2014). Nitric oxide synthases and diabetic cardiomyopathy. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **43**,29-34.
60. Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **23**,75-93.
61. Gorren, A. C. F., Mayer, B. (2007). Nitric-oxide synthase: A cytochrome P450 family foster child. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1770**,432-445.
62. Li, H. Y., Poulos, T. L. (2005). Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**,293-305.

63. Raman, C. S., Li, H. Y., Martasek, P., Kral, V., Masters, B. S. S., Poulos, T. L. (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **95**,939-950.
64. Li, H. Y., Shimizu, H., Flinspach, M., Jamal, J., Yang, W. P., Xian, M., Cai, T. W., Wen, E. Z., Jia, Q. A., Wang, P. G., Poulos, T. L. (2002). The novel binding mode of N-alkyl-N'-hydroxyguanidine to neuronal nitric oxide synthase provides mechanistic insights into no biosynthesis. *Biochemistry* **41**,13868-13875.
65. Roman, L. J., Martasek, P., Masters, B. S. S. (2002). Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chemical Reviews* **102**,1179-1189.
66. Baek, K. J., Thiel, B. A., Lucas, S., Stuehr, D. J. (1993). Macrophage nitric-oxide synthase subunits - purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **268**,21120-21129.
67. Fischmann, T. O., Hruza, A., Niu, X. D., Fossetta, J. D., Lunn, C. A., Dolphin, E., Prongay, A. J., Reichert, P., Lundell, D. J., Narula, S. K., Weber, P. C. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature Structural Biology* **6**,233-242.
68. Daff, S. (2010). NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **23**,1-11.
69. Feng, C. (2012). Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions. *Coordination Chemistry Reviews* **256**,393-411.
70. Stuehr, D. J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1411**,217-230.
71. Crane, B. R., Arvai, A. S., Gachhui, R., Wu, C. Q., Ghosh, D. K., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., Tainer, J. A. (1997). The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* **278**,425-431.
72. Ludwig, M. L., Marletta, M. A. (1999). A new decoration for nitric oxide synthase - a Zn(Cys)(4) site. *Structure* **7**,R73-R79.
73. Garcin, E. D., Bruns, C. M., Lloyd, S. J., Hosfield, D. J., Tiso, M., Gachhui, R., Stuehr, D. J., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. (2004). Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **279**,37918-37927.
74. Salerno, J. C., Harris, D. E., Irizarry, K., Patel, B., Morales, A. J., Smith, S. M. E., Martasek, P., Roman, L. J., Masters, B. S. S., Jones, C. L., Weissman, B. A., Lane, P., Liu, Q., Gross, S. S. (1997). An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **272**,29769-29777.
75. Aoyagi, M., Arvai, A. S., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. (2003). Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *Embo Journal* **22**,766-775.
76. Xia, C., Misra, I., Iyanagi, T., Kim, J.-J. P. (2009). Regulation of interdomain interactions by calmodulin in inducible nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **284**,30708-30717.
77. Siddhanta, U., Presta, A., Fan, B. C., Wolan, D., Rousseau, D. L., Stuehr, D. J. (1998). Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase - electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *Journal of Biological Chemistry* **273**,18950-18958.
78. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., Dawson, J. H. (1996). Heme-containing oxygenases. *Chemical Reviews* **96**,2841-2887.
79. Mayer, B., Wu, C. Q., Gorren, A. C. F., Pfeiffer, S., Schmidt, K., Clark, P., Stuehr, D. J., Werner, E. R. (1997). Tetrahydrobiopterin binding to macrophage inducible nitric oxide synthase: Heme spin shift and dimer stabilization by the potent pterin antagonist 4-amino-tetrahydrobiopterin. *Biochemistry* **36**,8422-8427.
80. McMillan, K., Masters, B. S. S. (1993). Optical-difference spectrophotometry as a probe of rat-brain nitric-oxide synthase heme-substrate interaction. *Biochemistry* **32**,9875-9880.
81. Presta, A., Siddhanta, U., Wu, C. Q., Sennequier, N., Huang, L. X., Abu-Soud, H. M., Erzurum, S., Stuehr, D. J. (1998). Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**,298-310.

82. Bec, N., Gorren, A. C. F., Voelker, C., Mayer, B., Lange, R. (1998). Reaction of neuronal nitric-oxide synthase with oxygen at low temperature - evidence for reductive activation of the oxyferrous complex by tetrahydrobiopterin. *Journal of Biological Chemistry* **273**,13502-13508.
83. Kaufman, S. (1993). The phenylalanine hydroxylating system. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Vol 67 **67**,77-264.
84. Hurshman, A. R., Krebs, C., Edmondson, D. E., Huynh, B. H., Marletta, M. A. (1999). Formation of a pterin radical in the reaction of the heme domain of inducible nitric oxide synthase with oxygen. *Biochemistry* **38**,15689-15696.
85. Santolini, J. (2011). The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: A story of electrons and protons. *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**,127-141.
86. Wei, C. C., Wang, Z. Q., Tejero, J., Yang, Y. P., Hemann, C., Hille, R., Stuehr, D. J. (2008). Catalytic reduction of a tetrahydrobiopterin radical within nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **283**,11734-11742.
87. Wei, C. C., Crane, B. R., Stuehr, D. J. (2003). Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chemical Reviews* **103**,2365-2383.
88. Stoll, S., NejatyJahromy, Y., Woodward, J. J., Ozarowski, A., Marletta, M. A., Britt, R. D. (2010). Nitric oxide synthase stabilizes the tetrahydrobiopterin cofactor radical by controlling its protonation state. *Journal of the American Chemical Society* **132**,11812-11823.
89. de Visser, S. P., Tan, L. S. (2008). Is the bound substrate in nitric oxide synthase protonated or neutral and what is the active oxidant that performs substrate hydroxylation? *Journal of the American Chemical Society* **130**,12961-12974.
90. Cho, K.-B., Carvajal, M. A., Shaik, S. (2009). First half-reaction mechanism of nitric oxide synthase: The role of proton and oxygen coupled electron transfer in the reaction by quantum mechanics/molecular mechanics. *Journal of Physical Chemistry B* **113**,336-346.
91. Martin, N. I., Woodward, J. J., Winter, M. B., Beeson, W. T., Marletta, M. A. (2007). Design and synthesis of C5 methylated L-arginine analogues as active site probes for nitric oxide synthase. *Journal of the American Chemical Society* **129**,12563-12570.
92. Rusche, K. M., Spiering, M. M., Marletta, M. A. (1998). Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**,15503-15512.
93. Wei, C. C., Wang, Z. Q., Hemann, C., Hille, R., Stuehr, D. J. (2003). A tetrahydrobiopterin radical forms and then becomes reduced during N-omega-hydroxyarginine oxidation by nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **278**,46668-46673.
94. Cho, K. B., Gault, J. W. (2004). Quantum chemical calculations of the NHA bound nitric oxide synthase active site: O₂ binding and implications for the catalytic mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **126**,10267-10270.
95. Cho, K. B., Gault, J. W. (2005). Second half-reaction of nitric oxide synthase: Computational insights into the initial step and key proposed intermediate. *Journal of Physical Chemistry B* **109**,23706-23714.
96. Robinet, J. J., Cho, K.-B., Gault, J. W. (2008). A density functional theory investigation on the mechanism of the second half-reaction of nitric oxide synthase. *Journal of the American Chemical Society* **130**,3328-3334.
97. Woodward, J. J., Chang, M. M., Martin, N. I., Marletta, M. A. (2009). The second step of the nitric oxide synthase reaction: Evidence for ferric-peroxo as the active oxidant. *Journal of the American Chemical Society* **131**,297-305.
98. Miller, R. T., Martasek, P., Omura, T., Masters, B. S. S. (1999). Rapid kinetic studies of electron transfer in the three isoforms of nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **265**,184-188.
99. Gachhui, R., Presta, A., Bentley, D. F., AbuSoud, H. M., McArthur, R., Brudvig, G., Ghosh, D. K., Stuehr, D. J. (1996). Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* - calmodulin response is complete within the reductase domain itself. *Journal of Biological Chemistry* **271**,20594-20602.
100. Feng, C., Chen, L., Li, W., Elmore, B. O., Fan, W., Sun, X. (2014). Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **130**,130-140.

101. Craig, D. H., Chapman, S. K., Daff, S. (2002). Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric-oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock. *Journal of Biological Chemistry* **277**,33987-33994.
102. Panda, K., Adak, S., Konas, D., Sharma, M., Stuehr, D. J. (2004). A conserved aspartate (asp-1393) regulates NADPH reduction of neuronal nitric-oxide synthase - implications for catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **279**,18323-18333.
103. Tejero, J., Hannibal, L., Mustovich, A., Stuehr, D. J. (2010). Surface charges and regulation of FMN to heme electron transfer in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **285**,27232-27240.
104. Tejero, J., Haque, M. M., Durra, D., Stuehr, D. J. (2010). A bridging interaction allows calmodulin to activate NO synthase through a bi-modal mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **285**,25941-25949.
105. Dunford, A. J., Rigby, S. E. J., Hay, S., Munro, A. W., Scrutton, N. S. (2007). Conformational and thermodynamic control of electron transfer in neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* **46**,5018-5029.
106. Sobolewska-Stawiarz, A., Leferink, N. G. H., Fisher, K., Heyes, D. J., Hay, S., Rigby, S. E. J., Scrutton, N. S. (2014). Energy landscapes and catalysis in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **289**,11725-11738.
107. He, Y., Haque, M. M., Stuehr, D. J., Lu, H. P. (2015). Single-molecule spectroscopy reveals how calmodulin activates NO synthase by controlling its conformational fluctuation dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**,11835-11840.
108. Salerno, J. C., Ray, K., Poulos, T., Li, H., Ghosh, D. K. (2013). Calmodulin activates neuronal nitric oxide synthase by enabling transitions between conformational states. *Febs Letters* **587**,44-47.
109. Campbell, M. G., Smith, B. C., Potter, C. S., Carragher, B., Marletta, M. A. (2014). Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**,E3614-E3623.
110. Astashkin, A. V., Elmore, B. O., Fan, W., Guillemette, J. G., Feng, C. (2010). Pulsed EPR determination of the distance between heme iron and FMN centers in a human inducible nitric oxide synthase. *Journal of the American Chemical Society* **132**,12059-12067.
111. Smith, B. C., Underbakke, E. S., Kulp, D. W., Schief, W. R., Marletta, M. A. (2013). Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**,E3577-E3586.
112. Sheng, Y. H., Zhong, L. H., Guo, D. H., Lau, G., Feng, C. J. (2015). Insight into structural rearrangements and interdomain interactions related to electron transfer between flavin mononucleotide and heme in nitric oxide synthase: A molecular dynamics study. *Journal of Inorganic Biochemistry* **153**,186-196.
113. Roman, L. J., Martasek, P., Miller, R. T., Harris, D. E., de la Garza, M. A., Shea, T. M., Kim, J. J. P., Masters, B. S. S. (2000). The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **275**,29225-29232.
114. Vasquez-Vivar, J., Hogg, N., Martasek, P., Karoui, H., Pritchard, K. A., Kalyanaraman, B. (1999). Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **274**,26736-26742.
115. Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H. P., Mayer, B. (1995). Structural-analysis of porcine brain nitric-oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *Embo Journal* **14**,3687-3695.
116. Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russell, S. W., Murphy, W. J. (1993). Macrophage nitric-oxide synthase gene - 2 upstream regions mediate induction by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**,9730-9734.
117. MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* **15**,323-350.

118. Geller, D. A., Billiar, T. R. (1998). Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**,7-23.
119. Schmidt, H., Smith, R. M., Nakane, M., Murad, F. (1992). Ca^{2+} /calmodulin-dependent NO synthase type-I - a biopteroflavoprotein with Ca^{2+} /calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. *Biochemistry* **31**,3243-3249.
120. Cho, H. J., Xie, Q. W., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Nathan, C. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric-oxide synthase from macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **176**,599-604.
121. Mitchell, D. A., Erwin, P. A., Michel, T., Marletta, M. A. (2005). S-nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* **44**,4636-4647.
122. Smith, B. C., Fernhoff, N. B., Marletta, M. A. (2012). Mechanism and kinetics of inducible nitric oxide synthase auto-S-nitrosation and inactivation. *Biochemistry* **51**,1028-1040.
123. Marletta, M. A. (2001). Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: Why does it have to be so complicated? *Trends in Biochemical Sciences* **26**,519-521.
124. Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z. Q., Huang, F., Xia, H. H., Peters, M. F., Froehner, S. C., Bredt, D. S. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**,757-767.
125. Stuehr, D. J., Santolini, J., Wang, Z. Q., Wei, C. C., Adak, S. (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *Journal of Biological Chemistry* **279**,36167-36170.
126. Panda, K., Rosenfeld, R. J., Ghosh, S., Meade, A. L., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J. (2002). Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *Journal of Biological Chemistry* **277**,31020-31030.
127. Torreilles, J. (2001). Nitric oxide: One of the more conserved and widespread signaling molecules. *Frontiers in Bioscience* **6**,D1161-D1172.
128. Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z. J., Zhu, Y., Carpenter, E. J., Wong, G. K. S., Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling* **9**.
129. Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Calo, G., Salerno, G., Lamattina, L. (2010). Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**,3816-3830.
130. Golderer, G., Werner, E. R., Leitner, S., Grobner, P., Werner-Felmayer, G. (2001). Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. *Genes & Development* **15**,1299-1309.
131. Messner, S., Leitner, S., Bommassar, C., Golderer, G., Groebner, P., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G. (2009). *Physarum* nitric oxide synthases: Genomic structures and enzymology of recombinant proteins. *Biochemical Journal* **418**,691-700.
132. Falb, M., Pfeiffer, F., Palm, P., Rodewald, K., Hickmann, V., Tittor, J., Oesterheld, D. (2005). Living with two extremes: Conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Research* **15**,1336-1343.
133. Chen, Y. J., Rosazza, J. P. N. (1994). A bacterial, nitric-oxide synthase from a *Nocardia* species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **203**,1251-1258.
134. Choi, D. W., Oh, H. Y., Hong, S. Y., Han, J. W., Lee, H. W. (2000). Identification and characterization of nitric oxide synthase in *Salmonella typhimurium*. *Archives of Pharmacal Research* **23**,407-412.
135. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borris, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Daniel, R. A., Denizot, F., Devine, K. M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S. D., Emmerson, P. T., Entian, K. D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S. Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E. J., Grandi, G., Guiseppe, G., Guy, B. J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C. R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M. F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., KlaerrBlanchard, M., Klein, C.,

- Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S. M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R. P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., Oreilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S. H., Parro, V., Pohl, T. M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A. M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Serror, P., Shin, B. S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H. F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**,249-256.
136. Choi, W. S., Chang, M. S., Han, J. W., Hong, S. Y., Lee, H. W. (1997). Identification of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**,554-558.
 137. Hong, I. S., Kim, Y. K., Choi, W. S., Seo, D. W., Yoon, J. W., Han, J. W., Lee, H. Y., Lee, H. W. (2003). Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus*. *Fems Microbiology Letters* **222**,177-182.
 138. Gusarov, I., Nudler, E. (2005). No-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**,13855-13860.
 139. Johnson, E. G., Sparks, J. P., Dzikovski, B., Crane, B. R., Gibson, D. M., Loria, R. (2008). Plant-pathogenic streptomyces species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals. *Chemistry & Biology* **15**,43-50.
 140. Shatalin, K., Gusarov, I., Avetisova, E., Shatalina, Y., McQuade, L. E., Lippard, S. J., Nudler, E. (2008). *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**,1009-1013.
 141. Schneiker, S., Perlova, O., Kaiser, O., Gerth, K., Alici, A., Altmeyer, M. O., Bartels, D., Bekel, T., Beyer, S., Bode, E., Bode, H. B., Bolten, C. J., Choudhuri, J. V., Doss, S., Elnakady, Y. A., Frank, B., Gaigalat, L., Goesmann, A., Groeger, C., Gross, F., Jelsbak, L., Jelsbak, L., Kalinowski, J., Kegler, C., Knauber, T., Konietzny, S., Kopp, M., Krause, L., Krug, D., Linke, B., Mahmud, T., Martinez-Arias, R., McHardy, A. C., Merai, M., Meyer, F., Mormann, S., Munoz-Dorado, J., Perez, J., Pradella, S., Rachid, S., Raddatz, G., Rosenau, F., Rueckert, C., Sasse, F., Scharfe, M., Schuster, S. C., Suen, G., Treuner-Lange, A., Velicer, G. J., Vorhoelter, F.-J., Weissman, K. J., Dwelch, R., Wenzel, S. C., Whitworth, D. E., Wilhelm, S., Wittmann, C., Bloecker, H., Puehler, A., Mueller, R. (2007). Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nature Biotechnology* **25**,1281-1289.
 142. Midha, S., Mishra, R., Aziz, M. A., Sharma, M., Mishra, A., Khandelwal, P., Bhatnagar, R. (2005). Cloning, expression, and characterization of recombinant nitric oxide synthase-like protein from *Bacillus anthracis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**,346-356.
 143. Bird, L. E., Ren, J. S., Zhang, J. C., Foxwell, N., Hawkins, A. R., Charles, I. G., Stammers, D. K. (2002). Crystal structure of sanos, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *staphylococcus aureus*. *Structure* **10**,1687-1696.
 144. Lang, J., Driscoll, D., Gelinas, S., Rafferty, S. P., Couture, M. (2009). Trp180 of endothelial NOS and Trp56 of bacterial saNOS modulate sigma bonding of the axial cysteine to the heme. *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**,1102-1112.
 145. Lang, J., Santolini, J., Couture, M. (2011). The conserved Trp-Cys hydrogen bond dampens the "push effect" of the heme cysteinate proximal ligand during the first catalytic cycle of nitric oxide synthase. *Biochemistry* **50**,10069-10081.

146. Brunel, A., Wilson, A., Henry, L., Dorlet, P., Santolini, J. (2011). The proximal hydrogen bond network modulates *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase electronic and structural properties. *Journal of Biological Chemistry* **286**.
147. Hannibal, L., Somasundaram, R., Tejero, J., Wilson, A., Stuehr, D. J. (2011). Influence of heme-thiolate in shaping the catalytic properties of a bacterial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **286**,39224-39235.
148. Chartier, F. J. M., Blais, S. P., Couture, M. (2006). A weak Fe-O bond in the oxygenated complex of the nitric-oxide synthase of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* **281**,9953-9962.
149. Salard, I., Mercey, E., Rekka, E., Boucher, J.-L., Nioche, P., Mikula, I., Martasek, P., Raman, C. S., Mansuy, D. (2006). Analogies and surprising differences between recombinant nitric oxide synthase-like proteins from *Staphylococcus aureus* and *Bacillus anthracis* in their interactions with L-arginine analogs and iron ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**,2024-2033.
150. Ghosh, D. K., Wu, C. Q., Pitters, E., Moloney, M., Werner, E. R., Mayer, B., Stuehr, D. J. (1997). Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *Biochemistry* **36**,10609-10619.
151. Chen, Y. S., Panda, K., Stuehr, D. J. (2002). Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme-NO-dependent mechanism. *Biochemistry* **41**,4618-4625.
152. Abusoud, H. M., Loftus, M., Stuehr, D. J. (1995). Subunit dissociation and unfolding of macrophage NO synthase - relationship between enzyme structure, prosthetic group binding, and catalytic function. *Biochemistry* **34**,11167-11175.
153. Wang, J. L., Stuehr, D. J., Rousseau, D. L. (1995). Tetrahydrobiopterin-deficient nitric-oxide synthase has a modified heme environment and forms a cytochrome P-420 analog. *Biochemistry* **34**,7080-7087.
154. Pant, K., Crane, B. R. (2005). Structure of a loose dimer: An intermediate in nitric oxide synthase assembly. *Journal of Molecular Biology* **352**,932-940.
155. Montgomery, H. J., Dupont, A. L., Leivo, H. E., Guillemette, J. G. (2010). Cloning, expression, and purification of a nitric oxide synthase-like protein from *Bacillus cereus*. *Biochemistry research international* **2010**,489892-489892.
156. Davydov, R., Sudhamsu, J., Lees, N. S., Crane, B. R., Hoffman, B. M. (2009). EPR and endor characterization of the reactive intermediates in the generation of NO by cryoreduced oxy-nitric oxide synthase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of the American Chemical Society* **131**,14493-14507.
157. Brunel, A., Lang, J., Couture, M., Boucher, J. L., Dorlet, P., Santolini, J. (2016). Oxygen activation in NO synthases: Evidence for a direct role of the substrate. *Febs Open Bio* **6**,386-397.
158. Rosenfeld, R. J., Bonaventura, J., Szymczyna, B. R., MacCoss, M. J., Arvai, A. S., Yates, J. R., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. (2010). Nitric-oxide synthase forms N-NO-pterin and S-NO-Cys implications for activity, allostery, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **285**,31581-31589.
159. Holden, J. K., Lim, N., Poulos, T. L. (2014). Identification of redox partners and development of a novel chimeric bacterial nitric oxide synthase for structure activity analyses. *Journal of Biological Chemistry* **289**,29437-29445.
160. Whited, C. A., Warren, J. J., Lavoie, K. D., Weinert, E. E., Agapie, T., Winkler, J. R., Gray, H. B. (2012). Gating NO release from nitric oxide synthase. *Journal of the American Chemical Society* **134**,27-30.
161. Schreiber, F., Beutler, M., Enning, D., Lamprecht-Grandio, M., Zafra, O., Eduardo Gonzalez-Pastor, J., de Beer, D. (2011). The role of nitric-oxide-synthase-derived nitric oxide in multicellular traits of *Bacillus subtilis* 3610: Biofilm formation, swarming, and dispersal. *Bmc Microbiology* **11**.
162. Patel, B. A., Moreau, M., Widom, J., Chen, H., Yin, L., Hua, Y., Crane, B. R. (2009). Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus*

- radiodurans* from exposure to UV light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**,18183-18188.
163. van Sorge, N. M., Beasley, F. C., Gusarov, I., Gonzalez, D. J., von Koeckritz-Blickwede, M., Anik, S., Borkowski, A. W., Dorrestein, P. C., Nudler, E., Nizet, V. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. *Journal of Biological Chemistry* **288**,6417-6426.
 164. Wach, M. J., Kers, J. A., Krasnoff, S. B., Loria, R., Gibson, D. M. (2005). Nitric oxide synthase inhibitors and nitric oxide donors modulate the biosynthesis of thaxtomin A, a nitrated phytotoxin produced by *Streptomyces* spp. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **12**,46-53.
 165. Kers, J. A., Wach, M. J., Krasnoff, S. B., Widom, J., Cameron, K. D., Bukhalid, R. A., Gibson, D. M., Crane, B. R., Loria, R. (2004). Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* **429**,79-82.
 166. Barry, S. M., Kers, J. A., Johnson, E. G., Song, L., Aston, P. R., Patel, B., Krasnoff, S. B., Crane, B. R., Gibson, D. M., Loria, R., Challis, G. L. (2012). Cytochrome P450-catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtominphytotoxin biosynthesis. *Nature Chemical Biology* **8**,814-816
 167. Crane, B. R. (2008). The enzymology of nitric oxide in bacterial pathogenesis and resistance. *Biochemical Society Transactions* **36**,1149-1154.
 168. Vaish, M., Singh, V. K. (2013). Antioxidant functions of nitric oxide synthase in a methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. *International journal of microbiology* **2013**,312146-312146.
 169. Popova, T. G., Teunis, A., Vaseghi, H., Zhou, W., Espina, V., Liotta, L. A., Popov, S. G. (2015). Nitric oxide as a regulator of *B.anthraxis* pathogenicity. *Frontiers in Microbiology* **6**.
 170. Chung, M.-C., Narayanan, A., Popova, T. G., Kashanchi, F., Bailey, C. L., Popov, S. G. (2013). *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide induces protein S-nitrosylation contributing to macrophage death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **430**,125-130.
 171. Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M., Nudler, E. (2009). Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**,1380-1384.
 172. Zeng, Q.-P., Xiao, N., Wu, P., Yang, X.-Q., Zeng, L.-X., Guo, X.-X., Zhang, P.-Z., Qiu, F. (2011). Artesunate potentiates antibiotics by inactivating heme-harboring bacterial nitric oxide synthase and catalase. *BMC research notes* **4**,223-223.
 173. Holden, J. K., Li, H., Jing, Q., Kang, S., Richo, J., Silverman, R. B., Poulos, T. L. (2013). Structural and biological studies on bacterial nitric oxide synthase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**,18127-18131.
 174. Holden, J. K., Dejam, D., Lewis, M. C., Huang, H., Kang, S., Jing, Q., Xue, F., Silverman, R. B., Poulos, T. L. (2015). Inhibitor bound crystal structures of bacterial nitric oxide synthase. *Biochemistry* **54**,4075-4082.
 175. Holden, J. K., Kang, S., Beasley, F. C., Cinelli, M. A., Li, H., Roy, S. G., Dejam, D., Edinger, A. L., Nizet, V., Silverman, R. B., Poulos, T. L. (2015). Nitric oxide synthase as a target for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemistry & Biology* **22**,785-792.
 176. Hansler, A., Chen, Q. Y., Ma, Y. L., Gross, S. S. (2016). Untargeted metabolite profiling reveals that nitric oxide bioynthesis is an endogenous modulator of carotenoid biosynthesis in *Deinococcus radiodurans* and is required for extreme ionizing radiation resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **589**,38-52.
 177. Czyz, A., Wegrzyn, G. (2005). The obg subfamily of bacterial GTP-binding proteins: Essential proteins of largely unknown functions that are evolutionarily conserved from bacteria to humans. *Acta Biochimica Polonica* **52**,35-43.
 178. Plate, L., Marletta, M. A. (2013). Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behavior. *Trends in Biochemical Sciences* **38**,566-575.
 179. Spiro, S. (2007). Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *Fems Microbiology Reviews* **31**,193-211.
 180. Brunel, A. (2012). Etude du mécanisme d'activation de l'oxygène par les NO-synthases. Université Paris Sud.
 181. Wang, Z.-Q., Wei, C.-C., Stuehr, D. J. (2010). How does a valine residue that modulates heme-NO binding kinetics in inducible NO synthase regulate enzyme catalysis? *Journal of Inorganic Biochemistry* **104**,349-356.

182. Beaumont, E., Lambry, J.-C., Wang, Z.-Q., Stuehr, D. J., Martin, J.-L., Slama-Schwok, A. (2007). Distal Va1346Ile mutation in inducible NO synthase promotes substrate-dependent NO confinement. *Biochemistry* **46**,13533-13540.
183. Kabir, M., Sudhamsu, J., Crane, B. R., Yeh, S. R., Rousseau, D. L. (2006). A novel heme environment in nitric oxide synthase from the bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **14**,A77-A77.
184. Kabir, M., Rousseau, D. L., Yeh, S.-R., Egawa, T., Crane, B., Sudhamsu, J. (2007). Fast kinetics study of the reaction of oxygen with *Geobacillus stearothermophilus* nitric oxide synthase. *Biophysical Journal*,211A-211A.
185. Kabir, M., Sudhamsu, J., Crane, B. R., Yeh, S.-R., Rousseau, D. L. (2008). Substrate-ligand interactions in *Geobacillus stearothermophilus* nitric oxide synthase. *Biochemistry* **47**,12389-12397.
186. Kinloch, R. D., Sono, M., Sudhamsu, J., Crane, B. R., Dawson, J. H. (2010). Magnetic circular dichroism spectroscopic characterization of the NOS-like protein from *Geobacillus stearothermophilus* (gsnos). *Journal of Inorganic Biochemistry* **104**,357-364.
187. www.bioweb2.pasteur.fr
188. Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der hh. Weselsky und Benedikt ueber einige Azoverbindungen *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*,426-428.
189. Presta, A., Weber-Main, A. M., Stankovich, M. T., Stuehr, D. J. (1998). Comparative effects of substrates and pterin cofactor on the heme midpoint potential in inducible and neuronal nitric oxide synthases. *Journal of the American Chemical Society* **120**,9460-9465.
190. Bio-kine32 user's manual, version 4.72.
191. Stoll, S., Schweiger, A. (2006). Easyspin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance* **178**,42-55.
192. (2005). Mix & freeze accessory for SFM-20, SFM-300 and SFM-400, version 1.4.
193. Sali, A., Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology* **234**,779-815.
194. Webb, B., Sali, A. (2014). Comparative protein structure modeling using modeller. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]* **47**,5.6.1-32.
195. Shen, M. Y., Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science* **15**,2507-2524.
196. Benkert, P., Tosatto, S. C. E., Schomburg, D. (2008). Qmean: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **71**,261-277.
197. <https://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>
198. <http://www.gromacs.org/>
199. Berendsen, H. J. C., Vanderspoel, D., Vandrunen, R. (1995). Gromacs - a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Computer Physics Communications* **91**,43-56.
200. Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., Lindahl, E. (2013). Gromacs 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**,845-854.
201. <http://www.swissparam.ch/>
202. Sligar, S. G. (1976). Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450. *Biochemistry* **15**,5399-5406.
203. Matsuoka, A., Stuehr, D. J., Olson, J. S., Clark, P., Ikedasaito, M. (1994). L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **269**,20335-20339.
204. White, R. E., Coon, M. J. (1982). Heme ligand replacement reactions of cytochrome-P-450 - characterization of the bonding atom of the axial ligand trans to thiolate as oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **257**,3073-3083.
205. Omura, T., Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **237**,1375-&.
206. Stuehr, D. J., Ikedasaito, M. (1992). Spectral characterization of brain and macrophage nitric-oxide synthases - cytochrome-p-450-like hemeproteins that contain a flavin semiquinone radical. *Journal of Biological Chemistry* **267**,20547-20550.

207. Santolini, M., Roman, M., Stuehr, D. J., Mattioli, T. A. (2006). Resonance raman study of *Bacillus subtilis* NO synthase-like protein: Similarities and differences with mammalian NO synthases. *Biochemistry* **45**,1480-1489.
208. Adak, S., Wang, Q., Stuehr, D. J. (2000). Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase - implications for mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **275**,33554-33561.
209. Adak, S., Stuehr, D. J. (2001). A proximal tryptophan in NO synthase controls activity by a novel mechanism. *Journal of Inorganic Biochemistry* **83**,301-308.
210. Tejero, J. S., Biswas, A., Wang, Z. Q., Page, R. C., Haque, M. M., Hemann, C., Zweier, J. L., Misra, S., Stuehr, D. J. (2008). Stabilization and characterization of a heme-oxy reaction intermediate in inducible nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **283**,33498-33507.
211. Astashkin, A. V., Elmore, B. O., Chen, L., Fan, W., Guillemette, J. G., Feng, C. (2012). Pulsed ENDOR determination of the arginine location in the ferrous-NO form of neuronal NOS. *Journal of Physical Chemistry A* **116**,6731-6739.
212. Flores, M., Wajenberg, E., Bemski, G. (1997). Temperature dependence of q-band electron paramagnetic resonance spectra of nitrosyl heme proteins. *Biophysical Journal* **73**,3225-3229.
213. Migita, C. T., Salerno, J. C., Masters, B. S. S., Martasek, P., McMillan, K., IkedaSaito, M. (1997). Substrate binding-induced changes in the EPR spectra of the ferrous nitric oxide complexes of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* **36**,10987-10992.
214. Morse, R. H., Chan, S. I. (1980). Electron-paramagnetic resonance studies of nitrosyl ferrous heme complexes - determination of an equilibrium between 2 conformations. *Journal of Biological Chemistry* **255**,7876-7882.
215. Radoul, M., Sundararajan, M., Potapov, A., Riplinger, C., Neese, F., Goldfarb, D. (2010). Revisiting the nitrosyl complex of myoglobin by high-field pulse EPR spectroscopy and quantum mechanical calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**,7276-7289.
216. Santolini, J., Marechal, A., Boussac, A., Dorlet, P. (2013). EPR characterisation of the ferrous nitrosyl complex formed within the oxygenase domain of NO synthase. *Chembiochem* **14**,1852-1857.
217. Schmidt, P. P., Kappl, R., Huttermann, J. (2001). On the mode of hexacoordinated no-binding to myo- and hemoglobin: Variable-temperature efr studies at multiple microwave frequencies. *Applied Magnetic Resonance* **21**,423-440.
218. Trandafir, F., Van Doorslaer, S., Dewilde, S., Moens, L. (2004). Temperature dependence of NO binding modes in human neuroglobin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1702**,153-161.
219. Tyryshkin, A. M., Dikanov, S. A., Reijerse, E. J., Burgard, C., Huttermann, J. (1999). Characterization of bimodal coordination structure in nitrosyl heme complexes through hyperfine couplings with pyrrole and protein nitrogens. *Journal of the American Chemical Society* **121**,3396-3406.
220. Yonetani, T., Yamamoto, H., Erman, J. E., Reed, G. H., Leigh, J. S. (1972). Electromagnetic properties of hemoproteins .5. Optical and electron-paramagnetic resonance characteristics of nitric-oxide derivatives of metalloporphyrin-apohemoprotein complexes. *Journal of Biological Chemistry* **247**,2447-&.
221. Pant, K., Crane, B. R. (2006). Nitrosyl-heme structures of *Bacillus subtilis* nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation. *Biochemistry* **45**,2537-2544.
222. Raman, C. S., Li, H. Y., Martasek, P., Southan, G., Masters, B. S. S., Poulos, T. L. (2001). Crystal structure of nitric oxide synthase bound to nitro indazole reveals a novel inactivation mechanism. *Biochemistry* **40**,13448-13455.
223. Li, H. Y., Igarashi, J., Jamal, J., Yang, W. P., Poulos, T. L. (2006). Structural studies of constitutive nitric oxide synthases with diatomic ligands bound. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**,753-768.
224. AbuSoud, H. M., Gachhui, R., Raushel, F. M., Stuehr, D. J. (1997). The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase - divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. *Journal of Biological Chemistry* **272**,17349-17353.

225. Wei, C. C., Wang, Z. Q., Wang, Q., Meade, A. L., Hemann, C., Hille, R., Stuehr, D. J. (2001). Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **276**,315-319.
226. Wei, C. C., Wang, Z. Q., Stuehr, D. J. (2002). Nitric oxide synthase: Use of stopped-flow spectroscopy and rapid-quench methods in single-turnover conditions to examine formation and reactions of heme-O₂ intermediate in early catalysis. *Enzyme Kinetics and Mechanism, Pt F: Detection and Characterization of Enzyme Reaction Intermediates* **354**,320-338.
227. Alp, N. J., Channon, K. M. (2004). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **24**,413-420.
228. Chartier, F. J. M., Couture, M. (2004). Stability of the heme environment of the nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus* in the absence of pterin cofactor. *Biophysical Journal* **87**,1939-1950.
229. Hori, H., Ikedaisaito, M., Yonetani, T. (1981). Electromagnetic properties of hemoproteins .6. Single-crystal electron-paramagnetic-res of myoglobin nitroxide - freezing-induced reversible changes in the molecular-orientation of the ligand. *Journal of Biological Chemistry* **256**,7849-7855.
230. Wang, J. L., Rousseau, D. L., Abusoud, H. M., Stuehr, D. J. (1994). Heme coordination of NO in NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**,10512-10516.
231. Chartier, F. J. M., Couture, M. (2007). Interactions between substrates and the haem-bound nitric oxide of ferric and ferrous bacterial nitric oxide synthases. *Biochemical Journal* **401**,235-245.
232. Pufahl, R. A., Wishnok, J. S., Marletta, M. A. (1995). Hydrogen peroxide-supported oxidation of N-g-hydroxy-L-arginine by nitric-oxide synthase. *Biochemistry* **34**,1930-1941.
233. Wang, Z. Q., Haque, M. M., Binder, K., Sharma, M., Wei, C. C., Stuehr, D. J. (2016). Engineering nitric oxide synthase chimeras to function as NO dioxygenases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **158**,122-130.
234. Buddha, M. R., Crane, B. R. (2005). Structures of tryptophanyl-tRNA synthetase II from *Deinococcus radiodurans* bound to ATP and tryptophan - insight into subunit cooperativity and domain motions linked to catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **280**,31965-31973.
235. Davydov, R., Labby, K. J., Chobot, S. E., Lukoyanov, D. A., Crane, B. R., Silverman, R. B., Hoffman, B. M. (2014). Enzymatic and cryoreduction EPR studies of the hydroxylation of methylated N-omega-hydroxy-L-arginine analogues by nitric oxide synthase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* **53**,6511-6519.
236. Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A. Z., Robbins, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piegue, B., Ball, S. G., Ral, J. P., Bouget, F. Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y., Moreau, H. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**,11647-11652.

Annexe 1

Alignement et script Python utilisés pour la construction de la structure de deiNOS

On



Fichier d'alignement multiple utilisé pour générer les dimères de deiNOS en présence d'arginine et de H4F

```
P1;1noe
structureX:1noe:128      :A:498  :B:iNOS  :murine: 1.90: 0.19
TPLEELLPHAIEFINQYYGSFKEAKIEEHLARLEAVTKEIETTGTYYQLTLDELIFATKMA
WRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARNCSTAQEMFQHICRHILYATNNGNIRSAITVFPQRS
KHDFRLWNSQLIRYAGYQMPDGTIRGDAATLEFTQLCIDLGWKPRYGRFDVLPVLQAD-
GQDPEVFEIPDDLVLVLEVTMEHPKYEFWFQELGLKWYALPAVANMLLEVGGLEFPACPFNGW
YMGTEIGVRDFCDTQRYNILEEVGRRMGLETHTLASLWKDRAVTEINVAVLHSFQKQNV
IMDHHTASESFMKHMONEYRARGGCPADWIWLVPPVSGSITPVFHHQEMLNYVLSPFYYYQ
IEPWKTHIWQ---h./QYVRIKNWGSGEILHDTLHHKATSD-----SCLGSIMNPKSLTRGPRDKP-
---
TPLEELLPHAIEFINQYYGSFKEAKIEEHLARLEAVTKEIETTGTYYQLTLDELIF
ATKMAWRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARNCSTAQEMFQHICRHILYATNNGNIRSAITVFP
QRS DGKHDFRLWNSQLIRYAGYQMPDGTIRGDAATLEFTQLCIDLGWKPRYGRFDVLPVL
LQAD-GQDPEVFEIPDDLVLVLEVTMEHPKYEFWFQELGLKWYALPAVANMLLEVGGLEFPAC
PFNGWYMGTEIGVRDFCDTQRYNILEEVGRRMGLETHTLASLWKDRAVTEINVAVLHSFQ
KQNVTIMDHHTASESFMKHMONEYRARGGCPADWIWLVPPVSGSITPVFHHQEMLNYVLS
FYYYQIEPWKTHIWQ---h.*
```

```
>P1;1m7v
structureN:1m7v: 1 :A: 362 :B:NOS: bacillus subtilis:-1.00:-1.00
---EILWNEAKAFIAECYQELGKEE--EVKDRLDSIKSEIDRTGSYVHTKEELEHGAKMA
WRNSNRCIGRLFWNSLNVIDRRDVRTKEDVRDALFHHIETATNNGKIRPSITIFPPEEK
EKQVEIWNHQLIRYAGYE--G-ERIGDPASRSLTAACEQLGWRGERTDFDLLPLIFMRG
DEQPVWYELPRSLVIEVPITHPDIEAFSDLELKWYGVPIISDMKLEVGGIHYNAAPFNGW
YMGTEIGARNLADEKRYDKLKKVASVIGISTNYNTDLWKDQALVELNKAVLYSYKKQGV
IVDHHTAASQFKRFEEQEEEAGRKLTDGWTWLIPIISPAATHIFHRSYDINSIVKPNYFYQ
DKPYE-----h../-----
-----GSHM---EILWNEAKAFIAECYQELGKEE--
EVKDRLDSIKSEIDRTGSYVHTKEELEHGAKMA
WRNSNRCIGRLFWNSLNVIDRRDVRTKEDVRDALFHHIETATNNGKIRPSITIFPPEEK
EKQVEIWNHQLIRYAGYE--G-ERIGDPASRSLTAACEQLGWRGERTDFDLLPLIFMRG
DEQPVWYELPRSLVIEVPITHPDIEAFSDLELKWYGVPIISDMKLEVGGIHYNAAPFNGW
YMGTEIGARNLADEKRYDKLKKVASVIGISTNYNTDLWKDQALVELNKAVLYSYKKQGV
IVDHHTAASQFKRFEEQEEEAGRKLTDGWTWLIPIISPAATHIFHRSYDINSIVKPNYFYQ
DKPYE-----h../
```

```
>P1;2flq
structureP:2flq: 11 :A: 370 :B:NOS: geobacillus
stearothermophilus:-1.00:-1.00
QHDEQLMTKAEQFIIASYRELKGSE-QEIKRRVNEIRWEVEQTGTYYRHTYEELSYGAKMA
WRHSNRCIGRLFWQSLHVIDAREAVTEEEVFSYLFHHIEVATNGGKIRPTITIFRPNG--
--EVRIWNHQLIRYAGYETEE-GIIGDSSSLTFTRACEQLGWKGKTPFDVLPVLVIQVG-
GQKPWVTPIPKELVLEVPIDHPEFPWFRDLQLKWYAVPIISDMCLEIGGIRYMAAPFNGW
YMGTEIGARNFADDYRYNMLPKVASCMGLDTSNASLWKDKALVELNIAVLYSYKKAGVS
IVDHHTAARQFQLFEQQEKAAGRHVTDGWTWLIPLSPATTHIFHRSYDNTMMLPNFFYQ
DRPYE-----h../-----
-----QHDEQLMTKAEQFIIASYRELKGSE-
QEIKRRVNEIRWEVEQTGTYYRHTYEELSYGAKMA
WRHSNRCIGRLFWQSLHVIDAREAVTEEEVFSYLFHHIEVATNGGKIRPTITIFRPNG--
--EVRIWNHQLIRYAGYETEE-GIIGDSSSLTFTRACEQLGWKGKTPFDVLPVLVIQVG-
```

GQKPVWTPIPKELVLEVPIEHPEFPWFRDLQLKQYAVPIISDMCLEIGGIRYMAAPFNGW
YMGTEIGARNFADDYRYNMLPKVASCMGLDTSNASLWKDKALVELNIAVLYSYKKAGVS
IVDHHTAARQFQLFEQQEKAAGRHVTDGWTWLIPLPLSPATTHIFHRSYDNTMMLPNFFYQ
DRPYE-----h.*

>P1;dei-multi-dimer-heme-arg-thf
sequence:dei-multi-dimer-heme-arg-thf:1 : :734 : :NOS:
deinococcus radiodurans: 2.00:-1.00
PAAAVLTPDMRAFLRRFHEEMGEPGL-----PARLRAVEEAGLWWPTSaelTWGAKVA
WRNSTRCVGRLYWEALSVRDLRELNTAQAVYEALLQHLDDAFCGGHIRPVISVFGP----
--GVRLHNPQLIRYADD-----PINADFVDKLRRFGWQPRGERFEVLPLLIEVNG
--RAELFSLPPQAVQEVAITHPVCLGIGELGLRWHALPVISDMHLDIGGLHLP-CAFSGW
YVQTEIAARDLADVGRYDQLPAVARALGLDTSRERTLWRDRALVELNVAVLHSFDAAGVK
LADHHTVTAHHVRFEEREARAGREVRGKWSWLPPLSPATTPLWSRRYRAREESPRFVRA
RCPFHPTVHASTh../-----
-----PAAAVLTPDMRAFLRRFHEEMGEPGL-----PARLRAVEEAGLWWPTSaelTWGAKVA
WRNSTRCVGRLYWEALSVRDLRELNTAQAVYEALLQHLDDAFCGGHIRPVISVFGP----
--GVRLHNPQLIRYADD-----PINADFVDKLRRFGWQPRGERFEVLPLLIEVNG
--RAELFSLPPQAVQEVAITHPVCLGIGELGLRWHALPVISDMHLDIGGLHLP-CAFSGW
YVQTEIAARDLADVGRYDQLPAVARALGLDTSRERTLWRDRALVELNVAVLHSFDAAGVK
LADHHTVTAHHVRFEEREARAGREVRGKWSWLPPLSPATTPLWSRRYRAREESPRFVRA
RCPFHPTVHASTh..*

Script python utilisé par Modeller pour générer les dimères de deiNOS en présence d'arginine et de H₄F

```
# Comparative modeling with multiple templates
from modeller import *          # Load standard Modeller classes
from modeller.automodel import * # Load the automodel class

log.verbose() # request verbose output
env = environ() # create a new MODELLER environment to build this model in

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.', './atom_files']

# Read in HETATM records from template PDBs
env.io.hetatm = True

a = automodel(env,
               alnfile = 'align-multiple-i-bs-gs-dei-dimer-heme-arg-thf.ali', # alignment filename
               knowns = ('1noe', '1m7v', '2flq'), # codes of the templates
               sequence = 'dei-multi-dimer-heme-arg-thf',
               assess_methods=(assess.DOPE, assess.GA341)) # code of the target

a.starting_model= 1          # index of the first model
a.ending_model  = 100        # index of the last model (determines how many models to
                             # calculate)
a.make()                    # do the actual comparative modeling

# Get a list of all successfully built models from a.outputs
ok_models = filter(lambda x: x['failure'] is None, a.outputs)

# Rank the models by DOPE score
key = 'DOPE score'
ok_models.sort(lambda a,b: cmp(a[key], b[key]))

# Get top model
m = ok_models[0]
print("Top model: %s (DOPE score %.3f)" % (m['name'], m[key]))
```

Annexe 2

Paramètres de l'hème et de H₄F utilisés pour les calculs de dynamique moléculaire

Paramètres de l'hème Fe^{III} – Atomes d'hydrogène ajoutés au fichier aminoacids.hdb

HEME 16

1	1	HA	CHA	C1A	C4D
1	1	HB	CHB	C4A	C1B
1	1	HC	CHC	C1C	C4B
1	1	HD	CHD	C1D	C4C
3	4	HMA	CMA	C3A	C2A
2	6	HAA	CAA	C2A	CBA
2	6	HBA	CBA	CAA	CGA
3	4	HMB	CMB	C2B	C1B
1	1	HAB	CAB	C3B	CBB
2	3	HBB	CBB	CAB	C3B
3	4	HMC	CMC	C2C	C1C
1	1	HAC	CAC	CBC	C3C
2	3	HBC	CBC	CAC	C3C
3	4	HMD	CMD	C2D	C1D
2	6	HAD	CAD	C2D	CBD
2	6	HBD	CBD	CAD	CGD

Paramètres de l'hème Fe^{III} – Paramètres de la liaison Fe-S ajoutés au fichier ffbonded.itp

SM	FE	1	0.232	209200.0			
CT2	SM	FE	5	100.6	418.4	0.0	0.0
SM	FE	NPH	5	90.0	836.8	0.0	0.0
CT2	SM	FE	NPH	9	0.00	0.0	4
CA	CT2	SM	FE	9	0.20	0.0	3
CT1	CT2	SM	FE	9	0.20	0.0	3
HA	CT2	SM	FE	9	0.20	0.0	3

Paramètres de l'hème Fe^{III}- Charges partielles hème

Issues de la référence [112]

FE	FE	0.761	0	HBA1	HA	0.1225	37
NA	NPH	-0.749	1	HBA2	HA	0.1225	38
NB	NPH	-0.712	2	CGA	CC	0.467	39
NC	NPH	-0.722	3	O1A	OC	-0.575	40
ND	NPH	-0.748	4	O2A	OC	-0.575	41
C1A	CPA	0.265	5	CMB	CT3	-0.479	42
C2A	CPB	0.030	6	HMB1	HA	0.1447	43
C3A	CPB	0.044	7	HMB2	HA	0.1447	44
C4A	CPA	0.255	8	HMB3	HA	0.1447	45
C1B	CPA	0.267	9	CAB	CE1	-0.047	46
C2B	CPB	0.025	10	HAB	HE1	0.121	47
C3B	CPB	-0.012	11	CBB	CE2	-0.327	48
C4B	CPA	0.244	12	HBB1	HE2	0.1075	49
C1C	CPA	0.270	13	HBB2	HE2	0.1075	50
C2C	CPB	0.030	14	CMC	CT3	-0.480	51
C3C	CPB	-0.015	15	HMC1	HA	0.1477	52
C4C	CPA	0.238	16	HMC2	HA	0.1477	53
C1D	CPA	0.261	17	HMC3	HA	0.1477	54
C2D	CPB	0.054	18	CAC	CE1	-0.049	55
C3D	CPB	0.037	19	HAC	HE1	0.111	56
C4D	CPA	0.267	20	CBC	CE2	-0.328	57
CHA	CPM	-0.155	21	HBC1	HE2	0.1075	58
HA	HA	0.180	22	HBC2	HE2	0.1075	59
CHB	CPM	-0.164	23	CMD	CT3	-0.470	60
HB	HA	0.116	24	HMD1	HA	0.1473	61
CHC	CPM	-0.168	25	HMD2	HA	0.1473	62
HC	HA	0.111	26	HMD3	HA	0.1473	63
CHD	CPM	-0.167	27	CAD	CT2	-0.303	64
HD	HA	0.116	28	HAD1	HA	0.144	65
CMA	CT3	-0.471	29	HAD2	HA	0.144	66
HMA1	HA	0.148	30	CBD	CT2	-0.308	67
HMA2	HA	0.148	31	HBD1	HA	0.1215	68
HMA3	HA	0.148	32	HBD2	HA	0.1215	69
CAA	CT2	-0.307	33	CGD	CC	0.465	70
HAA1	HA	0.1425	34	O1D	OC	-0.5635	71
HAA2	HA	0.1425	35	O2D	OC	-0.5635	72
CBA	CT2	-0.309	36				

Paramètres de l'hème Fe^{III}- Charges partielles cystéine

Issues de la référence [112]

N	NH1	-0.432	0
HN	H	0.305	1
CA	CT1	-0.0291	2
HA	HB	0.187	3
CB	CT2	-0.444	4
HB1	HA	0.185	5
HB2	HA	0.185	6
SG	SM	-0.118	7
C	C	0.361	8
O	O	-0.427	9

Paramètres du cofacteur H₄F – Atomes d'hydrogènes ajoutés au fichier aminoacids.hdb

1	2	H10	N10	C4'	C3'	
1	1	H	N	C11	CA	
1	5	HA	CA	C	CB	N
2	6	HB	CB	CG	CA	
2	6	HG	CG	CB	CD	
1	1	H6'	C6'	C1'	C5'	
1	1	H5'	C5'	C6'	C4'	
1	1	H3'	C3'	C2'	C4'	
1	1	H2'	C2'	C1'	C3'	
2	4	H2	N2	C2	N1	
1	2	H5	N5	C6	C7	
1	5	H6	C6	C7	N5	C9
2	6	H7	C7	C6	N8	
1	1	H8	N8	C8A	C7	
2	6	H9	C9	C6	N10	
1	1	H3	N3	C2	C4	

Paramètres du cofacteur H₄F – Charges de Mülliken calculées avec Orca

C2'	CA	-0.016453	0	CD	CD	0.047928	19	HB1	HA2	-0.041518	38
C3'	CA	-0.059742	1	OE1	OC	-0.433279	20	HB2	HA2	-0.046644	39
C4'	CA	0.099544	2	C	CD	0.120372	21	HG1	HA2	-0.067864	40
C5'	CA	-0.020421	3	OX1	OC	-0.367742	22	HG2	HA2	-0.022341	41
C6'	CA	-0.013541	4	N10	NH3	-0.149612	23	H10	H	0.084849	42
C1'	CA	0.007986	5	C9	CT2	0.162690	24	H91	HA	0.010062	43
C8A	CN3	0.022285	6	C6	CP3	-0.000238	25	H92	HA	-0.022436	44
C4A	CN3	-0.104695	7	H6	HA	-0.030167	26	H71	HA	0.014172	45
C4	CN1	0.090026	8	C7	CP3	0.201822	27	H72	HA	0.052481	46
N3	NN3	-0.101361	9	N8	N	-0.133739	28	H8	HN1	0.120766	47
C2	CN2	0.010864	10	O4	ON1	-0.276459	29	H21	HN1	0.109327	48
N1	NN2G	-0.130551	11	H3	HN2	0.107081	30	H22	HN1	0.122544	49
C11	C	0.126289	12	N2	NN1	-0.084470	31	H5	HN1	0.098993	50
O11	O	-0.316429	13	N5	N	-0.164560	32	OE2	OC	-0.448563	51
N	NH2	-0.136703	14	H2'	HP	-0.006132	33	OX2	OC	-0.448914	52
CA	CT1	0.009679	15	H3'	HP	-0.061159	34				
HA	HB	-0.039988	16	H5'	HP	-0.082564	35				
CB	CT2	0.113234	17	H6'	HP	-0.029062	36				
CG	CT2	0.004104	18	H	H	0.120251	37				

Paramètres du cofacteur H₄F – Topologie obtenue avec Swissparam

[bonds]

CD	OE1	0.12610	587519.8	N10	C9	0.14460	296409.6
CD	OE2	0.12610	587519.8	N10	H10	0.10180	396015.6
C	OX1	0.12610	587519.8	C9	C6	0.15080	256422.3
C	OX2	0.12610	587519.8	C9	H91	0.10930	287014.9
C2'	C1'	0.13740	335613.7	C9	H92	0.10930	287014.9
C2'	C3'	0.13740	335613.7	C6	H6	0.10930	287014.9
C2'	H2'	0.10840	319534.6	C6	N5	0.14460	296409.6
C3'	C4'	0.13740	335613.7	C6	C7	0.15080	256422.3
C3'	H3'	0.10840	319534.6	C7	N8	0.14460	296409.6
C4'	C5'	0.13740	335613.7	C7	H71	0.10930	287014.9
C4'	N10	0.13980	371445.5	C7	H72	0.10930	287014.9
C5'	C6'	0.13740	335613.7	N8	C8A	0.13700	367952.7
C5'	H5'	0.10840	319534.6	N8	H8	0.10180	396015.6
C6'	C1'	0.13740	335613.7	C8A	N1	0.13600	384513.8
C6'	H6'	0.10840	319534.6	C8A	C4A	0.13330	572403.8
C1'	C11	0.14570	270273.8	C4A	C4	0.14680	274910.6
C11	O11	0.12220	779866.6	C4A	N5	0.13700	367952.7
C11	N	0.13690	351030.1	C4	O4	0.12220	779866.6
N	CA	0.14360	280872.8	C4	N3	0.13690	351030.1
N	H	0.10150	401254.8	N3	H3	0.10150	401254.8
CA	HA	0.10930	287014.9	N3	C2	0.13690	351030.1
CA	CB	0.15080	256422.3	C2	N1	0.12900	606850.7
CA	C	0.15100	230648.0	C2	N2	0.13700	367952.7
CB	CG	0.15080	256422.3	N2	H21	0.10180	396015.6
CB	HB1	0.10930	287014.9	N2	H22	0.10180	396015.6
CB	HB2	0.10930	287014.9	N5	H5	0.10180	396015.6
CG	CD	0.15100	230648.0				
CG	HG1	0.10930	287014.9				
CG	HG2	0.10930	287014.9				

[angles]

; ai	aj	ak	th0	cth	ub0	cub							
C3'	C2'	C1'	119.9770	402.88	0.0	0.0	CA	CB	HB2	110.5490	383.00	0.0	0.0
C3'	C2'	H2'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CG	CB	HB1	110.5490	383.00	0.0	0.0
C1'	C2'	H2'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CG	CB	HB2	110.5490	383.00	0.0	0.0
C2'	C3'	C4'	119.9770	402.88	0.0	0.0	HB1	CB	HB2	108.8360	310.74	0.0	0.0
C2'	C3'	H3'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CB	CG	CD	98.4220	198.73	0.0	0.0
C4'	C3'	H3'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CB	CG	HG1	110.5490	383.00	0.0	0.0
C3'	C4'	C5'	119.9770	402.88	0.0	0.0	CB	CG	HG2	110.5490	383.00	0.0	0.0
C3'	C4'	N10	121.6330	629.31	0.0	0.0	CD	CG	HG1	108.9040	316.16	0.0	0.0
C5'	C4'	N10	121.6330	629.31	0.0	0.0	CD	CG	HG2	108.9040	316.16	0.0	0.0
C4'	C5'	C6'	119.9770	402.88	0.0	0.0	HG1	CG	HG2	108.8360	310.74	0.0	0.0
C4'	C5'	H5'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CG	CD	OE1	114.6890	728.07	0.0	0.0
C6'	C5'	H5'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CG	CD	OE2	114.6890	728.07	0.0	0.0
C5'	C6'	C1'	119.9770	402.88	0.0	0.0	OE1	CD	OE2	130.6000	711.20	0.0	0.0
C5'	C6'	H6'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CA	C	OX1	114.6890	728.07	0.0	0.0
C1'	C6'	H6'	120.5710	339.05	0.0	0.0	CA	C	OX2	114.6890	728.07	0.0	0.0
C2'	C1'	C6'	119.9770	402.88	0.0	0.0	OX1	C	OX2	130.6000	711.20	0.0	0.0
C2'	C1'	C11	114.4750	480.57	0.0	0.0	C4'	N10	C9	107.3490	502.84	0.0	0.0
C6'	C1'	C11	114.4750	480.57	0.0	0.0	C4'	N10	H10	110.2880	398.66	0.0	0.0
C4A	C8A	N1	123.5360	578.12	0.0	0.0	C9	N10	H10	112.3740	414.92	0.0	0.0
C4A	C8A	N8	126.8300	465.50	0.0	0.0	N10	C9	C6	108.6780	680.49	0.0	0.0
N1	C8A	N8	130.5210	555.23	0.0	0.0	N10	C9	H91	109.8700	432.99	0.0	0.0
C8A	C4A	C4	111.2970	328.20	0.0	0.0	N10	C9	H92	109.8700	432.99	0.0	0.0
C8A	C4A	N5	126.8300	465.50	0.0	0.0	C6	C9	H91	110.5490	383.00	0.0	0.0
C4	C4A	N5	116.4080	616.66	0.0	0.0	C6	C9	H92	110.5490	383.00	0.0	0.0
C4A	C4	N3	111.7210	627.50	0.0	0.0	H91	C9	H92	108.8360	310.74	0.0	0.0
C4A	C4	O4	122.6230	563.67	0.0	0.0	C9	C6	H6	110.5490	383.00	0.0	0.0
N3	C4	O4	127.1520	546.20	0.0	0.0	C9	C6	C7	109.6080	512.48	0.0	0.0
C4	N3	C2	120.2740	426.97	0.0	0.0	C9	C6	N5	108.6780	680.49	0.0	0.0
C4	N3	H3	120.2770	346.27	0.0	0.0	H6	C6	C7	110.5490	383.00	0.0	0.0
C2	N3	H3	120.2770	346.27	0.0	0.0	H6	C6	N5	109.8700	432.99	0.0	0.0
N3	C2	N1	120.6970	665.44	0.0	0.0	C7	C6	N5	108.6780	680.49	0.0	0.0
N3	C2	N2	119.6970	658.21	0.0	0.0	C6	C7	N8	108.6780	680.49	0.0	0.0
N1	C2	N2	128.0780	508.26	0.0	0.0	C6	C7	H71	110.5490	383.00	0.0	0.0
C8A	N1	C2	109.8560	747.94	0.0	0.0	C6	C7	H72	110.5490	383.00	0.0	0.0
C1'	C11	O11	119.9680	442.02	0.0	0.0	N8	C7	H71	109.8700	432.99	0.0	0.0
C1'	C11	N	112.4950	663.03	0.0	0.0	N8	C7	H72	109.8700	432.99	0.0	0.0
O11	C11	N	127.1520	546.20	0.0	0.0	H71	C7	H72	108.8360	310.74	0.0	0.0
C11	N	CA	119.6000	494.41	0.0	0.0	C8A	N8	C7	118.8730	601.01	0.0	0.0
C11	N	H	120.2770	346.27	0.0	0.0	C8A	N8	H8	111.0530	461.90	0.0	0.0
CA	N	H	120.0660	332.42	0.0	0.0	C7	N8	H8	112.3740	414.92	0.0	0.0
N	CA	HA	107.6460	445.64	0.0	0.0	C2	N2	H21	114.8080	421.55	0.0	0.0
N	CA	CB	109.9600	632.32	0.0	0.0	C2	N2	H22	114.8080	421.55	0.0	0.0
N	CA	C	110.9610	654.60	0.0	0.0	H21	N2	H22	109.1600	337.24	0.0	0.0
HA	CA	CB	110.5490	383.00	0.0	0.0	C4A	N5	C6	118.8730	601.01	0.0	0.0
HA	CA	C	108.9040	316.16	0.0	0.0	C4A	N5	H5	111.0530	461.90	0.0	0.0
CB	CA	C	98.4220	198.73	0.0	0.0	C6	N5	H5	112.3740	414.92	0.0	0.0
CA	CB	CG	109.6080	512.48	0.0	0.0							
CA	CB	HB1	110.5490	383.00	0.0	0.0							

[dihedrals]

ai	aj	ak	al	phi0	kphi	mult	C8A	N8	C7	C6	0.00	0.5230	3
C2'	C3'	C4'	C5'	180.00	14.6440	2	C8A	N8	C7	H71	0.00	0.5230	3
C2'	C3'	C4'	N10	180.00	14.6440	2	C8A	N8	C7	H72	0.00	0.5230	3
C2'	C1'	C6'	C5'	180.00	14.6440	2	C4A	C8A	N1	C2	180.00	3.7656	2
C2'	C1'	C6'	H6'	180.00	14.6440	2	C4A	C8A	N8	C7	180.00	7.7404	2
C2'	C1'	C11	O11	180.00	4.7196	2	C4A	C8A	N8	H8	180.00	7.8576	2
C2'	C1'	C11	N	180.00	5.2300	2	C4A	C8A	N8	H8	0.00	-1.1088	3
C3'	C2'	C1'	C6'	180.00	14.6440	2	C4A	C4	N3	C2	180.00	12.5520	2
C3'	C2'	C1'	C11	180.00	14.6440	2	C4A	C4	N3	H3	0.00	-0.5983	1
C3'	C4'	C5'	C6'	180.00	14.6440	2	C4A	C4	N3	H3	180.00	14.9411	2
C3'	C4'	C5'	H5'	180.00	14.6440	2	C4A	C4	N3	H3	0.00	0.2510	3
C3'	C4'	N10	C9	180.00	9.0709	2	C4A	N5	C6	C9	0.00	0.5230	3
C3'	C4'	N10	C9	0.00	0.7740	3	C4A	N5	C6	H6	0.00	0.5230	3
C3'	C4'	N10	H10	0.00	1.4937	1	C4A	N5	C6	C7	0.00	0.5230	3
C3'	C4'	N10	H10	180.00	5.4978	2	C4	C4A	C8A	N1	180.00	3.7656	2
C3'	C4'	N10	H10	0.00	7.0166	3	C4	C4A	C8A	N8	180.00	3.7656	2
C4'	C3'	C2'	C1'	180.00	14.6440	2	C4	C4A	N5	C6	180.00	7.5312	2
C4'	C3'	C2'	H2'	180.00	14.6440	2	C4	C4A	N5	H5	180.00	7.5312	2
C4'	C5'	C6'	C1'	180.00	14.6440	2	C4	N3	C2	N1	180.00	12.5520	2
C4'	C5'	C6'	H6'	180.00	14.6440	2	C4	N3	C2	N2	180.00	12.5520	2
C4'	N10	C9	C6	0.00	0.5230	3	N3	C4	C4A	N5	180.00	5.2300	2
C4'	N10	C9	H91	0.00	0.6904	3	N3	C2	N2	H21	180.00	8.1588	2
C4'	N10	C9	H92	0.00	0.6904	3	C2	N3	C4	O4	0.00	1.6234	1
C5'	C4'	C3'	H3'	180.00	14.6440	2	C2	N3	C4	O4	180.00	-1.2217	2
C5'	C4'	N10	C9	180.00	9.0709	2	C2	N3	C4	O4	0.00	-0.3012	3
C5'	C4'	N10	C9	0.00	0.7740	3	C2	N1	C8A	N8	180.00	3.7656	2
C5'	C4'	N10	H10	0.00	1.4937	1	N1	C8A	C4A	N5	180.00	3.7656	2
C5'	C4'	N10	H10	180.00	5.4978	2	N1	C8A	N8	C7	180.00	7.5312	2
C5'	C4'	N10	H10	0.00	7.0166	3	N1	C8A	N8	H8	180.00	7.5312	2
C6'	C5'	C1'	C11	180.00	14.6440	2	N1	C2	N3	H3	180.00	12.5520	2
C6'	C5'	C4'	N10	180.00	14.6440	2	N1	C2	N2	H21	0.00	3.1296	1
C6'	C1'	C2'	H2'	180.00	14.6440	2	N1	C2	N2	H21	180.00	9.1379	2
C6'	C1'	C11	O11	180.00	4.7196	2	N1	C2	N2	H21	0.00	-0.8703	3
C6'	C1'	C11	N	180.00	5.2300	2	N1	C2	N2	H22	0.00	3.1296	1
C1'	C2'	C3'	H3'	180.00	14.6440	2	N1	C2	N2	H22	180.00	9.1379	2
C1'	C6'	C5'	H5'	180.00	14.6440	2	N1	C2	N2	H22	0.00	-0.8703	3
C1'	C11	N	CA	180.00	12.5520	2	C11	C1'	C2'	H2'	180.00	4.1840	2
C1'	C11	N	H	180.00	12.5520	2	C11	C1'	C6'	H6'	180.00	4.1840	2
C8A	C4A	C4	N3	0.00	0.2008	1	C11	N	CA	HA	0.00	-4.3932	1
C8A	C4A	C4	N3	180.00	3.3095	2	C11	N	CA	HA	180.00	2.8493	2
C8A	C4A	C4	N3	0.00	0.7950	3	C11	N	CA	HA	0.00	0.0460	3
C8A	C4A	C4	O4	0.00	0.7573	1	C11	N	CA	CB	0.00	-2.1464	1
C8A	C4A	C4	O4	180.00	4.1380	2	C11	N	CA	CB	180.00	1.4518	2
C8A	C4A	N5	C6	180.00	7.7404	2	C11	N	CA	CB	0.00	1.9832	3
C8A	C4A	N5	H5	180.00	7.8576	2	O11	C11	N	C	0.00	2.0920	3
C8A	C4A	N5	H5	0.00	-1.1088	3	O11	C11	N	CA	0.00	-0.6694	1
C8A	N1	C2	N3	180.00	3.7656	2	O11	C11	N	CA	180.00	13.1670	2
C8A	N1	C2	N2	180.00	3.7656	2	O11	C11	N	CA	0.00	-0.3054	3
C8A	N8	C7	C6	0.00	0.5230	3	O11	C11	N	H	0.00	3.0041	1
											180.00	10.4056	2

011	C11	N	H	180.00	10.4056	2	C9	C6	C7	H72	0.00	0.5523	3
011	C11	N	H	0.00	-0.9498	3	C9	C6	N5	H5	0.00	0.5230	3
N	CA	CB	CG	0.00	0.6276	3	C6	C9	N10	H10	0.00	0.5230	3
N	CA	CB	HB1	0.00	0.8912	3	C6	C7	N8	H8	0.00	0.5230	3
N	CA	CB	HB2	0.00	0.8912	3	H6	C6	C9	H91	0.00	0.5941	1
N	CA	C	OX1	180.00	1.2552	2	H6	C6	C9	H91	180.00	-2.8995	2
N	CA	C	OX2	180.00	1.2552	2	H6	C6	C9	H91	0.00	0.6569	3
CA	CB	CG	CD	0.00	0.6276	3	H6	C6	C9	H92	0.00	0.5941	1
CA	CB	CG	HG1	0.00	1.3389	1	H6	C6	C9	H92	180.00	-2.8995	2
CA	CB	CG	HG1	180.00	-1.3180	2	H6	C6	C9	H92	0.00	0.6569	3
CA	CB	CG	HG1	0.00	0.5523	3	H6	C6	C7	N8	0.00	0.6276	3
CA	CB	CG	HG2	0.00	1.3389	1	H6	C6	C7	H71	0.00	0.5941	1
CA	CB	CG	HG2	180.00	-1.3180	2	H6	C6	C7	H71	180.00	-2.8995	2
CA	CB	CG	HG2	0.00	0.5523	3	H6	C6	C7	H71	0.00	0.6569	3
HA	CA	N	H	0.00	-1.2887	1	H6	C6	C7	H72	0.00	0.5941	1
HA	CA	N	H	0.00	0.5732	3	H6	C6	C7	H72	180.00	-2.8995	2
HA	CA	CB	CG	0.00	1.3389	1	H6	C6	C7	H72	0.00	0.6569	3
HA	CA	CB	CG	180.00	-1.3180	2	H6	C6	N5	H5	180.00	-0.2050	2
HA	CA	CB	CG	0.00	0.5523	3	H6	C6	N5	H5	0.00	0.4268	3
HA	CA	CB	HB1	0.00	0.5941	1	C7	C6	C9	H91	0.00	1.3389	1
HA	CA	CB	HB1	180.00	-2.8995	2	C7	C6	C9	H91	180.00	-1.3180	2
HA	CA	CB	HB1	0.00	0.6569	3	C7	C6	C9	H91	0.00	0.5523	3
HA	CA	CB	HB2	0.00	0.5941	1	C7	C6	C9	H92	0.00	1.3389	1
HA	CA	CB	HB2	180.00	-2.8995	2	C7	C6	C9	H92	180.00	-1.3180	2
HA	CA	CB	HB2	0.00	0.6569	3	C7	C6	C9	H92	0.00	0.5523	3
HA	CA	C	OX1	0.00	-0.2218	3	C7	C6	N5	H5	0.00	0.5230	3
HA	CA	C	OX2	0.00	-0.2218	3	N8	C8A	C4A	N5	180.00	25.1040	2
CB	CA	N	H	0.00	1.1548	1	N8	C7	C6	N5	0.00	0.6276	3
CB	CA	N	H	180.00	-0.7950	2	04	C4	C4A	N5	180.00	5.2300	2
CB	CA	N	H	0.00	0.6820	3	04	C4	N3	H3	0.00	3.0041	1
CB	CA	C	OX1	180.00	2.6401	2	04	C4	N3	H3	180.00	10.4056	2
CB	CA	C	OX2	180.00	2.6401	2	04	C4	N3	H3	0.00	-0.9498	3
CB	CG	CD	OE1	180.00	2.6401	2	H3	N3	C2	N2	180.00	12.5520	2
CB	CG	CD	OE2	180.00	2.6401	2	N5	C6	C9	H91	0.00	0.6276	3
CG	CB	CA	C	0.00	0.6276	3	N5	C6	C9	H92	0.00	0.6276	3
CD	CG	CB	HB1	0.00	-0.2929	3	N5	C6	C7	H71	0.00	0.6276	3
CD	CG	CB	HB2	0.00	-0.2929	3	N5	C6	C7	H72	0.00	0.6276	3
OE1	CD	CG	HG1	0.00	-0.2218	3	H2'	C2'	C3'	H3'	180.00	14.6440	2
OE1	CD	CG	HG2	0.00	-0.2218	3	H5'	C5'	C6'	H6'	180.00	14.6440	2
C	CA	N	H	0.00	0.6276	3	HB1	CB	CG	HG1	0.00	0.5941	1
C	CA	CB	HB1	0.00	-0.2929	3	HB1	CB	CG	HG1	180.00	-2.8995	2
C	CA	CB	HB2	0.00	-0.2929	3	HB1	CB	CG	HG1	0.00	0.6569	3
N10	C4'	C3'	H3'	180.00	14.6440	2	HB1	CB	CG	HG2	0.00	0.5941	1
N10	C4'	C5'	H5'	180.00	14.6440	2	HB1	CB	CG	HG2	180.00	-2.8995	2
N10	C9	C6	H6	0.00	0.6276	3	HB1	CB	CG	HG2	0.00	0.6569	3
N10	C9	C6	C7	0.00	0.6276	3	HB2	CB	CG	HG1	0.00	0.5941	1
N10	C9	C6	N5	0.00	0.6276	3	HB2	CB	CG	HG1	180.00	-2.8995	2
C9	C6	C7	N8	0.00	0.6276	3	HB2	CB	CG	HG1	0.00	0.6569	3
C9	C6	C7	H71	0.00	1.3389	1	HB2	CB	CG	HG2	0.00	0.5941	1
C9	C6	C7	H71	180.00	-1.3180	2	HB2	CB	CG	HG2	180.00	-2.8995	2
C9	C6	C7	H71	0.00	0.5523	3	HB2	CB	CG	HG2	0.00	0.6569	3
C9	C6	C7	H72	0.00	1.3389	1	HG1	CG	CD	OE2	0.00	-0.2218	3
C9	C6	C7	H72	180.00	-1.3180	2	HG2	CG	CD	OE2	0.00	-0.2218	3
C9	C6	C7	H72	0.00	0.5523	3	H10	N10	C9	H91	180.00	-0.2050	2
H71	C7	N8	H8	180.00	-0.2050	2	H10	N10	C9	H91	180.00	-0.2050	2
H71	C7	N8	H8	0.00	0.4268	3	H10	N10	C9	H91	0.00	0.4268	3
H72	C7	N8	H8	180.00	-0.2050	2	H10	N10	C9	H92	180.00	-0.2050	2
H72	C7	N8	H8	0.00	0.4268	3	H10	N10	C9	H92	0.00	0.4268	3

[impropers]

;	ai	aj	ak	al	xi0	kxi
	C2'	C1'	C3'	H2'	0.00	9.0291
	C3'	C4'	C2'	H3'	0.00	9.0291
	C4'	N10	C3'	C5'	0.00	27.6981
	C5'	C6'	C4'	H5'	0.00	9.0291
	C1'	C6'	C2'	C11	0.00	16.2590
	C11	N	C1'	O11	0.00	78.2910
	N	CA	C11	H	0.00	-12.0416
	CA	CB	N	C	0.00	0.0000
	CA	CB	N	HA	0.00	0.0000
	CB	CG	CA	HB1	0.00	0.0000
	CB	CG	CA	HB2	0.00	0.0000
	CG	CD	CB	HG1	0.00	0.0000
	CG	CD	CB	HG2	0.00	0.0000
	CD	O11	CG	O12	0.00	107.1941
	C	O11	CA	O12	0.00	107.1941
	N10	C9	C4'	H10	0.00	-3.6150
	C9	C6	N10	H91	0.00	0.0000
	C9	C6	N10	H92	0.00	0.0000
	C6	N5	C9	C7	0.00	0.0000
	C6	N5	C9	H6	0.00	0.0000
	N5	C4A	C6	H5	0.00	-3.0125
	C4A	C8A	N5	C4	0.00	12.0416
	C4	N3	C4A	O4	0.00	69.8561
	N3	C2	C4	H3	0.00	-18.0665
	C8A	N8	C4A	N1	0.00	12.0416
	C2	N1	N3	N2	0.00	78.2910
	C6'	C1'	C5'	H6'	0.00	9.0291
	C7	N8	C6	H71	0.00	0.0000
	C7	N8	C6	H72	0.00	0.0000
	N8	C7	C8A	H8	0.00	-3.0125
	N2	H21	C2	H22	0.00	-4.2175

Annexe 3

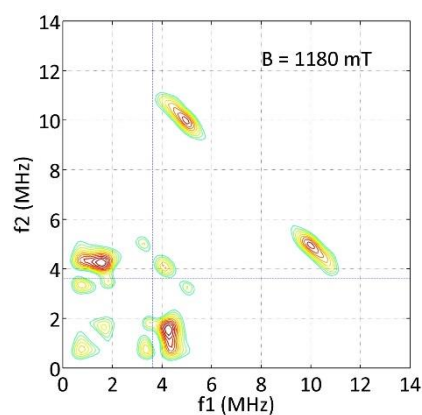
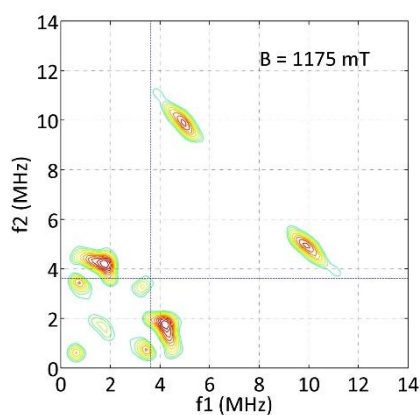
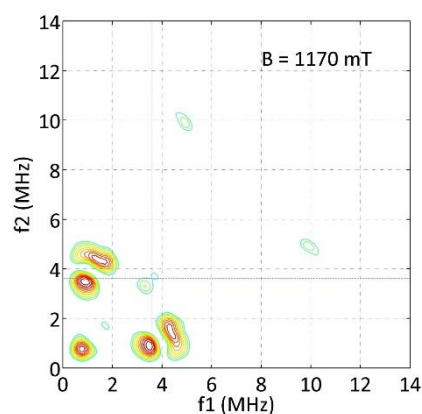
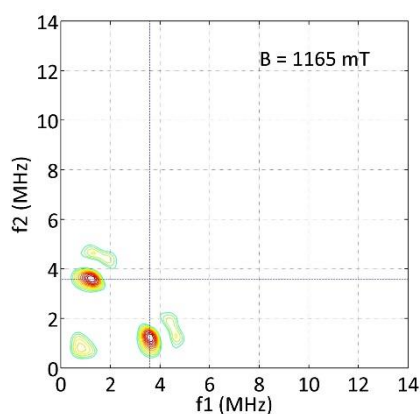
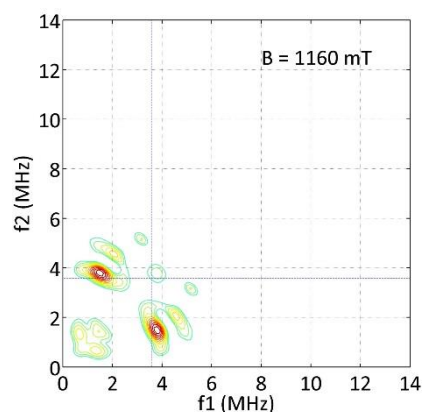
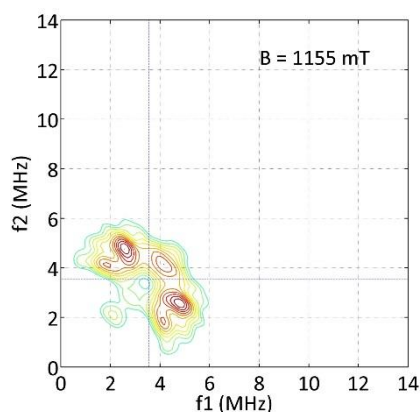
**Spectres HYSCORE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ de
deiNOS**

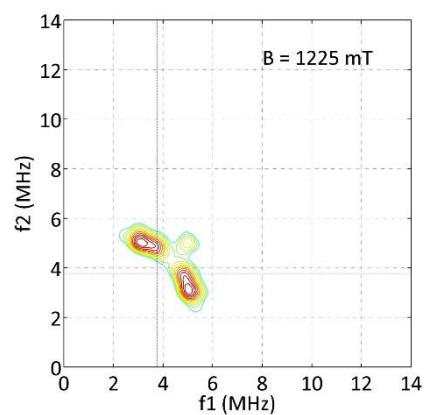
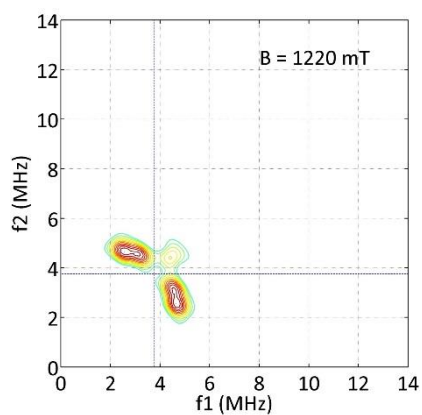
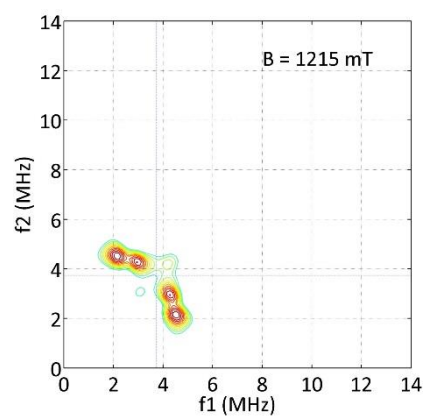
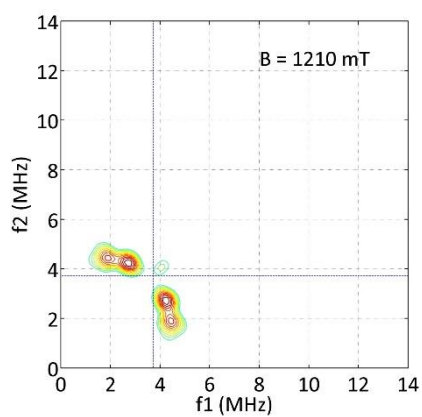
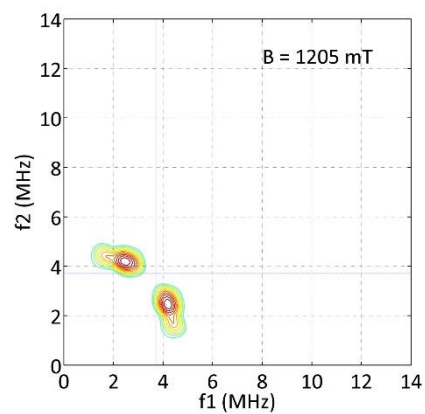
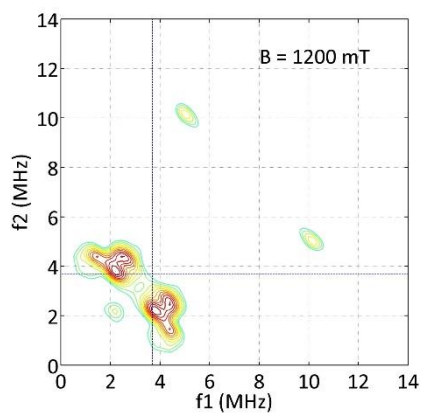
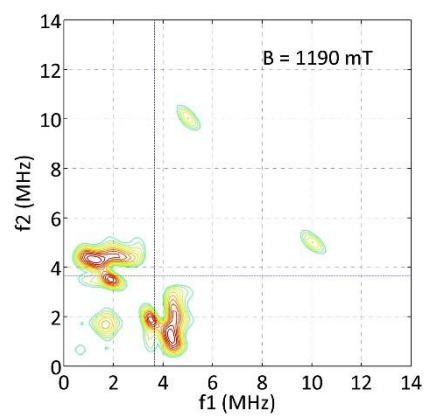
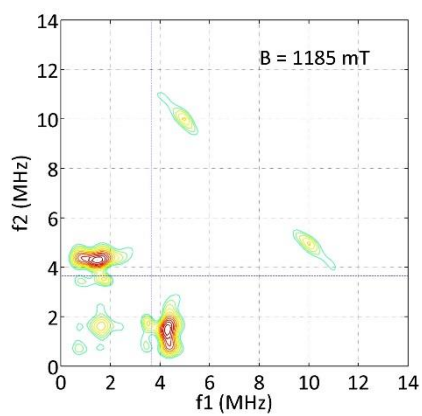
Spectres HYSORE du complexe saturé en arginine et H₄F

Conditions expérimentales : fréquence 33,68GHz, température 20K, puissance micro-onde 7,924mW, impulsion $\pi/2$ 20ns, impulsion π 36ns, t_1 32ns, t_2 52ns, incrément 16ns, τ 136ns, durée d'intégration 96ns, intervalle entre deux tirs 510 μ s.

Les lignes pointillées marquent la fréquence de Larmor de ^{14}N .

Le champ magnétique est indiqué sur chaque spectre.



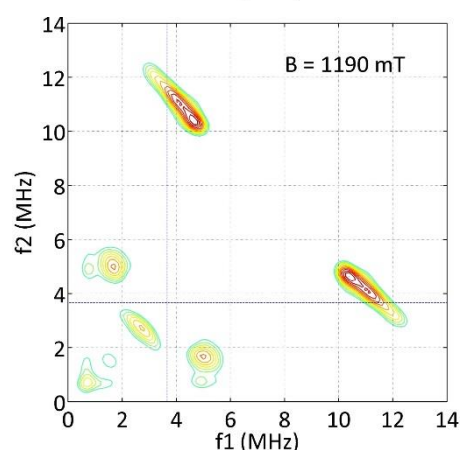
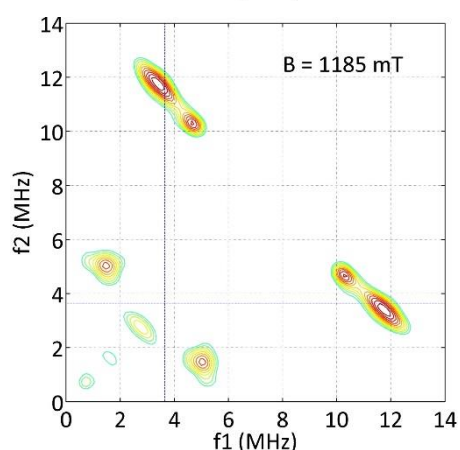
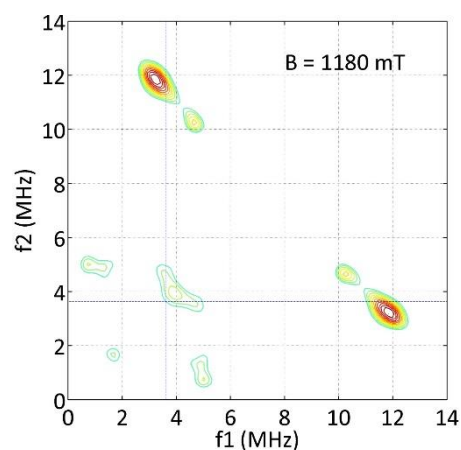
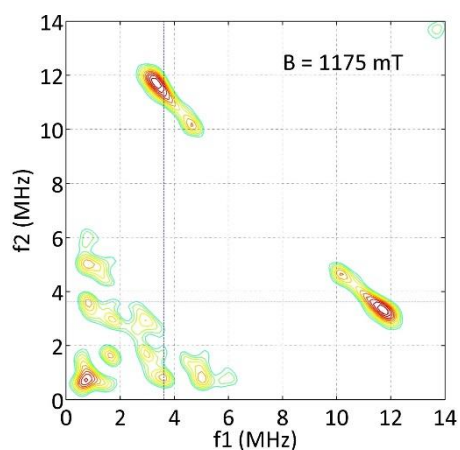
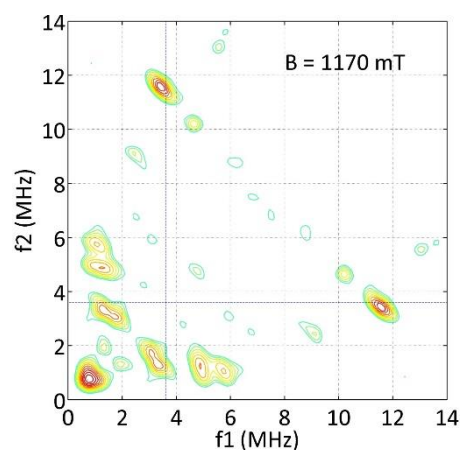
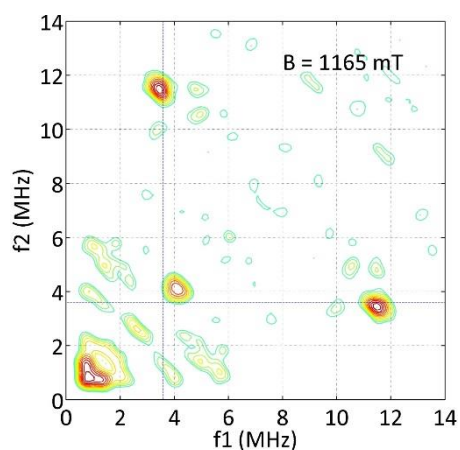


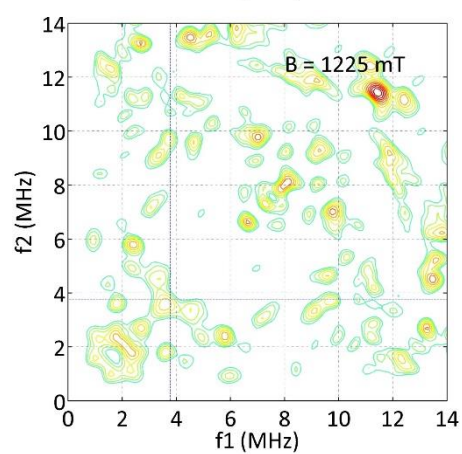
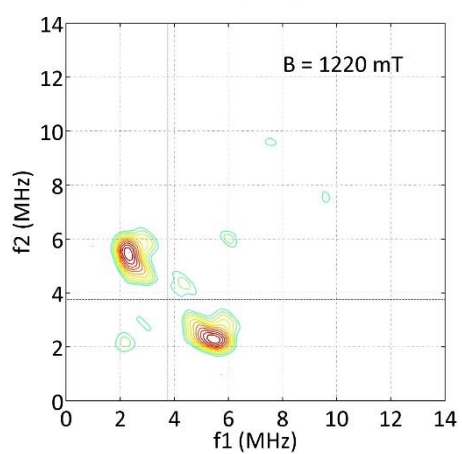
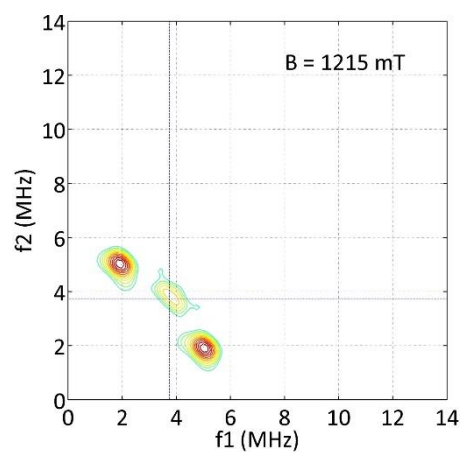
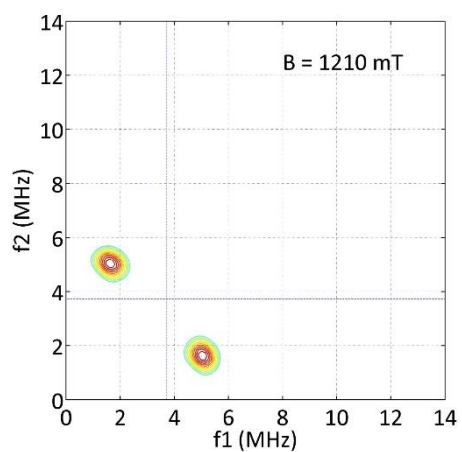
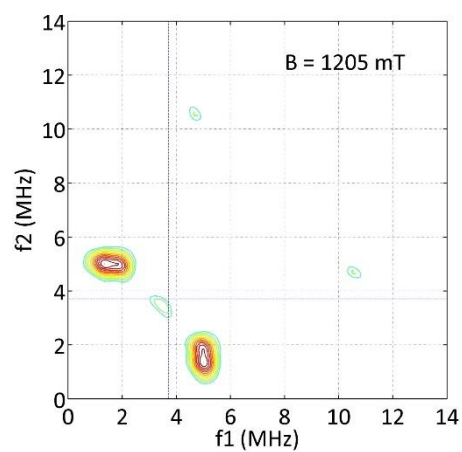
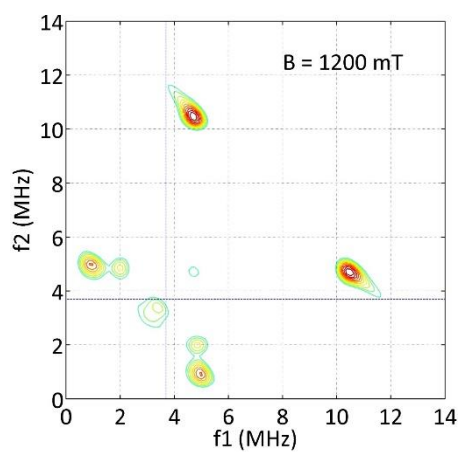
Spectres HYSORE du complexe saturé en NOHA et H₄F

Conditions expérimentales : fréquence 33,68GHz, température 20K, puissance micro-onde 7,924mW, impulsion $\pi/2$ 20ns, impulsion π 36ns, t_1 32ns, t_2 52ns, incrément 16ns, τ 136ns, durée d'intégration 96ns, intervalle entre deux tirs 510 μ s.

Les lignes pointillées marquent la fréquence de Larmor de ^{14}N .

Le champ magnétique est indiqué sur chaque spectre.

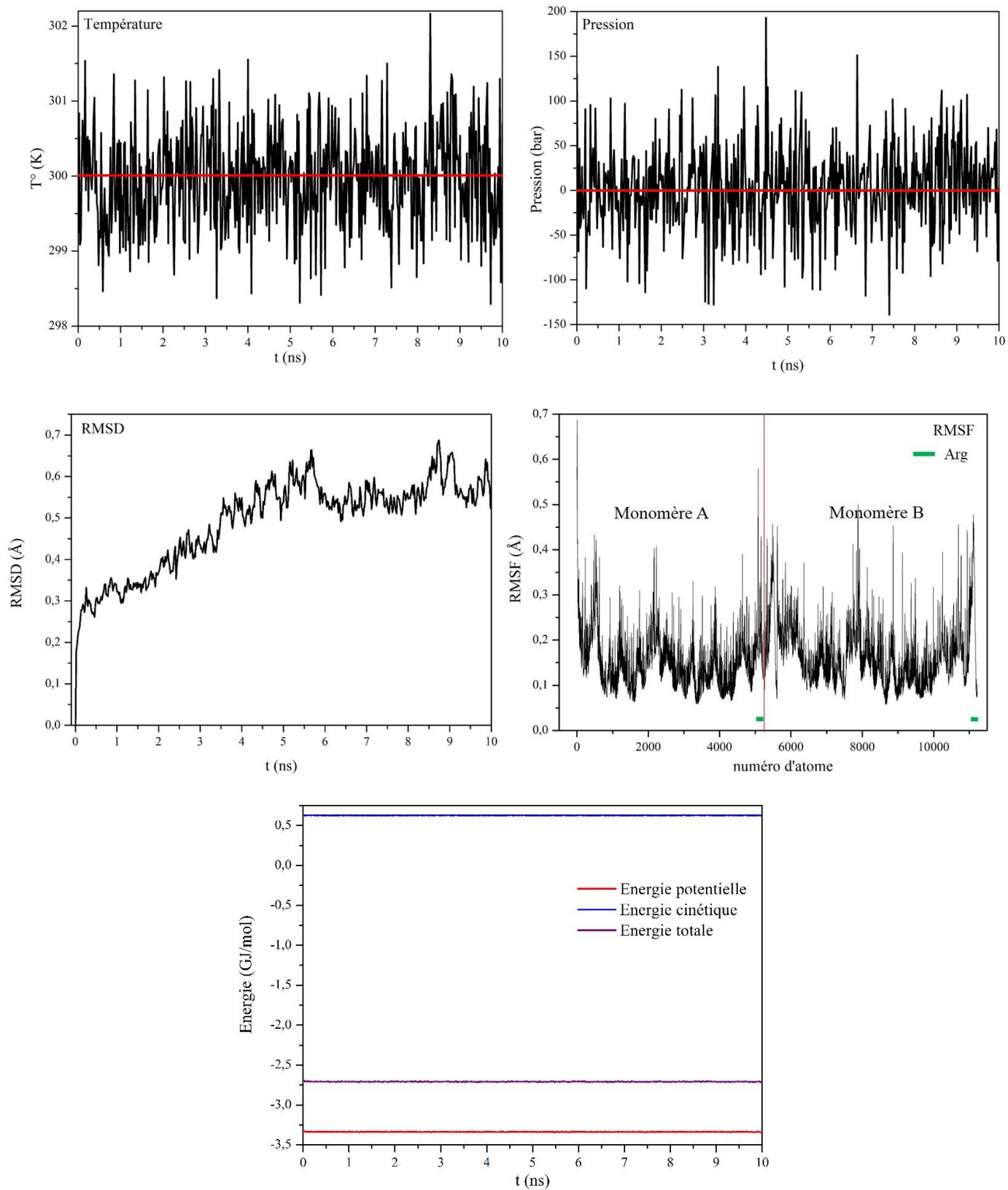




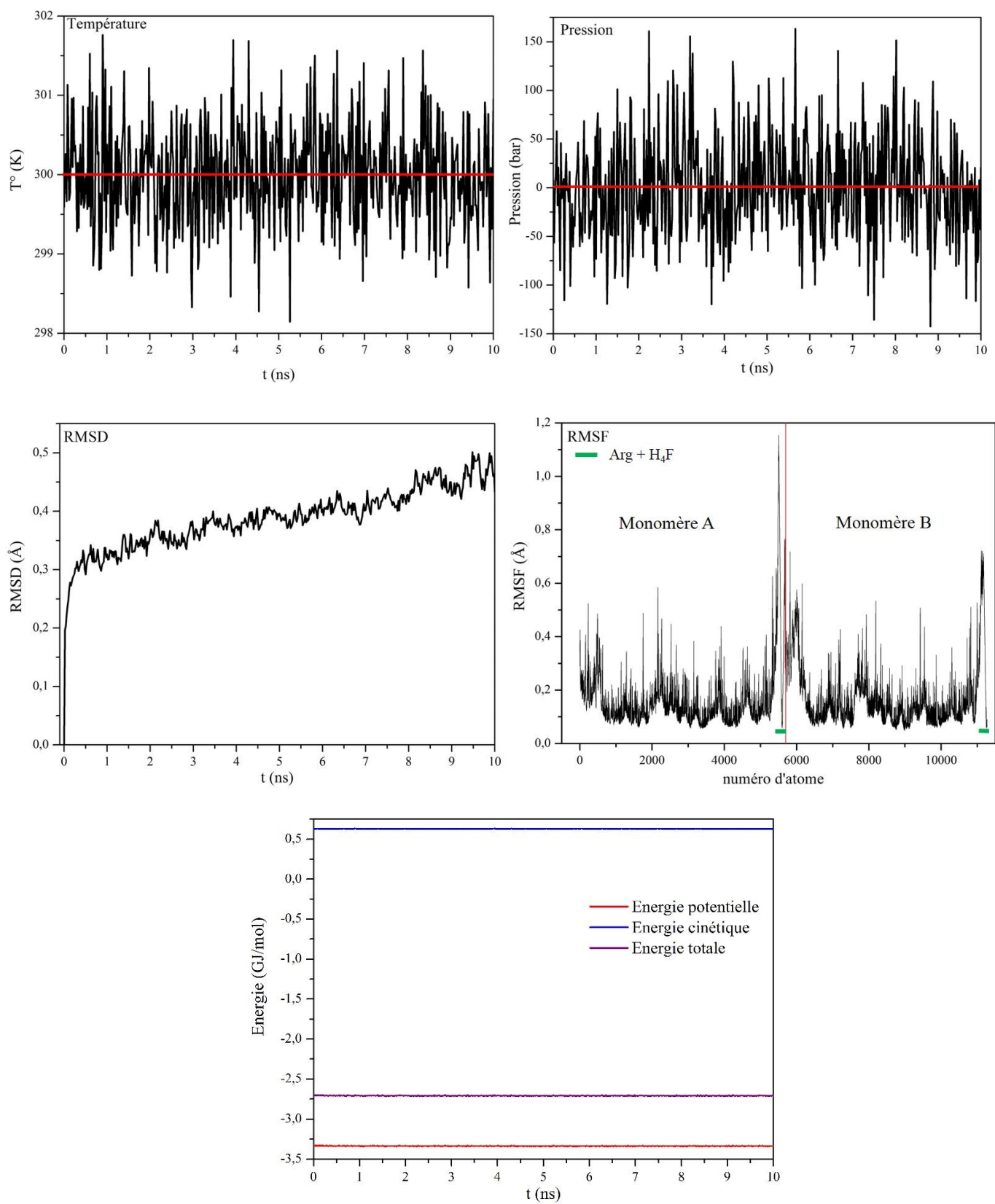
Annexe 4

Suivi des variations d'énergie, de RMSD, de RMSF et de température au cours des dynamiques moléculaires

Suivi de la dynamique moléculaire en absence de cofacteur



Suivi de la dynamique moléculaire en présence du cofacteur H₄F



Annexe 5

Revisiting the Val/Ile mutation in mammalian and bacterial NO-Synthases: a spectroscopic and kinetic study

Revisiting the Val/Ile mutation in mammalian and bacterial NO-Synthases: a spectroscopic and kinetic study.

Marine Weisslocker--Schaetzel, Mehdi Lembrouk, Jérôme Santolini and Pierre Dorlet*

From: Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), IBITECS, CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91198, Gif-sur-Yvette cedex, France

Running title: *Val/Ile mutation in iNOS and bsNOS*

* To whom correspondence should be addressed: Pierre Dorlet, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), IBITECS, CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91198, Gif-sur-Yvette cedex, France. Fax: (+33)-1-69088717; E-mail: pierre.dorlet@i2bc.paris-saclay.fr

Keywords: NO-Synthase, EPR, Stopped-Flow, Freeze-quench, Heme protein, mechanism, Raman

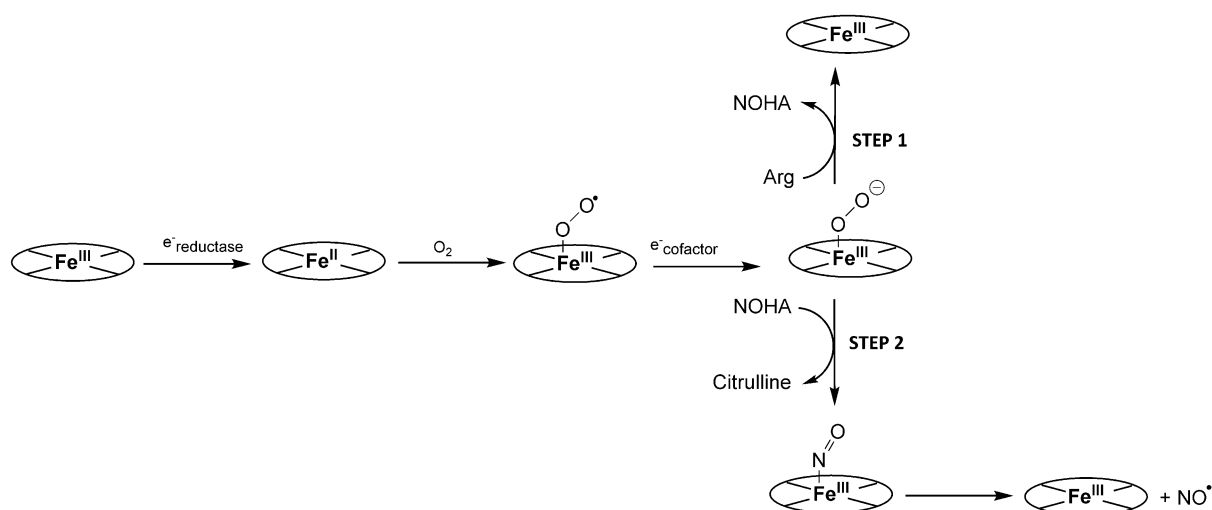
ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is produced in mammals by the nitric oxide synthase (NOS) isoforms at a catalytic site comprising a heme associated with a bipterin cofactor. Through genome sequencing, proteins with high homology to the oxygenase domain of NOSs have been identified, in particular in bacteria. The active site is highly conserved except for a valine residue in the distal pocket that is replaced by an isoleucine in bacteria. This switch was previously reported to influence the kinetics of the reaction. We have used the V346 mutant of the mouse inducible NOS as well as the I224V mutant of the NOS from *Bacillus subtilis* to study their spectroscopic signatures in solution and look for potential structural differences compared to their respective wild types. Both mutants seem destabilized in absence of substrate and cofactor. When arginine or NOHA are present along the cofactor, the mutation has negligible effects. Small differences can be detected when NOHA is present compared to arginine, which is likely due to the differences in the hydrogen bonding network of the distal pocket. Stopped-flow experiments evidence significant changes in the kinetics of the reaction due to the mutation as was already known. We found these effects particularly marked for iNOS. Based on those results, we performed rapid freeze-quench experiments to trap the bipterin radical and found the same results that we had obtained on the wild types. Despite differences in kinetics, a radical could be trapped in both steps for the iNOS mutant but only for the first step in the mutant of bsNOS. This strengthens the hypothesis that mammalian and bacterial NOSs may have a different mechanism during the second catalytic step.

INTRODUCTION

Nitric oxide synthases (NOSs) are the enzymes responsible for the production of NO in mammals. They catalyse the 2-step oxidation of L-arginine (Arg) into L-citrulline and NO *via* the formation of N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA).(1, 2) They are homodimeric enzymes containing an oxygenase and a reductase domain. The active site, located in the oxygenase domain, comprises a heme molecule bound to the protein by a cysteine residue and associated with a tetrahydrobiopterin cofactor (H4B). The precise and detailed mechanism of NOS is still under debate but the first events are common to both steps of the catalysis (Scheme 1).(2) The high-spin ferric heme is first reduced by an electron from the reductase domain and binds

dioxygen to form an oxyferrous moiety.(3) The biopterin cofactor is directly involved in the catalysis: it gives an electron to this oxyferrous complex before autoxidation can occur allowing the catalysis to proceed towards the oxidation of the substrate.(4, 5) The biopterin thus forms a radical that is later on reduced to regenerate the cofactor.(2, 6, 7)



SCHEME 1 NOS molecular mechanism. Only the species that have been detected experimentally are shown. Other heme intermediates occur during step 1 and step 2.(2)

Extensive genome sequencing has led to the identification of proteins with high homology compared to the oxygenase domain of mammalian NOS, throughout the living kingdoms. In particular, NOSs have been identified in many bacterial phyla mostly Gram⁺, such as *Deinococcus*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*,...(8, 9) Bacterial NOSs present an overall structure similar to that of mammalian NOS oxygenase domain and the heme active site is highly conserved.(10-12) The only difference in the distal environment of the heme is the replacement of a conserved valine residue in mammalian NOS by an isoleucine in bacterial enzymes.(13) The study of the mutation of that specific aminoacid has been reported previously for the inducible isoform of mammalian NOS (iNOS, V346I mutant) and the NOS from the bacterium *Bacillus subtilis* (bsNOS, I224V mutant) with kinetics characterization in single turnover conditions.(13) The mutation was found to have a significant impact on the kinetics of the reaction, in particular the final dissociation of NO from the active site but also the formation and decay of the oxyferrous species.(13) The iNOS V346I mutant was further studied with respect to its NO binding properties, steady-state kinetics and in NO geminate recombination experiments.(14, 15) More recently, this mutation was found to be important in the design of selective inhibitors towards bacterial NOSs.(16, 17) Structurally, the comparison between iNOS and bsNOS was done on the WT X-ray structures and no significant changes were found.(18, 19) Regarding the mutants, only an inhibitor bound bsNOS I224V was crystallized.(16)

The changes in reaction kinetics observed for these mutations potentially provide a good opportunity to further study the mechanism of NOS and the structure-function relationship for mammalian and bacterial enzymes. In comparing the behavior of the latter, our group reported a potential difference in mechanism for the second step.(20) Indeed, by performing rapid freeze-quench experiments, it is in principle possible to trap the biopterin radical that is formed as the cofactor reduces the oxyferrous moiety at the beginning of catalysis.(21, 22) We were able to trap the radical for both steps in the case of iNOS but only for the 1st step in the case of bsNOS.(20) The absence of radical trapped for the 2nd step in bsNOS for any quenching times attempted questions whether the cofactor is involved at all in the electron transfer in that case.

If it is, significant changes in the radical reduction rate have to occur between iNOS and bsNOS. The use of the Val/Ile mutants for which the kinetics resemble those of their counterpart (the mutant of iNOS behaving more like bsNOS WT and the mutant of bsNOS more like iNOS WT) seems therefore appropriate to further study this question.

In this report, we have used EPR and Raman spectroscopies to probe potential structural changes of the heme active site for the WT and mutant proteins of iNOS and bsNOS in solution. We have reinvestigated their kinetic properties by stopped-flow before using rapid freeze quench to probe the formation of a biopterin radical during catalysis. The results obtained are discussed with respect to the initial events of the catalytic mechanism proposed for NOS.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals - All chemicals were purchased from Sigma or Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). H₄B was purchased from Schricks Laboratories (Schricks Laboratories, Jona, Switzerland) and NOHA from Enzo Life Sciences (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, U.S.A.). NO was purchased from Messer (Messer France SA, Asnières, France).

Samples preparation - I224VbsNOS and V346IiNOSoxy were overexpressed in *Escherichia coli* as described previously.(10)

Fe^{III} samples were prepared by conditioning the protein in a KPi 100 mM pH 7.4 buffer containing 10% glycerol, in the presence of Arg (5 mM) or NOHA (500μM), H₄B (500μM) and DTT (3mM) by four successive cycles of dilution/centrifugation using MicroCon membrane concentrators with a 30 kDa cut-off (Millipore, Bedford, MA, USA). Samples were directly frozen into EPR tubes.

Fe^{II}NO samples were prepared from the ferric samples. Anaerobic Fe^{III} NOS was obtained by 100 cycles of alternate vacuum and argon refilling, in a quartz cuvette. Ferric samples were reduced by an anaerobic dithionite solution (100 mM) added directly into the cuvette using a gas-tight syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). NO saturated solution was then added to form the Fe^{II}NO complex. Samples were transferred into argon-filled EPR tubes using a gas-tight syringe. The NO-saturated solution was prepared by flushing NO gas (filtered by a KOH solution) through a previously degassed buffer. Reduction of the ferric iron and formation of the Fe^{II}NO complex were monitored by UV-visible absorption spectroscopy.

Stopped-flow experiments - Samples for stopped-flow experiments were prepared from the ferric samples. Anaerobic Fe^{III} NOS was obtained by 100 cycles of alternate vacuum and argon refilling, directly in a quartz cuvette. Fe^{II} samples were then obtained by reduction of Fe^{III} NOS by the addition of a small volume of anaerobic dithionite solution (100 mM) directly into the cuvette by using a gas-tight syringe. Reduction was monitored by UV-visible absorption spectroscopy (Uvikon spectrometer from Serlabo Technologies). The ferrous protein sample was then quickly mixed at 4 °C with an aerobic buffer by using a Stopped-Flow SFM-300 set-up (BioLogic Science Instruments). The reaction was monitored by UV-visible absorption spectroscopy using a diode array detector. Spectra were recorded with a minimum time interval of 3ms. The final protein concentration was about 10 μM. The formation and decay kinetics of hemic intermediates were determined by monitoring the absorbance change *versus* time at 396, 440 or 650 nm. For each condition two or three separate experiments were performed and for each of them five series of spectra were averaged. The mean value and standard deviation of the kinetic constants were determined from all experiments.

Rapid freeze-quench experiments - Samples for freeze-quench experiments were prepared from the ferric samples. Anaerobic Fe^{III} NOS was obtained by 100 cycles of alternate vacuum and argon refilling, directly in a quartz cuvette. Fe^{II} samples were then obtained by reduction of Fe^{III} NOS by the addition of a small volume of anaerobic dithionite solution (100 mM)

directly into the cuvette by using a gas-tight syringe. Reduction was monitored by UV-visible absorption spectroscopy (Uvikon spectrometer from Serlabo Technologies). In order to avoid unwanted reactions, the excess of dithionite was eliminated on protein desalting spin columns (Thermo Scientific) in a glove box. The ferrous protein sample was then quickly mixed at 4 °C with an aerobic buffer by using a Freeze-Quench SFM-300 set-up (BioLogic Science Instruments). The reaction was stopped at a given time by rapid freezing into an isopentane bath at 150 K. The sample was then collected into an EPR tube and frozen at 77 K. The final protein concentration was about 100 μ M.

EPR Spectroscopy - 9.4 GHz EPR (X-band) spectra were recorded on a Bruker ELEXSYS 500 spectrometer equipped with an Oxford Instrument continuous flow liquid helium cryostat and a temperature control system. Simulations were performed by using the Easyspin software package (23) and routines written in the lab.

Resonance Raman Spectroscopy. - Samples (50 μ L) were placed into a gas-tight quartz spinning cell, at room temperature, to avoid local heating and to prevent photodissociation and degradation. Raman excitation at 441.6 nm was obtained with a He-Cd laser (Kimmon, Tokyo, Japan). Resonance Raman spectra were recorded using a modified single-stage spectrometer (Jobin-Yvon T64000, Jobin-Yvon, Longjumeau, France) equipped with a liquid N₂-cooled back-thinned CCD detector. Stray scattered light was rejected using a holographic notch filter (Kaiser Optical Systems, Ann Arbor, MI). Spectra were recorded as the co-addition of 40-240 individual spectra with CCD exposure times of 5-30 s each. Three to six successive sets of such spectra were then averaged. Laser power at the sample was <5 mW. Neutral density filters were used for the FeCO and FeNO complexes to decrease laser power (<1 mW) and prevent photodissociation and photooxidation. Spectral precision and accuracy were estimated to be ± 1 cm⁻¹. Spectral resolution was ≈ 3 cm⁻¹. Baseline correction was performed using GRAMS 32 (Galactic Industries, Salem, NH).

RESULTS AND DISCUSSION

EPR Analysis of ferric samples.

Wild-type and mutated iNOS and bsNOS samples were prepared both in the absence and in the presence of substrate (L-arginine or NOHA) and cofactor (H₄B) and analyzed by EPR spectroscopy (see Figure 1 and SI). In the absence of substrate and cofactor, all four spectra exhibit a mixture of high-spin and low-spin ferric iron. The low-spin form is commonly associated to the heme with a water molecule as the 6th ligand. This water molecule is present when the protein is not properly or fully folded. Upon binding of the cofactor and substrate, the tight dimer is formed and this water molecule excluded to give the high-spin form which is catalytically the competent. This is particularly true for the WT of iNOS whose EPR spectrum is known to exhibit a significant proportion of LS heme (Figure 1 grey lines and Table 1). This is in contrast to bsNOS WT which is essentially in the HS state even in the absence of substrate and cofactor.(24) The EPR spectra also show a higher relative proportion of low-spin state for both mutants compared to their respective WT suggesting that the mutation destabilizes the protein in both cases. The effect is especially visible for bsNOS for which a significant proportion of LS is observed for the mutant. Since the low-spin state is due to the presence of a water molecule as the sixth iron ligand, we can propose that the solvent accessibility to the distal side of the heme is facilitated in the bsNOS I224V mutant by the shorter lateral chain of the valine residue. In the WT, this would be prevented by the extra methyl group of the isoleucine moiety.

Addition of saturating concentrations of arginine and H₄B triggers the full conversion to the competent high-spin ferric state for all four NOSs (Figure 1, black solid line, and Table 2). The addition of NOHA and H₄B has the same effect (see SI for the spectra and Table 2 for parameters). Although WT and mutants all exhibit similar rhombic spectra dominated by zero field splitting, those are not superimposable which implies subtle differences in the heme electronic environment. We note that for both mutants the g^{eff} values vary in the same direction (the g_1^{eff} values increase while the g_2^{eff} and g_3^{eff} values decrease compared to the WT).

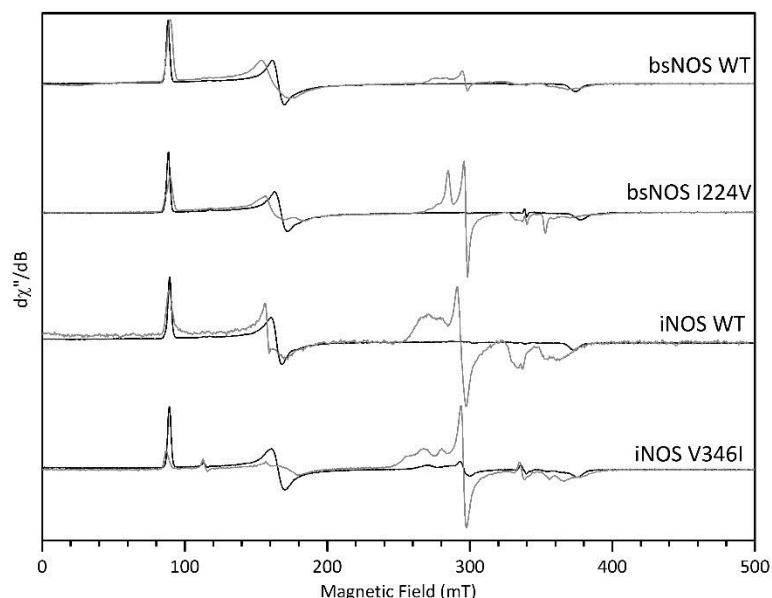


FIGURE 1 EPR spectra of native ferric NOS for WT and mutants of iNOS and bsNOS with (black) and without (grey) saturating concentrations of arginine and cofactor. Spectra have been scaled independently for display. Typical experimental conditions: microwave frequency 9.5 GHz, microwave power 1 mW, field modulation amplitude 2 mT, field modulation frequency 100 kHz, T 10 K.

TABLE 1. g -values measured for the LS ferric heme of WT and mutants samples in absence of arginine and cofactor.

	g_1	g_2	g_3
iNOS WT	2.53	2.29	1.85
	2.48	2.29	1.85
	2.39	2.29	1.90
iNOS V346I	2.64	2.29	1.79
	2.53	2.29	1.84
	2.41	2.29	1.90
bsNOS WT	2.47	2.29	1.88
	2.40	2.29	1.91
bsNOS I224V	2.52	2.29	1.86
	2.39	2.29	1.92

TABLE 2. Effective g -values measured for the HS ferric heme of WT and mutants samples in presence of saturating concentrations of substrate and cofactor

	+Arg				+NOHA			
	g_1^{eff}	g_2^{eff}	g_3^{eff}	E/D	g_1^{eff}	g_2^{eff}	g_3^{eff}	E/D
iNOS WT	7.54	4.12	1.82	0.075	7.62	4.03	1.80	0.080
iNOS V346I	7.60	4.10	1.81	0.079	7.70	3.99	1.78	0.082
bsNOS WT	7.64	4.07	1.80	0.080	7.68	3.97	1.78	0.083
bsNOS I224V	7.67	4.05	1.79	0.081	7.75	3.95	1.77	0.084

EPR Analysis of ferrous-nitrosyl complex

The $\{\text{FeNO}\}^7$ is a very good paramagnetic probe to study structural changes in the distal pocket. It has been extensively studied by EPR for various hemoproteins including NO-synthases.(25-33) Because of the location of the Ile/Val mutation, it is thus particularly adapted to investigate the structural influence of these residues.

The EPR spectra for the $\{\text{FeNO}\}^7$ complex of the different proteins saturated with H₄B and either arginine or NOHA are shown in Figure 2 along with their simulated spectra. The parameters are given in Table 3. $\{\text{FeNO}\}^7$ complexes were also prepared in the presence of H₄B only or in the presence of H₄B and L-citrulline (see SI).

As reported before,(29) the spectra for the WT samples exhibit two components: a dominant rhombic powder pattern with partial resolution of the hyperfine coupling from the NO nitrogen nuclei, and an axial contribution (at $g=2.04$). The axial contribution is more obvious in the case of iNOS compared to bsNOS but remains minor and the rhombic pattern is the only one that is usually taken into account. The nature of the substrate also has an influence on the $\{\text{FeNO}\}^7$ conformation since the spectra are less anisotropic in g and less resolved with respect to the nitrogen hyperfine coupling in the case of NOHA compared to arginine.

For both iNOS and bsNOS, the spectrum of the Ile/Val mutant is virtually the same compared to the WT, suggesting that there is no significant change in the electronic structure of the complex due to the mutation. The proportion of the axial contribution does not seem to be affected, as is the nitrogen hyperfine coupling (we note that differences in values for A_x in Table 3 are not significant since the coupling is not resolved on g_x for most cases and therefore contributes to the line broadening, making its value difficult to determine precisely). Only in the absence of substrate do we observe a significant change in the EPR spectra (see SI). Indeed in this case, the rhombic pattern is much broader in the mutants compared to the WTs and we see the appearance of a fraction of penta-coordinated $\{\text{FeNO}\}^7$ complex. This indicates that in the absence of substrate the mutation destabilizes the protein both for iNOS and bsNOS. Somehow Arg compensates for the destabilization induced by the Ile/Val substitution.

The destabilization observed for both mutants in the absence of substrate corresponds well to what was observed when looking at the ferric samples, however it is hard to rationalize. Indeed if the I224V mutation on bsNOS increases solvent access that could explain the destabilization of the protein, then we should expect stabilization for the iNOS mutant which is not the case. This could mean that effects at longer distances are at play that hinders the proper folding of the protein when the substrate is not bound or modify the structural environment of the heme. Upon binding of the arginine however the mutants exhibit well resolved spectra characteristic of 6-coordinated ferrous nitrosyl complexes and matching well those of the respective WT. The latter means that the Val/Ile switch is not the cause of the differences observed in the EPR spectra between iNOS and bsNOS WTs (g_x edge narrower, hyperfine structure better resolved in the case of bsNOS), which are rather due to the surrounding protein conformation and rigidity. Upon binding of NOHA, all spectra exhibit a lower g -anisotropy as expected compared to that in presence of arginine.(29) This confirms that the overall lineshape

of the ferrous nitrosyl EPR spectrum is imposed by the nature of the substrate. By contrast to what was observed for arginine however, both mutants display a small increase in g-anisotropy compared to the WT in the presence of NOHA. It is therefore likely that in this case, small changes occur in the environment of the ferrous nitrosyl complex with the Val/Ile mutation or that they are more easily detected. This could be related to the greater influence that NOHA has on the EPR spectrum of the $\{\text{FeNO}\}^7$ compared to Arg and to the fact that the Fe-N-O angle is more bent in the presence of NOHA.(34) This is very likely linked to differences induced by the substrates in the hydrogen bonding network of the distal site and their interaction with water molecules.(35)

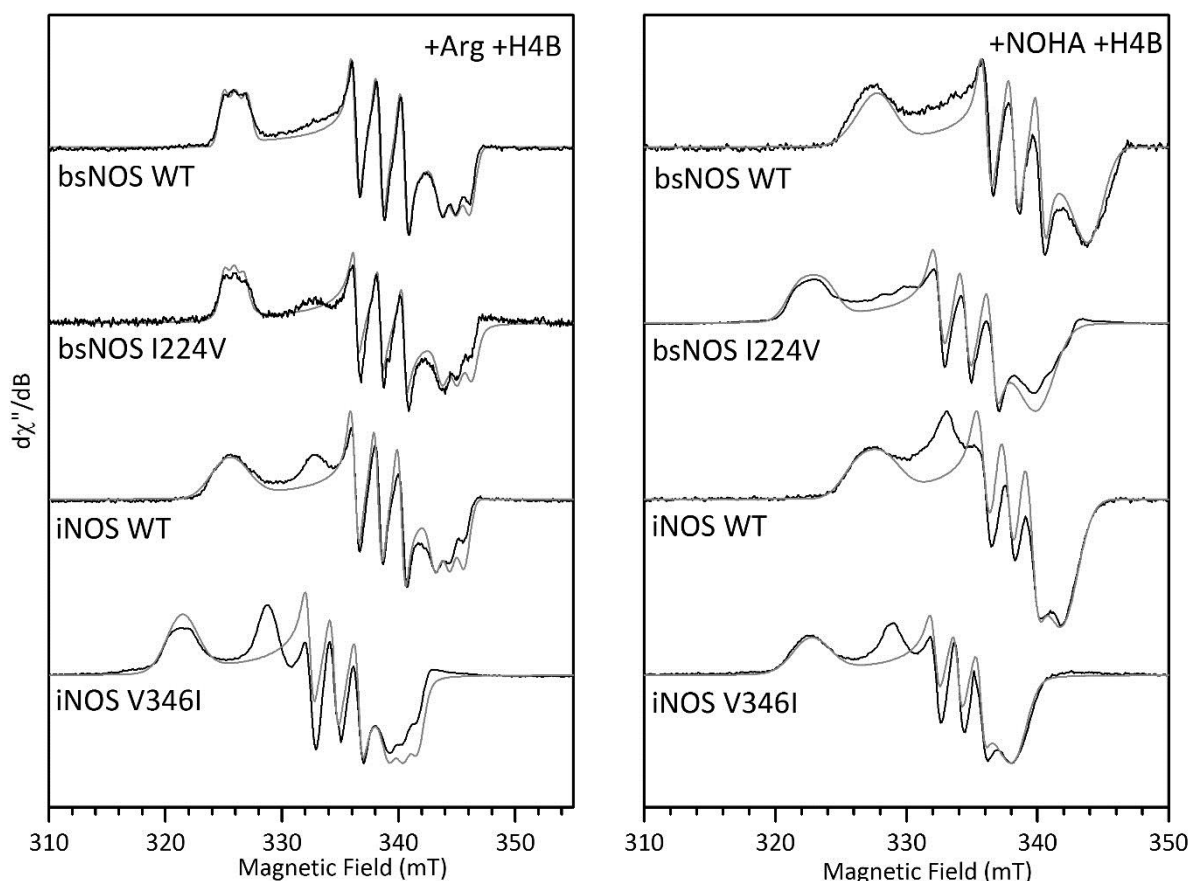


FIGURE 2 EPR spectra (black) of the $\{\text{FeNO}\}^7$ NOS for WT and mutants of iNOS and bsNOS with their simulations (grey), with saturating concentrations of cofactor and substrate (left panel: L-Arg, right panel: NOHA). Experimental conditions: microwave frequency 9.49 GHz (except iNOS V346I Arg, iNOS V346I NOHA and bsNOS I224V NOHA 9.39 GHz), microwave power 0.25 μW , field modulation amplitude 0.5 mT, field modulation frequency 100 kHz, T 10 K.

TABLE 3 Parameters obtained from the simulation of the EPR spectra in Figure 2. A values (hyperfine coupling for the nitrosyl nitrogen) given in MHz.

	+Arg +H4B						+NOHA +H4B					
	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
bsNOS WT	2.081	2.005	1.967	29	59	33	2.073	2.007	1.974	22	58	20
bsNOS I224V	2.080	2.004	1.966	26	58	34	2.078	2.005	1.973	36	57	20
iNOS WT	2.084	2.005	1.972	30	56	34	2.073	2.009	1.984	40	52	14
iNOS V346I	2.085	2.005	1.970	17	58	37	2.078	2.008	1.984	24	49	20

Resonance Raman

Resonance Raman is useful to characterize small structural changes in the active site of heme proteins. Spectra were recorded for the $\{\text{FeNO}\}^7$, $\{\text{FeNO}\}^6$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complexes of bsNOS WT and I224V mutant in the presence of arginine and H_4B . The excitation at 441.6 nm was chosen based on the UV-visible absorption spectra obtained for those complexes, with maximum absorption around 436 nm, 440 nm and 445 nm for the $\{\text{FeNO}\}^7$, $\{\text{FeNO}\}^6$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ species, respectively. The low frequency region of the Raman spectra is shown in Figure 3. For the WT (grey lines), the $\nu_{\text{Fe-NO}}$ mode is observed at 552 cm^{-1} for $\{\text{FeNO}\}^7$ and 540 cm^{-1} for $\{\text{FeNO}\}^6$ and the stretching ($\nu_{\text{Fe-CO}}$) and bending ($\delta_{\text{Fe-CO}}$) modes for $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ are observed at 500 and 567 cm^{-1} , respectively.(24) The spectra obtained on the I224V mutant (Figure 3, black lines) are virtually identical to those observed on the WT. This is also true for the high frequency region (data not shown), indicating that the Val/Ile mutation does not induce major changes in the heme structure and its ligands coordination when arginine is bound. This is in agreement with the EPR data obtained in the case of the $\{\text{FeNO}\}^7$ complex. However differences have been reported for heme-CO vibrational modes between the iNOS and bsNOS protein.(24) These differences arise from changes in the electronic properties of the heme due to changes in the proximal ligand bond strength. This confirms that when arginine is bound, the structure of the FeXO species is not affected by the Val/Ile switch but depends only on the nature of the protein studied. It also means that the mutation does not affect the distal hydrogen bond network in the presence of arginine.

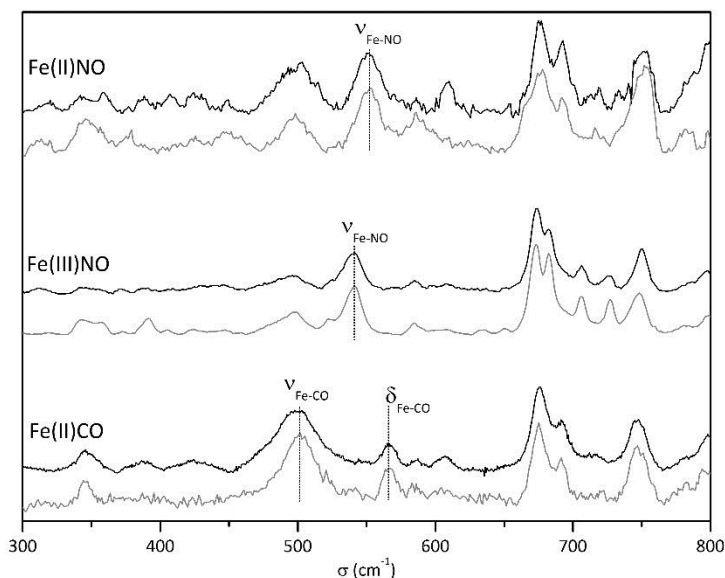


FIGURE 3 Resonance Raman spectra of the Fe(II)NO , Fe(III)NO and Fe(II)CO complexes of bsNOS WT (grey line) and I224V mutant (black line) in the presence of saturating conditions of arginine and cofactor. Experimental conditions: λ_{exc} 441.6 nm, room temperature.

Stopped-flow

Kinetic analysis of these mutants has previously been performed, in particular for the 2nd step of catalysis. We have performed stopped-flow experiments on both mutants for the 1st and 2nd step of NOS catalysis at 4°C, a temperature lower than the one used in previous studies (10

°C). The reaction is monitored by UV-visible spectroscopy and the kinetics of the different transitions were determined by fitting time traces at selected wavelengths.

The rapid-mixing of the arginine- and H₄B-saturated Fe^{II} NOS with an air-saturated buffer allows following the 1st step reaction. For both iNOS WT and bsNOS WT, the only intermediate that can be observed before the final Fe^{III} state is the oxy-ferrous complex (see SI).(10, 15, 36, 37) As previously reported at 10°C,(13) the disappearance of the Fe^{II}O₂ complex is much faster for iNOS compared to bsNOS (see Table 4). In addition, we observe here that the formation of Fe^{II}O₂ is also faster (4-fold) for iNOS.

The stopped-flow spectra obtained for iNOS V346I (Step 1) are shown in Figure 4 left panel (see SI for the data on bsNOS I224V for Step 1). Both bsNOS I224V and iNOS V346I follow the same pathway as their wild-type counterparts, with Fe^{II}O₂ being the only observable intermediate in step 1. Although the mutation does not modify the general behavior of the enzymes, it strongly influences the rates of formation and disappearance of the oxy-ferrous complex. Indeed the Ile to Val switch in bsNOS accelerates the formation and decay of Fe^{II}O₂ whereas the Val to Ile substitution in iNOS dramatically slows down ($\approx$ 14-fold) the rate of oxygen binding and the decay of the resulting oxy-ferrous complex.(15) Changes in O₂ binding rate suggest that the Val/Ile residue may be located along the O₂ channel and that the bulkier isoleucine could hinder oxygen access to the heme.

The Ile/Val mutation is actually known for significantly modifying the kinetics of dioxygen binding and NO release during the second step of catalysis.(13, 15) For all four proteins we can observe the same three transitions reported previously at 10°C:(10, 13, 36) binding of oxygen to the ferrous iron, formation of the Fe^{III}NO complex that dissociates to yield NO and the final ferric enzyme (as example, the spectra obtained for bsNOS I224V Step 2 are shown in Figure 4 right panel, see SI for the data on iNOS V346I Step 2). All transitions are found faster for iNOS WT compared to bsNOS WT (Table 5).(10, 13, 36) In the mutants, bsNOS I224V exhibits slightly faster transition rates than bsNOS WT whereas they are all much slower for iNOS V346I compared to the WT (Table 5).

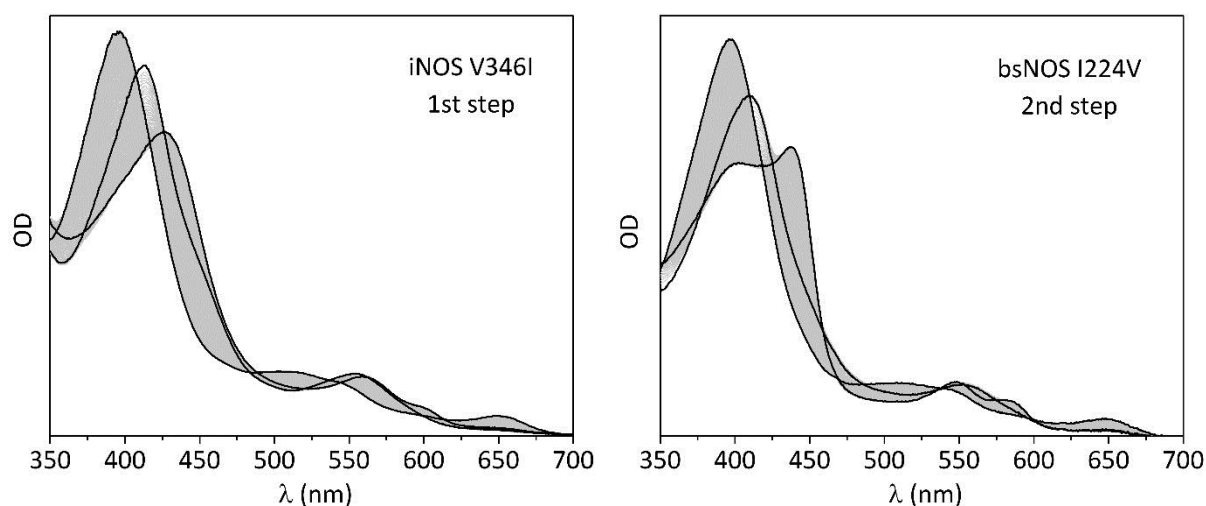


FIGURE 4 Stopped-flow spectra measured upon mixing a solution of reduced iNOS V346I saturated with L-Arg and H₄B (left panel) or reduced bsNOS I224V saturated with NOHA and H₄B (right panel) with an air saturated buffer at 4°C. Black traces have been selected to show the initial state (Fe^{II}, λ_{max} 412 nm), the final state (Fe^{III}, λ_{max} 396 nm, 2.25 s for left panel and 5.85 s for right panel) and the maximum of formation of the main intermediate (left panel Fe^{II}O₂ λ_{max} 426 nm 213 ms; right panel Fe^{III}NO λ_{max} 438 nm 132 ms).

TABLE 4 Transition rates (s^{-1}) obtained from stopped-flow experiments for the 1st step of NOS catalysis performed at 4°C.

	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$Fe^{II}O_2$	$\longrightarrow$	Fe^{III}
bsNOS WT		66 ± 16		4.3 ± 2.2	
bsNOS I224V		143 ± 54		6.1 ± 2.2	
iNOS WT		209 ± 61		18.6 ± 1.8	
iNOS V346I		13.8 ± 1.4		1.52 ± 0.29	

TABLE 5 Transition rates (s^{-1}) obtained from stopped-flow experiments for the 2nd step of NOS catalysis performed at 4°C.

	Fe^{II}	$\longrightarrow$	$Fe^{II}O_2$	$\longrightarrow$	$Fe^{III}NO$	$\longrightarrow$	Fe^{III}
bsNOS WT		29.0 ± 2.1		18.3 ± 3.5		0.39 ± 0.06	
bsNOS I224V		38.7 ± 4.1		22.5 ± 3.3		0.60 ± 0.03	
iNOS WT		84.0 ± 6.4		43.3 ± 4.5		1.08 ± 0.04	
iNOS V346I		9.8 ± 1.7		7.7 ± 1.7		0.41 ± 0.03	

The Val/Ile switch affects directly the dioxygen binding and the decay of the oxyferrous complex for both steps of catalysis, as well as the dissociation of the nitric oxide from $Fe(III)$ in the second step. The data we obtained here are in good agreement (same order of magnitude) with those reported previously.(10, 13, 36) The small variations observed in some cases could be due to differences in temperature, sample preparation and data analysis. The effects on O_2 binding and NO dissociation rates were rationalized by steric hindrance caused by the extra methyl group of the Ile residue compared to Val. They are particularly marked in the case of iNOS for which we observed a dramatic decrease in O_2 binding for both steps. It seems therefore that the structure of iNOS is optimized for O_2 access and that replacing the valine by a bulkier isoleucine seriously disrupts this optimization. In the case of bsNOS, the wild type structure can already bind dioxygen rather efficiently despite the presence of the isoleucine residue and therefore its mutation into valine has less of an effect. In addition the mutation also affects the decay of the oxyferrous complex which was more difficult to explain.(13) Without having a clear explanation, the small changes detected with spectroscopy for both mutants compared to the wild-type could be an indication that some structural modifications do occur at the level of the heme. These modifications could have greater consequences on catalysis in the case of iNOS compared to bsNOS since the two proteins have different properties to begin with (heme redox potential, strength of proximal bond, structural effect of the pterin cofactor, dimer interface, ...).

Rapid freeze-quench

When studying the role of the cofactor in bsNOS compared to iNOS, we trapped a biopterin radical for both steps of the reaction in the case of iNOS but only for the 1st step in bsNOS.(20) In NOS catalysis, the formation rate of the biopterin radical corresponds to the decay rate of the $Fe^{II}O_2$ moiety since the cofactor directly gives an electron to the oxyferrous complex (Scheme 1).(6) The results of the stopped-flow experiments show that the $Fe^{II}O_2$ decay rates are modified for the iNOS and bsNOS mutants compared to the WT (Tables 4 and 5). In particular, for iNOS V346I the reduction of the oxyferrous complex is significantly slower compared to its WT and becomes also slower compared to the WT of bsNOS for both steps. We therefore decided to

perform rapid freeze-quench experiments on both mutants to see if we could trap a biopterin radical.

Several trapping times were chosen based on the stopped-flow kinetics and representative EPR spectra of the corresponding samples are shown in Figure 5. In the 1st step (Arg hydroxylation), a biopterin radical is observed for both iNOS V346I and bsNOS I224V mutants. The position and lineshape of the EPR signals (top spectra) are similar to those observed in the WT samples, indicating that the biopterin radical is protonated.(20, 22) In the 2nd step (NOHA oxidation), a protonated biopterin radical could be trapped for iNOS V346I whereas it was not possible to observe a signal in the case of the mutant of bsNOS (bottom spectra). This is identical to what we previously reported for the WT iNOS and bsNOS, despite the differences we observed between WT and mutants in the rates of Fe^{II}O₂ decay.

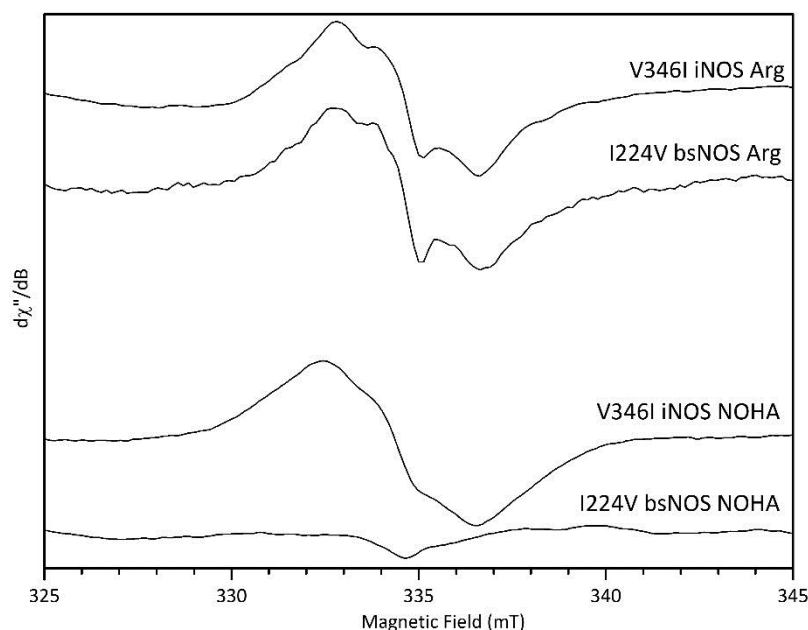


FIGURE 5 EPR spectra of the freeze-quench samples for step 1 (Arg, top) and step 2 (NOHA, bottom) of the reaction of the iNOS V346I and bsNOS I224V mutants. Experimental conditions: samples trapped at 600 ms (iNOS V346I Arg), 50 ms (bsNOS I224V Arg), 280 ms (iNOS V346I NOHA) and 127 ms (bsNOS I224V NOHA); microwave frequency 9.38 GHz, microwave power 0.25 mW, field modulation amplitude 0.5 mT, field modulation frequency 100 kHz, T 50 K.

In the case of the WT, it was suggested that the non-observation of the radical by freeze quench for bsNOS 2nd step was due to kinetic effects or to a different mechanism that does not require the oxidation of the pterin in that case.(20) Because the kinetics of Fe^{II}O₂ decay differs for the mutants compared to the WT we were expecting different outcomes for the freeze-quench experiments for both steps of catalysis. In the first step, the much slower decay rate of Fe^{II}O₂ (and therefore formation rate of the biopterin radical) for iNOS V346I could have prevented the trapping of the radical which was not the case. Indeed, a biopterin radical was observed after 600 ms of reaction and was still present after 1.3 s. This indicates that the radical stabilization by the protein is not hindered by the mutation, but also that the decay of the radical is rather slow. Similarly a radical was trapped for the mutant of bsNOS in the 1st step of catalysis. The radical disappears more quickly (the trapping time needs to be below 100 ms to observe the EPR signal) compared to iNOS, which was also observed for the WT of bsNOS and is likely linked to the fact that the pterin site is more exposed to the solvent for the bacterial

enzyme.(18) For the 2nd step, the formation of the pterin radical (decay of the Fe^{II}O₂ species) in the mutant of iNOS is slowed down 6-fold making it slower than that of bsNOS WT. However this does not prevent the observation of the pterin radical which indicates that its reduction rate has also to be much slower for iNOS compared to bsNOS, suggesting a different mechanism or route of reduction. The same conclusion can be drawn between the 1st and 2nd step for bsNOS since the formation of the radical is faster in the 2nd step than in the 1st (based on the kinetics of Fe^{II}O₂ decay). As discussed for the WT,(20) the reduction of the pterin radical in the 2nd step for bsNOS would have to be unreasonably fast to prevent its observation. A first hypothesis is that the radical forms transiently and is reduced immediately by a nearby species, the substrate being the most likely candidate in this case since it is what differs between the 1st and 2nd step. Another hypothesis is that the radical does not form in the 2nd step of catalysis for bsNOS mutant as was also proposed for the WT.(20) The latter hypothesis is favored based on the freeze-quench experiments, however it was shown that the presence of the biopterin is necessary for the production of NO and citrulline by bsNOS.(10) In anycase, the results obtained for the mutants tend to confirm that there is a difference in mechanism between mammalian and bacterial enzymes for the 2nd step of catalysis, in particular regarding the involvement of the pterin cofactor.

Yet another scenario that could be envisioned for not observing the radical by EPR is that it would be strongly coupled to another S=1/2 paramagnetic species, making the resulting complex diamagnetic and thus EPR silent. For the 2nd step of the catalytic cycle, the obvious (and only?) candidate as the S=1/2 species would be NO itself. In addition it has been shown that N-nitrosation can occur on the pterin cofactor.(38) This could result from the direct reaction of NO with the pterin radical. However, this can be possible only after the nitrosyl ferric complex has dissociated at the end of the reaction. The kinetics for this event, as observed by stopped-flow experiments, is not compatible with an extinction of the biopterin radical which would have to occur beforehand. Therefore despite that we must keep in mind that possible reactions could occur within the catalytic site after formation of NO, this hypothesis is not pertinent to explain the absence of detection of the biopterin radical for the 2nd step of catalysis for both bsNOS WT and I224V mutant.

Since the catalytic heme intermediates in NOS are not detectable past the oxyferrous species, the use of such mutants that are able to modify the different rates of the kinetics seems to be particularly important in trying to get further insights into that mechanism. Here, they underline significant differences of behavior between a bacterial NOS and the mammalian iNOS. Despite differences in kinetics, both mutants retain the behavior of their WT when it comes to the electron transfers and show that bacterial and mammalian enzymes may work in different ways especially for the 2nd step of catalysis.

CONCLUSION

In this work we took advantage of the modified kinetics of the bsNOS I224V and iNOS V346 mutants to further investigate our findings on the biopterin radical formation differences in iNOS and bsNOS. The use of EPR and resonance Raman spectroscopies to probe structural differences of the two mutant proteins in solution showed that in absence of substrate and cofactor, the mutation seems to destabilize both iNOS and bsNOS. On the contrary, in the presence of arginine and cofactor the mutation has no effect on the structure and electronic properties of the active site whereas in the presence of NOHA and cofactor subtle differences were detected between the WTs and their respective mutants indicating that the NOHA substrate is more sensitive to the presence of the mutation or that it is less prone to rigidify the site compared to arginine. This is most likely due to the differences in the hydrogen bonding network in the distal site between Arg- and NOHA-bound enzymes. Surprisingly, when looking

at the formation of the biopterin radical we observed the same behavior for the mutants as we had seen with the WTs. A radical can be trapped by rapid freeze-quench for both steps of the reaction in the case of the iNOS mutant but only for the 1st step in the case of the bsNOS mutant, this despite the changes in the reaction rates due to the mutation and measured by stopped-flow. This underlines the hypothesis that the inducible and the bacterial NOSs could have a different mechanism during the 2nd step of catalysis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr Dennis Stuehr for the kind gifts of the mutant plasmids and discussions. We thank the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01. M.W.S. acknowledges a PhD fellowship from the CEA (Irtelis Program).

REFERENCES

1. Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.
2. Santolini, J. 2011. The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: a story of electrons and protons. *J Inorg Biochem* 105:127-141.
3. Boggs, S., L. Huang, and D. J. Stuehr. 2000. Formation and reactions of the heme-dioxygen intermediate in the first and second steps of nitric oxide synthesis as studied by stopped-flow spectroscopy under single-turnover conditions. *Biochemistry* 39:2332-2339.
4. Wei, C. C., Z. Q. Wang, Q. Wang, A. L. Meade, C. Hemann, R. Hille, and D. J. Stuehr. 2001. Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276:315-319.
5. Wei, C. C., Z. Q. Wang, A. S. Arvai, C. Hemann, R. Hille, E. D. Getzoff, and D. J. Stuehr. 2003. Structure of tetrahydrobiopterin tunes its electron transfer to the heme-dioxy intermediate in nitric oxide synthase. *Biochemistry* 42:1969-1977.
6. Wei, C. C., B. R. Crane, and D. J. Stuehr. 2003. Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chem Rev* 103:2365-2383.
7. Wei, C. C., Z. Q. Wang, C. Hemann, R. Hille, and D. J. Stuehr. 2003. A tetrahydrobiopterin radical forms and then becomes reduced during Nomega-hydroxyarginine oxidation by nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278:46668-46673.
8. Crane, B. R., J. Sudhamsu, and B. A. Patel. 2010. Bacterial nitric oxide synthases. *Annu Rev Biochem* 79:445-470.
9. Sudhamsu, J., and B. R. Crane. 2009. Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends in Microbiology* 17:212-218.
10. Adak, S., K. S. Aulak, and D. J. Stuehr. 2002. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 277:16167-16171.
11. Adak, S., A. M. Bilwes, K. Panda, D. Hosfield, K. S. Aulak, J. F. McDonald, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, B. R. Crane, and D. J. Stuehr. 2002. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:107-112.
12. Bird, L. E., J. Ren, J. Zhang, N. Foxwell, A. R. Hawkins, I. G. Charles, and D. K. Stammers. 2002. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. *Structure* 10:1687-1696.

13. Wang, Z. Q., C. C. Wei, M. Sharma, K. Pant, B. R. Crane, and D. J. Stuehr. 2004. A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. *Journal of Biological Chemistry* 279:19018-19025.
14. Beaumont, E., J.-C. Lambry, Z.-Q. Wang, D. J. Stuehr, J.-L. Martin, and A. Slama-Schwok. 2007. Distal Va1346Ile mutation in inducible NO synthase promotes substrate-dependent NO confinement. *Biochemistry* 46:13533-13540.
15. Wang, Z.-Q., C.-C. Wei, and D. J. Stuehr. 2010. How does a valine residue that modulates heme-NO binding kinetics in inducible NO synthase regulate enzyme catalysis? *Journal of Inorganic Biochemistry* 104:349-356.
16. Holden, J. K., S. Kang, F. C. Beasley, M. A. Cinelli, H. Li, S. G. Roy, D. Dejam, A. L. Edinger, V. Nizet, R. B. Silverman, and T. L. Poulos. 2015. Nitric Oxide Synthase as a Target for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemistry & Biology* 22:785-792.
17. Holden, J. K., D. Dejam, M. C. Lewis, H. Huang, S. Kang, Q. Jing, F. Xue, R. B. Silverman, and T. L. Poulos. 2015. Inhibitor Bound Crystal Structures of Bacterial Nitric Oxide Synthase. *Biochemistry* 54:4075-4082.
18. Pant, K., A. M. Bilwes, S. Adak, D. J. Stuehr, and B. R. Crane. 2002. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 41:11071-11079.
19. Crane, B. R., A. S. Arvai, D. K. Ghosh, C. Wu, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, and J. A. Tainer. 1998. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279:2121-2126.
20. Brunel, A., J. Santolini, and P. Dorlet. 2012. Electron paramagnetic resonance characterization of tetrahydrobiopterin radical formation in bacterial nitric oxide synthase compared to mammalian nitric oxide synthase. *Biophysical Journal* 103:109-117.
21. Hurshman, A. R., C. Krebs, D. E. Edmondson, B. H. Huynh, and M. A. Marletta. 1999. Formation of a pterin radical in the reaction of the heme domain of inducible nitric oxide synthase with oxygen. *Biochemistry* 38:15689-15696.
22. Stoll, S., Y. NejatyJahromy, J. J. Woodward, A. Ozarowski, M. A. Marletta, and R. D. Britt. 2010. Nitric oxide synthase stabilizes the tetrahydrobiopterin cofactor radical by controlling its protonation state. *J Am Chem Soc* 132:11812-11823.
23. Stoll, S., and A. Schweiger. 2006. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance* 178:42-55.
24. Santolini, M., M. Roman, D. J. Stuehr, and T. A. Mattioli. 2006. Resonance Raman study of *Bacillus subtilis* NO synthase-like protein: Similarities and differences with mammalian NO synthases. *Biochemistry* 45:1480-1489.
25. Astashkin, A. V., B. O. Elmore, L. Chen, W. Fan, J. G. Guillemette, and C. Feng. 2012. Pulsed ENDOR Determination of the Arginine Location in the Ferrous-NO Form of Neuronal NOS. *Journal of Physical Chemistry A* 116:6731-6739.
26. Flores, M., E. Wajenberg, and G. Bemski. 1997. Temperature dependence of Q-band electron paramagnetic resonance spectra of nitrosyl heme proteins. *Biophysical Journal* 73:3225-3229.
27. Morse, R. H., and S. I. Chan. 1980. Electron paramagnetic resonance studies of nitrosyl ferrous heme complexes - determination of an equilibrium between 2 conformations. *Journal of Biological Chemistry* 255:7876-7882.
28. Radoul, M., M. Sundararajan, A. Potapov, C. Riplinger, F. Neese, and D. Goldfarb. 2010. Revisiting the nitrosyl complex of myoglobin by high-field pulse EPR

- spectroscopy and quantum mechanical calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics* 12:7276-7289.
29. Santolini, J., A. Marechal, A. Boussac, and P. Dorlet. 2013. EPR characterisation of the ferrous nitrosyl complex formed within the oxygenase domain of NO synthase. *Chembiochem* 14:1852-1857.
 30. Schmidt, P. P., R. Kappl, and J. Huttermann. 2001. On the mode of hexacoordinated NO-Binding to myo- and hemoglobin: Variable-temperature EPR studies at multiple microwave frequencies. *Applied Magnetic Resonance* 21:423-440.
 31. Trandafir, F., S. Van Doorslaer, S. Dewilde, and L. Moens. 2004. Temperature dependence of NO binding modes in human neuroglobin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1702:153-161.
 32. Tyryshkin, A. M., S. A. Dikanov, E. J. Reijerse, C. Burgard, and J. Huttermann. 1999. Characterization of bimodal coordination structure in nitrosyl heme complexes through hyperfine couplings with pyrrole and protein nitrogens. *Journal of the American Chemical Society* 121:3396-3406.
 33. Yonetani, T., H. Yamamoto, J. E. Erman, G. H. Reed, and J. S. Leigh. 1972. Electromagnetic properties of hemoproteins. 5. Optical and electron paramagnetic resonance characteristics of nitric-oxide derivatives of metalloporphyrin-apohemoprotein complexes. *Journal of Biological Chemistry* 247:2447-&.
 34. Migita, C. T., J. C. Salerno, B. S. S. Masters, P. Martasek, K. McMillan, and M. IkedaSaito. 1997. Substrate binding-induced changes in the EPR spectra of the ferrous nitric oxide complexes of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* 36:10987-10992.
 35. Giroud, C., M. Moreau, T. A. Mattioli, V. Balland, J. L. Boucher, Y. Xu-Li, D. J. Stuehr, and J. Santolini. 2010. Role of arginine guanidinium moiety in nitric-oxide synthase mechanism of oxygen activation. *J Biol Chem* 285:7233-7245.
 36. Wang, Z. Q., C. C. Wei, and D. J. Stuehr. 2002. A conserved tryptophan 457 modulates the kinetics and extent of N-hydroxy-L-arginine oxidation by inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277:12830-12837.
 37. Wei, C. C., Z. Q. Wang, and D. J. Stuehr. 2002. Nitric oxide synthase: use of stopped-flow spectroscopy and rapid-quench methods in single-turnover conditions to examine formation and reactions of heme-O₂ intermediate in early catalysis. *Methods Enzymol* 354:320-338.
 38. Rosenfeld, R. J., J. Bonaventura, B. R. Szymczyna, M. J. MacCoss, A. S. Arvai, J. R. Yates, 3rd, J. A. Tainer, and E. D. Getzoff. 2010. Nitric-oxide synthase forms N-NO-pterin and S-NO-cys: implications for activity, allostery, and regulation. *J Biol Chem* 285:31581-31589.

FOOTNOTES

The abbreviations used are: Arg, L-arginine ; EPR, Electron Paramagnetic Resonance ; Fe^{II}NO, ferrous heme-nitrosyl complex; Fe^{II}O₂, ferrous heme-oxygene complex ; Fe^{III}NO, ferric heme-nitrosyl complex ; H₄B, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin ; HS-5c, high-spin hexa-coordinated iron; KPi, inorganic phosphate buffer ; NO, nitric oxide; NOHA, N^ω-hydroxy-L-arginine ; NOS, nitric oxide synthase ; NOS_{oxy}, oxygenase domain of NOS ; bacNOS, bacterial NOS-like proteins; eNOS, endothelial nitric oxide synthase ; iNOS, inducible nitric oxide synthase ; mNOS, mammalian nitric oxide synthase ; nNOS, neuronal nitric oxide synthase ; bsNOS, NOS-like protein isolated from *Bacillus subtilis*; CPET, concerted proton electron transfer.

Supporting Material

for

Revisiting the Ile/Val mutation in mammalian and bacterial NO-Synthases: a spectroscopic and kinetic study.

Marine Weisslocker--Schaetzel, Mehdi Lembrouk, Jérôme Santolini and Pierre Dorlet*

From: Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91198, Gif-sur-Yvette cedex, France

Running title: *Ile/Val mutation in bsNOS and iNOS*

* To whom correspondence should be addressed: Pierre Dorlet, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91198, Gif-sur-Yvette cedex, France. Fax: (+33)-1-69088717; E-mail: pierre.dorlet@i2bc.paris-saclay.fr

EPR spectra of ferric NOS in presence of NOHA and cofactor

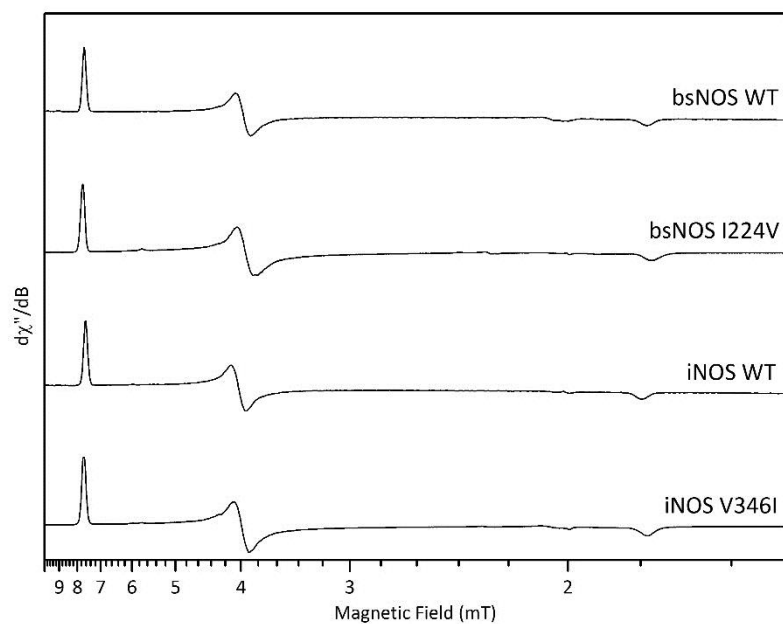


FIGURE S1 EPR spectra of native ferric NOS for WT and mutants of iNOS and bsNOS with saturating concentrations of NOHA and cofactor. Spectra have been scaled independently for display. Typical experimental conditions: microwave frequency 9.5 GHz, microwave power 1 mW, field modulation amplitude 2 mT, field modulation frequency 100 kHz, T 10 K.

EPR Spectra of {FeNO}7 in the presence of H₄B only

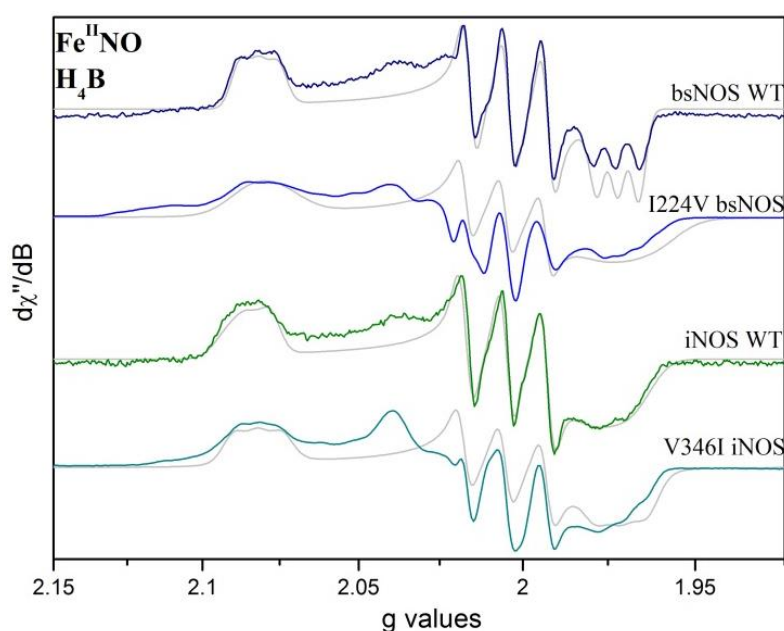


FIGURE S2 EPR spectra of the {FeNO}⁷ NOS for WT and mutants of iNOS and bsNOS with their simulations (grey), with no substrate and saturating concentrations of cofactor. Typical experimental conditions: microwave frequency 9.5 GHz, microwave power 0.25 μ W, field modulation amplitude 0.5 mT, field modulation frequency 100 kHz, T 10 K.

TABLE S1 Parameters obtained from the simulation of the EPR spectra in Figure S2. A values (hyperfine coupling for the nitrosyl nitrogen) given in MHz.

	+H ₄ B					
	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
bsNOS WT	2.082	2.004	1.972	28	55	29
bsNOS I224V	2.079	2.005	1.972	29	57	33
iNOS WT	2.084	2.005	1.974	30	58	36
iNOS V346I	2.084	2.005	1.972	26	55	34

Stopped-flow

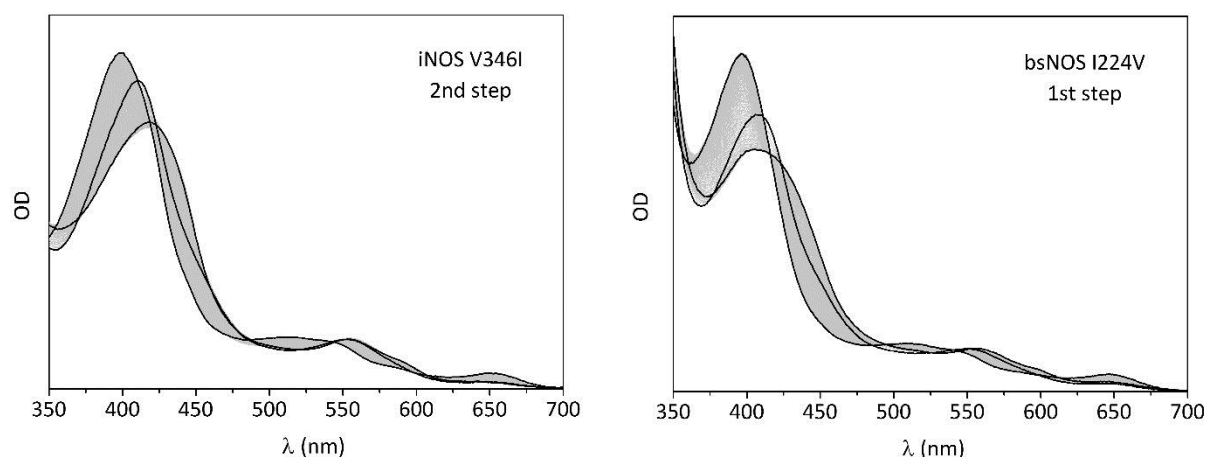


FIGURE S3 Stopped-flow spectra measured upon mixing a solution of reduced iNOS V346I saturated with NOHA and H₄B (left panel) or reduced bsNOS I224V saturated with L-Arg and H₄B (right panel) with an air saturated buffer at 4°C. Black traces have been selected to show the initial state (Fe^{II}, λ_{max} 412 nm), the final state (Fe^{III}, λ_{max} 396 nm, 4.50 s for left panel and 2.25 s for right panel) and the maximum of formation of the main intermediate (left panel Fe^{III}NO λ_{max} 438 nm 252 ms; right panel Fe^{II}O₂ λ_{max} 426 nm 42 ms).

Annexe 6

**The very first plant NOS-like protein is a
genuine NO synthase**

The very first plant NOS-like protein is a genuine NO synthase

Marine Weisslocker-Schaetzel, François André, Nabila Touazi, Mehdi Lembrouk, Pierre Dorlet, Annie Frelet-Barrand, Lorenzo Lamattina[#] and Jérôme Santolini[§]

Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Bât 532 CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette cedex, France

[#]

[§] Corresponding author: Santolini Jérôme, Ph.D. *Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, iBiTec-S and CNRS UMR 9198, CEA Saclay - 91191 Gif-sur-Yvette Cedex - France.* Tel: +33-1-69-08-53-63; Fax: +33-1-69-08-87-17; E-mail: jerome.santolini@cea.fr

Running title: Structural and functional characterization of OtNOS oxygenase domain reveals very efficient NO producing.

Abbreviations: Arg, L-arginine; H₄B, tetrahydrobiopterin, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin; NO, nitric oxide; NOHA, N^ω-hydroxy-L-arginine, NOS, nitric oxide synthase; NOSoxy, oxygenase domain of NOS; iNOS, inducible nitric oxide synthase;

Keywords: NO synthase, plant, algae, catalysis,

Subdivision: Enzymes and catalysis.

SUMMARY

NO-Synthases have long been considered only as the source of NO in mammals. In the last ten years, number of sequenced genomes has exploded, revealing the presence of NOS throughout the tree of life and uncovering an extraordinary diversity of genomic structure and biological function. Although NO has been shown to be a crucial mediator in plant physiology, no NOSs have been identified so far in terrestrial plant genomes. NOSs sequence seem present solely in green algae genomes, with a first identification in the phytoplankton *Ostreococcus tauri*. The presence of a NOS in this early-diverging branch of the green lineage questions what for this pico-algae, unlike most of the plants, have conserved such an enzyme over hundreds of millions of years. To apprehend the potential biological function (and selection gain) of algae NOS, we cloned, expressed and characterize the model NOS from *Ostreococcus tauri* (OtNOS). Using multiple sequence alignments, we launched a phylogenetic analysis of algae NOSs, and achieved a 3D model of OtNOS by homology modelling. We used a combination of various spectroscopies to characterize the structural and electronic fingerprints of various OtNOS reaction intermediates. The analysis of OtNOS catalytic activity and kinetic efficiency was achieved by stoichiometric stopped-flow. The integration of these results highlight the conserved features but also the particularities of OtNOS structure that might explain why OtNOS is an ultrafast NO producing enzyme. This integrative Structure-Catalysis-Function approach could be extended to the whole NOS superfamily to identify the structural features that determine NOS family functioning and predict for any new NOS a set of potential biological activity.

INTRODUCTION

Nitrogen monoxide (NO°) is an extremely reactive radical molecule that has long been considered as a toxic, polluting and harmful gas (ref). A few decades ago, the biological history of NO° unfolded thanks to the discovery of its central role in the regulation of mammalian vascular tone (ref Nobel). The biological source of NO was identified soon after as being three different isoforms of a family of enzymes, named NO-Synthases. Despite significant differences (histological and subcellular localization, expression profiles, catalytic regulation [1-3]) these isoforms were found to share the same quaternary organization, the same crystallographic structure of their catalytic site and the same catalytic mechanism. If NO has become a ubiquitous signaling molecule regulating many physiological processes such as neural communication, cell cycle, metabolism [4], a considerable part of NOS/NO biochemical history remains related to the cytotoxic reactivity of NO and the utilization of NO and Reactive Nitrogen Species (RNS) in the non-specific immune response [5]. Today, because of the complexity of NO biological chemistry, it is becoming more and more difficult to account for the multiple functions of NOS and NO (from signaling to oxidative stress) and to understand the paradox of NOSs that are at the same time the support of essential physiological functions and the source of numerous pathological conditions [6].

The presence of hundreds of NOS throughout the Tree of Life (ref ?) has added another layer of complexity. Indeed, NOSs have been found in all kingdoms of life, in archaea, bacteria, fungi, insects, crustacean, fishes... [7-11]. As the predominant paradigm of the NO field is mostly based on the relation “NOS → NO → Signaling”, these new NOS were *a priori* assigned the same catalytic functioning and the same biological function, namely producing NO and mediating signals [4]. Though, these NOSs have been poorly characterized in comparison with their mammalian counterpart and only a few NOSs from drosophila [12, 13], amoeba [9, 14] and bacteria [15-23] have been investigated.

Since the late 90s, NO has emerged as a major signaling molecule in plants [24], involved in processes as diverse as plant immunity [25], systemic acquired resistance [26], growth and development [27], N₂-fixing symbiosis tuning [28], or abiotic stresses response [29]. If NO was shown to interact with other signaling molecules, including ROS, Ca²⁺ and hormones such as salicylic acid and abscisic acid, the precise ways of its biological activity remain to be established [25]. The source of NO production has been and remains also a matter of debate [30, 31]. Because of the central role of NO, the discovery of a NOS-like protein in *Arabidopsis thaliana* [32] [33, 34]Crawford) was an anticipated result. However, the analysis of the genome of *A. thaliana* and later of those of other plants led to the surprising conclusion that there were no mammalian-like NOSs in plants. Today the actual source of NO, the nature of the substrate (L-Arg, nitrite, polyamines...) and of the signal trigger (Ca²⁺, ROS...) still remains to be determined [35-39].

In this very context, the laboratory of Lamattina spotted in 2010 the presence of a NOS-related sequence [8] in the genome of the microalgae *Ostreococcus taurii* [40]. *Ostreococcus* belongs to the class of the mammeliophyceae¹, an early-diverging branch (at least 700 million years ago) from the green plant lineage. This picophytoplankton is the smallest eukaryote found to date. It bears a small and compacted genome, with only one mitochondria and one chloroplast. Its broad diffusion corresponds to various ecological niches from coastal to oligotrophic waters, from deep-sea to high-irradiance exposure. . NOSs have been also detected in other species from this taxon including *Ostreococcus lumarinus* and *Bathycoccus prasinos* [7]. More recently, using the 1000 Plants (1KP) international multidisciplinary consortium's transcriptome database (www.onekp.com/), Wendehenne and colleagues showed that NOSs were to be found in many other species throughout the various classes of algae [41]. NOSs sequence was even found in the fresh-water algae *Chaetosphaeridium globosum*, a member of the Coleochaetophyceae class, a class that is the closest branch to terrestrial plants. Since no NOS sequence could be found in land plants, the question then arises as to why these various algae, and especially those that have experienced a strong compaction genome, have conserved this enzyme throughout evolution. Is there any ecological specificity to this organism that required NOS and its beneficial activity? Which biochemical activity NOS is supposed to play in these organisms, and is it related to the catalytic production of NO like in animals?

The characterization of algae NOS biological activity is the first necessary step to apprehend these questions, with *Ostreococcus* as the best-suited model. The first functional characterization confirmed that NO production in *O. tauri* was OtNOS- and L-Arg dependent and was shown to increase under high light irradiance, suggesting a role of OtNOS in the repair or the defense against photo-induced oxidative damage [8]. More recently, Foresi and colleagues transformed *A. thaliana* plants with OtNOS and observed an increased NO production in relation with a greater resistance to water stress [42]. At this stage, the deciphering of OtNOS biochemistry is required to go further into NOS biological chemistry. In this regard, we present here our first results on OtNOS structural and functional characterization. Using a combination of spectroscopies and fast kinetics, we comparatively analyzed OtNOS catalytic and kinetic efficiency, its interaction with ligand, substrate and cofactor, and its capacity to produce NO. If OtNOS appears as a genuine NOS, with similar spectroscopic fingerprints to mammalian NOSs and high capacity of NO production, some data still raise the question of its actual functioning and biological role in vivo.

¹ http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=T6f1f7ac43489a845

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bioinformatics and computational

All NOS protein sequences were extracted from NCBI by similarity search from either OtNOS or *mus musculus* iNOS sequences. For phylogenetic analysis, 39 full-length sequences of NOSs representative of the genetic diversity of this family of proteins were selected (see Figure 1 legend). Phylogenetic trees were computed through Seaview 4.5 graphical interface using PhyML algorithm, and the figures produced by FigTree.

Jalview 2.8 software was used to generate various multiple sequence alignments. Different algorithms were applied (ClustalW, Muscle, Probcons) and compared. By assessment with the three-dimensional structures of mammal and bacterial NOSs available in PDB, the PROBCONS alignment was considered and further used for phylogeny and homology modeling procedures.

For homology modeling procedure, the set of NOS sequences used for phylogenetic analysis was restrained to a subset of 16 sequences including the 3 algal species, 3 cyanobacteria, 3 mammalian, 3 bacterial, 1 fungal, 1 insect, 1 mollusk, and 1 diatom sequences. This subset was set up for anchoring precisely the NOS oxygenase domains, that appeared to be well-conserved in the multiple alignment. The oxygenase domains sequences of algal NOSs were then extracted from the PROBCONS multiple alignment based on the overlap with the well-characterized iNOSoxy domain (segment 127-494 in *mus musculus* iNOS residue numbering). Among the 16 species of the subset, 5 have been crystallized and structurally determined. This allowed refining the PROBCONS alignment by manual adjustment (see Figures 2 and S1).

The three-dimensional model of *Ostreococcus tauri* NO-synthase oxygenase domain was rebuilt using the homology modeling suite Modeller (9v14) with 1NOD PDB structure as template (chain A). The Cys49-Lys434 domain of OtNOS was rebuilt from the alignment with the segment Cys109-Gln496 of 1NOD chain A structure. The cofactors HEM and H4B, and the substrate ARG have been included in the pairwise alignment, for rebuilding an OtNOS model in the catalytical state. The validated pairwise sequence alignment used as input for Modeller is the same as that displayed Figures 2 and S1, by extracting lines 4 (*Mus*) and 5 (*Ostreococcus*) from the multiple alignment. Runs of 100 models were performed with a further loop refinement protocol, and the generated models sorted by the MODELLER objective function were evaluated by their DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) and GA341 scores calculated by Modeller. The best models corresponding to the lowest DOPE score and best objective function issued from each run were pooled and submitted to the online metaserver SAVES (Structural Analysis and Verification Server (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES>),

and finally to the QMEAN scoring function server (<https://swissmodel.expasy.org/qmean>) for model quality assessment. The final model was the best one according to a good compromise between the scores calculated by the SAVES server scoring programs and the QMEAN value. As a result, the selected OtNOS structural model had a DOPE score of -41721 and QMEAN score equal to 0.690, which is a good when compared to the QMEAN scores of individual iNOS PDB templates. Other mono-template 3D models were rebuilt with various mammal and bacterial structures available in PDB, and the 1NOD template gave the best DOPE and QMEAN scores.

Cloning and expression of OtNOSoxy

Molecular cloning of *Ostreococcus tauri* NO-Synthases. The *Ostreococcus tauri* full-length NOS (OtNOS) coding DNA sequence was synthesized, sequenced, and cloned into pUC57 using *Xba*I and *Xho*I enzymes [8]. The cDNA fragment corresponding to the oxygenase domain (1-437 AA) has been amplified by PCR in order to subclone the *Nde*I-*Bam*HI fragment into pET15b vector. All PCR fragments and plasmids were verified by sequencing. All cloning steps were performed into *E. coli* strains DH5 α . After sequencing, constructions were used to transform Rosetta (DE3) *E. coli* strains, more suitable for high protein expression[43].

Expression and purification of the oxygenase domain of OtNOS (OtNOSoxy). OtNOSoxy was overexpressed and purified as previously described [44, 45]. OtNOSoxy was expressed in *E. coli* cultures of terrific broth containing 125 mg/L ampicillin. Protein expression was induced by adding 1 mM isopropyl- β -D thiogalactoside, and the cultures were supplemented with 500 μ M -aminolevulinic acid. After 72 h of growth at 20 °C, the cells were harvested by centrifugation at 6000 rpm for 20 min at 4 °C. After one cycle of freeze (-80°C)-thaw, bacteria were resuspended in ice-cold lysis buffer (0.04 M Tris-HCl, pH7.4, 10% glycerol, 0.25 M NaCl) containing 1 mg/mL lysozyme, 0.5 μ g/mL each leupeptin and pepstatin, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), Pefabloc (0,120 μ g/l) and 50 U/mL DNase I (bovine pancreas type IV, Sigma) with or without 10 μ M H₄B in ascorbic acid and 10 mM L-arginine.

Cells were lysed using a continuous-flow Cell disruption equipment (Constant Systems Ltd, United Kingdom). The lysate was centrifuged at 16,000 rpm for 45 min at 4 °C. The supernatant was mixed with Ni-Nta resin (Novagen) equilibrated with MCAC buffer (0.04 M Tris-HCl, pH7.4, 10% glycerol, 0.15 M NaCl, 1 mM PMSF) in the presence or absence of 10 μ M BH₄ and 10 mM L-arginine. Resin was stacked into a column and washed with 5 volumes of MCAC buffer and 5 volumes of MCAC Buffer supplemented with 60 mM imidazole. Bound protein was eluted with MCAC buffer containing 300 mM imidazole. Column fractions were pooled and concentrated using Centriprep (10 units) (Millipore, Bedford, MA).

Samples preparation

Samples were reconditioned in a 100mM KPi buffer, pH 7.4, 10% glycerol, 150 mM NaCl in the presence of different combinations of Arg (5 or 10 mM) and/or BH₄ (100 µM to 1 mM in 3 mM DTT) by three successive cycles of dilution/centrifugation in the final buffer using MicroCon membrane concentrators with a 30 kDa cut-off (Millipore). Anaerobic ferric NOS (Fe^{III}) was first prepared by 100 cycles of alternate vacuum and argon refilling over 20 minutes, directly in a quartz EPR tube (EPR experiments) or in a quartz cuvette (UV-visible spectrometry), both sealed with air-tight rubber septa. Ferrous samples (Fe^{II}) were obtained by reduction of Fe^{III} NOS with the addition of a small volume of dithionite solution (5–100 mM). Ferrous heme-CO (Fe^{II}CO) and heme-NO samples were then obtained by flushing CO/NO gas directly inside the EPR tube (or the cuvette) for 10 min to ensure CO/NO saturation of the solution and complete CO/NO binding. All UV-visible spectra were recorded at room temperature on an Uvikon XL spectrophotometer (Serlabo, Entraigues sur la Sorgue, France).

EPR characterization

OtNOSoxy ferric heme (Fe^{III}) and ferrous heme-NO (Fe^{II}NO) complexes were directly conditioned in a XXX EPR tube. 9.4 GHz EPR (X-band) spectra were recorded on a Bruker Elexsys 500 X-band spectrometer equipped with a standard TE cavity (Bruker), a continuous-flow ESR 900 cryostat and an ITC504 temperature controller (Oxford Instruments, Abingdon, UK). Spectra were recorded at 10K (Fe^{III} OtNOS) or 40K (Fe^{II}NO OtNOS) with optimized conditions of power and amplitude modulation. The absolute magnetic field was calibrated by using a manganese manganese-doped magnesium oxide standard (40). The absolute error in g was 10⁻⁴. However, the relative accuracy was better than 2 × 10⁻⁵ in g. Simulations were performed with the Easyspin software package and routines written in the lab. The EPR parameters used for the simulations are reported in the corresponding tables.

Stoichiometric Stopped-flow

OtNOSoxy (30-40 µM) were conditioned in a buffer (0.1M KPi pH 7.4, 10% glycerol), containing the substrate (Arg 5mM or NOHA 500µM) and cofactor (BH₄ 500µM), by 3 to 5 dilution/concentrating cycles. Anaerobic Fe^{III} NOS was then obtained by 100 cycles of alternate vacuum and argon refilling, directly into a quartz cuvette. This sample was diluted with anaerobic conditioning buffer, using a gas-tight syringe, to a final NOS concentration of about 20-25 µM. Fe^{III} NOS was reduced to Fe^{II} NOS using a freshly prepared anaerobic solution of sodium dithionite (32mM). The reduction was followed by UV-visible spectroscopy to ensure the complete reduction of the protein and avoid dithionite excess.

The rapid-mixing stopped-flow experiments were performed at 4 °C on a Bio-Logic SFM 300 instrument customized for anaerobic and semianaerobic experiments and connected to a Tidas 1024-diode array detector able of recording spectra every 3 ms. One SFM syringe was first washed with dithionite to scavenge any residual oxygen and then with anaerobic buffer (0.1M KPi pH 7.4, 10% glycerol) to remove excess dithionite. The Fe^{II} NOS samples were transferred to the SFM anaerobic syringe and rapidly mixed with air-saturated buffer (0.1M KPi pH 7.4), in a 1:1 ratio, at 4°C. The reaction was monitored using a diode array detector that allows the recording of one spectrum every 3ms. Kinetic analyses were achieved using the SFit routine (Bio-logic) and by directly simulating the kinetic traces to multi-exponential functions (Origin 8.0 ©).

RESULTS

Phylogenetic tree of NOS including algae NOSs

We first achieved a phylogenetic analysis of 40 proteins from the NOS family that included three microalgae NOSs (namely *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus* and *Bathycoccus prasinus*), the four studied mammalian NOSs and various NOSs from archaea, bacteria, cnidarian, porifera, molluscs, arthropods, insects, fishes, amphibians and reptiles (Fig. 1)... The distribution of metazoan NOS matches the standard evolution tree of this Phylum (Fig. 1, mark 1). However, algae NOSs seem to follow a singular evolution path (Fig. 1 mark 2), disconnected from that of metazoan but also from that of bacteria (Fig. 1, mark 3). This suggests an ancient separation of these branches and a long evolution drift of OtNOS. The origin of NOS in algae might neither be related to NOS in cyanobacteria nor to NOS from metazoan. In this regard, the closest NOS to algae NOSs is from the marine, planktonic diatom *Thalassiosira oceanica*, another photosynthetic organism

Comparative Alignment of OtNOS oxygenase sequence with bacterial and mammalian NOSs

We then performed a sequence alignment using the sequences of the three algae NOSs against a selection of NOSs representative of the phylogenetic diversity (Fig. 2). We chose the three mammalian canonical NOS (nNOS from *Rattus norvegicus*, iNOS from *Mus musculus* and eNOS from *Bos bovis*), the three most studied bacterial NOSs (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*) and three cyanobacterial NOS that present a full-length NOS structure (*Synechococcus* sp PCC7335, *Crinalium epipsamum*, *Nostoc* sp PCC 7107). For comparison purpose, we added the NOSs from *Thalassiosira oceanica*, from an amoeba (*Physarum polycephalum*), from a crustacean (*Crassostrea gigas*) and from an insect (*Drosophila melanogaster*).

Two types of alignments have been performed: either with full-length proteins or with only the oxygenase domains, with native bacterial NOSs and the truncated forms for the other NOSs. Both approaches led to the same results (not shown). As reported in previous articles [7, 8], OtNOS displays most of the characteristic domains of a NO-Synthase: a reductase domain, an oxygenase domain, connected via a Ca-binding domain. When focusing on the oxygenase domain (Figure S1), that harbors NOS catalytic site, we globally observe a weak homology between OtNOS and NOSs from other clades (between 34.65 and 43.96 % of identity). If the overall alignment shows a weak similarity, it appears concentrated in zones that are crucial for NOSs structural properties. This is illustrated by the conservation of residues that constitute the catalytic core of the oxygenase domain. Figure 2 highlights the similarity and differences between the sequences of OtNOS and iNOS in the case of the global alignment. **L-Arg. Binding.** Most of the residues involved in Arg binding or in the substrate access channel [46] are conserved (Fig. 2A), in particular Glu 371/306 and Trp 366/301 (that form H-bond with

both L-Arg nitrogens) and Q257/189, Y367/302 (H-bond with the carboxylate terminal). The only modification we noticed is the conversion of Asp376 (iNOS) into Asn311 (OtNOS) that is also observed in eNOS, bsNOS and dmNOS and might not have significant structural impact.

Dimer interface. Many parts of NOS sequence that contribute to its dimerization are missing (Fig S1). The N-terminal hook that contains residues essential in monomer/dimer equilibrium [47, 48] is completely absent from OtNOS sequence. So is the Zn/pterin binding domain. In particular the CxxxxC motif that is found in all eukaryotic NOSs (here amoeba, insect and molluscs) is replaced by a CxxxC motif (Fig S1) suggesting an impeded ability to build a Zn-tetrathiolate cluster. Likewise the CTer region of the oxygenase domain is much less conserved with an obvious insert in the helical lariat at the level of the β 12a β -strand and the absence of the β 12b β -strand. G464 is replaced by a Ser399, which unlike the Proline in bacterial NOS, might not provide additional hydrophobic contact and contribution to dimer interface.

Heme pocket. We observe a strong identity of the hydrophobic residues that surround the heme (344-346 and 363-372 for iNOS, and 279-281, 298-307 for OtNOS). It is to be noted that OtNOS conserved a Valine residues at position 281, which is the landmark of the capacity of efficiently releasing NO [21, 49-51]. The isoleucine observed at that position for bacterial NOSs slows down NO release by two orders of magnitude [21, 50]. The other key-residues of the catalytic core are conserved, such as W188/119, F363/298 and the heme binding Cys194/125. Although the 448/449 residues (383/384 in OtNOS) are conserved, we observed strong variations in sequences in the C-terminal region in particular with a 3-residues insert in the helical lariat (483-485), which is believed to modify the exposed heme edge.

Pterin. Binding. As noticed here-above, The N-terminal hook that is involved in pterin binding [47, 52] and the N-terminal pterin binding region are absent from OtNOS sequence, alike what is observed for bacterial NOSs [53]. Other major variations in residues involved in pterin binding are observed, such as His440 (W375), Met441 (Y376) and Ile456 (Lys391) and again the region 470-474 (iNOS) that experiences a 3-residue insert. Also the major residues involved in BH4 binding in iNOS are conserved (R375/310, W455/390, W457/392, [54] these changes suggest strong changes in the pterin cofactor binding.

Although OtNOS shares the same percentage of identity with mammalian and bacterial NOSs (37-38%) it seems to exhibit more of the required structural elements that are necessary to preserve NO producing ability. We investigated this structural similarity by generating a 3D model of the oxygenase domain of OtNOS by Homology Modelling.

Structural analysis of OtNOS oxygenase domain

This model was generated using Modeller9v12 with the crystallographic structure of iNOSoxy in the presence of L-Arg and BH4 (PDB 1NOD) as template (see Experimental procedures [55, 56]). The overall structure shows the same global architecture, a central winged β -structure surrounded by alpha-helices looking like a baseball catcher's mitt ([57], Figure S2);

L-Arg. Fig. 3A displays the 3D of the heme pocket in OtNOS model. Connolly surface generated for residues surrounding L-Arg reveals a tight constrained, binding niche for L-Arg similar to the one observed for iNOSoxy [46] and bsNOS [53]. Indeed, as mentioned above, apart from the N376-D311 conversion, all residues involved in L-Arg binding most of the H-bonding and electrostatic interactions between L-Arg and its vicinal residues were conserved (Fig S3). The H-bond distances between L-Arg guanidinium moiety and the vicinal residues Glu306 and Trp301 were observed at 2.66 and 2.82 Å between the Glu306 carboxylate oxygen and the guanidinium N ω and N ϵ Nitrogens and 3.01 Å between the Trp366 carbonyl oxygen and the guanidinium N ϵ Nitrogen (2.72, 2.77 and 3.07 Å observed for iNOS 1NOD structure). Some differences were observed in the amino-acid side of L-Arg (Fig S3). Although the measured distances between Q189, Y276, Y302, E306 and L-Arg amine and carboxylate are similar (Fig; S3), the N376-D311 conversion has moved the carbonyl moiety more than 3 Å away from L-Arg closest oxygen atom, suggesting some potential changes in L-Arg anchoring in the distal heme pocket.

Heme The superimposition of the major residues in interaction with heme in iNOSoxy and OtNOS (Fig. 3B) suggests a strong similarity between the two heme pockets. Although some key-residues are modified (for example S236vsV167, R193vsK124 and Q199vsY130), all OtNOS and iNOSoxy residues are superimposable (Fig. 3B). The residues forming the hydrophobic core of the heme pocket are strictly conserved, in particular V281 that tunes NO off-rate (Fig 3B). This suggests a strongly conserved architecture of the heme distal and proximal environments. This is not the case when it comes to entry of the access channel (Fig. 3C). Some major differences are observed: i) the absence of the N-terminal hook (red β -strands), ii) a three-residues insert (406-408) that might disorder the end of the α 11-helix, iii) major differences in the residues surrounding the exposed edge of the heme such as W375/Y376 (instead of H440/M441), K391 (for W456) and L420/G422 (for Y483/Y485) (Fig. S4). The modifications of the residues located at this interface, along with the opening of the channel access, might affect the dimerization process and the interaction with cofactors, among them the pterin cofactor.

Pterin. We thus looked at the residues of OtNOSoxy that are in interaction with the pterin. The absence of the N-terminal hook, of the N-terminal H4B binding region (in particular Ser112) and of the 3-residue insert in the helical lariat, might modify the dimer interface and affect the binding of the hydroxypropyl sidechain of the pterin cofactor. However, Tyr405 that stands just before the insert and Trp390 seem to adopt the same conformation as their corresponding residues Phe470 and Trp 455 in iNOS (Fig. S4), which suggest that the helical lariat might still lock BH4 binding pocket. The network of H-bond interaction of BH4 with the other residues is conserved is globally conserved (Fig. 3D). However we noticed a few modifications such as an Ile456-Lys391 conversion, a small tilt of the Trp392 (that might weaken the π -stacking) and the displacement of the Arg310 guanidinium more than 2.5 Å away

from BH4 carbonyl oxygen, strongly weakening this crucial H-bond. In general, changes in OtNOS sequence seem to lead to a looser and more open BH4 binding pocket.

Spectroscopic characterization of native OtNOSoxy

otNOSoxy was overexpressed and purified as described previously (Foresi, Ghosh, experimental Procedures). We first recorded the UV-Visible absorption spectra of OtNOSoxy. The protein purified in the presence of L-Arg and BH4 seems to fold into a functional quaternary structure characterized by a pure high spin five-coordinated (HS-5c) native complex with a Soret band maximum at 395 nm (Fig 4A, solid line) that is identical to the ones obtained for bacterial and mammalian NOSs in the same condition [58-60]. A contrario, the enzyme purified in the absence of substrate and cofactor exhibits a broad Soret peak with an absorption maximum around 407nm (Fig. 4A, dotted line), corresponding to mixture of low spin six-coordinated (LS-6c) and high spin five-coordinated (HS-5c) species, suggesting and uncomplete folding of OtNOSoxy into a tight dimer [45, 61, 62]. The presence of LS-6c species has been already reported for some bacterial (deiNOS) and mammalian (iNOS) NOSs in the absence of substrate and cofactor. The addition of saturating concentrations of L-Arg and BH4 seems to induce a complete conversion of the Ls-6c species into HS-5c species, leading to a UV-Visible absorption spectrum (Fig. 4A dash line) similar to the one obtained for the pure HS-5c complex. This suggests that substrate and cofactor are required to promote the folding of OtNOS into a functional conformation, alike what has been proposed for the inducible NOS [63-65].

In this conformation, OtNOSoxy is easily reduced in anaerobic conditions by addition of small amount of dithionite (Fig. 4B, dash lines; see Experimental Procedures). Addition of small amount of NO-saturated solution leads to the build-up of a ferrous heme-NO complex with an absorption maximum around 436 nm and a broad band in the α/β region, fingerprints that are characteristic of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ complexes of mammalian NOSs (Fig. 4B, dotted lines). These two intermediates of NOS catalysis show the same spectroscopic fingerprint for OtNOS compared to mNOSs. This is not the case for ferrous heme-CO complex. Fig. 4C shows the UV-visible absorption spectrum of OtNOSoxy $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex in the presence or absence of substrate and/or cofactor. $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex were obtained by gentle CO flushing of reduced OtNOSoxy (see Experimental Procedures). In the absence of substrate and cofactor, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ species corresponds mostly to a 5-coordinated (5c) complex (absorption maximum around 422 nm), with a negligible fraction of 6-coordinated (6c) species (Soret at 44nm; Fig. 4C), indicating the loss of the proximal thiolate ligand (ref). If the addition of saturating concentrations of BH4 does not modify the UV-visible spectrum of OtNOSoxy $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ species, the binding of L-Arg slightly modifies the 5c/6c equilibrium and increases the fraction of 6c $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex (Fig. 4C, violet, red and blue lines respectively). In any cases, this fraction remains minor at pH7.4 and a significant percentage of 6c $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex was to be observed only at pH 9 (Fig. 4C,

orange). This suggests that the proximal ligation of OtNOS complexes that is essential for NOS proper catalysis [20, 65] is more fragile.

We observed the same transition by EPR spectroscopy (Fig. 5A, see experimental procedures). In the absence of substrate and cofactor, native OtNOS exhibits a Low-Spin EPR spectrum, well resolved, suggesting an absence of mixture between various LS-species. The simulation of the experimental spectrum (grey line, see experimental procedure) leads to g values that are similar to the ones reported for water-bound iNOS LS-6c (Table 1, [66, 67]). The addition of substrate (NOHA or L-Arg) and cofactor (BH₄) induces an almost complete transition towards a High-Spin species (Fig. 5a). The simulated spectra (grey lines) are once again perfectly superimposable to the experimental ones, with g values that indicate a slightly more anisotropic complex with an EPR fingerprint more closely related to that of bsNOS (Table 1). Likewise, the EPR spectrum of OtNOS Fe^{II}NO is well defined with the hyperfine coupling because of the nitrogen nucleus (¹⁴N, I=1) of NO, well resolved on the central g value. The simulated spectra of the rhombic form (grey lines, ref) reveals g values and coupling constants similar to those reported for bsNOS and iNOS Fe^{II}NO complexes, with however a slightly more anisotropic complex (Table 1).

Functional characterization of OtNOSoxy

NOSs catalyze two successive steps, L-Arg and NOHA oxidation, that harbor different chemistry. Ability of OtNOS to catalyze L-Arg oxidation and release NO using stopped-flow kinetics coupled to UV-visible absorption spectroscopy in stoichiometric conditions (see Experimental Procedures). Ferrous OtNOSoxy complexes were rapid-mixed with an air-saturated buffer in the presence of BHA and L-Arg (first oxidation step) or NOHA (second oxidation step). Heme transitions were subsequently monitored and kinetics were analyzed by global analysis (see Experimental Procedures). Figure 6A shows the superimposed spectra for the first catalytic reaction (L-Arg hydroxylation) recorded over the first 500 ms, highlighting the transition from ferrous (Soret band at 412 nm) to ferric OtNOS (Soret band at 398 nm and charge-transfer band around 650 nm). Kinetic traces at 650 nm depict the recovery of native HS ferric OtNOS (Fig. 6A, inset). The global analysis routine (Biologic SFIT software ©, see experimental procedures) was based on a single transition (Scheme 2, equation 1) and leads to the identification of the very same complexes (ferric and ferrous heme OtNOSoxy) with similar UV-vis fingerprints. The kinetic analysis of these complexes leads to Fe^{III} build-up and Fe^{II} decay rates around 14 s⁻¹. These rates are similar to the ones by simulating the time traces at 650 nm to a mono-exponential function (14.1 +/- 0.3 s⁻¹, not shown). We achieved the same experiment for the second catalytic step in the presence of saturating concentrations of NOHA. Figure 6B shows additional transitions with an increased absorption between 420 and 460 nm. This new band reflects the transient build-up of ferrous heme-O₂ (Soret around 428nm, ref) and ferrous heme-NO complexes (Soret around 440 nm; See Scheme 2, equation 2). Time traces show the initial decay of absorption at 395 nm (disappearance of ferrous heme) followed by

ferric heme recovery after reaction completion (Fig. 6D Inset). Similarly, time traces at 442 nm show the fast build-up of a ferrous heme-NO intermediate, followed by its slow decay linked to NO dissociation. We simulated these time traces to a biexponential function corresponding to two steps: Oxygen activation and NO dissociation (Scheme 2, equation 2). The simulation of the 395 nm kinetics leads to rate constants around $200 \pm 16 \text{ s}^{-1}$ (Fe^{III} decay) and $33 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ (Fe^{III} recovery). Symmetrically, simulation of the 442 nm time traces leads to a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ build-up rate at $182 \pm 13 \text{ s}^{-1}$ and a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ decay rate at $45 \pm 10 \text{ s}^{-1}$. The cross-sections do not allow to discriminate between $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ absorption changes. The rate of the 442 nm absorption increase (and 395nm decay) thus only reflects a global catalytic rate that includes two steps: O_2 binding and activation. However, Fe^{III} recovery at 395 nm (and 442 nm decay) is a more accurate landmark of NO dissociation rate.

We also achieved global analysis of the NOHA oxidation kinetics using SFIT protocol (see Experimental Procedure). We first try to use a 4-species model (Scheme 2 equation 3) but the calculation did not converge towards significant intermediates and lead to inappropriate spectra. We repeated the analysis with a 3-species model (Scheme 2, equation 2). In this case the generated intermediate spectra was corresponding to a perfect NOS $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ spectra nickel (with some minor contribution of some $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ species), confirming the catalytic production of NO. The simulation led to global catalytic rates around 82 s^{-1} ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ build-up – oxygen activation) and 85 s^{-1} ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ decay – NO dissociation)

Both kinetics analyses converge and led to incredibly fast rates for OtNOS catalysis. Oxygen activation rate is 5 to 10 times greater than the rates reported for mammalian and bacterial NOSs [17, 68, 69]. Even more surprising, NO dissociation seems 10 to 80 times faster from OtNOS than from other NOSs [21, 68] .

DISCUSSION

Specific features of OtNOS Structure.

Most of the sequence alignments done so far on various NOS proteins highlight the conservation of structural elements involved in L-Arg binding. The whole structure that surrounds the heme-Arg moiety is also present and highly conserved in OtNOS (Fig. 3B). This suggests that this structural motif has not evolved since the diverging of the algal/bacterial/metazoan NOS branches. As our phylogenetic studies place this event really early on, this indicates that this motif has been conserved through selection pressure over hundreds of million years and is the central element of NOS biological function. Thus Arg-binding is a landmark of NOS identity and might have been involved in NOS primal biochemical activity.

However, other structural motifs are not strictly conserved. In OtNOS, many features are reminiscent of bacterial NOSs, in particular the absence of a mammalian-like N-terminal hook, including at least the first 114 residues of iNOS (up to the SIM BH₄-binding motif). This questions the nature of OtNOS quaternary structure and in particular the dimer/monomer equilibrium. Indeed the absence of the 114 first residues, or even mutations of key residues, prevents iNOS dimerization and diminishes its activity [45, 52]. However, these drastic changes have been reported for bacterial NOS [18, 53, 70] for which it does not prevent the dimer formation. For OtNOS, the absence of a genuine Zn/S cluster might not prevent the dimer conformation. The presence of a C(X)₃C motif (observed for all algal NOSs but not in bacterial NOS) might instead lead to the formation of two disulfide bridges between the Cys45 and Cys49 couples, equivalent to the “swapped conformation” reported for mammalian NOS [71]. This suggests that OtNOS quaternary structure is specific to algal NOS: it is not related to that of mNOS but relies on additional motifs (compared to the bare bacNOS structure). Indeed, when looking at the spectroscopic fingerprints, we observe the same 6-coordinated Low-Spin / 5-coordinated High-Spin equilibrium (Figures 4A and 5A), suggesting the existence of an equilibrium between two conformations (monomer/dimer or loose/tight dimer). **Développer sur le type de dimère loose, bactérien, mammal ? (pant 2005)**

Another aspect of OtNOS structure relates it to bacterial NOS. Alike bacterial NOS, OtNOS heme edge is more exposed, linked to changes in the N-terminal and the Helical lariat regions. This questions the nature, or even binding of a pterin cofactor. Since there are no biosynthetic pathways for BH₄ in algae either, FH₄ could be an alternative cofactor [16, 17, 42]. However, bacterial NOSs do not seem to harbor an optimized binding site for FH₄, apart from a few charged residues in deiNOS that could accommodate the glutamate moieties of the extended chain of FH₄ [53]. However these residues are absent in OtNOS (N 389, T412, Y414) that displays a sequence closer to that of iNOS in this region. The same observation can be made for OtNOS N409 (closer to iNOS Q472 than to bsNOS R323). This region is uniquely

modified in algal NOS by a small LGL insert that could also modify FH₄ binding. It appears that these motifs are not favorable to a substitution of BH₄ by FH₄, which questions the nature of the NOS cofactor (tryptophan or another heterocyclic moiety?) or even its presence.

Oxygen activation and OtNOS catalysis

Our spectroscopic investigation showed that NO ligand was binding to OtNOS ferrous heme in a standard way, with build-up of a stable 6-coordinated Fe^{II}NO complex that harbors UV-vis and EPR fingerprints similar to those reported for bacNOS and mNOS. However, in the same conditions, CO binding seems to exacerbate the σ -competition, weaken the proximal thiolate (C125) ligation and leads to a predominant 5-coordinated complex (Fig. 4C). This effect is pH-dependent: at alkaline pH, the W119-C125 H-bond is more stable, decreasing thiolate electron-donating potency, which in turn leads to a weaker σ -competition and a greater 6-coordinated fraction². This reflects a weaker W-S H-bond leading to a stronger “Push Effect” as we previously reported it [20].

Our kinetics investigation echoes this increased « Push Effect ». In the case of the L-Arg hydroxylation reaction, we observed an ultrafast Fe^{II}O₂ decay, illustrated by the absence of transient build-up of a Fe^{II}O₂. No Fe^{II}O₂ build-up was to be observed in the Second catalytic Step (NOHA oxidation) either, suggesting an ultrafast Fe^{II}O₂ decay, at least faster than O₂ binding. As we reported it [20, 22, 72], this increased decay rate is most likely related to the stronger electron donation from the thiolate, which increases both the rates of Fe^{II}O₂ activation or autoxidation. This does not imply that this increased Push effect is catalytically efficient, since it might lead to greater uncoupling. We indeed reported that the fine tuning of the thiolate electron-donation modulates the coupling/uncoupling balance. The question of an efficient L-Arg hydroxylation (and of NOHA formation) by OtNOS will depend on an appropriate synchronization of the protons transfer. In this regard, OtNOS distal heme pocket seems identical to that of mNOS and bacNOS, as can be seen from Fe^{II}NO EPR fingerprint (Fig. 5B), which indicates a similar H-bond network [73, 74].

In any regard, OtNOS seems to efficiently catalyze oxygen activation, without uncoupling. Indeed, kinetics analysis of the second catalytic step (NOHA oxidation) shows 100 % of Fe^{II}NO build-up (from global analysis report) with an ultrafast catalytic rate ($k_{\text{cat}} > 100 \text{ s}^{-1}$, beyond our set-up time resolution). This might be due a stronger “Push Effect” or to a faster electron transfer. This rapidity might result from another molecular mechanism. Indeed, the mechanism of oxygen activation is commonly accepted for the first catalytic step (L-Arg Hydroxylation), but has not yet been elucidated for the second step (NOHA oxidation, ref). If the oxygen activation by mamNOS relies on the transfer of a second electron from the pterin

²In the case of NO binding, the bent conformation of the Fe^{II}NO complex induces an increased π -backbonding that interferes with σ -competition (ref)

cofactor [19, 75, 76], alternative mechanisms may apply for bacterial NOSs [77]. In particular, the formation of a heme-peroxide intermediate might arise from the transfer of a supplemental electron from NOHA [78-80]. In this regard, the ultrafast catalytic rate of OtNOS suggests another electron/proton transfer scheme that allows a ultrafast build-up of a heme-peroxide or oxoferryl intermediates. Moreover OtNOS catalysis is characterized by an extraordinary fast rate of NO release for a hemoprotein. The OtNOS Fe^{III}NO koff rates range between 40 and 80 s⁻¹ depending on the analytical procedure. This rate is at least 10 to 40 fold greater than the ones reported for mNOS [68] and 200 fold greater than that of bsNOS [21, 81]. This ability to expulse NO might be linked to a weak geminate recombination yield [49] and a more open heme pocket, as we observed it by *in silico* homology modelling.

In brief, OtNOS seems to be a prototype for a High NO-output NOS. Along with a iNOS-related reductase domain (that favors faster electron transfer to the oxygenase), changes in the Push Effect, high kcat and fast NO release could allow OtNOS to release NO at a yet unseen rate; but for what purpose?

Function and Origin of OtNOS

This question might find an answer in the phylogenetic analysis of the algal NOS family that could help understanding which NOS-related function has been conserved for many hundreds millions of year, leading to the selection of the *otNOS gene*. It is linked to OtNOS origin. One hypothesis was an horizontal genome transfer (HGT) event from cyanobacteria or other plankton? This should be ruled out since no cyanobacterial NOS looks like OtNOS. The 17 NOSs we identified in the cyanobacteria Phylum (spread along all sub-sections) could be classified in three different families of NOS but none of them harbors a sequence close to that of OtNOS (personal results). An HGT from a metazoan or another eukaryote is also unlikely. OtNOS gene is located on the Chromosome 17 that seems related to viridiplantae genome (although a truncated OtNOS isoform is located on Chromosome 2 that is believed to mostly arise from HGT).

The presence of many other NOSs in other green algae phylum [41] pleads for a common ancestor to this phylum that has not been conserved in land plants. But what could have been the function required for algal NOS that would have been useless for terrestrial plants? In fact NOS are present in all the genomes of *Bathycoccus* genus, all but that of *Ostreococcus* RCC809. And the major difference between RCC809 and the other *Ostreococcus* species is light exposure. *Ostreococcus* from Clades A, C, D are exposed to medium to high light and might experience photoinactivation by an oxidative stress generated in the photosynthetic chain. These organisms need to regulate Photosystem 2 activity and inhibit electron transfer chain [8]. NO might exert this activity [82] as it commonly does for the mitochondrial respiratory chain [83]. This is not the case for *Ostreococcus* RCC809 that is a deep-water organism exposed to low light intensity. RCC809 does not need an PS inhibitor but instead needs to maximize light photosynthesis (for example with large light harvesting collecting

antenna) Could be developed based on Foresi 2015. By any means this topics needs more investigation at various levels such as a comparative analysis of these diverse algae and the effect of NOS activity in each of them, or the ability of algal NOS to produce other RNOS in vivo.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Maximum likelihood phylogenetic tree of microalgae NOSs aligned with a series of NOSs representative of the bacteria, cyanobacteria and mammal phyla.

The set of sequences includes the 3 microalgae NOSs (green), and a selection of species representative of the phylogenetic diversity of NOS genes: 4 mammalian NOSs (blue), 4 NOSs from other tetrapodes (red), 5 bacterial NOSs (orange), 2 NOSs from fungi (brown), 2 NOSs from molluscs (blue), 7 NOSs from arthropods (magenta), and various NOSs from diatoms, amoeba, cnidaria, placozoa, porifera, arachnids, cephalocordata, tunicata. Probcons algorithm provided by Jalview 2.8 interface was applied to generate multiple sequence alignments. The phylogenetic tree was generated via Seaview software (version 4.5.4)[84] using PhyML algorithm, with LG model as substitution model, approximate Likelihood-ratio test for branches (aLRT, SH-like), and NNI tree topology improvement using BioNJ distance-based tree as starting tree.

Figure 2: Partial views of the multiple sequence alignment of three microalgae NOSs and the series of NOSs representative of the bacteria, cyanobacteria and mammals phyla used for the phylogenetic analysis.

Two excerpts of the multiple sequence alignment showing essential regions from the oxygenase domain of NO-Synthases. The sequences aligned are (GI numbers in parenthesis): *Ostreococcus tauri* (308812915), *Ostreococcus lucimarinus* (144582176), *Bathycoccus prasinos* (612390834), inducible NOS from *Mus musculus* (6754872), *Crinalium epipsammum* (428248029), *Synechococcus* sp. PCC7335 (196188428), *Nostoc* sp. PCC 7107 (427361656), endothelial NOS from *Bos Taurus* (317008623) and neuronal NOS from *rattus norvegicus* (1527149). ClustalX color code as follows: blue for hydrophobic (ILMAV) and aromatic (FW) residues, violet for positively charged polar residues (ED), red for negatively charged polar residues (RK), light green for non-polar residues (QST), orange for glycine, green for polar aromatic residues (HT), yellow for proline, and pink for cysteine. Jalview © software (v2.8) was used as graphical interface and PROBCONS[®] as protein multiple sequence alignment program. See Figure S1 for the complete alignment and the methodological details. Regions of interest for iNOs and otNOS sequences are highlighted in red boxes. Panel A. Regions with residues involved in L-Arg binding (blue dash and A letters) and dimer interface (brown dash). Panel B. C-terminal domain showing residues involved in heme binding (orange dash) and pterin binding (green dash).

Figure 3: Three-dimensional model of *Ostreococcus tauri* NOS oxygenase domain (otNOSoxy) obtained by Homology modelling.

The model was rebuilt by modeller 9v12 using *mus musculus* iNOSoxy crystallographic structure (1NOD) as template. Panel A. **laquelle des deux protéines est montrée ?** Perspective

from the exposed heme edge showing the tight L-Arg binding pocket in otNOSoxy structure. Residues surrounding L-Arg substrate are represented in quick surface mode, heme and L-Arg (yellow), proximal Cys and pterin (atom type color) displayed in licorice representation. Panel B. Superimposed 3D structures of the heme pocket of iNOSoxy (1NOD) and otNOSoxy. All residues in atom-type colored licorice representation, except heme and L-Arg substrate that are in yellow. The three mutated residues are indicated by an arrow. *(peut-on faire trois fleches sur le panel B?)* Panel C. Superimposed view of the heme edge and pterin binding sites of iNOSoxy (1NOD) and otNOSoxy. The two structures are superimposed in new cartoon mode representation, with N-terminal hook of iNOS in red, and C-terminal segments of both proteins in blue. Access channel residues and cofactors are represented in licorice mode: heme and L-Arg in tan, pterin in green, iNOSoxy residues in purple, otNOSoxy residues in yellow. Panel D. Superimposed 3D structures of the pterin binding site highlighting the conservation of the H-bond network in both oxygenases. All residues and cofactors in licorice representation. Residues of otNOSoxy in atom-type color mode, residues of iNOSoxy in pink. The H-bonding with pterin of three residues (Lys391/Ile456, Trp392/457, and Arg310/375), are illustrated by purple lines. Figures generated with visualization software VMD 1.9.2.

Figure 4: Spectrophotometric characterization of major OtNOSoxy intermediates. A) UV-visible absorption spectra of ferric OtNOS in the presence of various combinations of substrate and cofactor: purified in the absence of substrate and cofactor (dash lines), after addition of Arg and BH4 (dotted line), purified in the presence of Arg and BH4 (solid lines); B) Ferric heme (solid,) ferrous heme (dash) and heme-NO (dotted line) complexes of OtNOSoxy in the presence of Arg and BH4 C) UV-visible absorption spectra of OtNOS FeIICO complex under different conditions: purified at pH 7.4 in the absence of substrate and cofactor (black), after addition of Arg (red), after addition of BH4 (mauve), in the presence of Arg and BH4 (green) and at pH 9 (orange). See Experimental Procedures section.

Figure 5: Structural characterization of otNOSoxy by EPR spectroscopy. A) Experimental (black) and simulated (grey) spectra of ferric otNOS in the presence of various combinations of substrate and cofactor. Experimental parameters: microwave frequency 9.38 GHz (Arg and NOHA) and 9.49 GHz (-/-), microwave power 1 mW (Arg), 0.25mW (NOHA) and 0.01 mW (-/-), modulation amplitude 2 mT., temperature 10K. B) Experimental (black) and simulated (grey) spectra of otNOS Fe^{II}NO complex in the presence of saturating concentrations of substrate and cofactor, spectra obtained for iNOS and bsNOS are shown for comparison. Experimental conditions: microwave frequency 9.38 GHz (otNOS) and 9.49 GHz (iNOS and bsNOS), microwave power 0.25 μ W (otNOS) and 1 μ W (iNOS and bsNOS), modulation amplitude 0.25mT (otNOS) and 0.4mT (iNOS and bNOS), temperature 30 K (otNOS) and 10 K (iNOS and bsNOS).

Figure 6: Rapid-scan stopped-flow analysis OtNOSoxy catalysis. A) Superimposed spectra of OtNOSoxy recorded for the L-Arg oxidation reaction. Arrows indicate the absorption increase/decrease; Inset: Time traces at 650 nm reflecting FeIII heme recovery. B) Global analysis of the L-Arg oxidation kinetics using Sfit software with a two-intermediates model (see Experimental procedures). Sfit-calculated spectra of two distinct OtNOSoxy intermediates observed during the reaction C) Sfit-calculated kinetics of the concentration of the intermediates species; D) E) F) same as A)B)C) but for the second catalytic step (NOHA oxidation). D) Superimposed spectra of OtNOSoxy recorded for the NOHA oxidation reaction. Arrows indicate the absorption increase/decrease; Inset: Time traces at 395 and 442 nm reflecting FeIII heme and FeIINO absorption changes. B) Global analysis of the NOHA oxidation kinetics using Sfit software with a three-intermediates model (see Experimental procedures). Sfit-calculated spectra of three distinct OtNOSoxy intermediates observed during the reaction C) Sfit-calculated kinetics of the concentration of these intermediates species.

TABLES

FeIII HS		g_1^{eff}	g_2^{eff}	g_3^{eff}	E/D
OtNOS	Arg/BH ₄	7,65	4,07	1,80	0,07 7
	NOHA/BH ₄	7,69	4,00	1,79	0,08 0
bsNOS	-/-	7,56	4,15	1,84	0,07 4
	Arg/BH ₄	7,64	4,07	1,80	0,08 0
	NOHA/BH ₄	7,67	3,97	1,78	0,08 3
iNOS	Arg/BH ₄	7,54	4,12	1,82	0,07 5
	NOHA/BH ₄	7,62	4,03	1,80	0,08 0
FeIII LS		g_1	g_2	g_3	
OtNOS	-/-	2,53	2,29	1,86	
iNOS	-/-	2,42	2,29	1,91	
FeIIINO		g_x A (MHz)	g_y A (MHz)	g_z A (MHz)	
iNOS	Arg/BH ₄	2.08 4 30	2.00 5 56	1.97 2 34	
bsNOS	Arg/BH ₄	2.08 1 29	2.00 5 59	1.96 7 33	
OtNOS	Arg/BH ₄	2.09 3 29	2.00 4 57	1.97 4 34	

Table 1

Figure 1: Phylogenetic tree of the microalgae NOSs and a series of NOSs representative of the bacteria, cyanobacteria and mammals phyla.

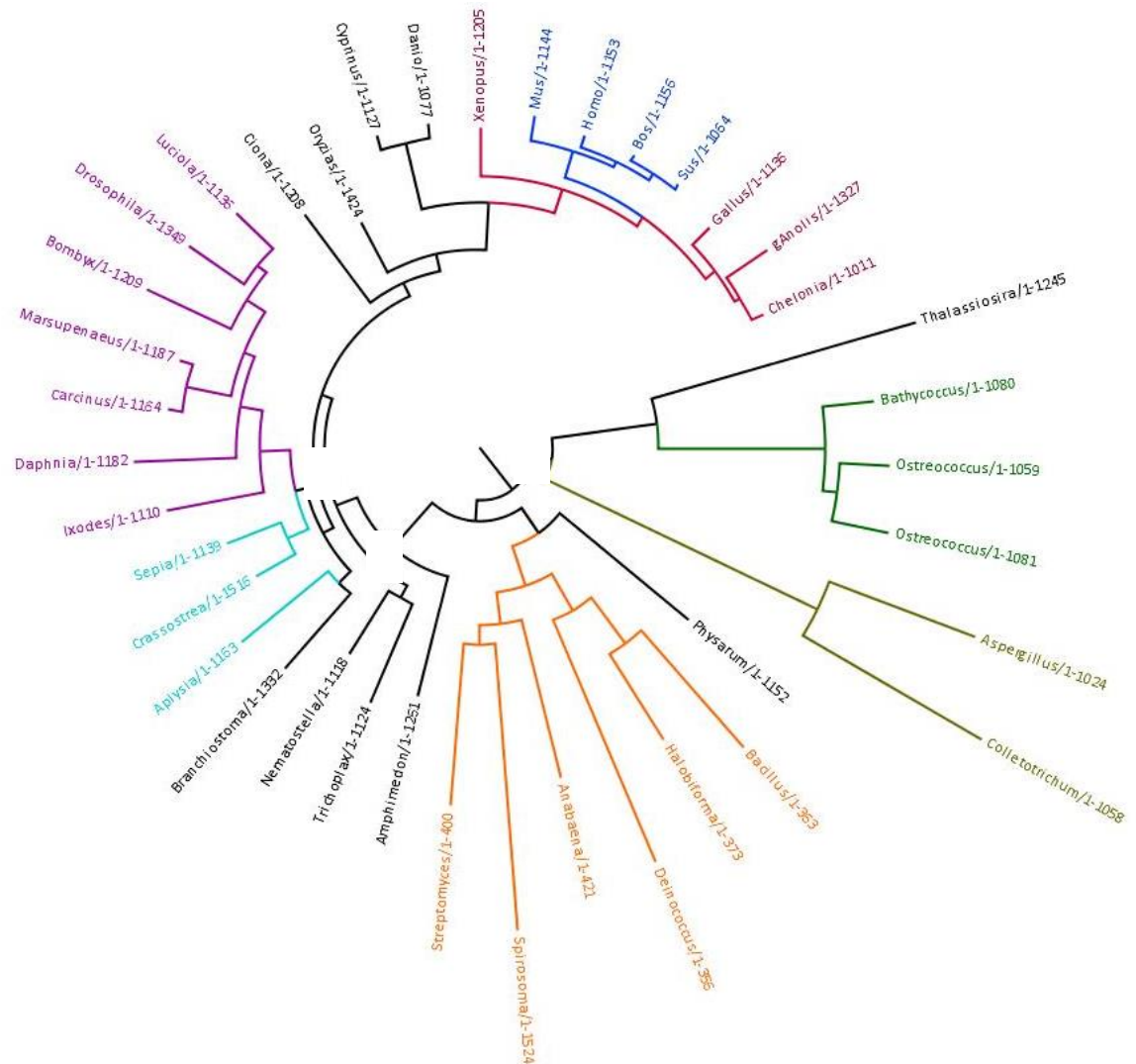


Figure 2: Alignment of three microalgae NOSs and a series of NOSs representative of the bacteria, cyanobacteria and mammals phyla.

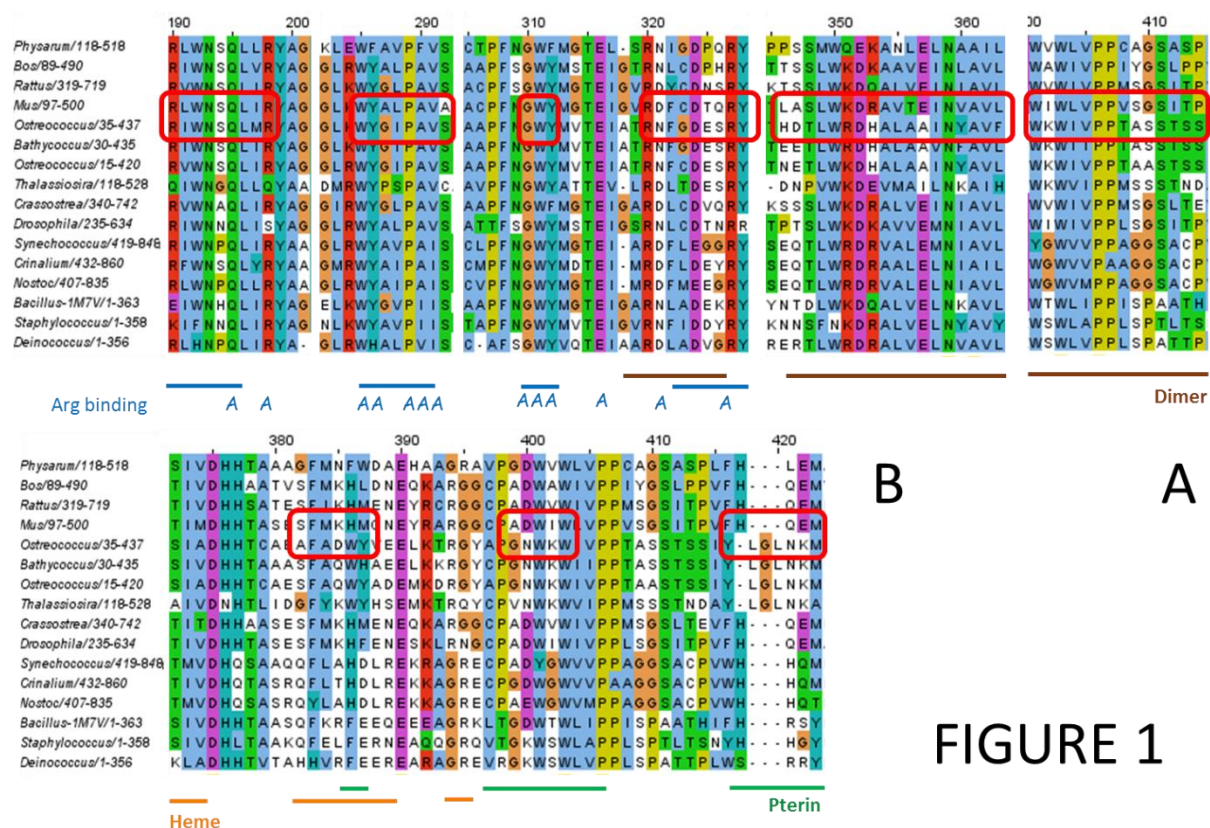


FIGURE 1

Figure 3: Three-dimensional structure of the oxygenase domain of *Ostreococcus tauri* NOS (OtNOSoxy) obtained by Homology modelling.

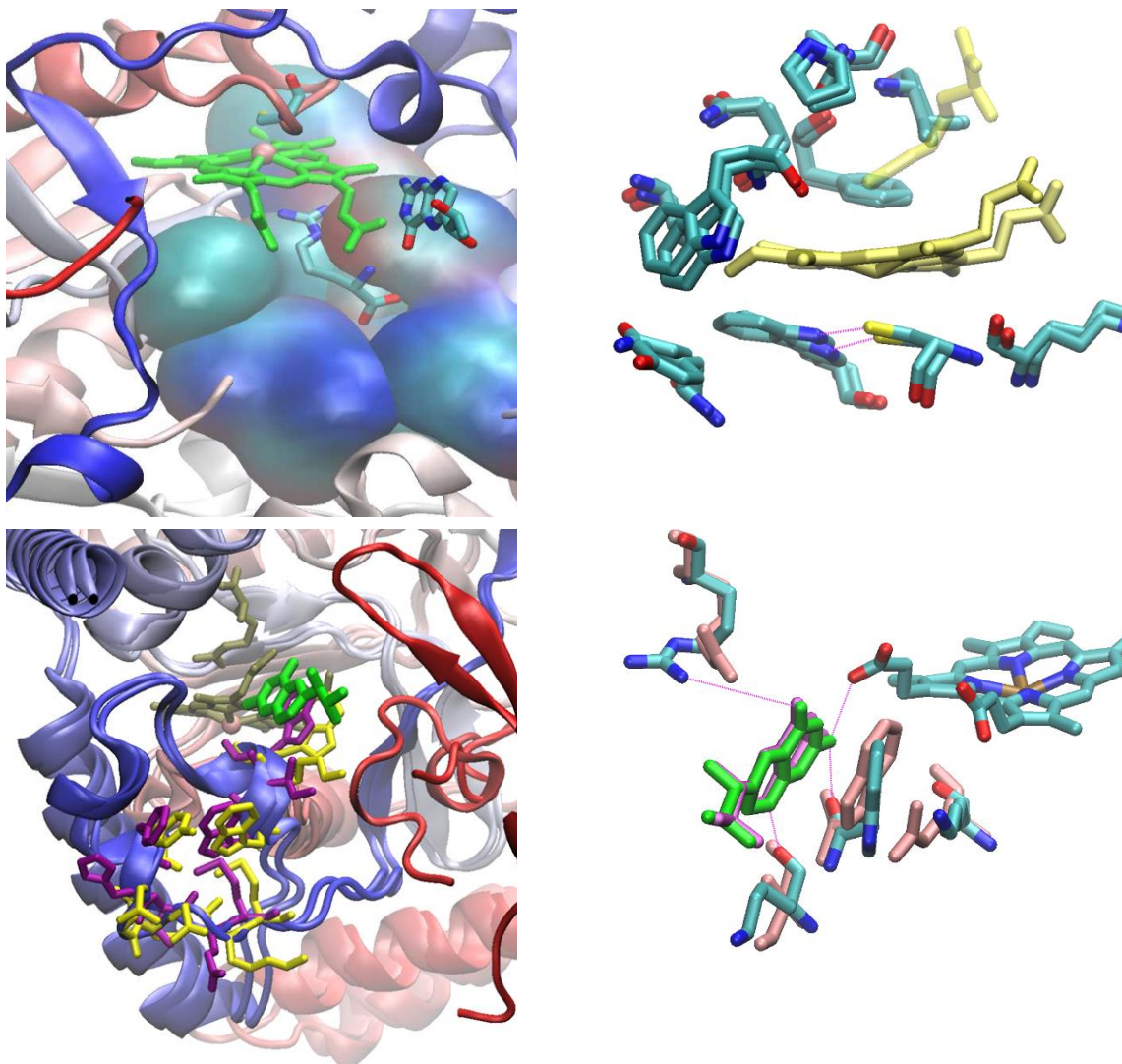


Figure 4: Spectrophotometric characterization of major OtNOSoxy intermediates.

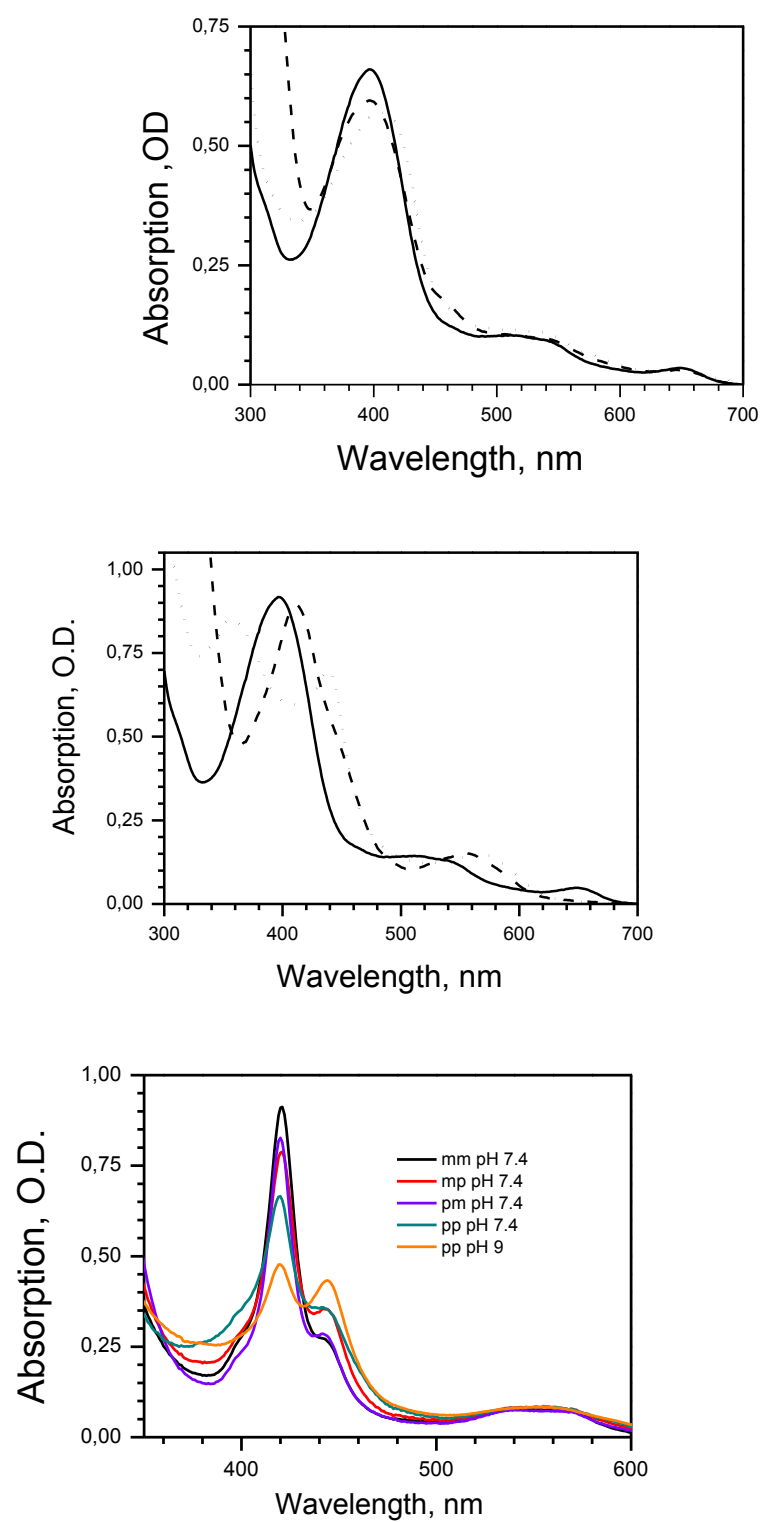


Figure 5: Structural characterization of OtNOSoxy by EPR spectroscopy

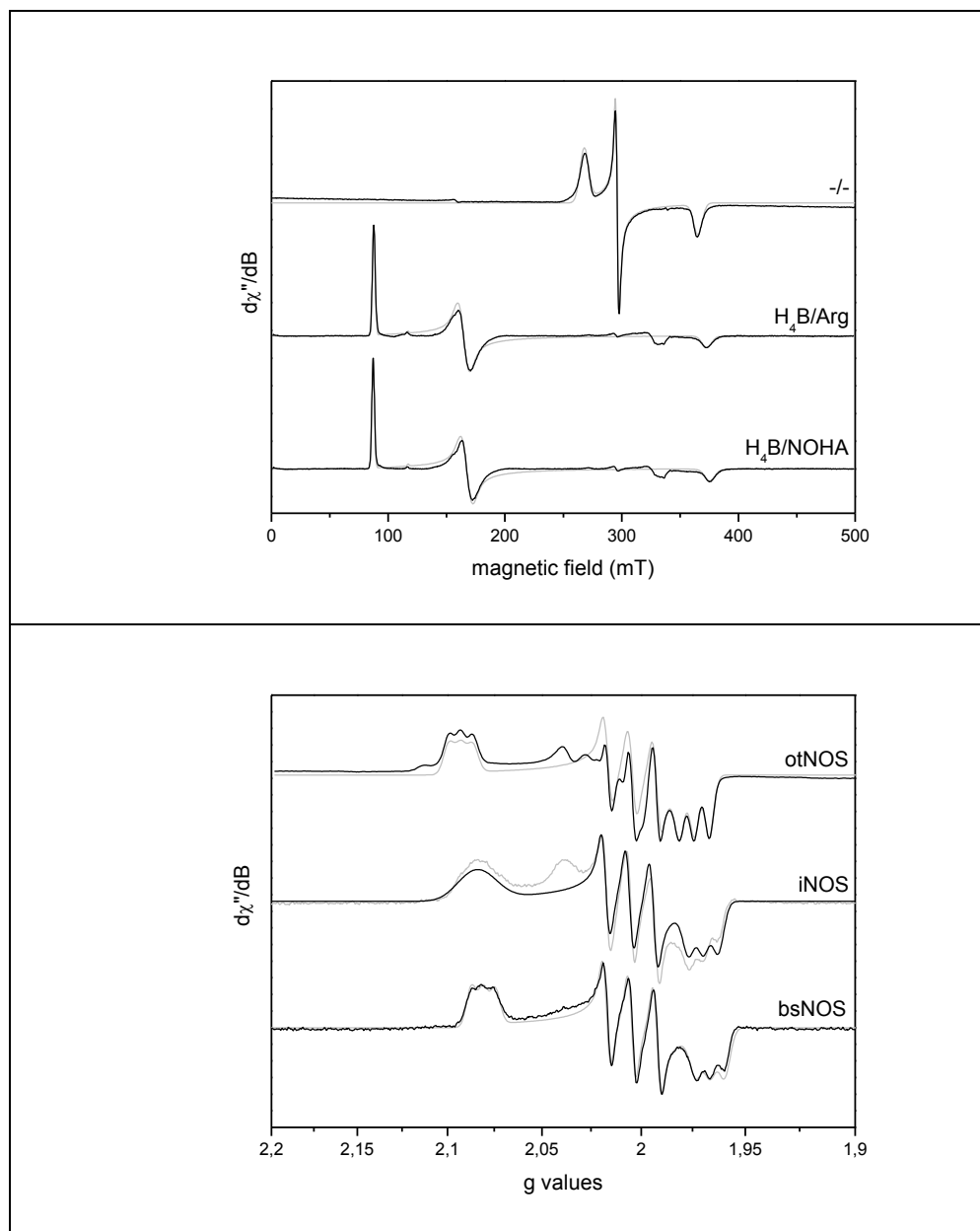
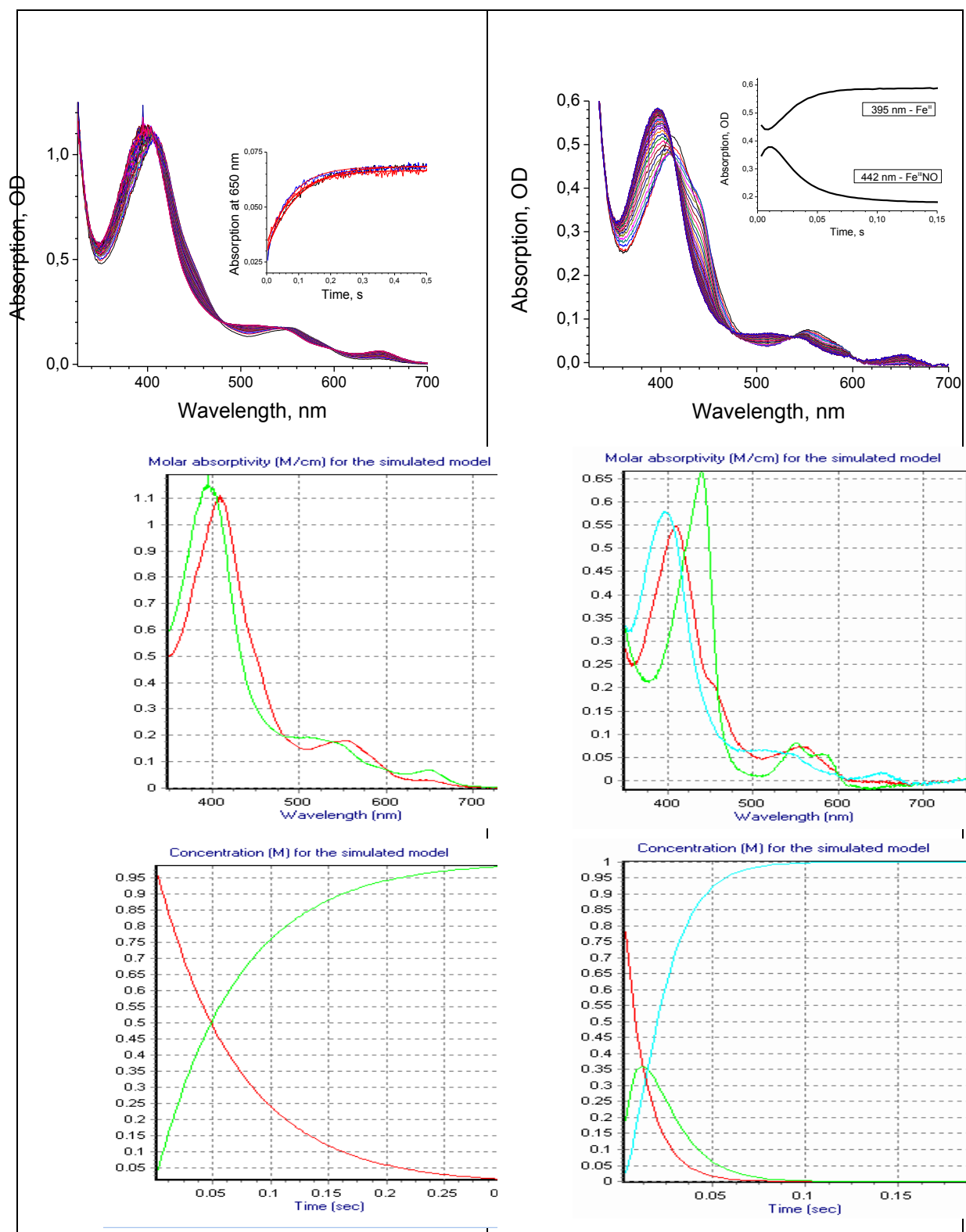
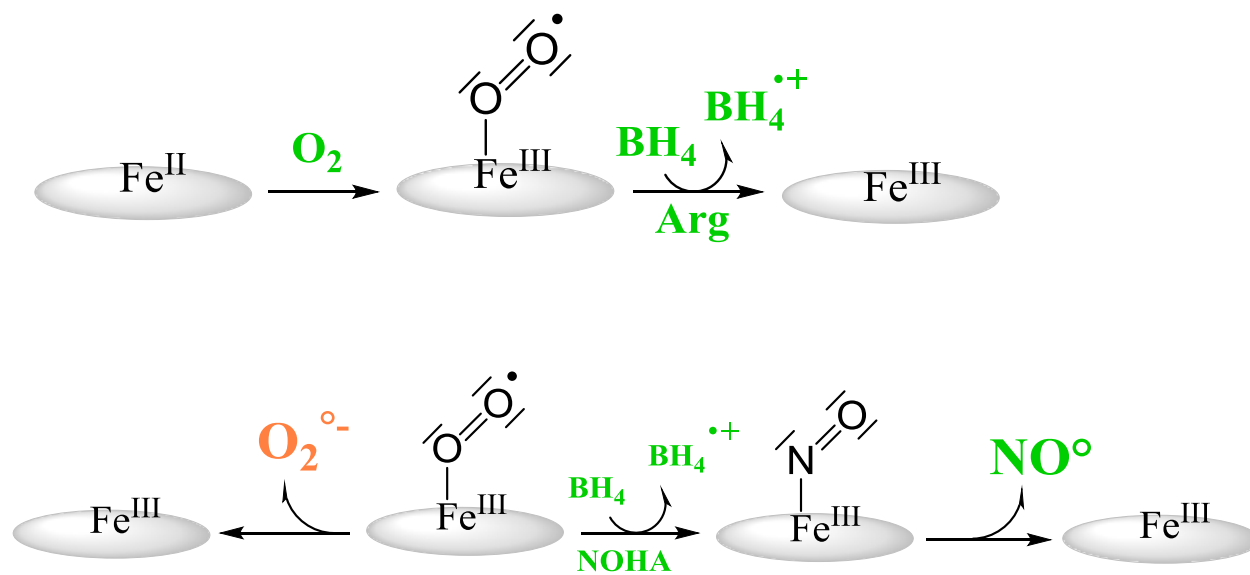


Figure 6: Rapid-scan stopped-flow analysis *Ot*NOSoxy catalysis



Scheme 1: The two catalytic steps of NO-Synthases



REFERENCES

1. Sessa, W.C., *eNOS at a glance*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2427-9.
2. Mungrue, I.N. and D.S. Bredt, *nNOS at a glance: implications for brain and brawn*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2627-9.
3. Lowenstein, C.J. and E. Padalko, *iNOS (NOS2) at a glance*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 14): p. 2865-7.
4. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 175-95.
5. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
6. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
7. Kumar, A., et al., *Nitric oxide in marine photosynthetic organisms*. Nitric Oxide, 2015. **47**: p. 34-9.
8. Foresi, N., et al., *Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent*. Plant Cell, 2010. **22**(11): p. 3816-30.
9. Messner, S., et al., *Physarum nitric oxide synthases: genomic structures and enzymology of recombinant proteins*. Biochem J, 2009. **418**(3): p. 691-700.
10. Crane, B.R., J. Sudhamsu, and B.A. Patel, *Bacterial nitric oxide synthases*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 445-70.
11. Sengupta, R., et al., *Characterization of *Drosophila* nitric oxide synthase: a biochemical study*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(2): p. 590-7.
12. Ray, S.S., et al., *Reductase domain of *Drosophila melanogaster* nitric-oxide synthase: redox transformations, regulation, and similarity to mammalian homologues*. Biochemistry, 2007. **46**(42): p. 11865-73.
13. Ray, S.S., et al., *Oxygenase domain of *Drosophila melanogaster* nitric oxide synthase: unique kinetic parameters enable a more efficient NO release*. Biochemistry, 2007. **46**(42): p. 11857-64.
14. Werner-Felmayer, G., et al., *Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarum polycephalum**. Biochem J, 1994. **304** (Pt 1): p. 105-11.
15. Agapie, T., et al., *NO formation by a catalytically self-sufficient bacterial nitric oxide synthase from *Sorangium cellulosum**. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16221-6.
16. Reece, S.Y., J.J. Woodward, and M.A. Marletta, *Synthesis of nitric oxide by the NOS-like protein from *deinococcus radiodurans*: a direct role for tetrahydrofolate*. Biochemistry, 2009. **48**(23): p. 5483-91.
17. Adak, S., K.S. Aulak, and D.J. Stuehr, *Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis**. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 16167-71.
18. Adak, S., et al., *Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans**. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 107-12.

19. Brunel, A., J. Santolini, and P. Dorlet, *Electron paramagnetic resonance characterization of tetrahydrobiopterin radical formation in bacterial nitric oxide synthase compared to mammalian nitric oxide synthase*. Biophys J, 2012. **103**(1): p. 109-17.
20. Brunel, A., et al., *The proximal hydrogen bond network modulates Bacillus subtilis nitric-oxide synthase electronic and structural properties*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 11997-2005.
21. Wang, Z.Q., et al., *A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19018-25.
22. Lang, J., J. Santolini, and M. Couture, *The conserved Trp-Cys hydrogen bond dampens the "push effect" of the heme cysteinate proximal ligand during the first catalytic cycle of nitric oxide synthase*. Biochemistry, 2011. **50**(46): p. 10069-81.
23. Chartier, F.J., S.P. Blais, and M. Couture, *A weak Fe-O bond in the oxygenated complex of the nitric-oxide synthase of Staphylococcus aureus*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 9953-62.
24. Lamattina, L., et al., *Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule*. Annu Rev Plant Biol, 2003. **54**: p. 109-36.
25. Trapet, P., et al., *NO signaling in plant immunity: a tale of messengers*. Phytochemistry, 2015. **112**: p. 72-9.
26. Wendehenne, D., et al., *Free radical-mediated systemic immunity in plants*. Curr Opin Plant Biol, 2014. **20**: p. 127-34.
27. Yu, M., et al., *Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution*. New Phytol, 2014. **202**(4): p. 1142-56.
28. Hichri, I., et al., *Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis*. J Exp Bot, 2015. **66**(10): p. 2877-87.
29. Wendehenne, D., J. Durner, and D.F. Klessig, *Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses*. Curr Opin Plant Biol, 2004. **7**(4): p. 449-55.
30. Gupta, K.J., et al., *Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide*. FEBS Lett, 2011. **585**(24): p. 3843-9.
31. Moreau, M., et al., *NO synthesis and signaling in plants--where do we stand?* Physiol Plant, 2010. **138**(4): p. 372-83.
32. Chandok, M.R., et al., *The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex*. Cell, 2003. **113**(4): p. 469-82.
33. Guo, F.Q., M. Okamoto, and N.M. Crawford, *Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling*. Science, 2003. **302**(5642): p. 100-3.
34. Guo, F.Q. and N.M. Crawford, *Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence*. Plant Cell, 2005. **17**(12): p. 3436-50.
35. Moreau, M., et al., *AtNOS/AtNOA1 is a functional Arabidopsis thaliana cGTPase and not a nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32957-67.
36. Besson-Bard, A., A. Pugin, and D. Wendehenne, *New insights into nitric oxide signaling in plants*. Annu Rev Plant Biol, 2008. **59**: p. 21-39.
37. Zemojtel, T., et al., *Plant nitric oxide synthase: a never-ending story?* Trends Plant Sci, 2006. **11**(11): p. 524-5; author reply 526-8.

38. Zemojtel, T., et al., *A novel conserved family of nitric oxide synthase?* Trends Biochem Sci, 2004. **29**(5): p. 224-6.
39. Zemojtel, T., R.C. Wade, and T. Dandekar, *In search of the prototype of nitric oxide synthase.* FEBS Lett, 2003. **554**(1-2): p. 1-5.
40. Derelle, E., et al., *Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11647-52.
41. Jeandroz, S., et al., *Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom.* Sci Signal, 2016. **9**(417): p. re2.
42. Foresi, N., et al., *Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*.* Plant J, 2015. **82**(5): p. 806-21.
43. Tegel, H., et al., *Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3).* Protein Expr Purif, 2010. **69**(2): p. 159-67.
44. Foresi, N., et al., *Analysis of the Expression and Activity of Nitric Oxide Synthase from Marine Photosynthetic Microorganisms.* Methods Mol Biol, 2016. **1424**: p. 149-62.
45. Ghosh, D.K., et al., *Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction.* Biochemistry, 1997. **36**(35): p. 10609-19.
46. Crane, B.R., et al., *Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.* Science, 1998. **279**(5359): p. 2121-6.
47. Ghosh, D.K., et al., *Inducible nitric oxide synthase: role of the N-terminal beta-hairpin hook and pterin-binding segment in dimerization and tetrahydrobiopterin interaction.* EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6260-70.
48. Siddhanta, U., et al., *Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer.* J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18950-8.
49. Beaumont, E., et al., *Distal Val346Ile mutation in inducible NO synthase promotes substrate-dependent NO confinement.* Biochemistry, 2007. **46**(47): p. 13533-40.
50. Wang, Z.Q., C.C. Wei, and D.J. Stuehr, *How does a valine residue that modulates heme-NO binding kinetics in inducible NO synthase regulate enzyme catalysis?* J Inorg Biochem, 2010. **104**(3): p. 349-56.
51. Wang, Z.Q., et al., *Engineering nitric oxide synthase chimeras to function as NO dioxygenases.* J Inorg Biochem, 2016.
52. Ghosh, S., et al., *Mutational analysis of the tetrahydrobiopterin-binding site in inducible nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24100-12.
53. Pant, K., et al., *Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*.* Biochemistry, 2002. **41**(37): p. 11071-9.
54. Crane, B.R., et al., *Structures of the N(omega)-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins.* Biochemistry, 2000. **39**(16): p. 4608-21.
55. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.* J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 779-815.
56. Webb, B., et al., *Modeling of proteins and their assemblies with the Integrative Modeling Platform.* Methods Mol Biol, 2014. **1091**: p. 277-95.
57. Crane, B.R., et al., *The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes.* Science, 1997. **278**(5337): p. 425-31.

58. Rodriguez-Crespo, I., N.C. Gerber, and P.R. Ortiz de Montellano, *Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in Escherichia coli, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation*. J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11462-7.
59. Ghosh, D.K. and D.J. Stuehr, *Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction*. Biochemistry, 1995. **34**(3): p. 801-7.
60. Santolini, J., et al., *Resonance Raman study of Bacillus subtilis NO synthase-like protein: similarities and differences with mammalian NO synthases*. Biochemistry, 2006. **45**(5): p. 1480-9.
61. Chen, Y., K. Panda, and D.J. Stuehr, *Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme-NO-dependent mechanism*. Biochemistry, 2002. **41**(14): p. 4618-25.
62. Pant, K. and B.R. Crane, *Structure of a loose dimer: an intermediate in nitric oxide synthase assembly*. J Mol Biol, 2005. **352**(4): p. 932-40.
63. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
64. Santolini, J., *The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: a story of electrons and protons*. J Inorg Biochem, 2011. **105**(2): p. 127-41.
65. Li, H. and T.L. Poulos, *Structure-function studies on nitric oxide synthases*. J Inorg Biochem, 2005. **99**(1): p. 293-305.
66. Salerno, J.C., et al., *Characterization by electron paramagnetic resonance of the interactions of L-arginine and L-thiocitrulline with the heme cofactor region of nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27423-8.
67. Salerno, J.C., et al., *Electron paramagnetic resonance spectroscopy of the heme domain of inducible nitric oxide synthase: binding of ligands at the arginine site induces changes in the heme ligation geometry*. Biochemistry, 1996. **35**(24): p. 7626-30.
68. Santolini, J., A.L. Meade, and D.J. Stuehr, *Differences in three kinetic parameters underpin the unique catalytic profiles of nitric-oxide synthases I, II, and III*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48887-98.
69. Wei, C.C., et al., *The three nitric-oxide synthases differ in their kinetics of tetrahydrobiopterin radical formation, heme-dioxy reduction, and arginine hydroxylation*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8929-35.
70. Bird, L.E., et al., *Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from Staphylococcus aureus*. Structure, 2002. **10**(12): p. 1687-96.
71. Crane, B.R., et al., *N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6271-81.
72. Hannibal, L., et al., *Influence of heme-thiolate in shaping the catalytic properties of a bacterial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39224-35.
73. Santolini, J., et al., *EPR characterisation of the ferrous nitrosyl complex formed within the oxygenase domain of NO synthase*. Chembiochem, 2013. **14**(14): p. 1852-7.
74. Migita, C.T., et al., *Substrate binding-induced changes in the EPR spectra of the ferrous nitric oxide complexes of neuronal nitric oxide synthase*. Biochemistry, 1997. **36**(36): p. 10987-92.
75. Wei, C.C., et al., *A tetrahydrobiopterin radical forms and then becomes reduced during Nomega-hydroxyarginine oxidation by nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46668-73.
76. Stoll, S., et al., *Nitric oxide synthase stabilizes the tetrahydrobiopterin cofactor radical by controlling its protonation state*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(33): p. 11812-23.

77. Zhu, Y. and R.B. Silverman, *Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), Heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s)*. Biochemistry, 2008. **47**(8): p. 2231-43.
78. Marletta, M.A., A.R. Hurshman, and K.M. Rusche, *Catalysis by nitric oxide synthase*. Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(5): p. 656-63.
79. Korth, H.G., et al., *On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide*. J Biol Chem, 1994. **269**(27): p. 17776-9.
80. Cho, K.B. and J.W. Gauld, *Second half-reaction of nitric oxide synthase: computational insights into the initial step and key proposed intermediate*. J Phys Chem B, 2005. **109**(49): p. 23706-14.
81. Whited, C.A., et al., *Gating NO release from nitric oxide synthase*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(1): p. 27-30.
82. Shi, S., et al., *Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation*. Nitric Oxide, 2005. **13**(1): p. 1-9.
83. Brown, G.C., *Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(1): p. 46-57.
84. Gouy, M., S. Guindon, and O. Gascuel, *SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building*. Mol Biol Evol, 2010. **27**(2): p. 221-4.

The very first plant NOS-like protein is a genuine NO synthase

Marine Weisslocker-Schaetzel, François André, Nabila Touazi, Mehdi Lembrouk, Pierre Dorlet, Annie Frelet-Barrand, Lorenzo Lamattina[#] and Jérôme Santolini[§]

Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Bât 532 CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette cedex, France

[#]

[§] Corresponding author: Santolini Jérôme, Ph.D. *Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, iBiTec-S and CNRS UMR 9198, CEA Saclay - 91191 Gif-sur-Yvette Cedex - France.* Tel: +33-1-69-08-53-63; Fax: +33-1-69-08-87-17; E-mail: jerome.santolini@cea.fr

Running title: Structural and functional characterization of OtNOS oxygenase domain reveals very efficient NO producing.

Abbreviations: Arg, L-arginine; H₄B, tetrahydrobiopterin, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin; NO, nitric oxide; NOHA, N^ω-hydroxy-L-arginine, NOS, nitric oxide synthase; NOSoxy, oxygenase domain of NOS; iNOS, inducible nitric oxide synthase;

Keywords: NO synthase, plant, algae, catalysis,

Subdivision: Enzymes and catalysis.

SUPPORTING INFORMATION

Supplementary Fig. S1. Multiple sequence *alignment of three microalgae NOSs and a series of NOSs representative of the bacteria, cyanobacteria and mammals phyla.* **Top):** Multiple sequence alignment of the oxygenase domain of NO-Synthases. The sequences aligned are (GI numbers in parenthesis): *Ostreococcus tauri* (308812915), *Ostreococcus lucimarinus* (144582176), *Bathycoccus prasinos* (612390834), inducible NOS from *Mus musculus* (6754872), *Crinalium epipsammum* (428248029), *Synechococcus sp. PCC7335* (196188428), *Nostoc sp. PCC 7107* (427361656), endothelial NOS from *Bos taurus*

(317008623) and neuronal NOS from *Rattus norvegicus* (1527149). Jalview 2.7 © software was used as graphical interface and PROBCONS[®] as protein multiple sequence alignment algorithm.

Titre : Mécanisme moléculaire des NO-synthases bactériennes

Mots clés : NO-synthases, mécanisme catalytique, RPE, cinétiques rapides

Résumé : Les NO-synthases sont des flavohémostéines responsables de la production de NO[•] chez les mammifères (mNOS). Elles se composent d'un domaine réductase, qui lie les cofacteurs FMN et FAD et le co-substrat NADPH, et d'un domaine oxygénase qui lie l'hème, le substrat L-arginine et le cofacteur redox essentiel tétrahydrobioptérine H₄B. Ces quinze dernières années, plusieurs NOS d'origine bactérienne (bacNOS) ont été caractérisées et il a été montré qu'elles étaient semblables au domaine oxygénase de leurs homologues mammifères. Il existe cependant des différences significatives entre mNOS et bacNOS, la plus importante étant l'absence de domaine réductase chez les NOS d'origine bactérienne. De plus, le(s) mécanisme(s) catalytique(s) de ces dernières ainsi que leur(s) fonction(s) *in vivo* restent actuellement à déterminer.

Plusieurs études publiées montrent que la substitution Val/Ile à proximité du site actif, conservée entre mNOS et bacNOS, est partiellement responsable des différences observées au niveau catalytique entre ces deux groupes. Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé les spectroscopies d'absorption UV-visible et RPE, ainsi que des techniques de cinétiques rapides comme le *stopped-flow* et le *freeze-quench*, pour caractériser les deux mutants complémentaires bsNOS I224V et iNOS V346I afin de mieux comprendre l'influence de cette mutation. J'ai ainsi montré qu'il existait des différences fondamentales entre bacNOS et mNOS qui ne sont pas liées à la substitution Val/Ile et que ces deux familles d'enzymes suivent probablement des mécanismes catalytiques différents pour l'étape d'oxydation du NOHA. Ces résultats sont confirmés par l'étude de la NOS thermostable issue de *Geobacillus stearothermophilus*.

Lorsqu'on s'intéresse au fonctionnement *in vivo* des bacNOS, se pose également la question de la nature du cofacteur redox puisque de nombreuses bactéries possédant une NOS n'ont pas la machinerie nécessaire à la synthèse de H₄B ; c'est par exemple le cas de *Deinococcus radiodurans* pour qui l'utilisation du tétrahydrofolate H₄F a été proposée. J'ai donc étudié et caractérisé deiNOS de manière approfondie en présence de différents cofacteurs afin de mieux comprendre leurs rôles redox et structural. Ceci a notamment permis de proposer un mécanisme catalytique légèrement différent de celui suivi par bsNOS ce qui suggère que ces enzymes pourraient avoir différentes fonctions *in vivo*.

Enfin, la première caractérisation *in vitro* d'une NOS de plante, issue de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri* est présentée dans ce manuscrit. Les résultats suggèrent que celle-ci aurait effectivement une activité NO-synthase *in vivo*.

Title : Molecular mechanism of bacterial NO-synthases

Keywords : NO-synthases, catalytic mechanism, EPR, rapid kinetics

Abstract : NO-synthases are flavohemoproteins responsible for NO[•] production in mammals (mNOS). They are comprised of a reductase domain, that binds FMN, FAD and NADPH, and an oxygenase domain, that binds heme, the substrate L-arginine and the essential redox active tetrahydrobiopterin cofactor H₄B. In the last 15 years, several bacterial NOS (bacNOS) have been characterized and shown to resemble the oxygenase domain of their mammalian counterpart. However bacNOS exhibit significant differences from mNOS, the most striking one being the lack of a reductase domain, and their catalytic mechanism(s) and *in vivo* function(s) are currently poorly understood.

Previously published studies suggest that a conserved Val to Ile substitution near the active site is at least partially responsible for the differences in catalysis observed between mNOS and bacNOS. During my PhD I characterized the mutants on this particular position, bsNOS I224V and iNOS V346I, using UV-visible and EPR spectroscopies as well as rapid-kinetic technics such as stopped-flow spectrophotometry and rapid-freeze quench, to better understand the influence of this substitution. This showed that mammalian and bacterial enzymes are fundamentally different and probably follow different mechanisms for NOHA oxidation. Results from studying the thermostable NOS from *Geobacillus stearothermophilus* further confirm these observations.

Another important issue regarding bacNOS functioning *in vivo* concerns the nature of the redox active cofactor since many NOS-containing bacteria do not have the machinery for H₄B biosynthesis; this is for instance the case of *Deinococcus radiodurans* for which the use of tetrahydrofolate H₄F has been proposed. I therefore performed an extensive characterization of deiNOS in the presence of various cofactors to better understand their redox and structural roles. This allowed proposing a slightly different mechanism for deiNOS, compared to bsNOS, suggesting different function(s) *in vivo*.

Finally, the first *in vitro* characterization of a plant NOS from the unicellular green alga *Ostreococcus tauri* is reported in this manuscript. The results suggest that this NOS-like protein is indeed a genuine NO-synthase.

