



**HAL**  
open science

# Étude de l'influence de modifications structurales sur la neuroglobine humaine

Éric André

► **To cite this version:**

Éric André. Étude de l'influence de modifications structurales sur la neuroglobine humaine. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS145 . tel-01721321

**HAL Id: tel-01721321**

**<https://theses.hal.science/tel-01721321>**

Submitted on 2 Mar 2018

**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 : 2017SACLS145

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 de doctorat : Chimie

Par

M. Eric ANDRÉ

Etude de l'influence de modifications structurales sur la Neuroglobine humaine

Thèse soutenue à l'Université de Paris-Sud, Orsay, le 19 Juin 2017 :

Composition du Jury :

Mme.	Sophie LECOMTE	Directrice de Recherche Université de Bordeaux	Rapporteur
M.	Gilles TRUAN	Directeur de Recherche INSA Toulouse	Rapporteur
Mme.	Marie-Agnès SARI	Professeur Université Paris Descartes	Examinatrice
Mme.	Marie ERARD	Professeur Université Paris Sud,	Présidente
Mme.	Sophie BERNAD	Maître de Conférences Université Paris Sud	Examinatrice
M.	Pierre SEBBAN	Professeur Université Paris-Sud	Directeur de thèse



## **Remerciements**

*J'aurais attendu la toute fin, avec les ultimes corrections du manuscrit, pour écrire cette partie des remerciements. Ce chapitre vient clôturer une étape importante de ma vie. J'espère réussir à y exprimer toute la gratitude que j'éprouve pour celles et ceux qui m'auront accompagné et aidé, que ce soit dans les bons ou mauvais moments de cette thèse ... et surtout j'espère n'oublier personne !*

**Mes premiers remerciements vont aux membres du Jury :**

*Je suis extrêmement reconnaissant envers Sophie Lecomte et Gilles Truan, rapporteurs de mon manuscrit, pour avoir accepté d'endosser ce rôle. Je les remercie pour le temps qu'ils y ont consacré et pour les précieuses remarques et corrections qu'ils ont apportées. Merci aussi pour les discussions fructueuses que nous avons eues.*

*J'adresse également de vifs remerciements à Marie-Agnès Sari qui a bien voulu examiner l'ensemble de mon travail et à Marie Erard pour avoir présidé le Jury lors de mon audition. Un grand merci pour toutes vos remarques et questions constructives. Je tiens à noter ces quelques mots de Marie : « J'ai été l'une des enseignantes d'Eric et aujourd'hui c'est lui qui se tient face à moi à m'apprendre des choses ». Je n'écris pas ces mots par fierté ou par orgueil, mais parce qu'ils représentent une partie de la conception que j'ai d'être un scientifique. La boucle est bouclée. J'espère avoir aussi cette chance, un jour, d'apprendre de la part d'anciens de mes étudiants.*

**Puis vient le temps de remercier toutes les personnes qui m'ont encadré et accompagné dans mon travail :**

*Je tiens tout d'abord à remercier Pierre Sebban qui a accepté de devenir, en cours de route, mon directeur de thèse lors de son retour du Viêt Nam. Je te dis merci pour ta gentillesse, ta patience (j'ai essayé de ne pas te rendre fou avec toutes les signatures administratives), ton aide dans la construction du manuscrit et pour les discussions scientifiques que nous avons eues.*

*Il me faut également saluer Fabienne Merola, qui a bien voulu être, d'un point de vue officiel, ma directrice de thèse en l'absence de Pierre. Sans cela, ma thèse n'aurait pas pu démarrer et tout ce qui a été accompli, tout ce qui a été vécu, n'aurait pas eu lieu.*

*Sophie, tu es naturellement celle que je considère comme ma Chef (en plus tu aimes bien quand je t'appelle comme ça !). Je te remercie tout d'abord de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer mon stage de M2 puis ma thèse au sein de l'équipe. Tu m'as permis de découvrir et d'avoir accès à un monde dont j'avais beaucoup de choses à apprendre (et dont il me reste encore beaucoup de choses à apprendre d'ailleurs). J'ai eu la chance, grâce à toi, de travailler pleinement dans un domaine qui m'attirait et dont je ne possédais que des bases théoriques. Tu as su me laisser une grande liberté dans ma façon de mener mes travaux et dans mes choix personnels ... et je ne demandais que ça. La thèse n'a pas été un long fleuve tranquille comme tu l'as fait remarquer. Je tiens donc énormément à te remercier (avec Valérie aussi !) de la patience dont tu as fait preuve lorsque j'ai été au plus bas et des efforts déployés pour m'aider à remonter la pente. Je te remercie enfin pour toutes nos discussions scientifiques et pour les précieux conseils qui ont permis de construire, notamment, mon manuscrit et ma présentation orale. Je n'oublie pas également l'aspect humain ... pour nos rires, pour les gâteaux et autres moments culinaires et pour la bonne ambiance dans l'équipe : Merci.*

*Valérie, tu as été tout autant que Sophie une pierre angulaire de ma thèse. Je pourrais écrire un long paragraphe sur toi mais je n'en ferai rien (au risque de te décevoir vu que tu attendais trois pages minimum !). Je ne peux pas exprimer à quel point tu as été extrêmement précieuse, tant sur le plan scientifique qu'humain tout au long de ma thèse. Je ne sais pas où mes pas me conduiront mais j'espère avoir la chance, l'honneur et le privilège, de pouvoir retravailler avec quelqu'un comme toi (ou encore mieux avec toi !). A tous nos fous rires ... ils me manqueront. Fais attention que les plantes carnivores ne te bouffent pas !*

*Ensuite j'aimerais remercier Mehran Mostafavi, directeur du LCP jusqu'en 2014, et Philippe Maitre, directeur du LCP depuis 2015, pour m'avoir autorisé à faire ma thèse au sein du LCP. Merci aussi à Philippe pour m'avoir autorisé à déborder sur une quatrième année afin de finir sereinement la rédaction de mon manuscrit.*

*Dans le cadre de ma thèse, j'ai été amené à effectuer quelques collaborations qui m'ont énormément apporté. Je tiens à adresser des remerciements particuliers à Ewen Lescop et Nadine Assrir qui m'ont accueilli à l'ICSN. Je les remercie bien évidemment pour l'accès aux équipements mais surtout pour les échanges fructueux que nous avons eus. Ils ont toujours fait preuve de bonne humeur à mon égard et c'est une joie d'avoir pu partager des moments conviviaux hors travail avec eux. J'en profite pour saluer l'ensemble de l'équipe de RMN de l'ICSN qui m'a toujours réservé un bon accueil. Je les remercie d'ailleurs pour les nombreuses fois où ils sont venus m'ouvrir la porte !*

*Enfin, j'ai été amené à interagir avec un certains nombres de personnes au sein du laboratoire, qui bien que ne m'ayant pas encadré directement, m'ont tout de même aidé tant sur le plan du travail que sur le plan humain. Je remercie chaleureusement la team second étage : Cécile, Emilie et Stéphanie. Monter au second étage constituait l'une de mes petites pauses favorites. Merci pour tous les bons moments, les potins et autres que nous avons partagés. Cela faisait du bien de râler avec vous ! Je remercie aussi fortement les autres membres de notre équipe : Alexandre, Ariane et Delphine. Mention spéciale à Alexandre et nos parties vidéo ludiques endiablées ... un jour tu seras pro !*

### **A mes amis Orcéens :**

*Arrivé à Orsay à la sortie de prépa, je démarrais une nouvelle étape de ma vie. Même si à 20 ans, on est invincible, cela représente un sacré changement de quitter le cercle familial, de quitter ses amis d'enfance. Fort heureusement, tout au long de ma scolarité et de ma thèse à Orsay, j'ai eu le plaisir et la chance de rencontrer des personnes qui seront à jamais gravées dans ma mémoire et dans mon cœur.*

*Et je ne pourrais pas commencer à évoquer ces personnes sans faire une mention spéciale à Manon. Manon que je n'étais pas vraiment censé rencontrer au départ. Manon qui est mon exacte opposée sur bien des points : je suis plutôt du genre à laisser mes affaires traîner alors qu'elle est plutôt maniaque (dédicace à ce fameux mois d'hébergement), je suis plutôt calme et réservé alors qu'elle est ouverte et toujours toujours toujours (trop :P) enjouée .... Et pourtant par un heureux hasard nous nous sommes croisés. Et peut-être parce que, par nos différences, nous nous complétons si bien, tu as pris une place très importante dans ma vie. Merci pour toutes les aventures que nous*

*avons vécues et merci d'avance pour toutes celles que nous vivrons ! Et, pour reprendre tes mots, je pourrais écrire des pages à ton sujet mais je n'en ferai rien. Un simple MERCI, pour tout.*

*Côtoyer Manon, c'est aussi l'assurance de rencontrer tout un tas de personnes plus cools les unes que les autres. J'en profite donc pour saluer l'incroyable (si si !) Marie, pour laquelle je pourrais également écrire des pages. Tu comptes beaucoup. Il y a aussi Marine et sa voix incomparable, ce pauvre Tom-Tom à qui on (enfin surtout Manon) en fait voir de toutes les couleurs, Clément (It's Ok to be ...) et bien d'autres encore. Enfin, je ne peux penser à Manon sans penser à celle qui me l'a faite connaître : ma marraine de promo Anaïs ! Pour les bons moments que nous avons passés ensemble, pour les merveilleux spectacles de DPL, je te remercie. Un petit coucou à ta famille que j'adore.*

*Puisque je parle de promo, j'en profite pour saluer tous les amis que je me suis fait au sein du Magistère. J'ai vécu des années folles, dont j'avais bien besoin à la sortie de prépa, avec vous. J'adresse une mention spéciale à ma filleule, Emmeline, talentueuse danseuse de salsa et au rire si doux :P ainsi qu'à toute la petite famille dont j'ai eu l'honneur d'être le (grand, arrière grand etc.) parrain : Guillaume, JR (quelle super surprise de t'avoir vu à la soutenance), Cloé, Estelle, Thomas, MC, Juliette, Caroline et certainement d'autres car j'ai fini par perdre le fil. Petites dédicaces à Gurvan, my master, à Thibault, Joseph et tek'Vinz, camarades de soirées, de WEI et de soundpainting.*

*Jérémie, j'aurais pu te classer dans le paragraphe précédent, mais comme tu as été aussi un pote de paillasse, je te mets ici. Je te remercie pour nos nombreuses conversations intéressantes, pour toutes les soirées et je te souhaite un prompt rétablissement. Enormes remerciements à Rolando, mon compagnon de thèse et camarade geek. Nous avons commencé ensemble et enduré ensemble l'épreuve de la thèse. Je te félicite pour le plus beau troll qu'on ne m'ait jamais infligé et je reconnais ma défaite. Je salue également Céline, Lucie et Yoann qui ont tous été des membres de la team second étage et avec lesquels j'ai eu de très bons moments.*

*Je clôturerais ce chapitre sur ma vie orcéenne en ayant une grosse pensée pour tous les étudiants et stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Côté étudiants, mention spéciale pour Mira qui m'aura invité à plusieurs soirées avec d'autres supers élèves ! J'aurais aimé vous enseigner de la chimie pendant toute votre scolarité. Côté stagiaires, je salue Anaïs et Myriam (trop cool que tu sois venue à la soutenance) qui ont été au top ! Je pense aussi à Yacine que j'aurais rapidement rencontré quelques semaines avant ma soutenance (et que j'aurais fait venir un jeudi férié pour rédiger son rapport de stage). Et, évidemment, les meilleures pour la fin : Sysy et Momo qui seront venues chez moi à Arcachon à la suite d'une idée folle (à laquelle je n'ai pas osé dire non ;). Sysy on le sait tous : tu es la meilleure. Morgane, plus sérieusement, je profite de ces remerciements pour te dire que tu es une fille géniale, vraiment (et bien meilleure que tu ne veux te l'accorder). Voilà maintenant tu sais que c'est écrit noir sur blanc dans un manuscrit de thèse. Si tu déprimes, tu n'auras qu'à venir lire ce passage !*

### **A mes amis Bordelais :**

*Avant Orsay et la thèse, j'habitais dans des contrées ensoleillées, bien loin de me douter de tout ce que je vivrais (incroyable ce que ça me paraît loin). J'ai l'immense chance d'en garder un cercle d'amis très fort, pour lesquels je n'hésiterais pas à jurer « à la vie, à la mort ». A vous trois (les*

trois mousquetaires) Yacine, Maxime et Eñaut. Je trouve cela incroyable, qu'après toutes ces années et alors que nous sommes tous partis à droite et à gauche, nous trouvons toujours le temps et l'occasion de nous retrouver à Bordeaux. Ce n'est pas donné à tout le monde. Pour tous les bons moments passés et à venir, merci à vous.

Je ne peux pas songer à Bordeaux sans évoquer la famille Duverdier, un pilier depuis mon enfance. Nicolas, mon plus vieil ami, encore mes félicitations pour ton mariage avec Béné. Alpha du centaure te salue.

Enfin, j'aimerais remercier sincèrement M. Nadal, mon prof de Physique-Chimie au lycée, qui a su me passionner pour la Chimie. C'est là que tout a commencé pour moi

**A mes amis ... inclassables :**

Parce que je ne peux pas vraiment vous associer à Bordeaux ou Orsay, mais parce que vous avez tous représenté un élément important de ma vie à un moment ou un autre de ces dernières années, je vous ai fait une petite catégorie rien que pour vous. A vous, Marlène (vive la pizza !), Noémie (mes parents sont toujours d'accord pour qu'on se marie), Nesma (que dire à part courage et que tu peux toujours compter sur moi), Mallauray et Arnaud. A toutes celles et ceux également que j'oublie de mentionner. Ce n'est pas volontaire, vous vous en doutez, mais vous comptez tous !

**A ceux de mon cœur, tout simplement :**

Mes derniers remerciements vont à ma famille. A mes parents, qui doivent encore se demander comment leur fils a pu se retrouver dans la Chimie et qui n'ont toujours pas compris mon sujet de thèse, je vous remercie pour votre patience, pour votre soutien et pour tout le reste. A mes grands-parents, qui se font certainement plus de soucis que moi sur mon avenir ! J'espère que vous me verrez accomplir encore de nombreuses choses. Je vous aime tous.

A mon Tonton, je te dédie cette thèse. Tu es dans chaque page.



## **Introduction générale**



La neuroglobine (Ngb) est une protéine découverte en 2000 par le Docteur Burmester (Burmester, Weich, & Reinhardt, 2000). Elle appartient à la grande famille des globines, des protéines essentielles au bon fonctionnement et à la survie du corps humain et de nombreuses autres espèces. Bien que sa structure tridimensionnelle soit similaire à celles des globines classiques, comme l'hémoglobine (Hb) ou la myoglobine (Mb), la Ngb possède plusieurs particularités structurales. Notamment, il a été mis en évidence que l'hème de la Ngb, une protoporphyrine IX qui constitue son site actif, est hexacoordiné par un ligand distal endogène, une histidine. Chez l'Hb ou la Mb, l'hème est hexacoordiné par une molécule d'eau ou est pentacoordiné. Il a également été relevé *in vitro* que l'hème existe sous deux conformations, aux proportions respectives non négligeables, isomères l'une de l'autre par une rotation de 180°. Chez les globines plus classiques, seule une forme isomère prédomine. Un dernier élément structural qui n'existe pas chez l'Hb ou la Mb est la présence d'un pont disulfure intramoléculaire, dont l'état d'oxydation pourrait être impliqué dans des mécanismes structuraux.

Les nombreuses particularités structurales de la Ngb semblent indiquer une ou des fonctions biologiques différentes de celles des globines classiques Hb et Mb. De plus la Ngb a été principalement localisée dans le cerveau. Elle y est cependant présente dans des concentrations trop faibles pour assurer les rôles classiques de transport et stockage du dioxygène comme les autres globines. Aussi la principale fonction *in vivo* de la Ngb reste encore inconnue à ce jour. Sa localisation particulière dans le cerveau en fait néanmoins une cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre les maladies du système nerveux central. Les maladies neuronales, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la chorée de Huntington représentent l'une des catégories de maladies graves les plus répandues. Ces maladies résultent de diverses pathologies du cerveau, comme l'ischémie, l'hypoxie ou la dégénérescence neuronale. Plusieurs corrélations entre l'expression de la Ngb et des effets protecteurs contre ces dysfonctionnements du système nerveux ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo* chez différentes espèces (Ascenzi et al., 2016). Plusieurs voies de protection comprenant une intervention de la Ngb impliquent son site actif. Notamment, sa capacité à fixer des ligands, comme des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS), serait primordiale (Ascenzi et al., 2016).

Malgré plus de 500 articles publiés sur la Ngb depuis sa découverte, l'influence des particularités structurales de la Ngb humaine sur ses potentielles fonctions demeure mal comprise et peu explorée. Nous nous sommes alors intéressés durant la thèse à étudier le comportement *in vitro* de la Ngb et de son site actif en fonction de ses particularités structurales. Pour ce faire, nous avons réalisé des mutations de différents acides aminés positionnés à des endroits potentiellement clés pour la structure et la fonction de la protéine. L'objectif est de mettre en évidence, à l'aide du rôle de ces acides aminés essentiels, des corrélations entre les différentes particularités structurales de la Ngb et leurs implications sur la réactivité de la protéine.

Après un premier chapitre introductif détaillant l'étendue actuelle des connaissances sur les particularités structurales et les fonctions présumées de la Ngb, le Chapitre II abordera les caractéristiques des différentes techniques (UV-Visible, Dichroïsme Circulaire et Résonance Magnétique Nucléaire) utilisées durant la thèse pour analyser l'impact des mutations sur la structure et la réactivité de la Ngb. Ces techniques permettent d'explorer différents aspects de la protéine. Un intérêt particulier peut ainsi être porté sur l'hème et son environnement, sur l'influence du pont disulfure intramoléculaire, ainsi que sur la structure secondaire de la protéine. Cette partie servira

également à présenter le protocole de synthèse et de purification des protéines qui a fait l'objet d'optimisations durant la thèse.

Nous avons tout d'abord déterminé les propriétés spectrales et structurales des variants, qui seront présentées en Chapitre III. Les différentes caractérisations réalisées et leurs comparaisons avec les propriétés de la Ngb WT (sauvage) mettront en évidence l'impact de certains acides aminés sur l'hème et son environnement d'une part, et sur la structure secondaire de la protéine d'autre part. Une attention particulière sera portée à l'effet de l'état d'oxydation du pont disulfure sur les caractéristiques de la Ngb WT et des variants. Nous avons ensuite réalisé, dans la Chapitre IV, une étude du comportement de la protéine et des variants dans des conditions dénaturantes, en faisant varier le pH. Cette étude permettra de révéler les rôles structurants de plusieurs acides aminés non seulement sur la structure secondaire de la protéine mais aussi sur le positionnement et la stabilité de l'hème au sein de la protéine. Les études cinétiques de fixation du cyanure sur la Ngb WT et les différents variants seront détaillées dans le Chapitre V. La cinétique de fixation du cyanure présente l'avantage de pouvoir être étudiée par les différentes techniques utilisées et ainsi de prendre en compte l'influence de différents paramètres, comme l'isomérisation de l'hème ou l'état d'oxydation du pont disulfure. Nos résultats fournissent une première approche expérimentale *in vitro* des mécanismes réactionnels expliquant la réactivité particulière de la Ngb. En couplant les résultats et les analyses faites lors de cette thèse, nous montrerons dans une partie discussion au Chapitre VI que la réactivité de la Ngb met en jeu un mécanisme coopératif entre différentes parties structurales de la protéine, lui procurant une réactivité inédite.

## **Sommaire**

<b>INDEX DES ABREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>A. La Neuroglobine et la superfamille des globines</b>	<b>8</b>
1. La superfamille des globines	8
i. Généralités sur les globines	8
ii. Propriétés communes des globines	10
2. La Neuroglobine (Ngb)	12
i. Découverte et localisation	12
ii. La Ngb dans la famille des globines	12
<b>B. Fonctions biologiques potentielles de la Neuroglobine</b>	<b>14</b>
1. Ngb et apoptose	15
i. Expression de la Ngb dans des conditions d'hypoxie ou d'ischémie	15
ii. La Ngb et les mitochondries	15
2. Ngb et stress oxydant	17
i. Expression de la Ngb dans des conditions de stress oxydant	17
ii. Ngb et activité d'inhibiteur de dissociation de guanine	17
<b>C. Caractéristiques structurales et propriétés de la Ngb</b>	<b>18</b>
1. Structure tridimensionnelle de la Ngb	18
i. Structure de type globine	18
ii. Cavités internes	19
2. Environnement de l'hème de la Ngb	20
i. Hexacoordination	20
ii. Hexacoordination et stabilité de la protéine	22
iii. Isomérisation de l'hème	24
3. Pont disulfure intramoléculaire	25
i. Localisation	25
ii. Influence du pont disulfure	26
<b>D. Cinétiques de fixation et de dissociation de ligands chez la Ngb</b>	<b>26</b>
1. Introduction à la cinétique de fixation de ligands	26
i. Schéma réactionnel de la fixation d'un ligand chez la Ngb	27
ii. Etat d'oxydation du fer <i>in vitro</i>	27
2. Cinétiques et sites de fixation de ligands	28
i. Etudes par stopped-flow	28
ii. Etudes par flash-photolyse	29
3. Facteurs influençant la cinétique de fixation de ligands	30
i. Formes isomères de l'hème	30
ii. Pont disulfure	31
iii. Cavités internes	31
<b>E. Conclusion</b>	<b>32</b>

## **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 35**

<b>A. Spectrophotométrie d'absorption Ultraviolet-Visible</b>	<b>38</b>
1. Spectrophotométrie UV-Visible stationnaire	38
i. Caractéristiques techniques	38
ii. Conditions d'utilisation - Détermination du coefficient d'extinction molaire : méthode de la pyridine hémochrome	38
iii. Condition d'utilisation - cinétique de fixation du cyanure	39
2. Spectrophotométrie résolue en temps : Montage stopped-flow	40
i. Principe	40
ii. Caractéristiques techniques	41
iii. Conditions d'utilisation	42
iv. Exploitation des données	43
3. Lecteur de plaques - Expériences de stabilité en fonction du pH	43
i. Caractéristiques techniques	43
ii. Conditions d'utilisation	44
iii. Exploitation des données	44
<b>B. Dichroïsme circulaire (DC)</b>	<b>45</b>
1. Principe	45
2. Caractéristiques techniques	46
3. Conditions d'utilisations	46
4. Exploitation des données	47
<b>C. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)</b>	<b>48</b>
1. Principe	48
2. Caractéristiques techniques	50
3. Conditions d'utilisation	50
4. Exploitation des données	50
<b>D. Expression et purification de protéines</b>	<b>51</b>
1. Construction du plasmide pour l'expression des protéines	51
2. Transformation dans des bactéries compétentes	52
3. Purification des protéines	52
4. Oxydation/réduction du pont disulfure	54
<b>E. Conclusion</b>	<b>55</b>

## **CHAPITRE III : CARACTERISATION DE LA NGB ET DES VARIANTS ETUDIES 57**

<b>A. Présentation des variants étudiés</b>	<b>60</b>
1. Mutation de l'histidine 64 (E7)	60
2. Mutation de la cystéine 46 (CD5)	61
3. Mutation de la phénylalanine 106 (G5)	61
4. Mutation de l'alanine 90 (F2)	62
<b>B. Caractérisation UV-Visible de la Ngb et des variants</b>	<b>62</b>
1. Caractéristiques UV-Vis du spectre de la Ngb WT <sub>ox</sub>	63
2. Effet des mutations sur le spectre UV-Visible de la Ngb	64
3. Effet du pont disulfure	66

4.	Détermination du coefficient d'extinction molaire de la Ngb et des variants	69
<b>C.</b>	<b>Caractérisation structurale par Dichroïsme Circulaire (DC)</b>	<b>73</b>
1.	Cas de la Ngb WT : comparaison DC et cristallographie	73
2.	Effet des mutations sur la structure secondaire de la Ngb	75
<b>D.</b>	<b>Caractérisation par RMN</b>	<b>79</b>
1.	Spectre RMN de la Ngb WT <sub>ox</sub>	79
2.	Effet du pont disulfure sur le spectre RMN	80
3.	Effet des mutations Ngb A90P et Ngb F106L	82
4.	Effets de la mutation Ngb H64V	83
<b>E.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>86</b>

## **CHAPITRE IV : ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA NGB WT ET DE SES VARIANTS EN FONCTION DU PH**

<b>A.</b>	<b>Influence du pH sur la dissociation de l'hème</b>	<b>92</b>
1.	Dissociation de l'hème chez la Ngb WT <sub>ox</sub>	92
2.	Stabilité de l'hème de la Ngb WT <sub>red</sub>	95
3.	Effet de la mutation Ngb H64V <sub>ox</sub>	96
4.	Effet de la mutation Ngb A90P	98
5.	Effet de la mutation Ngb F106L	99
<b>B.</b>	<b>Influence du pH sur la structure secondaire de la Ngb WT et des variants</b>	<b>102</b>
1.	Structure secondaire de la Ngb WT <sub>ox</sub> en fonction du pH	102
2.	Effet des mutations	103
3.	Effet du pont disulfure	105
<b>C.</b>	<b>Réversibilité d'entrée/sortie de l'hème chez la Ngb</b>	<b>108</b>
1.	Phénomène d'entrée/sortie de l'hème chez la Ngb WT <sub>ox</sub>	108
2.	Influence du pont disulfure sur le phénomène de réversibilité d'entrée/sortie de l'hème	111
3.	Effet de la mutation F106L	112
4.	Effet de la mutation A90P	113
<b>D.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>115</b>

## **CHAPITRE V : ETUDE DE LA FIXATION DU CYANURE**

<b>A.</b>	<b>Modèle cinétique</b>	<b>120</b>
1.	Modèle cinétique général de fixation du cyanure sur la Ngb	120
2.	Expression des concentrations en fonction du temps en RMN	121
3.	Expressions des concentrations en fonction du temps en UV-Visible	122
<b>B.</b>	<b>Cinétique de fixation du cyanure sur la Ngb WT<sub>ox</sub></b>	<b>124</b>
1.	Corrélation RMN et UV-Visible à une concentration de 0,5 mM en cyanure	124
i.	Résultats en RMN	124
ii.	Comparaison des résultats en RMN et en UV-Visible	125
2.	Influence de la concentration en cyanure sur la cinétique de fixation du cyanure	128
i.	Spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps	128



ii. Utilisation d'un montage stopped-flow	129
<b>C. Effet des mutations sur la fixation du cyanure</b>	<b>133</b>
1. Effet des mutations A90P et F106L	133
i. Etude par RMN	133
ii. Influence de la concentration en cyanure	134
2. Effet de la mutation Ngb H64V <sub>ox</sub>	139
i. Modèle cinétique	139
ii. Cinétique de fixation du cyanure	140
iii. Comparaison Ngb WT <sub>ox</sub> et Ngb H64V <sub>ox</sub>	142
<b>D. Effet du pont disulfure</b>	<b>146</b>
1. Cinétiques de fixation du cyanure chez la Ngb WT <sub>red</sub> et la C46G	146
i. Comparaison des résultats en RMN	146
ii. Comparaison des résultats en UV-Visible	148
2. Cinétiques de fixation du cyanure chez les variants Ngb A90P <sub>red</sub> et Ngb F106L <sub>red</sub>	150
i. Comparaison des résultats en RMN	150
ii. Influence de la concentration en cyanure	151
<b>E. Conclusion</b>	<b>156</b>
<b>CHAPITRE VI : DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	<b>157</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>170</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>187</b>



## **Index des abréviations**



CAM :	Iodoacétamide
DTT :	Dithiothréitol
Da :	Dalton
DC :	Dichroïsme circulaire
E.Coli :	Escherichia Coli
GDP :	Guanosine diphosphate
GTP :	Guanosine triphosphate
Hb :	Hémoglobine
Mb :	Myoglobine
Ngb :	Neuroglobine
Ngb 3M :	Neuroglobine avec les mutations de la cystéine 46 en glycine, cystéine 55 en sérine et cystéine 120 en sérine
Ngb A90P :	Neuroglobine avec la mutation de l'alanine 90 en proline
Ngb C46G :	Neuroglobine avec la mutation de la cystéine 46 en glycine
Ngb H64V :	Neuroglobine avec la mutation de l'histidine 64 en valine
Ngb F106L :	Neuroglobine avec la mutation de la phénylalanine 106 en leucine
« Protéine » WT :	« protéine » sauvage
Ngb X <sub>ox</sub> :	Neuroglobine X (X désignant WT, A90P, C46G, H64V ou F106L) avec le pont disulfure oxydé
Ngb X <sub>red</sub> :	Neuroglobine X (X désignant WT, A90P, C46G, H64V ou F106L) avec le pont disulfure réduit
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
RNS :	Espèces réactives de l'azote
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
Xe :	Xénon (cavité)



## **Chapitre I : Introduction**





Ce chapitre introductif est découpé autour de quatre axes. La famille des globines et le positionnement de la Ngb au sein de cette famille seront tout d'abord présentés. Nous soulignerons notamment l'opposition entre les globines classiques comme l'Hb ou la Mb qui ont des séquences en acides aminés très similaires et la Ngb dont la séquence en acides aminés est plus unique. Les principales pistes sur les potentielles fonctions biologiques de la Ngb seront ensuite brièvement décrites. Nous exposerons ainsi différents modes d'action de la Ngb. Ces modes d'action sont dépendants des particularités structurales de la Ngb. Ces principales particularités structurales seront détaillées dans une troisième partie. Nous porterons un intérêt particulier à l'hème de la Ngb, qui constitue son site actif. Enfin, étant donné que plusieurs fonctions potentielles de la Ngb impliquent sa capacité à interagir avec des ligands externes, les différentes études *in vitro* sur la réactivité de la Ngb avec des ligands externes seront résumées en dernière partie. Nous en profiterons pour introduire les différentes approches réalisées sur les facteurs pouvant influencer ces réactivités.

## A. La Neuroglobine et la superfamille des globines

### 1. La superfamille des globines

#### i. Généralités sur les globines

L'ensemble des familles de globines chez les différentes espèces constitue une superfamille de protéines. En effet, les globines s'expriment chez les trois grands domaines du vivant (Figure I. 1) : les eucaryotes, les bactéries et les archées (Woese, Kandler, & L., 1990). L'analyse et la comparaison des séquences de protéines homologues de différents organismes permettent de remonter à une origine commune datant de plus de 4 milliards d'années (Hardison, 1996; S.N. Vinogradov, Hoogewijs, Bailly, Arredondo-Peter, & Gough, 2006; S. N. Vinogradov et al., 2007; S. N. Vinogradov & Moens, 2008). Cette famille semble s'être développée à partir d'un même ancêtre commun apparu en même temps que le dioxygène sur Terre (Lane, 2003).

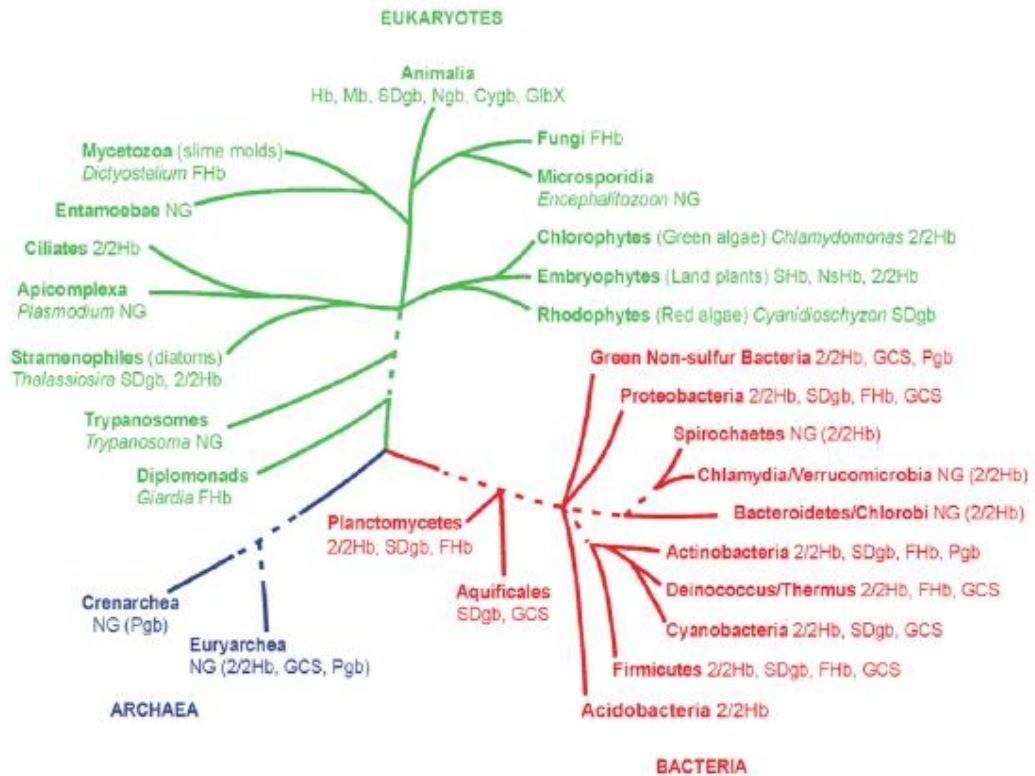


Figure I. 1- Arbre schématisé présentant les relations phylogénétiques des différentes globines dans les trois domaines de la vie (Woese et al., 1990).

Le repliement tridimensionnel caractéristique des globines (J. C. Kendrew et al., 1960; Perutz, 1979), est constitué de huit hélices  $\alpha$  (Figure I. 2), nommées de A à H. Les six principales hélices (A, E, F d'une part et B, G, H d'autre part) sont réparties en deux couches face-à-face selon un schéma de type 3-3. L'hélice E forme la partie distale au-dessus de l'hème et l'hélice F forme la partie proximale en-dessous de l'hème (Bashford, Chothia, & Lesk, 1987).

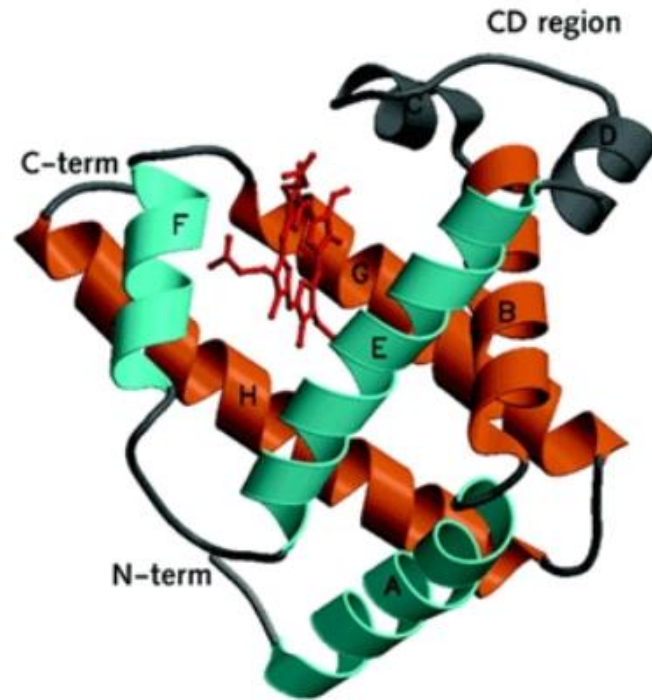


Figure I. 2- Structure tridimensionnelle classique d'une globine. Exemple de la Mb de grand cachalot (A. Pesce, Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S. , 2002). L'hème est représenté en rouge. Les deux couches d'hélices formant le schéma de type 3-3 caractéristique du repliement des globines sont représentées en bleu et orange respectivement. La nomenclature (lettres A à H) des hélices est représentée sur chaque hélice correspondante.

Les globines possèdent généralement un hème de type b. Cet hème b est une protoporphyrine IX avec un atome de fer au centre (Figure I. 3). Ce groupe prosthétique n'est pas lié de façon covalente au reste de la protéine comme dans le cas du cytochrome c. L'atome de fer peut avoir différents états d'oxydation. L'hème constitue le site actif de la protéine, siège de réactions chimiques. Il est impliqué dans plusieurs processus biologiques comme le transport de petits ligands, la capture d'espèces toxiques ou dans des réactions d'oxydoréduction.

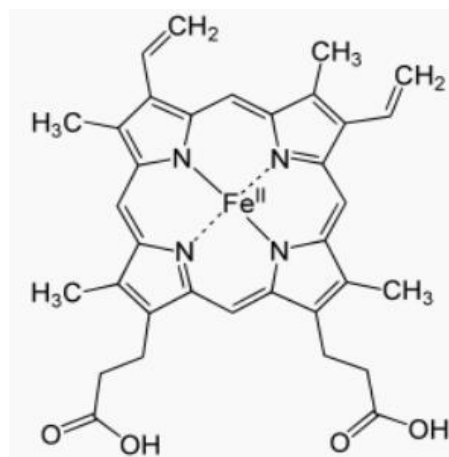


Figure I. 3- Hème b.

## Chapitre I : Introduction

Deux globines ont particulièrement été étudiées, l'Hémoglobine (Hb) et la Myoglobine (Mb). L'Hb est une protéine assurant le transport du dioxygène dans les vaisseaux sanguins vers les tissus (M. Brunori, 1999; Imai, 1999; Perutz, 1990; Scholander, 1960). Elle existe sous forme de tétramère constitué de deux sous-unités  $\alpha$  et deux sous-unités  $\beta$ . La Mb se situe au niveau des muscles des vertébrés. Sa fonction principale est d'assurer le stockage et la diffusion de  $O_2$  dans ces organes et elle est requise dans des mécanismes de détoxification de NO (M. Brunori, 2001; Flogel, Merx, Godecke, Decking, & Schrader, 2001; Frauenfelder, McMahon, & Fenimore, 2003; Merx et al., 2001; Ordway & Garry, 2004; Weber & Vinogradov, 2001; B. A. Wittenberg & Wittenberg, 1989; J. B. Wittenberg & Wittenberg, 2003). La structure de la Mb fut la première déterminée expérimentalement par diffraction aux rayons X (J. C. Kendrew & Parrish, 1957). A l'opposé de ces deux globines ubiquitaires représentant la Superfamille des globines, il existe dans la grande diversité des globines, des protéines aux structures différentes. Notamment, une famille de « globines tronquées » possède six hélices au lieu de huit, réparties suivant une structure de type 2-2 hélices  $\alpha$  (A. Pesce, Couture, M., Dewilde, S., Guertin, M., Yamauchi, K., Ascenzi, P., 2000).

En 1999, Ptitsyn et al. (Ptitsyn & Ting, 1999) se sont intéressés à l'évolution moléculaire de la Superfamille des globines pour mieux comprendre le lien entre leur fonction et leur diversité.

### ii. Propriétés communes des globines

Afin d'identifier des résidus « clés » dans le fonctionnement des globines, Ptitsyn et al. (Ptitsyn & Ting, 1999) ont comparé les alignements de 728 séquences différentes de globines provenant d'organismes appartenant aux trois grands domaines du vivant. Ces auteurs ont ainsi pu mettre en évidence que plus de 50 % des séquences possédaient des acides aminés conservés pour 23 positions données dans la séquence. Sur la Figure I. 4 sont répertoriés en vert les résidus qui interagissent directement avec l'hème b, en bleu les résidus situés au voisinage de l'hème b et en rouge les résidus non fonctionnels conservés. La nomenclature utilisée pour décrire les résidus sur cette figure est une lettre (A à H) et un nombre correspondant respectivement à l'hélice  $\alpha$  et à la position sur l'hélice  $\alpha$ . Par exemple le résidu E4 correspond au quatrième résidu de l'hélice E. Les résidus constituant les boucles entre deux hélices sont désignés par les lettres des deux hélices, comme par exemple le résidu CD1 de la boucle CD.

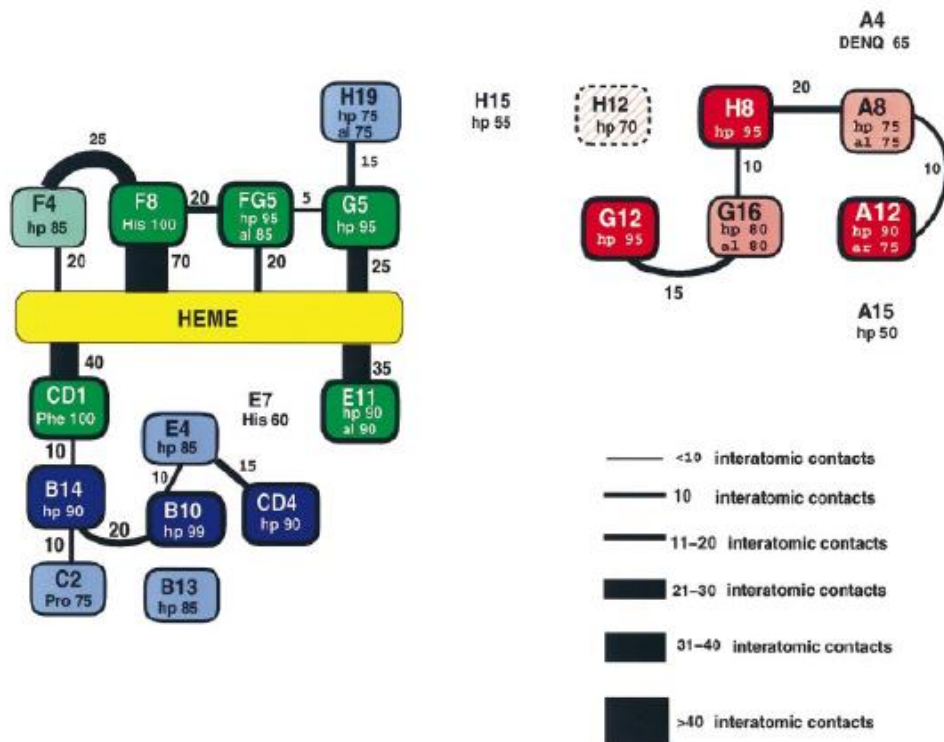


Figure I. 4- Schéma représentant les résidus ou types de résidus partiellement conservés ( $\geq 50\%$ ) chez 12 sous-familles de globines. Dans chaque case sont indiqués la position du résidu, le nom ou le type (hydrophobe hp, aliphatique al) de résidu concerné et son pourcentage de conservation. Vert : résidus qui interagissent directement avec l'hème b. Bleu : résidus situés au voisinage de l'hème b. Rouge : résidus non fonctionnels conservés (Ptitsyn & Ting, 1999).

Un premier point important est la conservation à 100% de l'histidine en F8 dans les différentes séquences. Cette histidine est le résidu qui lie le fer du côté proximal. Deux autres groupes de résidus fonctionnels, en interaction avec le site actif de la protéine, sont très conservés entre les différentes protéines. Un premier groupe concerne six résidus en interaction directe avec l'hème : CD1, E11, F4, F8, FG5 et G5. Ils sont considérés comme interagissant avec l'hème car leur centre de masse est à moins de 5 Å de l'hème. Le deuxième groupe concerne des résidus dans le proche environnement de l'hème mais n'interagissant pas directement avec lui : B10, B14, C2, CD4, E4 et H19. Un dernier groupe de résidus conservés implique les résidus des chaînes A, G et H : A8, A12, G12, G16, H8 et H12. Ces résidus n'interagissent pas avec le site actif mais présentent un nombre élevé de contacts interatomiques entre eux. Il faut noter la présence du résidu E7, une autre histidine conservée à 60%, qui se situe dans le proche environnement distal de l'hème.

Les résidus conservés constituent classiquement le noyau rigide, partie centrale peu flexible, de la protéine. Des études réalisées sur les structures cristallographiques des principales globines de vertébrés (Yonetani & Laberge, 2007) montrent que des résidus situés dans les hélices C, E et F et dans les boucles CD, EF et GH sont au contraire flexibles. Ceci souligne une autre particularité de la structure générale des globines, à savoir que les hélices  $\alpha$  sont plus ou moins flexibles. Ce point soulève l'importance du profil de rigidité au sein de la protéine avec la mise en évidence de résidus « frontières » à l'origine de cavités les globines.

En effet, l'un des points remarquables concernant les globines est la présence de nombreuses cavités internes (M. Brunori & Gibson, 2001; Carugo & Argos, 1998; Hubbard, Gross, & Argos, 1994; Tilton, Kuntz, & Petsko, 1984; Tomita, 2010). Ces cavités ont un rôle crucial dans la diffusion des ligands externes dans la protéine. Elles seront détaillées dans une prochaine partie de ce chapitre.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons présenter de façon plus détaillée la Neuroglobine (Ngb).

## 2. La Neuroglobine (Ngb)

### i. Découverte et localisation

L'existence de la Ngb fut mise en évidence par Burmester et al. en 2000 (Burmester et al., 2000). En parcourant des bases de données d'ADNs chez l'humain et la souris, les auteurs ont identifié des séquences partielles de type globine ne correspondant ni à la Mb ni à l'Hb. En clonant et séquençant les régions codantes des ADNs chez l'humain et la souris, ils ont exprimé une protéine de 151 acides aminés et de poids moléculaire 17 kDa.

L'expression de la Ngb se fait principalement dans différentes régions du cerveau (Burmester et al., 2000; C. A. Hundahl, Kelsen, & Hay-Schmidt, 2013). Son expression se fait très tôt au cours du développement de l'embryon, lors des étapes de différenciation neuronale (Haines et al., 2013; Simon, 2013). Il a été montré que la Ngb se trouvait également dans le système nerveux central et périphérique et dans certains tissus endocriniens chez l'humain (Hankeln et al., 2004; Qin et al., 2008; S. Reuss et al., 2002) ou chez les rongeurs (C. A. Hundahl et al., 2008; Wystub et al., 2003). Au niveau du système nerveux, la Ngb serait située plus particulièrement dans le cytoplasme des cellules nerveuses au niveau des neurones (Burmester et al., 2000). La présence de Ngb a aussi été détectée dans le réseau neuronal de la rétine chez l'humain (Schmidt et al., 2003) ou chez le rat (Lechauve et al., 2012). Alors que sa concentration totale dans le cerveau n'excéderait pas le  $\mu\text{M}$  (Burmester et al., 2000), sa concentration serait 50 à 100 fois plus grande dans la rétine (Schmidt et al., 2003). Ceci laisserait supposer un rôle différent pour la Ngb dans la rétine et dans le système nerveux.

Des études plus récentes tendent à prouver l'existence de la Ngb dans d'autres organes du corps. En 2012 et 2013, Di Giulio et al. révèlent la présence de la Ngb dans la carotide humaine, un organe essentiel pour la respiration (Di Giulio et al., 2012; Di Giulio et al., 2013). De la Mb et de la Ngb ont été également identifiées au sein de la moelle épinière dans des quantités équivalentes à celles trouvées dans la rétine (D'Aprile et al., 2014). Elles pourraient y jouer un rôle de support en apport d'oxygène dans cet environnement plutôt caractérisé par un appauvrissement en oxygène. Il est aussi montré que les cellules de la moelle épinière ont une activité d'oxyde nitrique réductase, en adéquation avec des possibles fonctions de Mb et Ngb. La Ngb se situerait aussi dans le système auditif chez la souris, le rat et l'humain (S. Reuss et al., 2016) dans des milieux contenant des oxyde nitrite synthèses.

### ii. La Ngb dans la famille des globines

L'étude phylogénétique de la famille des globines suggère que la Ngb est une globine ancienne qui se serait différenciée très tôt des autres globines (Droge, Pande, Englander, & Makalowski, 2012; Roesner, 2005; Schwarze, Singh, & Burmester, 2015). L'arbre phylogénétique

(Figure I. 5) montre que la Ngb se serait différenciée, avec les globines X, des autres globines il y a environ 800 millions d'années alors que la myoglobine et l'hémoglobine ne se seraient séparées entre elles qu'il y a 500 millions d'année environ.

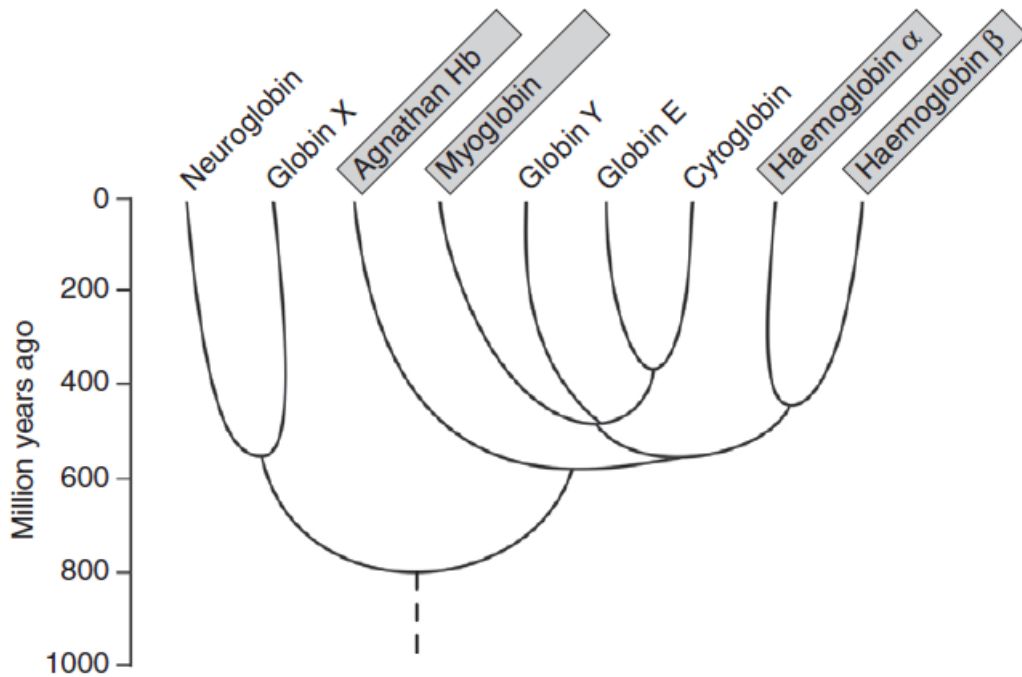
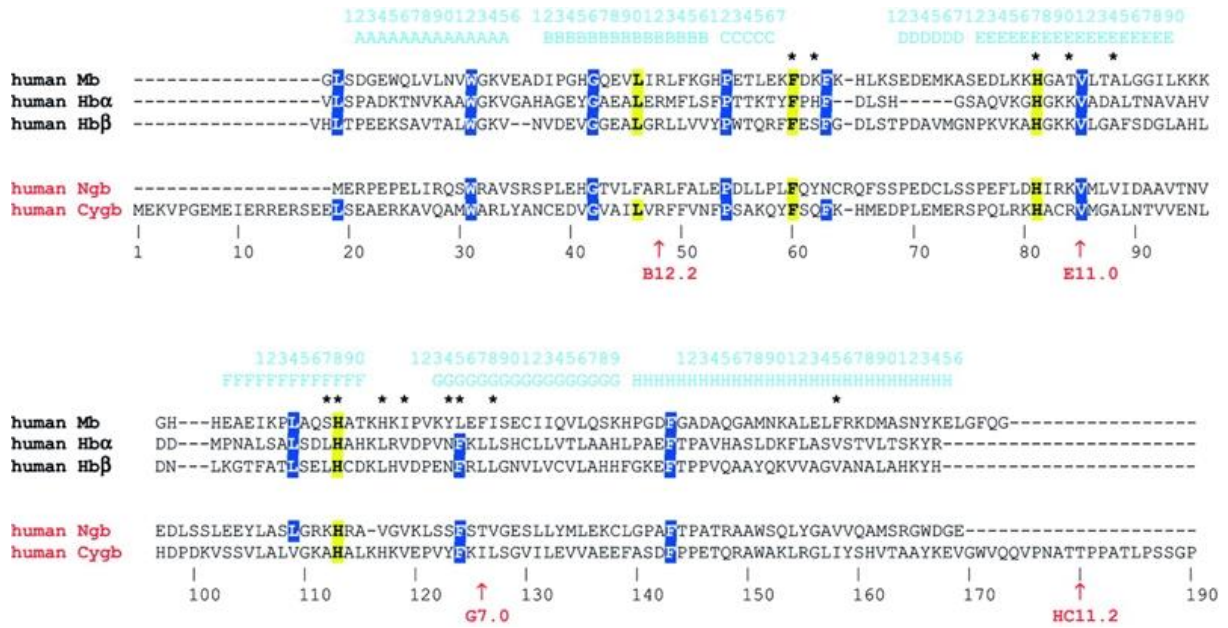


Figure I. 5- Arbre phylogénétique des globines. Les globines grisées interviennent dans le processus respiratoire (Hankeln & Burmester, 2009).

La Ngb possède une faible identité de séquence avec les autres globines humaines (Figure I. 6). Il existe seulement 21% d'identité de séquence entre la Ngb et la Mb et 25% d'identité de séquence entre la Ngb et l' $\alpha$ -Hb (Burmester et al., 2000). En revanche, la comparaison des séquences en acides aminés obtenues entre les Ngb de différentes espèces sont très proches (Van Leuven et al., 2013). Par exemple les Ngb humaine et de souris montre une identité de séquence de 94%. Seulement 77% et 85% d'identité existent lorsque les séquences entre ces deux espèces sont comparées pour l'hémoglobine et la myoglobine respectivement (Burmester et al., 2000; A. Pesce, Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., 2002). La séquence en acides aminés de la Ngb est donc très conservée parmi différentes espèces.

## Chapitre I : Introduction



**Figure 1. 6- Alignement de séquences, de haut en bas, de myoglobine humaine (human Mb), d'hémoglobine alpha humaine (human Hb $\alpha$ ), d'hémoglobine-bêta humaine (human Hb $\beta$ ), de neuroglobine humaine (human Ngb) et de cytoglobine humaine (human Cygb). Les hélices  $\alpha$  sont indiquées par les lettres A à H. Les acides aminés d'importance structurale sont surlignés en bleu, les acides aminés distaux et à proximité de l'hème en jaune (A. Pesce, Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., 2002).**

Le fait d'avoir une faible identité de séquence avec l'Hb ou la Mb, mais une forte identité entre les Ngb de différentes espèces suggère la présence d'acides aminés spécifiques à la Ngb ayant potentiellement un rôle déterminant pour les fonctions de la Ngb. Notamment, chez la Ngb humaine, il existe trois cystéines : C46, C55, et C120 susceptibles de former des ponts disulfures. Elles ne sont pas présentes chez la Mb ou l'Hb. De même, la Ngb du rat possède une cystéine de moins. Une glutamine est présente à la position 46 au lieu d'une cystéine, ce qui peut induire des rôles différents entre les Ngb de différentes espèces.

Cette différenciation de la Ngb par rapport aux autres globines indique que la Ngb ne remplit pas obligatoirement la fonction classique d'autres globines à savoir le transport et le stockage du dioxygène. Mais elle pourrait remplir plusieurs autres rôles possibles. Ces rôles semblent d'ailleurs liés aux différentes localisations de la Ngb dans l'organisme. Nous allons explorer la partie suivante les principales fonctions potentielles de la Ngb actuellement proposées.

## B. Fonctions biologiques potentielles de la Neuroglobine

L'implication possible de la Ngb dans des mécanismes de protection cellulaire a été intensivement étudiée depuis sa découverte (Ascenzi, Gustincich, & Marino, 2014; Brittain, Skommer, Raychaudhuri, & Birch, 2010; M. Brunori & Vallone, 2006, 2007; Dietz, 2011; Z. Yu, Liu, Liu,



Yang, & Wang, 2012) du fait de sa localisation spécifique dans plusieurs régions neuronales du cerveau (Burmester et al., 2000; Casado, Pannell, Whalen, Clauw, & Baraniuk, 2005; Di Giulio et al., 2013; Hankeln et al., 2004; C. A. Hundahl et al., 2013; Laufs et al., 2004). Quelques grands axes autour des modes d'action de la Ngb ont pu être dégagés.

### 1. Ngb et apoptose

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée, c'est-à-dire induite par des signaux spécifiques et contrôlés génétiquement par la cellule. Il existe deux voies d'induction de l'apoptose. La voie extrinsèque est basée sur la fixation de ligands spécifiques à des récepteurs membranaires de la cellule. L'autre voie est la voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale (Vosler, Graham, Wechsler, & Chen, 2009). Elle est induite en réponse à des signaux de mort intracellulaires, comme des dommages à l'ADN causés par des radiations, à du stress cellulaire, causé par exemple par de l'hypoxie. Bien que l'apoptose soit un mécanisme naturel de l'organisme, il existe de nombreuses pathologies, comme Alzheimer ou Parkinson, associées à une activation anormale ou à une inhibition des mécanismes d'apoptose (Lin & Beal, 2006).

#### i. Expression de la Ngb dans des conditions d'hypoxie ou d'ischémie

L'hypoxie et l'ischémie sont deux pathologies associées à une privation de dioxygène dans l'organisme. Il en résulte notamment un stress cellulaire à l'origine du dérèglement des voies apoptotiques.

Comme rappelé en première partie, la fonction principale des globines classiques, à savoir l'Hb et la Mb, est d'assurer le transport et la diffusion du dioxygène dans les organes où elles sont présentes. Cette fonction potentielle de la Ngb a cependant été rapidement écartée dans la mesure où sa concentration à l'état naturel demeure trop faible, de l'ordre du micromolaire pour assurer une telle fonction (Burmester et al., 2000). Même dans la rétine où elle demeure en concentration plus élevée, des simulations numériques récentes, tendent à prouver qu'elle ne sert pas à stocker le dioxygène (Roberts, Gaffney, Luthert, Foss, & Byrne, 2015).

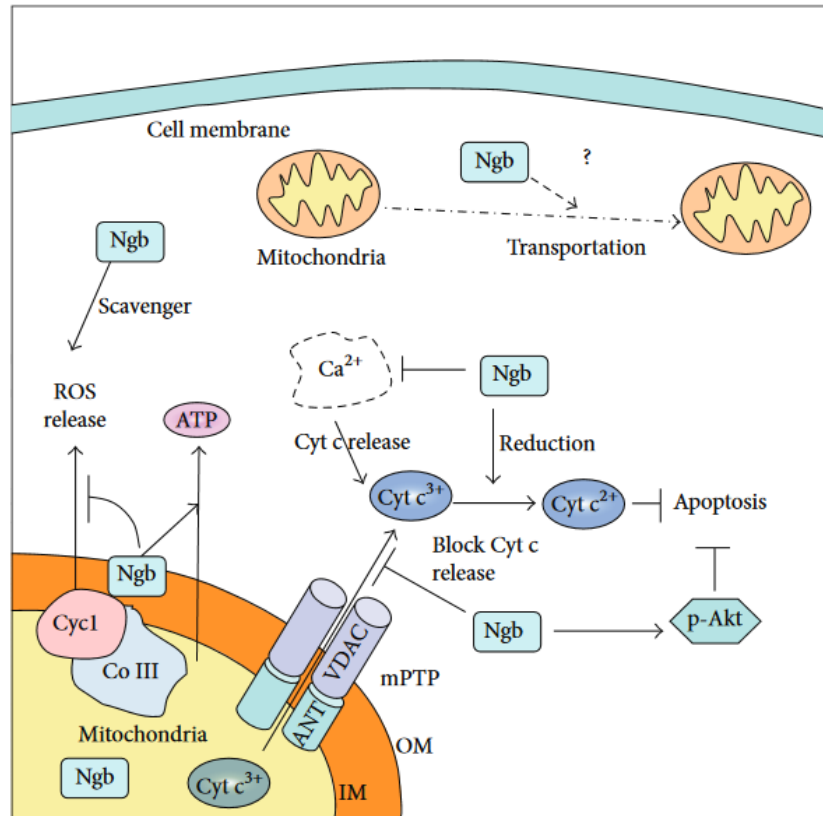
Néanmoins, étant donné la relation particulière entre les globines et le dioxygène, le comportement de la Ngb en fonction de la quantité de dioxygène, et plus particulièrement dans des conditions d'hypoxie ou d'ischémie, a été testé. Beaucoup d'études ont été publiées sur les effets protecteurs de la Ngb dans des conditions de manque de dioxygène. D'une façon générale, il est constaté une surproduction de Ngb dans les tissus impactés par un manque de dioxygène brutal aussi bien chez l'humain (Duong et al., 2009; Fordel, Geuens, Dewilde, De Coen, & Moens, 2004; Fordel et al., 2007; Jin, Mao, Xie, & Greenberg, 2011; Jin, Mao, Mao, Xie, & Greenberg, 2010; Sun, Jin, Mao, Zhu, & Greenberg, 2001) que chez le rat (Y. Liu, Li, Li, & Zou, 2015; Shang et al., 2015). Cette surexpression est corrélée à une augmentation de la survie cellulaire dans ces conditions.

#### ii. La Ngb et les mitochondries

Les mitochondries sont des organites essentiels pour toutes les cellules. Les neurones étant très demandeurs en énergie, les mitochondries y sont un élément d'importance capitale. Elles jouent un rôle clé dans l'apport en énergie au métabolisme, dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et dans l'apoptose.

## Chapitre I : Introduction

Il a été montré un effet bénéfique de la surexpression de la Ngb sur la résistance des mitochondries face à des conditions de privation de dioxygène et face à la surexpression de beta-amyloïdes (Khan et al., 2008; Li, Pouranfar, et al., 2008; J. Liu et al., 2009). Dans la Figure I. 7, un aperçu des fonctions potentielles de la Ngb en relation avec les mitochondries est donné (Z. Yu, Poppe, & Wang, 2013).



**Figure I. 7- Rôles protecteurs potentiels de la Ngb dans les mécanismes mitochondriaux (Z. Yu et al., 2013). En partant du haut : La Ngb pourrait agir sur le transport de molécules de l'intérieur vers l'extérieur des mitochondries ou inversement. Elle pourrait agir en tant que capteur de ROS et permettre le maintien de la production d'adénosine triphosphate (ATP). Elle pourrait inhiber l'augmentation du relargage de cytochrome C (Cyt c), un initiateur d'apoptose, par la mitochondrie dans des conditions dénaturantes provoquées par un influx de calcium  $Ca^{2+}$ . De plus la Ngb ferreuse serait capable de réduire la forme ferrique du Cyt c, qui est la forme efficace pour l'apoptose. Elle serait aussi capable d'empêcher le relargage de Cyt c dans des conditions de manque d'oxygène et de glucose en se fixant aux canaux membranaires VDAC (Voltage-dependent anion channel). Enfin elle pourrait lutter contre l'apoptose en activant les protéines phospho-kinases p-Akt, inhibitrices d'apoptose.**

La Ngb est notamment impliquée dans la préservation de la production d'ATP, qui est le rôle principal des mitochondries. Un maintien, voire une augmentation du niveau de production d'ATP est constaté dans des conditions de stress oxydant ou d'hypoxie pour des cellules neuronales humaines transfectées avec de la Ngb (Antao, Duong, Aran, & Witting, 2010; Duong et al., 2009). L'autre protection principale induite par la Ngb au niveau des mitochondries est sa capacité à inhiber l'action du cytochrome c, un déclencheur des processus apoptotiques (Brittain, Skommer, Henty, Birch, & Raychaudhuri, 2010; Brittain, Skommer, Raychaudhuri, et al., 2010; A. Fago, Mathews, & Brittain, 2008; A. Fago, Mathews, Moens, Dewilde, & Brittain, 2006; Fiocchetti, De Marinis, Ascenzi, & Marino,

2013; Guidolin et al., 2014; Raychaudhuri, Skommer, Henty, Birch, & Brittain, 2010; Skommer & Brittain, 2012; Suto, Sato, Ohba, Yoshimura, & Fujii, 2005; Tiwari et al., 2014; Z. Yu et al., 2013).

## **2. Ngb et stress oxydant**

Les radicaux libres sont des espèces intermédiaires nécessaires à l'organisme pour de nombreuses réactions chimiques. Ils sont principalement représentés par deux familles de composés, à savoir les ROS et les espèces réactives de l'azote (RNS). L'excès de radicaux libres *in vivo*, appelé stress oxydant ou oxydatif, peut être une source de pathologies graves (Delanty & Dichter, 1998; Kim, Noshita, Sugawara, & Chan, 2001; Marzatico & Cafe, 1993; Sugawara & Chan, 2003). Cet excès résulte d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la capacité de notre organisme à les neutraliser. Aussi les systèmes de contrôle et de capteur de radicaux libres sont d'importantes cibles thérapeutiques.

### **i. Expression de la Ngb dans des conditions de stress oxydant**

Dans le cas de la Ngb, plusieurs études montrent une corrélation directe entre la résistance de la cellule à des radicaux libres et la présence de la Ngb dans ces cellules (Antao et al., 2010; Fordel et al., 2006; Fordel et al., 2007; Li, Morris, et al., 2008; Vorasubin et al., 2016). Deux voies expérimentales sont principalement explorées.

La première consiste à évaluer la quantité et l'effet de la Ngb dans des cellules pc12 de type neuronal soumises à un stress oxydant induit par  $H_2O_2$ , en comparant des cellules normales et mutées pour ne plus exprimer la Ngb (Li, Morris, et al., 2008). L'étude montre que chez les cellules mutées, où la Ngb est absente, il y a une grande augmentation des effets négatifs (morts cellulaires, production de ROS/RNS) induits par le stress oxydant. La deuxième voie expérimentale consiste à transfecter la Ngb dans des cellules soumises à des conditions de stress oxydant pour analyser les apports de la présence en Ngb (Fordel et al., 2006; Fordel et al., 2007). Dans ces études, il est montré que l'injection de plasmides codant pour la Ngb dans ces cellules provoque une diminution du taux de mort cellulaire.

Le stress oxydant peut avoir de nombreuses conséquences néfastes. L'un des effets est l'activation non-désirée de protéines suite à leur oxydation. C'est le cas des protéines G qui sont sensibles au stress oxydant.

### **ii. Ngb et activité d'inhibiteur de dissociation de guanine**

Les protéines G appartiennent à une famille de protéines dont l'activation de la fonction dépend de la fixation de guanine. Le ratio entre formes active et inactive peut être modulé notamment par des systèmes d'inhibiteur de dissociation de guanine (GDI) (Bourne, Sanders, & McCormick, 1991; Gilman, 1987; Hepler & Gilman, 1992; Sprang, 1997; Vetter & Wittinghofer, 2001). Cependant, la présence de radicaux libres peut provoquer leur activation non-désirée.

L'homologie de séquence en acides aminés de 25 à 35% entre la Ngb et des GDI conduit à s'intéresser à l'activité GDI potentielle de la Ngb (Wakasugi, Nakano, & Morishima, 2003) (Kitatsuji, Kuroguchi, Nishimura, Ishimori, & Wakasugi, 2007; Takahashi, Watanabe, & Wakasugi, 2013; Wakasugi & Morishima, 2005). Ces études chez le rat mettent en évidence la capacité de fixation de la Ngb ferrique à la sous-unité  $G\alpha$  ce qui entraîne une inhibition de l'activation des protéines G. Chez

l'humain, le rôle de la Ngb en tant que GDI en réponse à un stress oxydant est également confirmé (Watanabe, Takahashi, Uchida, & Wakasugi, 2012; Watanabe & Wakasugi, 2008).

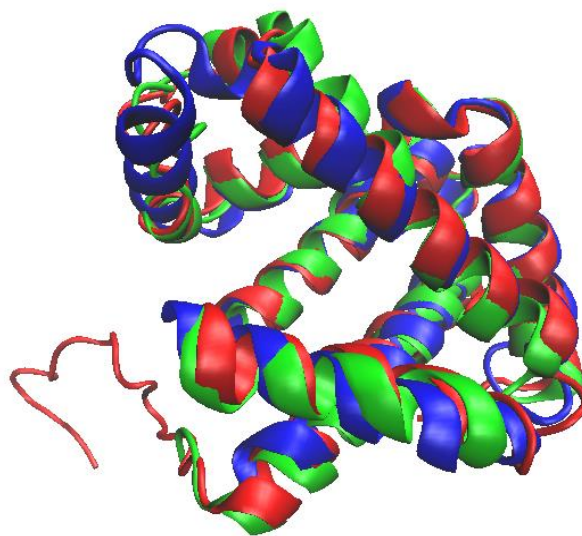
L'ensemble des études montrent une gamme très étendue de fonctions possibles de la Ngb, dépendant de sa localisation et des conditions environnementales. Les caractéristiques structurales particulières de la Ngb représentent une piste pour déterminer ses possibles fonctions.

## **C. Caractéristiques structurales et propriétés de la Ngb**

### **1. Structure tridimensionnelle de la Ngb**

#### **i. Structure de type globine**

Deux structures cristallographiques de la Ngb ont été déterminées (Guimaraes, Hamdane, Lechauve, Marden, & Golinelli-Pimpaneau, 2014; A. Pesce et al., 2003). La première en 2003 correspond à une forme triplement mutée des cystéines C46, C55 et C120 (fichier pdb 1OJ6)(A. Pesce et al., 2003). La seconde comprend deux structures possibles, différenciées par la position de la boucle CD, de la neuroglobine sauvage (fichier pdb 4MPM, (Guimaraes et al., 2014)). Sur la Figure I. 8 sont superposées les structures cristallographiques de la Ngb (Guimaraes et al., 2014), de la Mb (Evans & Brayer, 1990) et de la Cytoglobine (Cgb), une autre globine récemment découverte (Makino et al., 2006). Ces structures tridimensionnelles ont leurs hélices superposables dans l'espace. La Ngb possède donc une structure tridimensionnelle propre à la famille des globines. Elle possède huit hélices  $\alpha$  notées de A à H structurées selon un schéma de type 3-3.

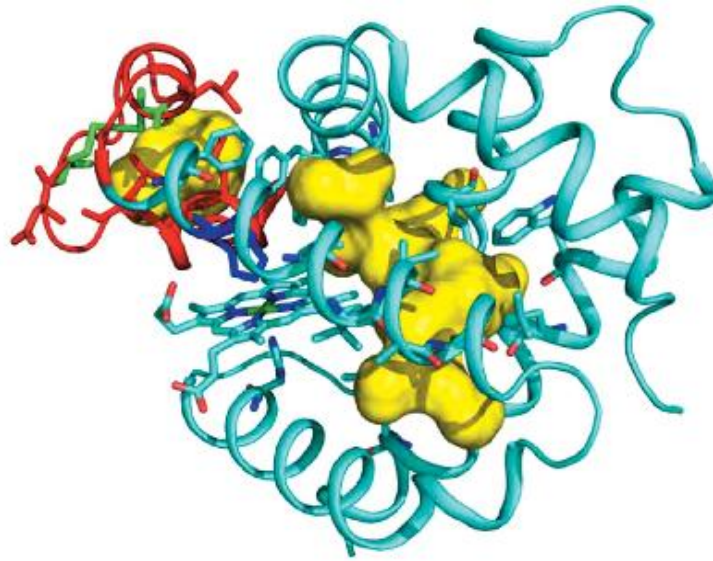


*Figure I. 8- Alignement structural issu de VMD entre Mb en bleu (PDB: 1YMB), Ngb en vert (PDB: 4MPM, chaîne A) et Cgb en rouge (PDB : 2DC3, chaîne A). Figure obtenue à partir du programme VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996).*

Comme indiqué en partie A.2.ii. la Ngb possède une faible identité de séquence avec les autres globines. Les acides aminés spécifiques de la Ngb ne semblent donc pas provoquer de modifications de la structure tridimensionnelle de la Ngb par rapport aux autres globines. Il en résulte tout de même certaines particularités structurales propres à la Ngb. Notamment les cystéines 46 et 55 de la boucle CD sont suffisamment proches dans l'espace pour former un pont disulfure intramoléculaire (D. Hamdane et al., 2003). De même l'histidine 64 se retrouve assez proche du fer de l'hème pour s'y lier. Enfin, certains acides aminés dessinent un réseau de cavités unique à la Ngb.

### ii. Cavités internes

La structure tridimensionnelle de la Ngb WT fait apparaître deux cavités principales (Figure I. 9). La plus large cavité est entourée de résidus apolaires et se trouve en partie sur la face distale de l'hème. Elle est fortement hydrophobe et inaccessible au solvant. L'existence de cavités a déjà été bien étudiée chez les globines (M. Brunori & Gibson, 2001; M. Brunori et al., 2000; Ouellet, Milani, Couture, Bolognesi, & Guertin, 2006; Scott & Gibson, 1997; Tilton et al., 1984). Cependant cette cavité distale de l'hème de la Ngb ne peut être comparée aux cavités classiques des autres globines à cause de sa grande taille et de son caractère hydrophobe. L'autre cavité, plus petite, est localisée au niveau de la boucle CD. Elle est inaccessible au solvant mais est connectée à la partie distale de l'hème.



**Figure I. 9- Cavités internes chez la Ngb WT humaine (pdb : 4MPM-2). Les cavités sont représentées en jaune. La plus grande cavité, en partie située du côté distal de l'hème, fait 225 Å<sup>3</sup>. La plus petite, située au niveau de la boucle CD, fait 60 Å<sup>3</sup> (Guimaraes et al., 2014).**

L'existence de ces cavités est notamment régulée par l'état de coordination du fer et par l'état d'oxydation du pont disulfure (A. Bocahut, Bernad, Sebban, & Sacquin-Mora, 2009). La présence d'autres cavités, de type Xénon, correspondantes aux cavités présentes dans les autres globines ont alors été identifiées chez l'homme et la souris, avec des acides aminés conservés définissant ces structures (Figure I. 10) (Anselmi, Brunori, Vallone, & Di Nola, 2007; A. Bocahut et al., 2009; Orłowski & Nowak, 2008; A. Pesce et al., 2004). Ces cavités sont mises en évidence par diffraction aux rayons X sous pression de xénon, qui vient alors se fixer dans les cavités hydrophobes.

Cavités	Acides aminés entourant la cavité
Poche distale	L27, F28, F32, L31, L38, F42, F61, H64, L67, V68, V109, Hème
Xe2	I72, A75, V109, L113, W137
Xe3	A75, L85, L89, L136, V140
Xe4	W13, L27, F28, I65, M69, I72, L113, M116

Figure I. 10- Liste des acides aminés formant les cavités chez la Ngb. (Orlowski & Nowak, 2008). Ce sont les acides aminés dont la chaîne latérale est orientée vers la cavité à laquelle ils sont associés. Le numéro des cavités a été choisi en comparant leurs positions à celles des cavités Xe de la Mb WT.

## 2. Environnement de l'hème de la Ngb

### i. Hexacoordination

Une particularité de la Ngb est qu'elle possède un sixième ligand endogène autour du fer de l'hème (Burmester et al., 2000; Couture, Burmester, Hankeln, & Rousseau, 2001; S. Dewilde et al., 2001). A l'inverse, les globines classiques comme l'Hb ou la Mb ont leur hème dans un état pentacoordiné en l'absence de ligands externes. La Ngb est donc dite hexacoordinée. La position de l'hème (Figure I. 11) est observable avec les deux histidines axiales qui interagissent avec l'hème. L'histidine proximale est l'histidine 96 notée également F8. L'histidine distale est l'histidine 64 ou E7. La Ngb est la première globine découverte présentant cette particularité. L'hexacoordination est présente pour les deux états d'oxydation du fer, ferreux  $Fe^{2+}$  et ferrique  $Fe^{3+}$ , de l'hème.

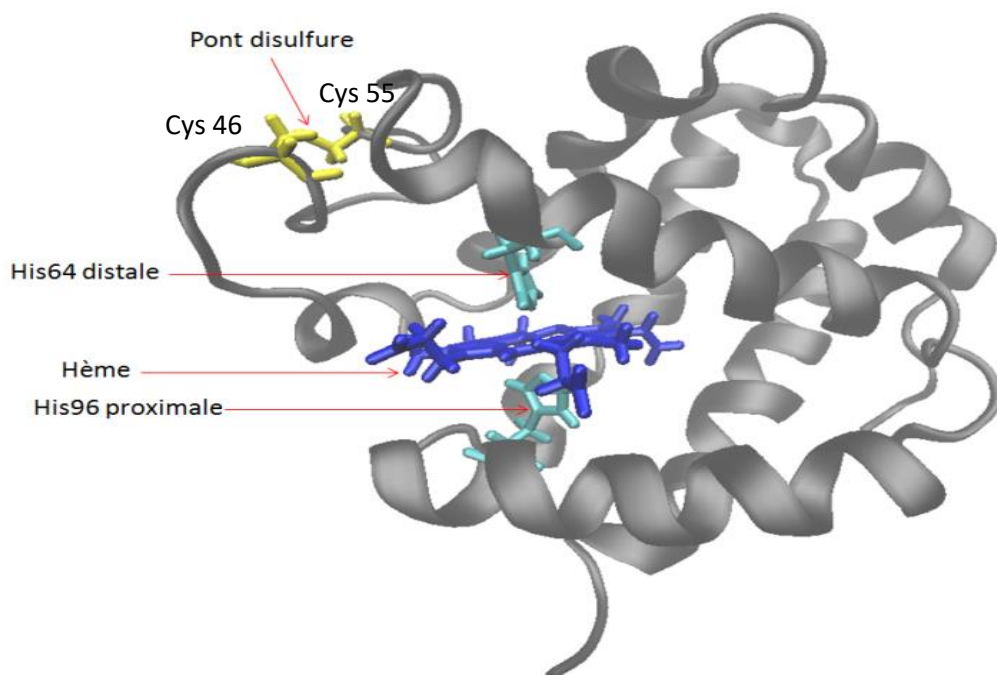


Figure I. 11- Structure de la Ngb avec mise en évidence de la position de l'hème, des deux histidines axiales et du pont disulfure (PDB : 1NSH). Figure obtenue à partir du programme VMD (Humphrey et al., 1996).

L'état d'oxydation, de spin et la coordination du fer de l'hème des globines sont bien caractérisés par les spectres d'absorption UV-Visible. Il y a classiquement deux régions spectrales associées à ces propriétés. Entre 400 et 450 nm, la bande de Soret, très intense, reflète la coordination et l'état d'oxydation du fer. Elle se situe à 406 nm et 407 nm pour l'Hb WT et la Mb WT humaines respectivement. Ce sont des protéines où le fer  $Fe^{3+}$  est pentacoordiné à la structure avec en sixième ligand une molécule d'eau. La réduction du fer entraîne un déplacement caractéristique de cette bande autour de 420-425 nm. L'autre région spectrale caractéristique se situe entre 500 nm et 650 nm. Les bandes de cette région sont aussi dépendantes de l'état d'oxydation et de la coordination du fer. Elles donnent également une indication sur son état de spin avec l'apparition chez l'Hb WT et la Mb WT d'une bande vers 630 nm lorsque le fer est haut spin.

L'hexacoordination de la Ngb conduit à des spectres d'absorption UV-Vis caractéristiques (Figure I. 12). La bande de Soret se situe à 412 nm pour la forme ferrique native  $Fe^{3+}$  et une bande à 426 nm pour la forme deoxy-ferreuse  $Fe^{2+}$  (S. Dewilde et al., 2001). Elle est plus haute en longueur d'onde que l'Hb WT ou la Mb WT à cause de la présence d'un sixième ligand endogène. Cet effet sur la bande de Soret est retrouvé chez la Cgb WT humaine qui est aussi hexacoordinée par un ligand endogène (Sawai et al., 2003). Les bandes d'absorption autour de 550 nm sont également caractéristiques de l'état d'oxydation du fer. La bande  $\alpha$  à 530 nm est plus intense que la bande  $\beta$  à 565 nm chez la Ngb  $Fe^{3+}$  et inversement chez la Ngb deoxy-ferreuse  $Fe^{2+}$ .

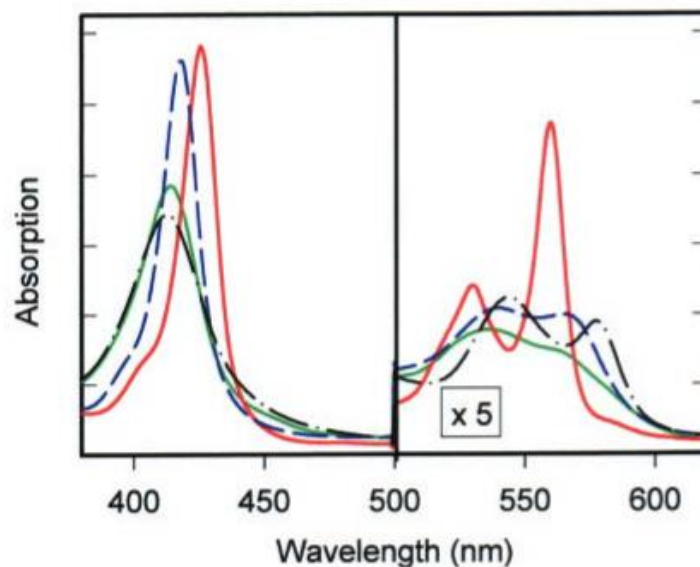


Figure I. 12- Spectres d'absorbance de la Ngb forme  $Fe^{3+}$  (vert), deoxy- $Fe^{2+}$  (rouge), CO- $Fe^{2+}$  (bleu), en présence de dioxigène (noir) (S. Dewilde et al., 2001).

L'hexacoordination de la Ngb a été observée en spectroscopie Raman (Couture et al., 2001). Les bandes de fréquences obtenues (Figure I. 13) sont caractéristiques de l'état d'oxydation et de la coordinence du fer d'hémoprotéines hexacoordinées (Das et al., 1999; Vogel, Spiro, Shelper, Thorsteinsson, & Roberts, 1999). En 2004, une autre étude en spectroscopie Raman (Uno et al.,

2004) montre que l'histidine H64 est le ligand distal natif à pH neutre et que la lysine 67 est le ligand distal majoritaire à pH basique.

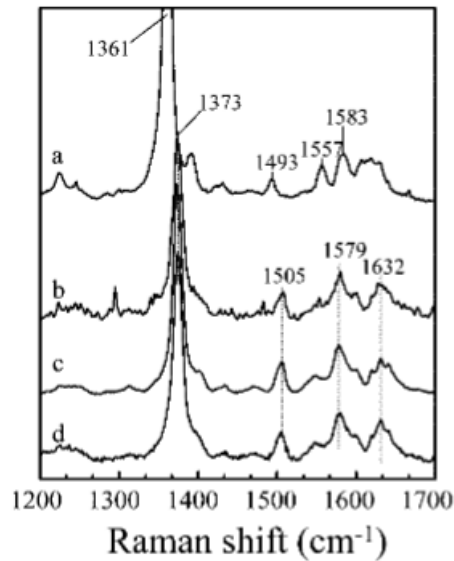


Figure 1. 13- Spectres Raman de la Ngb a) état  $Fe^{2+}$  pH 8,0 b) état  $Fe^{3+}$  pH 5,2 c) état  $Fe^{3+}$  pH 8,0 d) état  $Fe^{3+}$  pH 10,0 (Couture et al., 2001).

ii. Hexacoordination et stabilité de la protéine

La stabilité de la protéine par rapport à la température a été testée (D. Hamdane et al., 2005) pour étudier l'effet de l'hexacoordination et du pont disulfure sur la structure. La Ngb possède une meilleure stabilité à haute température que les globines classiques Hb et Mb (Figure I. 14). Cette stabilité accrue est associée à la présence de l'histidine distale. La réversibilité de la dénaturation en fonction de la température a également été étudiée. Ils ont montré que la Ngb pouvait se restructurer après dénaturation à haute température avec une perte structurale de 15 % en hélices  $\alpha$  par rapport à la structure avant dénaturation.

Protéine	$T_m$ (°C)	$K_{His}$
Ngb humaine C46C55C120 -> G46S55S120	103	4500
Ngb WT humaine (avec pont disulfure)	100	280
Cgb WT humaine	95	110
Hb de drosophile	76	18
Ngb de souris H64L	80	-
Mb de cœur de cheval	81	<<1
Hb-CO humaine	71	<<1

Figure I. 14- Température de dénaturation  $T_m$  et constante d'affinité  $K_{His}$  de l'histidine distale de différentes globines (D. Hamdane et al., 2005).

La stabilité accrue de l'hème peut notamment être associée à une meilleure affinité de l'histidine distale (Figure I. 14). Les valeurs de l'affinité de l'histidine distale de la Ngb, avec ou sans pont disulfure, sont nettement supérieures à celles de la Mb ou de l'Hb. Seule la Cgb, une autre globine hexacoordinée récemment découverte, présente la même affinité que la Ngb  $WT_{ox}$ .

La stabilité de la protéine en fonction du pH a également été étudiée pour déterminer l'effet de l'hexacoordination sur la fixation de l'hème au sein de la protéine. Le suivi de l'absorbance de la



bande de Soret, caractéristique de la présence de l'hème dans la protéine, en fonction du pH révèle un  $pH_{1/2}$  de dissociation, valeur à laquelle la moitié des protéines ont perdu leur hème, plus faible pour la Ngb que pour la Mb (Figure I. 15). La Ngb a donc une meilleure capacité à conserver son hème à bas pH. Il faut atteindre un pH 2,0 ou inférieur pour ne trouver que de la protéine sans hème, dite apo-Ngb, en solution.

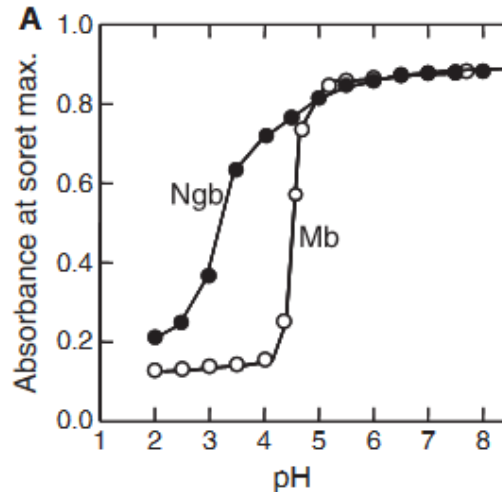


Figure I. 15- Suivi de la dénaturation de la Ngb (cercles noirs) et de la Mb (cercles blancs) en fonction du pH (Picotti et al., 2009).

Une autre étude s'est intéressée à la comparaison de la stabilité entre la forme apoNgb et la forme holoNgb (Picotti et al., 2009). Il est montré par la technique de dichroïsme circulaire (Figure I. 16) que le passage de la forme holo à la forme apo entraîne une perte d'environ 25% des hélices  $\alpha$ . A pH 2,0, le spectre obtenu pour l'apoNgb est quasiment identique de celui obtenu à pH 7,0, ce qui n'est pas le cas de la Mb qui est totalement déstructurée à pH 2,0 (2% d'hélices  $\alpha$  restant).

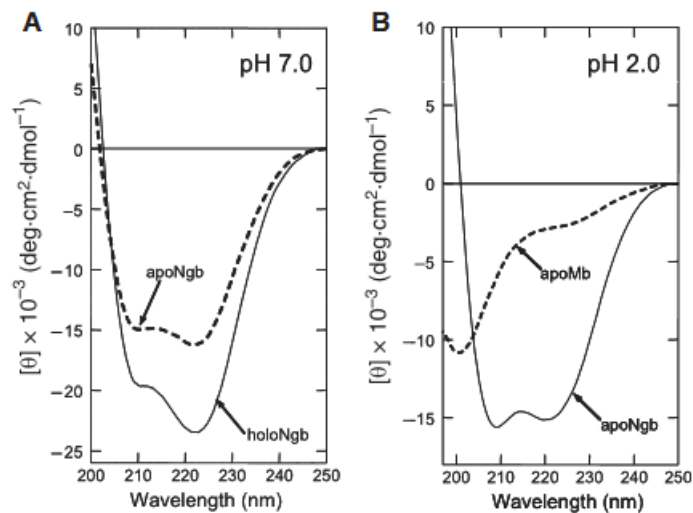


Figure I. 16- Spectres de dichroïsme circulaire en UV lointain de A) holoNgb (ligne solide) et apoNgb (pointillés) à pH 7,0 B) apoNgb (ligne solide) et apoMb (pointillés) à pH 2,0 (Picotti et al., 2009).

iii. Isomérisation de l'hème

Une autre particularité liée à l'hème de la Ngb est l'existence de deux orientations privilégiées. Une étude par RMN  $^1\text{H}$  1D de la neuroglobine de souris a montré que le nombre de signaux obtenus dus aux protons de la protéine était deux fois plus élevé que le nombre théorique de signaux attendus d'après la structure (Du, Syvitski, Dewilde, Moens, & La Mar, 2003). Il a été déduit qu'il existait deux formes isomères de l'hème en solution, notées A et B (Du et al., 2003; Xu, Li, Yin, Li, & Du, 2009). La présence de ces deux conformations a aussi été observée chez la Ngb humaine par RMN (Xu et al., 2009). L'hème n'est pas lié de façon covalente aux histidines axiales et donc au squelette protéique. De plus, la taille de la cavité hémique favorise le manque de sélectivité des formes isomères de l'hème (Du et al., 2003; A. Pesce et al., 2003; Vallone, Nienhaus, Brunori, & Nienhaus, 2004). Ces deux conformations sont obtenues par une rotation de  $180^\circ$  autour d'un axe passant par les carbones  $\alpha$  et  $\gamma$  dans le plan du cycle (Figure I. 17). Bien que les deux orientations n'entraînent pas de modifications structurales de la protéine, il y a un déplacement important de certains groupes latéraux avec l'échange de position entre les groupes vinyliques V et les groupes méthyles M entre les deux conformations. Ceci est corrélé à la modification des déplacements chimiques des protons de ces groupes en fonction de la forme isomère.

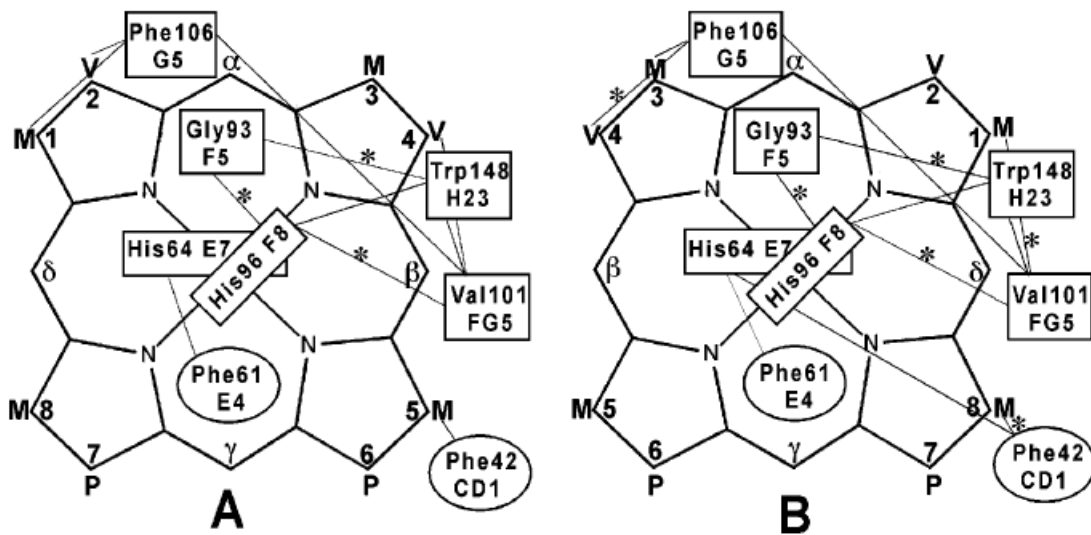


Figure I. 17- Représentation des deux conformations A et B de l'hème b de la Ngb de souris. La rotation de  $180^\circ$  pour passer d'une forme à l'autre se fait suivant l'axe méso- $\alpha$ - $\gamma$ . Les interactions entre les résidus proches de l'hème et l'hème sont représentés par des traits pour la Ngb WT et par des astérisques pour la Ngb WT-CN (Du et al., 2003).

Ce phénomène d'isomérisation n'a pas été observé à l'état natif chez d'autres globines comme la Mb (Ikeda-Saito et al., 1992; Morishima & Inubushi, 1977). Cependant il a été observé sur de la Mb et de l'Hb reconstituées où un hème est inséré dans l'apoprotéine (La Mar, Budd, Viscio, Smith, & Langry, 1978; Shulman, Wuthrich, Yamane, Antonini, & Brunori, 1969; Yee & Peyton, 1991).

La présence distincte et stable dans le temps (Du et al., 2003) des deux formes isomères de la Ngb serait donc due à des éléments structuraux propres à cette protéine.

Il a été indiqué en C.2.ii que l'un des facteurs participant à la stabilité de la protéine est la présence d'un pont disulfure intramoléculaire. Nous allons détailler dans la suite les caractéristiques de ce pont disulfure.

### 3. Pont disulfure intramoléculaire

#### i. Localisation

Comme indiqué en A.2, la Ngb possède trois cystéines susceptibles de former un pont disulfure. La présence d'un pont disulfure a d'abord été identifiée par spectrométrie de masse (D. Hamdane et al., 2003). La comparaison entre les spectres de masse de la protéine sous forme monomérique, avec ou sans ajout de dithiothréitol DTT, un réducteur de pont disulfure, montre une augmentation de masse de 2 Da lors de l'ajout de DTT (Figure I. 18). Cette augmentation peut être assimilée à l'apparition de deux hydrogènes suite à la réduction d'un pont disulfure en deux groupements thiols libres. L'ajout d'iodoacétamide (CAM), qui se fixe spécifiquement aux thiols, après l'ajout d'un agent réducteur, le DTT, confirme la présence de trois sites libres qui correspondent aux trois cystéines de la Ngb, alors qu'il n'y a qu'un seul site libre si le DTT n'est pas ajouté.

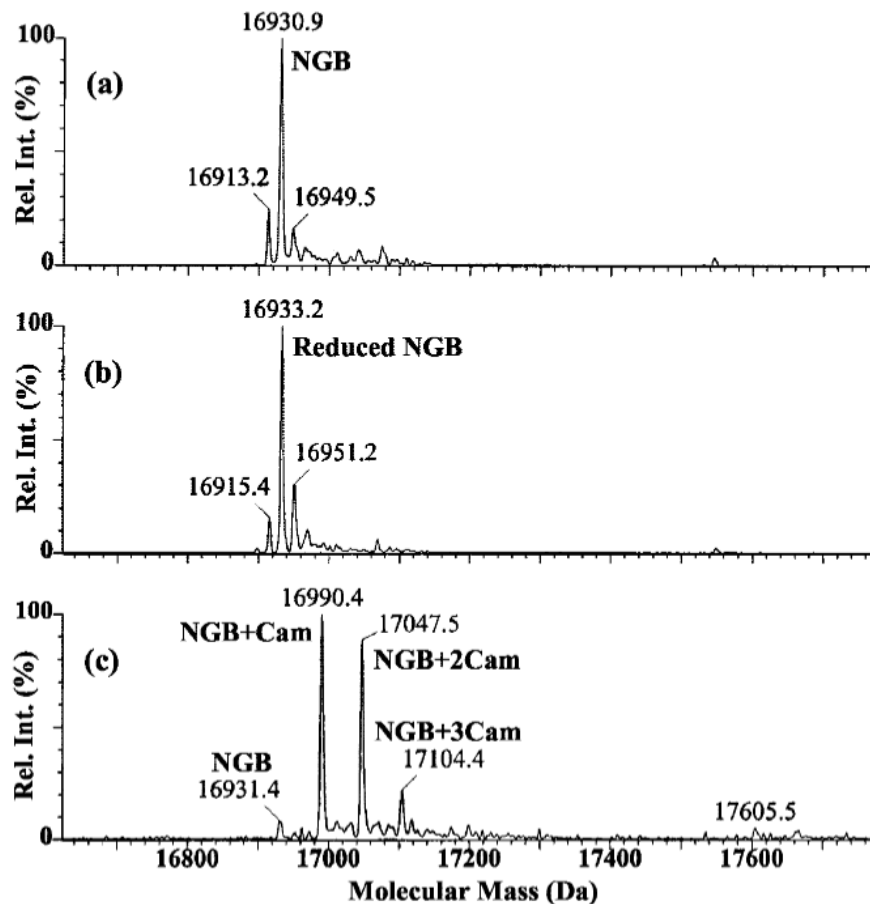


Figure I. 18- Spectres de masse d'ionisation par électronébuliseur de Ngb a) fraction F1 sans DTT b) fraction F1 avec DTT c) fraction F1 après DTT avec de l'iodoacétamide (CAM) (D. Hamdane et al., 2003).

Ces résultats indiquent que le pont disulfure est intramoléculaire. La Ngb possède deux cystéines, la Cys 46 ou CD7 et la Cys 55 ou D5 suffisamment proches pour former un pont disulfure (Figure I. 11). Les études sur la structure cristalline de la Ngb sauvage récemment publiée (Guimaraes et al., 2014), révèlent que la boucle CD est assez flexible, ce qui permettrait la formation du pont disulfure intramoléculaire en rapprochant les deux cystéines.

### ii. Influence du pont disulfure

Des simulations par dynamique moléculaire indiquent que des changements structuraux induits par la formation du pont disulfure suivant les conditions oxydantes du milieu influent sur la coordination de l'hème (Morozov, Roach, Kotzer, & Chatfield, 2014; Nadra, Marti, Pesce, Bolognesi, & Estrin, 2008). La boucle CD, qui opèrerait un repliement de simple brin à hélice lors de la formation du pont disulfure, joue sur la proximité de l'histidine distale H64 avec l'hème. En outre, lorsque le pont disulfure est réduit, la cavité de l'hème se retrouve fermée par la tyrosine 44 et l'histidine distale 64 voit sa mobilité réduite, bloquée par la chaîne latérale comprenant la phénylalanine 42. Ainsi, en fonction du pouvoir redox du milieu et donc de l'état d'oxydation du pont disulfure, la protéine ne serait pas structurée de la même façon. Ceci permettrait donc un contrôle oxydant de la protéine.

La présence d'un pont disulfure est spécifique à la Ngb humaine. Il n'existe pas de pont disulfure chez la Mb ou l'Hb ou même chez la Ngb du rat (L. Astudillo, Bernad, Derrien, Sebban, & Miksovská, 2010). Il faut noter que la Ngb possède aussi une troisième cystéine, la Cys 120 ou G9, qui pourrait contribuer à former des ponts disulfures intermoléculaires aboutissant à la formation de dimères de Ngb.

Dans la dernière partie de l'introduction, nous nous intéresserons aux cinétiques *in vitro* de fixation et de dissociation de ligands chez la Ngb. L'influence de différents paramètres, comme l'hexacoordination ou la présence du pont disulfure, sera introduite.

## D. Cinétiques de fixation et de dissociation de ligands chez la Ngb

Les cinétiques de fixation et de dissociation de ligands chez la Ngb ont été abondamment étudiées. Plusieurs ligands ont été testés dans des conditions variées, telles que l'état d'oxydation du fer, l'état d'oxydation du pont disulfure, le pH du milieu (Ascenzi et al., 2016). Nous nous concentrerons ici sur les études des cinétiques de fixation et de dissociation de O<sub>2</sub> et CO qui sont les deux ligands les plus utilisés. Les résultats pour la cinétique de fixation du cyanure, le ligand que nous avons utilisé durant la thèse, seront également introduits.

### 1. Introduction à la cinétique de fixation de ligands

i. Schéma réactionnel de la fixation d'un ligand chez la Ngb

La cinétique de fixation d'un ligand externe comprend deux étapes. La première consiste en la dissociation de l'histidine 64 distale. La deuxième est la fixation du ligand externe. Ces deux étapes sont en compétition. Le schéma réactionnel pour un ligand externe quelconque L est présenté en Figure I. 19, où  $\text{Ngb}_{\text{hexa}}$  représente la forme hexacoordinée de la Ngb et  $\text{Ngb}_{\text{penta}}$  la forme pentacoordinée sans histidine distale.

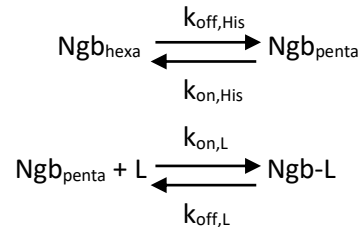


Figure I. 19- Schéma réactionnel de la fixation d'un ligand L externe sur la Ngb sauvage.

Le système est donc caractérisé par quatre constantes cinétiques. Les constantes cinétiques de premier ordre  $k_{\text{on,His}}$  et  $k_{\text{off,His}}$  représentent respectivement les constantes d'association et de dissociation de l'histidine distale et sont exprimées en  $\text{s}^{-1}$ . Les constantes cinétiques  $k_{\text{on,L}}$  et  $k_{\text{off,L}}$ , respectivement de second et premier ordre, représentent respectivement les constantes de fixation et dissociation du ligand externe L. La constante cinétique  $k_{\text{on,L}}$  désigne la fixation du ligand externe sur le fer. Elle s'exprime alors en  $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Elle est dépendante de l'affinité de l'histidine distale pour le fer mais aussi de la capacité du ligand à diffuser au sein de la protéine. La constante cinétique  $k_{\text{off,L}}$  s'exprime en  $\text{s}^{-1}$ . La deuxième étape qui représente l'étape même de fixation du ligand est généralement approximée comme étant totale et non réversible du fait de sa cinétique lente vis-à-vis de la première étape. Il n'y a donc pas de dissociation du ligand externe. Aussi dans de tels cas, la constante  $k_{\text{off,L}}$  est négligée.

ii. Etat d'oxydation du fer *in vitro*

La fixation de certains ligands, comme CO ou  $\text{O}_2$ , nécessite que l'atome de fer de l'hème se trouve à l'état  $\text{Fe}^{2+}$  qui n'est pas l'état d'oxydation natif de la protéine. Bien qu'un partenaire d'oxydoréduction de la protéine n'ait pas encore été mis en évidence *in vivo*, certains systèmes d'oxydoréduction ont été testés.

Dans une étude de l'affinité du dioxygène chez la Ngb de souris étudiée par spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps, il est mis en place un cycle d'oxydoréduction pour la réduction de la Ngb ferrique en Ngb ferreuse, à l'aide d'un système d'oxydoréductase NADH : flavurobreddoxine (FIRd-red) afin de fixer le dioxygène (Giuffre, 2008). Après fixation du dioxygène, il est observé une légère décroissance de la bande de Soret du spectre UV-Visible que les auteurs expliquent par le phénomène d'auto-oxydation du dioxygène une fois fixé. La réaction d'auto-oxydation est la transformation de la forme  $\text{NgbO}_2$  en forme  $\text{Ngb WT}_{\text{ox}}$  avec production de l'anion superoxyde.

## 2. Cinétiques et sites de fixation de ligands

Les expériences de cinétiques de fixation de ligands ont principalement été réalisées à l'aide de deux techniques, à savoir le stopped-flow et la flash-photolyse. En stopped-flow, ce sont les cinétiques de fixation de ligands externes qui sont observées. Ces études correspondent au phénomène de fixation d'un ligand externe observable *in vivo*. En flash-photolyse en revanche, les expériences partent d'un ligand déjà fixé à l'hème. Les analyses permettent donc d'étudier les cinétiques de re-fixation d'un ligand à l'hème une fois celui-ci dissocié.

### i. Etudes par stopped-flow

Le stopped-flow est une technique qui permet l'acquisition rapide de signaux suite à un mélange entre deux échantillons et que nous détaillerons dans le Chapitre II.

Les cinétiques de fixation de CO et de O<sub>2</sub> sont les plus étudiées à ce jour sur différentes espèces (M. Brunori et al., 2005; S. Dewilde et al., 2001; A. Fago, Mathews, A. J., Dewilde, S., Moens, L., Brittain, T., 2006; Giuffre, 2008; Kiger et al., 2004; Smagghe, Sarath, Ross, Hilbert, & Hargrove, 2006; Uzan et al., 2004). Il est montré que la fixation de ces deux ligands est en compétition avec la fixation/dissociation de l'histidine distale. Les cinétiques observées sont indépendantes de la concentration du ligand indiquant que la dissociation de l'histidine distale est l'étape limitante. Les constantes cinétiques déterminées pour la fixation de ces ligands, qui correspondent donc au  $k_{off,His}$  (Figure I. 19) sont égales à 0,15 s<sup>-1</sup>. La fixation du ligand NO présente un comportement similaire (M. Brunori et al., 2005).

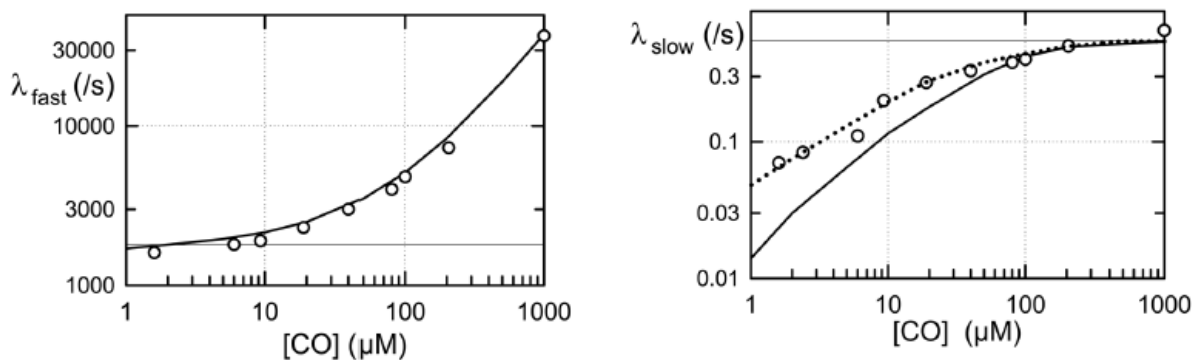
L'analyse des courbes de cinétique obtenues nécessite un modèle en bi-exponentielles pouvant refléter l'existence de deux formes réactives en solution. Plusieurs hypothèses sont avancées, comme l'influence des deux formes isomères de l'hème ou un mélange entre espèces avec ou sans pont disulfure. Des cinétiques réalisées à différents pH (A. Fago, Mathews, A. J., Dewilde, S., Moens, L., Brittain, T., 2006) montrent que les constantes de fixation et dissociation de l'histidine distale pour ces deux formes réactives ne seraient pas identiques. Une étude sur la cinétique de fixation du cyanure (Herold, Fago, Weber, Dewilde, & Moens, 2004), qui au contraire de CO ou O<sub>2</sub> n'est pas indépendante de la concentration du ligand, révèle là aussi l'existence de deux formes aux réactivités différentes. Les constantes de fixation déterminées pour ces deux formes sont 1,65 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> et 0,37 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

Ces analyses en stopped-flow sont en général couplées avec des expériences réalisées en flash-photolyse. Ces expériences permettent d'évaluer les constantes cinétiques de fixation de ligands via des phénomènes de diffusion différents que le stopped-flow. La comparaison entre les deux techniques que les cinétiques regardées en stopped-flow correspondent à l'une des phases, celle de la dissociation de l'histidine, étudiées en flash-photolyse.

ii. Etudes par flash-photolyse

La technique de flash-photolyse a principalement été utilisée pour étudier les cinétiques de fixation du CO. Cette technique présente la particularité de partir d'un état où le CO est fixé au Fe<sup>2+</sup> de l'hème. La liaison Fe<sup>2+</sup>-CO est rompue par photoexcitation. Le devenir du CO est ensuite analysé par suivi du déclin d'absorption. Deux cinétiques distinctes sont observées. La cinétique la plus rapide correspond à la re-fixation du CO au Fe<sup>2+</sup> après rupture de la liaison. La cinétique la plus lente correspond à une compétition par fixation entre le CO et l'histidine distale initialement dissociée.

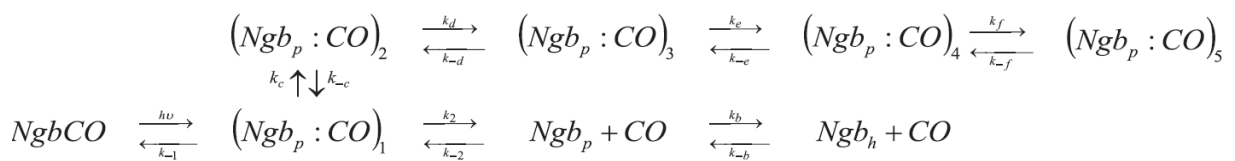
Les analyses de l'évolution des constantes cinétiques, associées respectivement à la cinétique lente et à la cinétique rapide, en fonction de la concentration en CO montrent que leurs évolutions sont non-linéaires (Figure I. 20). Plusieurs études suggèrent alors que chaque cinétique est caractérisée par deux étapes distinctes (S. Dewilde et al., 2001; Kiger et al., 2004; Uzan et al., 2004). Ces différentes étapes seraient dues à des changements de facteurs limitants en fonction de la concentration en CO. Pour la cinétique rapide (Figure I. 20 graphe de gauche), la première étape à basse concentration en CO serait limitée par la fixation de l'histidine ( $k_{on,HIS}$ ). Puis la fixation du CO ( $k_{on,CO}$ ) deviendrait limitante. Pour la cinétique lente (Figure I. 20 graphe de droite) la première étape, à basse concentration en CO, serait limitée par la fixation du CO ( $k_{on,CO}$ ) puis ça serait la dissociation de l'histidine qui deviendrait limitante ( $k_{off,HIS}$ ).



**Figure I. 20- Courbes de la constante cinétique de la réaction en fonction de la concentration en CO. Graphe de gauche : valeurs expérimentales (points) et courbe de simulation (ligne solide) utilisant un modèle hexacoordiné de la constante cinétique de la réaction observée pour la cinétique rapide en fonction de la concentration en CO. Graphe de droite : valeurs expérimentales (points) et courbe de simulation (ligne solide) à très faible concentration en CO de la constante cinétique de réaction en fonction de la concentration en CO pour la cinétique lente (Kiger et al., 2004).**

L'existence de plusieurs cinétiques multiphasiques serait due à la présence de sites internes d'interaction du CO avec la protéine, autres que le fer de l'hème. Ces sites d'interaction sont mis en évidence par des expériences de spectroscopie infrarouge qui montrent la présence de plusieurs bandes d'élongation de la liaison CO lorsque le CO est fixé à l'hème (Kriegl et al., 2002). Le ligand serait donc capable de tourner autour de la liaison Fe-CO pour interagir avec différents acides aminés environnants. De plus, les longueurs d'onde des bandes associées à ces sites d'interaction sont dépendantes du pH et de la température (Kriegl et al., 2002) (A. Fago et al., 2004). Ceci montrerait que ces sites d'interaction sont structurellement modulables.

Des expériences sur la Ngb dans une matrice de gel de silice menées par Abbruzzetti et al. (Abbruzzetti et al., 2009) confirmeraient cette notion de sites d'interaction présents dans les cavités de la Ngb. Le gel de silice présenterait les avantages de mieux recréer le milieu physiologique et de figer un peu plus la structure de la protéine grâce à sa viscosité. La structuration des cavités serait alors améliorée en limitant leurs fluctuations. La dissociation du CO par flash photolyse met en évidence la présence d'intermédiaires de réaction indépendants de la formation de la forme hexacoordinée de la protéine. Ces intermédiaires sont attribués à la présence de différents sites d'interaction du CO correspondant à des cavités plus ou moins proches de l'hème. La cinétique de fixation du CO suivrait un schéma réactionnel en plusieurs étapes (Figure I. 21).



**Figure I. 21- Schéma réactionnel de la fixation de CO après flash photolyse. Cinq sites de stockage seraient présents et numérotés de 1 à 5. Ngb<sub>p</sub> désigne la Ngb sous forme pentacoordinée, Ngb<sub>h</sub> sous forme hexacoordinée.**

Un point récurrent est toutefois soulevé concernant les différentes phases cinétiques. Les auteurs soulignent que pour chaque phase observée, le meilleur modèle cinétique pour évaluer les courbes obtenues suit une loi de type bi-exponentiel (L. Astudillo, Bernad, Derrien, Sebban, & Miksovská, 2012; S. Dewilde et al., 2001; A. Fago et al., 2006; D. Hamdane et al., 2004; Smaghe et al., 2006; Uno et al., 2004; Vallone, Nienhaus, Matthes, Brunori, & Nienhaus, 2004). Ceci montrerait l'intervention de deux phénomènes lors de chaque phase cinétique. Il convient donc de se pencher sur les différents facteurs proposés pouvant expliquer ce comportement en bi-exponentielles.

### 3. Facteurs influençant la cinétique de fixation de ligands

#### i. Formes isomères de l'hème

Les deux formes isomères de l'hème ont été mises en évidence par Du et al. (Du et al., 2003) dans une étude par RMN de la Ngb de souris (Figure I. 17). Il y est aussi montré que la cinétique de fixation du cyanure est beaucoup plus lente chez la Ngb que chez d'autres globines (Dou, Olson, Wilkinson, & Ikeda-Saito, 1996) et que celle-ci est différente en fonction de la forme isomère de l'hème considérée, en étant deux fois plus rapide pour la forme A que pour la forme B. Cette observation (Figure I. 22) a été confirmée par A. Bocahut dans notre équipe (A. Bocahut et al., 2013). Sur le panel de gauche, le signal caractéristique du groupement méthyle en position 8 de la forme isomère B diminue en intensité beaucoup plus lentement que le signal du groupement méthyle en position 5 de la forme isomère A.



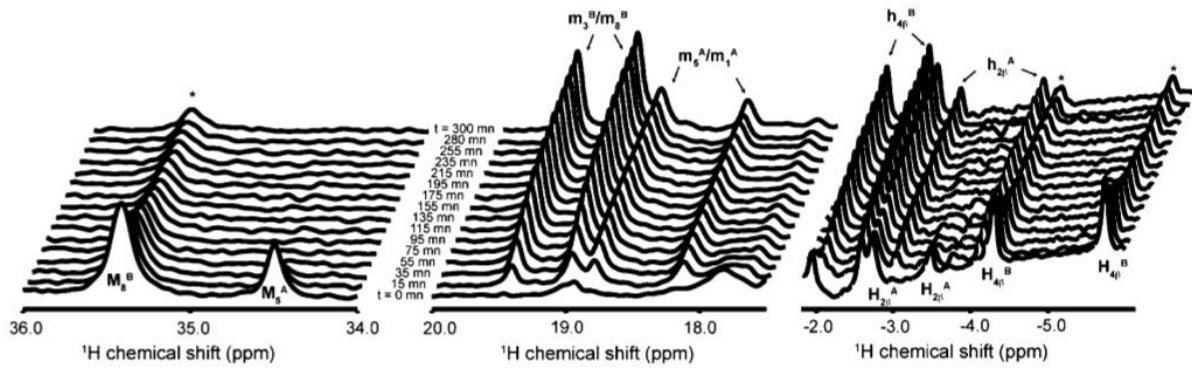


Figure I. 22- Evolution dans le temps des spectres RMN  $^1\text{H}$  en 1D de la cinétique de fixation du cyanure sur la Ngb WT (A. Bocahut et al., 2013).

Bien qu'en spectrophotométrie UV-Vis les deux formes isomères de l'hème ne peuvent être distinguées à partir du spectre, c'est également une hypothèse émise plusieurs fois pour justifier les comportements observés pour les cinétiques de fixation de CO et de CN étudiées en stopped-flow (S. Dewilde et al., 2001; A. Fago, Mathews, A. J., Dewilde, S., Moens, L., Brittain, T., 2006; Herold et al., 2004; Smaghe et al., 2006). Notamment Herold et al. (Herold et al., 2004) ont observé une cinétique de type bi-exponentiel lors de la fixation du cyanure sur la Ngb humaine analysée par stopped-flow. Les constantes cinétiques de réaction, définies comme des constantes apparentes, extraites des mesures à différentes concentrations, sont  $1,65 \pm 0,06 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et  $0,37 \pm 0,02 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . L'hypothèse émise est que ces deux constantes sont attribuables à deux formes isomères de l'hème. La différence de réactivité observée rejoint les résultats des cinétiques en RMN (A. Bocahut et al., 2013).

## ii. Pont disulfure

L'influence du pont disulfure sur la cinétique de fixation du cyanure est aussi étudiée par RMN sur la Ngb sauvage humaine par Bocahut et al. (A. Bocahut et al., 2013). Il est montré que lorsque le pont disulfure est réduit par du DTT ou par mutation, la cinétique observée est plus lente pour les deux formes isomères. Ces observations sont aussi faites pour la fixation du CO étudiée en stopped-flow (D. Hamdane et al., 2004; Smaghe et al., 2006). La réduction préalable du pont disulfure par ajout de DTT entraîne un ralentissement de la cinétique de fixation du ligand.

De plus, le pont disulfure et son état d'oxydation est potentiellement impliqué dans un système d'oxydoréduction permettant la transition  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  chez la Ngb. Il a été récemment montré que la Ngb pouvait agir comme capteur d'ion superoxyde (Yamashita, Hafsi, Masuda, Tsujino, & Uno, 2014). Il est mis en évidence que la présence du pont disulfure est nécessaire pour que la réaction se fasse.

## iii. Cavités internes

Il a été montré que lors de la fixation d'un ligand, l'hème change de position et bascule vers l'intérieur de la protéine (Anselmi et al., 2007; Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004). Les études cristallographiques sur le complexe Ngb-CO de la murine (Figure I. 23) montrent un déplacement d'environ 2 Å de l'hème dans une cavité plus interne (cavité jaune sur la droite de l'hème) entre la forme sauvage et la forme avec le CO fixé. L'histidine distale 64 ne subit pas de changement réel de

position. En revanche, l'espace distal au sein de la nouvelle cavité est plus large et favorise donc la présence du sixième ligand externe.

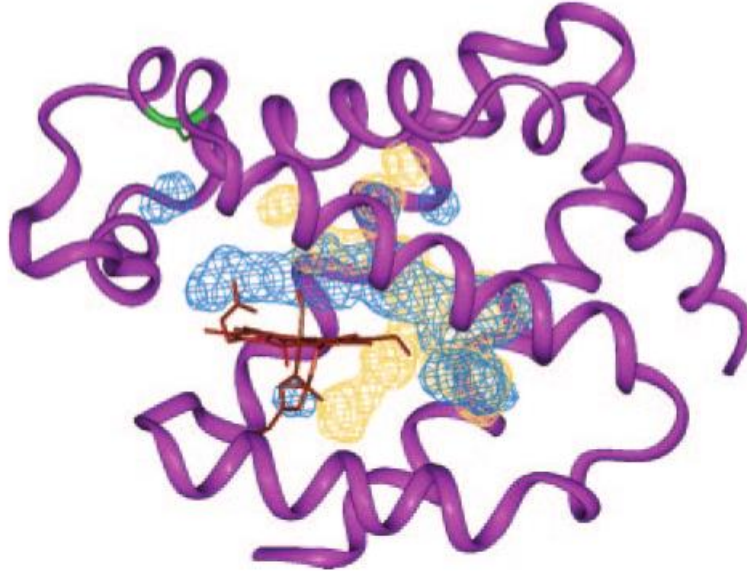


Figure I. 23- Cavités de la Ngb de murine. En bleu les cavités correspondent à la forme Ngb-CO et en jaune à la forme Ngb sans ligand (Anselmi et al., 2007; Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004).

Ces cavités, qui permettent différentes voies de diffusion des ligands, sont modulées notamment par l'état d'oxydation de l'hème et par la position de ce dernier (A. Bocahut et al., 2009).

## E. Conclusion

La Ngb possède une structure tridimensionnelle caractéristique de la famille des globines. Cependant la comparaison de sa séquence en acides aminés avec celles des globines classiquement étudiées, la Mb et l'Hb, montre une faible identité de séquence. La Ngb possède donc des acides aminés caractéristiques ayant un rôle potentiellement clé dans son comportement *in vivo*.

Sa fonction principale ne semble d'ailleurs pas être celle des globines classiques, à savoir transporter et stocker le dioxygène. La Ngb pourrait être impliquée dans plusieurs mécanismes de défense du corps humaine. Ces modes d'action peuvent être directs comme par exemple capter des ROS ou des RNS. Mais elle peut aussi agir via des interactions avec d'autres protéines comme pour son activité de protection contre le stress oxydant en tant que GDI.

Les spécificités structurales de la Ngb sont potentiellement impliquées dans sa ou ses différentes fonctions biologiques. Elles se concentrent autour de deux éléments. Tout d'abord, la Ngb possède un hème hexacoordiné par une histidine distale, la H64, ce qui n'est pas le cas de l'Hb ou la Mb. De plus, l'hème existe sous deux orientations isomères l'une de l'autre par une rotation de 180°. Ces deux formes isomères, de par la position de leurs chaînes latérales, ne possèdent pas les mêmes

interactions avec le proche environnement de l'hème. Le deuxième élément caractéristique de la Ngb humaine est la présence d'un pont disulfure intramoléculaire. Il est formé entre deux cystéines, en positions 46 et 55. Il influe sur la stabilité de la protéine et sur sa structure, notamment en modulant l'emplacement des cavités internes.

Les cavités internes de la Ngb constituent une autre de ses particularités structurales. Elles semblent jouer un rôle majeur dans les cinétiques de fixation et diffusion de ligands. Ces cinétiques sont modulées par un ensemble de facteurs propres à la Ngb. En premier lieu, la dissociation de l'histidine distale H64 représente une étape nouvelle par rapport à l'Hb ou la Mb qui ne sont pas hexacoordinées par un ligand endogène. L'équilibre de dissociation/association est en compétition avec la fixation du ligand externe. Un autre facteur influençant les cinétiques de fixation est l'état d'oxydation du pont disulfure. Enfin, les formes isomères de l'hème semblent montrer une réactivité différente.

La Ngb possède donc plusieurs caractéristiques structurales associées à la présence d'acides aminés propres à cette protéine. Le lien entre ces caractéristiques et de possibles fonctions *in vivo* de la Ngb n'est cependant pas claire. Afin d'évaluer l'apport de ces spécificités structurales chez la Ngb, nous nous sommes intéressés pendant la thèse à analyser l'influence de certains acides aminés sur la structure et le comportement de la protéine. Les acides aminés choisis sont positionnés stratégiquement vis-à-vis des différentes particularités de la Ngb.

L'étude de variants s'est développée autour de trois grands thèmes :

- Les protéines ont été caractérisées par différentes techniques spectroscopiques. Ces caractérisations ciblent en particulier l'hème et son environnement qui sont le centre de la réactivité de la Ngb.
- L'implication de la Ngb dans la protection *in vivo* de l'organisme face à des conditions dénaturantes, comme en présence de stress oxydant, nécessite une stabilité accrue de la protéine. Nous avons alors exploré l'évolution des propriétés et de la structure de la Ngb et des variants au travers d'expériences de variation de pH.
- La capacité de la Ngb à interagir avec des ligands externes est importante pour ses fonctions *in vivo*. A l'aide des mutations réalisées, nous avons essayé de définir les paramètres qui régissent la fixation de ligands *in vitro*.

Dans le prochain chapitre, les techniques spectroscopiques (UV-Visible, Dichroïsme Circulaire et Résonance Magnétique Nucléaire) seront présentées en soulignant les propriétés de la protéine spécifiquement observables par chaque technique. La corrélation des résultats obtenus avec ces techniques permettra d'obtenir une vue d'ensemble sur le comportement de l'hème de la Ngb, son proche environnement et la structure secondaire de la protéine.



## **Chapitre II : Matériels et méthodes**



Dans ce chapitre, les différentes techniques spectroscopiques utilisées durant la thèse sont présentées. Un accent particulier sera mis sur les spécificités et les contraintes d'utilisation de chaque technique. Les modes opératoires pour les traitements des résultats obtenus pour les différentes techniques seront également introduits. Nous détaillerons également le protocole de synthèse et de purification de la Ngb WT et de ses variants en expliquant les améliorations apportées durant la thèse. Un dernier point introduira le protocole opératoire permettant le contrôle de l'état d'oxydation du pont disulfure.

## A. Spectrophotométrie d'absorption Ultraviolet-Visible

La spectrophotométrie d'absorption Ultraviolet-Visible (UV-Visible) est une spectroscopie électronique. Elle est basée sur la capacité des molécules à absorber des photons à certaines longueurs d'onde. Elle permet d'observer les transitions entre niveaux électroniques d'une molécule suite à une interaction avec un rayonnement incident. Outre les mesures de routine, la spectrophotométrie UV-Visible a été utilisée dans trois thématiques de cette thèse : la détermination du coefficient d'extinction molaire de la Ngb et des variants, l'étude de leur stabilité en fonction du pH et l'étude de la cinétique de fixation du cyanure. Nous allons développer ci-dessous les principes et protocoles utilisés pour l'usage de la spectrophotométrie UV-Visible au travers de ces trois thématiques.

### 1. Spectrophotométrie UV-Visible stationnaire

Sous le terme de spectrophotométrie UV-Visible stationnaire sont regroupées notamment les expériences de routine, comme la prise de spectres de référence ou les analyses de pureté des échantillons lors des synthèses de protéines. Dans la suite, les expériences de mesure du coefficient d'extinction molaire et les expériences de cinétique de fixation du cyanure à basse concentration en cyanure seront plus particulièrement décrites.

#### i. Caractéristiques techniques

Le spectrophotomètre DU 800 de Beckman Coulter est un spectrophotomètre UV-Visible à simple faisceau pouvant balayer une gamme de longueur d'onde de 190 nm à 1100 nm. La précision en absorbance est de  $\pm 0,005$  A. Cet appareil est équipé d'un porte-cuves à 6 emplacements pour pouvoir réaliser plusieurs mesures simultanément. Il est également équipé d'un système de bain thermostaté afin de réguler la température des cuves. Des droites de calibration ont été établies et l'absorbance maximale d'application de la loi de Beer-Lambert a été déterminée à 1,8. L'appareil se trouve dans une pièce climatisée à 20°C.

Les cuves utilisées pour ces expériences sont des semi-micros cuvettes UV en plastiques de Fischerbrand®.

#### ii. Conditions d'utilisation - Détermination du coefficient d'extinction molaire : méthode de la pyridine hémochrome

La méthode de la pyridine hémochrome est une technique développée et largement utilisée pour déterminer la concentration en hème d'une solution, ce qui permet d'en déduire le coefficient d'extinction molaire des hémoprotéines (Berry & Trumpower, 1987; de Duve, 1948; Paul, Theorell, & Akeson, 1953; Smith, 1975). Elle consiste à dénaturer les protéines en milieu fortement basique pour libérer l'hème de la protéine puis à former le complexe pyridine-hème. Ce complexe possède des bandes caractéristiques entre 500 et 600 nm en fonction de l'état d'oxydation du centre métallique. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire de ces bandes ont été déterminées à partir de différents types de complexes d'hémine (Berry & Trumpower, 1987; de Duve, 1948; Paul et al., 1953; Smith, 1975). En utilisant les valeurs d'absorbance mesurées et les coefficients d'extinction molaire calculés il est donc possible d'en déduire la concentration en hème de l'échantillon. Par comparaison



avec un spectre de référence de la protéine, les valeurs des coefficients d'extinction molaire des différentes bandes du spectre de la protéine peuvent être déterminées. Cette méthode a notamment permis de calculer le coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret de la myoglobine humaine sauvage, à  $153\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Ikeda-Saito et al., 1992) et de la Ngb humaine sauvage à  $129\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Nicolis et al., 2007).

Le protocole a été construit à partir de celui de Paul et al. (Paul et al., 1953). Un complexe hème-pyridine est formé par dénaturation de la protéine en milieu basique (soude 1M). Le milieu contient du ferricyanure à la concentration de 10 mM pour s'assurer qu'il n'y a que la forme oxydée du complexe. Ensuite un excès de dithionite est rajouté pour obtenir la forme réduite du complexe. La différence d'absorbance  $A_{557-540}$  entre forme réduite et oxydée est obtenue :

$$A_{557-540} = (A_{557,red} - A_{557,ox}) - (A_{540,red} - A_{540,ox}) \quad \text{Equation II. 1}$$

Avec :

$A_{557,red}$  et  $A_{540,red}$  : absorbances à 557 nm et 540 du spectre de la forme réduite

$A_{557,ox}$  et  $A_{540,ox}$  : absorbances à 557 nm et 540 du spectre de la forme oxydée

Pour cette valeur, le coefficient d'extinction molaire a été calculé à  $23,98\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Paul et al., 1953). En utilisant la valeur de  $A_{557-540}$  et son coefficient d'extinction molaire. Il est donc possible de calculer la concentration en hème de la solution. Puis en se servant d'un spectre de la Ngb enregistré dans les mêmes conditions de concentration, il est alors possible d'accéder au coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret.

Les mesures sont effectuées à température ambiante (20°C) sans l'utilisation du bain thermostaté. L'appareil est réglé sur une gamme de longueur d'onde de 400 nm à 800 nm. La vitesse de balayage est de 1200 nm/min avec un pas de 1 nm.

Les résultats présentés sont les valeurs moyennes issues d'au moins trois expériences sur des lots de protéine différents. L'incertitude indiquée avec les résultats correspond à l'écart type sur la moyenne.

### iii. Condition d'utilisation - cinétique de fixation du cyanure

Des mesures de cinétique de fixation du cyanure sur la Ngb et ses variants ont été réalisées à l'aide du spectrophotomètre DU 800. Ces mesures concernent des cinétiques à basse concentration en cyanure, de 0,5 mM à 25 mM.

Les solutions sont préalablement préparées in situ dans le porte-cuve sous une hotte ventilée. Pour chaque expérience, deux cuves sont systématiquement préparées. La première sert de référence et ne contient que la solution tampon phosphate pH 7,4, 66 mM. Il a été vérifié que l'ajout de cyanure dans cette solution ne modifiait pas son évolution au cours du temps. La deuxième cuve contient une solution de Ngb ( $[Ngb] = 5 \text{ à } 7\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en fonction du variant) qui sert de référence et à laquelle il n'y a pas d'ajout de cyanure. Les autres cuves sont préparées de telle sorte qu'après ajout du cyanure, la concentration finale en Ngb soit identique à celle de la cuve de référence. Les cuves sont bouchées à l'aide de bouchons à jupe rabattable en silicone afin de limiter l'évaporation. La température à l'intérieur du porte-cuve est fixée à 25 °C à l'aide du bain thermostaté. L'injection de

la solution de cyanure sous hotte et le transport des cuves implique un temps mort avant le début de la mesure de une à quatre minutes en fonction du nombre de cuves. Le temps mort a été mesuré à chaque fois.

L'absorbance à une longueur d'onde donnée est mesurée à des intervalles de temps réguliers. La longueur d'onde choisie dans le cas de la Ngb et de ses variants correspond à la longueur d'onde de l'absorbance maximale de la bande de Soret, qui peut varier en fonction de la mutation. La durée d'une cinétique est en général de 1500 minutes avec un intervalle de temps de 1 à 10 minutes. Le réglage du pas de temps dépend du nombre de cuves, de la concentration en cyanure et du variant étudié. Le spectrophotomètre apporte deux corrections automatiques aux courbes enregistrées. La première est une correction du background pour chaque cuve, en mesurant et soustrayant en chaque point l'absorbance à 800 nm. La seconde est la soustraction de l'absorbance de la solution de référence.

Une correction supplémentaire est éventuellement apportée lorsqu'une croissance linéaire de pente faible est observée pour les temps longs. Cette croissance linéaire est probablement due à un phénomène d'évaporation malgré le contrôle de la température et la cuve bouchée. Cette correction consiste à déterminer le coefficient directeur de la pente observée. La valeur de ce coefficient est utilisée pour soustraire en chaque point les valeurs d'absorbance engendrées par cette déviation linéaire.

Les courbes corrigées sont ensuite analysées à l'aide du logiciel OriginPro 8. Pour une concentration donnée, chaque courbe est analysée avec l'équation cinétique appropriée. Une moyenne sur les valeurs obtenues pour chaque courbe est réalisée avec une incertitude correspondant à l'écart type total  $\sigma_{total}$ . L'écart type total  $\sigma_{total}$  calculé pour chaque paramètre tient compte de l'écart type entre les différentes valeurs obtenues et de l'écart type donné par le logiciel pour chaque valeur selon la formule :

$$\sigma_{total} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i^2}{n}} \quad \text{Equation II. 2}$$

Avec :

$x_i$  :  $i^{\text{ème}}$  valeur mesurée d'un paramètre donné

$\bar{x}$  : moyenne des n valeurs mesurées de ce paramètre

$\sigma_i$  : écart type mesuré par le logiciel pour chaque valeur  $x_i$  du paramètre

## 2. Spectrophotométrie résolue en temps : Montage stopped-flow

Pour les cinétiques à haute concentration en cyanure, un appareil stopped-flow a été utilisé. Le temps mort de plusieurs minutes à cause de la préparation des échantillons et les caractéristiques techniques du DU 800 ne permettent pas en effet de suivre des cinétiques très rapides, se déroulant sur quelques dizaines ou centaines de secondes.

### i. Principe

L'appareil utilisé est un stopped-flow SX20 Applied Photophysics équipé d'une lampe Xenon 150W et d'un système de bain thermostaté. L'acquisition du signal transmis se fait grâce à un

photomultiplicateur. L'appareil est équipé de trois seringues, deux seringues à échantillon (drive syringe) et une seringue d'évacuation (stop syringe) (Figure II. 1). L'efficacité du montage repose sur un système de déplacement de volumes à haute pression (8 bars). Un volume correspondant au volume à injecter est préalablement expulsé du circuit par la seringue d'évacuation. Puis, par action d'une forte pression, les pistons des seringues à échantillon injectent rapidement les réactifs dans le circuit. Le volume injecté repousse simultanément la seringue d'évacuation au contact d'une languette de cuivre sur le bloc auto-stop (auto-stop assembly) ce qui déclenche instantanément l'acquisition. Le mélange entre les réactifs contenus dans les deux seringues à échantillon est optimisé grâce à un système de mélange en forme de T (T-mixer) avant la cuve d'analyse. Les cinétiques de l'ordre de quelques millisecondes à plusieurs milliers de secondes peuvent être réalisées.

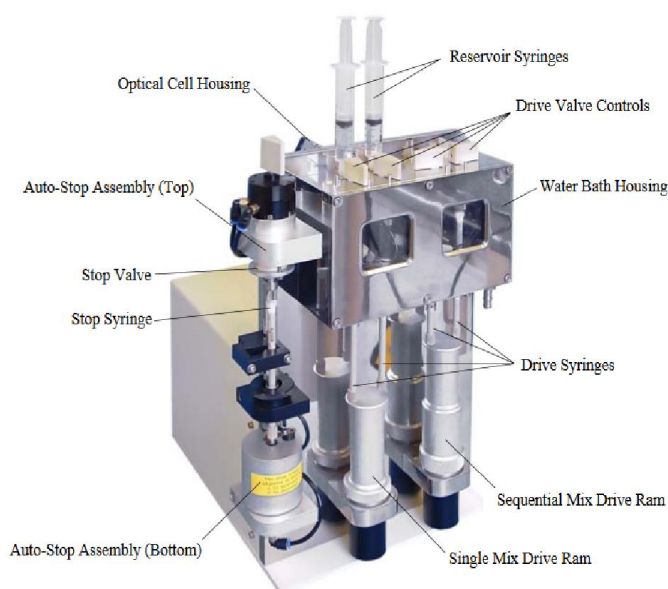


Figure II. 1- Montage du système d'injection du stopped-flow SX20 ("SX20 Hardware User Guide ", 2006).

### ii. Caractéristiques techniques

Il y a quatre paramètres importants concernant le montage.

Le volume d'injection doit être choisi de façon à injecter suffisamment d'échantillon entre chaque acquisition pour renouveler à chaque fois le contenu de la cuve d'analyse. Le volume d'injection après différents essais a été fixé à 140  $\mu\text{L}$ .

De plus, il faut aussi s'assurer que lors d'une nouvelle expérience, le circuit ne soit rempli que des réactifs désirés, afin qu'il n'y ait pas de mélange entre les réactifs de l'expérience précédente et les réactifs de l'expérience en cours. Pour ce faire, au début de chaque expérience, un volume de 200  $\mu\text{L}$  de chaque réactif est introduit manuellement dans le circuit. Cinq tirs à blanc sont réalisés. La première acquisition analysée correspond au sixième tir.

Bien que l'appareil possède un déclenchement d'acquisition quasiment instantané après l'injection des réactifs, il existe tout de même un temps mort. Le temps mort du SX20 est de 1 ms pour la cellule utilisée (cellule de 20  $\mu\text{L}$  de trajet optique 1 cm).

Enfin, le montage entre les seringues réservoir (reservoir syringe) qui servent à introduire les réactifs dans les seringues à échantillon du circuit et les seringues à échantillon fait qu'il existe un volume mort qui ne peut être évité. Ce volume mort entraîne un effet de dilution sur les réactifs introduits. La dilution calculée sur plusieurs expériences, par comparaison avec des spectres de référence sur le spectromètre DU 800 est de 1,17 avec un écart type de 0,04.

### iii. Conditions d'utilisation

Le stopped-flow a été utilisé pour des cinétiques à haute concentration en cyanure : entre 25 mM et 435 mM pour tous les échantillons, exceptée la Ngb H64V pour laquelle des expériences avec des concentrations de 0,5 mM à 25 mM en cyanure ont aussi été testées.

A cause de la contrainte de dilution imposée par l'appareil, toutes les solutions sont préparées à une concentration double de celle souhaitée ( $[Ngb] = 5 \text{ à } 7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  en fonction du variant). Pour les solutions de Ngb et des variants, la concentration des solutions est préalablement vérifiée avec le spectrophotomètre DU 800, ce qui permet d'avoir un spectre de référence. Pour les solutions de cyanure, cette contrainte a forcé la préparation de solutions de concentration de l'ordre de 900 mM. Ces solutions ont été préparées dans du tampon phosphate pH 7,4. Néanmoins il a été constaté que ces solutions se dégradent sur une période de temps relativement faible. Aussi les solutions de cyanure de concentration supérieure à 600 mM n'étaient utilisées que deux jours consécutifs.

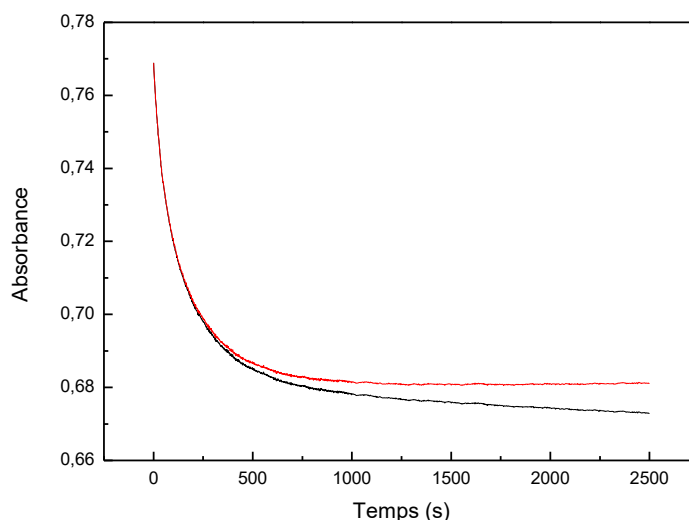
Avant chaque cinétique, un spectre de référence de la solution de Ngb est enregistré avec l'appareil stopped-flow. Pour ce faire, un blanc est d'abord réalisé en injectant du tampon phosphate à l'aide des deux seringues dans le circuit. Les paramètres d'acquisition, qui seront les mêmes pour l'enregistrement du spectre de référence, sont un balayage sur une plage de 250 nm à 800 nm avec un pas de 2 nm et une vitesse de lecture de 2 nm/s. Le blanc est automatiquement enregistré et soustrait au signal d'absorbance par l'appareil. La solution de Ngb est ensuite mise dans une seringue et du tampon phosphate dans l'autre seringue afin d'obtenir un effet de dilution identique à l'expérience avec le cyanure.

Pour les cinétiques, la longueur d'onde d'acquisition choisie correspond à la longueur d'onde d'absorbance maximale de la bande de Soret pour la protéine étudiée. Avant d'introduire les réactifs dans le circuit, un blanc est d'abord réalisé en injectant du tampon phosphate par une seringue et de la solution de cyanure à la concentration désirée par l'autre seringue. La seringue de tampon phosphate est ensuite remplacée par la seringue contenant la solution de Ngb étudiée. Le temps d'acquisition et le nombre de points par unité de temps est réglé en fonction de la protéine étudiée et de la concentration en cyanure étudiée. Ces deux paramètres sont changés toutes les deux ou trois acquisitions afin d'obtenir différents jeux de données.

Pour s'assurer de la reproductibilité des mesures, deux expériences avec plusieurs acquisitions chacune ont été réalisées à chaque concentration en cyanure, pour la Ngb WT et les variants. Dans le cas de la Ngb WT, des acquisitions ont aussi été réalisées à d'autres longueurs d'onde, 400 nm et 407 nm pour vérifier que le même déclin était observé.

### iv. Exploitation des données

Les différentes courbes obtenues sont récupérées sous forme de fichiers excel. Avant l'analyse, une correction préalable est apportée sur l'allure des courbes. Il a été remarqué, lors d'expériences tests sur la Ngb WT ou sur des variants en présence seulement de tampon phosphate, que le signal n'est pas stable au cours du temps. En se plaçant aux longueurs d'onde d'absorbance maximale de la bande de Soret, une décroissance linéaire du signal avec un coefficient directeur de l'ordre de  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$  à  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  est observée. Cette décroissance est aussi observable sur les courbes de déclin cinétique obtenues (Figure II. 2). Lorsque la courbe atteint le plateau (en se basant sur la constante de temps déterminée avec la tangente à l'origine), la même décroissance linéaire, avec le même ordre de grandeur, est obtenue. Aussi, pour chaque courbe obtenue, la valeur du coefficient directeur est évaluée en le mesurant pour des temps longs par rapport à l'obtention du plateau. Puis la courbe est corrigée en ajoutant en chaque point la valeur d'absorbance perdue du fait de cette décroissance linéaire.



**Figure II. 2-** Courbes de déclin cinétique de la réaction de la Ngb WT avec du cyanure à 25 mM. En noir : courbe expérimentale sans correction. En rouge : courbe expérimentale avec correction de pente.

Les courbes sont ensuite analysées à l'aide du logiciel OriginPro 8. Pour une concentration donnée, chaque courbe est analysée avec l'équation cinétique appropriée. Puis une moyenne sur les valeurs obtenues est réalisée. L'incertitude indiquée correspond à l'écart type total  $\sigma_{total}$  calculé en utilisant l'équation II. 2.

### 3. Lecteur de plaques - Expériences de stabilité en fonction du pH

Pour limiter la quantité d'échantillon à utiliser, les expériences de stabilité en fonction du pH ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaques.

#### i. Caractéristiques techniques

## Chapitre II : Matériels et méthodes

Ces expériences ont été faites sur des plaques 96 puits (UV-STAR, F-bottom, de Greiner Bio One) à l'aide d'un lecteur de plaques Synergy H1 Hybrid Reader de Biotek. Ce lecteur de plaques bénéficie d'un contrôleur de température et d'un système d'agitation interne des plaques.

La source lumineuse est une lampe flash Xenon et le signal d'absorbance obtenu est enregistré à l'aide d'une photodiode. L'erreur sur la valeur d'absorbance est de 1 % de 0 à 3 d'absorbance.

Le volume déposé dans chaque puits influe directement sur la valeur du trajet optique  $l$  qui intervient dans la loi de Beer-Lambert. Des expériences de calibration ont été réalisées avec la Ngb WT pour vérifier la précision de la valeur du trajet optique en fonction du volume versé, de la concentration et de l'agitation. Il a été vérifié que l'évolution de  $l$  en fonction du volume versé (de 100 à 250  $\mu\text{L}$ ) obtenue est linéaire et identique entre les différentes concentrations testées (de 4 à 12  $\mu\text{M}$ ). Le coefficient directeur de la droite de calibration est de  $0,0024 \text{ cm} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Le logiciel Gen5.2.00 fourni avec le lecteur de plaques permet aussi de calculer cette évolution et donne un coefficient de proportionnalité de  $0,0025 \text{ cm} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . La valeur de  $l$  est donc précise pour des volumes de 100  $\mu\text{L}$  à 250  $\mu\text{L}$ .

L'influence des modes d'agitation a aussi été vérifiée. Le mode d'agitation linéaire perturbe de façon significative la valeur de  $l$ . En revanche le mode d'agitation circulaire n'a pas d'influence sur la valeur de  $l$ .

Pour la suite, un volume de 200  $\mu\text{L}$  par puits a été choisi. A l'aide des droites de calibration, le trajet optique pour un volume de 200  $\mu\text{L}$  a été mesuré à  $0,462 \pm 0,007 \text{ cm}$ .

### ii. Conditions d'utilisation

Le protocole d'acquisition est réglé à partir du logiciel Gen5.2.00 fourni avec le lecteur de plaques. Le protocole créé pour ces expériences est le suivant :

- Réglage de la température à  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$
  - Agitation circulaire 30 s, 282 cercles par minute
  - Analyse du puits, de 252 à 802 nm, avec un pas de 5 nm
- } x4

Lors de chaque acquisition, quatre puits différents sont analysés. Il a été choisi de ne pas analyser plus de puits en une acquisition afin de garder un temps raisonnable entre la mesure du spectre dans le premier et le dernier puits. Le temps d'une acquisition est de 2 minutes 30 secondes. Chaque puits est rempli avant une acquisition avec 200  $\mu\text{L}$  d'une solution de Ngb (concentration finale 8  $\mu\text{M}$ ) au pH désiré (tampon phosphate + acide citrique de pH 2,2 à 8,0). Le pH final dans chaque puits a été vérifié à l'aide d'un pH-mètre.

La première acquisition comprend toujours un puits ne contenant que du tampon à pH 2,2. Le spectre mesuré pour ce puits sert de référence. Il a été vérifié qu'un spectre semblable était obtenu pour des solutions tampons à d'autres pH.

Afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, l'expérience a été répétée au moins deux fois pour chaque protéine et à chaque valeur de pH.

### iii. Exploitation des données

Avant toute analyse, deux corrections sont apportées aux données recueillies. La première consiste à soustraire le spectre de référence mesuré à l'ensemble des courbes obtenues aux différents pH. La deuxième correction ne concerne que certaines courbes. Dans la zone de pH de 4,0 à 5,0, il a été observé chez certains variants une augmentation de la ligne de base sur l'ensemble du spectre due à la formation d'un léger précipité. Par comparaison avec la ligne de base du spectre obtenu à pH 7,4, la ligne de base a été corrigée dans ces cas là par soustraction pour obtenir une ligne de base similaire à celle de pH 7,4.

Une fois les corrections effectuées, les valeurs des absorbances à la longueur d'onde d'absorbance maximale de la bande de Soret ont été recueillies en fonction du pH. Les valeurs représentées sur les graphes de l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret en fonction du pH correspondent à des valeurs moyennes issues de deux expériences. Les barres d'erreurs représentées pour chaque point correspondent à l'écart type sur la moyenne calculée en chaque point.

## B. Dichroïsme circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire a été mis en évidence en 1896 par Aimé Cotton, physicien français. Bien que les spectres obtenus en dichroïsme circulaire se situent dans le domaine de l'UV, cette technique se distingue de la spectrophotométrie d'absorption UV-Vis de par la grandeur mesurée. C'est une technique très utilisée en biochimie pour étudier les structures secondaires des protéines car les hélices et les feuillets présentent des spectres caractéristiques.

### 1. Principe

La lumière est une onde électromagnétique polarisable, c'est-à-dire dont l'orientation dans l'espace peut être dirigée. Ainsi, une onde linéaire monochromatique polarisée rectilignement peut s'exprimer sous la forme de deux ondes polarisées circulairement. On parle alors de lumière polarisée circulaire droite (PCD) ou de lumière polarisée circulaire gauche (PCG) en fonction du sens de rotation de la composante analysée. Un échantillon présente du dichroïsme circulaire à une longueur d'onde donnée lorsque sa capacité à absorber l'une des deux composantes de la lumière polarisée circulaire est différente de l'autre (Fasman, 1996). L'absorbance d'un milieu dichroïque peut donc être définie par la différence d'absorbance  $\Delta A$  entre les absorbances respectives des deux polarisations circulaires :

$$\Delta A = A_{PCG} - A_{PCD} \quad \text{Equation II. 3}$$

En utilisant la loi de Beer-Lambert il vient :

$$\Delta A = (\epsilon_{PCG} - \epsilon_{PCD}) \times l \times C = \Delta \epsilon \times l \times C \quad \text{Equation II. 4}$$

Avec :

$\Delta \epsilon = (\epsilon_{PCG} - \epsilon_{PCD})$  : différence entre les coefficients d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée pour les deux polarisations en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Le dichroïsme circulaire est défini par ce  $\Delta \epsilon$ .

$l$  : épaisseur de la cuve en cm

C : concentration de l'échantillon en mol.L<sup>-1</sup>.

Cependant  $\Delta\epsilon$  n'est pas la grandeur mesurée par l'appareil. La valeur mesurée par l'appareil est l'ellipticité  $\theta$  en millidegrés. Afin de s'affranchir de la dépendance de  $\theta$  avec la concentration C, la longueur de la cellule l et la longueur de la protéine, il est possible de convertir l'ellipticité en ellipticité moyenne par résidu (ou ellipticité molaire par résidu)  $[\theta]_{MR}$  suivant la relation suivante :

$$[\theta]_{MR} = \frac{100\theta_{obs}(\lambda)}{N_r \times l \times C} \quad \text{Equation II. 5}$$

Avec :

$N_r$  : nombre d'acides aminés de la protéine (151 pour la Ngb)

l : épaisseur de la cuve en cm

C : concentration de l'échantillon en mol.L<sup>-1</sup>

$\theta_{obs}(\lambda)$  : ellipticité mesurée à une longueur d'onde  $\lambda$  en degré

$[\theta]_{MR}$  : ellipticité moyenne par résidu en deg.L.m<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>.

L'ellipticité moyenne par résidu  $[\theta]$  est reliée au dichroïsme circulaire  $\Delta\epsilon$  par la relation suivante :

$$\Delta\epsilon_{MR} = \frac{[\theta]_{MR}}{3298} \quad \text{Equation II. 4}$$

## **2. Caractéristiques techniques**

Le spectrophotomètre utilisé est un Jasco J-810 situé à l'ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette. Le faisceau incident provient d'une lampe Xenon 450 W réfrigérée à l'eau. Le faisceau incident est transformé en lumières PCD et PCG grâce à un modulateur photoélastique avant d'entrer en contact avec l'échantillon. Le spectromètre J-810 est équipé d'un thermostat Peltier. Le logiciel Spectra Manager fourni avec l'appareil permet de régler les paramètres d'acquisition. Il offre aussi la possibilité de traiter les spectres en convertissant le signal en millidegrés, en ellipticité moyenne par résidu  $[\theta]_{MR}$  (ou ellipticité molaire par résidu).

## **3. Conditions d'utilisations**

Des expériences en DC ont été menées afin de déterminer et de comparer la structure secondaire de la Ngb WT et des variants. De plus, l'évolution de la structure secondaire de ces protéines à différents pH a aussi été étudiée en DC.

Les paramètres d'acquisition réglés avec le logiciel Spectra Manager sont les suivants :

Modes de mesure : CD, tension, Absorbance

Echelle de mesure : 350 - 180 nm

Pas de mesure : 0,1 nm

Sensibilité : Haute

Temps d'intégration des données (DIT) : 1 s



Bande passante : 2,00 nm

Vitesse de balayage : 50 nm/min

Accumulations de spectres : 3

Des droites de calibration ont été effectuées pour déterminer la concentration de protéine à utiliser avec la cuve (quartz, 0,1 mm d'épaisseur). La concentration nécessaire a été déterminée à 8  $\mu\text{M}$  pour un volume de 30  $\mu\text{L}$ . La concentration exacte de l'échantillon est vérifiée avant les expériences par mesure d'un spectre d'absorption UV-Vis.

Avant chaque série d'expériences ou à chaque changement de protéine, la cuve est nettoyée avec de l'éthanol puis rincée abondamment à l'eau distillée. Le blanc est réalisé en faisant une acquisition du tampon utilisé. Le spectre obtenu est ensuite soustrait manuellement aux spectres des échantillons à l'aide du logiciel Spectra Manager.

Pour les expériences d'étude de la structure en fonction du pH, une solution mère de 50  $\mu\text{L}$  de Ngb à 80  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 66 mM pH 7,4 est constituée. Par suite, 5  $\mu\text{L}$  de cette solution sont dilués dans 45  $\mu\text{L}$  de solution tampon phosphate + acide citrique, au pH désiré. Le pH final de la solution est vérifié à l'aide d'un pH-mètre.

#### 4. Exploitation des données

Une fois le spectre recueilli, il est traité avec Spectra manager comme indiqué dans la partie B.1 pour obtenir une unité en ellipticité moyenne par résidu. Cette unité est conservée pour les traitements suivants.

La déconvolution des spectres pour obtenir le pourcentage d'hélices, de feuillets, et de structure désordonnée est réalisée à partir du serveur d'analyse Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) (Whitmore & Wallace, 2004, 2008).

Le programme d'analyse utilisé est le programme CONTIN/LL (Provencher & Glockner, 1981; Van Stokkum, Spoelder, Bloemendal, van Grondelle, & Groen, 1990). L'objectif du programme est d'établir l'équation reliant le spectre expérimental à la structure secondaire en déterminant les coefficients  $f_k$  d'après l'équation suivante:

$$C_\lambda = \sum f_k B_{k,\lambda} \quad \text{Equation II. 5}$$

Avec :

$C_\lambda$  : valeur du spectre expérimental en  $\text{deg.L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  à la longueur d'onde  $\lambda$  (nm)

$B_{k,\lambda}$  : valeur du spectre individuel en  $\text{deg.L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  d'une composante de structure secondaire  $k$  (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , structure désordonnée et boucles) à la longueur d'onde  $\lambda$  (nm)

$f_k$  : fraction de la composante  $k$  dans le spectre expérimental. Ce sont les coefficients  $f_k$  qui nous intéressent.

Pour ce faire, le programme cherche à déterminer par régression une valeur approchée de  $C_\lambda$ . Afin de procéder à la régression, il utilise une combinaison linéaire de spectres de référence. La base de spectres de références retenue est l'ensemble numéro sept (Sreerama & Woody, 2000) proposé par le site. Elle comprend notamment le spectre de la myoglobine. Elle est optimisée pour

des spectres de 190 nm à 240 nm, ce qui correspond à la gamme de longueur d'onde d'intérêt des spectres expérimentaux obtenus. En effet, entre 180 et 190 nm, l'allure des spectres expérimentaux est trop dépendante du tampon utilisé et de la perte de puissance du signal incident. Au-dessus de 240 nm, les spectres obtenus ont une allure linéaire de valeur approximative 0.

Les résultats des déconvolutions présentés dans ce manuscrit correspondent à la moyenne des valeurs obtenues sur au minimum deux expériences sur des lots de protéine différents. L'incertitude représentée correspond à l'écart type sur la moyenne des valeurs.

## **C. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est un phénomène mis en évidence en 1946 par deux équipes de physiciens, l'équipe du Professeur Bloch à Stanford et l'équipe du Professeur Purcell à Harvard. Elle nous permet notamment d'observer des signaux caractéristiques de la présence des formes isomères de l'hème chez la Ngb.

### **1. Principe**

Les expériences de RMN réalisées durant cette thèse sont des expériences de RMN du proton  $^1\text{H}$  en 1D. L'hydrogène est un noyau classiquement utilisé en RMN car il possède un spin nucléaire de  $\frac{1}{2}$ . Sous l'effet d'un champ magnétique  $B_0$ , il est possible d'orienter les moments magnétiques de ce spin. Ces orientations correspondent à deux états quantiques d'énergie caractérisés par les nombres quantiques de spin  $m_s = -\frac{1}{2}$  et  $m_s = +\frac{1}{2}$ . La différence d'énergie très faible séparant ces deux niveaux est à l'origine d'une répartition des populations inégales entre les deux niveaux. Il en résulte une aimantation macroscopique orientée suivant l'axe du champ magnétique  $B_0$ . La RMN consiste alors à manipuler et à détecter cette aimantation macroscopique. Pour réaliser ces manipulations, un deuxième champ magnétique  $B_1$  est appliqué, sous forme d'impulsion, perpendiculairement à  $B_0$ . A la suite de cette impulsion, l'aimantation obtenue revient à son état initial, créant ainsi le signal RMN.

Dans la pratique, pour les expériences de RMN du proton réalisées, l'acquisition du signal temporel RMN (ou FID pour Free Induction Decay) se fait par suivi du courant électrique induit dans la bobine de détection par la rotation dans le plan de l'aimantation. La transformée de Fourier de ce FID permet d'obtenir un spectre en fréquence, contenant un (ou des) signal (signaux) à la fréquence de rotation de l'aimantation. Cette fréquence est aussi appelée déplacement chimique  $\delta$ , d'unité ppm (partie par million) et est directement liée à l'interaction entre l'aimantation et le champ magnétique.

Les signaux obtenus représentent la somme des signaux issus de chaque proton  $^1\text{H}$  résonant à des fréquences (déplacements chimiques) la plupart du temps différentes. Plusieurs paramètres peuvent affecter l'intensité de ces signaux et leurs déplacements chimiques. Tout d'abord, les déplacements chimiques sont directement impactés par l'environnement électronique du noyau considéré. Ainsi lorsque des électrons forment un écran entre le champ magnétique et le noyau, il y a un effet de blindage chimique. La présence de groupements chimiques électronégatifs ou électro-

attracteurs influe donc sur les déplacements chimiques. De plus, les signaux peuvent être modifiés à la suite de couplages scalaires s'effectuant par le biais des électrons impliqués dans la formation des liaisons chimiques séparant deux noyaux étudiés. La constante  $J$  désigne ce type de couplage. Plus le nombre de liaisons séparant les deux centres étudiés est élevé, moins le couplage est fort. Il est difficile d'observer des couplages scalaires entre des noyaux séparés par plus de trois ou quatre liaisons. Un autre facteur influençant les déplacements chimiques est la présence d'un centre paramagnétique. Cet effet est la résultante d'un couplage dipolaire entre le spin électronique des électrons délocalisés et le spin nucléaire des noyaux étudiés. Chez la Ngb WT, la présence d'un centre fer  $3+$  de spin  $S=3/2$  fortement paramagnétique joue un rôle sur les déplacements chimiques des protons à proximité de ce centre (Du et al., 2003).

Ainsi le spectre RMN de la Ngb peut se découper en trois zones (Figure II. 3). Entre 5 ppm et 10 ppm, les signaux des protons sont attribués aux groupements amides du squelette protéique ainsi qu'aux groupements aromatiques des chaînes latérales des acides aminés. Entre 0 et 5 ppm, les signaux correspondent aux protons aliphatiques des chaînes latérales des acides aminés. Enfin, au-dessus de 10 ppm et en-dessous de 0 ppm, des signaux ayant respectivement des déplacements chimiques élevés (fortement déblindés) et très faibles (fortement blindés) à cause de leur proximité avec le fer paramagnétique ( $Fe^{3+}$ ,  $S=3/2$ ) de l'hème sont observés. Nous entrerons plus dans le détail de l'attribution de ces signaux dans le Chapitre III.

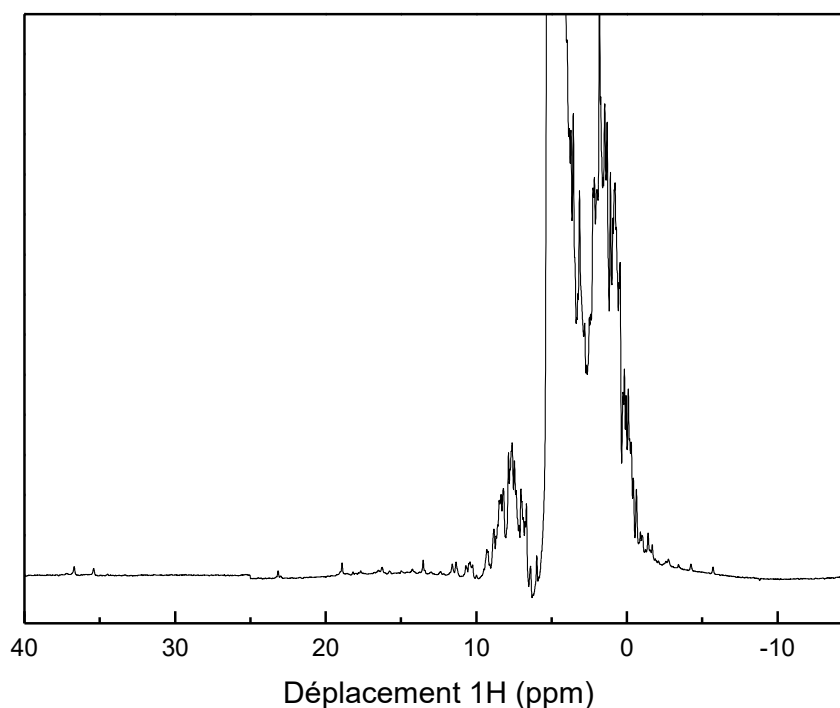


Figure II. 3- Spectre RMN  $^1H$  à 600 MHz de la Ngb  $WT_{ox}$ . Le spectre a été réalisé pour une concentration de Ngb  $WT_{ox}$  de 100  $\mu M$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 25°C.

## **2. Caractéristiques techniques**

Les expériences de RMN ont été menées sur un spectromètre Bruker AVANCE équipé d'un aimant UltraShield 600 MHz. Ce spectromètre se situe au laboratoire de Chimie et Biologie Structurales (ICSN, Gif-suf-Yvette). Les données RMN ont été collectées à l'aide du logiciel Bruker TopSpin.

## **3. Conditions d'utilisation**

Les expériences réalisées en RMN sont des études du comportement de la Ngb WT et des variants en fonction du pH et des études de cinétiques de fixation de ligand. Les expériences ont été menées sur des solutions de protéine de concentration 100  $\mu$ M dans du tampon phosphate pH 7,4, 66 mM. Du D<sub>2</sub>O est ajouté à la solution pour réaliser le « lock » du signal. Un spectre est typiquement constitué de la somme de 1024 scans. La durée de prise d'un spectre est d'une vingtaine de minutes. Chaque expérience a au moins été répétée deux fois sur des lots de protéines différents.

Dans le cas des expériences en fonction du pH, un spectre de référence à pH 7,4 est préalablement enregistré. La solution est retirée du tube RMN et la modification du pH se fait par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 37 % ou par ajout d'une solution de soude 4 M en fonction du pH désiré. Le pH obtenu est contrôlé à l'aide d'un pH-mètre. La solution est éventuellement centrifugée pour homogénéiser puis elle est remise dans le tube RMN pour l'acquisition.

Dans le cas des expériences de cinétique de fixation du cyanure, un spectre de référence à pH 7,4 est également enregistré. Le cyanure est directement déposé sous hotte dans le tube à partir d'une solution mère de 50 mM. Il faut noter un temps mort d'environ cinq minutes entre le mélange de la solution de Ngb et de la solution de cyanure dans le tube et le début de la première acquisition, lié au temps nécessaire pour préparer le tube, le mettre dans le spectromètre et faire les réglages nécessaires.

## **4. Exploitation des données**

L'exploitation des données comprend d'abord la mise en phase des spectres obtenus à l'aide du logiciel NMRpipe (Delaglio et al., 1995).

Dans le cas des cinétiques de fixation du cyanure, le premier spectre obtenu après injection du cyanure sert de spectre au temps initial. Les autres spectres sont traités automatiquement en prenant les mêmes paramètres de traitement de signal que ceux utilisés pour le premier spectre. Les valeurs des intensités en fonction du temps pour les pics d'intérêt des deux formes isomères de l'hème, autour de 30-40 ppm, sont ensuite extraites à partir de chaque spectre. Les valeurs obtenues pour le premier spectre sont normalisées à 1 et les valeurs obtenues à partir des autres spectres sont normalisées par rapport à celles du premier. Les courbes obtenues de l'évolution de l'intensité en fonction du temps pour chaque forme isomère sont ensuite analysées à l'aide du logiciel OriginPro 8. Une moyenne et un écart type (Equation I. 3) sont réalisés à partir des valeurs des différents paramètres obtenues pour chaque courbe.

## D. Expression et purification de protéines

Dans cette partie, les étapes de clonage du gène ainsi que de la production et de purification des protéines sont présentées. Le protocole a fait l'objet de différentes optimisations durant la thèse.

### 1. Construction du plasmide pour l'expression des protéines

La production de la Ngb ou de variants par des bactéries compétentes nécessite l'emploi d'un plasmide. Un plasmide est un double brin d'ADN circulaire avec notamment un site de clonage conçu pour insérer le gène codant pour la protéine d'intérêt. Le plasmide choisi est un plasmide commercial pProEx TA. Ce plasmide présente deux particularités intéressantes. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline. Ce gène permet de sélectionner des bactéries ayant incorporé le plasmide grâce à l'ampicilline contenue dans les milieux de culture. De plus il possède un His-tag au niveau N-terminal du site de clonage. Chez pProEx, l'His-tag est un ensemble de six histidines associé à une séquence d'acides aminés spécifiquement reconnue par une protéase, la TEV (Tobacco Etch Virus). Ce His-tag se retrouve donc en partie N-terminale de la protéine désirée lorsqu'elle est clonée (Figure II. 4). Il permet de réaliser certaines étapes de purification que nous verrons par la suite et peut être éliminé ensuite par clivage avec la TEV.

```
MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGAERPEPELIRQSWRAVSRSPLEHGTV  
LFARLFALEPDLLPLFQYNCRQFSSPEDCLSSPEFLDHIRKVMLVIDAAV  
TNVEDLSSLEEYLASLGRKHRAVGVKLSSFSTVGESLLYMLEKCLGPAFT  
PATRAAWSQLYGAVVQAMSRGWDGE
```

*Figure II. 4- Séquence en acides aminés de la Ngb WT avec le tag histidine en rouge et en bleu la séquence d'acides aminés spécifiquement reconnue par la TEV. La partie N-terminale de la Ngb WT commence donc au résidu A (orange).*

Le plasmide pProEx TA comprenant le gène codant pour la Ngb WT a été produit et stocké par l'équipe au laboratoire. Il est possible à partir de ces plasmides d'introduire les mutations souhaitées par mutagenèse dirigée. Ce processus comprend une étape de PCR où les mutations sont introduites dans la séquence de la Ngb en utilisant des amorces contenant la mutation désirée. Ainsi l'ADN codant pour la Ngb mutée est amplifié sélectivement en utilisant les amorces d'ADN qui s'hybrident de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases. Puis la pfu, une ADN polymérase, permet l'élongation de l'ADN mutée. Une fois la PCR terminée, l'amplification des plasmides est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose fabriqués au laboratoire. Les solutions obtenues sont traitées par des enzymes DpnI pour digérer les plasmides méthylés qui ont servi à l'amplification pour introduire les mutations. Le plasmide muté est utilisé pour transformer des

bactéries puis après culture et extraction des plasmides, ces derniers sont envoyés à séquencer pour vérifier leur séquence.

## **2. Transformation dans des bactéries compétentes**

Les solutions obtenues après PCR contiennent majoritairement des plasmides avec le gène codant pour la protéine souhaitée. Il est possible de trouver des plasmides originaux avec le gène codant pour la Ngb WT qui n'auraient pas été digérés par la Dpn I. De plus la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase n'est pas fiable à 100 % et il est possible que des erreurs soient introduites durant le cycle de PCR. En effet le taux d'erreur de la pfu DNA polymérase est de l'ordre d'une erreur toutes les  $7,7.10^5$  à  $1.10^6$  bases incorporées.

Les plasmides sont alors incorporés dans une première bactérie compétente, la DH5 lors d'une phase de transformation. Cette étape va permettre de faire une sélection parmi les plasmides obtenus. Chaque bactérie DH5 ne peut incorporer qu'un plasmide. L'incorporation se fait grâce à un traitement chimique qui permet de perméabiliser la membrane des bactéries. La solution de bactéries est ensuite déposée sur un milieu de Lauria Broth (LB) + ampicilline. Seules les bactéries ayant incorporé un plasmide pProEX avec son gène de résistance à l'ampicilline peuvent se développer. Les cultures obtenues sont récupérées individuellement et déposées dans des milieux de cultures LB pour être amplifiées. Après traitement pour lyser les bactéries, chaque solution de plasmides est récupérée est stockée dans des tubes. Un tube de solution peut alors servir à analyser la pureté des plasmides formés par électrophorèse sur gel d'agarose, à être séquencé pour vérifier s'il y a bien la bonne séquence en acides aminés, notamment dans le cas où une mutation a été introduite dans la séquence. La dernière partie sera utilisée pour transformer des bactéries BL21 pour produire la protéine sauvage ou mutée en fonction des besoins.

Ces bactéries BL21 permettent la production de la protéine par différentes étapes (S. Dewilde et al., 2008). Une fois les protéines produites dans les bactéries, les culots bactériens sont récupérés et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

## **3. Purification des protéines**

Pour pouvoir utiliser les protéines voulues, il faut les extraire des bactéries BL21 dans lesquelles elles ont été produites et s'assurer que la solution obtenue ne contient bien que la protéine voulue. La purification des protéines se divise en quatre grandes étapes.

La première étape consiste à casser les parois des bactéries pour libérer leur contenu, dont les protéines voulues, en solution. Cette étape est réalisée par traitement chimique puis par ultrasons au sonicateur (Branson Sonifier 250). La solution obtenue est centrifugée à 15 000 rpm pendant 30 min pour éliminer les bactéries non-cassées, les débris cellulaires et agrégats protéiques. La solution obtenue est filtrée sur une membrane de  $22\ \mu\text{m}$  afin d'éliminer les agrégats de protéines.

La solution obtenue contient les protéines désirées ainsi qu'une quantité importante de milieu cellulaire et de fragments de protéines. Une quantité importante de ces impuretés sont éliminées à l'aide d'une première colonne de purification (Annexe A). Cette colonne, à base de résine de nickel-acide nitriloacétique (Ni-NTA), ne permet de retenir que les protéines présentant une affinité avec le nickel. Or, la Ngb est retenue spécifiquement à la résine de Nickel grâce à l'His-tag présent à la partie N-terminale de la protéine (Figure II. 4). Grâce au lavage, les impuretés n'ayant

pas d'affinité avec le nickel sont éliminées. Puis les protéines fixées à la résine sont récupérées en différentes fractions lors d'une étape d'élution avec de l'imidazole qui présente une meilleure affinité pour le nickel. La présence de la protéine dans les fractions recueillies est aisément identifiable grâce à sa couleur rouge. Les fractions retenues pour la suite de la purification correspondent aux fractions les plus concentrées et les plus pures. Ces deux aspects sont évalués par UV-Vis grâce à l'absorbance de la bande de Soret, caractéristique de la protéine et grâce au ratio  $A_{\text{Soret}}/A_{280}$ .

Une fois cette première colonne réalisée, il n'est pas nécessaire de conserver l'His-tag, qui ne fait pas partie de la séquence initiale de la protéine. Le clivage de l'His-tag est réalisé par la TEV qui reconnaît la séquence en acides aminés et coupe entre le résidu G (Figure II. 4, résidu G de la séquence d'acides aminés bleus) et la Ngb (Figure II. 4 résidu A orange). La TEV (produite au laboratoire avec un His-Tag), l'extrémité N-terminale qui contient le His-tag et les protéines non clivées sont ensuite éliminées de la solution par mélange avec de la résine Ni-NTA. Grâce à une centrifugation, la solution ne contenant que les protéines sans His-Tag est séparée de la résine Ni-NTA.

A cette étape de la purification, l'analyse sur gel de protéine (NuPage 12% Bis-Tris Gel, Novex) montre que la solution protéique contient majoritairement la Ngb mais aussi des impuretés en quantité moindre (puits numéro 2 de la Figure II. 5). La majorité de ces impuretés sont des impuretés plus lourdes que la Ngb. Une deuxième purification sur colonne a alors été totalement mise au point pendant la thèse.

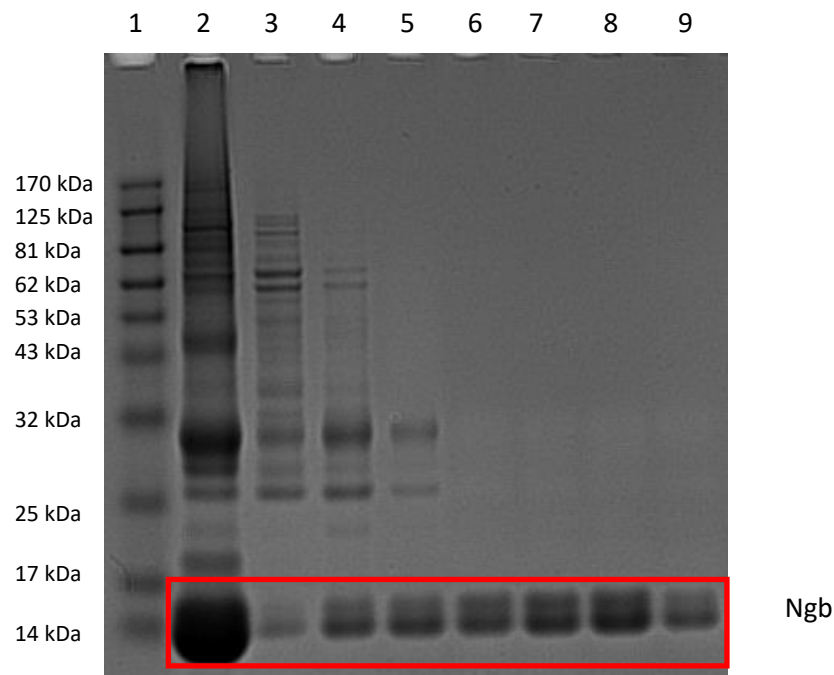


Figure II. 5- Analyse sur gel d'électrophorèse des solutions en sortie de colonne de Ni-NTA 1) Référence de poids moléculaire 2) Solution de Ngb WT clivée avant passage sur sephacryle 3) Fraction (tube) 1 d'élution 4) Fraction 2 d'élution 5) Fraction 3 d'élution 6) Fraction 7 d'élution 7) Fraction 6 d'élution 8) Fraction 5 d'élution 9) Fraction 4 d'élution.

La résine choisie pour cette deuxième colonne est une résine Sephacryl S-200. La séparation dans cette résine repose sur le principe d'exclusion de masse grâce à des grains poreux qui

permettent de retenir les petites molécules. La solution obtenue après la phase de clivage est directement éluée sur la colonne. Les molécules les plus lourdes éluent plus vite que les molécules les plus légères, comme la Ngb. La solution en sortie de colonne est récupérée en plusieurs fractions. La pureté des fractions est évaluée en UV-Visible et par analyse de gel de protéine (Figure II. 5). Il est visible que les dernières fractions recueillies, 6 à 9, ne contiennent que de la Ngb WT, avec une pureté supérieure à 95%. Les pourcentages relatifs des espèces présentes dans chaque puits sont évalués grâce au logiciel GeneTools fourni par Syngene avec le lecteur de gel de type Syngene PXi de Genesys. Afin de concilier quantité produite et pureté des échantillons, les fractions d'une pureté supérieure à 90% seront retenues.

Les fractions les plus pures sont réunies et concentrées/diluées deux fois 20 minutes à 2990 g dans du tampon phosphate pH 7,4 dans un vivaspin®. La solution concentrée obtenue est fractionnée en plusieurs aliquotes de 10 µL stockés à -80 °C pour de futures utilisations.

#### 4. Oxydation/réduction du pont disulfure

Afin d'assurer la présence ou l'absence du pont disulfure dans les expériences, les échantillons sont préalablement traités avec du ferricyanure ou du DL-dithiothreitol (DTT) respectivement.

Pour oxyder le pont disulfure, la solution de Ngb concentrée est diluée dans 5 mL de tampon phosphate 66 mM, ferricyanure 10 mM, pH 7,4 et laissée sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. La solution est ensuite concentrée/diluée dans du tampon phosphate pH 7,4 quatre à cinq fois 20 minutes à 2990 g afin d'éliminer le ferricyanure. Les aliquotes peuvent être stockés à -80 °C pour de futures utilisations.

Pour réduire le pont disulfure, la solution de Ngb concentrée est diluée dans 5 mL de tampon phosphate 66 mM, DTT 10 mM, pH 7,4 et laissée sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. La solution est ensuite concentrée/diluée dans du tampon phosphate pH 7,4 quatre à cinq fois 20 minutes à 2990 g afin d'éliminer le DTT. Etant donné qu'il y a un phénomène d'auto-oxydation lent du pont disulfure, la solution est utilisée rapidement plutôt que d'être stockée à -80 °C.

L'oxydation ou la réduction du pont disulfure par ce protocole ont été vérifiées en spectrométrie de masse (Annexe B) et par RMN. En RMN, la protéine sans pont disulfure présente des signaux avec des déplacements chimiques caractéristiques différents de la protéine avec pont disulfure (Figure III. 15). Nous présenterons ces résultats plus en détail dans le chapitre suivant.

Dans la suite du manuscrit, les protéines avec le pont disulfure oxydé (avec pont disulfure donc) seront indiquées avec un indice ox (exemple : Ngb WT<sub>ox</sub>) et les protéines avec le pont disulfure réduit (sans pont disulfure donc) seront indiquées avec un indice red (exemple : Ngb WT<sub>red</sub>). Si aucun indice n'est indiqué, il s'agit de la protéine mentionnée d'une façon générale, sans tenir compte de la présence ou de l'absence du pont disulfure. Il faut noter l'exception de la Ngb C46G, qui ne possède naturellement pas de pont disulfure. La mention Ngb C46G<sub>ox</sub> servira à indiquer si la protéine a été traitée par du ferricyanure et la mention Ngb C46G<sub>red</sub> si la protéine a été traitée par du DTT.



## **E. Conclusion**

Les techniques spectroscopiques présentées permettent d'étudier sous différents angles la Ngb WT et ses variants.

La spectrophotométrie UV-Visible fournit des informations sur la sphère de coordination de l'hème et son environnement. Elle est utilisée pour déterminer pour la première fois l'influence de mutations sur le coefficient d'extinction molaire de l'hème. Elle sert aussi à étudier les paramètres cinétiques de la fixation de ligand sur les protéines.

Le DC permet d'observer l'influence des mutations sur la structure secondaire en hélices de la protéine.

La RMN sert quant à elle à distinguer les deux formes isomères de l'hème. Il est ainsi possible d'attribuer des paramètres cinétiques à chacun.

L'optimisation du protocole de synthèse et de purification des protéines permet d'utiliser avec rigueur certaines techniques, comme le DC ou la détermination du coefficient d'extinction molaire. La concentration des échantillons, et donc leur pureté, est absolument nécessaire.

Afin d'étudier le comportement de la Ngb et des variants dans plusieurs conditions, il a d'abord fallu leurs différentes caractéristiques spectrales dans des conditions de référence. Ces caractérisations font l'objet du prochain chapitre.



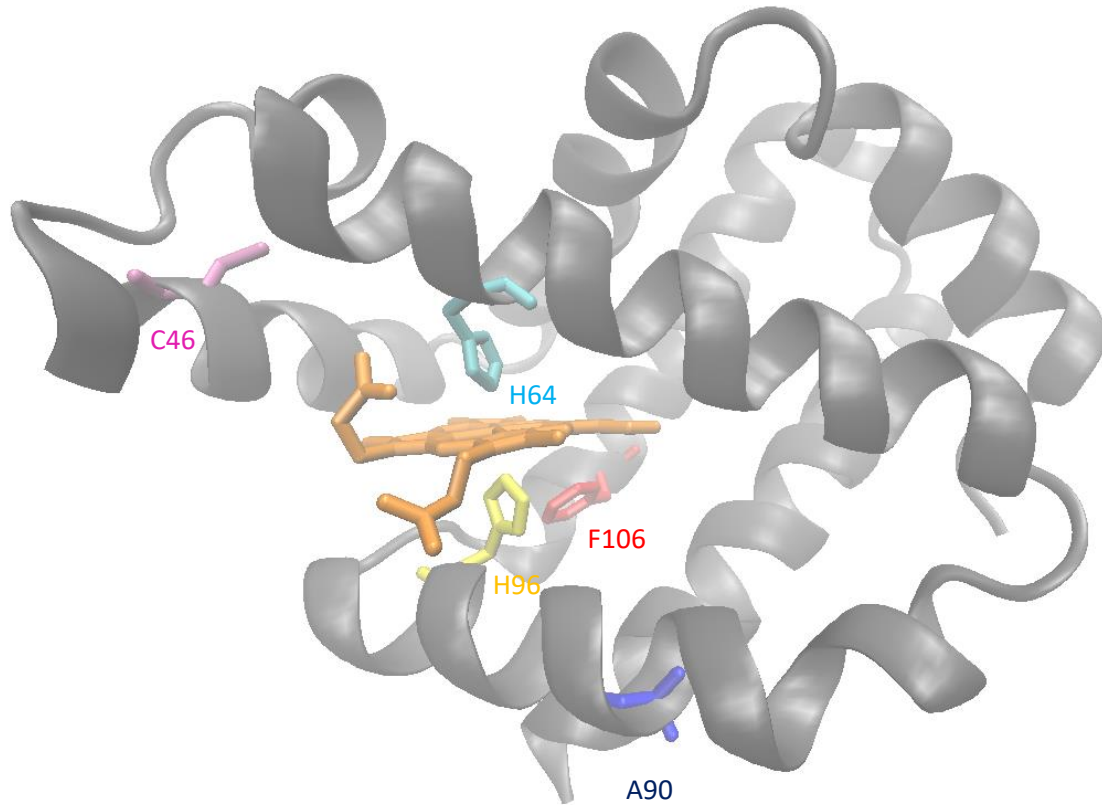
## **Chapitre III : Caractérisation de la Ngb et des variants étudiés**



Ce chapitre présente les différents variants de la Ngb étudiés ainsi que leurs caractéristiques spectrales. Différentes techniques ont été utilisées : spectrophotométrie UV-Visible pour l'hème, dichroïsme circulaire pour la structure secondaire et résonance magnétique nucléaire pour les deux formes isomères de l'hème. Les caractéristiques spectrales des variants seront comparées à celles de la Ngb WT afin d'observer les effets des mutations sur la structure de la protéine.

## A. Présentation des variants étudiés

Les travaux présentés dans ce manuscrit se sont articulés autour des mutations de quatre acides aminés de la Ngb : l'histidine distale E7, la cystéine CD5, la phénylalanine G5 et l'alanine F2. La position de ces acides aminés au sein de la protéine est représentée ci-dessous (Figure III. 1). Nous allons tout d'abord expliquer le choix ces acides aminés et des mutations effectuées.



*Figure III. 1- Structure tridimensionnelle de la Ngb WT avec en orange l'hème de la protéine, en bleu cyan l'histidine distales H64 (E7) (au-dessus de l'hème), en jaune l'histidine proximales H96 (F8) (en-dessous de l'hème), en rose la cystéine C46 CD5, en rouge la phénylalanine F106 (G5) et en bleu l'alanine A90 (F2) (figure réalisée avec VMD, fichier pdb 4MPM-1).*

### 1. Mutation de l'histidine 64 (E7)

Comme indiqué au chapitre I, l'histidine 64 complète la sphère de coordination de l'hème de la Ngb (Uno et al., 2004). Elle est responsable de l'hexacoordination de l'atome de fer. Cela confère à cet acide aminé un rôle crucial pour la stabilité de la protéine et est impliquée dans le processus de fixation de ligands.

Nous avons introduit la mutation de l'histidine 64 en valine (H64V). Cette mutation aboutit à une forme hexacoordinée de l'hème avec une molécule d'eau occupant alors la place du sixième ligand du fer (Uno et al., 2004). L'utilisation de la valine comme variant de l'histidine permet de limiter les interactions entre l'hélice E et l'hème du fait de la chaîne latérale apolaire de la valine. La mention Ngb H64V<sub>ox</sub> désigne la Ngb H64V avec un pont disulfure et la mention Ngb H64V<sub>red</sub> la Ngb H64V sans pont disulfure.

## 2. Mutation de la cystéine 46 (CD5)

Comme indiqué en introduction, elle est l'une des deux cystéines impliquée dans la formation d'un pont disulfure intramoléculaire.

Nous avons introduit la mutation de la cystéine 46 en glycine (C46G). L'utilisation de la glycine comme acide aminé variant a été choisie car la glycine se trouve chez l'hémoglobine humaine en position CD5. Cette mutation permet aussi de mimer l'absence de pont disulfure comme chez la Ngb de murine où une glycine est en position 46. La mention Ngb C46G<sub>ox</sub> désigne la Ngb C46G traitée par du ferricyanure et la mention Ngb C46G<sub>red</sub> la Ngb C46G traitée par du DTT.

## 3. Mutation de la phénylalanine 106 (G5)

La fonction phényle du résidu présente la particularité de se trouver dans le proche environnement de l'hème de la Ngb (A. Pesce et al., 2004; A. Pesce et al., 2003). Du fait de la forte aromaticité de l'hème, des interactions de Van der Waals de type  $\pi$ - $\pi$  stacking entre l'hème et le phényle de la F106 sont possibles. De plus, en fonction de la forme isomère de l'hème, l'encombrement stérique au niveau de la chaîne latérale de la F106 n'est pas le même (Chapitre I, Figure I. 17). Dans la forme isomère A, la F106 est plus proche du groupement vinylique en position 2. Dans la forme isomère B, la F106 est plus proche du groupement méthyle en position 3.

Dans le Chapitre I, il a été suggéré que la fixation de ligands s'accompagnait d'un glissement de l'hème dans une cavité inférieure. Des calculs de dynamiques moléculaires (Xu, Yin, Huang, Wang, & Du, 2010), effectués sur des structures de neuroglobine de souris mutées en F106 et en présence du ligand CO, ont mis en évidence un pivotement de la F106 vers l'extérieur de la protéine lors du glissement de l'hème (Figure III. 2). La F106 aurait donc un rôle potentiel dans le glissement de l'hème.

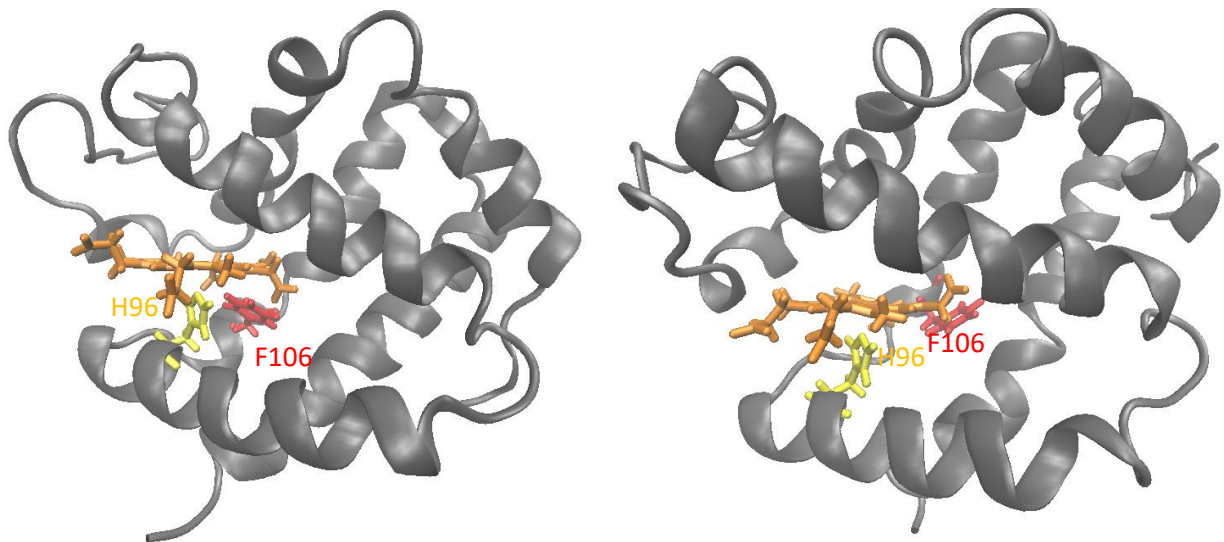


Figure III. 2- A gauche : Ngb avant réaction avec CO (figure réalisée avec VMD, fichier PDB 1NSH). A droite : Ngb après réaction avec CO (figure réalisée avec VMD, fichier PDB 1NSP). En bleu, l'hème avec l'histidine proximale 96 et en rouge la F106.

Nous avons introduit une mutation de la phénylalanine 106 en leucine (F106L). La leucine a été choisie car elle est l'acide aminé localisé en position G5 chez les myoglobines alors que la phénylalanine est un résidu très conservé chez les autres globines, comme l'hémoglobine humaine ou la cytoglobine humaine. La mention Ngb F106L<sub>ox</sub> désigne la Ngb F106L avec pont disulfure et la mention Ngb F106L<sub>red</sub> la Ngb F106L sans pont disulfure.

#### **4. Mutation de l'alanine 90 (F2)**

L'alanine 90 se situe sur l'hélice portant l'histidine proximale de l'hème (Figure III. 1).

Une étude sur un fragment d'acides aminés correspondant à l'hélice F de la forme apomyoglobine (Picotti et al., 2004) a montré que la mutation de la proline 88 (F3) en alanine augmente la stabilité de l'hélice F. Au contraire, la mutation inverse de l'alanine 90 en proline sur un fragment d'acides aminés correspondant à l'hélice F de la Ngb a montré que cette mutation conduit à une perte de stabilité de l'hélice vis-à-vis du pH (Codutti et al., 2009). L'alanine 90 a donc un rôle dans la structuration de l'hélice F de la Ngb.

Nous avons introduit la mutation de l'alanine 90 en proline (A90P). Cette proline est présente chez 90% des myoglobines et chez quelques hémoglobines. La mention Ngb A90P<sub>ox</sub> désigne la Ngb A90P avec pont disulfure et la mention Ngb A90P<sub>red</sub> la Ngb A90P sans pont disulfure.

Les différents acides aminés choisis pour être mutés ont tous en commun d'avoir une influence directe ou indirecte sur l'hème. L'histidine 64 est directement coordonnée à l'hème. L'alanine 90 a été mutée car elle impacte l'hélice F portant l'histidine proximale. La phénylalanine 106 se trouve dans le proche environnement de l'hème et peut avoir des interactions de  $\pi$ - $\pi$  stacking avec celui-ci. Enfin, il a été montré que l'état d'oxydation du pont disulfure, engendré par la cystéine 46 et la cystéine 55, influait sur la coordinence de l'hème (Morozov et al., 2014; Nadra et al., 2008). Chaque protéine a été produite suivant le protocole indiqué au chapitre II (partie IV). Puis les variants obtenus ont été caractérisés par spectrophotométrie UV-Visible, DC et RMN.

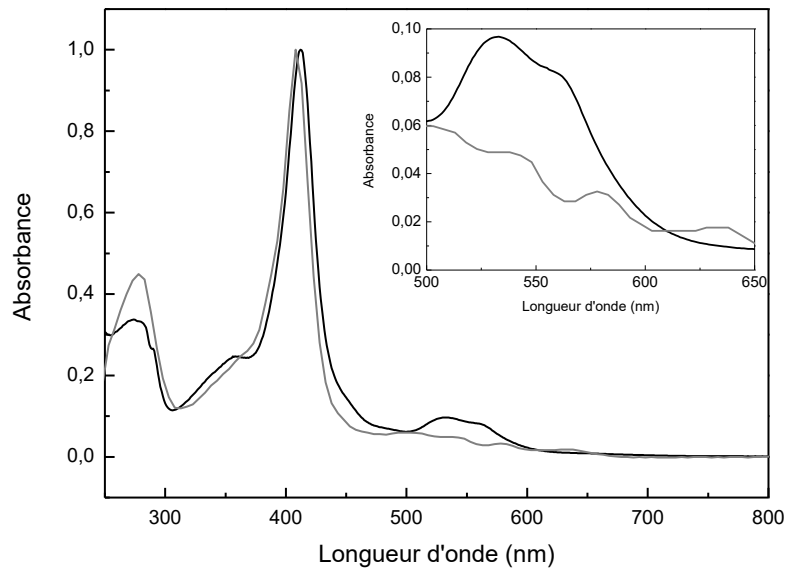
## **B. Caractérisation UV-Visible de la Ngb et des variants**

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux spectres UV-Visibles de la Ngb WT et de ses variants. La spectrophotométrie UV-Visible permet principalement chez les globines de sonder l'environnement proche de l'hème. En particulier, la bande de Soret et les bandes entre de 500 nm et 650 nm sont représentatives de l'état d'oxydation, l'état de spin et de la coordination du fer de l'hème. La comparaison des caractéristiques des spectres UV-Visibles des variants de la Ngb avec la Ngb WT constitue une première approche pour dégager des modifications structurales induites par ces mutations sur l'hème de la protéine. Nous nous intéresserons également à l'effet de la réduction du pont disulfure sur l'environnement de l'hème chez la Ngb WT et les variants.



### 1. Caractéristiques UV-Vis du spectre de la Ngb WT<sub>ox</sub>

Le spectre UV-Visible de la Ngb WT<sub>ox</sub> se compose de trois séries de bandes distinctes, à 280 nm, 412 nm et entre 500 et 600 nm (Figure III. 3). Par comparaison, le spectre de la Mb WT humaine a aussi été introduit. Les trois séries de bandes sont aussi visibles. Elles sont caractéristiques de la famille des globines.



**Figure III. 3- Spectres UV-visible de la Ngb WT<sub>ox</sub> et de la Mb WT humaines. En noir : Ngb WT<sub>ox</sub>, C= 7,6 μM dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 20 °C. En gris : Mb WT normalisée à 1 d'absorbance à 408 nm dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 20 °C.**

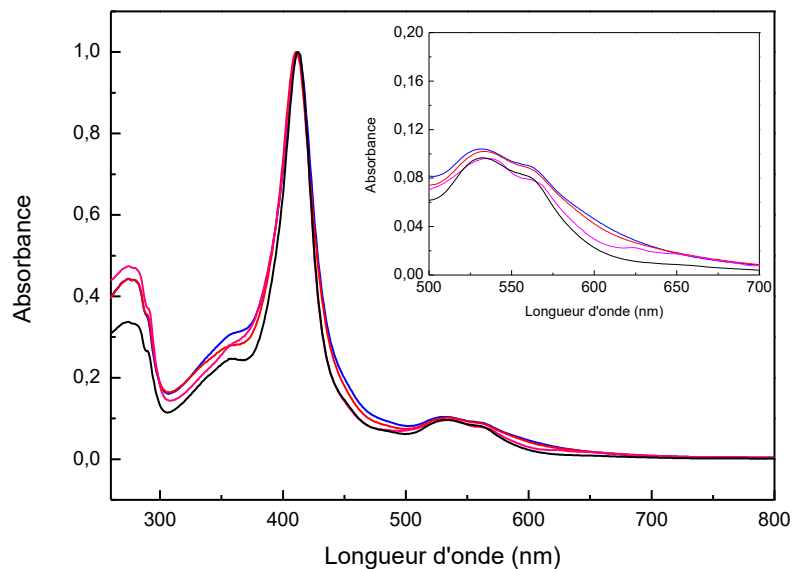
La bande large dans le domaine UV à 280 nm est associée à l'absorption de résidus aromatiques : tyrosine, tryptophane et phénylalanine (Pace, Vajdos, Fee, Grimsley, & Gray, 1995). Leurs contributions respectives sont modulées par leur nombre et par leurs coefficients d'extinction molaire qui dépendent du résidu et de son environnement créé par le repliement de la protéine. Dans une moindre mesure, la présence du pont disulfure absorbe aussi à cette longueur d'onde. Par exemple, le ratio des coefficients d'extinction molaire du tryptophane en solution par rapport au pont disulfure est de 44 (Pace et al., 1995). Dans le cas des hémoprotéines, l'hème de la protéine participe également à la bande à 280 nm (Urry, 1967).

La bande intense à 412 nm avec un épaulement à 360 nm ainsi que la série de bandes à 530 nm et 560 nm sont caractéristiques de la présence du groupe protoporphyrine IX de l'hème de la Ngb (Chapitre I, Figure I. 3). L'origine de ces bandes caractéristiques de la porphyrine est bien décrite par le modèle de « four-orbital » avancé par Gouterman (Gouterman, 1959, 1961). La bande la plus intense à 412 nm est la bande de Soret (bande B selon le modèle de Gouterman). Par comparaison avec le spectre de la Mb WT, la bande de Soret de la Ngb WT se situe à une longueur d'onde plus élevée (effet bathochrome). Cet effet bathochrome est associé à la différence de ligand distal entre les deux protéines. Chez la Mb WT, le sixième ligand est une molécule d'eau. Il s'agit d'un ligand faible comparé à l'histidine distale de la Ngb WT. Les bandes à 533 nm et à 560 nm sont appelées



(effet hypsochrome) par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub> ce qui est caractéristique d'une globine avec un hème hexacoordiné avec une molécule d'eau en sixième ligand. La bande présente à 630 nm, caractéristique d'un état haut-spin du fer, renforce cette hypothèse. Ce résultat est en accord avec les caractérisations du spectre UV-Visible de la Ngb H64V humaine dans la littérature (Uno et al., 2004).

Les autres mutations qui ont été introduites n'ont en revanche que très peu d'effet sur l'allure du spectre de la Ngb (Figure III. 5). Chez la Ngb F106L<sub>ox</sub> et la Ngb C46G, un léger déplacement de la bande de Soret, de 412 nm à 411 nm est observable. Les maxima d'absorption entre 500 nm et 600 nm sont conservés pour la Ngb F106L<sub>ox</sub> et la Ngb A90P<sub>ox</sub>. En revanche la Ngb C46G présente des bandes légèrement différentes, avec des maxima à 535 nm et 565 nm et deux bandes faiblement intenses vers 630 nm et 650 nm.



**Figure III. 5- Spectres UV-Vis de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (bleu), de la Ngb F106L<sub>ox</sub> (rouge), de la Ngb C46G (rose) et de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir). Les spectres ont été normalisés par rapport à 1,0 pour la valeur d'absorbance de la bande de Soret. Les expériences ont été réalisées dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 20 °C.**

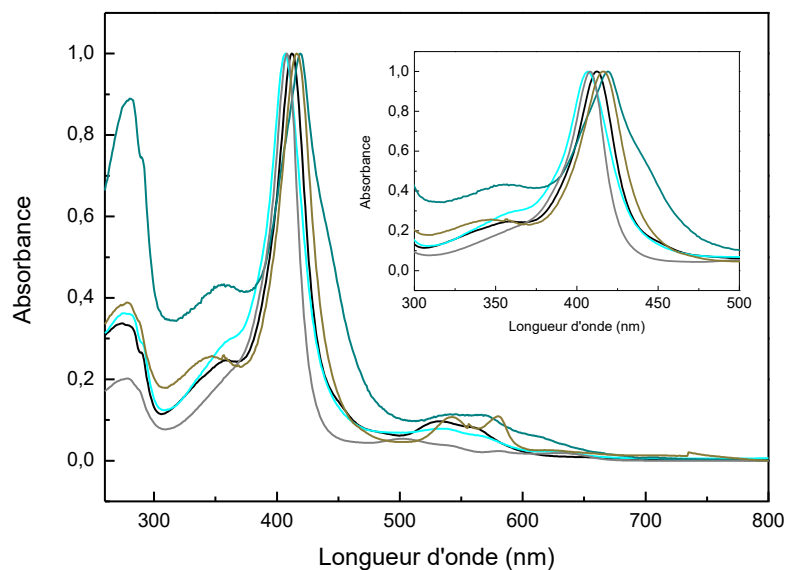
Dans le cas de la Ngb A90P<sub>ox</sub> et de la Ngb F106L<sub>ox</sub>, les spectres obtenus au niveau des bandes dues à la présence de l'hème sont donc similaires à celui de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Les mutations Ngb A90P<sub>ox</sub> et Ngb F106L<sub>ox</sub> ne semblent donc pas affecter le proche environnement de l'hème. En revanche dans le cas de la Ngb C46G, la présence de deux bandes vers 630 nm et 650 nm laisse envisager la présence d'une population haut-spin, comme pour la Mb WT et la Ngb H64V<sub>ox</sub>. Comparativement aux spectres de ces deux protéines, l'intensité de la bande à 630 nm de la Ngb C46G par rapport aux autres bandes du spectre est très faible. La Ngb C46G possède donc deux populations avec une population bas-spin et une population haut-spin. Ceci montre une perturbation sur l'environnement de l'hème et son champ de ligands engendrée par la suppression du pont disulfure. Nous entrerons plus dans l'interprétation de ce résultat dans la partie suivante (B.3) en comparant le variant Ngb C46G à la Ngb WT<sub>red</sub>.

Les bandes à 280 nm sont plus intenses pour les variants que pour la Ngb WT<sub>ox</sub>. Cette augmentation pourrait traduire de légères modifications structurales perturbant l'environnement électronique des acides aminés aromatiques absorbant à cette longueur d'onde. L'interprétation est cependant délicate dans la mesure où plusieurs facteurs peuvent contribuer à ce phénomène : coefficients d'extinction molaire des chromophores absorbant à 280 nm différents d'un variant à l'autre, repliement de la protéine différent d'un variant à l'autre, pureté légèrement différente d'un échantillon à l'autre.

### **3. Effet du pont disulfure**

Le spectre UV-Visible de la Ngb C46G montre que l'absence du pont disulfure n'affecte pas l'allure du spectre de la Ngb. Cependant, étant donné l'importance structurale du pont disulfure, nous avons voulu voir si le fait de réduire le pont disulfure dans le cas d'un variant de la Ngb WT n'affecte pas la sphère de coordination de l'hème.

La mutation de l'histidine 64 modifie directement l'environnement de l'hème. Lorsque le pont disulfure est réduit, l'allure du spectre est nettement modifiée (Figure III. 6). La bande de Soret s'est déplacée et élargie de 407 nm pour la forme avec pont disulfure à 420 nm pour la forme sans pont disulfure. Elle présente un épaulement vers 450 nm. Une autre bande à 360 nm, différente de l'épaulement observé sur la bande de Soret dans le cas de la Ngb H64V<sub>ox</sub>, semble apparaître. La bande à 280 nm est 2,5 fois plus intense et son intensité est de l'ordre de la bande de Soret. Enfin les bandes entre 500 nm et 600 nm sont elles aussi modifiées. La bande  $\beta$  est devenue plus intense que la bande  $\alpha$ . Un spectre de la Mb WT traitée avec du DTT par le même protocole a également été réalisé pour comparer (Figure III. 6). La bande de Soret est déplacée de 408 nm pour la forme native à 416 nm pour la forme traitée avec du DTT. Une bande semble aussi apparaître à 360 nm. Les bandes entre 500 et 600 nm sont également modifiées. La bande  $\beta$  est devenue aussi plus intense que la bande  $\alpha$ . La bande à 280 nm est 1,8 fois plus intense que la bande de la forme native.

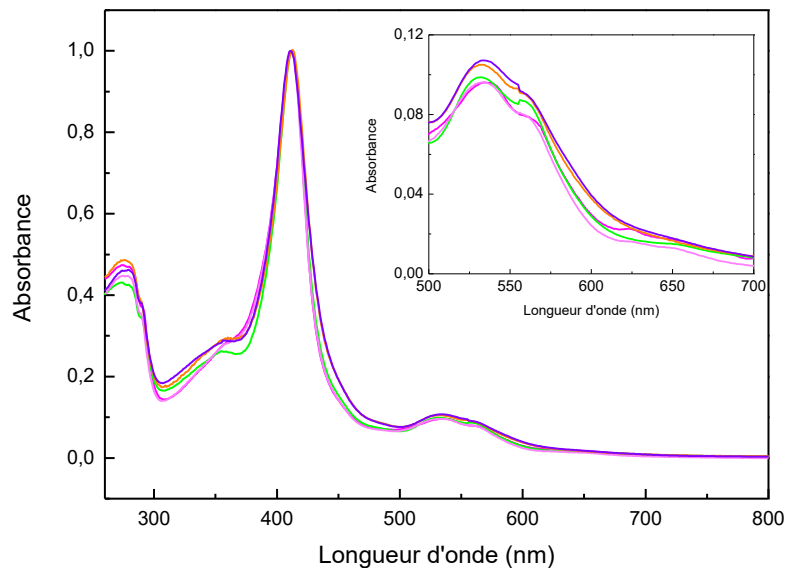


**Figure III. 6- Spectres UV-Vis de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir), de la Ngb H64V<sub>ox</sub> (cyan), de la Ngb H64V<sub>red</sub> (bleu-vert), de la Mb WT (gris) et de la Mb WT+DTT (vert olive). Les spectres ont été normalisés par rapport à 1,0 pour la valeur d'absorbance de la bande de Soret. Les expériences ont été réalisées dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 20 °C.**

Bien que l'effet du traitement avec le DTT soit plus marqué chez la Ngb H64V<sub>red</sub> que chez la Mb WT+DTT, l'évolution des spectres UV-Visibles est tout de même comparable. La Mb WT ne possédant pas de pont disulfure, les effets remarquables chez la Mb WT+DTT et vraisemblablement chez la Ngb H64V<sub>red</sub> ne peuvent pas être attribués à la seule réduction du pont disulfure. Des études réalisées sur les NOS et sur le cytochrome P-450 ont montré que le DTT pouvait se fixer sur l'hème de la protéine (Abu-Soud, Loftus, & Stuehr, 1995; Gorren, Schrammel, Schmidt, & Mayer, 1997; Sono, Andersson, & Dawson, 1982; C. Yu, Gunsalus, Katagiri, Suhara, & Takemori, 1974). Les spectres d'absorbance correspondant exhibent deux bandes d'absorption caractéristiques aux alentours de 380 nm et 460 nm. Par comparaison, la fixation du DTT sur l'hème de la Ngb H64V<sub>red</sub> pourrait expliquer l'apparition des bandes à 360 nm et à 450 nm. La présence de DTT, qui absorbe à 280 nm, dans la protéine, pourrait aussi expliquer l'augmentation d'intensité de la bande à 280 nm. Enfin, dans le cas de la Ngb WT<sub>red</sub>, la réduction du centre fer de l'état Fe<sup>3+</sup> à l'état Fe<sup>2+</sup> entraîne un déplacement de la bande de Soret de 412 nm à 426 nm (Figure I. 12). Le déplacement en longueur d'onde pour le maximum de la bande de Soret, de 407 nm à 420 nm chez la Ngb H64V<sub>red</sub>, pourrait également s'expliquer par l'existence d'une forme avec du Fe<sup>2+</sup> formée par réduction du fer par le DTT. La solution obtenue consisterait en un mélange de plusieurs formes de Ngb H64V, avec notamment de la Ngb H64V hexacoordinée par du DTT et de la Ngb H64V avec du Fe<sup>2+</sup> hexacoordiné par un autre ligand que le DTT (une molécule d'eau par exemple).

En raison de l'allure du spectre UV-Vis obtenue et de la difficulté d'interpréter le comportement de la solution de Ngb H64V<sub>red</sub>, nous avons décidé de ne pas étudier le cas de la Ngb H64V<sub>red</sub> par la suite.

Dans le cas des autres mutations, la réduction du pont disulfure n'affecte pas l'allure des spectres des protéines (Figure III. 7). Bien que chez la Ngb C46G le pont disulfure soit absent, l'expérience a quand même été réalisée en traitant de la Ngb C46G avec du DTT afin de servir de témoin. La bande de Soret a toujours son maximum à 411 nm pour la Ngb C46G<sub>red</sub> et pour la Ngb F106L<sub>red</sub> et à 412 nm pour la Ngb A90P<sub>red</sub> et la Ngb WT<sub>red</sub>. Les bandes entre 500 nm et 600 nm sont identiques. Chez la Ngb C46G<sub>red</sub>, les bandes à 630 nm et 650 nm sont également présentes après traitement avec DTT. La Ngb WT<sub>red</sub> montre également une bande faiblement intense vers 650 nm. La bande à 630 nm est peut-être trop faible pour être correctement détectée chez la Ngb WT<sub>red</sub>.



**Figure III. 7- Spectres UV-Vis de la Ngb C46G (rose), Ngb WT<sub>red</sub> (vert), Ngb C46G<sub>red</sub> (rose pâle), Ngb A90P<sub>red</sub> (orange) et Ngb F106L<sub>red</sub> (violet). Les spectres ont été normalisés par rapport à 1,0 pour la valeur d'absorbance de la bande de Soret. Les expériences ont été réalisées dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 20 °C.**

Il n'y a donc pas de différences dans l'allure des spectres entre la Ngb C46G<sub>ox</sub>, la Ngb C46G<sub>red</sub> et la Ngb WT<sub>red</sub>. La Ngb C46G semble donc constituer un bon témoin pour la spectrophotométrie UV-Visible de la Ngb WT<sub>red</sub>.

Nous avons mis en évidence que l'allure des spectres UV-Visibles n'était pas modifiée de façon significative par les mutations F106L et A90P avec ou sans pont disulfure, exceptée pour la Ngb H64V. Ceci révèle que la sphère de coordination de l'hème est peu sensible aux mutations et à la réduction du pont disulfure. La bande de Soret n'étant pas déplacée vers de plus hautes longueurs d'onde sous l'effet du DTT, cela indique que le fer reste sous un état Fe<sup>3+</sup>.

La Ngb C46G traitée par du DTT exhibe des bandes très faiblement intenses autour de 630 nm et 650 nm par rapport au reste du spectre. La Ngb WT<sub>red</sub> montre également une bande très faible vers 650 nm. Le fait que ces bandes soient observées chez la Ngb WT<sub>red</sub>, la Ngb C46G<sub>ox</sub> et la Ngb C46G<sub>red</sub>, mais pas chez les autres variants, montre qu'il s'agit d'un effet attribuable à la réduction du pont disulfure seulement. La réduction ou la suppression du pont disulfure par rapport à la protéine native est donc à l'origine d'une légère perturbation de l'environnement de l'hème entraînant

l'apparition d'une faible population avec un centre fer haut-spin. Chez les variants, l'absence de ces bandes lorsque le pont disulfure est réduit va dans le sens d'une corrélation entre l'environnement de l'hème et le pont disulfure. La modification de cet environnement par le biais d'une mutation semble supprimer ou diminuer l'interaction entre le pont disulfure et l'environnement de l'hème.

Une autre information sur les caractéristiques de l'hème dans la protéine peut être apportée par le coefficient d'extinction molaire. Notamment, le coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret est une caractéristique fondamentale de la protéine. Pour calculer le coefficient d'extinction molaire, la méthode de la pyridine hémochrome a été retenue car elle a déjà été employée dans le calcul de coefficient d'extinction molaire chez des globines (Ikeda-Saito et al., 1992; Nicolis et al., 2007). Mais elle n'a jamais été utilisée pour le calcul de coefficients d'extinction molaire de variants de la Ngb.

#### **4. Détermination du coefficient d'extinction molaire de la Ngb et des variants**

Cette méthode permet une mesure indirecte du coefficient d'extinction molaire par détermination de la concentration d'un échantillon. Le calcul de la concentration se fait grâce à la formation d'un complexe hème+pyridine en milieu alcalin. Les résultats ont été obtenus pour la Ngb WT et ses variants avec et sans pont disulfure (Tableau III. 1).

Un coefficient d'extinction molaire de  $132000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  avec un écart type de  $4000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a été mesuré pour la Ngb WT<sub>ox</sub> à 412 nm. Cette mesure est en accord avec la littérature (Nicolis et al., 2007). La mesure du coefficient d'extinction molaire de la Mb WT a aussi été effectuée et la valeur déterminée est en accord avec la littérature (Ikeda-Saito et al., 1992).

La valeur déterminée pour la Ngb C46G a été calculée à partir de mesures sur des solutions préalablement traitées par du ferricyanure ou du DTT qui servent respectivement à oxyder ou réduire le pont disulfure chez une protéine qui en possède. Ces mesures sur la Ngb C46G servent de témoin aux autres expériences. Le faible écart type obtenu montre bien que le ferricyanure et le DTT, tel qu'ils sont utilisés, n'ont pas d'influence sur la méthode.

	Longueur d'onde de la bande de Soret (nm)	Coefficient d'extinction molaire ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	Littérature : Coefficient d'extinction molaire ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )
Ngb WT <sub>ox</sub>	412	132000 ± 4000	129000*
Ngb WT <sub>red</sub>	412	194000 ± 6000	
Ngb C46G - native	411	184000	
Ngb C46G <sub>ox</sub>	411	179000	
Ngb C46G <sub>red</sub>	411	187000	
Ngb C46G - moyenne	411	183000 ± 4000	
Ngb F106L <sub>ox</sub>	411	140000 ± 7000	
Ngb F106L <sub>red</sub>	411	153000 ± 6000	
Ngb A90P <sub>ox</sub>	412	152000 ± 3000	
Ngb A90P <sub>red</sub>	412	152000 ± 12000	
Ngb H64V <sub>ox</sub>	406	119000 ± 5000	
Ngb H64L <sub>ox</sub>	410	108000 ± 5000	
Mb WT humaine	408	151000 ± 3000	153000**

\* (Nicolis et al., 2007)

\*\* (Ikeda-Saito et al., 1992)

Tableau III. 1- Coefficients d'extinction molaire avec leurs écarts types déterminés par la méthode de la pyridine hémochrome pour différentes protéines. Ces mesures sont effectuées dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 20 °C.

La réduction du pont disulfure entraîne une augmentation du coefficient d'extinction molaire chez la Ngb WT<sub>red</sub>, où le coefficient passe de 132000  $M^{-1}.cm^{-1}$  à 194000  $M^{-1}.cm^{-1}$ . La valeur de 183000  $M^{-1}.cm^{-1}$  déterminée pour la Ngb C46G, variant sans pont disulfure, confirme cet effet. Cette augmentation du coefficient d'extinction molaire est caractéristique d'un effet hyperchrome. Dans la mesure où cet effet n'est pas associé à des déplacements bathochromes significatifs, il n'est pas causé par des modifications de l'écart entre les niveaux d'énergie impliqués dans les transitions électroniques observées. Cet effet reste cependant difficilement interprétable car il peut être causé par des phénomènes d'origines différentes. Il y a d'un côté l'aspect quantique des transitions électroniques. Plus les règles de sélection sont respectées plus la transition électronique est permise et donc intense. La réduction du pont disulfure peut avoir un impact sur les niveaux énergétiques impliqués dans cette transition et donc modifier cet aspect. D'un autre côté, cette modification du coefficient d'extinction molaire rappelle également l'effet observé à 280 nm lors des expériences de suivi de dénaturation des double-brins d'ADN par effet de température (Cox, 1970; Felsenfeld & Sandeen, 1962). Le coefficient d'extinction molaire augmente car les acides aminés absorbants dans cette région voient leur environnement électronique modifié à cause de la dénaturation. La réduction du pont disulfure pourrait entraîner une perturbation de l'environnement électronique de l'hème causant cette augmentation du coefficient d'extinction molaire. Enfin la présence d'une population de Fe<sup>3+</sup> haut-spin, pourrait également contribuer à augmenter le coefficient d'extinction molaire.

Les mutations F106L et A90P provoquent aussi une augmentation du coefficient d'extinction molaire. Comme dans le cas de la réduction du pont disulfure pour la Ngb WT, cet effet hyperchrome n'est pas associé à un effet bathochrome significatif. Cet effet hyperchrome est donc là aussi



difficilement interprétable. En revanche, chez ces variants, la réduction du pont disulfure n'entraîne pas une augmentation significative du coefficient d'extinction molaire. Cela pourrait confirmer l'influence de la population de Fe<sup>3+</sup> haut-spin sur le coefficient d'extinction molaire. En effet, les spectres de ces variants sans pont disulfure n'exhibent pas de bandes caractéristiques d'une population haut-spin, contrairement à ceux de la Ngb WT<sub>red</sub> ou de la Ngb C46G qui, eux, voient leur coefficient d'extinction molaire augmenter.

En revanche, la mutation H64V<sub>ox</sub> induit une diminution du coefficient d'extinction molaire (effet hypochrome) couplée à un effet hypsochrome. Le coefficient obtenu est de 119000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Etant donné la ressemblance spectrale entre la Ngb H64V<sub>ox</sub> et la Mb WT, un coefficient d'extinction molaire autour de 150000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> aurait été attendu. Afin de vérifier si cet effet était attribuable à la perte de l'hexacoordination par un ligand distal endogène, nous avons réalisé une autre mutation, en leucine, de l'histidine 64. Tout comme la valine, la leucine est un acide aminé qui n'interagit pas avec l'hème. La mesure de son coefficient d'extinction molaire donne aussi un résultat plus faible que pour la Ngb WT<sub>ox</sub>, de 108000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> associée à une longueur d'onde maximale de la bande de Soret à 410 nm, également plus faible que celle de la Ngb WT<sub>ox</sub>. La perte de l'histidine distale est donc bien associée à une diminution du coefficient d'extinction molaire. Cela pourrait traduire une modification du système  $\pi$  conjugué autour du fer à cause de la perte des électrons délocalisés apportés par l'histidine 64. En effet, la diminution du nombre d'électrons délocalisés d'un système  $\pi$  conjugué s'accompagne de façon caractéristique par un effet hypsochrome couplé à un effet hypochrome comme ce qui est observé ici.

• **Résumé**

Nous avons défini les différentes caractéristiques spectrales UV-Visible des protéines étudiées (Tableau III. 2). Notamment, les coefficients d’extinction molaire de différents variants sont pour la première fois calculés dans une étude.

- La mutation H64V<sub>ox</sub>, où le ligand distal endogène est remplacé par un autre ligand (H<sub>2</sub>O ou lysine 67), modifie le champ de ligand et l’état de spin du fer. Le spectre obtenu est comparable à celui de la Mb WT où l’hème est hexacoordinée avec une molécule d’eau en 6<sup>ème</sup> ligand..
- Conformément à un déplacement en longueur d’onde de la bande de Soret, le coefficient d’extinction molaire de la Ngb H64V<sub>ox</sub> est logiquement modifié par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>.
- La réduction du pont disulfure (Ngb WT<sub>red</sub>) ou la suppression du pont disulfure (Ngb C46G) entraîne une forte augmentation du coefficient d’extinction molaire. Elle traduit un changement de l’environnement électronique de l’hème. Elle pourrait être associée à l’apparition d’une population haut-spin du fer.
- Un fait tout à fait remarquable est la modification du coefficient d’extinction molaire par les mutations A90P et F106L qui ne modifient cependant pas la forme globale du spectre. Ces résultats mettent en évidence l’importance de mesurer systématiquement les coefficients d’extinction molaire.

	Etat d’oxydation du fer	$\lambda_{\text{Soret}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{Soret}}$ (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\text{Bande } \alpha}$ (nm)	$\lambda_{\text{Bande } \beta}$ (nm)	Autres bandes (nm)
Ngb WT <sub>ox</sub>	Fe <sup>3+</sup> bas spin	412	132000	533 (+)	560	-
Ngb WT <sub>red</sub>	Fe <sup>3+</sup> bas spin (maj) et haut spin	412	194000	533 (+)	560	650
Ngb C46G	Fe <sup>3+</sup> bas spin (maj) et haut spin	411	183000	535 (+)	565	630 et 650
Ngb A90P <sub>ox</sub>	Fe <sup>3+</sup> bas spin	412	152000	533 (+)	560	
Ngb A90P <sub>red</sub>	Fe <sup>3+</sup> bas spin	412	152000	533 (+)	560	
Ngb F106L <sub>ox</sub>	Fe <sup>3+</sup> bas spin	411	140000	533 (+)	560	
Ngb F106L <sub>red</sub>	Fe <sup>3+</sup> bas spin	411	153000	535 (+)	560	
Ngb H64V <sub>ox</sub>	Fe <sup>3+</sup> haut spin	406	119000	535 (+)	570	630

**Tableau III. 2- Tableau des caractéristiques UV-Visibles relatives au fer de l’hème pour les différentes protéines. L’indication (maj) indique à quel état de spin correspond la forme majoritaire. L’indication (+) indique quelle est la bande la plus intense entre les bandes  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces caractéristiques sont obtenues dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 20 °C.**

Ces résultats montrent que les mutations ou la réduction du pont disulfure ont une influence sur l’environnement de l’hème. La mesure du coefficient d’extinction molaire apparaît comme un paramètre essentiel à vérifier chez les variants de la protéine. Dans la suite, nous allons nous intéresser de façon plus spécifique à l’étude de la structure secondaire des protéines grâce à l’utilisation du dichroïsme circulaire.

## C. Caractérisation structurale par Dichroïsme Circulaire (DC)

Les spectres caractéristiques de la structure secondaire des variants réalisés à pH physiologique 7,4 par DC sont présentés dans ce chapitre. A partir des spectres les pourcentages de chaque type de structures secondaires ont été calculés pour les différents variants. Grâce à l'existence de structures cristallographiques, il est possible de comparer les résultats obtenus et de déterminer l'impact des mutations sur la structure secondaire de la protéine.

### 1. Cas de la Ngb WT : comparaison DC et cristallographie

Le spectre de DC de la Ngb WT<sub>ox</sub> (Figure III. 8) a été mesuré pour vérifier la validité des réglages de l'appareil et pour servir de spectre de référence. Le résultat que nous avons obtenu est semblable à la littérature (Picotti et al., 2009). Il possède deux bandes d'ellipticité molaire par résidu négatives à 220 et 210 nm et une bande d'ellipticité molaire par résidu positive vers 193 nm. Ces trois bandes sont caractéristiques des spectres de DC de structures secondaires en hélices  $\alpha$ .

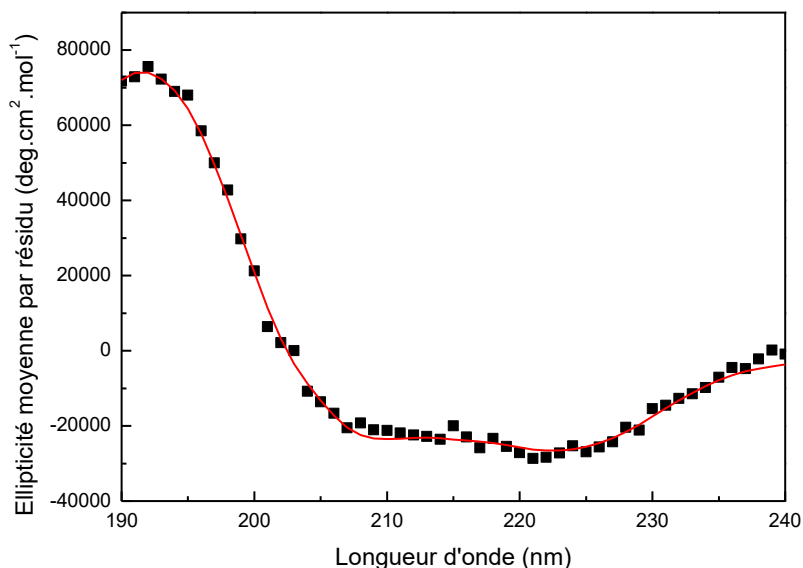
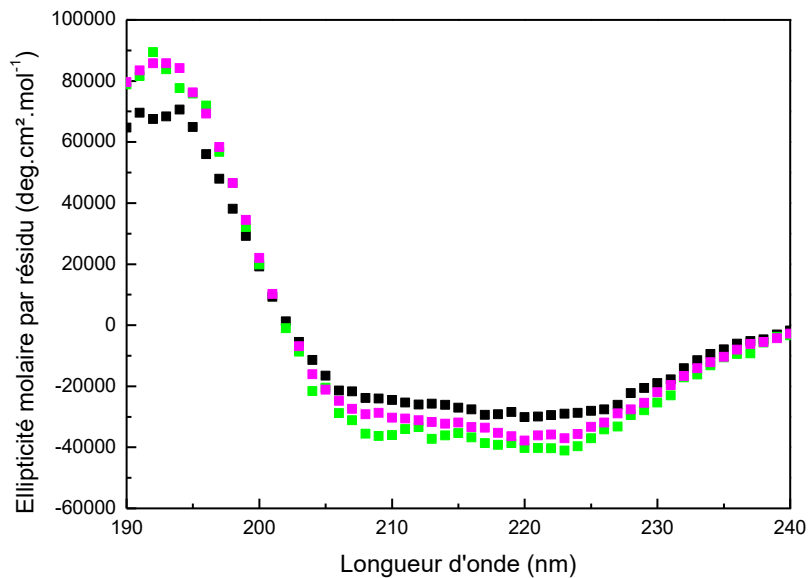


Figure III. 8- Spectre de DC de la Ngb WT<sub>ox</sub>, tampon phosphate 65 mM pH 7,4, C = 8  $\mu$ M, T = 25 °C . Le spectre de déconvolution obtenu par la méthode CONTIN/LL a été représenté par un tracé rouge.

Les spectres obtenus ont été déconvolués par la méthode CONTIN/LL (Provencher & Glockner, 1981; Van Stokkum et al., 1990) afin d'obtenir les composantes des différents types de structures secondaires de la Ngb. Les résultats ont été comparés aux structures cristallographiques (Guimaraes et al., 2014) afin de valider la méthode de déconvolution. En effet, il est possible avec VMD (Humphrey et al., 1996) et des fichiers pdb, d'associer à chaque acide aminé le type de structure secondaire qu'il occupe dans la structure cristallographique. Le fichier pdb choisi ici est le fichier 4MPM de la Ngb WT humaine. Les résultats entre les mesures cristallographiques et les mesures en DC sont comparables, avec un pourcentage d'hélices  $\alpha$  à 80 %.

Nous avons aussi étudié l'effet de la réduction du pont disulfure sur la Ngb WT. La suppression du pont disulfure, par réduction avec du DTT ou par mutation avec la Ngb C46G, ne semble pas affecter l'allure générale du spectre (Figure III. 9). Les trois bandes caractéristiques à 220 nm, 210 nm et 193 nm, d'une structure secondaire en hélice  $\alpha$  sont obtenues. Les spectres de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G présentent tout de même une intensité plus élevée au niveau de ces trois bandes.



**Figure III. 9- Spectres de DC de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir) et de la Ngb WT<sub>red</sub> (vert) et Ngb C46G (rose). Les trois solutions sont à la concentration  $C = 8 \mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .**

Les résultats de déconvolution dans les cas de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G montrent une augmentation significative de la structure en hélices  $\alpha$  (Figure III. 10). La réduction du pont disulfure a donc un impact sur la structure secondaire de la protéine. Le pont disulfure doit notamment contribuer à conserver la structure en boucle au niveau de la boucle CD en rigidifiant cette zone. Lorsque le pont disulfure est réduit, certains acides aminés de la boucle, à la frontière avec les hélices, peuvent alors préférentiellement adopter une structure en hélice  $\alpha$ .

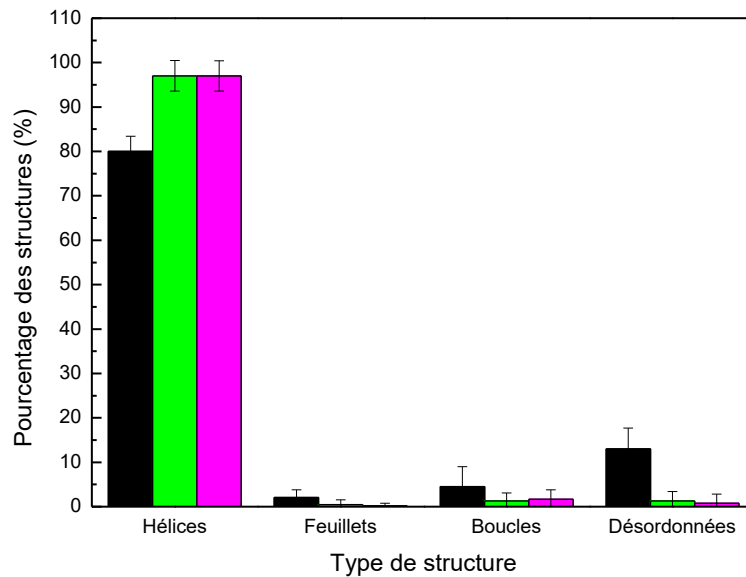


Figure III. 10- Comparaison des types de structure entre la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir), Ngb WT<sub>red</sub> (vert) et la Ngb C46G (rose).

Les résultats obtenus sont cependant opposés à la structure cristallographique de la Ngb mutée au niveau de ses trois cystéines (Ngb 3M, PDB : 1OJ6). Le calcul du pourcentage d'hélices pour cette structure cristallographique est de 75 %. Néanmoins, l'impact structural de la mutation de trois acides aminés étant potentiellement plus important qu'une seule mutation ou que la simple réduction du pont disulfure, la comparaison reste incertaine entre la Ngb C46G, la Ngb WT<sub>red</sub> et la Ngb 3M. Ces résultats semblent aussi aller à l'encontre des résultats de dynamique moléculaire (Morozov et al., 2014; Nadra et al., 2008) où il est indiqué que la boucle CD opèrerait un repliement de simple brin à hélice lors de la formation du pont disulfure. Cela sous-entend que la structure en hélices est plus conséquente au niveau de la boucle CD lorsque le pont disulfure est formé. Cependant ces résultats de dynamique moléculaire ne s'intéressent qu'aux modifications structurales au niveau de la boucle CD. Ils ne reflètent pas l'effet de la réduction du pont disulfure sur l'ensemble de la structure. Ces résultats soulignent l'importance du fait que les données issues de cristallographie ou de simulations numériques ne sont pas forcément représentatives du comportement en solution de la protéine. Il est donc essentiel de vérifier expérimentalement en solution les analyses faites via la cristallographie et les simulations.

## 2. Effet des mutations sur la structure secondaire de la Ngb

L'allure des spectres de DC obtenus pour les variants Ngb F106L<sub>ox</sub> et Ngb A90P<sub>ox</sub> ne montrent pas de différences significatives avec celui de la Ngb WT (Figure III. 11). Les variants ont donc vraisemblablement une structure secondaire très comparable. En revanche, le spectre de DC de la Ngb H64V<sub>ox</sub> présente une légère différence. Le pic à 210 nm est plus intense que le pic à 220 nm. Le phénomène inverse est observé pour les autres protéines.

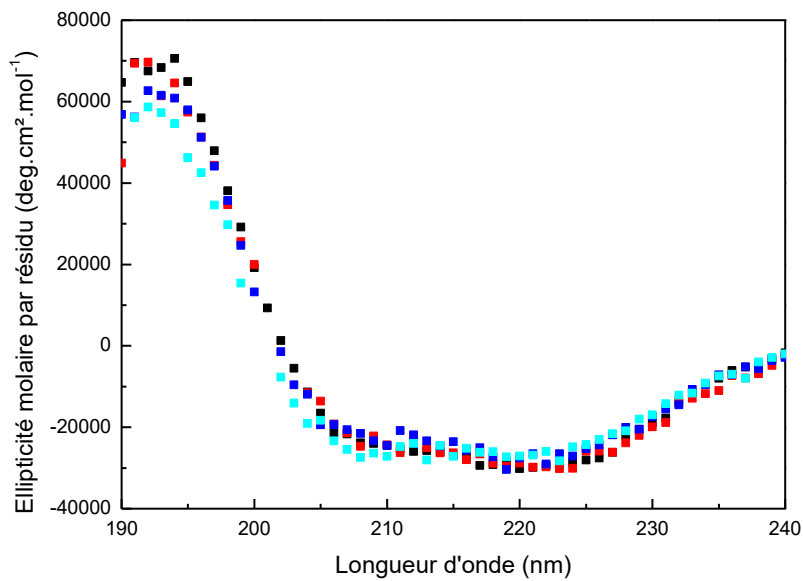


Figure III. 11- Spectres de DC de Ngb WT (noir), de Ngb F106L (rouge), de Ngb A90P (bleu) et de Ngb H64V (cyan). La concentration en protéine est de 8  $\mu$ M dans un tampon phosphate 65 mM pH 7,4, T = 25 °C.

Les résultats de déconvolution sont présentés en histogramme (Figure III. 12) et tableau (Tableau III. 3).

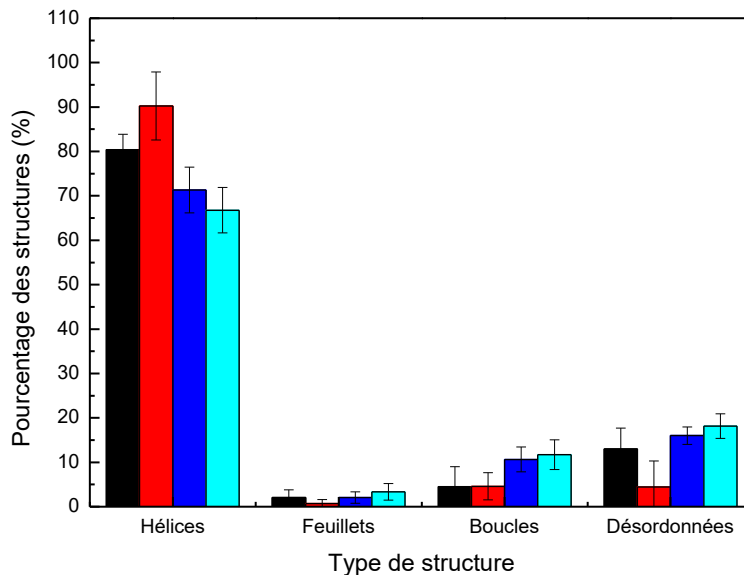


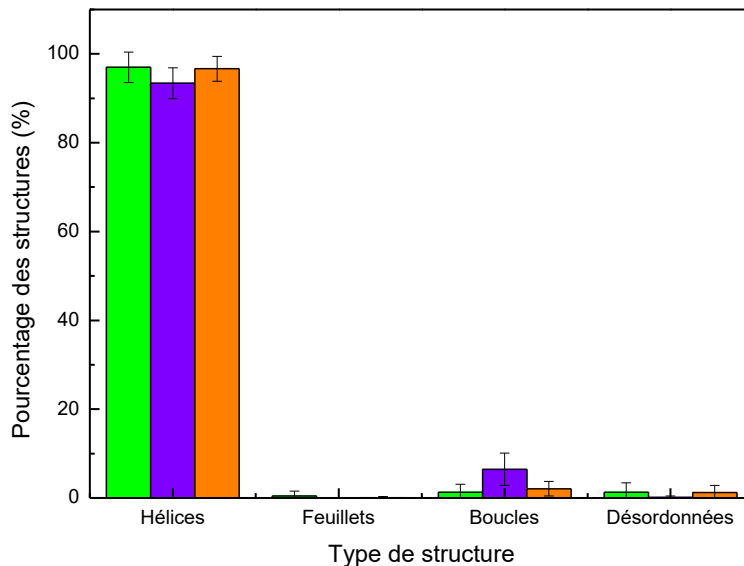
Figure III. 12- Comparaison des pourcentages avec écart type de chaque type de structure secondaire entre la Ngb WT (noir), la Ngb F106L (rouge), la Ngb A90P (bleu) et la Ngb H64V (cyan).

En tenant compte de l'écart type, la Ngb F106L<sub>ox</sub> ne semble pas provoquer de changement de structure secondaire par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>. En revanche La Ngb A90P<sub>ox</sub> présente un pourcentage d'hélices  $\alpha$  légèrement plus faible que celui de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Ce résultat semble aller

### Chapitre III : Caractérisation de la Ngb et des variants étudiés

dans le sens de l'étude de Codutti et al. (Codutti et al., 2009) montrant que cette mutation entraîne une déstructuration de l'hélice F, notamment vis-à-vis du pH.

La mutation H64V<sub>ox</sub> entraîne aussi une perte en hélices  $\alpha$  de la protéine. Il est probable que dans la Ngb WT<sub>ox</sub>, la liaison entre H64 et l'hème participe à structurer la protéine et à stabiliser le squelette protéique de la Ngb. La mutation de H64 entraîne donc une déstructuration de la protéine.



**Figure III. 13- Comparaison des pourcentages avec écart type de chaque type de structure secondaire entre la Ngb WT<sub>red</sub> (vert), Ngb F106L<sub>red</sub> (violet), Ngb A90P<sub>red</sub> (orange).**

Nous avons aussi analysé en DC les différents variants avec le pont disulfure réduit. L'effet de la réduction du pont disulfure sur les variants est comparable à celui de la réduction du pont disulfure sur la Ngb WT<sub>red</sub>. L'intensité des spectres augmente et le pourcentage d'hélices  $\alpha$  se situe entre 90 % et 100 % quelque soit la mutation (Figure III. 13).

• **Résumé**

Par DC, Le pourcentage d'hélices  $\alpha$  a été déterminé. La comparaison du pourcentage d'hélices  $\alpha$  (Tableau III. 3) pour les différents variants permet de souligner plusieurs effets.

- Les mutations H64V et A90P entraînent une diminution du pourcentage d'hélices  $\alpha$ . Les acides aminés H64 et A90 ont un rôle structurant pour la protéine.
- La réduction du pont disulfure chez la Ngb WT ou chez les variants provoque une augmentation du pourcentage en hélices  $\alpha$  au détriment des structures de types boucle ou désordonnée. Le pont disulfure joue donc un rôle majeur dans la structuration en hélices  $\alpha$  de la protéine.
- La mutation F106L ne change pas le pourcentage d'hélices  $\alpha$  même si le pont disulfure est réduit.

	Hélices $\alpha$ (%)
Ngb WT <sub>ox</sub>	80 $\pm$ 3
Ngb WT <sub>red</sub>	97 $\pm$ 3
Ngb C46G	98 $\pm$ 2
Ngb A90P <sub>ox</sub>	71 $\pm$ 5
Ngb A90P <sub>red</sub>	80 $\pm$ 3
Ngb F106L <sub>ox</sub>	90 $\pm$ 8
Ngb F106L <sub>red</sub>	93 $\pm$ 4
Ngb H64V <sub>ox</sub>	67 $\pm$ 3

Tableau III. 3- Pourcentages avec écarts types d'hélices  $\alpha$  chez la Ngb WT et ses variants.

Le dichroïsme circulaire, au même titre que la spectrophotométrie UV-Visible classique, permet d'avoir accès à des informations structurales de la protéine. Cependant, il présente l'inconvénient de ne pouvoir différencier les formes isomères de l'hème qui ont été mises en évidence (Du et al., 2003). La RMN peut alors être utilisée pour apporter une caractérisation supplémentaire.

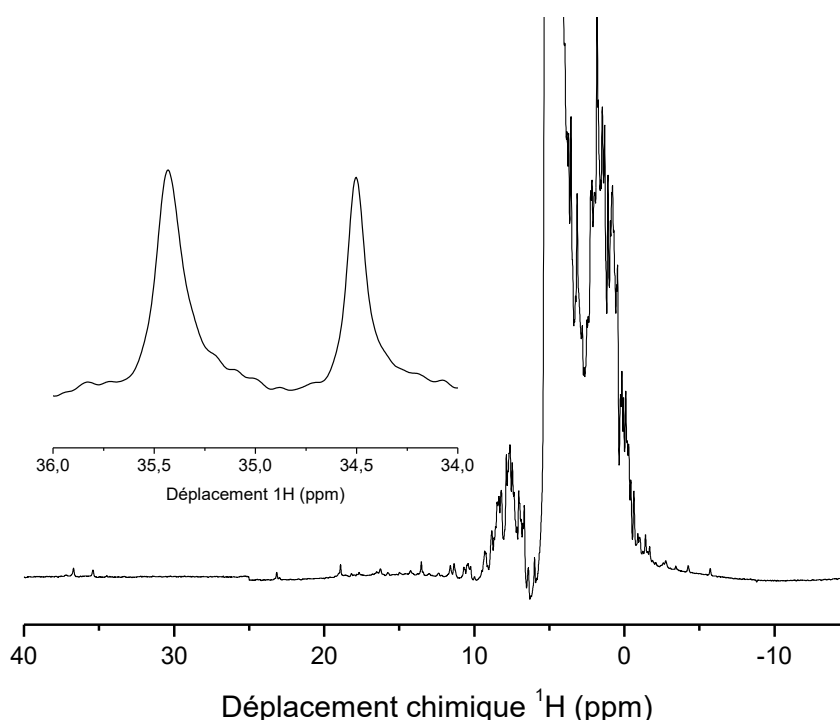


## D. Caractérisation par RMN

Les mesures de RMN présentées dans cette partie sont basées sur la comparaison entre le spectre de RMN de la Ngb WT et les spectres de RMN mesurés pour les différents variants. L'objectif principal est d'identifier les signaux d'intérêt qui seront utilisés par la suite pour les expériences de réversibilité d'entrée/sortie de l'hème en fonction du pH et de cinétiques de fixation de ligands.

### 1. Spectre RMN de la Ngb WT<sub>ox</sub>

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H de la Ngb WT<sub>ox</sub> est représenté en Figure III. 14.



**Figure III. 14- Spectre RMN <sup>1</sup>H à 600 MHz de la Ngb WT. La concentration en protéine est de 100 μM dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température d'acquisition est 25 °C.**

Les signaux qui nous intéressent particulièrement sont ceux situés au-dessus de 10 ppm et en-dessous de 0 ppm car ils résultent de l'influence fer paramagnétique (Fe<sup>3+</sup>, S=3/2) de l'hème. En particulier, dans la région de 34 ppm à 38 ppm, deux signaux caractéristiques des formes isomères A et B de l'hème (Encart Figure III. 14) sont présents. Ces deux signaux sont superposables à ceux obtenus par Anthony Bocahut (A. Bocahut et al., 2013). Ils se situent à 34,5 ppm et 35,4 ppm. Le signal à 34,5 ppm a été attribué au groupement méthyle 5 de la forme isomère A et le signal à 35,4 ppm au groupement méthyle 8 de la forme isomère B (A. Bocahut et al., 2013; Du et al., 2003). Ces groupements donnent des signaux fortement déblindés à cause de leur proximité avec le centre fer. De plus, les deux signaux sont proches l'un de l'autre car les deux groupements méthyle sont

superposables par rotation de 180° autour de l'axe  $\alpha$ - $\gamma$  (Figure I. 17). L'intensité relative des deux formes isomères se rapproche d'un ratio 50/50.

Par la suite, nous nous intéresserons principalement à ces deux signaux qui sont aisément identifiables afin de pouvoir étudier le comportement des deux formes isomères de l'hème en fonction des mutations.

## 2. Effet du pont disulfure sur le spectre RMN

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  de la forme Ngb<sub>red</sub> et du variant Ngb C46G ont été enregistrés. Par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>, nous observons un changement de 1 ppm des déplacements chimiques des deux signaux entre 34 et 38 ppm (Figure III. 15). Ces changements de déplacements chimiques sont identiques à ceux obtenus dans la littérature pour la Ngb WT<sub>red</sub> (A. Bocahut et al., 2013). La présence de ces signaux indique une population majoritaire de protéine avec un centre Fe<sup>3+</sup> bas-spin. Dans le cas d'un Fe<sup>3+</sup> haut-spin, les signaux seraient beaucoup plus déblindés (cas de la Ngb H64V que nous développerons plus loin). Cela confirme les analyses spectrales UV-Visible de la Ngb C46G et de la Ngb WT<sub>red</sub>. Les bandes à 630 nm et 650 nm de leurs spectres UV-Visibles étant très faibles en intensité, cela suggère que la population haut spin est la population majoritaire.

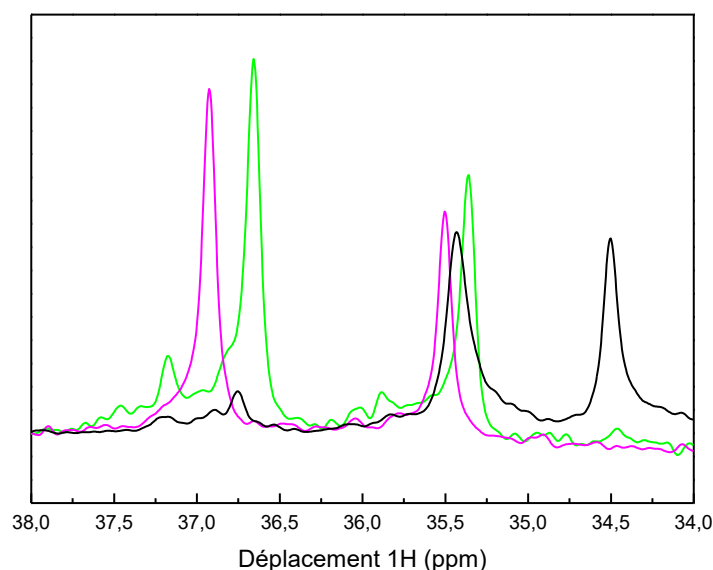


Figure III. 15- Spectres RMN  $^1\text{H}$  de la Ngb WT<sub>red</sub> (noir), Ngb C46G (rouge) et Ngb WT<sub>ox</sub> (bleu) entre 34 et 38 ppm. La concentration des protéines est de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température d'acquisition est 25 °C.

Le signal caractéristique de la forme isomère B est déplacé à 36,7 ppm pour la Ngb WT<sub>red</sub> et 36,9 ppm pour la Ngb C46G. Le signal caractéristique de la forme isomère A est déplacé à 35,3 ppm pour la Ngb WT<sub>red</sub> et 35,5 ppm pour la Ngb C46G (Tableau III. 4).

	$\delta (M^5 A)$ (ppm)	$\delta (M^8 B)$ (ppm)
Ngb WT <sub>ox</sub>	34,5	35,4
Ngb WT <sub>red</sub>	35,3	36,7
Ngb C46G	35,5	36,9

Tableau III. 4- Comparaison des déplacements chimiques des groupements méthyle  $M^5$  de la forme isomère A et  $M^8$  de la forme isomère B.

Les variations de déplacements chimiques des signaux, par comparaison entre la forme avec pont disulfure et la forme sans pont disulfure, sont relativement faibles au regard des déplacements chimiques des signaux affectés par l'hème (de -10 ppm à 37 ppm). Cependant ils pourraient traduire un réarrangement léger de l'hème au sein de la structure entre la forme avec et sans pont disulfure.

La comparaison des spectres dans les autres zones de déplacement chimique influencés par la présence de l'hème, montre également des modifications (Figure III. 16). Sans chercher à attribuer les signaux pour la Ngb C46G, il est observable que les spectres de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G dans cette région ont des signaux aux mêmes déplacements chimiques. En revanche, le spectre de la Ngb WT<sub>ox</sub>, comparativement aux spectres des deux autres protéines, présente une allure différente. Plusieurs des signaux de la Ngb WT ne présentent pas le même déplacement chimique lorsque le pont disulfure est réduit ou absent. Ces différences confirment probablement un arrangement dans l'espace différent de l'hème de la Ngb entre la forme avec pont disulfure et les formes sans pont disulfure. Il faut tout de même noter la possibilité que le paramagnétisme de l'hème soit aussi affecté entre les protéines avec et sans pont disulfure, ce qui peut également engendrer des modifications des déplacements chimiques.

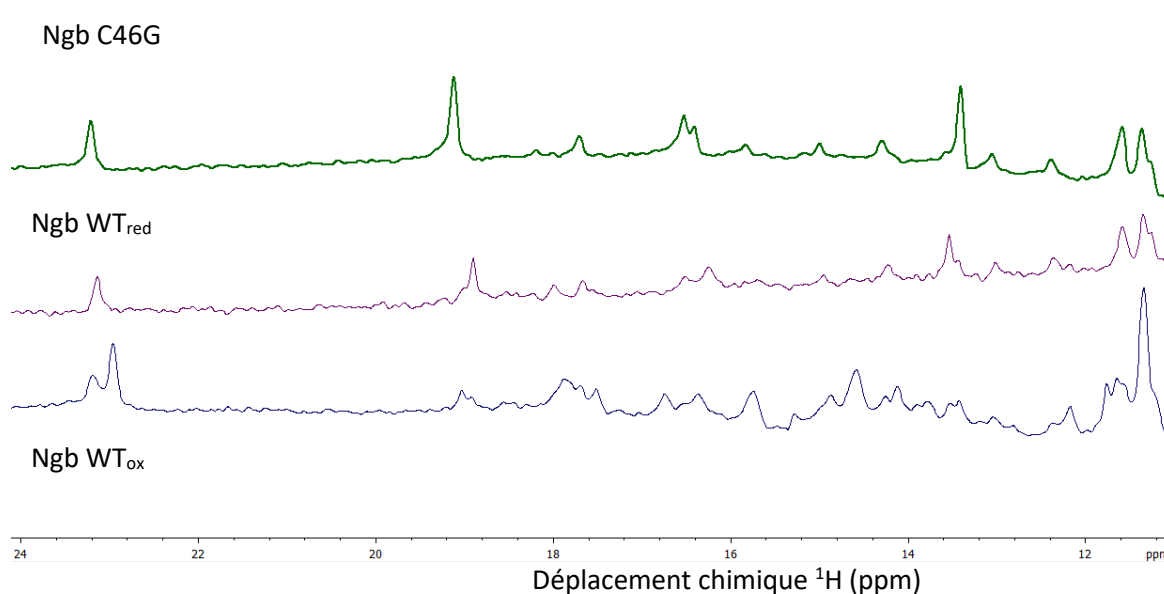


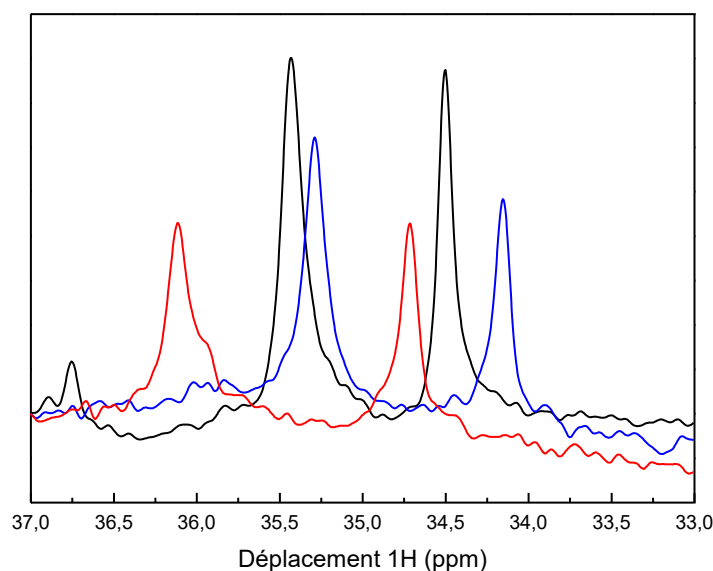
Figure III. 16- Spectres RMN  $^1H$  de la Ngb WT<sub>red</sub> (bleu), Ngb C46G (vert) et Ngb WT<sub>ox</sub> (violet) entre 12 et 24 ppm. La concentration des protéines est de 100  $\mu M$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température d'acquisition est 25 °C.

Ces premières comparaisons ont permis de mettre en évidence une influence du pont disulfure sur le l'hème et son environnement au sein de la protéine. Nous nous sommes ensuite penchés sur l'effet des mutations.

### 3. Effet des mutations Ngb A90P et Ngb F106L

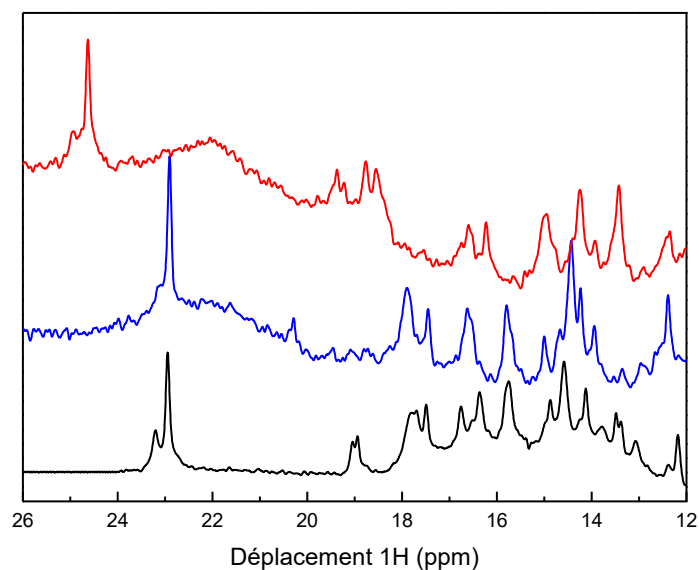
Les spectres des mutations Ngb A90P et Ngb F106L sont présentés ensemble dans la mesure où ces deux mutations n'affectent pas la coordination de l'hème, l'état d'oxydation et le spin du centre fer d'après les données UV-Visibles (cf B de ce chapitre). Dans ces deux variants, le fer est toujours à l'état  $\text{Fe}^{3+}$  bas spin ( $S=3/2$ ).

Par analogie avec la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$ , les signaux caractéristiques des deux formes isomères de l'hème sont toujours présents aussi bien chez la Ngb  $\text{A90P}_{\text{ox}}$  que chez la Ngb  $\text{F106L}_{\text{ox}}$  (Figure III. 17). Ces signaux sont situés dans la même région que ceux de la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$ . Ils sont légèrement décalés par rapport à ceux de la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$ . Cependant l'effet n'est pas comparable à la différence entre la Ngb WT avec et sans pont disulfure. Les mutations doivent donc légèrement influencer sur le positionnement des groupements méthyles vis-à-vis de leur environnement, que ce soit en modifiant un peu la position de l'hème et/ou en changeant légèrement l'environnement structural de l'hème.



**Figure III. 17-** Spectres  $^1\text{H}$  de la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$  (noir), Ngb  $\text{A90P}_{\text{ox}}$  (bleu) et Ngb  $\text{F106L}_{\text{ox}}$  (rouge) entre 33 ppm et 36,5 ppm. La concentration des protéines est de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température d'acquisition est 25 °C.

Les autres régions des spectres où les signaux sont affectés par la présence du fer montre aussi quelques différences avec le spectre de la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$ . Entre 12 et 24 ppm certains signaux sont décalés (Figure III. 18). D'autres sont absents ou présents en plus par rapport au spectre de la Ngb WT. Ces changements sont aussi des preuves d'un léger réarrangement de l'environnement de l'hème causé par les mutations.



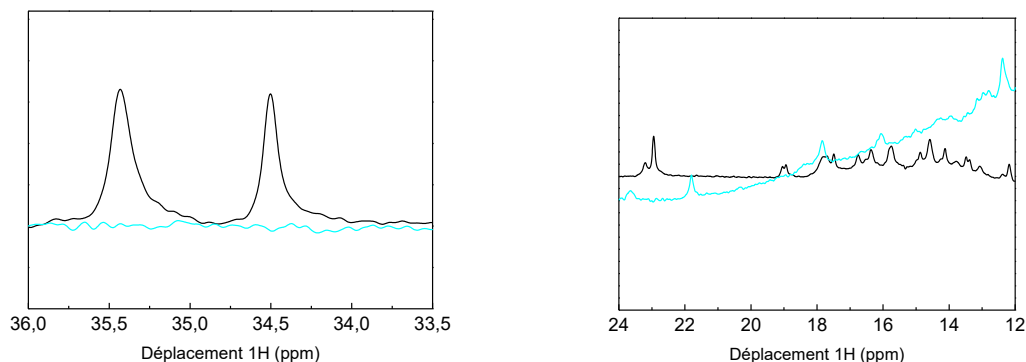
**Figure III. 18-** Spectres  $^1\text{H}$  de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir), Ngb A90P<sub>ox</sub> (bleu) et Ngb F106L<sub>ox</sub> (rouge) entre 12 ppm et 26 ppm. La concentration des protéines est de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température d'acquisition est 25 °C.

Nous avons également réalisé les mesures de spectre dans le cas du pont disulfure réduit par le DTT pour les variants (Annexe D). L'effet sur les signaux est comparable à celui obtenu pour la Ngb WT avec et sans pont disulfure. Pour les deux variants, les signaux caractéristiques de deux formes isomères de l'hème entre 30 et 40 ppm sont déplacés vers des déplacements chimiques plus élevés avec un décalage de 1 ppm à 1,5 ppm pour chaque signal. Dans les autres zones de déplacements chimiques dus à l'influence de l'hème, certains signaux sont décalés et d'autres signaux sont soit apparus soit disparus par rapport aux formes avec pont disulfure. Ces mesures traduisent là aussi un léger réarrangement dans l'espace de l'hème causé par la réduction du pont disulfure.

#### 4. Effets de la mutation Ngb H64V

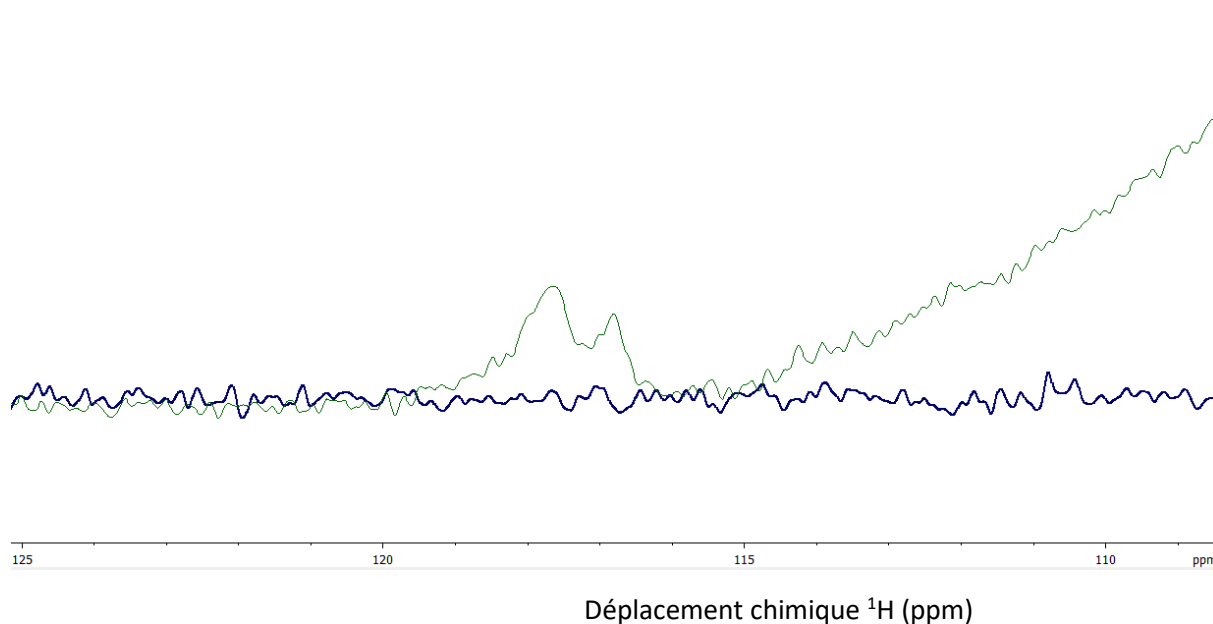
Dans le cas de la mutation de la Ngb H64V, le centre fer devient haut spin (Sawai et al., 2005). L'effet paramagnétique du centre fer est donc encore plus marqué et devrait entraîner un déblindage plus important des signaux influencés par sa proximité.

Dans la région de 34-38 ppm, les deux signaux caractéristiques des formes isomères de l'hème sont absents (Figure III. 19). Dans la région de 12-24 ppm, le spectre de la Ngb WT<sub>ox</sub> présente plus de pics que le spectre de la Ngb H64V<sub>ox</sub>. L'absence de signaux observée dans la région de 12 ppm à 38 ppm chez la Ngb H64V<sub>ox</sub> est l'une des conséquences possibles de ce déblindage plus important.



**Figure III. 19-** Spectres de RMN  $^1\text{H}$  de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir), Ngb H64V<sub>ox</sub> (rouge). A gauche : entre 33,5 ppm et 36 ppm. A droite : entre 12 ppm et 24 ppm. La concentration des protéines est de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température d'acquisition est 25 °C.

Afin d'appuyer ces observations, des mesures ont été effectuées à des déplacements chimiques plus élevés. Des signaux ont été observés autour de 108 ppm et 125 ppm (Figure III. 20)



**Figure III. 20-** Spectres de la Ngb WT<sub>ox</sub> (bleu) et de la Ngb H64V<sub>ox</sub> (vert) entre 108 et 125 ppm. La concentration des protéines est de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température d'acquisition est 25 °C.

La Ngb WT ne présente aucun signal dans cette région spectrale. La qualité du signal à des déplacements chimiques si élevés rend cependant l'interprétation de ces signaux difficile. Elle confirme cependant le passage d'un fer bas-spin chez la Ngb WT<sub>ox</sub> à un fer haut-spin chez la Ngb H64V<sub>ox</sub>.

• **Résumé**

Les spectres RMN de la Ngb WT et des différents variants ont été comparés. Une attention particulière a été portée aux signaux dus à des protons de la porphyrine sensibles à la présence du fer paramagnétique entre 30 ppm et 40 ppm (Tableau III. 5).

- Les déplacements chimiques des signaux affectés par la présence du fer sont quasiment identiques entre la Ngb WT<sub>ox</sub> et les variants Ngb A90P<sub>ox</sub> et Ngb F106L<sub>ox</sub>. Il en va de même pour la comparaison des déplacements chimiques entre la Ngb WT<sub>red</sub> et les variants Ngb A90P<sub>red</sub> et Ngb F106L<sub>red</sub>. Ces deux mutations ont donc un léger effet sur le positionnement de l'hème et/ou sur la structure de son environnement.
- En revanche, les changements de déplacements chimiques provoqués par la réduction du pont disulfure chez la Ngb WT ou chez les variants sont plus quantifiables, de l'ordre de 1 ppm. L'état d'oxydation du pont disulfure a donc une influence sur le positionnement de l'hème et son environnement.
- Dans le cas de la Ngb H64V, il n'y a pas de signaux observés entre 30 ppm et 40 ppm. Des signaux sont observés à des déplacements chimiques plus élevés. Cela confirme que le fer se trouve dans un état haut-spin dû à un changement de la coordination.

	$\delta$ (M <sup>5</sup> A) (ppm)	$\delta$ (M <sup>8</sup> B) (ppm)
Ngb WT <sub>ox</sub>	34,5	35,4
Ngb WT <sub>red</sub>	35,3	36,7
Ngb C46G	35,5	36,9
Ngb A90P <sub>ox</sub>	34,2	35,3
Ngb A90P <sub>red</sub>	35,2	36,7
Ngb F106L <sub>ox</sub>	34,8	36,0
Ngb F106L <sub>red</sub>	35,7	37,2
Ngb H64V <sub>ox</sub>	-	-

**Tableau III. 5- Déplacements chimiques des protons des groupements méthyles 5 de la forme isomère A et 8 de la forme isomère B pour la Ngb WT et ses variants. Les conditions expérimentales sont C(protéine) = 100  $\mu$ M, tampon phosphate 65mM pH 7,4, T = 25 °C**

## E. Conclusion

Différents variants de la Ngb ont été présentés dans ce chapitre. La Ngb H64V affecte la sphère de coordination de l'hème en remplaçant le ligand distal par un acide aminé qui n'interagit pas avec l'hème. La Ngb C46G permet d'obtenir une forme sans pont disulfure de la Ngb. La Ngb F106L modifie le proche environnement de l'hème en remplaçant une phénylalanine susceptible d'avoir des interactions spécifiques avec une forme isomère de l'hème. La Ngb A90P affecte l'hélice F porteuse de l'histidine proximale de l'hème. Toutes ces mutations ont aussi été étudiées avec la présence ou l'absence du pont disulfure.

Les variants ont fait l'objet de caractérisations par différentes techniques (spectrophotométrie UV-Vis, DC et RMN) qui ont permis de dégager plusieurs points importants sur l'effet des mutations et sur l'influence du pont disulfure.

Les variants Ngb A90P<sub>ox</sub> et Ngb F106L<sub>ox</sub> affectent la structure secondaire de la protéine mais n'ont pas d'impact direct sur la sphère de coordination de l'hème de la Ngb. En effet, l'allure des spectres UV-Visibles et RMN de ces deux variants est très peu modifiée en regard de la Ngb WT<sub>ox</sub>. En revanche, l'augmentation du coefficient d'extinction molaire pour ces deux variants traduit une perturbation de l'environnement électronique de l'hème. De plus, les spectres de dichroïsme circulaire de ces deux variants montrent une modification du pourcentage d'hélices  $\alpha$  par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub> indiquant des modifications structurales.

Le variant Ngb H64V<sub>ox</sub> affecte en revanche directement l'hème de la Ngb, comme le confirme l'allure du spectre UV-Visible, qui correspond au spectre d'une protéine haut spin hexacoordinée par une molécule d'eau. Le spectre RMN obtenu abonde aussi dans ce sens avec une absence des signaux caractéristiques des formes isomères de l'hème, notamment entre 34 ppm et 38 ppm. Cette absence est imputable au changement d'état de spin du centre fer de l'hème. Cette mutation entraîne aussi des modifications structurales, confirmées par le spectre de DC. Ces modifications vont plutôt dans le sens d'une déstructuration partielle de la protéine avec une perte du pourcentage d'hélices  $\alpha$ .

Enfin, un effet structural du pont disulfure a été confirmé. Que ce soit pour la Ngb WT ou pour les variants, la réduction du pont disulfure entraîne systématiquement une hausse du coefficient d'extinction molaire et une hausse du pourcentage d'hélices  $\alpha$ . La boucle CD et par conséquent les hélices C et D de la protéine sont affectées par cette mutation. Il en résulte un réarrangement structural au niveau de la structure secondaire et au niveau de l'hème. Chez la Ngb C46G et la Ngb WT<sub>red</sub>, la présence de bandes autour de 630 nm et 650 nm sur les spectres UV-Visible montre également l'apparition d'une faible population de fer haut-spin. Ceci va également dans le sens d'une perturbation de l'environnement de l'hème et de son champ de ligands. La modification de position de l'hème est aussi visible sur les spectres RMN des protéines. Le déblindage est plus conséquent pour les signaux sous influence du centre fer chez les protéines sans pont disulfure que chez les protéines avec pont disulfure.



### ***Chapitre III : Caractérisation de la Ngb et des variants étudiés***

Les différentes caractérisations effectuées nous permettent de connaître les propriétés de la Ngb et de ses variants dans des conditions de référence. La Ngb WT montre une stabilité accrue vis-à-vis de conditions dénaturantes (Chapitre I, C.2.ii) qui pourrait permettre à la Ngb d'intervenir dans des milieux perturbateurs. Dans le prochain chapitre, le comportement de la Ngb et de ses variants face à des variations de pH sera analysé afin de mettre en évidence l'effet des mutations sur la stabilité structurale de la Ngb.



## **Chapitre IV : Etude du comportement de la Ngb WT et de ses variants en fonction du pH**



Nous avons montré que les mutations réalisées affectent plutôt la structure secondaire de la protéine que l'hème. Le but de ce chapitre est de fournir une autre approche des relations possibles entre l'hème et la structure en faisant varier le pH dans des conditions acides, potentiellement dénaturante pour les protéines. Le chapitre est développé autour de deux axes. Dans le premier cas, nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet des mutations sur la stabilité de l'hème au sein de la protéine en fonction du pH. D'autre part, nous avons étudié l'impact en fonction du pH de ces mutations sur la structure secondaire de la Ngb grâce notamment au dichroïsme circulaire.

## A. Influence du pH sur la dissociation de l'hème

La stabilité de la protéine est notamment associée à la présence de l'hème au sein de celle-ci. Le suivi de l'évolution du spectre UV-Visible, en fonction du pH, des différentes protéines a été réalisé. L'intérêt est de pouvoir comparer l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret pour les différentes protéines. En effet, comme nous l'avons montré au Chapitre III, B, la bande de Soret, mais aussi les bandes  $\alpha$  et  $\beta$ , sont associées à la présence et à l'état de coordination de l'hème dans la protéine.

### 1. Dissociation de l'hème chez la Ngb WT<sub>ox</sub>

Les mesures ont d'abord été effectuées sur la Ngb WT<sub>ox</sub> pour servir de référence. L'évolution en fonction du pH de l'allure du spectre UV-Visible de la Ngb WT peut se séparer en trois parties.

De pH 8,1 à 3,7, l'allure du spectre ne change pas (Figure IV. 1). La protéine est donc stable pour cette zone de pH.

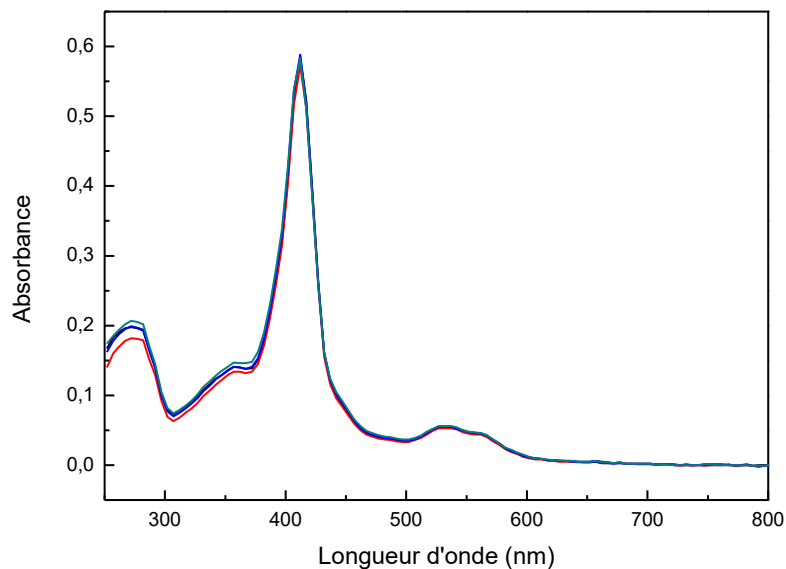


Figure IV. 1- Spectres UV-Visible de la Ngb WT<sub>ox</sub> à pH 7,4 (noir), pH 6,1 (rouge), pH 4,7 (bleu) et pH 3,7 (vert). Les mesures ont été réalisées dans du tampon phosphate + acide citrique au pH désiré, à 25 °C.

De pH 3,7 à 2,9, des modifications de l'allure du spectre sont visibles (Figure IV. 2). L'intensité de la bande de Soret à 412 nm et des bandes entre 500 nm et 600 nm diminue par effet hypsochrome. La diminution d'intensité de la bande de Soret et des bandes entre 500 nm et 600 nm indique une diminution de la concentration en Ngb WT. Conjointement, une bande autour de 630 nm à pH 2,9 commence à apparaître. Celle-ci est caractéristique d'un passage à l'état haut spin du fer de l'hème. L'intensité de la bande à 360 nm augmente également. Cette bande peut être associée à la présence d'hémine en solution (Figure IV. 4) qui est haut spin. La bande à 280 nm garde en revanche la même intensité. La protéine ne semble donc pas subir de modification de structure secondaire importante autour de ses résidus aromatiques. L'évolution de l'ensemble de ces bandes irait dans le sens d'une dissociation partielle à totale de l'hème de la Ngb.

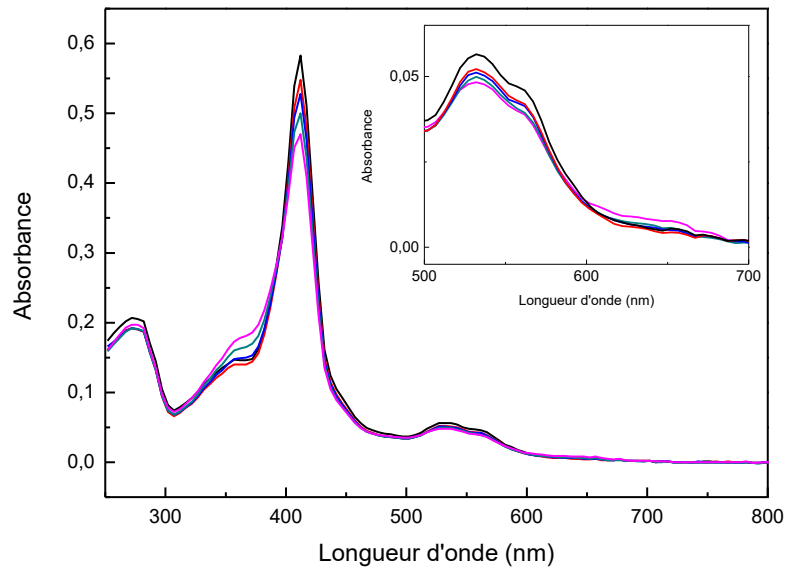


Figure IV. 2- Spectres UV-Visible de la Ngb WT<sub>ox</sub> à pH 3,7 (noir), pH 3,5 (rouge), pH 3,3 (bleu), pH 3,1 (vert) et pH 2,9 (rose). Les mesures ont été réalisées dans du tampon phosphate + acide citrique au pH désiré, à 25 °C.

Enfin, de pH 2,9 à 2,3, l'intensité de la bande de Soret chute. Les bandes entre 500 nm et 600 nm diminuent en intensité et changent de forme (Figure IV. 3). La bande à 630 nm devient plus intense. La bande à 360 nm, caractéristique de l'hème, augmente également en intensité. La bande à 280 nm augmente légèrement en intensité. La Ngb passe donc majoritairement à un état où l'hème est totalement dissocié de la protéine.

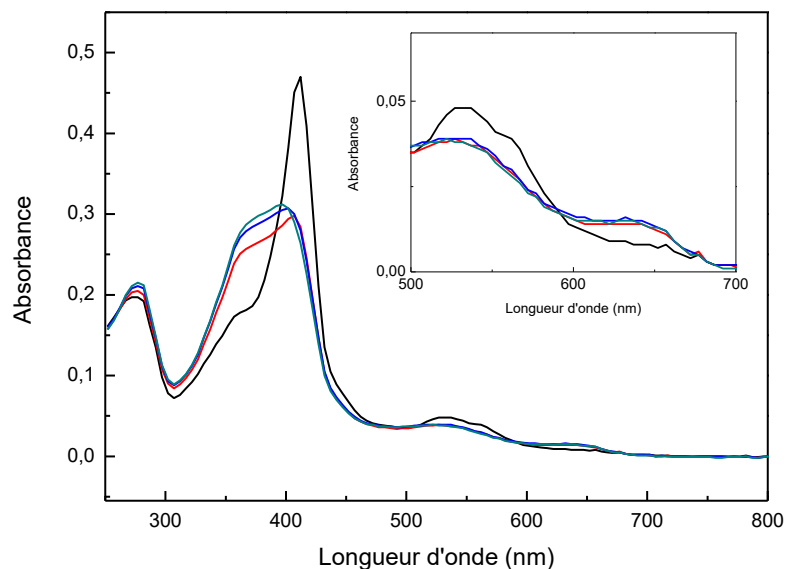


Figure IV. 3- Spectres UV-Visible de la Ngb WT<sub>ox</sub> à pH 2,9 (noir), pH 2,7 (rouge), pH 2,5 (bleu), et pH 2,3 (vert). Les mesures ont été réalisées dans du tampon phosphate + acide citrique au pH désiré, à 25 °C.

Afin de vérifier l'état de l'hème, le spectre obtenu à pH 2,3 a été comparé à celui de l'hémine à pH 2,3 (Figure IV. 4). Le spectre de la Ngb WT à pH 2,3 montre les bandes caractéristiques de l'hémine avec une bande très intense à 360 nm et des bandes à 530 nm et 630 nm. Une bande d'absorption est cependant observable à 400 nm. Cette bande est plutôt caractéristique de la présence de protéine avec de l'hème partiellement dissocié. Ce spectre semble donc correspondre à un mélange de Ngb WT avec de l'hème partiellement dissocié et de l'hémine, qui est de l'hème libre en solution.

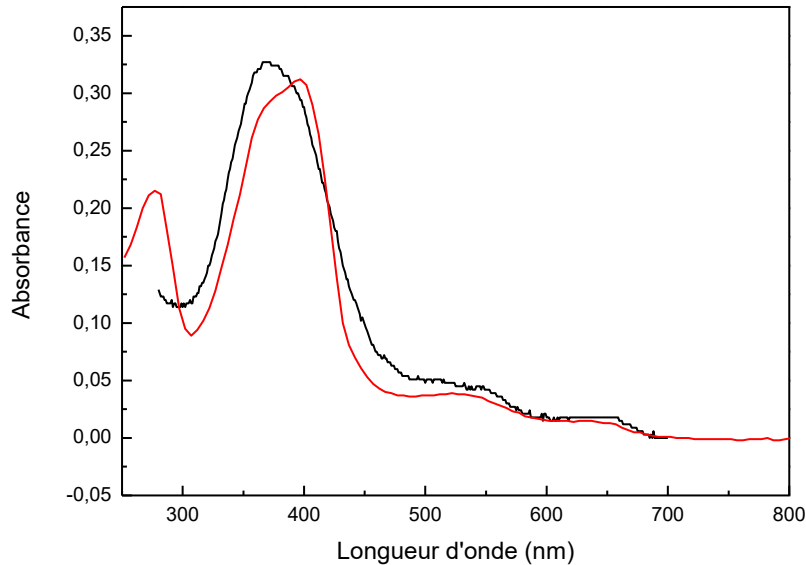


Figure IV. 4- Spectres UV-Vis de l'hémine (noir) et de la Ngb WT<sub>ox</sub> à pH 2,3 (rouge). Les mesures ont été réalisées dans du tampon phosphate + acide citrique au pH désiré, à 25 °C.

L'évolution de l'intensité de la bande de Soret a été reportée en fonction du pH (Figure IV. 5). Chaque point représente la moyenne sur deux mesures. A partir du graphe, il est possible de déterminer le  $pH_{1/2}$  en utilisant la méthode des tangentes. Ce pH représente le pH où la moitié des protéines ont leur hème dissocié. Chez la Ngb WT, d'après la courbe, le  $pH_{1/2}$  est de 2,9. Il est plus faible que celui de la Mb WT ( $pH_{1/2}=4,6$  (Picotti et al., 2009)). Cette valeur montre que l'hème est plus stabilisé dans la Ngb WT que dans la Mb WT. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Picotti et al., 2009).



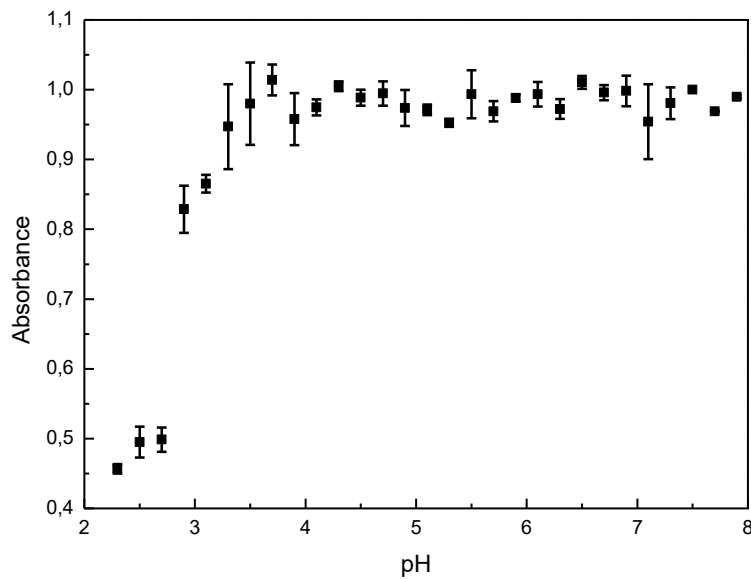


Figure IV. 5- Evolution de l'absorbance de la bande de Soret de la Ngb WT<sub>ox</sub> en fonction du pH. Le graphe a été normalisé à 1,0 à pH 7,4.

Par la suite, nous nous intéresserons surtout à l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret chez les différents variants. Elle est la plus représentative de la stabilité de la protéine.

L'une des particularités structurales de la Ngb WT est la présence du pont disulfure. Il a été montré dans le chapitre précédent que ce pont disulfure a une influence sur la structure de la protéine. Il pourrait donc influencer sur la stabilité de l'hème.

## 2. Stabilité de l'hème de la Ngb WT<sub>red</sub>

La stabilité de la Ngb sans pont disulfure a été étudiée via le variant Ngb C46G d'une part et via la réduction du pont disulfure chez la Ngb WT par du DTT d'autre part.

Les mesures sur le variant Ngb C46G ont été réalisées dans trois conditions différentes : Ngb C46G après traitement avec du K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub>, Ngb C46G après traitement avec du DTT et Ngb C46G sans traitement. Ces expériences ont pour objectif de vérifier que les traitements avec du K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub> ou du DTT n'affectent pas la stabilité de la protéine. Les résultats obtenus entre les différentes expériences sont identiques (Annexe E). Le graphe associé à la Ngb C46G représenté en Figure IV. 6 est la moyenne des différentes expériences réalisées.

L'évolution des spectres d'absorbance en fonction du pH pour la Ngb C46G et la Ngb WT<sub>red</sub> est similaire à celle de la Ngb WT<sub>ox</sub> (Figure IV. 6). Dans la zone de pH 2,3 à 2,5, l'absorbance mesurée à 412 nm est toutefois plus élevée pour la C46G. Cela indique qu'il reste une quantité plus importante de protéine qui conserve l'hème pour la Ngb C46G que pour la Ngb WT<sub>ox</sub> et la Ngb WT<sub>red</sub> dans cette zone de pH.

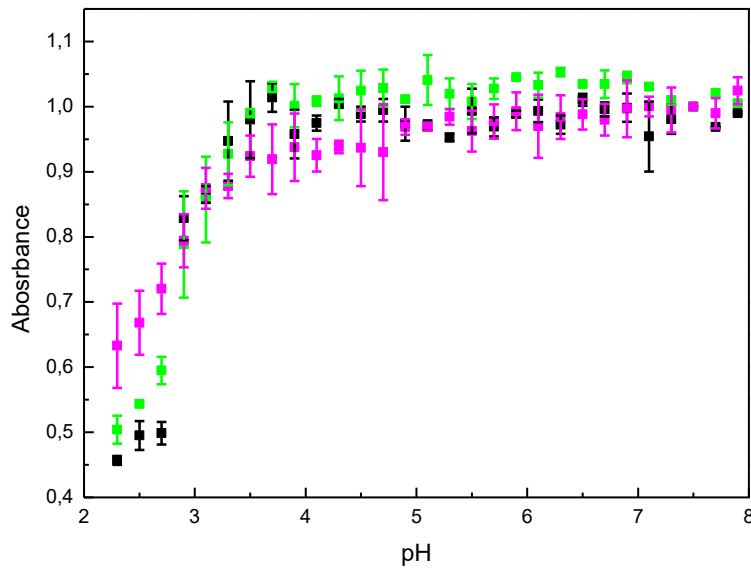


Figure IV. 6- Evolution de l'absorbance de la bande de Soret en fonction du pH pour la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir), la Ngb WT<sub>red</sub> (vert) et la Ngb C46G (rose). Les graphes ont été normalisés à 1,0 à pH 7,4.

Les  $pH_{1/2}$  mesurés pour la Ngb WT<sub>red</sub> et la Ngb C46G sont 2,9 et 2,8 respectivement. Compte tenu des barres d'erreur, les  $pH_{1/2}$  de la Ngb WT<sub>ox</sub>, de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G sont considérés égaux. Ces résultats montrent que la réduction ou la suppression du pont disulfure ne modifie pas les conditions de dissociation de l'hème de la protéine en fonction du pH. En revanche, ils semblent indiquer que dans le cas de la Ngb C46G, l'équilibre atteint aux pH acides comprend une plus grande quantité de Ngb avec de l'hème partiellement dissocié. L'analyse de ces solutions une heure après la première mesure ne montre pas de changement dans l'absorbance. Un équilibre thermodynamique semble donc être atteint. Il a été montré que le remplacement de la cystéine par une glycine en position 46 contribue à augmenter la mobilité de la boucle CD qui est corrélée à une meilleure affinité de l'histidine distale (A. Bocahut et al., 2013). Cela pourrait constituer un facteur limitant à la sortie de l'hème expliquant la plus grande stabilité à pH 2,3 du variant C46G par rapport à la Ngb WT<sub>red</sub>.

### 3. Effet de la mutation Ngb H64V<sub>ox</sub>

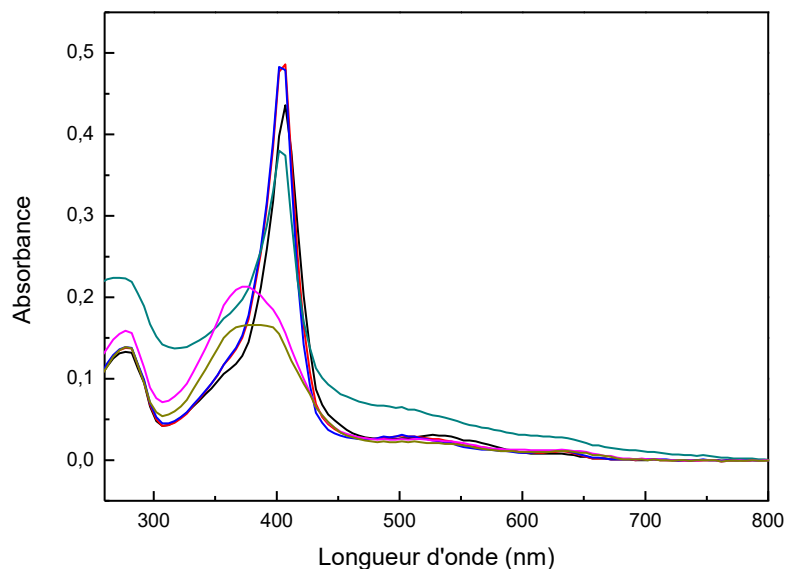
Dans le cas de la Ngb H64V<sub>ox</sub>, l'hexacoordination est réalisée par une molécule d'eau en condition acide (Uno et al., 2004). La molécule d'eau ayant une affinité plus faible pour l'hème que l'histidine distale H64, la stabilité de l'hème en fonction du pH est susceptible d'être modifiée.

L'évolution de l'allure des spectres UV-Visibles de la Ngb H64V<sub>ox</sub> est très comparable à celle de la Ngb WT lorsque le pH est diminué. Elle comprend trois grandes étapes comme pour la Ngb WT<sub>ox</sub>. Cependant ces étapes se réalisent dans des zones de pH différentes de la Ngb WT<sub>ox</sub>. L'allure des spectres UV-Visibles se modifie à un pH plus élevé (Figure IV. 7). De pH 6,5 à 5,0, l'allure du spectre est conservée. En-dessous de pH 5,0 l'intensité de la bande de Soret diminue et l'intensité de la bande à 360 nm, associée à l'hémine, augmente. Finalement à partir de pH 4,0, l'allure des spectres correspond à l'état où l'hème s'est dissocié de la protéine et demeure libre en solution.

#### Chapitre IV : Etude du comportement de la Ngb WT et de ses variants en fonction du pH

Dans le cas de la Ngb H64V<sub>ox</sub>, la bande à 280 nm augmente en intensité entre pH 3,5 et pH 5,0 avec une valeur maximale atteinte à pH 4,5. Cette augmentation correspond à la formation d'un précipité en solution. La ligne de base du spectre est aussi modifiée. Le point isoélectronique de la Ngb WT<sub>ox</sub> étant de 4,6, il y a une perte des répulsions ioniques créées par les chaînes latérales des acides aminés autour de ce pH. Cette zone de pH est donc propice à la formation d'agrégats de protéine.

Si le pH est augmenté de 6,5 à 7,4, le spectre présente une diminution de l'intensité de la bande de Soret. Sa longueur d'onde est déplacée de 407 nm à 410 nm. L'allure des bandes entre 500 nm et 700 nm se modifie également. Les deux bandes entre 500 nm et 600 nm sont plus intenses et se rapprochent de l'allure des bandes de la Ngb WT. La bande à 630 nm diminue en intensité. Ces modifications sont caractéristiques de l'apparition d'une forme hexacoordinée avec un acide aminé pour sixième ligand. Ce ligand a été identifié comme étant la lysine 67 (Uno et al., 2004).



**Figure IV. 7- Spectres UV-Visibles de la Ngb H64V<sub>ox</sub> à pH 7,4 (noir), pH 6,5 (rouge), pH 5,5 (bleu), pH 4,5 (vert), pH 3,5 (rose) et pH 2,5 (kaki). Les mesures ont été réalisées dans du tampon phosphate + acide citrique au pH désiré, à 25 °C.**

Ainsi l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret de la Ngb H64V en fonction du pH est présentée en Figure IV. 8 et montre deux sauts de pH distincts. Par comparaison, les nuages de points obtenus pour la Mb WT et la Ngb WT<sub>ox</sub> ont été ajoutés sur la figure. Le graphe de la Mb WT est issu d'une seule expérience et l'allure obtenue est en accord avec la littérature (Picotti et al., 2009).

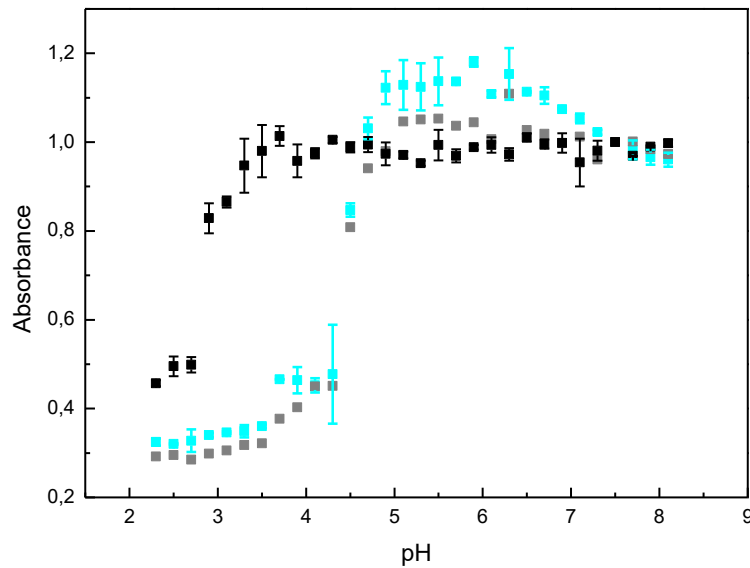


Figure IV. 8- Evolution de l'absorbance de la bande de Soret en fonction du pH de la Ngb H64V<sub>ox</sub> (cyan), de la Mb WT (gris) et de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir). Les graphes ont été normalisés à 1,0 à pH 7,4.

Le premier saut de pH, caractérisé par un  $pH_{1/2}$  de 4,5, représente la dissociation de l'hème de la protéine. Le  $pH_{1/2}$  est plus élevé que dans le cas de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Il a la même valeur que le  $pH_{1/2}$  de la Mb WT qui est hexacoordinée par une molécule d'eau (Uno et al., 2004). Cette hausse du  $pH_{1/2}$  traduit donc une déstabilisation accrue de la protéine dans le cas du variant Ngb H64V par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>. L'hème se dissocie du reste de la protéine à un pH plus élevé.

Le deuxième saut de pH représente la fixation de lysine 67 sur l'hème dans des conditions alcalines (Uno et al., 2004). Il est caractérisé par un  $pH_{1/2}$  de 7,5. Il faudrait faire des mesures à des pH plus basiques pour mieux définir ce saut. En estimant qu'à pH 5,5, la protéine se trouve à 100 % sous forme hexacoordinée avec une molécule d'eau comme ligand distal, il est possible d'estimer le pourcentage de Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67 à différents pH. En particulier, à pH 7,4, qui est le pH de référence pour nos études, le pourcentage de Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinée est de 88 % et le pourcentage de Ngb H64V hexacoordinée avec la lysine 67 est de 12 %. Le pourcentage que nous avons déterminé est assez éloigné de celui de 45% environ déterminé dans la littérature à pH 7,5 (Uno et al., 2004).

La mutation Ngb H64V<sub>ox</sub> affecte donc la stabilité de la protéine en fonction du pH. Elle contribue à augmenter son  $pH_{1/2}$ . L'effet de la réduction du pont disulfure sur le comportement de la Ngb H64V en fonction du pH n'a pas été étudié à cause de la solution hétérogène obtenue dans le cas de la Ngb H64V<sub>red</sub> (Chapitre III, B.3).

#### 4. Effet de la mutation Ngb A90P

La Ngb A90P est une autre mutation susceptible d'affecter directement la stabilité de la protéine en influant sur la structure de l'hélice F qui porte l'histidine proximale de l'hème.

L'évolution de l'allure des spectres UV-Visibles de la Ngb A90P est très comparable à celle observée pour la Ngb WT. L'intensité de la bande de Soret commence à décroître vers pH 4,0. Cependant, au niveau de la bande à 280 nm, un effet similaire à la Ngb H64V est observé. L'intensité de la bande augmente entre pH 3,5 et 5,0 avec la formation d'un précipité.

L'évolution de la bande de Soret en fonction du pH est comparée à la Ngb WT<sub>ox</sub> (Figure IV. 9). Un léger décalage dans le saut de pH entre la Ngb A90P et la Ngb WT<sub>ox</sub> est observable. Le pH<sub>1/2</sub> de la Ngb A90P<sub>ox</sub> et de la Ngb A90P<sub>red</sub> est à 3,25.

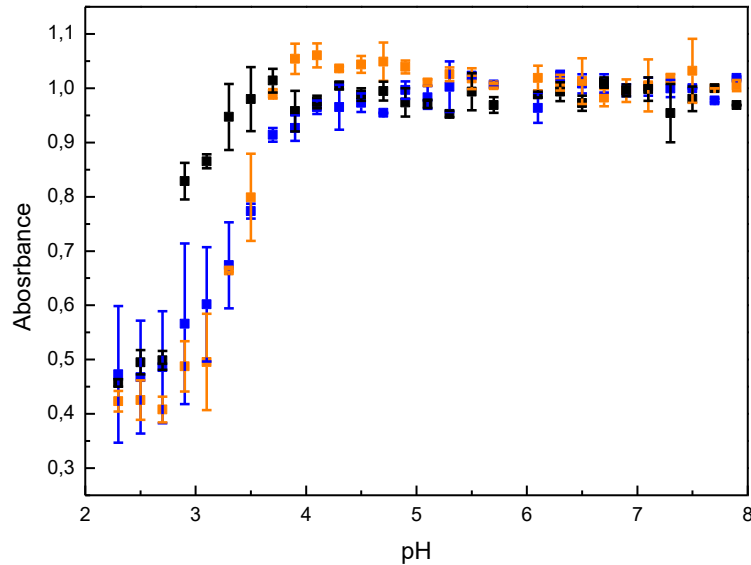


Figure IV. 9- Evolution de l'absorbance de la bande de Soret en fonction du pH de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (bleu), de la Ngb A90P<sub>red</sub> (orange) et de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir). Les graphes ont été normalisés à 1,0 à pH 7,4.

Le variant A90P est donc légèrement plus déstabilisé que la Ngb WT. L'alanine 90 a été montrée comme étant un acide aminé facilitant la structuration en hélice  $\alpha$  de l'hélice F de la Ngb (Codutti et al., 2009). La mutation A90P, à l'inverse, défavorise cette structuration. L'hélice F, portant l'histidine proximale, doit donc perdre sa structure plus facilement en faisant varier le pH chez le variant A90P conduisant à une dissociation de l'hème à un pH plus élevé que la Ngb WT. Nos résultats rejoignent les observations expérimentales menées sur le fragment d'acides aminés correspondant à l'hélice F de la Ngb WT (Codutti et al., 2009).

## 5. Effet de la mutation Ngb F106L

Cette mutation n'affecte pas directement les histidines distales ou proximales de l'hème, au contraire des mutations Ngb H64V ou Ngb A90P.

L'évolution des spectres UV-Visibles est identique à celle de la Ngb WT. L'évolution de l'absorbance de la bande de Soret de la Ngb F106L<sub>ox</sub> et de la Ngb F106L<sub>red</sub> a été comparée avec celle de la Ngb WT<sub>ox</sub> (Figure IV. 10).

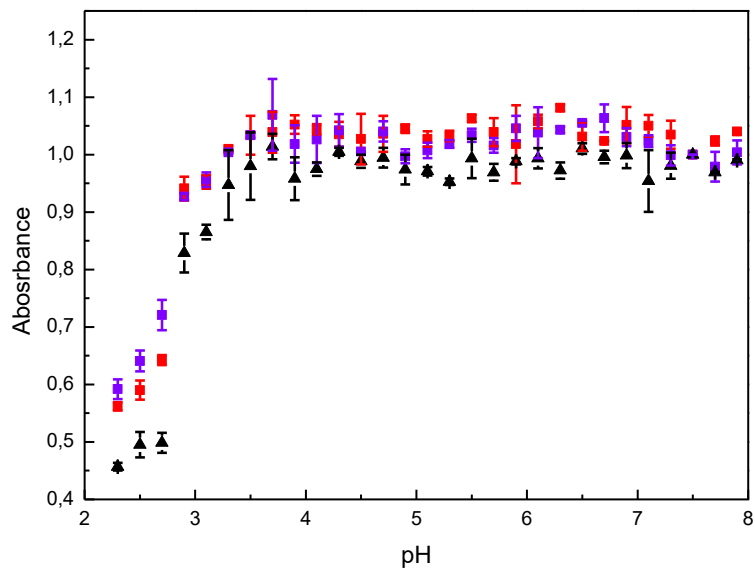


Figure IV. 10- Evolution de la bande de Soret en fonction du pH de la Ngb F106L<sub>ox</sub> (noir), de la Ngb F106L<sub>red</sub> (rouge) et de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir). Les graphes ont été normalisés à 1,0 à pH 7,4.

Le saut de pH pour la Ngb F106L<sub>ox</sub> et la Ngb F106L<sub>red</sub> est identique à celui de la Ngb WT<sub>ox</sub> ( $pH_{1/2} = 2,9$ ). La mutation F106L ne modifie pas la stabilité de la protéine en conditions acides.

• **Résumé**

La stabilité de la protéine est notamment liée à sa capacité à fixer son hème dans des conditions dénaturantes. La stabilité de la Ngb et de ses variants a été étudiée en fonction du pH par UV-Visible. Notamment, les  $pH_{1/2}$  ont pu être déterminés à partir de l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret en fonction du pH. Ces valeurs de  $pH_{1/2}$  reflètent le pH auquel la moitié des protéines ont perdu leur hème. Les résultats obtenus (Tableau III. 6) mettent en évidence trois points importants.

- La réduction du pont disulfure chez la Ngb WT ou chez les variants n'a pas d'effet sur le  $pH_{1/2}$  par rapport aux formes avec pont disulfure oxydé.
- Le  $pH_{1/2}$  est légèrement plus élevé pour la Ngb A90P. La mutation déstabilise donc légèrement la structure du variant A90P.
- La mutation de l'H64 conduit à une augmentation significative du  $pH_{1/2}$ . L'H64 est donc directement impliquée dans la stabilité de la protéine grâce à l'hexacoordination qu'elle réalise avec le fer. Le  $pH_{1/2}$  observé chez le variant correspond à celui de la Mb WT qui est similaire à la Ngb H64V au niveau de la coordination de l'hème.

	$pH_{1/2}$
Ngb WT <sub>ox</sub>	2,9
Ngb WT <sub>red</sub>	2,9
Ngb C46G	2,9
Ngb A90P <sub>ox</sub>	3,25
Ngb A90P <sub>red</sub>	3,25
Ngb F106L <sub>ox</sub>	2,9
Ngb F106L <sub>red</sub>	2,9
Ngb H64V <sub>ox</sub>	4,5

Tableau III. 6- Valeurs de  $pH_{1/2}$  chez la Ngb WT et les variants à 25 °C.

Ce phénomène de dissociation de l'hème en fonction du pH est principalement lié au  $pK_a$  des histidines distale et proximale. Le  $pK_a$  de l'histidine 64 est probablement diminuée à cause de sa liaison avec le fer (Picotti et al., 2009). Les modifications structurales, montrées au Chapitre III, C.2, induites par la réduction du pont disulfure n'affecteraient donc pas les liaisons entre les histidines distale et proximale et le fer au contraire des résultats mis en évidence par dynamique moléculaire (A. Bocahut et al., 2013).

Dans cette partie, nous nous sommes concentrés principalement sur l'évolution de l'absorbance la bande de Soret. Nous avons voulu analyser dans le chapitre suivant par dichroïsme circulaire l'effet de ces mutations en fonction du pH sur la structure secondaire de la protéine.

## B. Influence du pH sur la structure secondaire de la Ngb WT et des variants

Dans cette étude, nous avons observé la variation de structure secondaire des protéines en fonction du pH par DC. Les spectres de DC ont été déconvolués afin d'obtenir les proportions des différents types de structure secondaire. La comparaison se fait à la fois entre les pourcentages des structures obtenues à différents pH pour une même protéine et entre les pourcentages des structures obtenues pour les variants par rapport à la Ngb WT.

En raison de la longueur des acquisitions, les expériences ont été réalisées pour quatre pH différents : pH 2,3, pH 4,5, pH 7,4 et pH 9,5. Le pH 2,3 a été choisi pour que la protéine se retrouve en conditions acides, où l'hème est dissocié de la protéine. Le pH 4,5 a été choisi car il se situe juste avant la zone de saut de pH d'après les expériences en UV-Visible. C'est également dans cette zone de pH qu'un précipité a pu être observé chez certains variants. Le pH 9,5 a été ajouté à cette étude afin de pouvoir observer et comparer des modifications structurales à pH basique, notamment dans le cas de la Ngb H64V où il est montré qu'un ligand distal, la lysine 67, vient se fixer (Uno et al., 2004).

### 1. Structure secondaire de la Ngb WT<sub>ox</sub> en fonction du pH

Le comportement de la Ngb WT<sub>ox</sub> en fonction du pH a d'abord été étudié pour établir des mesures de référence. Les spectres de DC de la Ngb WT à pH 2,3, pH 4,5, pH 7,4 et pH 9,5 ont été comparés (Figure IV. 11).

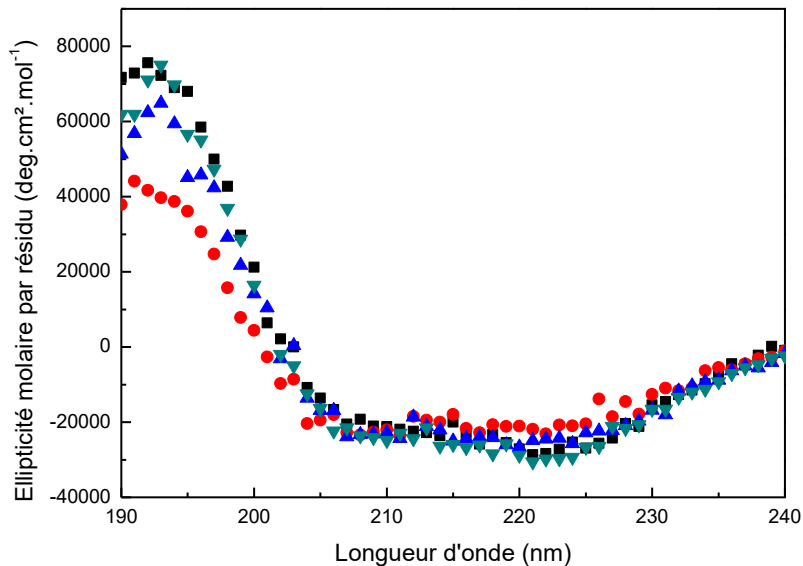


Figure IV. 11- Spectres de DC de la Ngb WT à pH 7,4 (carré), pH 2,3 (rond), pH 4,5 (triangle) et pH 9,5 (triangle inversé). Les expériences ont été réalisées à 25 °C dans du tampon phosphate + acide citrique pour les pH 2,3 à 7,4 et dans du tampon phosphate + borate pour le pH 9,5.



Les spectres à pH 7,4, 4,5 et 9,5 ont une allure très similaire. Le spectre à pH 2,3 présente une intensité plus faible de la bande à 192 nm et de la bande à 221 nm. La structure de la protéine ne semble donc pas affectée au pH 4,5 et 9,5.

Les résultats de déconvolution (Figure IV. 12) montrent que les structures à pH 7,4, pH 4,5 et pH 9,5 sont identiques. La diminution du pourcentage d'hélices  $\alpha$  semble plus prononcée à pH 2,3, avec une perte de 8 % en hélices  $\alpha$ . Cependant l'écart type important, de 13% fait que le pourcentage d'hélices  $\alpha$  reste comparable à celui de la Ngb WT à pH 7,4. Le spectre UV-Visible à pH 2,3 indique que cette structure correspond à un état majoritaire de la protéine où l'hème est dissocié. Le mélange entre apo-Ngb et holo-Ngb peut être à l'origine de l'écart type élevé de 13%, obtenu.

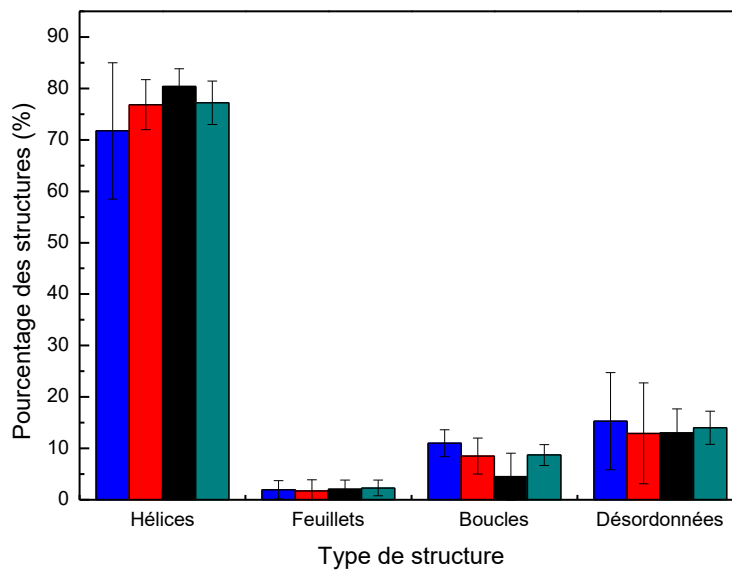
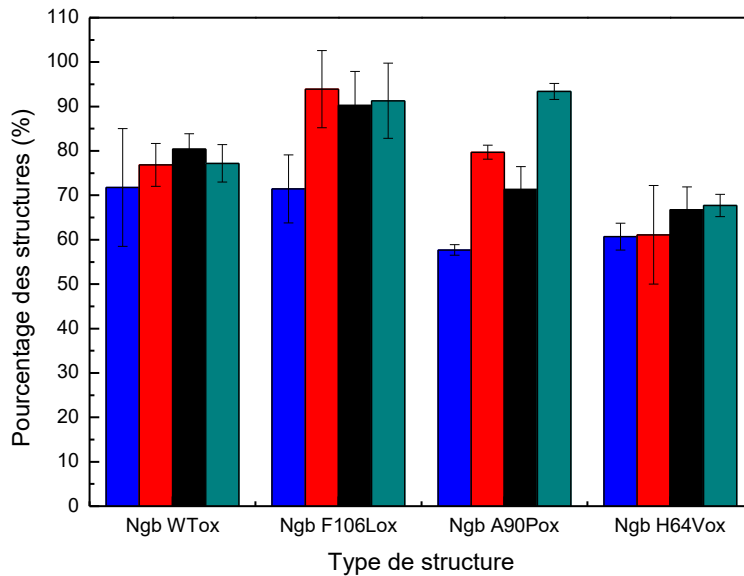


Figure IV. 12- Pourcentage des différents types de structures secondaires pour la Ngb WT<sub>ox</sub> à pH 2,3 (bleu), pH 4,5 (rouge), pH 7,4 (noir) et pH 9,5 (bleu-vert).

La structure secondaire de la Ngb WT est donc stable en fonction du pH. Les résultats sont en accord avec les observations faites sur la forme apo-Ngb (Picotti et al., 2009). Il est montré que le spectre de DC à pH 2,0 n'a que peu de différences avec le spectre à pH 7,0 de la forme apo. Le pourcentage d'hélices  $\alpha$  y est déterminé à 75 % à pH 7,4 et ne semble pas modifié à pH 2,0. La forme apo-Ngb reste donc structurée quelque soit le pH. La forme apo-Mb montre au contraire un spectre caractéristique d'une déstructuration majeure entre pH 2,0 et 7,0 (Picotti et al., 2009).

## 2. Effet des mutations

La structure de la Ngb est principalement constituée d'hélices  $\alpha$ . Afin d'étudier l'effet des mutations sur l'évolution de la structure secondaire en fonction du pH, nous allons dans la suite nous concentrer sur l'évolution du pourcentage des hélices  $\alpha$  chez les différents variants en fonction du pH (Figure IV. 13). Les résultats des déconvolutions obtenues pour chaque type de structure secondaire sont reportés en Annexe C.



**Figure IV. 13- Evolution du pourcentage d'hélices  $\alpha$  pour la Ngb WT<sub>ox</sub> et différents variants à pH 2,3 (bleu), pH 4,5 (rouge), pH 7,4 (noir) et pH 9,5 (bleu-vert).**

La Ngb F106L<sub>ox</sub> présente deux différences avec la Ngb WT<sub>ox</sub>. Les pourcentages d'hélices  $\alpha$  obtenus à pH 4,5, pH 7,4 et pH 9,5 sont identiques, comme pour la Ngb WT. En revanche, le pourcentage d'hélices  $\alpha$  déterminé à pH 2,3, est de 71 % et est nettement inférieur, de 20 points environ, à ceux calculés aux autres pH. Ceci n'est pas le cas chez la Ngb WT<sub>ox</sub> où le pourcentage d'hélices  $\alpha$  à pH 2,3 reste comparable à ceux des autres pH. Ensuite, les pourcentages d'hélice obtenus à pH 4,5 et pH 9,5 sont plus élevés chez la Ngb F106L<sub>ox</sub> que chez la Ngb WT<sub>ox</sub>, de 10 points environ. La Ngb F106L<sub>ox</sub> est donc plus structurée en hélices  $\alpha$  que la Ngb WT<sub>ox</sub> dans la zone de pH 4,5 à 9,5. C'est la zone de pH où la protéine possède son hème. En revanche, lorsque l'hème s'est dissocié de la protéine, à pH 2,3, la perte relative en hélices  $\alpha$  est plus importante chez la Ngb F106L que chez la Ngb WT.

Une évolution similaire du pourcentage d'hélices  $\alpha$  en fonction du pH est observée pour la Ngb A90P<sub>ox</sub>. A pH 4,5 et 7,4, les pourcentages sont égaux comme pour la Ngb WT<sub>ox</sub>. En revanche, à pH 2,3, le pourcentage de 57 % obtenu est inférieur de 14 points à celui à pH 7,4. Ce résultat, comme pour la Ngb F106L<sub>ox</sub>, est différent de la Ngb WT<sub>ox</sub>. De plus, à pH 9,5, le pourcentage obtenu de 93 % est supérieur de 22 points à celui à pH 7,4. Il est également supérieur à celui observé chez la Ngb WT<sub>ox</sub> à pH 9,5. La Ngb A90P<sub>ox</sub> est autant structurée en hélices  $\alpha$  que la Ngb WT<sub>ox</sub> de pH 4,5 à 7,5. Comme chez la Ngb F106L<sub>ox</sub>, la perte de l'hème à pH 2,3 est associée à une perte en hélices  $\alpha$  plus marquée que chez la Ngb WT<sub>ox</sub>. L'augmentation du pourcentage d'hélices  $\alpha$  observée à pH 9,5 est plus inattendue dans la mesure où la proline joue un rôle destructurant pour les hélices.

La Ngb H64V<sub>ox</sub> est au final le variant qui présente le plus de similitudes avec la Ngb WT<sub>ox</sub>. Les pourcentages d'hélices calculés aux différents pH restent égaux à celui obtenu à pH 7,4 comme pour la Ngb WT<sub>ox</sub>. La différence notable est que la Ngb H64V<sub>ox</sub> présente, quelque soit le pH, une structure

plus pauvre en hélices  $\alpha$  que la Ngb WT<sub>ox</sub>. Une différence de 10 à 15 points en hélices entre la Ngb H64V<sub>ox</sub> et la Ngb WT<sub>ox</sub> est observée à chaque pH. La perte de l'histidine distale entraîne donc une déstructuration partielle des hélices  $\alpha$  par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>. Mais cette mutation n'induit pas d'effets supplémentaires en fonction du pH.

### 3. Effet du pont disulfure

Il a été mis en évidence que le pont disulfure avait un impact sur la structure de la protéine. Par DC nous avons montré au Chapitre III que la suppression du pont disulfure par réduction avec du DTT ou par mutation entraîne une augmentation du pourcentage d'hélices  $\alpha$  à pH 7,4 par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>. Il a donc été analysé si la réduction du pont disulfure entraînait des effets supplémentaires en fonction du pH et en fonction des mutations. Comme dans la partie précédente, nous nous sommes intéressés à l'évolution des pourcentages des hélices  $\alpha$  en fonction du pH pour les différentes protéines (Figure IV. 14).

Dans le cas de la Ngb C46G, variant sans pont disulfure, les expériences ont été réalisées dans trois conditions de traitement différentes. La Ngb C46G après traitement avec du FeCN<sub>6</sub>, après traitement avec du DTT et sans aucun traitement a été étudiée aux différents pH. L'allure des spectres obtenue (Annexe F) et les déconvolutions sont comparables quel que soit le traitement, indiquant qu'il n'y a pas d'effet imputable au traitement employé. Les résultats présentés (Figure IV. 14) sont ceux obtenus pour la Ngb C46G sans aucun traitement

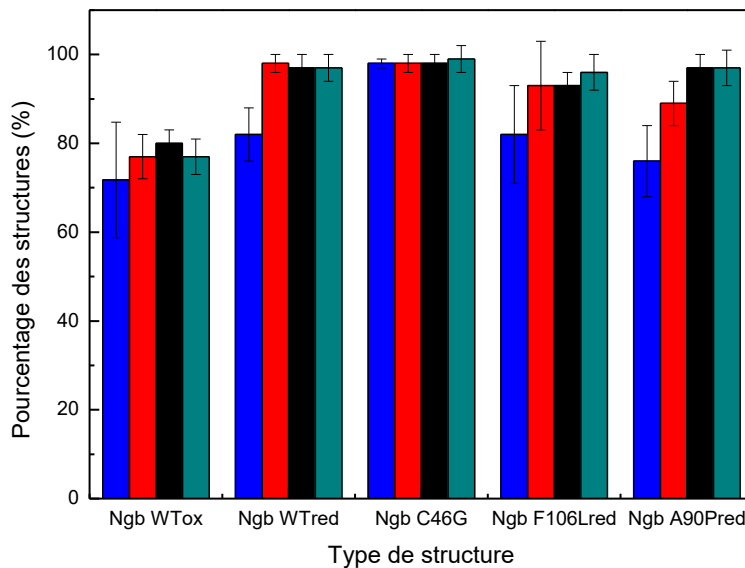


Figure IV. 14 - Evolution du pourcentage d'hélices  $\alpha$  pour la Ngb WT et différents variants sans pont disulfure à pH 2,3 (bleu), pH 4,5 (rouge), pH 7,4 (noir) et pH 9,5 (violet).

Un résultat général est que la suppression du pont disulfure entraîne un pourcentage d'hélices  $\alpha$  est plus élevé à pH 4,5, pH 7,4 et pH 9,5 que chez la Ngb WT<sub>ox</sub> ou que chez les variants avec pont disulfure (Figure IV. 13). De plus, les pourcentages obtenus, autour de 95 %, sont égaux entre les pH 4,5, pH 7,4 et pH 9,5 chez toutes les protéines sans pont disulfure, ce qui n'est pas le cas lorsque le pont disulfure est présent. La réduction du pont disulfure provoque donc une structuration

plus importante en hélices pour les différentes protéines. Cette augmentation du pourcentage d'hélices  $\alpha$  se fait au détriment des structures de types boucle ou désordonnée (Annexe C). La déstructuration de la Ngb A90P<sub>red</sub> devient même comparable à celle de la Ngb WT<sub>red</sub> à pH 2,3, alors que pour les formes avec pont disulfure, la déstructuration de la Ngb A90P<sub>ox</sub> est plus importante au même pH.

Chez la Ngb WT<sub>red</sub>, la diminution de pH 7,4 à pH 2,3 s'accompagne d'une diminution de 15 points du pourcentage d'hélices  $\alpha$  par rapport au pH 7,4. Cette diminution n'est en revanche pas observée chez la Ngb C46G. Une explication possible serait due à la différence des chaînes latérales des acides aminés. Chez la Ngb C46G, la glycine qui remplace la cystéine ne présente pas de chaîne latérale. En revanche, lorsque le pont disulfure est simplement réduit chez la Ngb WT, il y a donc présence d'une chaîne latérale avec un thiol au résidu 46. Cette chaîne fait face à la chaîne latérale identique de la cystéine 55. Des interactions entre ces chaînes latérales ou l'encombrement stérique entraîné par ces chaînes latérales peuvent contribuer à faciliter la déstructuration de la protéine en conditions acides. Une perte du pourcentage d'hélices par rapport à pH 7,4, de l'ordre de 20 points, est aussi observable chez la Ngb A90P<sub>red</sub>. La Ngb F106L<sub>red</sub> ne subit pas de diminution significative en tenant compte de l'écart type.

- **Résumé**

L'étude de l'évolution de la structure secondaire en fonction du pH constitue un autre indicateur de la stabilité de la protéine. Une attention particulière a été portée à l'évolution du pourcentage d'hélices  $\alpha$  en fonction du pH pour les différentes protéines avec et sans pont disulfure.

- Pour la Ngb WT<sub>ox</sub> il n'y a pas de différences significatives dans les pourcentages d'hélices  $\alpha$  aux différents pH étudiés. Sa structure secondaire demeure donc stable en fonction du pH, malgré la perte de l'hème à partir de pH 3,7.
- Comme pour la Ngb WT<sub>ox</sub>, le pourcentage d'hélices  $\alpha$  chez la Ngb H64V<sub>ox</sub> reste stable en fonction du pH. C'est un résultat différent de la Mb WT qui exprime une importante perte de sa structure en hélices  $\alpha$  à pH 2,0. Or la Ngb H64V<sub>ox</sub> et la Mb WT présentent un environnement de l'hème similaire ce qui suggère que l'héxacoordination par l'histidine distale n'est pas le seul facteur de stabilité en condition dénaturante.
- Les variants Ngb A90P<sub>ox</sub> et Ngb F106L<sub>ox</sub> expriment une perte en hélices  $\alpha$  significatives quand le pH diminue. L'A90 et la F106 participent donc à la meilleure structuration en hélices de la Ngb.
- Quand le pont disulfure est réduit, le pourcentage d'hélices  $\alpha$  diminue quand le pH est abaissé. Cela confirme que l'état d'oxydation du pont disulfure a un effet stabilisant/déstabilisant sur la structure de la protéine.

Même lorsqu'une perte en hélices  $\alpha$  est observée, que ce soit chez la Ngb WT ou chez les variants, avec ou sans pont disulfure, la structure secondaire globale des protéines reste tout-de-même majoritairement en hélices. Etant donné cette conservation observée, nous nous sommes intéressés au phénomène de réversibilité d'entrée/sortie de l'hème provoqué par une dénaturation/renaturation en milieu acide.

## **C. Réversibilité d'entrée/sortie de l'hème chez la Ngb**

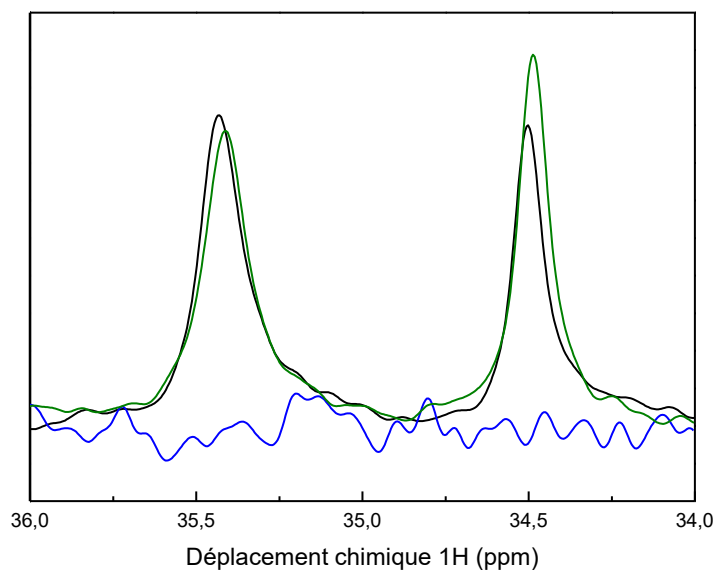
Cette étude possède plusieurs intérêts. D'une part, elle permet de souligner la stabilité accrue de la Ngb face à des conditions de dénaturation/renaturation. De plus, elle peut mettre en évidence des mouvements mécanistiques propres à l'hème. Enfin, elle permet de se pencher sur l'équilibre existant entre les deux formes isomères de l'hème. Cette étude a deux objectifs principaux. Le premier est de tout d'abord déterminer si l'hème peut, après dénaturation, à nouveau se fixer au sein de la protéine et plus particulièrement au niveau de son site de fixation naturel. Le second est d'étudier l'évolution du ratio des formes isomères de l'hème.

Cette étude a été menée par RMN afin de pouvoir suivre l'évolution du ratio. Nous avons tout d'abord étudié le phénomène dans le cas de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Puis nous nous sommes intéressés à l'effet du pont disulfure et des mutations.

### **1. Phénomène d'entrée/sortie de l'hème chez la Ngb WT<sub>ox</sub>**

La réalisation de cette expérience comporte trois étapes. Un spectre RMN de référence est d'abord réalisé à pH 7,4. Puis le pH de la solution est brutalement abaissé autour de pH 2,0 avec de l'acide chlorhydrique concentré afin d'entraîner la dissociation de l'hème. Un spectre RMN de la solution à pH 2,0 est enregistré. Enfin le pH est augmenté autour de pH 7,4 avec de la soude concentrée et un nouveau spectre RMN est enregistré. L'expérience a été réalisée deux fois afin de s'assurer de sa reproductibilité.

Les signaux caractéristiques des formes isomères de l'hème entre 34 ppm et 38 ppm ont été suivis (Figure IV. 15). A pH 2,0, les deux bandes correspondant aux formes isomères ont disparu. L'absence de ces signaux confirme tout d'abord qu'en milieu très acide, à pH 2,0, l'hème est dissocié de la protéine. Lorsque le pH de la solution est de nouveau ajusté à pH 7,4, les deux bandes sont à nouveau observables. Les déplacements chimiques des deux bandes sont identiques à ceux des bandes du spectre initial. Le ratio des deux formes isomères semble légèrement modifié et ne plus être de 50/50. Cependant la différence est trop faible pour pouvoir interpréter un réel changement dans les populations relatives des deux formes.



**Figure IV. 15- Spectres RMN de la Ngb WT ( $C = 100 \mu M$ ) à  $25^\circ C$  entre 34 ppm et 36 ppm à pH 7,4 (noir), pH 2,2 (bleu) et de retour à pH 7,4 (vert). Les signaux ont été normalisés par rapport à la bande de gauche.**

L'ensemble des bandes pour les autres zones du spectre RMN confirme les résultats observés (Figure IV. 16 et Figure IV. 17). En particulier, la présence des signaux entre 12 ppm et 24 ppm et entre 0 ppm et -6 ppm, est typique de la présence de l'hème bas-spin lié à la protéine. A pH 2,0, l'ensemble de ces bandes n'est plus présent. Le spectre RMN  $^1H$  (Figure IV. 16) est beaucoup plus resserré qu'à haut pH avec l'ensemble des résonances présentes entre 0 et 10 ppm. Il apparaît que des signaux de protons amides sortent à des déplacements chimiques supérieurs à 8.5 ppm et des signaux de méthyles en dessous de 0.5ppm. Cette dispersion spectrale signifie que la protéine garde un volume bien défini dans l'espace. Deux signaux  $^1HN$  sont présents dans la région caractéristique des chaînes latérales de tryptophane (vers 10ppm) : un pic fin et intense et plusieurs pics faibles et larges. Il s'agit vraisemblablement d'un tryptophane très dynamique et de plusieurs tryptophanes dont le mouvement est limité par un environnement structuré. Enfin, les raies semblent également assez larges. Ces éléments indiquent que la protéine n'est pas totalement désordonnée malgré la perte de l'hème. Ceci confirme les données de DC qui suggère que la forme apo-Ngb conserve une certaine structuration (Chapitre IV, B.1).

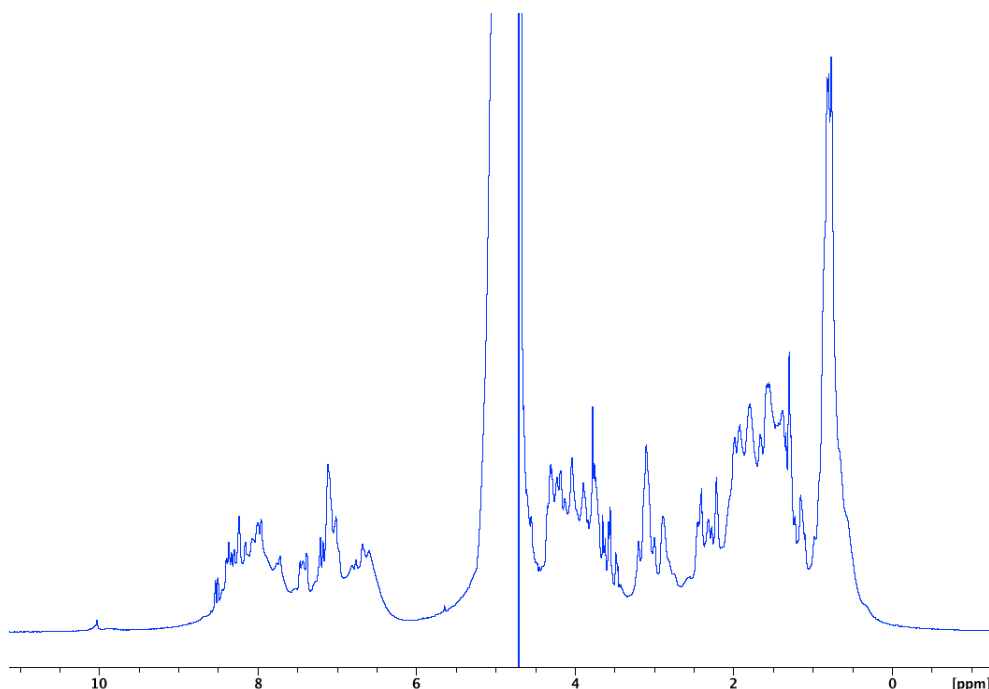


Figure IV. 16- Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la Ngb WT ( $C = 100 \mu\text{M}$ ) à pH 2,0 à 25 °C.

En revanche, en retournant à pH 7,4, l'ensemble des bandes réapparaît (Figure IV. 17). De plus, les déplacements chimiques sont identiques avec le spectre de référence. L'allure des bandes est également identique.

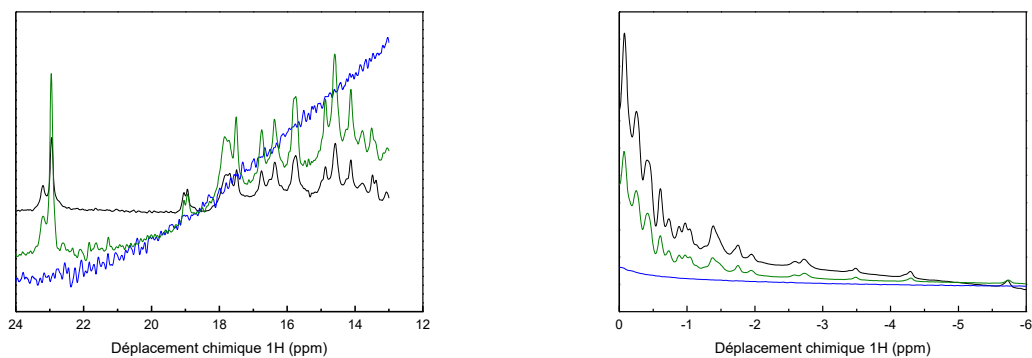


Figure IV. 17- Spectres RMN de la Ngb WT ( $C = 100 \mu\text{M}$ ). A gauche : entre 12 ppm et 24 ppm à pH 7,4 (noir), pH 2,2 (bleu) et de retour à pH 7,4 (vert). A droite : entre 0 ppm et -6 ppm à pH 7,4 (noir), pH 2,2 (bleu) et de retour à pH 7,4 (vert). Les spectres ont été réalisés à 25 °C.

Ces observations indiquent que le phénomène d'entrée et de sortie de l'hème est réversible. L'acidification de la solution conduit à la sortie de l'hème de la protéine. Lorsque le pH est ramené à pH 7,4, l'ensemble des bandes est de nouveau observable. L'allure et les déplacements chimiques sont identiques au spectre de référence. Cela indique que l'hème revient se placer à la même position au sein de la protéine. Par ailleurs, cela indique aussi que la protéine retrouve une structure tridimensionnelle relativement identique à la structure initiale. Les interactions entre l'hème et les résidus à l'origine de ces bandes sont conservés.



L'expérience a aussi été testée en conditions basiques. A pH 13,0 la dissociation totale de l'hème est observée comme pour le passage à pH 2,0. Les résultats obtenus après retour à pH 7,4 sont identiques à ceux observés pour une dissociation de l'hème en milieu acide. Les signaux caractéristiques de la présence de l'hème bas-spin hexacoordiné par la protéine réapparaissent aux mêmes déplacements chimiques. Leurs intensités sont un peu plus faibles que celles des signaux initiaux ce qui signifie néanmoins qu'une partie des protéines n'ont pas récupéré l'hème.

Nous avons aussi voulu voir si le pont disulfure avait aussi une influence sur ce phénomène.

## 2. Influence du pont disulfure sur le phénomène de réversibilité d'entrée/sortie de l'hème

L'expérience a été testée sur la Ngb WT<sub>red</sub> et sur de la Ngb C46G. L'expérience a été reproduite deux fois pour chaque protéine dans des conditions identiques à la Ngb WT<sub>ox</sub>.

Les résultats obtenus indiquent un phénomène identique à celui de la Ngb WT. En particulier l'observation de l'évolution des signaux caractéristiques de la présence de l'hème est similaire (Figure IV. 18). Il n'y a pas de différences observées entre le comportement de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G. Comme pour la Ngb WT<sub>ox</sub>, l'acidification à pH 2,0 provoque une sortie de l'hème de la protéine. L'ensemble des bandes dû à la présence de l'hème disparaît. Lorsque le pH est ramené à pH 7,4, les bandes sont de nouveau observables. Le déplacement chimique et l'allure des bandes dans les différentes zones du spectre sont identiques au spectre de référence. Comme pour la Ngb WT<sub>ox</sub>, une modification du ratio des formes isomères est visible entre le spectre de référence et le spectre obtenu après retour à pH 7,4. Le ratio obtenu après retour à pH 7,4 est de 50 :50. Le seul effet notable est que l'intensité finale des signaux est légèrement inférieure à l'intensité initiale, signe que toutes les protéines n'ont pas récupéré leur hème.

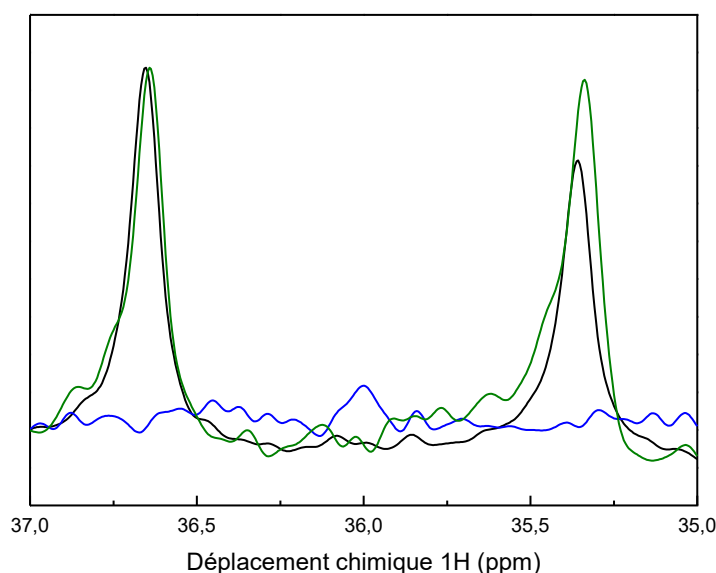


Figure IV. 18- Spectres RMN <sup>1</sup>H de la Ngb WT<sub>red</sub> (C = 100 μM) à 25 °C entre 35 ppm et 37 ppm à pH 7,4 (noir), pH 2,2 (bleu) et de retour à pH 7,4 (vert). Les signaux ont été normalisés par rapport à la bande de gauche.

La réduction ou la suppression du pont disulfure ne semble donc pas affecter le phénomène de réversibilité d'entrée/sortie de l'hème. Les mutations réalisées de la Ngb A90P et de la Ngb F106L pourraient en revanche avoir un impact sur ce phénomène. La Ngb A90P affecte le  $pH_{1/2}$  de dissociation de l'hème. La Ngb F106L ayant potentiellement une interaction spécifique avec l'une des formes isomères de l'hème, sa mutation pourrait modifier le ratio obtenu après retour à pH 7,4. Nous ne discuterons pas dans ce chapitre de la Ngb H64V dont les signaux caractéristiques de l'hème sont a priori très déblindés et difficilement observables.

### 3. Effet de la mutation F106L

L'expérience a été testée sur la Ngb F106L<sub>ox</sub> et la Ngb F106L<sub>red</sub>. Les résultats obtenus indiquent un comportement similaire à celui de la Ngb WT, aussi bien pour la Ngb F106L et la Ngb F106L<sub>red</sub> (Figure IV. 19). A pH 2,0, l'ensemble des bandes dues à la présence de l'hème a disparu, confirmant la sortie de l'hème de la protéine. Après retour à pH 7,4, les bandes sont de nouveau observables. Le déplacement chimique est identique au spectre de référence. En revanche le ratio des formes A et B est très différent.

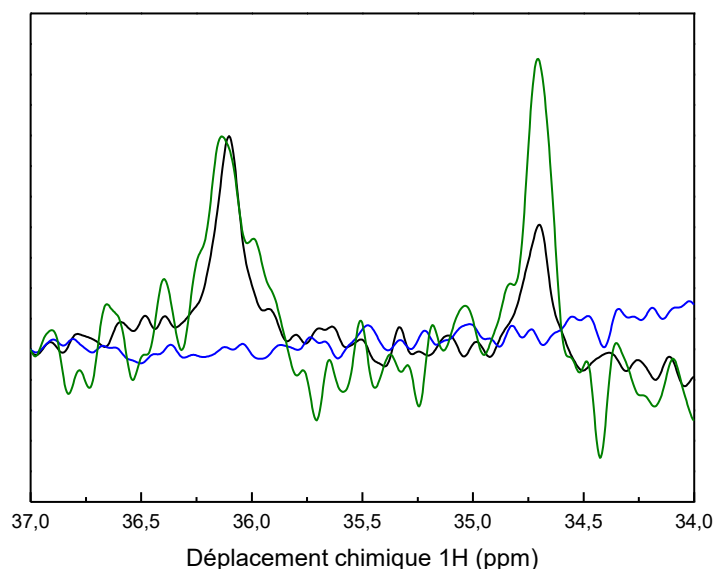


Figure IV. 19- Spectres RMN de la Ngb F106L<sub>ox</sub> ( $C = 100 \mu M$ ) à 25 °C entre 34 ppm et 37 ppm à pH 7,4 (noir), pH 2,2 (bleu) et de retour à pH 7,4 (vert). Les signaux ont été normalisés par rapport à la bande de gauche.

Cependant, l'intensité des bandes, notamment entre 34 ppm et 37 ppm, obtenue après retour à pH 7,4 est beaucoup plus faible que pour la Ngb WT<sub>ox</sub>. Pour normaliser par rapport à la bande de gauche, il a fallu multiplier par un facteur 5,3 l'intensité des bandes du spectre obtenu après retour à pH 7,4. Chez la Ngb WT, les bandes du spectre obtenu après pH 7,4 ont pratiquement la même intensité que celles du spectre de référence. Cette intensité plus faible dans le cas de la Ngb F106L<sub>ox</sub> pourrait indiquer que le phénomène de réversibilité s'effectue plus difficilement que dans le cas de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Cela pourrait aussi expliquer la différence de ratio importante constatée entre l'état initial et l'état final. Cette différence est en faveur de la forme isomère A. Ceci indique qu'elle rentrerait plus rapidement dans la cavité de l'hème. Une explication possible serait que

l'encombrement stérique entre les groupements latéraux de l'hème et les acides aminés de son environnement n'est pas le même en fonction de la forme isomère (A. Bocahut et al., 2013). Il serait plus important pour la forme isomère B, ce qui gênerait son insertion lorsque la structure de la protéine est plus perturbée à cause de la mutation.

#### 4. Effet de la mutation A90P

L'expérience a été réalisée sur de la Ngb A90P<sub>ox</sub> et la Ngb A90P<sub>red</sub>. Les expériences ont été reproduites deux fois dans les mêmes conditions que pour la Ngb WT<sub>ox</sub>.

Le comportement de la protéine est identique aux comportements de la Ngb WT (Figure IV. 20). A pH 2,0 les signaux caractéristiques de la présence de l'hème disparaissent. Ils sont de nouveau observables après retour à pH 7,4. L'intensité finale obtenue est inférieure à l'intensité initiale. Dans le cas de la Ngb A90P<sub>red</sub>, l'intensité finale obtenue est très l'intensité initiale. Il faut un facteur 6 pour normaliser par rapport au signal à 37 ppm (Annexe J).

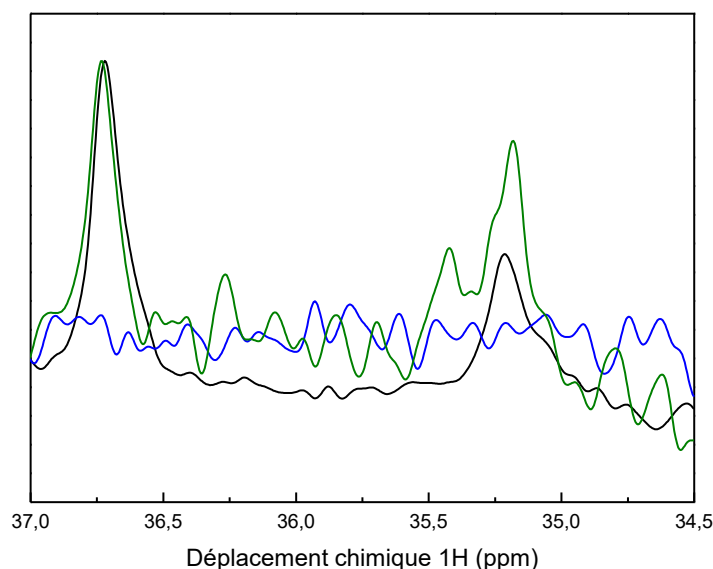


Figure IV. 20- Spectres RMN <sup>1</sup>H de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (C = 100 μM) à 25 °C Centre 34,5 ppm et 37 ppm à pH 7,4 (noir), pH 2,2 (bleu) et de retour à pH 7,4 (vert). Les signaux ont été normalisés par rapport à la bande de gauche.

Ainsi, comme pour le variant Ngb F106L, la réversibilité d'entrée/sortie de l'hème est observable mais les quantités de protéine reformées sont beaucoup moins importantes que l'état initial. La mutation entraîne donc une perturbation structurale qui gênerait l'entrée de l'hème.

- **Résumé**

L'étude du phénomène d'entrée/sortie de l'hème est intéressante pour déterminer les facteurs structuraux influençant le positionnement de l'hème et régissant le ratio des formes isomères.

- La structure de la Ngb WT, et notamment l'environnement de l'hème, ne semble pas impactée par la sortie de l'hème à pH acide. Les éléments contrôlant le positionnement de l'hème et le ratio des formes isomères ne sont pas modifiés.
- En revanche, chez les variants Ngb A90P<sub>ox</sub> et Ngb F106L<sub>ox</sub>, l'insertion de l'hème après sortie à pH 2,0 donne des signaux aux mêmes déplacements chimiques mais d'intensités plus faibles. Le positionnement de l'hème est donc identique lors de sa réinsertion mais les quantités obtenues de protéines possédant un hème sont plus faibles. Il y a donc une limite thermodynamique et/ou cinétique à l'équilibre final obtenu de formes avec hème et sans hème. L'A90 et la F106 participeraient donc à favoriser l'insertion de l'hème.
- De plus, la diminution des quantités de protéines avec hème obtenues lors de la réinsertion de l'hème sont encore plus faibles lorsque le pont disulfure est réduit chez ces variants. Il y a donc un effet corrélé entre l'état d'oxydation du pont disulfure et de la présence de l'A90 et de la F106.

## D. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons dégagé trois axes importants. Les deux premiers sont centrés autour de l'influence des mutations sur la stabilité de l'hème au sein de la protéine et sur la structure secondaire. Le troisième concerne l'influence du pont disulfure sur la stabilité de la structure secondaire de la protéine.

Il a été montré que les mutations affectant la stabilité de l'hème sont les mutations touchant directement ou indirectement les ligands distal et proximal de l'hème. En effet, lors de l'étude de l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret en fonction du pH, il a été observé que seules les mutations de la Ngb H64V et de la Ngb A90P entraînent une modification du  $pH_{1/2}$  de dissociation de l'hème (Tableau III. 7). Les mutations de la Ngb F106L et de la Ngb C46G, qui n'influent pas sur les ligands distal et proximal, n'affectent pas le  $pH_{1/2}$  de la protéine.

La mutation de la Ngb F106L ne semble pas affecter non plus l'évolution en fonction du pH de la structure secondaire de la protéine. Au contraire, chez les variants Ngb A90P et Ngb H64V, une diminution sensible du pourcentage d'hélices  $\alpha$  est observable à tous les pH par rapport à la Ngb WT (Tableau III. 7). De plus, le couplage entre les analyses UV-Visibles et les analyses en DC montrent que la dissociation de l'hème de la protéine provoque une diminution du pourcentage d'hélices  $\alpha$  chez les différentes protéines (Tableau III. 7). Ces deux points mis ensembles révèlent une corrélation entre la stabilité de la structure secondaire de la protéine et la présence de l'hème au sein de la protéine.

La présence du pont disulfure ne semble en revanche pas influencer sur la dissociation de l'hème (Tableau III. 7). Cependant la réduction du pont disulfure provoque chez toutes les protéines une augmentation du pourcentage d'hélices  $\alpha$  quelque soit le pH. Le pont disulfure a donc un rôle dans la présence des structures de type boucles ou désordonnés.

	$pH_{1/2}$	Hélices $\alpha$ (%)	
		pH 2,3	pH 7,4
Ngb WT <sub>ox</sub>	2,9	72	80
Ngb WT <sub>red</sub>	2,9	82	97
Ngb C46G	2,9	98	98
Ngb A90P <sub>ox</sub>	3,25	58	71
Ngb A90P <sub>red</sub>	3,25	76	97
Ngb F106L <sub>ox</sub>	2,9	71	90
Ngb F106L <sub>red</sub>	2,9	82	93
Ngb H64V <sub>ox</sub>	4,5	61	67

Tableau III. 7- Tableau récapitulatif des valeurs de  $pH_{1/2}$  et des pourcentages d'hélice  $\alpha$  à pH 2,3 et 7,4 pour la Ngb WT et ses variants à 25 °C.

Enfin, il est constatable que malgré les mutations ou la réduction du pont disulfure, la protéine conserve une structure assez ordonnée avec une majorité d'hélices  $\alpha$ . La conservation de cette structure permet à la protéine de réintégrer l'hème à nouveau après sa dissociation dans des conditions dénaturantes. La structure obtenue semble assez similaire à la structure initiale. Cette expérience a aussi permis de mettre en évidence qu'il n'existait pas de forme isomère de l'hème privilégiée thermodynamiquement. Les populations relatives des deux formes sont d'environ 50/50 après réassociation de l'hème au sein de la protéine.

Cependant, grâce aux mutations, nous pouvons constater que le phénomène de réinsertion de l'hème après dénaturation à pH acide est dépendant de l'environnement de l'hème. Dans le cas des mutations A90P et F106L, une perte significative de protéine reformée est constatée lors du retour à pH 7,4, comparée à la Ngb WT. Le positionnement de l'hème est donc fortement dépendant de son environnement. Un autre point intéressant que nous avons dégagé est qu'il y a un couplage entre les mutations et la présence du pont disulfure. Lors de l'absence de mutation, la réduction du pont disulfure n'entraîne pas de perturbation significative dans le processus de réinsertion de l'hème. En revanche, lorsque la réduction du pont disulfure est couplée à une mutation, la réduction des quantités de protéines reformées après retour à pH 7,4 est encore plus réduite que lors de la mutation seule. Il semble donc que la position des acides aminés régulant le positionnement de l'hème dans la protéine soit en partie régulée par la présence du pont disulfure.

Le comportement de l'hème au sein de la protéine est donc notamment régulé par ses acides aminés environnants. L'état d'oxydation du pont disulfure semble de plus être un élément impliqué dans cette régulation. L'effet de sa réduction est plus important en présence des variants. Nous allons dégager en étudiant les cinétiques de fixation du cyanure sur la Ngb WT et ses variants le rôle potentiel que joue cette corrélation entre le positionnement de l'hème, son environnement et le pont disulfure, sur la réactivité de la protéine.

## **Chapitre V : Etude de la fixation du cyanure**





Il a été discuté en chapitre I que la fonction de la Ngb pourrait impliquer sa capacité à fixer des ligands externes. Durant la thèse, nous nous sommes alors intéressés à la capacité de la Ngb à fixer le ligand cyanure en fonction des mutations présentées au Chapitre III et de la présence du pont disulfure. Le cyanure a été choisi car des études (A. Bocahut et al., 2013; Du et al., 2003) ont montré que sa cinétique de fixation était suffisamment lente pour être étudiée par RMN, technique qui permet de distinguer les deux formes isomères de l'hème. Après avoir établi les équations de cinétiques pour les différentes techniques utilisées, le premier objectif a été de comparer les résultats obtenus avec les différentes techniques de mesure afin de valider les équations de cinétiques. Le but est notamment de mettre en évidence la dépendance des équations à la présence des deux formes isomères de l'hème en comparant la RMN et la spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps. Ensuite, l'effet des mutations et de la présence du pont disulfure a été analysé.

## A. Modèle cinétique

Dans cette partie, les équations de cinétiques utilisées selon les techniques sont présentées. L'objectif est de pouvoir corréler les résultats obtenus pour les différentes analyses.

### 1. Modèle cinétique général de fixation du cyanure sur la Ngb

Les formules mathématiques ont été établies à partir du schéma réactionnel le plus général (Figure V. 1), déjà introduit au chapitre I. Ce modèle est valable pour les deux formes isomères de l'hème. Il comprend deux étapes réversibles. La première est la dissociation de l'histidine distale pour obtenir une forme pentacoordinée de l'hème, appelée Ngb<sub>penta</sub>. Elle est caractérisée par deux constantes d'association  $k_{on,His}$  et de dissociation  $k_{off,His}$ . La deuxième étape est la fixation du cyanure sur la forme pentacoordinée. Elle est définie par deux constantes d'association  $k_{on,CN}$  et de dissociation  $k_{off,CN}$ .

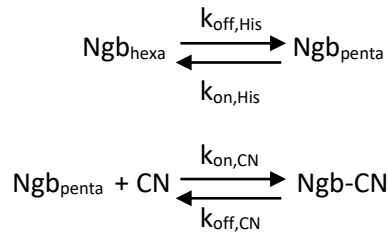


Figure V. 1- Schéma réactionnel de la fixation du cyanure sur la Ngb WT.

L'exploitation mathématique de ce schéma réactionnel passe tout d'abord par la considération de plusieurs hypothèses.

La première hypothèse consiste à négliger la présence de la forme Ngb<sub>penta</sub> en solution par rapport à la forme Ngb<sub>hexa</sub>. Il a été montré (S. Dewilde et al., 2001) que la constante  $k_{on,His}$ , de l'ordre de  $2000 \text{ s}^{-1}$  est très grande devant la constante  $k_{off,His}$ , de l'ordre de  $4,5 \text{ s}^{-1}$ . Ainsi la forme Ngb<sub>hexa</sub> demeure majoritaire en solution.

En deuxième hypothèse, il est postulé que la variation de la concentration en cyanure au cours de la réaction est négligeable au regard de la variation de la concentration en Ngb<sub>hexa</sub>. En effet, les expériences ont toutes été réalisées avec un excès de cyanure par rapport à la concentration en Ngb.

Ces hypothèses permettent d'effectuer l'approximation de l'état quasi-stationnaire (AEQS) sur la concentration en Ngb<sub>penta</sub>. Ceci donne l'expression :

$$\begin{aligned}
 \frac{d[\text{Ngb}_{\text{penta}}]}{dt} &= 0 \\
 &= k_{\text{off,His}}[\text{Ngb}_{\text{hexa}}] + k_{\text{off,CN}}[\text{Ngb} - \text{CN}] - k_{\text{on,His}}[\text{Ngb}_{\text{penta}}] - k_{\text{on,CN}}[\text{CN}][\text{Ngb}_{\text{penta}}]
 \end{aligned} \quad \text{Equation V. 1}$$

$$[\text{Ngb}_{\text{penta}}] = \frac{k_{\text{off,His}}[\text{Ngb}_{\text{hexa}}] + k_{\text{off,CN}}[\text{Ngb} - \text{CN}]}{k_{\text{on,His}} + k_{\text{on,CN}}[\text{CN}]} \quad \text{Equation V. 2}$$

L'expression de la variation de la concentration en  $\text{Ngb}_{\text{hexa}}$  au cours du temps est :

$$\frac{d[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]}{dt} = k_{\text{on,His}}[\text{Ngb}_{\text{penta}}] - k_{\text{off,His}}[\text{Ngb}_{\text{hexa}}] \quad \text{Equation V. 3}$$

Le principe de conservation de la matière fait qu'à tout instant  $t$ ,  $[\text{Ngb}]_{\text{tot},t} = [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0 = [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_t + [\text{Ngb}_{\text{CN}}]_t$  en négligeant la concentration en  $\text{Ngb}_{\text{penta}}$ . En utilisant les équations V. 2 et V. 3 puis en intégrant, il est alors possible d'établir l'expression de l'évolution de la concentration en  $\text{Ngb}_{\text{hexa}}$  au cours du temps :

$$[\text{Ngb}_{\text{hexa}}] = \frac{k_{\text{off,His}}k_{\text{on,CN}}[\text{CN}][\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0}{k_{\text{off,His}}k_{\text{on,CN}}[\text{CN}] + k_{\text{off,CN}}k_{\text{on,His}}} e^{-\frac{k_{\text{off,His}}k_{\text{on,CN}}[\text{CN}] + k_{\text{off,CN}}k_{\text{on,His}}}{k_{\text{on,His}} + k_{\text{on,CN}}[\text{CN}]}t} + \frac{k_{\text{off,CN}}k_{\text{on,His}}[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0}{k_{\text{off,His}}k_{\text{on,CN}}[\text{CN}] + k_{\text{off,CN}}k_{\text{on,His}}} \quad \text{Equation V. 4}$$

Le terme  $[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0$  représente la concentration initiale en  $\text{Ngb}$ . Pour simplifier cette expression, les paramètres  $k_1$  et  $k_2$  ont été introduites telles que :

$$k_1 = \frac{k_{\text{off,His}}k_{\text{on,CN}}[\text{CN}]}{k_{\text{on,His}} + k_{\text{on,CN}}[\text{CN}]} \quad \text{Equation V. 5}$$

$$k_2 = \frac{k_{\text{off,CN}}k_{\text{on,His}}}{k_{\text{on,His}} + k_{\text{on,CN}}[\text{CN}]} \quad \text{Equation V. 6}$$

L'équation V. 4 s'écrit alors :

$$[\text{Ngb}_{\text{hexa}}] = \frac{k_1[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0}{k_1 + k_2} e^{-(k_1 + k_2)t} + \frac{k_2[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0}{k_1 + k_2} \quad \text{Equation V. 7}$$

Par conséquent, comme à tout instant  $t$  :  $[\text{Ngb}_{\text{CN}}]_t = [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0 - [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_t$ , il vient

$$[\text{Ngb} - \text{CN}] = \frac{k_1[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_0}{k_1 + k_2} (1 - e^{-(k_1 + k_2)t}) \quad \text{Equation V. 8}$$

Les équations V. 7 et V. 8 sont les formules générales de l'évolution des concentrations en  $\text{Ngb}_{\text{hexa}}$  et  $\text{Ngb-CN}$ . Elles sont valables pour les deux formes isomères de la  $\text{Ngb}$ . Afin de les différencier par la suite, le couple de paramètres  $(k_{1,A}, k_{2,A})$  se rapportera à la forme isomère A et le couple  $(k_{1,B}, k_{2,B})$  se rapportera à la forme isomère B.

## 2. Expression des concentrations en fonction du temps en RMN

En RMN l'attribution des signaux permet de distinguer les deux formes isomères de l'hème. En particulier, dans la zone de 30 ppm à 40 ppm, il existe pour les différentes protéines, excepté la  $\text{Ngb H64V}$ , deux signaux spécifiquement attribuables aux deux formes isomères de l'hème hexacoordiné avec l'histidine distale. L'évolution de l'intensité de ces deux signaux peut être suivie afin d'analyser la cinétique de fixation du cyanure (A. Bocahut et al., 2013).

L'intensité de ces signaux est directement corrélée à la concentration en  $\text{Ngb}_{\text{hexa}}$  pour chaque forme isomère de l'hème. Il est donc possible d'écrire la relation suivante :

$$I(t) = \frac{k_1 I_0}{k_1 + k_2} e^{-(k_1 + k_2)t} + \frac{k_2 I_0}{k_1 + k_2} \quad \text{Equation V. 9}$$

Dans cette expression,  $I(t)$  désigne l'intensité du signal à un moment  $t$  donné et  $I_0$  l'intensité initiale du signal. Cette expression est valable pour les deux formes isomères de l'hème. Pour simplifier, les courbes obtenues ont été normalisées tel que  $I_0 = 1$ .

### 3. Expressions des concentrations en fonction du temps en UV-Visible

En spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps, l'exploitation du modèle cinétique est plus complexe. En effet, l'étude de la fixation d'un ligand sur l'hème se fait en suivant l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret, qui est caractéristique des propriétés de l'hème. Pour ce faire, les analyses sont réalisées en se plaçant à la longueur d'onde où l'absorbance de la bande de Soret est maximale. Le premier problème est que le spectre UV-Visible ne permet pas de différencier les deux formes isomères de l'hème. L'absorbance de la bande de Soret est la résultante des absorbances des deux formes isomères. Le second problème est que le déplacement en longueur d'onde entre les formes de Ngb sans cyanure et de Ngb avec du cyanure fixé est faible (Figure V. 2). La forme Ngb complexée avec le ligand participe donc à l'absorbance de la bande de Soret.

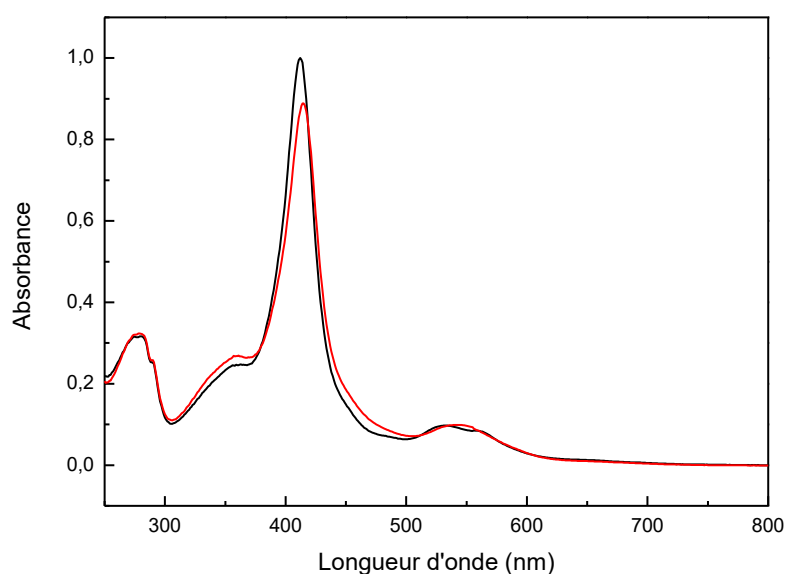


Figure V. 2- Spectres UV-Vis de la  $\text{Ngb WT}_{\text{ox}} + \text{CN}$  (0,5Mm) à  $t=0$  (noir) et à  $t=1330$  min (rouge). La réaction a lieu dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4. La température est contrôlée à 25 °C par un bain thermostaté.

L'équation mathématique à établir dans le cadre des études en UV-Visible résolues en temps doit donc tenir compte de la présence des deux formes isomères de l'hème et du mélange des formes avec cyanure et sans cyanure. Elle ne tient en revanche pas compte de la concentration en Ngb pentacoordinée qui est négligeable.

## Chapitre V : Etude de la fixation du cyanure

En considérant une longueur de trajet optique de 1 cm, le signal d'absorbance à longueur d'onde de la bande de Soret peut être défini par :

$$\begin{aligned} A_{\text{Soret}}(t) &= \varepsilon_1 * [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{tot}} + \varepsilon_2 * [\text{Ngb-CN}]_{\text{tot}} \\ &= \varepsilon_1 * [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{A}} + \varepsilon_2 * [\text{Ngb-CN}]_{\text{A}} + \varepsilon_1 * [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{B}} + \varepsilon_2 * [\text{Ngb-CN}]_{\text{B}} \end{aligned} \quad \text{Equation V. 10}$$

Les concentrations  $[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{A}}$  et  $[\text{Ngb-CN}]_{\text{A}}$  désignent respectivement les concentrations en Ngb hexacoordinée sans cyanure et en Ngb avec cyanure de la forme isomère A. De même,  $[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{B}}$  et  $[\text{Ngb-CN}]_{\text{B}}$  désignent respectivement les concentrations en Ngb hexacoordinée sans cyanure et en Ngb avec cyanure de la forme isomère B. Le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon_1$  est celui de la forme  $\text{Ngb}_{\text{hexa}}$  déterminé par la méthode de la pyridine hémochrome (Chapitre III, B.4). Le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon_2$  est celui de la forme Ngb-CN à 412 nm. C'est un paramètre inconnu.

En utilisant les équations V. 7, V. 8 et V. 10, il vient :

$$\begin{aligned} A_{\text{Soret}}(t) &= (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \frac{k_{1,\text{A}} [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{A}}}{k_{1,\text{A}} + k_{2,\text{A}}} e^{-(k_{1,\text{A}} + k_{2,\text{A}})t} + \frac{(\varepsilon_1 \times k_{2,\text{A}} + \varepsilon_2 \times k_{1,\text{A}}) [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{A}}}{k_{1,\text{A}} + k_{2,\text{A}}} \\ &\quad + (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \frac{k_{1,\text{B}} [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{B}}}{k_{1,\text{B}} + k_{2,\text{B}}} e^{-(k_{1,\text{B}} + k_{2,\text{B}})t} + \frac{(\varepsilon_1 \times k_{2,\text{B}} + \varepsilon_2 \times k_{1,\text{B}}) [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{B}}}{k_{1,\text{B}} + k_{2,\text{B}}} \end{aligned} \quad \text{Equation V. 11}$$

Il n'est pas possible d'estimer en UV-Visible les concentrations  $[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{A}}$  et  $[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{B}}$  mais elles sont définissables comme un ratio  $r_0$  de la concentration totale en  $\text{Ngb}_{\text{hexa}}$   $[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{tot}}$ .

$$[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{A}} = r_0 [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{tot}} \quad \text{Equation V. 12}$$

$$[\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{0,\text{B}} = (1 - r_0) [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{tot}} \quad \text{Equation V. 13}$$

En utilisant les équations V. 12 et V. 13 dans l'équation V. 11, il est possible de déterminer :

$$\begin{aligned} A_{\text{Soret}}(t) &= [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{tot}} \left[ r_0 \left( (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \frac{k_{1,\text{A}}}{k_{1,\text{A}} + k_{2,\text{A}}} e^{-(k_{1,\text{A}} + k_{2,\text{A}})t} + \frac{\varepsilon_1 \times k_{2,\text{A}} + \varepsilon_2 \times k_{1,\text{A}}}{k_{1,\text{A}} + k_{2,\text{A}}} \right) \right. \\ &\quad \left. + (1 - r_0) \left( (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \frac{k_{1,\text{B}}}{k_{1,\text{B}} + k_{2,\text{B}}} e^{-(k_{1,\text{B}} + k_{2,\text{B}})t} + \frac{\varepsilon_1 \times k_{2,\text{B}} + \varepsilon_2 \times k_{1,\text{B}}}{k_{1,\text{B}} + k_{2,\text{B}}} \right) \right] \end{aligned} \quad \text{Equation V. 14}$$

Cette expression est simplifiable en une équation de type bi-exponentielle classique :

$$A_{\text{Soret}}(t) = [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{tot}} [a_{\text{A}} e^{-k_{\text{A}}t} + a_{\text{B}} e^{-k_{\text{B}}t} + y_0] \quad \text{Equation V. 15}$$

Les expressions des différents paramètres intervenant dans cette équation sont les suivantes :

$$a_{\text{A}} = r_0 (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \frac{k_{1,\text{A}}}{k_{1,\text{A}} + k_{2,\text{A}}} \quad \text{Equation V. 16}$$

$$a_{\text{B}} = (1 - r_0) (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \frac{k_{1,\text{B}}}{k_{1,\text{B}} + k_{2,\text{B}}} \quad \text{Equation V. 17}$$

$$k_A = k_{1,A} + k_{2,A} \quad \text{Equation V. 18}$$

$$k_B = k_{1,B} + k_{2,B} \quad \text{Equation V. 19}$$

$$y_0 = r_0 \frac{\varepsilon_1 \times k_{2,A} + \varepsilon_2 \times k_{1,A}}{k_{1,A} + k_{2,A}} + (1 - r_0) \frac{\varepsilon_1 \times k_{2,B} + \varepsilon_2 \times k_{1,B}}{k_{1,B} + k_{2,B}} \quad \text{Equation V. 20}$$

Les paramètres  $a_A$ ,  $a_B$  et  $y_0$  ainsi exprimés sont assimilables à des coefficients d'extinction molaire et ont pour unité le  $M^{-1}.cm^{-1}$ . Les paramètres  $k_A$  et  $k_B$  sont des constantes cinétiques d'unité  $s^{-1}$ . Les paramètres ainsi déterminés ne sont pas indépendants les uns des autres. Cependant l'équation ainsi réduite permet de limiter les problèmes de paramétrisation rencontrés dans l'utilisation de modèles mathématiques pour déterminer les équations des courbes.

Les équations mathématiques ainsi construites ne sont pas exactement identiques entre les techniques utilisées. Cependant, l'ensemble des paramètres dans les différentes équations est dépendant de la concentration en cyanure. L'un des objectifs des expériences est donc de comparer les résultats obtenus pour les différentes techniques afin de valider les valeurs des paramètres déterminées.

## B. Cinétique de fixation du cyanure sur la Ngb WT<sub>ox</sub>

Ce chapitre comporte deux objectifs. La fixation du cyanure sur la Ngb WT a déjà été étudiée aussi bien en RMN (A. Bocahut et al., 2013; Du et al., 2003) qu'en spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps (Herold et al., 2004). Aussi, nous nous sommes intéressés à comparer nos résultats avec ceux de la littérature pour valider les méthodes de mesure et pour vérifier si le protocole de purification optimisé n'a aucune influence sur les expériences. De plus, nous nous sommes servis des mesures sur la Ngb WT pour déterminer les corrélations entre les modèles mathématiques des différentes méthodes de mesure.

### 1. Corrélation RMN et UV-Visible à une concentration de 0,5 mM en cyanure

La concentration de 0,5 Mm en cyanure est notre concentration de référence. A cette concentration la cinétique de fixation est suffisamment lente pour être suivie en RMN. Des mesures en RMN et en spectrophotométrie UV-Visible au cours du temps ont été réalisées à cette concentration en cyanure pour pouvoir comparer les résultats.

#### i. Résultats en RMN

Des expériences de cinétique de fixation du cyanure ont été réalisées avec des échantillons issus du protocole de purification avant et après son optimisation. Les courbes obtenues (Figure V. 3) pour les deux formes isomères sont semblables. La purification n'influe donc pas sur le comportement de la protéine.

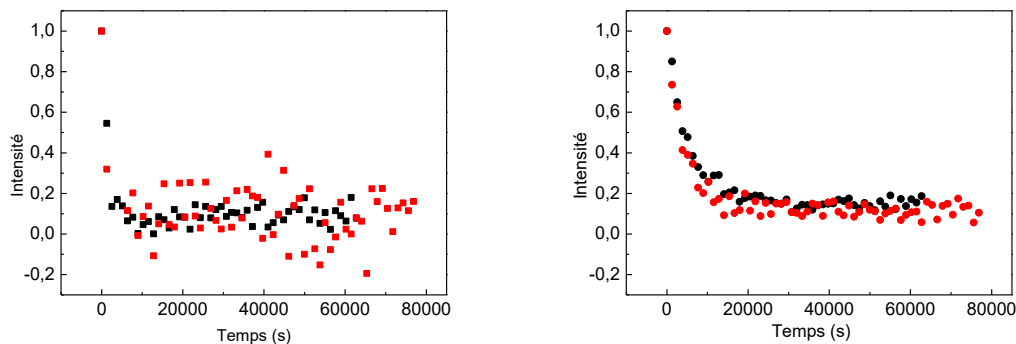


Figure V. 3- Courbes d'évolution de l'intensité du signal RMN en fonction du temps de la réaction de la forme isomère A de la Ngb WT<sub>ox</sub> avec du cyanure à 0,5 mM avant (carré noir) et après (carré rouge) optimisation du protocole de purification et de la forme isomère B de la Ngb WT<sub>ox</sub> avec du cyanure à 0,5 mM avant (rond noir) et après (rond rouge) optimisation du protocole de purification.

L'équation V. 9 déterminée en V.A.2 a été utilisée pour déterminer les valeurs des paramètres  $k_1$  et  $k_2$  pour les différents nuages de points (Tableau V. 1). Les paramètres  $k_1$  et  $k_2$  serviront par la suite à déterminer le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_2$  de la forme Ngb-CN.

La somme des paramètres  $k_1$  et  $k_2$  a été effectuée et a été convertie en minutes pour pouvoir être comparée à la littérature (A. Bocahut et al., 2013). Les valeurs obtenues de 92 minutes et 23 minutes respectivement pour les formes isomères B et A sont en accord avec les valeurs déjà déterminées de 97 minutes et 19 minutes respectivement.

	$k_1(s^{-1})$	$k_2(s^{-1})$	$k_1 + k_2 (s^{-1})$
Ngb WT <sub>ox</sub> -Isomère B	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(3,3 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
Ngb WT <sub>ox</sub> -Isomère A	$(6,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	$(5,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	$(7,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$

Tableau V. 1- Résultats des paramètres  $k_1$  et  $k_2$  donnés avec les écarts types pour les deux formes isomères de la Ngb WT<sub>ox</sub> dans la réaction avec du cyanure à 0,5 mM.

Ces résultats mettent en évidence une différence de réactivité pour les deux formes isomères vis-à-vis de la fixation du cyanure. La forme isomère A est plus efficace pour fixer ce ligand que la forme isomère B.

#### ii. Comparaison des résultats en RMN et en UV-Visible

La cinétique de fixation du cyanure à une concentration de 0,5 mM a également été effectuée en spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps (Figure V. 4). En comparant avec les résultats de RMN, l'objectif est de valider l'équation mathématique ajustée à l'UV-Visible du modèle cinétique de fixation du cyanure. La particularité de cette équation est qu'elle prend en compte la présence des deux formes isomères de l'hème.

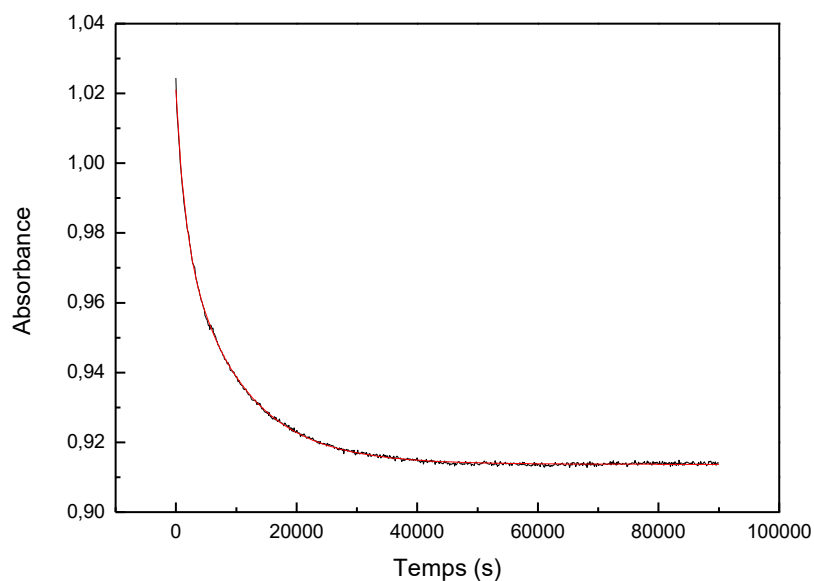


Figure V. 4- Courbe de l'évolution de l'absorbance d'une solution de Ngb WT<sub>ox</sub> (7 µM) en présence de cyanure à 0,5 mM en fonction du temps. La cinétique est réalisée dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 25 °C. La courbe représente l'évolution de l'absorbance de la bande de Soret à 412 nm. Le tracé de la courbe de tendance issue de l'Equation V. 15 est représenté en rouge.

La comparaison entre les modèles RMN et UV-Visible montre que les constantes  $k_A$  et  $k_B$  déterminées par le modèle UV-Visible devraient respectivement correspondre aux sommes des constantes  $k_{1,A} + k_{2,A}$  (Equation V. 18) de la forme isomère A et  $k_{1,B} + k_{2,B}$  (Equation V. 19) de la forme isomère B.

Les résultats mesurés en UV-Visible sont indiqués dans le Tableau V. 2. En considérant l'écart type, les valeurs obtenues pour la forme isomère A sont identiques. Il y a un petit écart entre les mesures pour la RMN et pour la spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps pour la forme isomère B. Cependant, en considérant les différences de caractéristiques entre les deux techniques et le traitement appliqué aux courbes, il n'est pas aberrant de constater une légère différence.

	RMN ( $k_1 + k_2$ ) ( $s^{-1}$ )	UV-Vis ( $k$ ) ( $s^{-1}$ )
Isomère A	$(7,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	$(6,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$
Isomère B	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$

Tableau V. 2- Comparaison des constantes de temps avec leurs écarts types entre RMN et spectrophotométrie UV-visible pour la cinétique de fixation du cyanure à 0,5 mM sur la Ngb WT<sub>ox</sub>.

Les résultats pour les constantes de temps entre la RMN et la spectrophotométrie UV-Visible sont donc comparables. Il est possible d'aller plus loin dans l'analyse en s'intéressant aux autres paramètres. Notamment, en utilisant les équations V. 16 à V. 20 et les constantes  $k_1$  et  $k_2$  déterminées en RMN, les constantes  $r_0$ , correspondant à la proportion de l'isomère A par rapport à la



concentration totale en Ngb, et  $\varepsilon_2$ , coefficient d'extinction molaire de la forme Ngb-CN, peuvent être déterminées.

- **Estimation du coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon_2$  de Ngb-CN**

La valeur  $\varepsilon_2$  peut être déterminée à partir des équations V. 16 et V. 17 en utilisant les valeurs des paramètres  $k_1$  et  $k_2$  déterminés par la RMN d'après la relation suivante :

$$\varepsilon_1 - \varepsilon_2 = \frac{a_A \times k_A}{k_{1,A}} + \frac{a_B \times k_B}{k_{1,B}} \quad \text{Equation V. 21}$$

Avec :

$\varepsilon_1 = 132000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , coefficient d'extinction molaire de la Ngb WT<sub>ox</sub> (Chapitre III, B.4)

$a_A, k_A, a_B, k_B$  : paramètres déterminés par l'ajustement du signal UV-Visible

$k_{1,A}, k_{1,B}$  : paramètres déterminés par l'ajustement du signal RMN

La valeur calculée avec écart type est de  $116000 \pm 4000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Cette valeur correspond bien à une diminution de l'absorbance de la bande de Soret lorsque le cyanure vient se fixer sur l'hème (Figure V. 2). Il est intéressant de comparer cette valeur à la valeur de  $y_0$ . En effet, d'après l'équation V. 15, à un temps infini, l'équation devient :

$$A_{Soret}(t = \infty) = y_0 \times [\text{Ngb}_{\text{hexa}}]_{\text{tot}} \quad \text{Equation V. 22}$$

Ainsi cette constante  $y_0$  est assimilable à un coefficient d'extinction molaire. La valeur moyenne obtenue par l'ajustement du signal UV-Visible est de  $116000 \pm 2500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Les valeurs de  $\varepsilon_2$  et  $y_0$  sont donc identiques. Cela va dans le sens d'une réaction totale. A temps très long, le coefficient d'extinction molaire de l'espèce en solution responsable de l'absorbance de la bande de Soret est égal à celui de la forme Ngb-CN. Dans le cas contraire, une valeur de  $y_0$  supérieure à celle de  $\varepsilon_2$  devrait être trouvée.

- **Estimation de la proportion  $r_0$  de l'isomère A**

La valeur de  $r_0$  est calculée en utilisant la relation suivante :

$$r_0 = \frac{a_A \times k_A}{k_{1,A} \times (\varepsilon_1 - \varepsilon_2)} \quad \text{Equation V. 23}$$

La valeur de  $r_0$  est de  $0,47 \pm 0,08$ . Ceci indique qu'il y a un ratio moyen de 47 % de forme isomère A en solution. En RMN, la valeur moyenne déterminée sur l'ensemble des cinétiques de la Ngb WT<sub>ox</sub> est de  $0,48 \pm 0,04$  de forme isomère A. Les proportions sont donc comparables entre les deux techniques, alors que la concentration en protéine est environ 15 fois supérieure en RMN. La concentration en protéine ne semble donc pas influencer sur le ratio des deux formes isomères.

Grâce à la comparaison entre les résultats de RMN et de spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps, il a été possible de valider un modèle cinétique en bi-exponentielle pour la spectrophotométrie UV-Visible car les résultats obtenus sont identiques. Chaque exponentielle est

donc attribuable à une forme isomère de l'hème. La comparaison des modèles RMN et UV-Visibles permet également de déterminer différentes grandeurs propres au système étudié. Ainsi le coefficient d'extinction molaire de la Ngb-CN a été calculé à  $116000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  à 412 nm. C'est une valeur plus élevée que celle de  $96000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  déterminée par Herold et al. (Herold et al., 2004) mais nous ne sommes pas exactement à la même longueur d'onde. Cependant elle reste inférieure au coefficient d'extinction molaire de la Ngb WT<sub>ox</sub>. La proportion de chaque forme isomère a également pu être évaluée. Elle est d'environ 50/50 et est comparable entre les deux techniques, malgré une large différence en concentration. Enfin la valeur obtenue pour  $y_0$  indique que la réaction a un caractère total à 0,5 mM en cyanure. La validation du modèle cinétique en UV-Visible permet de réaliser des cinétiques en faisant varier la concentration en cyanure sur une large gamme. Ceci n'est pas possible en RMN car les cinétiques deviennent, au-delà d'une concentration de 0,5 mM en cyanure, trop rapides pour être suivie correctement.

## 2. Influence de la concentration en cyanure sur la cinétique de fixation du cyanure

### i. Spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps

Des expériences ont d'abord été réalisées en spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible classique. Le but est d'établir des mesures pour des concentrations en cyanure aux cinétiques trop rapides pour être suivie en RMN mais trop lentes pour être suivies avec un montage de stopped-flow. Les expériences ont été réalisées pour des concentrations de 7 mM, 12 mM et 25 mM en cyanure.

L'évolution des constantes cinétiques  $k_A$  et  $k_B$  en fonction de [CN] ont été reportées en Figure V. 5. Les résultats déterminés pour une concentration de 0,5 mM en cyanure ont aussi été ajoutés. Les évolutions de  $k_A$  et  $k_B$  peuvent être modélisées par une droite.

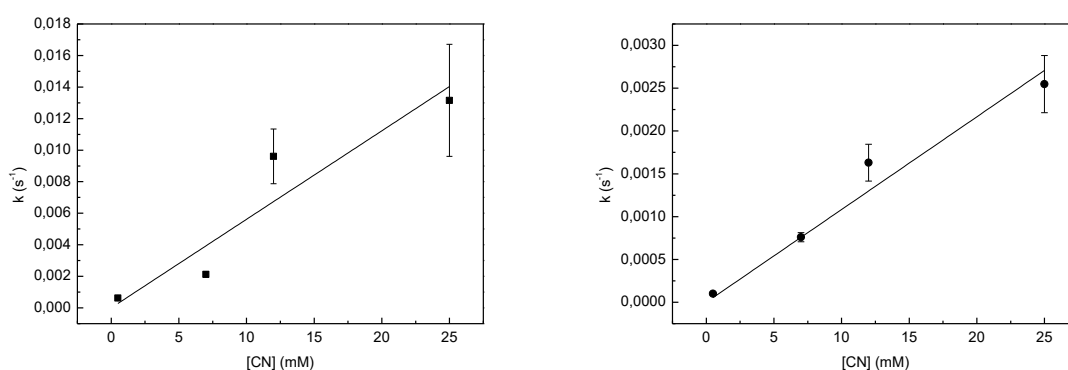


Figure V. 5- Evolution des constantes cinétiques  $k_A$  (carré noir à gauche) et  $k_B$  (rond noir à droite) en fonction de la concentration en cyanure. Les droites des régressions linéaires sont représentées

L'écart type devient plus important lorsque la concentration en cyanure augmente, notamment pour  $k_A$ . A 12 mM et 25 mM en cyanure, ce sont les limites de performance, au niveau du nombre de points acquis par unité de temps, du spectrophotomètre classique qui sont à l'origine des barres d'erreur plus grandes. Il faut donc utiliser un montage de stopped-flow pour les concentrations plus élevées.

ii. Utilisation d'un montage stopped-flow

Il a d'abord fallu s'assurer que les résultats obtenus en stopped-flow soient comparables avec les mesures faites avec le spectrophotomètre classique. Pour cela, les résultats pour une concentration de 25 mM en cyanure ont été comparés entre les mesures effectuées en spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps avec un spectrophotomètre classique et avec un montage de stopped-flow. Les valeurs obtenues sont légèrement différentes (Tableau V. 3). Mais elles sont du même ordre grandeur. Compte tenu des limitations techniques du spectrophotomètre classique, il a été considéré que les mesures entre les deux techniques correspondaient.

	$k_A$ ( $s^{-1}$ )	$k_B$ ( $s^{-1}$ )
[CN] = 25 mM - spectrophotomètre classique	$0,013 \pm 0,004$	$0,0025 \pm 0,0003$
[CN] = 25 mM - stopped-flow	$0,023 \pm 0,003$	$0,0042 \pm 0,0004$

Tableau V. 3- Comparaison des résultats obtenus, avec leurs écarts types, pour  $k_A$  et  $k_B$  à une concentration de 25 mM en cyanure avec un spectrophotomètre classique et un montage de stopped-flow.

Des mesures ont été effectuées pour des concentrations de 25 mM, 175 mM, 300 mM et 415 mM en cyanure. En tenant compte du facteur de dilution intrinsèque au montage de stopped-flow, l'évolution des constantes  $k_A$  et  $k_B$  a été ajoutée à celles déterminées avec le spectrophotomètre classique. L'allure obtenue correspond à une évolution linéaire (Figure V. 6).

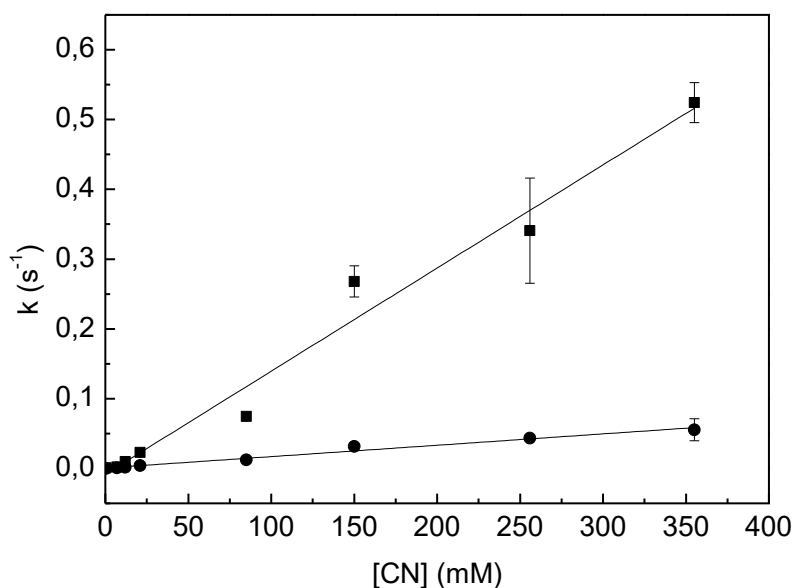


Figure V. 6- Evolution des constantes cinétiques  $k_A$  (carré noir) et  $k_B$  (rond noir) en fonction de la concentration en cyanure. Les droites des droites des régressions linéaires de  $k_A$  et  $k_B$  sont représentées.

## Chapitre V : Etude de la fixation du cyanure

D'après les équations V. 5, V. 6, V. 18 et V. 19, les constantes  $k_A$  et  $k_B$  ne sont normalement pas linéairement dépendantes de la concentration en cyanure. En effet leur expression générale est de la forme :

$$k = \frac{k_{off,HIS}k_{on,CN}[CN] + k_{off,CN}k_{on,HIS}}{k_{on,HIS} + k_{on,CN}[CN]} \quad \text{Equation V. 24}$$

La linéarité ne s'obtient que si la condition suivante est respectée :  $k_{on,HIS} \gg k_{on,CN}[CN]$  ce qui signifie que la fixation du cyanure est l'étape limitante. L'expression générale, pour chaque forme isomère des constantes  $k_A$  et  $k_B$  devient alors de la forme :

$$k = \frac{k_{off,HIS}k_{on,CN}[CN]}{k_{on,HIS}} + k_{off,CN} \quad \text{Equation V. 25}$$

La constante de second ordre, extraite par régression linéaire à partir des courbes présentées en Figure V. 6 de  $k_A$  et  $k_B$  est définie par :

$$p = \frac{k_{off,HIS}k_{on,CN}}{k_{on,HIS}} \quad \text{Equation V. 26}$$

Les constantes de second ordre calculées pour les isomères A et B respectivement ont les valeurs suivantes présentées avec écart type :

$$p_A = 1,48 \pm 0,09 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$p_B = 0,16 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Ces deux valeurs sont proches de celles de la littérature de  $1,65 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $0,37 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Herold et al., 2004).

L'équation V. 25 indique de plus que l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire correspond à la valeur de  $k_{off,CN}$ . Les valeurs déterminées avec écart type pour chaque forme isomère sont :

$$k_{off,CN,A} = (7 \pm 15) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{off,CN,B} = (-8 \pm 15) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

La valeur négative n'a pas de sens physique réel. Mais avec l'écart type, il est possible d'approximer que la valeur de  $k_{off,CN,B}$  est inférieure à  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  au total. Ces valeurs de  $k_{off,CN}$  proches de 0 confirment que la réaction de fixation du cyanure est une réaction totale.

Une valeur moyenne de  $y_0$  peut être calculée à partir des ajustements réalisés pour chaque concentration en cyanure. La valeur moyenne déterminée est constante sur l'ensemble de la gamme de concentrations en cyanure et vaut  $116000 \pm 4000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Cette valeur est donc identique au  $\epsilon_2 = 116000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  déterminé à la concentration de 0,5 mM en cyanure, ce qui va aussi dans le sens d'une réaction totale.

A partir des paramètres d'ajustement  $a_A$ ,  $a_B$ ,  $k_A$ ,  $k_B$  il est possible de déterminer les valeurs de  $k_{1,A}$  et  $k_{1,B}$  à chaque concentration en cyanure. Les paramètres  $r_0$  et  $\epsilon_2$  sont considérés constants

## Chapitre V : Etude de la fixation du cyanure

et ont pour valeur 0,5 et 116000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> respectivement. Pour chaque concentration en cyanure, en utilisant les équations V. 15, V. 16, V. 17 et V. 18, il vient alors :

$$k_{1,A} = \frac{a_A \times k_A}{r_0(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)} \quad \text{Equation V. 27}$$

$$k_{1,B} = \frac{a_B \times k_B}{(1-r_0)(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)} \quad \text{Equation V. 28}$$

[CN] (Mm)	$k_{1,A}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_A$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{1,B}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_B$ (s <sup>-1</sup> )
0,5	$(6 \pm 4) \cdot 10^{-4}$	$(6,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(1,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
7	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-3}$	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$	$(5 \pm 3) \cdot 10^{-4}$	$(6,7 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$
12	$(9 \pm 5) \cdot 10^{-3}$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$(3 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$
21	$(2 \pm 2) \cdot 10^{-2}$	$(1,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-2}$	$(4 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	$(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$
85	$(1,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-1}$	$(7,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-2}$	$(8 \pm 5) \cdot 10^{-3}$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$
150	$(4 \pm 2) \cdot 10^{-1}$	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-1}$	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-2}$	$(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-2}$
256	$(5 \pm 3) \cdot 10^{-1}$	$(3,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-1}$	$(1 \pm 1) \cdot 10^{-2}$	$(4,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$
355	$(6 \pm 3) \cdot 10^{-1}$	$(5,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-1}$	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-2}$	$(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$

**Tableau V. 4- Comparaison des paramètres  $k_{1,A}$ ,  $k_A$ ,  $k_{1,B}$ ,  $k_B$  avec leurs écarts types en fonction de la concentration en cyanure.**

Les résultats des calculs pour  $k_{1,A}$  et  $k_{1,B}$  ont été comparés respectivement à  $k_A$  et  $k_B$  (Tableau V. 4). Il ressort que pour chaque concentration en cyanure et chaque isomère, la constante  $k_1$  a la même valeur que la constante  $k$  malgré un écart type élevé pour  $k_1$ . Cela implique que la constante cinétique  $k_2$  est proche de 0 pour chaque forme isomère. Or l'expression de la constante  $k_2$  (Equation V. 6) en tenant compte de l'hypothèse  $k_{on,HIS} \gg k_{on,CN}[CN]$  peut être approximée à  $k_{off,CN}$ . Ces résultats sont donc cohérents avec les valeurs de  $k_{off,CN}$  déterminées d'après les valeurs de l'ordonnée à l'origine des courbes en Figure V. 6.

- **Résumé**

La fixation du ligand CN sur la Ngb WT<sub>ox</sub> a été étudiée par spectrophotométrie UV-Visible et par RMN. Les équations cinétiques ont été établies pour les deux techniques.

- Les paramètres cinétiques obtenus avec les deux techniques sont concordants. Ainsi les deux composantes du signal obtenu en UV-Visible correspondent à la fixation du CN sur les deux formes isomères de l'hème.
- Le ratio des deux formes isomères A et B est identique pour des concentrations de 7  $\mu$ M et 100  $\mu$ M. La concentration de la protéine n'a donc pas d'influence sur les proportions des formes isomères.
- Les constantes cinétiques sont plus élevées pour la forme isomère A, qui fixe donc le CN plus rapidement que la forme isomère B.

Les modèles cinétiques étant déterminés, nous allons pouvoir nous intéresser à l'effet des mutations en comparant les résultats obtenus pour les variants avec ceux de la Ngb WT<sub>ox</sub>.

## C. Effet des mutations sur la fixation du cyanure

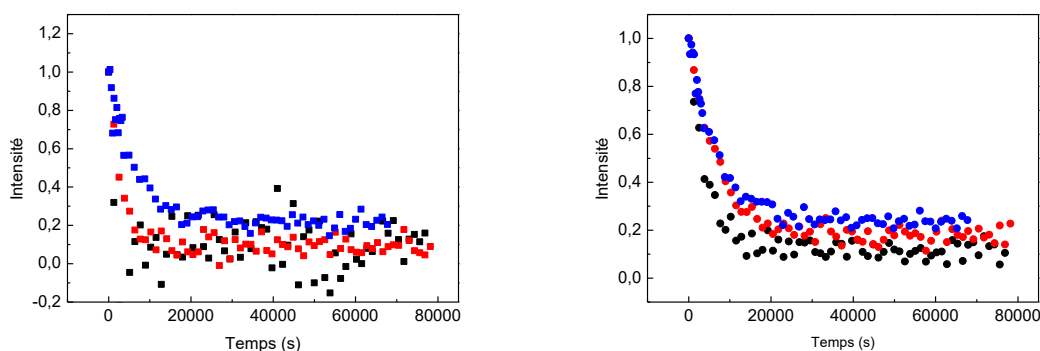
Dans cette partie, les résultats de la cinétique de fixation du cyanure, pour différentes concentrations en cyanure, sont présentés pour la Ngb A90P<sub>ox</sub>, Ngb F106L<sub>ox</sub>, et la Ngb H64V<sub>ox</sub>. L'objectif est de déterminer l'effet de ces mutations sur la cinétique de fixation de ligands en comparant les résultats obtenus à ceux de la Ngb WT. Nous allons tout d'abord discuter des résultats obtenus en RMN pour une concentration de 0,5 mM en cyanure. Comme il a été introduit pour la Ngb WT<sub>ox</sub>, cette technique présente l'avantage d'analyser séparément la réactivité des deux formes isomères de l'hème. L'influence de la concentration en cyanure sera ensuite analysée au travers des expériences réalisées en UV-Visible.

### 1. Effet des mutations A90P et F106L

Dans cette partie, les résultats obtenus pour les cinétiques de fixation du cyanure sur les variants Ngb A90P et Ngb F106L sont présentés. En raison d'une réactivité très différente, les résultats obtenus pour la Ngb H64V seront présentés ultérieurement.

#### i. Etude par RMN

Les courbes de l'évolution de l'intensité en fonction du temps pour chaque forme isomère présentent la même allure générale (Figure V. 7). Dans le cas de la forme isomère A, les courbes de la Ngb WT<sub>ox</sub> et de la Ngb A90P<sub>ox</sub> semble avoir la même allure. La courbe de la Ngb F106L<sub>ox</sub> présente une décroissance plus lente. L'intensité finale est également plus élevée pour la Ngb F106L<sub>ox</sub>. Pour la forme isomère B, la Ngb WT<sub>ox</sub> présente une décroissance un peu plus rapide que la Ngb A90P<sub>ox</sub> et la Ngb F106L<sub>ox</sub>. La Ngb A90P<sub>ox</sub> semble ensuite présenter une décroissance légèrement plus rapide que la Ngb F106L<sub>ox</sub>. De même que pour la forme isomère A, la valeur de l'intensité finale est plus élevée pour la Ngb F106L<sub>ox</sub>.



**Figure V. 7- Courbes d'évolution de l'intensité en fonction du temps de la réaction de fixation du cyanure à 0,5 mM. A gauche : forme isomère A de la Ngb WT<sub>ox</sub> (carré noir), de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (carré rouge) et de la Ngb F106L<sub>ox</sub> (carré bleu). A droite : forme isomère B de la Ngb WT<sub>ox</sub> (rond noire), de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (rond rouge) et de la Ngb F106L<sub>ox</sub> (rond bleu). Les expériences sont réalisées avec 100  $\mu$ M de protéine dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 25 °C.**

Les résultats des constantes  $k_{1,A} + k_{2,A}$  et  $k_{1,B} + k_{2,b}$  entre la Ngb WT<sub>ox</sub>, la Ngb A90P<sub>ox</sub> et la Ngb F106L<sub>ox</sub> ont aussi été comparés (Tableau V. 5). Pour la forme isomère A, la Ngb WT<sub>ox</sub> possède la constante de fixation la plus élevée. La Ngb A90P<sub>ox</sub> possède une constante plus faible d'un facteur 2

## Chapitre V : Etude de la fixation du cyanure

environ et la Ngb F106L<sub>ox</sub> d'un facteur 6 environ. En revanche pour la forme isomère B, les constantes de fixation des trois protéines ne présentent pas de différences significatives en tenant compte des écarts types. La Ngb WT<sub>ox</sub> présente également l'écart le plus important entre les réactivités des formes isomères A et B avec une forme isomère A environ 4 fois plus réactive. La forme isomère A de la Ngb A90P<sub>ox</sub> est seulement 2,5 fois plus réactive environ que la forme isomère B. La Ngb F106L<sub>ox</sub> n'a pas de différence de réactivité entre ses deux formes isomères.

	$k_{1,A} + k_{2,A} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{1,B} + k_{2,b} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Ngb WT <sub>ox</sub>	$(7,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
Ngb A90P <sub>ox</sub>	$(3,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
Ngb F106L <sub>ox</sub>	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$

**Tableau V. 5- Constantes de fixation du cyanure (C = 0,5 mM) et leurs écarts types déterminées en RMN pour les formes isomères A et B de la Ngb WT<sub>ox</sub>, la Ngb A90P<sub>ox</sub> et la Ngb F106L<sub>ox</sub>.**

Les résultats de RMN donnent un premier aperçu des effets des mutations. Ils permettent de dégager deux effets.

D'un point de vue impact sur la réactivité de chaque forme isomère, il apparaît que la forme isomère A subit plus l'effet des mutations que la forme isomère B. Les deux mutations entraînent une diminution de la réactivité de la forme isomère A, avec un effet plus marqué pour la Ngb F106L<sub>ox</sub> que pour la Ngb A90P<sub>ox</sub>. En revanche la forme isomère B n'est pas sensible aux mutations.

Par suite, la différence de réactivité entre les deux formes est également modifiée. La forme isomère A présente une réactivité plus élevée chez la Ngb WT<sub>ox</sub> que la forme isomère B. Cette réactivité devient presque aussi réactive que la forme isomère B chez la Ngb A90P<sub>ox</sub> et aussi réactive chez la Ngb F106L<sub>ox</sub>.

Les analyses UV-Visible de l'évolution des constantes cinétiques en fonction de la concentration en cyanure, vont permettre de compléter l'effet des mutations par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>.

### ii. Influence de la concentration en cyanure

Comme pour la Ngb WT<sub>ox</sub>, nous nous sommes d'abord intéressés à la comparaison entre les résultats obtenus en RMN et UV-Visible à 0,5 mM en cyanure. Cependant, pour les deux variants, l'utilisation du modèle en bi-exponentielle (Equation V. 15) pour déterminer la courbe d'ajustement donne des résultats possédant de grands écarts types qui semblent indiquer que le modèle mathématique n'est pas adapté. L'analyse des résultats en RMN montre que pour les deux variants, les valeurs des constantes cinétiques sont relativement proches. De plus, d'après les spectres RMN des variants, le ratio des populations de chaque forme isomère est quasiment de 50/50. Il est donc possible que le logiciel présente un problème d'ajustement des courbes en n'arrivant pas à distinguer



la part des deux formes isomères. Afin de vérifier cette hypothèse, un modèle mathématique en mono-exponentielle (Equation V. 29) a été testé pour les analyses à 0,5 mM en cyanure. Ce modèle représente un schéma réactionnel où la protéine présente deux formes isomères de réactivités et de populations égales.

$$A_{Soret}(t) = [Ngb_{hexa}]_{tot}[ae^{-kt} + y_0] \quad \text{Equation V. 29}$$

Les expressions des différents paramètres intervenant dans cette équation sont les suivantes :

$$a = (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \frac{k_1}{k_1 + k_2} \quad \text{Equation V. 30}$$

$$k = k_1 + k_2 \quad \text{Equation V. 31}$$

$$y_0 = \frac{\varepsilon_1 \times k_2 + \varepsilon_2 \times k_1}{A_1 + C_1} \quad \text{Equation V. 32}$$

Les analyses des courbes avec le modèle en mono-exponentielle donnent des résultats valides avec des valeurs moyennes du coefficient de détermination  $R^2$  supérieures 0,99. Par comparaison, les analyses avec le même modèle sur les courbes de la Ngb WT<sub>ox</sub> donnent en moyenne un  $R^2$  de 0,9781. Les résultats pour la Ngb WT<sub>ox</sub> montrent donc clairement que le modèle en mono-exponentielle n'est pas adapté pour analyser les courbes UV-Visibles. Les valeurs obtenues pour la Ngb A90P<sub>ox</sub> et la Ngb F106L<sub>ox</sub> à 0,5 mM en UV-Visible avec le modèle en mono-exponentielle sont comparables aux constantes obtenues en RMN (Annexe K).

Par suite, avec l'augmentation de la concentration en cyanure, l'écart entre les constantes  $k_A$  et  $k_B$  du modèle en bi-exponentielle augmente. Le logiciel parvient donc à distinguer la part des deux formes isomères pour l'ajustement des courbes. Les évolutions des constantes cinétiques pour chaque forme isomère pour les différents variants sont reportées ci-dessous (Figure V. 8).

Les évolutions de  $k_A$  et  $k_B$  pour la Ngb A90P<sub>ox</sub> sont linéaires. En revanche, pour la Ngb F106L<sub>ox</sub>, deux phases linéaires distinctes sont observables aussi bien pour  $k_A$  que pour  $k_B$ . Elles se rejoignent à une concentration critique de cyanure d'environ 150 mM.

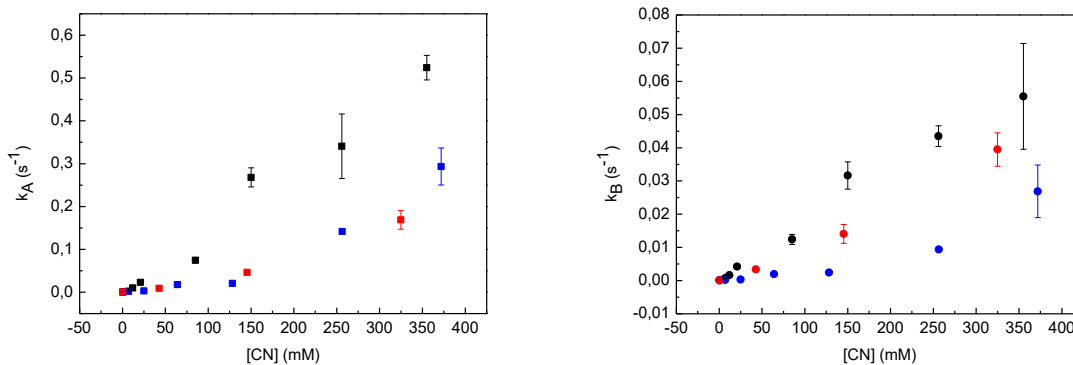


Figure V. 8- Evolution des constantes cinétiques  $k_A$  (à gauche) et  $k_B$  (à droite) en fonction de la concentration en cyanure pour la Ngb WT<sub>ox</sub> (en noir), la Ngb A90P<sub>ox</sub> (en rouge) et la Ngb F106L<sub>ox</sub> (en bleu).

## Chapitre V : Etude de la fixation du cyanure

La comparaison des évolutions des paramètres  $k_A$  et  $k_B$  de la Ngb A90P<sub>ox</sub> et de la Ngb F106L<sub>ox</sub> avec la Ngb WT<sub>ox</sub> permet de dégager quelques tendances. Pour la constante  $k_A$ , la Ngb WT<sub>ox</sub> possède l'évolution la plus forte en fonction de la concentration en cyanure. Par comparaison, les valeurs des constantes  $k_A$  de la Ngb A90P<sub>ox</sub> et de la Ngb F106L<sub>ox</sub> sont plus faibles en tout point que les valeurs de  $k_A$  de la Ngb WT. Cependant, la pente de la deuxième phase de la cinétique de fixation de la Ngb F106L, comprise entre 150 mM et 400 mM en cyanure, semble quasiment parallèle à la pente de la Ngb WT<sub>ox</sub> dans la même zone de concentration. Pour la constante  $k_B$ , les trois protéines ont des évolutions de  $k_B$  plus proches en fonction de la concentration en cyanure. Enfin, pour les trois protéines, l'évolution de la constante  $k_A$  en fonction de la concentration est plus forte que l'évolution de la constante  $k_B$ .

Les valeurs de  $p_A$  et  $p_B$  des coefficients directeurs des droites des différentes constantes en fonction de la concentration en cyanure sont comparées (Tableau V. 6). Les résultats concordent avec les observations faites pour les courbes. Pour la forme isomère A, la Ngb WT<sub>ox</sub> possède le coefficient directeur le plus élevé. Par comparaison, le coefficient directeur de la Ngb A90P<sub>ox</sub> est environ 3 fois plus faible. La Ngb F106L<sub>ox</sub> a un coefficient directeur nettement plus faible, d'un facteur 8,7 environ, sur la gamme de concentration de 0 mM à 150 mM en cyanure. En revanche, au-delà de 150 mM en cyanure, la valeur du coefficient directeur de la forme isomère A est proche de celle de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Une observation similaire peut être faite pour la forme isomère B. Sur la gamme de concentration en cyanure de 0 mM à 150 mM, le coefficient directeur de la Ngb F106L<sub>ox</sub> est environ 8 fois plus faible que celui de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Par contre, au-delà de 150 mM en cyanure, il devient quasiment égal à celui de la Ngb WT<sub>ox</sub>. D'une façon générale, les trois protéines présentent des valeurs proches les unes des autres pour  $p_B$ .

	$p_A$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	$p_B$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )
Ngb WT <sub>ox</sub>	1,48 ± 0,09	0,16 ± 0,01
Ngb A90P <sub>ox</sub>	0,53 ± 0,06	0,12 ± 0,01
Ngb F106L <sub>ox</sub>	$p_{1,A} = 0,17 \pm 0,04$ $p_{2,A} = 1,12 \pm 0,11$	$p_{1,B} = 0,020 \pm 0,004$ $p_{2,B} = 0,10 \pm 0,03$

**Tableau V. 6- Comparaison des constantes  $p_A$  et  $p_B$  avec leurs écarts types de la Ngb WT<sub>ox</sub>, de la Ngb A90P<sub>ox</sub> et de la Ngb F106L<sub>ox</sub>.**

Le premier point important mis en évidence avec ces observations en UV-Visible est la confirmation que les mutations A90P<sub>ox</sub> et F106L<sub>ox</sub> affectent peu la réactivité de la forme isomère B. La Ngb A90P<sub>ox</sub> sur l'ensemble des concentrations et la Ngb F106L<sub>ox</sub>, pour des concentrations en cyanure supérieures à 150 mM, présentent un coefficient directeur  $p_B$  proche de celui de la Ngb WT<sub>ox</sub>, compris entre 0,10 et 0,16  $M^{-1}.s^{-1}$ .

La mutation A90P affecte en revanche la réactivité de la forme isomère A, comme cela avait été avancé avec les résultats de RMN. La mutation semble révéler un mécanisme particulier pour la réactivité de la forme isomère A de l'hème. En 2004, Vallone et al. (Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004) ont montré sur une structure cristallographique de la Ngb de murine avec un CO fixé à

l'hème que lors de la fixation d'un ligand, l'hème opère un glissement vers l'intérieur de la protéine pour se retrouver dans une géométrie de fixation optimale. Ces résultats ont aussi été confirmés par des simulations sur la réactivité de la Ngb humaine avec différents ligands (A. Bocahut et al., 2009). Le mouvement de glissement de l'hème est accompagné d'un déplacement de l'histidine proximale qui par conséquent provoque un réarrangement dans l'espace de l'hélice F et plus globalement un réarrangement de l'espace formé par les hélices F et G et la boucle FG (A. Bocahut et al., 2009; Xu, Yin, & Du, 2011; Xu et al., 2010). Le remplacement de l'alanine 90 (F2) peut contribuer à perturber ce déplacement. Cela impliquerait que le déplacement de l'hème est un mouvement structural s'opérant de façon plus importante pour la forme isomère A que pour la forme isomère B. Les études par simulation (A. Bocahut et al., 2009; Nadra et al., 2008) ont aussi montré qu'à l'état hexacoordiné, les cavités principales dans lesquelles un ligand externe peut pénétrer se trouvent dans la partie proximale de l'hème où se situe l'hélice F. Lorsque l'hème passe d'un état hexacoordiné à un état pentacoordiné et opère son glissement pour fixer le ligand, les cavités migrent dans la partie distale de l'hème. Le remplacement de l'alanine, petit résidu apolaire par une proline, résidu apolaire légèrement plus grand, peut aussi contribuer à gêner la migration des ligands externes vers les cavités distales.

Chez la Ngb F106L de souris, il a été montré par dynamique moléculaire que la mutation entraîne une augmentation globale de la taille des cavités et notamment de la cavité distale formée lors du glissement de l'hème (Xu et al., 2010). Aussi cette mutation est peu susceptible d'affecter la migration des ligands au sein de la Ngb. Le résidu F106 est l'un des deux résidus, avec l'histidine proximale 96, les plus impliqués dans le glissement de l'hème lors de la fixation d'un ligand. Chez la Ngb de souris, sa chaîne latérale réalise un déplacement de 3,83 Å (Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004). Avella et al. (Avella et al., 2014), réalisant une mutation en tryptophane du résidu F106, ont également constaté une réduction de la cinétique de fixation du CO sur la Ngb. Ils ont alors proposé que la taille de ce résidu module l'espace de la cavité proximale interne où l'hème glisse lors de la fixation d'un ligand. Ainsi un résidu de chaîne latérale plus importante, comme le tryptophane, réduit l'espace de cette cavité et par conséquent gêne le glissement de l'hème. Cependant, dans le cas de la mutation Ngb F106L, la chaîne latérale de la leucine n'occupe pas un espace plus important que la phénylalanine et ne peut donc pas provoquer d'encombrement stérique comme le tryptophane. Le déplacement de la F106 doit donc participer au basculement de l'hème dans une géométrie optimale pour la fixation de ligands. Cette participation se fait soit par le biais d'interactions directes avec l'hème ( $\pi$ - $\pi$  stacking entre le cycle aromatique de la F106 et le cycle porphyrinique de l'hème) soit par le biais de mouvements structuraux initiés par une coordination des mouvements de l'hème et de la F106. Xu et al. (Xu et al., 2010) soulèvent deux points allant dans ce sens. Par dynamique moléculaire sur des variants de la F106 de Ngb de souris avec du CO fixé à l'hème, ils montrent que la mutation de la F106 en leucine entraîne un affaiblissement de l'interaction entre l'hème et les résidus avoisinant, ce qui diminuerait son maintien dans une position stable pour la fixation du CO. Il est aussi indiqué, pour le variant F106L<sub>ox</sub>, que lors de la fixation du CO, la rotation de l'histidine distale hors de sa position de fixation à l'hème est moins rapide que par rapport à la Ngb WT. La mobilité de l'ensemble formé par les hélices C et D et la boucle CD, corrélée à la rotation de l'histidine distale, est également réduite dans le cas du variant Ngb F106L<sub>ox</sub>. Or il a été montré que la mobilité de cette région participe au glissement de l'hème (Anselmi et al., 2007; Anselmi, Brunori, Vallone, & Di Nola, 2008; Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). La mutation de la F106

chez la Ngb humaine montre que ce résidu est visiblement impliqué dans les mouvements structuraux liés à la mobilité de l'hème lors de la fixation de ligands externes.

Ces interprétations corroborent la double phase cinétique observée pour  $k_A$  et  $k_B$ . En effet, pour rappel l'équation V. 22 qui définit l'expression de la constante  $k$  en fonction de la concentration en cyanure dans le cas d'une évolution linéaire de la constante en fonction de la concentration en cyanure s'exprime ainsi :

$$k = \frac{k_{off,His}k_{on,CN}[CN]}{k_{on,His}} + k_{off,CN}$$

Cette équation est introduite en émettant l'hypothèse que  $k_{on,His} \gg k_{on,CN}[CN]$ . Cette approximation représente le fait que la fixation du CN est l'étape limitante de la cinétique car elle est plus lente que le phénomène d'association/dissociation de l'histidine distale. Cette étape de fixation du cyanure est régie par un ensemble de facteurs : déprotonation du cyanure, migration dans la protéine pour atteindre la cavité distale, accès au fer de l'hème. Dans l'hypothèse où la mutation affecte le glissement de l'hème pour atteindre sa position optimale de fixation de ligand, la constante  $k_{on,CN}$  est vraisemblablement impactée et diminuée. Ce phénomène contribue à obtenir une cinétique globalement plus lente, ce qui correspond aux phases lentes observées pour  $k_A$  et  $k_B$ . Le fait que les deux formes isomères soient impliquées montre qu'elles sont toutes les deux soumises au mécanisme de glissement de l'hème, mais dans des proportions différentes. Cela rejoint l'étude cristallographique de Ngb de murine (Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004) dans laquelle le glissement de l'hème est montré sur la forme isomère B.

Au-delà de 150 mM en cyanure, la réactivité équivalente de la Ngb F106L à celle de la Ngb WT peut s'expliquer par un phénomène de saturation de la protéine. Les ligands externes saturant la protéine ont directement accès au site distal de l'hème sans que celui n'ait à opérer de basculement. Cet accès est facilité par une augmentation de la taille des cavités internes à cause de la mutation (Xu et al., 2010). La fixation peut donc s'opérer sans que l'hème ne se retrouve dans une position optimale. Ainsi l'effet de la mutation ne se fait plus ressentir.

Un dernier point concernant la mutation F106L<sub>ox</sub> est que l'effet, bien que présent pour les deux formes isomères de l'hème, possède, comme pour la Ngb A90P<sub>ox</sub> un impact plus important sur la forme isomère A. La constante  $p_{1,A}$  est 6,6 fois plus petite que la constante  $p_{2,A}$  alors que la constante  $p_{1,B}$  est 5 fois plus petite que la constante  $p_{2,B}$ . Cela confirme que la réactivité de la forme isomère A est plus sensible aux mouvements structuraux de la protéine.

Ces expériences montrent qu'une part importante du mécanisme de fixation d'un ligand externe inclut la dissociation de l'histidine distale pour que l'hème puisse basculer. Nous allons traiter dans la suite l'effet de la mutation de la Ngb H64V<sub>ox</sub>. La présentation de cette mutation a été séparée des autres variants Ngb A90P<sub>ox</sub> et Ngb F106L<sub>ox</sub> à cause des différences au niveau du schéma réactionnel et des équations de la Ngb H64V<sub>ox</sub>.

## 2. Effet de la mutation Ngb H64V<sub>ox</sub>

### i. Modèle cinétique

Dans le cas du variant Ngb H64V<sub>ox</sub>, l'histidine distale a été remplacée par une valine. La valine ne peut constituer un ligand distal. L'hème se trouve alors dans un état haut spin hexacoordiné par une molécule d'eau dans des conditions acides (Uno et al., 2004). Dans des conditions plus basiques, il y a un mélange entre deux formes hexacoordinées. L'une des formes est celle où l'hème est hexacoordiné par une molécule d'eau. L'autre forme correspond à la fixation de la lysine 67 et l'hème (Uno et al., 2004). Il a été montré au Chapitre IV,A.3 que le pourcentage de forme hexacoordinée par la lysine 67 à pH 7,4 était de 12 %.

Le mélange en solution des différentes formes de la Ngb H64V<sub>ox</sub> rend l'analyse des courbes de cinétiques de fixation du cyanure plus difficile à réaliser. Différents modèles cinétiques, en faisant varier le nombre d'exponentielles dans l'équation ont été testés. Les modèles en mono-exponentielle ou bi-exponentielle donnent des résultats peu satisfaisants, du point de vue du coefficient de détermination R<sup>2</sup> et des graphes résiduels, pour l'analyse des courbes. Les modèles en tri-exponentielle et quadri-exponentielle fournissent des résultats plus acceptables. Cependant, pour une concentration donnée, le modèle en quadri-exponentielles montre des écarts types plus importants entre les mesures des différentes expériences que le modèle en tri-exponentielle. Aussi le modèle en tri-exponentielle a été retenu (Equation V. 33).

$$A_{Soret}(t) = [Ngb_{hexa}]_{tot} [a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t} + a_3 e^{-k_3 t} + y_0] \quad \text{Equation V. 33}$$

Ce modèle correspond à deux schémas réactionnels possibles. Dans le premier cas (Figure V. 9), deux formes réactives, à l'origine de deux des trois exponentielles de l'équation V. 33, sont associées aux deux formes isomères de la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67. La Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau ne serait à l'origine que d'une seule exponentielle car les deux formes isomères de l'hème ne pourraient être distinguées. Cette hypothèse se base sur des expériences réalisées dans le cas de Mb WT recombinée (Aojula, Wilson, & Morrison, 1987; Light, Rohlf, Palmer, & Olson, 1987). Il a été montré que la Mb WT recombinée, c'est-à-dire formée à partir d'apo-myoglobine dans laquelle l'hème a été inséré, présente également deux formes isomères de l'hème contrairement à la Mb native (La Mar, Anderson, et al., 1981; La Mar, Burns, et al., 1981; La Mar, Smith, Gersonde, Sick, & Overkamp, 1980). Cependant les cinétiques de fixations de ligands réalisées sur ces Mb WT recombinées ne montrent pas deux comportements différents dus à la présence de deux formes isomères de l'hème. Du fait de l'analogie entre la Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau et la Mb WT, il est possible de postuler que cette forme de Ngb H64V ne montrera pas deux réactivités différentes vis-à-vis de la fixation du cyanure. Ce modèle est en accord avec des mesures de la fixation du CO effectuées sur les variants H64V et K67T de la Ngb (Uno et al., 2004).

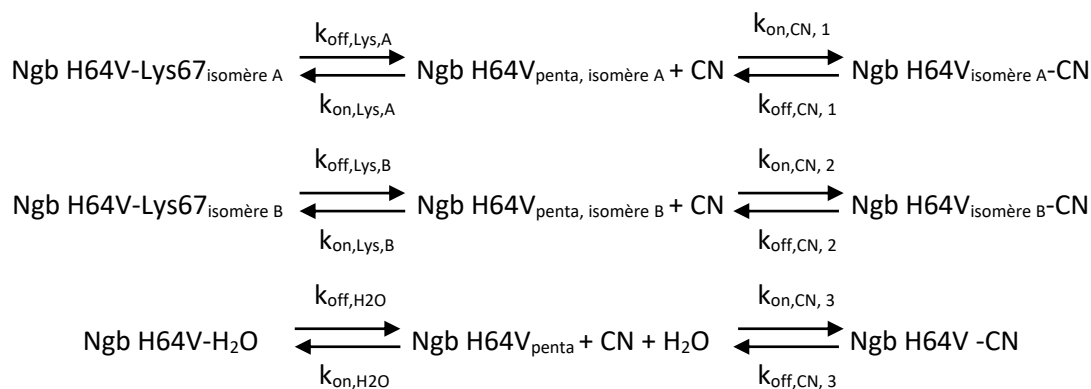


Figure V. 9- Schéma réactionnel de la fixation du cyanure sur la Ngb H64V<sub>ox</sub>. Cas 1.

Le deuxième cas de figure prévoit une réactivité différente pour les deux formes isomères de l'hème hexacoordiné par une molécule d'eau (Figure V. 10). La troisième exponentielle serait due à la réaction de la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67 où les deux formes isomères ne pourraient pas être distinguées. Cela s'expliquerait par le faible pourcentage, 12 %, de Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67 à pH 7,4 par rapport à la Ngb H64V hexacoordinée avec de l'eau. Les concentrations respectives des deux formes seraient alors trop faibles pour donner deux réactivités distinctes.

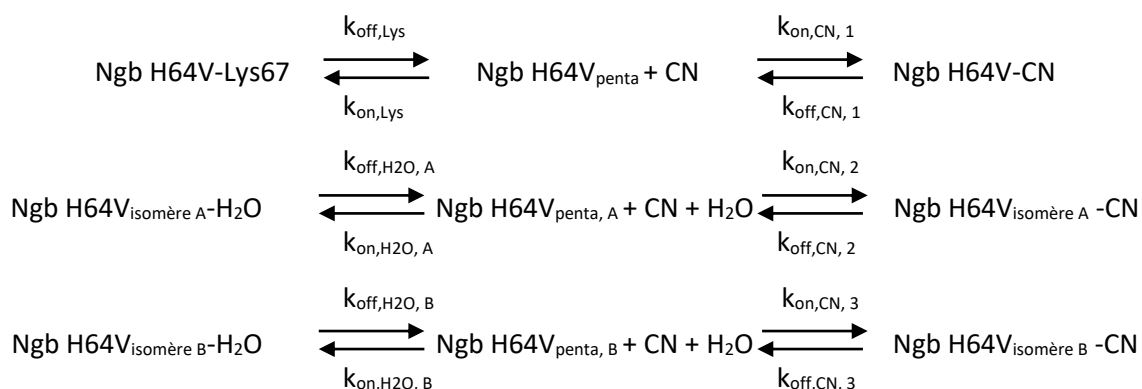


Figure V. 10- Schéma réactionnel de la fixation du cyanure sur la Ngb H64V<sub>ox</sub>. Cas 2.

Nous allons dans la suite essayer de corrélérer l'analyse des courbes avec l'un des deux schémas réactionnels proposés.

## ii. Cinétique de fixation du cyanure

Chez la Ngb H64V, l'ensemble des expériences aux différentes concentrations ont été réalisées avec le montage stopped-flow à cause de la rapidité des réactions même à basse concentration en cyanure.

Les courbes obtenues de l'évolution des constantes  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_3$  en fonction de la concentration en cyanure sont comparées ci-dessous (Figure V. 11). L'évolution de  $k_3$  en fonction de la concentration en cyanure est linéaire et présente un coefficient directeur plus élevé que pour les constantes  $k_1$  et  $k_2$ . La valeur mesurée pour ce coefficient directeur est  $250 \pm 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . La constante  $k_1$  présente une évolution parabolique qui tend vers une asymptote de valeur  $2,25 \text{ s}^{-1}$ . Le coefficient

directeur de la partie linéaire, entre 0 mM et 50 mM en cyanure est  $68 \pm 2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . La constante  $k_2$  est linéaire et son coefficient directeur est  $1,5 \pm 0,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

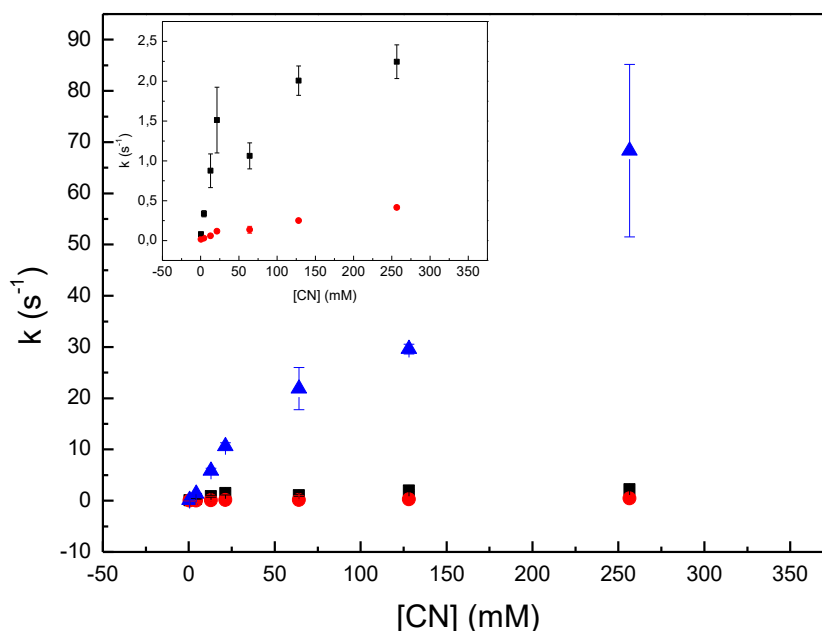


Figure V. 11- Evolution des constantes cinétiques  $k_1$  (carré noir),  $k_2$  (rond rouge) et  $k_3$  (triangle bleu) en fonction de la concentration en cyanure pour la Ngb H64V<sub>ox</sub>.

Ces observations sont plus en accord avec le premier schéma réactionnel évoqué dans la partie précédente (Figure V. 9). La constante  $k_3$ , dont l'évolution est la plus forte, est alors associée à la réactivité de la Ngb H64V hexacoordinée par de l'eau et les constantes  $k_1$  et  $k_2$  à la réactivité des formes isomères de la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67. Comme évoqué précédemment (C.2.i), la Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau est analogue à la Mb WT. Les constantes cinétiques du second ordre reportées dans la littérature pour la fixation du cyanure sur la Mb WT de différentes espèces varient autour de  $200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à  $350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Aojula et al., 1987; Brancaccio et al., 1994; Ver Ploeg & Alberty, 1968). La constante déterminée pour la Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau est donc du même ordre de grandeur que celles déterminées pour la Mb WT. Un autre point confirmant la validité du premier schéma réactionnel est la comparaison des valeurs des amplitudes  $a_1$ ,  $a_2$  et  $a_3$ . Comme indiqué en partie A.3, ces valeurs peuvent être assimilées aux ratios des différentes formes dans le cas de réaction totale comme ici. Le ratio de  $a_3$  sur la somme  $a_1 + a_2 + a_3$ , qui représente le pourcentage de Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinée par une molécule d'eau, donne une valeur de  $84 \pm 8 \%$ . Cette valeur est identique à la valeur de  $87 \%$  déterminée en UV-Visible pour la forme Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau.

Avant de discuter de l'allure obtenue pour  $k_1$ , nous allons exposer l'attribution des constantes  $k_1$  et  $k_2$  aux formes isomères A et B. La Ngb H64V<sub>ox</sub> présente le désavantage de ne pas montrer de signaux caractéristiques de l'hème aisément observables en RMN. Or ce sont les cinétiques de fixation du cyanure étudiées à partir de ces signaux qui sont utilisées chez la Ngb WT et les autres variants pour attribuer, par comparaison, l'évolution des constantes  $k_A$  et  $k_B$  aux formes

isomères A et B en UV-Visible. Néanmoins, il est récurrent chez la Ngb WT et chez les autres variants que la forme isomère A possède une meilleure réactivité que la forme isomère B. Et par conséquent  $k_A$  est supérieur à  $k_B$  aux différentes concentrations en cyanure analysées. Dans le cas de la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67,  $k_1$  est supérieure à  $k_2$  pour les différentes concentrations en cyanure analysées. Nous allons donc émettre pour la suite le postulat que  $k_1$  est associée à la forme isomère A et  $k_2$  à la forme isomère B de la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67.

L'allure de l'évolution de  $k_1$  en fonction de la concentration en cyanure n'a pas été observée chez la Ngb WT ou d'autres variants précédemment étudiés. Elle peut néanmoins s'expliquer grâce à l'équation de  $k_1$  (Equation V. 34). Bien que le schéma réactionnel de la Ngb H64V soit différent des autres Ngb étudiées, le mécanisme associé à chaque espèce réactive reste identique. C'est un mécanisme en deux étapes avec tout d'abord la dissociation du ligand distal suivie de la fixation du cyanure. Dans le cas de la constante  $k_1$ , le ligand distal est la lysine 67. En se basant sur les équations V. 4, V. 5, V. 6, V. 15, V. 18 et V. 19 déterminées pour la Ngb WT<sub>ox</sub>, l'expression de  $k_1$  peut donc s'écrire sous la forme :

$$k_1 = \frac{k_{off,Lys,A}k_{on,CN,1}[CN] + k_{off,CN,1}k_{on,Lys,A}}{k_{on,Lys,A} + k_{on,CN,1}[CN]} \quad \text{Equation V. 34}$$

Il est alors possible d'émettre les hypothèses suivantes à partir d'une certaine concentration en cyanure :  $k_{on,Lys,A} \ll k_{on,CN,1}[CN]$  et  $k_{off,CN,1}k_{on,Lys,A} \ll k_{on,CN,1}[CN]$  car la réaction est totale. A partir d'une certaine concentration en cyanure, la constante  $k_1$  prend alors la valeur de :

$$k_1 = k_{off,Lys,A} \quad \text{Equation V. 35}$$

Ainsi, la valeur de  $k_{off,Lys,A}$  serait de  $2,25 \text{ s}^{-1}$ . La valeur reportée dans la littérature pour la constante de dissociation de l'histidine distale de la Ngb WT<sub>ox</sub>, sans distinction des formes isomères, est de  $7,0 \text{ s}^{-1}$  (D. Hamdane et al., 2003). Ces deux valeurs sont du même ordre de grandeur.

Les résultats obtenus avec la Ngb H64V<sub>ox</sub> sont comparés à ceux de la Ngb WT<sub>ox</sub> dans la partie suivante afin de dégager les effets de cette mutation.

### iii. Comparaison Ngb WT<sub>ox</sub> et Ngb H64V<sub>ox</sub>

Il a été exposé que la solution de Ngb H64V<sub>ox</sub>, et donc son schéma réactionnel, résultait d'un mélange de plusieurs espèces. Structuralement parlant, ce sont les deux formes isomères de la Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinées par la lysine 67 qui se rapprochent le plus de la structure de la Ngb WT<sub>ox</sub>. En effet l'hème y est hexacoordiné par un ligand distal protéique comme la Ngb WT<sub>ox</sub>. Les résultats obtenus pour ces deux formes sont comparés à ceux de la Ngb WT (Tableau V. 7). Il apparaît que la réactivité des deux formes isomères est plus élevée chez la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67 que chez la Ngb WT<sub>ox</sub>. La réactivité de la forme isomère B de la Ngb H64V<sub>ox</sub> est environ 9,5 fois plus grande que celle de la Ngb WT<sub>ox</sub> et la réactivité de la forme isomère A est environ 46 fois plus grande.



	$p_A$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	$p_B$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )
Ngb WT <sub>ox</sub>	1,48 ± 0,09	0,16 ± 0,01
Ngb H64V <sub>ox</sub>	68 ± 2	1,5 ± 0,1

Tableau V. 7- Comparaison des constantes  $p_A$  (isomère A) et  $p_B$  (isomère B) avec leurs écarts types de la Ngb WT<sub>ox</sub> et de la Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinée par la lysine 67.

La lysine 67 est un ligand reconnu pour avoir des interactions avec les groupements propionates de l'hème chez la Ngb WT (Guimaraes et al., 2014; Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004; Xu et al., 2011). Comme pour l'histidine distale, le glissement de l'hème entraîne une rupture de ces interactions (Anselmi et al., 2007, 2008; Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004). Ainsi, chez la Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinée par la lysine 67, un mouvement de glissement de l'hème peut aussi expliquer le comportement observé en conduisant à une rupture de la liaison entre la lysine 67 et le fer de l'hème. Ce mouvement a été observé par dynamique moléculaire lors de la fixation du CO sur la Ngb H64V de souris (Xu et al., 2011). Après fixation du CO, trois positions de l'hème sont obtenues. La position correspondant à la population la plus abondante correspond à une forme où l'hème occupe une position similaire à celle de l'hème chez la Ngb WT<sub>ox</sub>. Les deux positions correspondantes aux plus faibles populations sont équivalentes à la position de l'hème obtenue après fixation du CO sur la Ngb WT<sub>ox</sub>. La réactivité plus élevée, par rapport à la Ngb WT<sub>ox</sub>, des deux formes isomères de la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67 peut s'expliquer par deux facteurs. Tout d'abord l'affinité de la lysine 67 pour le fer peut être plus faible que celle de l'histidine distale chez la Ngb WT<sub>ox</sub>. En effet la distance entre le fer et la lysine 67 est probablement plus élevée que la distance entre l'histidine distale et le fer. Chez la Ngb WT<sub>ox</sub>, la distance entre le fer et l'histidine distale est de 2,11 Å et la distance entre la lysine 67 et le plus proche propionate de l'hème est de 2,7 Å, ce qui signifie que la lysine 67 est à une distance supérieure à 2,7 Å du fer. Même si chez le variant, la distance entre lysine 67 et le fer doit être réduite pour que la coordination s'effectue, il est probable qu'elle reste plus élevée que 2,11 Å. Le second point est que l'hème coordonné à la lysine 67 se retrouve initialement dans une position plus favorable vis-à-vis de la fixation de ligand que lorsque qu'il est fixé à l'histidine distale. En effet la lysine 67 est un résidu frontière de la poche distale de l'hème (Orlowski & Nowak, 2008). Elle se trouve à côté de la valine 68 qui est un résidu frontière de la cavité distale formée lorsque l'hème opère son basculement lors de la fixation de ligands (A. Bocahut et al., 2009). Ainsi de par sa coordination avec la lysine 67, l'hème se retrouve mieux placé vis-à-vis de cette poche distale que dans le cas de l'histidine 64.

Comme indiqué précédemment, l'hème occupe trois positions distinctes après la fixation du CO chez la Ngb H64V de souris (Xu et al., 2011). La position correspondant à la population la plus élevée est similaire à celle de l'hème chez la Ngb WT<sub>ox</sub>. Cela signifie que la fixation du CO s'est opérée sans basculement de l'hème pour cette forme. Par déduction du paragraphe précédent, cette forme correspond ici à la Ngb H64V<sub>ox</sub> avec du cyanure fixé à l'hème issue de la forme Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinée par une molécule d'eau. La meilleure réactivité de la Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinée par une molécule d'eau a également été observée pour la fixation d'autres ligands (L. Astudillo et al., 2012; S. Dewilde et al., 2001; Uno et al., 2004; Van Doorslaer et al., 2003). Comme indiqué en C.2.ii, la constante obtenue est comparable à la constante de fixation du cyanure chez différentes espèces

de Mb. Chez la myoglobine, il a été montré que la fixation de ligands externes est notamment régulée par l'histidine E7 via un mécanisme de « his-gate » (Bolognesi et al., 1982; Johnson, Olson, & Phillips, 1989; Perutz, 1989; Ringe, Petsko, Kerr, & Ortiz de Montellano, 1984). Dans ce mécanisme, l'histidine opère une torsion qui permet l'accès à l'hème au ligand externe en ouvrant un canal entre le solvant et la poche distale. Il a aussi été montré qu'une mutation de l'histidine E7 chez la Mb, par un résidu apolaire plus petit, comme une leucine ou une valine, contribue à augmenter la cinétique de fixation de ligands externes en supprimant le pont hydrogène qui se forme entre l'histidine et le ligand et en diminuant la taille de la chaîne latérale ce qui facilite la rotation du résidu (Brucker, Olson, Ikeda-Saito, & Phillips, 1998; Eich, 1997). Une torsion de l'histidine distale avec un angle comparable à celui de l'histidine de la Mb est également observable chez la Ngb WT de souris hexacoordinée par du CO (Anselmi et al., 2007, 2008; Xu et al., 2010). Cependant, du fait du mécanisme de glissement de l'hème, il a été déduit que chez la Ngb WT, cette rotation de l'histidine n'agit pas en tant que « his-gate » mais participe à la mobilité de l'hème. Chez la Ngb H64V<sub>ox</sub> hexacoordinée par une molécule d'eau, l'hème n'étant plus fixé à la protéine par un ligand distal, il n'y a plus à opérer de glissement pour rompre cette liaison. La rotation de la valine, pour cette forme, doit seulement contribuer à rendre l'hème plus accessible au ligand externe. Bien que Xu et al. (Xu et al., 2011), dans leur simulation sur la Ngb H64V de souris, ont montré que la mutation H64V rend l'hème moins directement accessible au solvant, il reste possible d'assimiler l'effet de la mutation au mécanisme « his gate ». En effet, la mutation entraîne l'augmentation de la cavité Phantom 1 qui passe de 19 Å chez la Ngb WT de souris à 136 Å chez la Ngb H64V. Un réarrangement des cavités avec une augmentation de la taille de la cavité Phantom 1 est aussi observable chez la Ngb WT humaine (A. Bocahut et al., 2009). Cette cavité, dont la taille aussi importante est propre à la Ngb H64V<sub>ox</sub>, peut constituer un tunnel d'accès comparable à celui créé par le mécanisme « his gate » chez la Mb.

## • Résumé

L'étude de la cinétique de fixation du cyanure chez différents variants nous fournit une première approche *in vitro* du mécanisme structural à l'origine de la réactivité de la Ngb.

- Pour la Ngb A90P<sub>ox</sub>, un comportement en bi-exponentielle comparable à la Ngb WT<sub>ox</sub> est observé. La valeur de la constante  $p_A$  est cependant plus faible que celle mesurée pour la Ngb WT<sub>ox</sub> alors que la constante  $p_B$  n'est pas modifiée. Seule la forme isomère A est impactée par la mutation A90P.
- Pour la Ngb F106L<sub>ox</sub>, un comportement en bi-exponentielle est aussi observé. L'évolution de chaque exponentielle en fonction de la concentration en CN est caractérisée par deux pentes distinctes. Les pentes faibles de chaque exponentielle sont associées à des constantes cinétiques moins élevées que les constantes cinétiques de la Ngb WT<sub>ox</sub>. En revanche les constantes cinétiques des pentes élevées sont quasiment identiques aux constantes cinétiques de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Les processus de fixation du cyanure ne sont donc pas les mêmes en fonction de la concentration en cyanure.
- Pour la Ngb H64V<sub>ox</sub>, la cinétique suit un modèle en tri-exponentielle. La phase cinétique la plus rapide est attribuée à la réactivité de la Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau, sans distinction des formes isomères de l'hème. Les deux phases plus lentes correspondent aux réactions des formes isomères de la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67.
- L'ensemble des résultats montre que, quelle que soit la mutation, la forme isomère A est plus impactée par la mutation que par la forme isomère B. La plus grande réactivité de la forme isomère A chez la Ngb WT<sub>ox</sub> s'explique donc par une meilleure efficacité du mécanisme structural permettant au cyanure de se fixer sur l'hème.
- Pour la forme Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau, la constante obtenue de  $250 \pm 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  est comparable à celle de la Mb WT. La réactivité de la protéine serait alors différente de celle de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Elle serait due à un processus similaire de l'« histidine-gate » de la Mb WT. L'histidine 64 est donc l'un des acides aminés déclencheurs du mécanisme structural régissant la fixation et la diffusion de ligands chez la Ngb WT<sub>ox</sub>.

Ces observations concordent avec un mécanisme de glissement de l'hème, permis par la dissociation de l'histidine, qui serait nécessaire pour une fixation plus rapide du ligand (Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004). Plusieurs études soulignent une corrélation entre le mouvement de torsion de l'histidine distale et un mouvement de l'ensemble formé par les hélices C, D et la boucle CD (Anselmi et al., 2007, 2008; Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). Le mouvement de cette partie de la protéine participe également au glissement de l'hème. Aussi, nous allons voir dans la partie suivante l'effet de l'absence de pont disulfure chez la Ngb ainsi que chez les variants. Le cas de la Ngb H64V sans pont disulfure ne sera cependant pas étudié à cause de l'impossibilité d'identifier les constituants de la solution (Chapitre III, B.2).

## D. Effet du pont disulfure

Dans cette partie, les résultats de la cinétique de fixation du cyanure, pour différentes concentrations en cyanures, sont présentés pour la Ngb WT<sub>red</sub> et les variants avec le pont disulfure réduit. L'objectif est de déterminer l'effet de la réduction du pont disulfure sur la Ngb WT et de mettre en évidence des couplages structuraux entre certains acides aminés et le pont disulfure via les mutations réalisées.

### 1. Cinétiques de fixation du cyanure chez la Ngb WT<sub>red</sub> et la C46G

Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'effet du pont disulfure sur la cinétique de fixation du cyanure chez la Ngb WT. Pour cela, les cinétiques de fixation du cyanure sur la Ngb WT<sub>red</sub> et sur la Ngb C46G où le pont disulfure a été supprimé sont analysées.

#### i. Comparaison des résultats en RMN

Les réactivités de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G ont d'abord été étudiées en RMN afin d'avoir un aperçu du comportement de chaque forme isomère. Les décroissances des signaux de chaque forme isomère en fonction du temps sont comparées à celles de la Ngb WT<sub>ox</sub> pour une réaction avec 0,5 Mm en cyanure (Figure V. 12).

La comparaison avec la Ngb WT<sub>ox</sub> fait ressortir plusieurs points. Les courbes des protéines sans pont disulfure présentent des pentes plus faibles que pour la Ngb WT<sub>ox</sub>. La réduction ou la suppression du pont disulfure entraîne donc une baisse de la réactivité des formes isomères A et B vis-à-vis de la fixation du cyanure. De plus la valeur d'intensité finale de ces courbes n'est plus autour de zéro. La réaction n'est donc pas totale chez ces différentes formes. Les courbes des formes isomères A et B de la Ngb WT<sub>red</sub> ont quasiment la même allure. La réactivité de ces deux formes semble donc plus homogène lorsque le pont disulfure est réduit. En revanche, chez la Ngb C46G, la courbe de la forme isomère B possède une allure différente que celle de la forme isomère A qui est au même niveau que les courbes des formes isomères A et B de la Ngb WT<sub>red</sub>. La mutation de la cystéine a donc un effet légèrement différent de la réduction du pont disulfure.

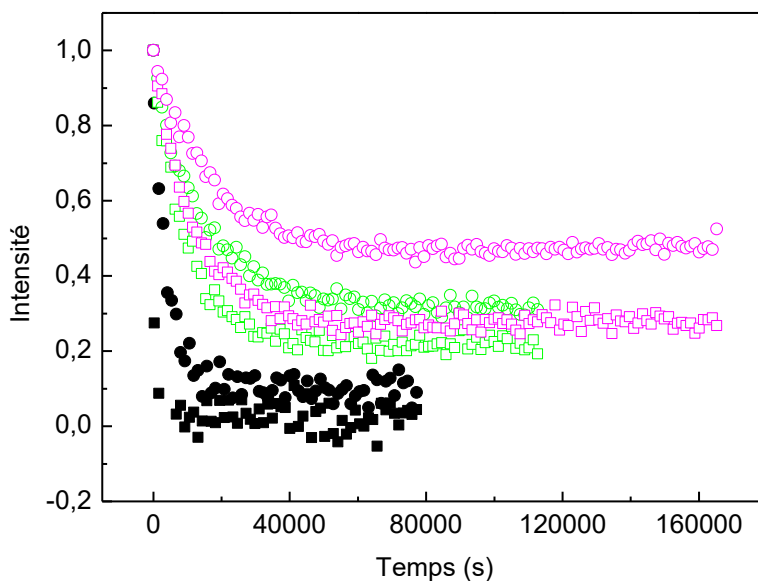


Figure V. 12- Courbes d'évolution de l'intensité en fonction du temps de la réaction de fixation du cyanure à 0,5 mM de la Ngb WT<sub>ox</sub> - isomère A (carré plein noir), de la Ngb WT<sub>ox</sub> - isomère B (rond plein noir), de la Ngb WT<sub>red</sub> - isomère A (carré vide vert), de la Ngb WT<sub>red</sub> - isomère B (rond vide vert), de la Ngb C46G - isomère A (carré vide rose) et de la Ngb C46G - isomère B (rond vide rose). Les expériences sont réalisées avec 100  $\mu$ M de protéine dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à 25 °C.

Les résultats des paramètres d'ajustement de ces courbes sont également comparés à ceux de la Ngb WT<sub>ox</sub> (Tableau V. 8). Les constantes obtenues pour la Ngb WT<sub>red</sub> et la Ngb C46G sont égales ou quasiment égales en tenant compte des écarts types pour les deux formes isomères. Elles sont plus faibles que les constantes de la Ngb WT<sub>ox</sub> aussi bien pour la forme isomère A que pour la forme isomère B.

	$k_{1,A} + k_{2,A} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{1,B} + k_{2,B} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Ngb WT <sub>ox</sub>	$(7,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-04}$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-04}$
Ngb WT <sub>red</sub>	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-04}$	$(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-04}$
Ngb C46G	$(0,96 \pm 0,1) \cdot 10^{-04}$	$(0,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-04}$

Tableau V. 8- Constantes de fixation du cyanure ( $C = 0,5 \text{ mM}$ ) et leurs écarts types déterminées en RMN pour les formes isomères A ( $k_{1,A} + k_{2,A}$ ) et B ( $k_{1,B} + k_{2,B}$ ) de la Ngb WT<sub>ox</sub>, de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G.

Deux effets majeurs de la réduction ou suppression du pont disulfure sont mis en évidence avec ces résultats. Tout d'abord, la perte du pont disulfure entraîne une baisse de réactivité des deux formes isomères. Cette baisse est beaucoup plus importante chez la forme isomère A, dont la

réactivité diminue d'un facteur 7 environ. Pour la forme isomère B, la diminution est seulement d'un facteur 3 environ. La réactivité de la forme isomère A est donc plus impactée par l'absence de pont disulfure. De plus, la réactivité des deux formes isomères tend à devenir identique. Le pont disulfure est donc impliqué dans la différence de réactivité des deux formes isomères.

Un point particulier est à noter concernant la réactivité de la forme isomère B de la Ngb C46G. En effet l'allure des courbes obtenues pour les différentes expériences montre une valeur d'intensité finale plus élevée (Figure V. 12) que pour les autres protéines. Pourtant la constante cinétique obtenue est identique aux autres formes. Cela signifie qu'à l'état final, il reste plus de Ngb<sub>hexa</sub> en solution que chez les autres protéines.

Les résultats obtenus sont en accord avec les expériences menées sur la Ngb WT<sub>red</sub> de Anthony Bocahut et al. (A. Bocahut et al., 2013). Nous allons étudier dans la suite l'effet de la concentration en cyanure lorsque le pont disulfure est absent de la Ngb.

#### ii. Comparaison des résultats en UV-Visible

Comme pour la Ngb WT, les expériences ont d'abord été réalisées à 0,5 Mm en cyanure afin de comparer avec la RMN. Il a été constaté que comme pour les variants Ngb A90P et Ngb F106L, les courbes expérimentales ne peuvent être ajustées par un modèle en bi-exponentielle. En revanche le modèle en mono-exponentielle donne des résultats valides. L'explication est la même que pour les variants. En raison de la réactivité proche des deux formes isomères à cette concentration, l'analyse par le logiciel ne parvient pas à les distinguer en UV-Visible.

En revanche, lorsque la concentration en cyanure augmente, le comportement observé est à nouveau de type bi-exponentiel. L'évolution des constantes  $k_A$  et  $k_B$  peut donc être suivie en fonction de la concentration en cyanure (Figure V. 13). La pente des droites des formes isomères A de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G est plus faible que celle de la Ngb WT<sub>ox</sub>. La réactivité des formes isomères A de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G est donc plus faible. De plus, elles présentent pratiquement la même pente ce qui signifie que les formes isomères A de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G ont la même réactivité. En revanche, les droites des formes isomères B des trois protéines sont comprises dans la même zone. Les formes isomères B des trois protéines semblent donc avoir la même réactivité. Seule la forme isomère A est donc impactée par la réduction du pont disulfure même si elle reste plus réactive que la forme isomère B.

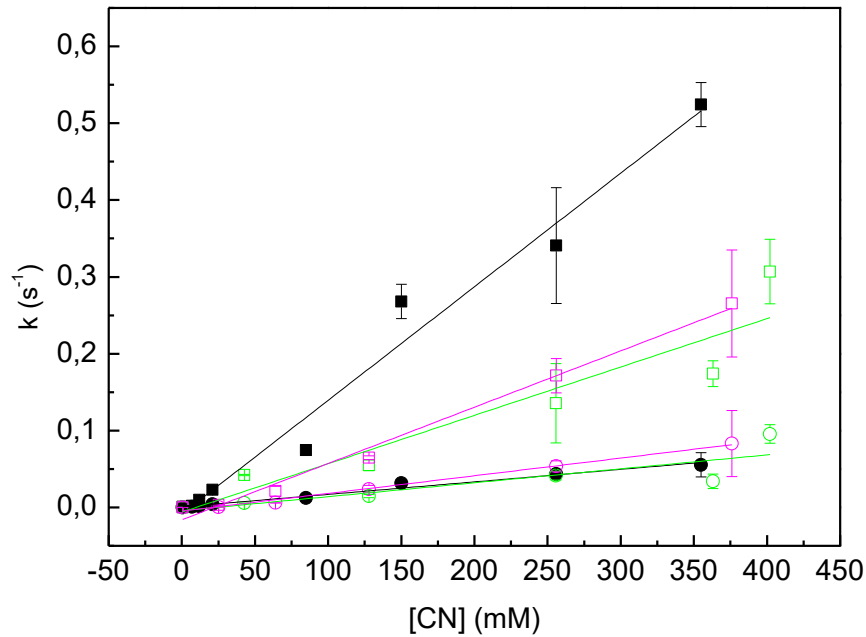


Figure V. 13- Evolution des constantes cinétiques  $k_A$  et  $k_B$  en fonction de la concentration en cyanure pour la Ngb WT<sub>ox</sub> ( $k_A$  : carré plein noir,  $k_B$  : rond plein noir) la Ngb WT<sub>red</sub> ( $k_A$  : carré vide vert,  $k_B$  : rond vide vert) et la Ngb C46G ( $k_A$  : carré vide rose,  $k_B$  : rond vide rose). Les droites de régression linéaires ont été tracées pour la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir) la Ngb WT<sub>red</sub> (vert) et la Ngb C46G (rose).

Les coefficients directeurs des différentes droites ont été reportés dans le tableau ci-dessous (Tableau V. 9). Les constantes cinétiques  $p_A$ , associées à la forme isomère A de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G sont égales et environ deux fois moins élevées que celle de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Elles restent cependant environ 3 fois plus élevées que les constantes cinétiques  $p_B$ . Les constantes  $p_B$  associées à la forme isomère B de la Ngb WT<sub>red</sub>, de la Ngb C46G et de la Ngb WT<sub>ox</sub> sont par ailleurs identiques.

	$p_A$ (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$p_B$ (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
Ngb WT <sub>ox</sub>	1,5 ± 0,1	0,16 ± 0,01
Ngb WT <sub>red</sub>	0,63 ± 0,1	0,18 ± 0,05
Ngb C46G	0,73 ± 0,04	0,23 ± 0,01

Tableau V. 9- Comparaison des constantes cinétiques  $p_A$  et  $p_B$  avec leurs écarts types de la Ngb WT<sub>ox</sub>, la Ngb WT<sub>red</sub> et la Ngb C46G.

Le principal effet dégagé par ces résultats est que seule la réactivité de la forme isomère A est impactée par la perte du pont disulfure. Lorsque le pont disulfure est absent, la forme isomère A devient moins réactive que chez la Ngb WT<sub>ox</sub>.

La région formée par les hélices C, D et la boucle CD est l'une des régions impliquées dans le mécanisme de mouvement de l'hème (Anselmi et al., 2007, 2008; Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). Plusieurs études montrent notamment une corrélation entre la dissociation de l'histidine distale et un mouvement opéré par cette région (Anselmi et al., 2007, 2008; Xu et al., 2011). Les études cristallographiques de la Ngb WT humaine (Guimaraes et al., 2014) et sur la Ngb humaine ayant ses trois cystéines mutées (A. Pesce et al., 2003) révèlent que la boucle CD possède une grande mobilité. La réduction du pont disulfure rend la flexibilité de cette région encore plus importante (A. Bocahut et al., 2013; Guimaraes et al., 2014). Il est démontré que la flexibilité de la boucle CD participe à améliorer la stabilité de la liaison de l'histidine distale avec le fer de l'hème. Une première approche de la différence de réactivité entre les protéines sans pont disulfure avec la Ngb WT<sub>ox</sub> serait donc une stabilité accrue de la liaison histidine-fer dans le cas de la forme isomère A. L'histidine étant plus difficile à se dissocier, la réactivité serait ralentie. La structure cristallographique de la Ngb WT humaine (Guimaraes et al., 2014) montre que la boucle CD occupe au minimum deux positions dans l'espace. Dans la première position, l'oxygène du groupement phénol de la tyrosine 44 se trouve à 4 Å du groupement propionate de l'hème et dans la seconde position la chaîne latérale de la tyrosine est orientée vers l'extérieur de la protéine. Par comparaison, la structure cristallographique de carboxyneuroglobine de murine révèle que la tyrosine 44 interagit avec un groupement propionate de l'hème via une liaison hydrogène. Le rapprochement de la boucle CD avec l'hème est confirmé par des études en dynamique moléculaire qui montrent que lors de la fixation de ligand, la rotation de l'histidine distale dans une position ouverte entraîne un mouvement de la boucle CD vers l'hème (Anselmi et al., 2007, 2008). Il y aurait alors un effet de propagation structurale, initié par le mouvement de la boucle CD et aidant à la dynamique de l'hème. Un tel effet a été notamment décrit dans le cas de la Mb (Bourgeois et al., 2006). La réduction du pont disulfure peut alors contribuer à restreindre cet effet notamment à cause d'une flexibilité trop grande de la boucle CD. Là encore, il s'agirait surtout d'un mécanisme affectant la réactivité de la forme isomère A.

Nous avons vu dans le chapitre III que les mutations Ngb A90P et Ngb F106L contribuent également à ralentir la cinétique de fixation du cyanure. Ces deux mutations participent potentiellement à gêner la dynamique de l'hème, nécessaire pour une bonne fixation du ligand. Dans la partie suivante, le pont disulfure est réduit chez ces deux variants afin d'étudier de possibles corrélations entre l'effet du pont disulfure et certains acides aminés.

## 2. Cinétiques de fixation du cyanure chez les variants Ngb A90P<sub>red</sub> et Ngb F106L<sub>red</sub>

### i. Comparaison des résultats en RMN

Comme précédemment, la réactivité des variants sans pont disulfure a d'abord été évaluée en RMN pour une concentration de 0,5 mM en cyanure afin d'avoir un aperçu distinct du comportement de chaque forme isomère. Les résultats des paramètres d'ajustement sont comparés aux valeurs obtenues pour les variants avec pont disulfure (Tableau V. 10).

Chez les deux variants, la réduction du pont disulfure s'accompagne d'une diminution de la valeur des constantes pour les deux formes isomères de l'hème. La diminution est cependant plus marquée chez la forme isomère A de la Ngb A90P<sub>red</sub> qui est environ 4,5 fois plus faible que lorsque le



Le pont disulfure est présente. Dans les autres cas la diminution est seulement d'un facteur 2 environ. La réactivité des variants est donc plus faible lorsque le pont disulfure est réduit. De plus, chez les deux variants, les constantes des formes isomères A et B sont égales lorsque le pont disulfure est réduit. La Ngb F106L<sub>ox</sub> présente également ce phénomène mais ce n'est pas le cas de la Ngb A90P<sub>ox</sub>. Le pont disulfure contribue donc à la différence de réactivité entre les deux formes isomères.

	$k_{1,A} + k_{2,A} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{1,B} + k_{2,b} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Ngb WT <sub>ox</sub>	$(7,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-04}$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-04}$
Ngb WT <sub>red</sub>	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-04}$	$(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-04}$
Ngb A90P <sub>ox</sub>	$(3,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
Ngb A90P <sub>red</sub>	$(0,83 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(0,44 \pm 0,16) \cdot 10^{-4}$
Ngb F106L <sub>ox</sub>	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$
Ngb F106L <sub>red</sub>	$(0,67 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	$(0,58 \pm 0,03) \cdot 10^{-4}$

**Tableau V. 10- Constantes de fixation du cyanure (C = 0,5 mM) et leurs écarts types déterminées en RMN pour les formes isomères A ( $k_{1,A} + k_{2,A}$ ) et B ( $k_{1,B} + k_{2,b}$ ) de la Ngb WT<sub>ox</sub>, Ngb WT<sub>red</sub>, Ngb A90P<sub>ox</sub>, Ngb A90P<sub>red</sub>, Ngb F106L<sub>ox</sub> et Ngb F106L<sub>red</sub>.**

Par comparaison avec la Ngb WT<sub>red</sub>, les constantes obtenues pour les différentes formes isomères des variants sans pont disulfure sont égales à la constante obtenue pour la forme isomère B de la Ngb WT<sub>red</sub>. L'impact de la réduction du pont disulfure est donc indépendant de la mutation effectuée pour la forme isomère B. En revanche, pour la forme isomère A, il y a un couplage entre l'effet de la mutation et la réduction du pont disulfure, qui contribuent tous deux à diminuer la réactivité de la forme isomère A.

ii. Influence de la concentration en cyanure

Les expériences en UV-Visible ont d'abord été réalisées à 0,5 mM en cyanure. Comme dans les parties précédentes, il n'a été possible que d'ajuster les courbes expérimentales obtenues avec un modèle en mono-exponentielle. Cela s'explique par la réactivité égale des deux formes isomères observées à 0,5 mM en RMN pour les deux variants. En revanche, contrairement aux variants avec pont disulfure, le comportement des deux formes isomères de l'hème ne se distingue pas plus avec l'augmentation de la concentration en cyanure. Même à des concentrations élevées en cyanure, les courbes expérimentales ont été ajustées avec un modèle en mono-exponentielle (Figure V. 14).

Les évolutions des constantes  $k$  du modèle cinétique en mono-exponentielle pour la Ngb A90P<sub>red</sub> et la Ngb F106L<sub>red</sub> sont linéaires. Les coefficients directeurs calculés sont :

$$p(\text{Ngb A90P}_{\text{red}}) = 0,18 \pm 0,04 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$p(\text{Ngb F106L}_{\text{red}}) = 0,08 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

La constante  $p$  de la Ngb A90P<sub>red</sub> est similaire à la constante  $p_B$  ( $0,12 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) de la forme isomère B de la Ngb A90P<sub>ox</sub>. De même la constante  $p$  de la Ngb F106L<sub>red</sub> est identique à la constante  $p_{2,B}$  ( $0,10 \pm 0,03 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) de la forme isomère B de la Ngb F106L<sub>ox</sub>.

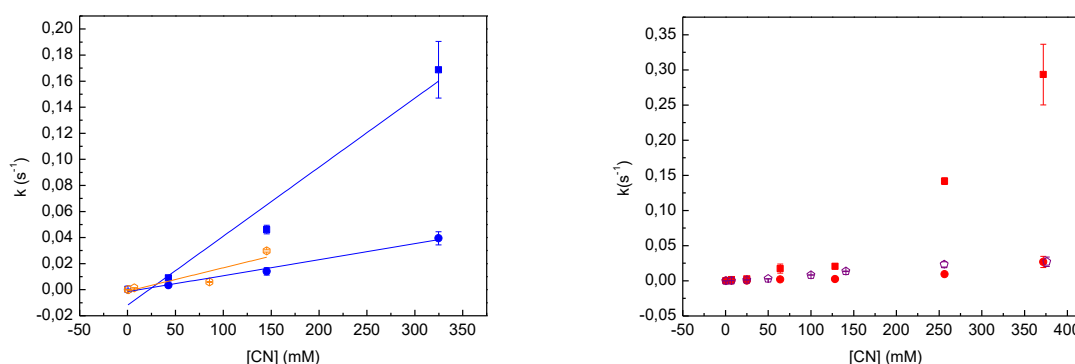


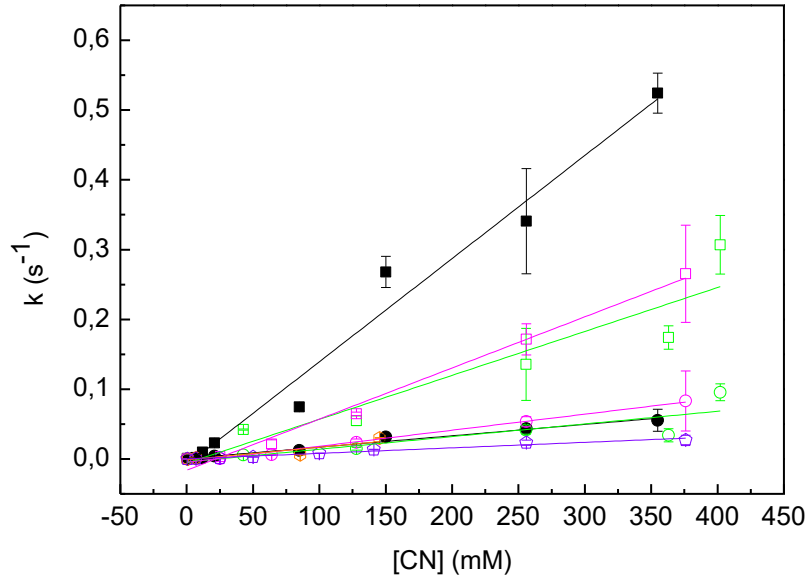
Figure V. 14- Evolution des constantes cinétiques  $k_A$  et  $k_B$  en fonction de la concentration en cyanure pour la Ngb A90P<sub>ox</sub> ( $k_A$  : carré bleu et  $k_B$  : rond bleu), la Ngb A90P<sub>red</sub> (hexagone orange), la Ngb F106L<sub>ox</sub> ( $k_A$  : carré rouge et  $k_B$  : rond rouge) et la Ngb F106L<sub>red</sub> (pentagone violet). Les droites des régressions linéaires de la la Ngb A90P<sub>ox</sub> (bleu), et de la Ngb A90P<sub>red</sub> (orange) ont été tracées.

Le fait que l'ajustement des courbes, quelque soit la concentration en cyanure, ne soit possible que par une mono-exponentielle peut avoir deux origines. La première hypothèse serait que l'une des deux formes n'est plus assez réactive pour être détectée par le logiciel. Le coefficient directeur  $p$  de l'évolution du paramètre  $k$  en fonction de la concentration en cyanure deviendrait donc trop faible. Cependant, les résultats des cinétiques en fonction de la concentration en cyanure obtenus sur les autres variants et les résultats de RMN pour la Ngb A90P<sub>red</sub> et la Ngb F106L<sub>red</sub> indiquent d'une part que la réactivité de la forme isomère B n'est en général pas impactée par les mutations ou la réduction du pont disulfure et d'autre part que la réactivité de la forme isomère A diminue et tend vers la réactivité de la forme isomère B.

La deuxième hypothèse possible, que nous retiendrons, est que dans le cas des variants Ngb A90P<sub>red</sub> et Ngb F106L<sub>red</sub> les formes isomères A et B ont un comportement identique, comme en RMN, quelque soit la concentration en cyanure. Ainsi la forme isomère B des deux variants n'est pas sensible à la réduction du pont disulfure car les constantes  $p$  sont égales. La réactivité de la forme isomère A est en revanche très diminuée ce qui indique un cumul des effets de la mutation et de la réduction du pont disulfure.

La comparaison des droites de l'évolution des constantes  $k_A$  et  $k_B$  en fonction de la concentration en cyanure pour les différentes espèces sans pont disulfure soulignent l'impact de la perte du pont disulfure lorsqu'elle est couplée à une mutation sur la forme isomère A (Figure V. 15). La forme isomère A de la Ngb WT<sub>red</sub> et de la Ngb C46G ont une pente intermédiaire entre la forme

isomère A de la Ngb WT<sub>ox</sub> et les formes isomères B. Dès que la perte du pont disulfure est couplée à une mutation, les pentes des formes isomères A sont encore plus faibles et deviennent identiques à celles des formes isomères B.



**Figure V. 15- Evolution des constantes cinétiques  $k_A$  et  $k_B$  en fonction de la concentration en cyanure pour la Ngb WT<sub>ox</sub> ( $k_A$  : carré plein noir,  $k_B$  : rond plein noir) la Ngb WT<sub>red</sub> ( $k_A$  : carré vide vert,  $k_B$  : rond vide vert) et la Ngb C46G ( $k_A$  : carré vide rose,  $k_B$  : rond vide rose), la Ngb A90P<sub>red</sub> (hexagone orange), et la Ngb F106L<sub>red</sub> (pentagone violet). Les droites des régressions linéaires de la Ngb WT<sub>ox</sub> (noir), de la Ngb WT<sub>red</sub> (vert), de la Ngb C46G (rose), de la Ngb A90P<sub>red</sub> (orange), et de la Ngb F106L<sub>red</sub> (violet) ont été tracées.**

Ces résultats mettent en évidence que la réactivité de la forme isomère A est très dépendante de la présence du pont disulfure et de la structure de la protéine, au contraire de la forme isomère B.

Chez la Ngb A90P<sub>ox</sub>, il a été montré en partie C.1.ii que la mutation peut influencer sur le mouvement de glissement de l'hème car celui-ci implique un mouvement de l'hélice F où se situe l'alanine 90 (A. Bocahut et al., 2009; Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). L'ajout d'un autre facteur potentiellement limitant vis-à-vis de la dynamique de l'hème, à savoir la réduction du pont disulfure, entraîne une totale perte de réactivité de la forme isomère A, qui devient aussi peu réactive que la forme isomère B.

Dans le cas de la Ngb F106L, il a été souligné en partie C.1.ii que cette mutation entraîne une réduction de la mobilité de la boucle CD couplée à une diminution de l'histidine distale (Xu et al., 2010). C'est donc un effet contraire à l'augmentation de la flexibilité de la boucle CD observée avec la réduction du pont disulfure (A. Bocahut et al., 2013; Guimaraes et al., 2014). La perte de réactivité de la forme isomère A peut alors s'expliquer soit par le fait que l'effet de la mutation sur la mobilité de la boucle CD est négligeable par rapport à la réduction du pont disulfure soit parce que l'effet de la mutation concerne une autre partie de la protéine. Notamment, comme il a été montré en partie C.1.ii, la mutation influe sur les acides aminés environnant l'hème lorsque celui-ci bascule, pouvant

## *Chapitre V : Etude de la fixation du cyanure*

contribuer à gêner ce mouvement. Ainsi, comme dans le cas de la Ngb A90P<sub>red</sub>, un cumul d'effets limitant le mouvement de l'hème semble à l'origine de la perte de réactivité de la forme isomère A.

- **Résumé**

Les cinétiques réalisées avec le pont disulfure réduit ont permis de mettre en évidence le rôle du pont disulfure dans le mécanisme de fixation du cyanure.

- La réduction du pont disulfure chez la Ngb WT (Ngb WT<sub>red</sub> et Ngb C46G) entraîne une diminution de la constante cinétique associée à la forme isomère A. La constante cinétique associée à la forme B n'est pas affectée. Le pont disulfure participe donc au mécanisme structural permettant la meilleure réactivité de la forme isomère A.
- L'effet est encore plus marqué lorsque la réduction du pont disulfure est couplée à une mutation. La constante cinétique associée à la forme isomère A devient similaire à la constante cinétique de la forme isomère B. La constante cinétique de la forme isomère B est en revanche peu impactée. Il y a donc un effet coopératif entre le pont disulfure et les acides aminés de l'environnement de l'hème qui participe à la meilleure réactivité de la forme isomère A.

## E. Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié les cinétiques de fixation du cyanure sur la Ngb WT et ses variants. Deux principaux objectifs ont été abordés. Les modèles et les paramètres cinétiques ont été mesurés par deux techniques différentes. Au travers des mutations et de la réduction du pont disulfure, les mécanismes à l'origine de la réactivité de la Ngb WT ont été analysés.

Nous avons montré que les paramètres cinétiques mesurés en RMN et UV-Visibles sont comparables pour une concentration de 0,5 mM en cyanure. Nous avons ainsi montré que le comportement en bi-exponentielle du signal observé lors d'expériences en de spectrophotométrie UV-Visible est dû à la présence des deux formes isomères de l'hème.

Ces deux formes n'ont pas la même réactivité. La forme isomère A est plus réactive que la forme isomère B. La réactivité de la forme isomère A est régie par un mécanisme structural permettant un positionnement optimal de l'hème pour fixer un ligand. Il implique plusieurs facteurs. Il s'opère lorsque l'hème est hexacoordiné, que ce soit par l'histidine 64 ou la lysine 67. En revanche, pour la Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau, la fixation du cyanure semble se réaliser via un mécanisme comparable à celui classique d'« histidine-gate ». La présence de l'H64 chez la Ngb WT<sub>ox</sub> est donc un élément nécessaire, voir déclenchant, du mécanisme de fixation de ligands.

De plus, ce mécanisme implique la participation de différentes parties structurales de la protéine. La réduction du pont disulfure, couplée à une mutation entraîne une perte significative de la réactivité de la forme isomère A. Un effet coopératif entre le pont disulfure et les acides aminés au voisinage de l'hème est donc mis en jeu pour que la fixation du cyanure se déroule de façon efficace.

Les mutations H64V et F106L affectent également la réactivité de la forme isomère B. Elle est aussi dirigée par ce mécanisme mais de façon moins efficace. Notamment, la constante cinétique associée à la fixation du CN sur de la forme isomère B dans le cas de la Ngb A90P ou dans les cas de la Ngb WT<sub>red</sub> et Ngb C46G n'est pas impactée. Ces éléments structuraux qui participent à la réactivité de la forme isomère A n'ont donc pas d'effet sur la réactivité de la forme isomère B.

## **Chapitre VI : Discussion et conclusion**





Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'une étude structurale de la neuroglobine humaine, une protéine principalement située dans le cerveau et la rétine et dont le rôle demeure encore inconnu (Burmester et al., 2000). Elle possède une séquence en acides aminés particulières vis-à-vis des autres globines. Plusieurs spécificités structurales sont associées à cette séquence (Chapitre I). Cependant les relations entre ces spécificités et les fonctions de la Ngb sont encore mal déterminées. L'objectif de cette thèse a alors été de montrer l'influence d'éléments structuraux sur les propriétés et la réactivité de la Ngb. Pour ce faire, les mutations A90P, C46G, F106L et H64V situées au niveau de positions et de rôles particuliers au sein de la Ngb ont été réalisées (Chapitre III). Au travers des expériences, nous avons alors pu montrer que différents facteurs régulaient la structure secondaire de la Ngb. Cela permet à la Ngb de mettre en jeu un mécanisme structural particulier lors de la fixation de ligands. Le pont disulfure et l'hexacoordination réalisée par l'histidine distale y ont un rôle primordial. Ce mécanisme structural rend une forme isomère de l'hème plus efficace lors de la fixation de ligands, ce qui pose la question de l'existence *in vivo* de ces deux formes isomères.

- **Une structure secondaire façonnée par différents acides aminés**

Malgré une séquence en acides aminés peu identique aux autres globines, la Ngb WT conserve une structure tridimensionnelle relativement superposable à celles de la Mb WT et de l'Hb WT. La Ngb WT possède donc des acides aminés particuliers qui influent sur sa structure, la faisant correspondre aux autres globines.

Un premier élément important que nous avons mis en évidence dans la structuration de la Ngb est la présence du pont disulfure. Les caractérisations que nous avons effectuées, notamment en DC, montrent que lorsque le pont disulfure est réduit, que ce soit chez la Ngb WT<sub>red</sub> ou chez les variants, il y a une diminution des structures de type boucle et désordonné au profit d'une structure en hélice  $\alpha$ . Les résultats de RMN chez les différentes protéines indiquent à chaque fois une perturbation de la structure de l'environnement de l'hème.

L'histidine 64 est un autre élément structurant d'importance. Sa mutation entraîne une perte de la stabilité de la protéine, avec un  $pH_{1/2}$  de dissociation de l'hème de 4,5 au lieu de 2,9 pour la Ngb WT<sub>ox</sub>. Une perte de la structure en hélices  $\alpha$  a également été observée à différents pH chez la Ngb H64V. L'hexacoordination avec l'hème participerait donc au maintien de la structure secondaire en hélices de la protéine.

Dans le cas de la Ngb A90P<sub>ox</sub>, les caractérisations spectroscopiques que nous avons effectuées montrent quelques différences avec la Ngb WT<sub>ox</sub>. Le spectre de DC montre une perte en hélices  $\alpha$  à pH 7,4. Ce résultat est en accord avec des observations faites sur l'effet d'une proline à cet emplacement sur des fragments d'acides aminés correspondant à l'hélice F chez la Mb ou chez la Ngb (Codutti et al., 2009; Picotti et al., 2004). L'alanine 90 de la Ngb WT<sub>ox</sub> a donc un effet structurant sur les hélices de la protéine. Elle semble aussi participer à la structuration du voisinage de l'hème et à son positionnement. Le spectre RMN de la Ngb A90P<sub>ox</sub> révèle un léger réarrangement de l'hème et de ses acides aminés environnants au sein de la protéine. De plus, lorsque cette mutation est couplée à la réduction du pont disulfure, la capacité de la protéine à fixer l'hème après dénaturation à pH acide est drastiquement diminuée au contraire de la Ngb WT<sub>ox</sub>.

Un fait remarquable que nous avons mis en évidence est que les différentes mutations, hormis la Ngb H64V, n'affectent pas ou peu les propriétés du site actif. Ni la réduction du pont disulfure, ni les mutations A90P et F106L ne provoquent de changements dans l'allure du spectre UV-Visible. Les propriétés de dissociation de l'hème vis-à-vis du pH sont d'ailleurs bien conservées. Seuls les coefficients d'extinction molaire sont modifiés. Ils traduisent une perturbation de l'environnement électronique de l'hème résultante, comme nos observations précédentes, de modifications structurales de la protéine.

Le rôle des acides aminés A90 et F106 ainsi que du pont disulfure semble donc majoritairement intervenir sur la structure plutôt que sur les propriétés de l'hème. Nous allons d'ailleurs étudier dans la suite leurs influences dans le mécanisme structural à l'origine de la réactivité de la Ngb.

### • Un mécanisme structural régissant la fixation de ligands

Il a été mis en évidence grâce à l'étude cristallographique de la Ngb-CO de murine et par des simulations en dynamique moléculaire que la fixation de ligands s'accompagnait d'un glissement de l'hème au sein de la cavité distale (Anselmi et al., 2007, 2008; A. Bocahut et al., 2009; Nadra et al., 2008; Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004; Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). Ce glissement est accompagné de mouvements structuraux des hélices C à G ainsi qu'une modification des cavités en fonction de l'état de coordination de l'hème. Il permettrait un positionnement optimal de l'hème par rapport à une nouvelle cavité distale, formée lors de son glissement par association et déplacement de cavités au préalable en contact avec le solvant.

Les études de cinétiques réalisées pendant la thèse ont permis de fournir pour la première fois plusieurs preuves de la présence d'un tel mécanisme *in vitro* lors de la fixation d'un ligand, le cyanure, chez la Ngb humaine en solution.

En effet les cinétiques de fixation du cyanure sur la Ngb A90P et la Ngb F106L montrent que ces deux acides aminés sont impliqués dans la réactivité de la Ngb WT<sub>ox</sub>. Les mutations de ces deux acides aminés perturbent la réactivité de la cinétique, contribuant à rendre la fixation du cyanure, qui est l'étape cinétique limitante, moins efficace.

La mutation A90P affecte la structure secondaire en hélices, notamment en déstabilisant l'hélice F. Or le glissement de l'hème s'accompagne d'un mouvement important de l'histidine proximale F8 et par voie de conséquence de l'ensemble formé par les hélices F et G et la boucle FG (A. Bocahut et al., 2009; Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). Cette mutation fait alors ressortir l'importance structurale de l'hélice F dans ce mécanisme. La présence d'une alanine en position 90 permettrait d'assurer la structure nécessaire à l'hélice F pour effectuer son mouvement accompagnant le glissement de l'hème.

La présence inhabituelle, comparée à la Mb, de la F106 en position G5, n'induit pas de modifications structurales à pH physiologique qui pourraient expliquer la baisse de réactivité observée. Le rôle de cet acide aminé dans la cinétique de fixation de ligands est donc directement lié

au mécanisme de fixation en lui-même. Les études de cristallographie de la Ngb-CO de murine et de dynamique moléculaire de la Ngb humaine (Vallone, Nienhaus, Matthes, et al., 2004; Xu et al., 2010) montrent que la position de cet acide aminé est grandement affectée par le glissement de l'hème. Pour que l'hème bascule, il faut que la chaîne latérale de la F106 pivote hors de la zone proximale qu'elle occupe. Il y a donc une vraie corrélation entre les deux effets ce que corrobore le remplacement de la F106 par une leucine. En supprimant le groupement aromatique de la chaîne latérale, l'effet de la rotation de cette dernière serait perturbé, voire supprimé. Le mouvement intrinsèque de la structure, et donc de l'hème, en serait réduit. L'étape de fixation du ligand en serait affectée, contribuant, à basse concentration en cyanure, à l'apparition d'une phase cinétique plus lente que celle observée pour la Ngb WT<sub>ox</sub> aussi bien pour la forme isomère A que pour la forme isomère B.

L'A90 et la F106 interviennent donc dans les mouvements structuraux de la partie proximale de l'hème de la Ngb lors de la fixation de ligands. L'étude de la réduction du pont disulfure chez la Ngb WT et les variants nous a fourni une approche des mouvements structuraux de la partie distale de la protéine.

- **L'état d'oxydation du pont disulfure comme régulateur du mécanisme de la cinétique de fixation de ligand**

La participation de la boucle CD, comprenant le pont disulfure, a déjà été évoquée grâce à des études cristallographiques sur la Ngb humaine et la Ngb triplement mutée au niveau de ces trois cystéines (Guimaraes et al., 2014; A. Pesce et al., 2003) et à des études de dynamique moléculaire chez l'humain et la murine (Anselmi et al., 2007, 2008; A. Bocahut et al., 2009; Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). Le premier point important ayant été montré est que lorsque l'histidine distale effectue une rotation en se dissociant, cela provoque un rapprochement de la boucle CD vers l'hème. Elle pourrait alors interagir avec ce dernier, via notamment la tyrosine 44 et participer à son mouvement de bascule en le poussant vers l'intérieur de la protéine. Un deuxième point abordé est que la boucle CD est structurée par la présence du pont disulfure entre les cystéines 46 et 55. La réduction du pont disulfure entraîne notamment une flexibilité accrue de la boucle CD et une meilleure affinité de l'histidine 64 pour l'hème, ce qui empêcherait sa dissociation.

Nous avons étudié pendant la thèse l'effet *in vitro* de la réduction du pont disulfure sur les cinétiques de fixation du cyanure chez la Ngb WT<sub>red</sub> et chez les différents variants. Nous avons également analysé la réactivité du variant Ngb C46G où le pont disulfure est absent afin de servir de comparaison.

Nos résultats montrent que la réduction du pont disulfure contribue à diminuer la réactivité de la cinétique de fixation du cyanure chez la Ngb WT ou chez les variants. Ces observations semblent confirmer l'implication de la boucle CD, structurée par le pont disulfure, dans le mécanisme structural à l'origine du glissement de l'hème. La boucle CD, lorsque le pont disulfure est réduit, perdrait donc sa structure native ce qui peut diminuer ses interactions avec l'hème, notamment celle de la tyrosine 44 avec les groupements propionates. Ainsi, le mécanisme de glissement de l'hème en

partie assurée par l'interaction de la boucle CD avec ce dernier lorsque l'histidine distale se dissocie serait perturbé par la modification de la boucle CD.

Le mécanisme de glissement de l'hème est donc la résultante d'un effet coopératif entre le mouvement de la boucle CD et les mouvements d'acides aminés voisins de l'hème (Figure VI. 1). La boucle CD participerait à pousser l'hème vers l'intérieur de la protéine. Le mouvement de la chaîne latérale de la F106, repoussée par le glissement de l'hème, permettrait alors d'ouvrir la cavité proximale. Enfin le mouvement de l'hème serait facilité par la structure de l'hélice F portant l'histidine proximale.

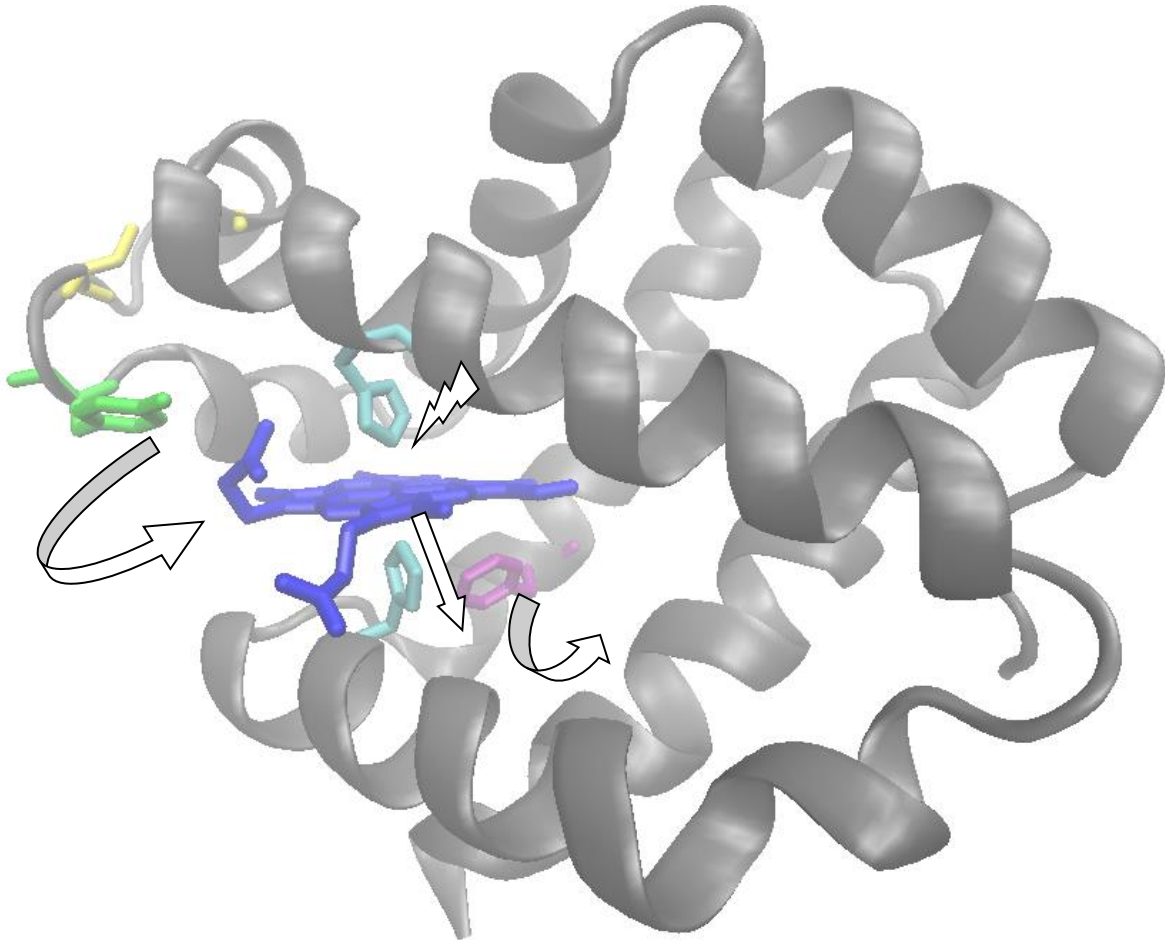


Figure VI. 1- Structure de la Ngb avec l'hème (bleu foncé), les histidines distale et proximales (bleu clair), la tyrosine 44 (vert), les cystéines 46 et 55 formant le pont disulfure (jaune) et la phénylalanine 106 (violet). L'éclair illustre la dissociation de l'histidine distale. Les flèches indiquent les mouvements mis en jeu.

Dans ce mécanisme structural, la dissociation de l'histidine distale représenterait une étape clé pour initier le mouvement de l'hème.

- **L'héxacoordination de l'histidine distale serait un facteur déterminant de ce mécanisme ... peut-être déclenchant ?**

## Chapitre VI : Discussion et conclusion

Les résultats de la cinétique de fixation du cyanure sur différentes globines sont reportés ci-dessous (Tableau VI. 1). La réactivité des deux formes isomères A et B de la Ngb WT<sub>ox</sub> est beaucoup plus faible, d'un facteur 100 et 1000 respectivement, que celles mesurées pour d'autres globines.

Afin de comparer, la fixation du cyanure a aussi été étudiée chez la Ngb H64V<sub>ox</sub>. Dans le cas de ce variant, nous avons déterminé trois constantes cinétiques. Nous avons pu attribuer deux de ces constantes,  $k_A$  et  $k_B$ , à la réaction du cyanure sur les formes isomères de l'hème hexacoordiné par la lysine 67. La troisième constante,  $k$ , représente la fixation du cyanure sur l'hème hexacoordiné par une molécule d'eau de la Ngb H64V<sub>ox</sub>. Il s'agit de la forme majoritaire en solution. La valeur déterminée pour cette constante est comparable à celles des autres globines.

La Ngb H64V avec l'hème hexacoordiné par une molécule d'eau est la forme qui se rapproche le plus, d'un point de vue coordination de l'hème, de la Mb. La réactivité de la forme majoritaire de la Ngb H64V<sub>ox</sub>, comparable à la réactivité de la Mb WT, pourrait donc s'expliquer par un mécanisme d'« histidine gate » semblable à celui de la Mb. Ce mécanisme consiste en la rotation de l'histidine E7 ouvrant la cavité distale au ligand externe (Bolognesi et al., 1982; Johnson et al., 1989; Ringe et al., 1984).

	$k$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	$k_A$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	$k_B$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )
Ngb WT <sub>ox</sub> (humaine)		$1,5 \pm 0,1$	$0,16 \pm 0,01$
Ngb H64V <sub>ox</sub> (humaine)	$250 \pm 10$	$68 \pm 2$	$1,5 \pm 0,1$
Mb WT (humaine)*	230		
Mb H64V (humaine)*	28		
Mb WT (grand cachalot)*	320		
Mb H64V (grand cachalot)*	21		
Hb tétramère (humaine)**	110		
Hb chaîne- $\alpha$ (humaine)***	170		
Hb chaîne- $\beta$ (humaine)***	160		

\*(Dou et al., 1996), pH 7,0, 20 °C

\*\* (Gibson, Parkhurst, & Geraci, 1969), pH 7,0, 20 °C

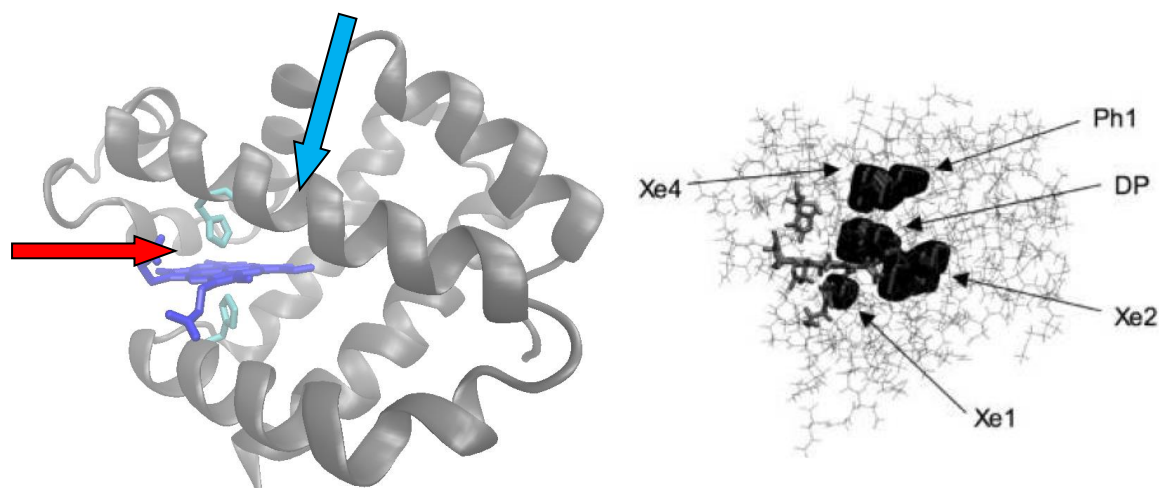
\*\*\* (Gibson et al., 1969), pH 6,05, 20 °C

**Tableau VI. 1- Constantes cinétiques de fixation du cyanure sur différentes globines. La constante  $k$  désigne les constantes cinétiques dans les cas où la différence de réactivité des deux formes isomères n'est pas distinguable. Les constantes  $k_A$  et  $k_B$  désignent les réactivités des formes isomères A et B respectivement. Les conditions expérimentales pour la Ngb WT<sub>ox</sub> et la Ngb H64V<sub>ox</sub> sont pH 7,4, 25 °C.**

Dans le cas de la Ngb H64V<sub>ox</sub> nous avons montré par DC que la perte de la structuration en hélices  $\alpha$  se fait au profit de structures de type boucle ou désordonné, plus labiles que les hélices  $\alpha$ . Ces observations peuvent être associées à la création de cavités particulières au variant, et plus généralement à une meilleure exposition à des ligands externes de l'hème de la protéine. Il a notamment été montré lors de simulations chez la Ngb H64V de souris (Xu et al., 2011), que la mutation entraîne une augmentation importante en taille de la cavité Phantom 1 située au-dessus de la partie distale de l'hème.

L'approche du ligand chez la Ngb H64V se ferait donc potentiellement via la cavité Phantom 1 ouverte grâce à la mutation. Il s'agit d'une voie d'accès différente de celle mise en jeu chez la Mb

(Figure). Chez la Mb, le remplacement de l'histidine par une valine diminue la réactivité de fixation du cyanure d'un facteur 10 environ (Tableau VI. I). Il a été montré que c'était dû à une augmentation du caractère apolaire de la cavité d'accès à l'hème à cause de la chaîne latérale de la valine qui se situe dans cette cavité (Gibson et al., 1969). Dans le cas de la Ngb H64V<sub>ox</sub>, la réactivité étant identique à celle de la Mb WT, cela signifie que la cavité d'accès ne comprend pas la chaîne latérale de la valine. La cavité Phantom 1 pourrait correspondre.



**Figure VI. 2-** A gauche : Schéma représentatif de la direction d'approche d'un ligand externe chez la Mb WT (flèche rouge) et de la potentielle direction d'approche d'un ligand externe chez la Ngb H64V<sub>ox</sub> (flèche bleue). La structure tridimensionnelle représentée est celle de la Ngb WT avec l'hème (bleu foncé) et les histidines distale et proximale (bleu clair). A droite : Structure de la Ngb WT<sub>ox</sub> dans sa forme pentacoordinée (H64 dissociée) obtenue par dynamique moléculaire. Les cavités représentées sont la cavité distale (DP), les cavités xénon 1 (Xe1), xénon 2 (Xe2) et xénon 4 (Xe4) et la cavité Phantom (Ph1) (A. Bocahut et al., 2009).

Ainsi la Ngb H64V<sub>ox</sub> et la Ngb WT<sub>ox</sub> possèderaient des réactivités différentes à cause de la nature du mécanisme régulant la fixation de ligands. L'élément déclenchant pour l'exécution d'un mécanisme plutôt que l'autre serait alors la présence d'un ligand distal endogène. Sa dissociation requerrait un mécanisme particulier, propre à la Ngb.

Les résultats obtenus pour les cinétiques de fixation du cyanure sur la Ngb H64V hexacoordinée par la lysine 67 vont dans ce sens. Ce cas est comparable au schéma réactionnel de la Ngb WT<sub>ox</sub> dans la mesure où l'hème y est également hexacoordiné par un ligand endogène. Les valeurs des constantes cinétiques pour chaque forme isomère ont été déterminées (Tableau VI. 1). La réactivité est meilleure que pour la Ngb WT<sub>ox</sub> mais reste inférieure à la réactivité de la Ngb H64V hexacoordinée par une molécule d'eau.

La lysine 67 se situe au niveau des résidus frontières de la cavité distale formée lors du glissement de l'hème (A. Bocahut et al., 2009; Orłowski & Nowak, 2008). Ainsi l'hème hexacoordiné par la lysine 67 demeure dans une position déjà partiellement orientée vers la position finale qu'il occupe lors du glissement. Ceci explique potentiellement la meilleure réactivité obtenue pour les deux formes isomères.

Il faut néanmoins souligner l'intervention d'autres facteurs possibles. Tout d'abord l'affinité de la lysine 67 pour l'hème est probablement plus faible que celle de l'histidine 64 ce qui fait qu'elle peut se dissocier plus facilement. Enfin nous avons discuté dans le point précédent de la création d'une cavité facilitant l'acheminement du ligand vers l'hème par rapport à la Ngb WT ce qui pourrait aussi expliquer une meilleure réactivité.

Le mécanisme expliquant la réactivité de la Ngb WT serait donc dû à un effet coopératif de différents éléments structuraux sur le positionnement de l'hème. Cet effet serait initié par la rupture de la liaison du ligand distal endogène. L'hème est alors dirigé vers l'intérieur de la protéine, dans une position plus optimale pour la fixation de ligands. Cependant, ce mécanisme semble dépendant de la forme isomère de l'hème.

### • Une forme isomère A plus réactive

L'hème de la Ngb existe sous deux formes isomères obtenues par une rotation de 180° autour de l'axe  $\alpha$ - $\gamma$  de l'hème (Du et al., 2003; Xu et al., 2009). Des études en RMN (A. Bocahut et al., 2013) ont également permis de mettre en évidence des cinétiques de fixation du cyanure différentes en fonction de la forme isomère de l'hème en suivant l'évolution dans le temps de signaux caractéristiques de chaque forme isomère. Les analyses de cinétiques de fixation de ligands avec des techniques exploitant les domaines de l'UV-Visible ou de la fluorescence présentent la difficulté de ne pas posséder des signaux propres à chaque forme isomère. L'influence des deux formes isomères sur les résultats a été avancée parmi d'autres facteurs sans être formellement établie (S. Dewilde et al., 2001; A. Fago, Mathews, A. J., Dewilde, S., Moens, L., Brittain, T., 2006; Herold et al., 2004; Smagghe et al., 2006).

Nous avons établi durant la thèse des modèles cinétiques correspondant à chaque technique employée. La comparaison entre les résultats à une même concentration en cyanure pour la RMN et la spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps nous a permis de valider un modèle cinétique en bi-exponentielle reflétant la réactivité de chaque forme isomère pour la spectrophotométrie UV-Visible résolue en temps. Les résultats des constantes cinétiques de l'évolution obtenus pour la Ngb WT<sub>ox</sub> confirment la réactivité différente des deux formes isomères observées en RMN. La forme isomère A est plus réactive que la forme isomère B. Les constantes cinétiques de la fixation du cyanure déterminées pour les formes isomères A et B sont respectivement  $1,5 \pm 0,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $0,16 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

La Ngb est la première globine à avoir été identifiée avec une forte proportion des deux formes isomères (A. Bocahut et al., 2013; Du et al., 2003; Xu et al., 2009). Chez l'Hb ou la Mb humaines, la présence des deux formes isomères a aussi été identifiée à l'état sauvage (Gerd N. La Mar, 1984; Ishikawa, Takahashi, Ishimori, & Morishima, 2004; Jue & La Mar, 1984; La Mar, Yamamoto, Jue, Smith, & Pandey, 1985). Cependant à l'équilibre, les proportions sont nettement en faveur de la forme isomère A présente de 90 % à 98 % en fonction des espèces. Des proportions identiques à celles trouvées pour la Ngb sont trouvées dans le cas de globines recombinées, c'est-à-dire formées par insertion de l'hème dans la forme apo-globine (Docherty & Brown, 1982; Jue & La

Mar, 1984; La Mar et al., 1978; Shulman et al., 1969; Yee & Peyton, 1991). Néanmoins, ni les formes de Hb ou Mb sauvages, ni les protéines recombinées ne montrent de réactivités différentes en fonction des formes isomères (Aojula et al., 1987; Light et al., 1987; Rwere, Mak, & Kincaid, 2008).

La différence de réactivité entre les deux formes isomères semble être attribuable au mécanisme de glissement de l'hème. En effet, lorsqu'un élément structural intervenant dans ce mécanisme est modifié, la réactivité de la forme isomère A est à chaque fois la plus perturbée. Notamment la réduction du pont disulfure entraîne une diminution de la réactivité de la forme isomère A alors que la forme isomère B ne semble pas affectée. Lorsque la réduction du pont disulfure est de plus couplée à la mutation F106L ou A90P, la réactivité de la forme isomère A devient équivalente à celle de la forme isomère B alors que la réactivité de la forme isomère B n'est toujours pas affectée.

La forme isomère A est donc plus dépendante du glissement de l'hème que la forme isomère B. La forme isomère B semble tout de même régie par ce mécanisme puisque les mutations F106L et H64V ont un impact sur sa réactivité. Le mécanisme régulant la fixation de ligand serait donc plus efficace pour la forme isomère A que pour la forme isomère B.

Cette différence d'efficacité peut potentiellement s'expliquer par des interactions différentes entre les chaînes latérales de l'hème et les acides aminés environnant. Les études en RMN sur les formes isomères de la Ngb WT<sub>ox</sub> (Anthony Bocahut, 2011; Du et al., 2003; Xu et al., 2009) montrent que l'interaction de l'hème avec les acides aminés dans le proche voisinage (F42, F106, G93, V101 et W148) dépend de l'emplacement des groupements méthyles, vinyles et propionates latéraux de l'hème et donc de la forme isomère concernée. Les études de ces interactions après fixation du cyanure révèlent que pour la forme isomère A, la plupart des interactions entre l'hème et les acides aminés voisins sont rompues alors que pour la forme isomère B la plupart de ces interactions sont conservées. Il semble donc que le mouvement de glissement de la forme isomère A soit plus conséquent que pour la forme isomère B. Une étude en dynamique moléculaire vient appuyer ces observations (A. Bocahut et al., 2013). Il y est décrit que l'encombrement stérique des chaînes latérales de l'hème de la forme isomère B est plus important au niveau de la cavité où l'hème bascule que pour la forme isomère A, ce qui gênerait donc son basculement.

La Ngb WT<sub>ox</sub> posséderait donc un mécanisme régulant la fixation de ligands unique. L'efficacité de ce mécanisme dépendant de la forme isomère de l'hème, l'existence des deux formes *in vivo* est une piste à explorer quant à ses potentielles fonctions.

### • Implications *in vivo*

#### Existence des deux formes isomères de l'hème

L'existence *in vivo* de Ngb présentant deux formes isomères de l'hème avec une réactivité différente est d'un intérêt biologique significatif. Il a déjà été montré chez l'Hb que la présence de deux formes isomères de l'hème pouvait induire une modification du taux d'auto-oxydation de l'hème ainsi qu'une modification de l'affinité de certains ligands (Yamamoto & La Mar, 1986).



Cependant, comme nous l'avons présenté au point précédent, la Mb et l'Hb expriment à l'équilibre une forme largement majoritaire, à plus de 90 %, qui correspond à la forme isomère A de la Ngb. Les expériences menées sur des globines recombinées exprimant un taux plus élevé de forme isomère B montrent que les proportions tendent vers l'équilibre où la forme A prédomine en l'espace de 24 heures (La Mar et al., 1985; Yamamoto & La Mar, 1986).

Par analogie, il serait tentant de postuler que la Ngb peut également atteindre un état d'équilibre où la forme A, qui est la forme la plus réactive et dépendante du mécanisme structural particulier de glissement de l'hème, se retrouve en proportion largement majoritaire. Cependant Du et al. (Du et al., 2003) ont montré lors de leur étude par RMN que la proportion des deux formes isomères demeure stable sur plusieurs mois. Une étude sur de la Mb recombinée mutée en I107 (G8) (Ishikawa et al., 2004) a permis de mettre en évidence que le mécanisme de conversion de la forme isomère B en forme isomère A se produit à l'intérieur de la protéine. Ils ont également montré que la mutation I107F bloque le mécanisme de retour à l'équilibre. La taille importante de la cavité de l'hème de la Ngb (Du et al., 2003; A. Pesce et al., 2003; Vallone, Nienhaus, Brunori, et al., 2004) est l'un des facteurs supposé du manque de sélectivité des formes isomères. Elle pourrait être également un facteur permettant un déplacement de l'équilibre des proportions des deux formes isomères. Cependant, l'hexacoordination de l'histidine distale 64 et la présence de la F106 (G5) sont probablement deux facteurs stériques empêchant un tel déplacement d'équilibre de se produire *in vitro*. Il serait intéressant d'observer chez les variants H64V et F106L si une modification des proportions des deux formes isomères survient au cours du temps.

Nous avons testé durant la thèse si la réversibilité du phénomène d'entrée/sortie de l'hème par dénaturation/renaturation en condition acide affectait les proportions des formes isomères de l'hème. Le phénomène est pratiquement réversible dans le cas de la Ngb WT avec ou sans pont disulfure. Les proportions obtenues sont identiques aux proportions initiales. En revanche, dans le cas des mutations A90P et F106L, les proportions finales obtenues sont différentes. Cependant l'intensité finale des signaux étant également plus faible que les intensités initiales, des facteurs cinétiques et thermodynamiques sont à prendre en compte. Le processus de réinsertion de l'hème au sein de l'apo-Ngb est incomplet. Ces résultats indiquent néanmoins clairement que ces acides aminés, situés au proche voisinage de l'hème, participent à l'équilibre des formes isomères A et B observé chez la Ngb WT.

Les proportions des deux formes isomères ont été comparées entre de l'Hb produite par des globules rouges humains et de l'Hb produite par de la levure (Mathews & Brittain, 2001). Leurs résultats montrent qu'à l'état initial, les proportions des deux formes isomères chez de l'Hb extraite des globules rouges sont différentes de celles d'Hb extraite à partir de la levure. Ils suggèrent donc que lors de la production d'Hb *in vivo*, l'insertion de l'hème dans l'apo-Hb est régie par un mécanisme stéréochimique. Un tel mécanisme pourrait aussi survenir *in vivo* pour la production de la Ngb, permettant la production préférentielle d'une forme isomère.

### Stabilité de la Ngb

Un point intéressant soulevé par Mathews et al. (Mathews & Brittain, 2001) est que l'exposition de l'Hb à un milieu de stress oxydant peut accélérer la réaction de retour à l'équilibre des proportions des formes isomères. Dans l'hypothèse où un tel comportement fonctionnerait aussi pour la Ngb, cela exige qu'elle soit suffisamment stable dans des conditions oxydantes. Il a été

montré que la mutation de l'histidine distale en leucine entraîne une perte de la stabilité de la protéine vis-à-vis du stress oxydant (Ezhevskaya, Trandafir, Moens, Dewilde, & Van Doorslaer, 2011). La stabilité de la Ngb serait donc due en particulier à la présence de l'histidine distale.

Nous pouvons établir un parallèle avec les études de stabilité en fonction du pH qui ont été réalisées durant la thèse. Il a été mis en évidence que les acides aminés H64 et A90 participent à abaisser le  $pH_{1/2}$  de dissociation de l'hème de la Ngb ainsi qu'à maintenir sa structure secondaire en hélices  $\alpha$  dans des conditions acides. Alors que la Ngb partage une structure tridimensionnelle semblable aux autres globines, elle voit donc sa stabilité accrue vis-à-vis des autres globines, comme la Mb humaine (Picotti et al., 2009).

L'hexacoordination réalisée par l'histidine distale est le facteur majeur impliqué dans la stabilité de la protéine comme le montre nos études en fonction du pH ainsi que d'autres études en fonction de la température et du pH (D. Hamdane et al., 2005; Picotti et al., 2009). Un autre effet coopératif a été mis en évidence (A. Bocahut et al., 2013). Il implique le pont disulfure et l'histidine distale dont l'affinité à l'hème est renforcée par la réduction du pont disulfure. Un fait intéressant est que le remplacement par ingénierie moléculaire (Boron et al., 2015; Wu et al., 2016) de la boucle CD chez la Mb humaine pour recréer un pont disulfure comme chez la Ngb permet d'obtenir une Mb partiellement hexacoordinée, à la stabilité accrue. En revanche, le remplacement de la boucle CD chez la Ngb par celle de la Mb n'affecte pas l'état de coordination de l'hème de la Ngb, qui reste donc hexacoordiné. Cependant, les études de cinétique de fixation du CO sur la Ngb modifiée montrent que la constante de dissociation de l'histidine distale est plus élevée. L'affinité de l'histidine distale y est donc plus faible. La comparaison avec les résultats de Bocahut et al. (A. Bocahut et al., 2013) montre que le pont disulfure n'est pas le seul élément de la boucle CD à être impliqué dans l'équilibre des formes hexacoordinée/pentacoordinée de l'hème. Cela va dans le sens de l'implication de résidus comme la tyrosine 44 dans le mouvement de glissement de l'hème (Xu et al., 2010).

### **Contrôle oxydant *in vivo* du pont disulfure**

Nos résultats montrent toutefois que l'état d'oxydation du pont disulfure joue un rôle essentiel dans le mécanisme de fixation de ligands, notamment en contribuant à rendre la forme isomère A plus réactive.

Le pont disulfure pourrait donc être impliqué dans un système d'oxydoréduction régulateur. En fonction des conditions oxydantes du milieu ou en fonction de la présence d'un partenaire d'oxydoréduction, la capacité de la Ngb à interagir avec des ligands serait affectée. Une telle approche a été suggérée pour des travaux *in vitro* sur la capacité de la protéine à fixer l'anion superoxyde (Yamashita et al., 2014). Il est montré que la Ngb n'est capable de fixer l'anion superoxyde seulement lorsque le pont disulfure est formé. Ils postulent alors qu'en condition physiologique normale, la protéine demeure à un état réduit aussi bien pour le fer que pour le pont disulfure. En cas d'augmentation des conditions oxydantes, la protéine passerait à un état  $Fe^{3+}$  avec pont disulfure capable de fixer l'anion superoxyde.

Le maintien de la protéine dans un état réduit pour le fer et le pont disulfure nécessite la présence d'un partenaire d'oxydoréduction. Un tel partenaire n'a pas encore été identifié *in vivo*. Cependant il a été montré que de la Ngb ferrique incubée dans le cytosol de cellules neuronales (Brittain & Skommer, 2012; A. Liu & Brittain, 2015) et aussi dans E.Coli (Moschetti et al., 2009) est

réduite efficacement en Ngb ferreuse. Une autre étude *in vitro* a montré que le système (Giuffrè, 2008) d'oxydoréductase NADH : flavuobredoxine pouvait également réduire efficacement la Ngb.

- **Perspectives**

Deux points essentiels seraient donc intéressants à vérifier lors d'études *in vivo*. Tout d'abord, nous venons de discuter de l'importance du pont disulfure et de son état d'oxydation. La recherche d'un partenaire *in vivo* capable de contrôler le pont disulfure de la protéine peut s'avérer essentiel pour déterminer le rôle potentiel de la Ngb dans son interaction avec des ligands.

De plus, comme nous en avons discuté plus haut, l'existence *in vitro* de deux formes isomères aux réactivités différentes chez la Ngb relève d'une particularité propre à la protéine. La démonstration de l'existence de ces deux formes isomères ou seulement d'une forme isomère particulière pourrait donner plus d'indications sur les fonctions potentielles de la Ngb. En effet, si contrairement à l'Hb ou la Mb, la Ngb demeurait en solution avec des proportions significatives des deux formes isomères, cela suggérerait que la Ngb est impliquée dans un mécanisme nécessitant une réactivité en deux étapes ou alors que son rôle n'est pas de fixer des ligands. Grâce à la RMN et les signaux caractéristiques fortement déblindés de la Ngb, l'existence des formes isomères de la Ngb sur des extraits cellulaires *in vivo* pourrait être vérifiée.

Enfin, nos résultats soulignent l'importance potentielle de plusieurs autres acides aminés. Notamment la tyrosine 44, sur la boucle CD, jouerait un rôle capital dans le mécanisme de glissement de l'hème en aidant à diriger l'hème vers l'intérieur de la protéine. De nouvelles études de caractérisation et de cinétiques de fixation de ligands sur le comportement de variants de ces acides aminés pourraient venir confirmer le mécanisme avancé.

## **Annexes**

## Annexe A : Protocole d'utilisation de la colonne de Ni-Nta

Mettre la solution en contact avec la résine Nickel (environ 20 mL) dans une bouteille de 100 mL. Agiter pendant 1h à 4°C en chambre froide.

En chambre froide, déposer la solution dans la colonne.

Laver avec un tampon Tris HCl (10 mM) + Imidazole (5mM, pH7,5) jusqu'à ce que l'absorbance à 280nm soit inférieur à 0,1.

Laisser reposer la colonne pour la nuit puis le lendemain reprendre le lavage jusqu'à ce que l'absorbance à 280nm soit de nouveau inférieur à 0,1.

Eluer avec du tampon Tris HCl (50 mM) + 300 mM imidazole pH8,5.

Récupérer les fractions et évaluer le rapport  $A_{Soret}/A_{280}$

Mélanger ensemble les fractions les plus pures, c'est-à-dire un rapport compris entre 2 et 3 et qui sont les plus concentrées.

Exemple d'une purification de Ngb WT.

Fraction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Dilution	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
$A_{Soret}$	0,025	0,17	0,23	0,21	0,53	0,60	0,55	0,52	0,45	0,45	0,098
$A_{280}$	-	0,077	0,1	0,09	0,23	0,28	0,25	0,21	0,16	0,21	0,029
Rapport $A_{Soret}/A_{280}$	-	2,16	2,33	2,35	2,32	2,13	2,17	2,46	2,80	2,72	-

Fraction retenues : Fraction 5, 8 et 9.

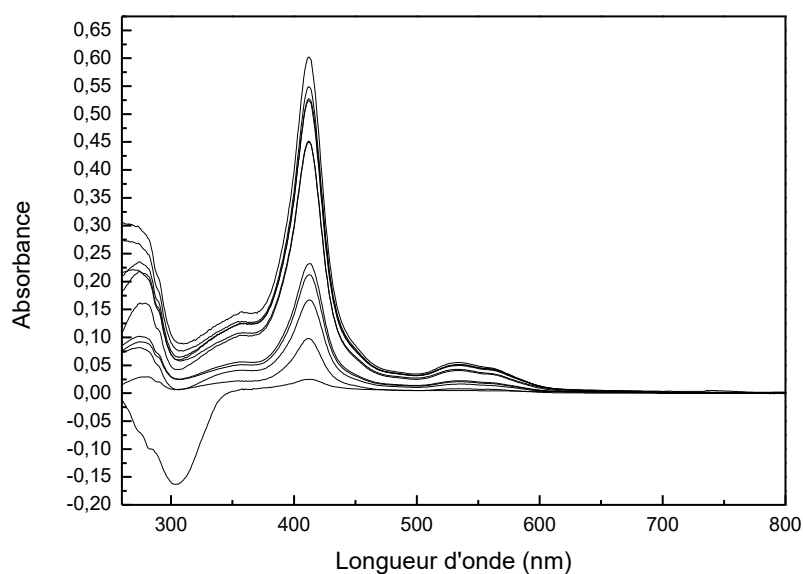
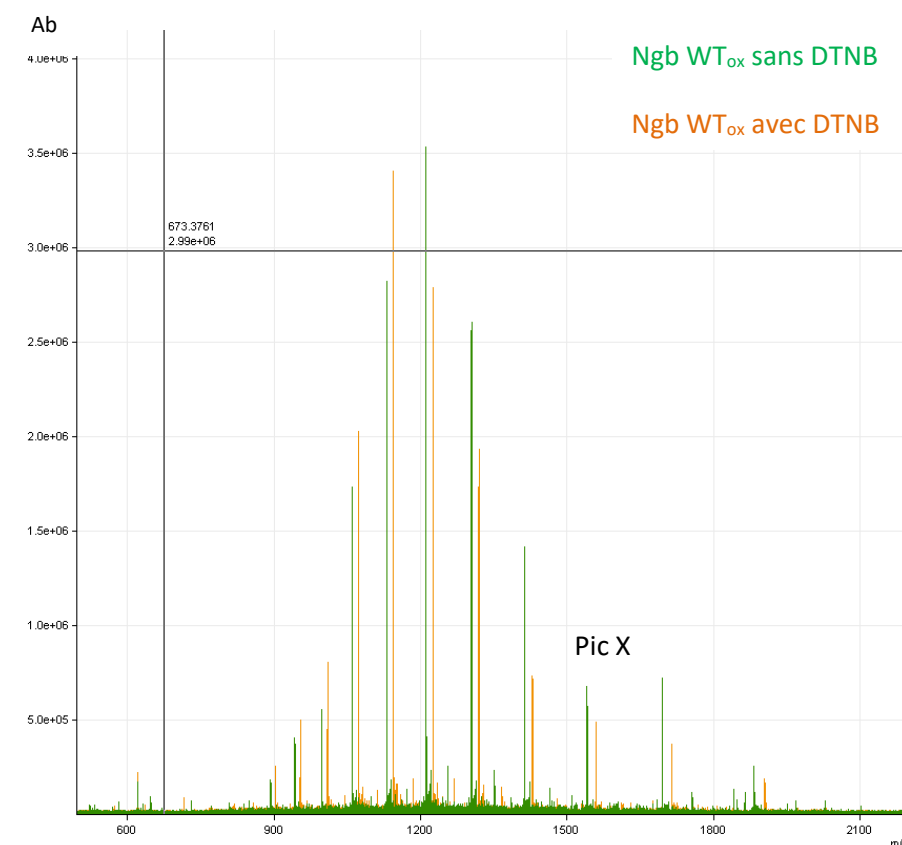


Figure A. 1- Profil d'éluion de la Ngb WT sur colonne de Ni-NTA. De bas en haut : Spectres des fraction 1, fraction 11, fraction 2, fraction 4, fraction 3, fraction 10, fraction 9, fraction 8, fraction 5, fraction 7, fraction 6.

## Annexe B : Protocole de vérification par spectrométrie de masse de la présence ou de l'absence du pont disulfure chez la Ngb

Une solution de Ngb (ici de la Ngb WT<sub>ox</sub>) à 500  $\mu$ M (environ) dans du tampon d'acétate d'ammonium pH 7,8 à 50 mM est injectée par electrospray grâce à une seringue de débit 3  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> dans un spectromètre de masse de type Bruker Apex Qe. Les protéines sont alors ionisées à différents états de charge  $z$  par protonations successives. Le spectre obtenu (Figure B. 1 spectre vert) présente ainsi différents signaux ayant pour valeur le rapport de la masse  $m$  de la protéine sur la charge  $z$  d'un état ionisé. Pour remonter à la charge  $z$  d'un signal donné, il est possible à partir du spectre d'accéder pour ce signal à son profil isotopique. Une fois la charge  $z$  déduite du profil isotopique, il est faisable d'obtenir la masse  $m$  en multipliant la valeur du signal  $m/z$  par la charge  $z$ . La masse théorique pour la Ngb WT avec le pont disulfure est de 16928,2 Da. Sur le spectre la charge du pic X a été déterminée à  $z=1$ . La valeur  $m/z$  du pic correspond donc directement à la masse de la protéine injectée. La masse obtenue est de 16927,8 Da, ce qui correspond à la valeur théorique à l'incertitude de mesure prêt. Cela confirme la bonne formation de la protéine. Il n'y a pas de pics de masses proportionnelles supérieures qui apparaissent. Il n'y a donc pas de polymères.



**Figure B. 1-** Spectres de masse de la Ngb WT sans DTNB (vert) et avec DTNB (orange). L'écart entre un pic vert et un pic orange consécutifs a été mesuré à  $m/z = 197$ . L'échantillon injecté a une concentration en Ngb WT de 533  $\mu$ M dans du tampon d'acétate d'ammonium pH 7,8 à 50 mM .

Pour identifier l'oxydation ou la réduction du pont disulfure, de l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque, DTNB (ou encore réactif d'Ellman) est ajouté. Il s'agit d'une molécule réagissant spécifiquement avec les thiols. Plus précisément, la réaction d'une molécule de DTNB avec un thiol conduit à la formation d'un pont disulfure entre le soufre du thiol et un TNB et à la libération d'un  $\text{NTB}^{2-}$  en solution. Sur la Figure B. 1 sont comparés les spectres de masse de la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$  avec (spectre orange) et sans DTNB (spectre vert). Il est observable que pour le spectre obtenu en présence de DTNB, tous les pics sont décalés d'une masse  $m/z$  d'environ 197, ce qui correspond à la masse d'un TNB ( $198 \text{ g.mol}^{-1}$ ) moins la masse de l'atome d'hydrogène que perd le thiol pour former le pont disulfure. Il n'y a pas de pics correspondant à l'addition de deux NTBs ou plus sur la protéine. Cela tend à prouver que deux des cystéines sont liées par un pont disulfure et que seule la cystéine restante peut réagir avec le DTNB. Dans le cas de la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$ , la cystéine 120 est le résidu qui est libre et les deux autres cystéines en position 46 et 55 forment un pont disulfure.

Dans le cas de la Ngb  $\text{WT}_{\text{red}}$ , les spectres de masse analysés présentent un écart entre le spectre avec et sans DTNB de  $m = 588 \text{ m/z}$ . Cela correspond à la fixation de trois DTNB moins les trois atomes d'hydrogène perdus par les thiols pour former les ponts disulfures. Les trois cystéines sont donc bien libres. Le spectre de masse ne présente pas de pics correspondant à la fixation d'un seul thiol. Il n'y a donc pas de possibilité d'avoir de la Ngb  $\text{WT}_{\text{ox}}$ .

## Annexe C : Résultats des déconvolutions des spectres de DC obtenues pour chaque type de structure secondaire en fonction du pH pour la Ngb WT et ses variants.

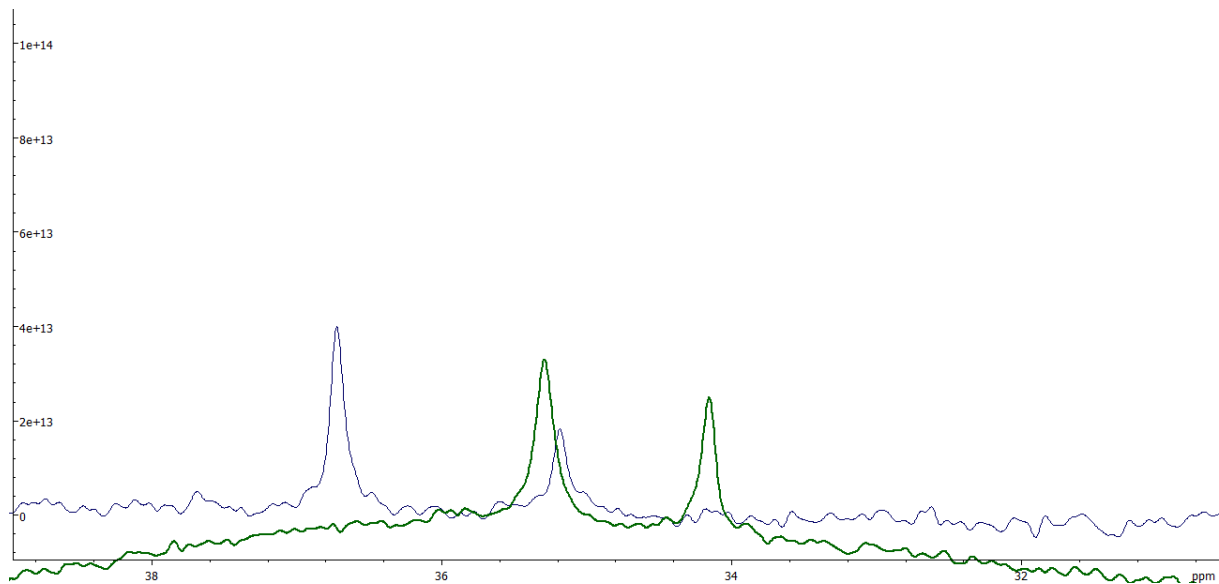
Les résultats sont présentés avec les écarts types.

	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb WT <sub>ox</sub> - pH 2,3	72 ± 13	2 ± 2	11 ± 3	15 ± 9
Ngb WT <sub>ox</sub> - pH 4,5	77 ± 5	2 ± 2	9 ± 4	13 ± 10
Ngb WT <sub>ox</sub> - pH 7,4	80 ± 3	2 ± 2	5 ± 5	13 ± 5
Ngb WT <sub>ox</sub> - pH 9,5	77 ± 4	2 ± 2	9 ± 2	14 ± 3
	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb F106L <sub>ox</sub> - pH 2,3	71 ± 8	2 ± 1	12 ± 2	15 ± 5
Ngb F106L <sub>ox</sub> - pH 4,5	94 ± 9	0 ± 0	3 ± 4	3 ± 5
Ngb F106L <sub>ox</sub> - pH 7,4	90 ± 8	1 ± 1	5 ± 3	4 ± 6
Ngb F106L <sub>ox</sub> - pH 9,5	91 ± 8	1 ± 1	6 ± 6	2 ± 3
	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb A90P <sub>ox</sub> -pH 2,2	58 ± 1	4 ± 1	16 ± 3	23 ± 3
Ngb A90P <sub>ox</sub> -pH 4,5	80 ± 2	3 ± 1	12 ± 2	6 ± 4
Ngb A90P <sub>ox</sub> -pH 7,4	71 ± 5	2 ± 1	11 ± 3	16 ± 2
Ngb A90P <sub>ox</sub> -pH 9,5	93 ± 2	1 ± 0	5 ± 1	0 ± 1
	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb H64V <sub>ox</sub> - pH 2,2	61 ± 3	3 ± 2	13 ± 2	23 ± 2
Ngb H64V <sub>ox</sub> - pH 4,5	61 ± 11	4 ± 2	13 ± 2	22 ± 11
Ngb H64V <sub>ox</sub> - pH 7,4	67 ± 5	3 ± 2	12 ± 3	18 ± 3
Ngb H64V <sub>ox</sub> - pH 9,5	68 ± 2	2 ± 2	11 ± 3	19 ± 3

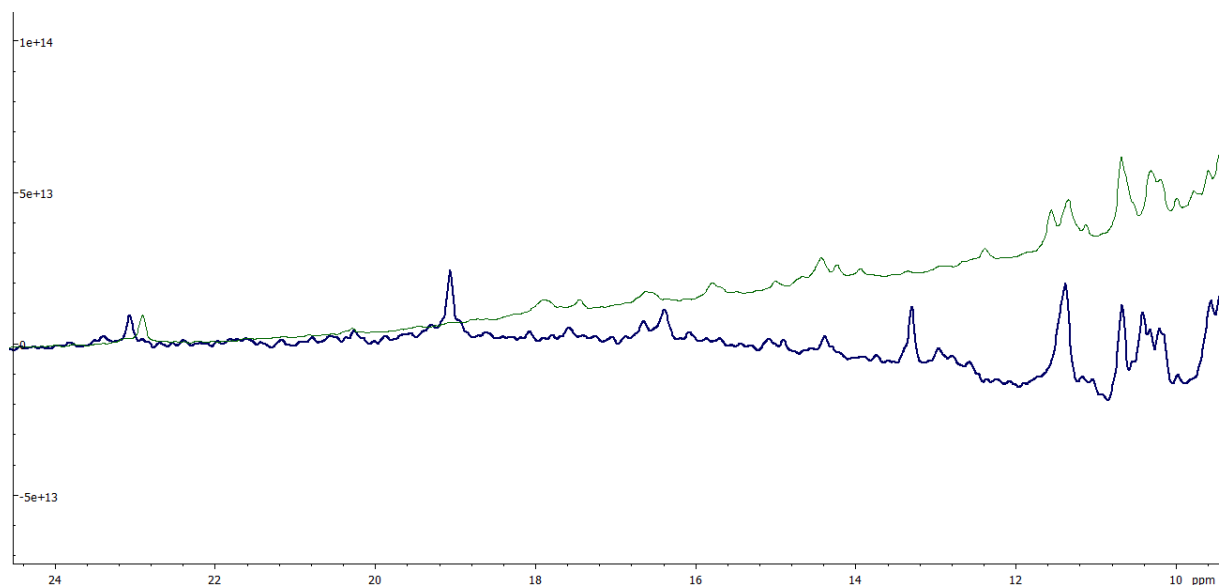


	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb WT <sub>red</sub> - pH 2,3	82 ± 6	0 ± 0	9 ± 1	93 ± 6
Ngb WT <sub>red</sub> - pH 4,5	98 ± 2	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
Ngb WT <sub>red</sub> - pH 7,4	97 ± 3	0 ± 1	1 ± 2	1 ± 2
Ngb WT <sub>red</sub> - pH 9,5	97 ± 3	0 ± 0	3 ± 2	0 ± 1
	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb C46G - pH 2,3	98 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1
Ngb C46G - pH 4,5	98 ± 2	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 2
Ngb C46G - pH 7,4	98 ± 2	0 ± 1	2 ± 2	0 ± 0
Ngb C46G - pH 9,5	99 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1
	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb F106L <sub>red</sub> - pH 2,2	82 ± 11	0 ± 1	0 ± 1	8 ± 11
Ngb F106L <sub>red</sub> - pH 4,5	86 ± 3	2 ± 1	4 ± 4	9 ± 7
Ngb F106L <sub>red</sub> - pH 7,4	93 ± 3	0 ± 0	6 ± 4	0 ± 0
Ngb F106L <sub>red</sub> - pH 9,5	96 ± 4	0 ± 1	3 ± 4	0 ± 1
	Hélices (%)	Feuillets (%)	Boucles (%)	Désordonnées (%)
Ngb A90P <sub>red</sub> - pH 2,2	76 ± 8	0 ± 0	10 ± 2	13 ± 7
Ngb A90P <sub>red</sub> - pH 4,5	89 ± 5	1 ± 1	6 ± 3	4 ± 6
Ngb A90P <sub>red</sub> - pH 7,4	97 ± 3	0 ± 0	2 ± 2	1 ± 2
Ngb A90P <sub>red</sub> - pH 9,5	97 ± 4	0 ± 0	2 ± 3	1 ± 2

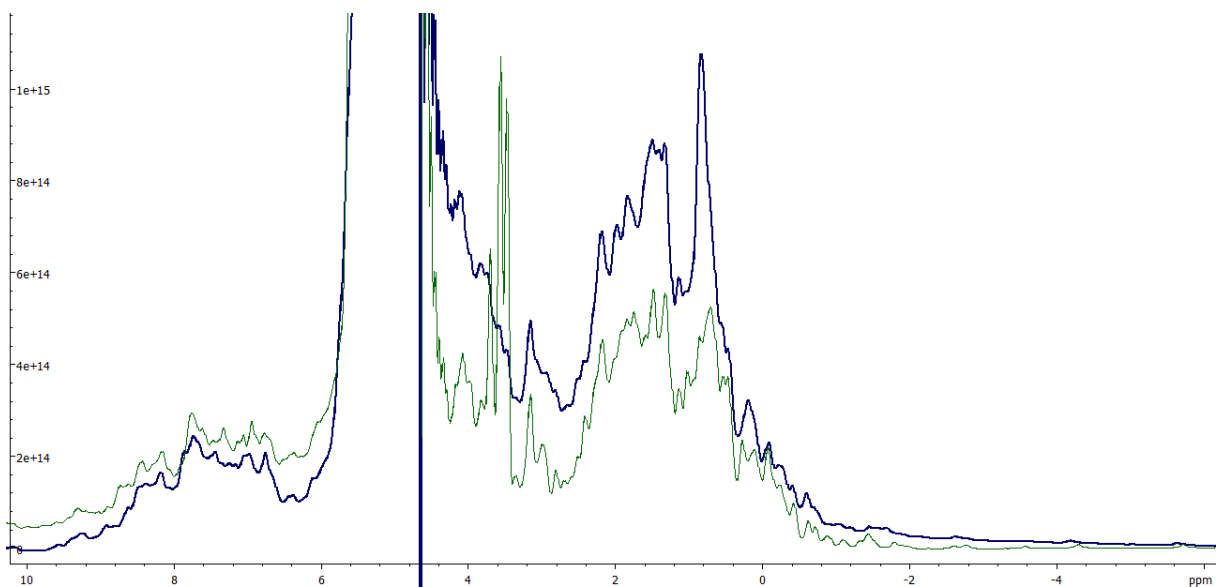
## Annexe D : Spectres RMN $^1\text{H}$ des variants A90P<sub>red</sub> et F106L<sub>red</sub>



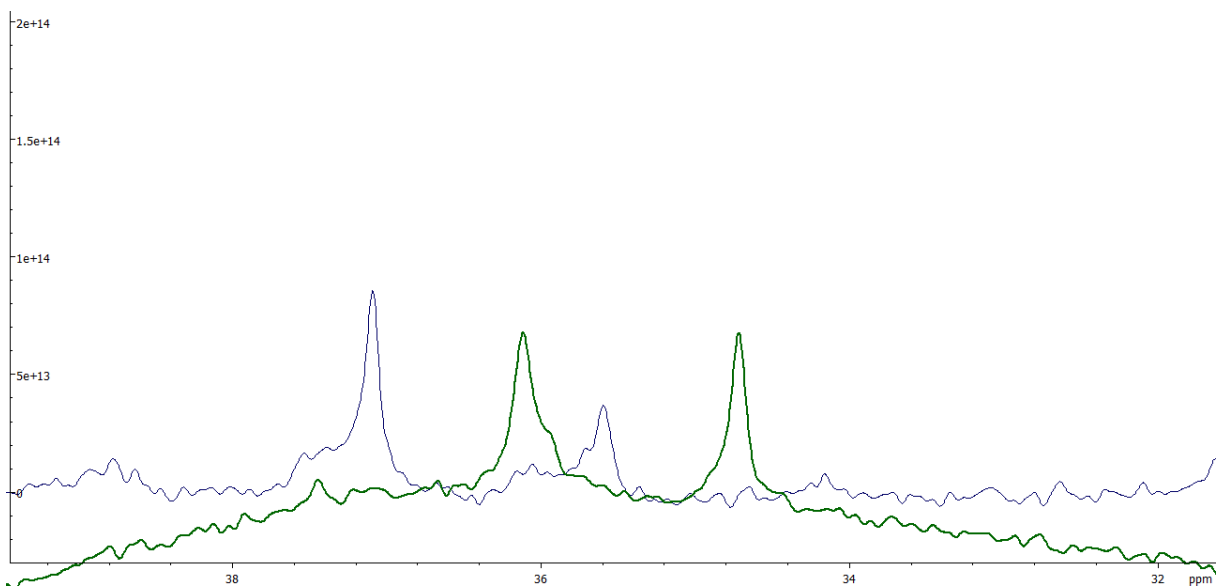
**Figure D. 1-** Spectres RMN  $^1\text{H}$  de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (vert) et de la Ngb A90P<sub>red</sub> (bleu) entre 31 et 38 ppm. Les concentrations des protéines sont de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à  $T = 25^\circ\text{C}$ .



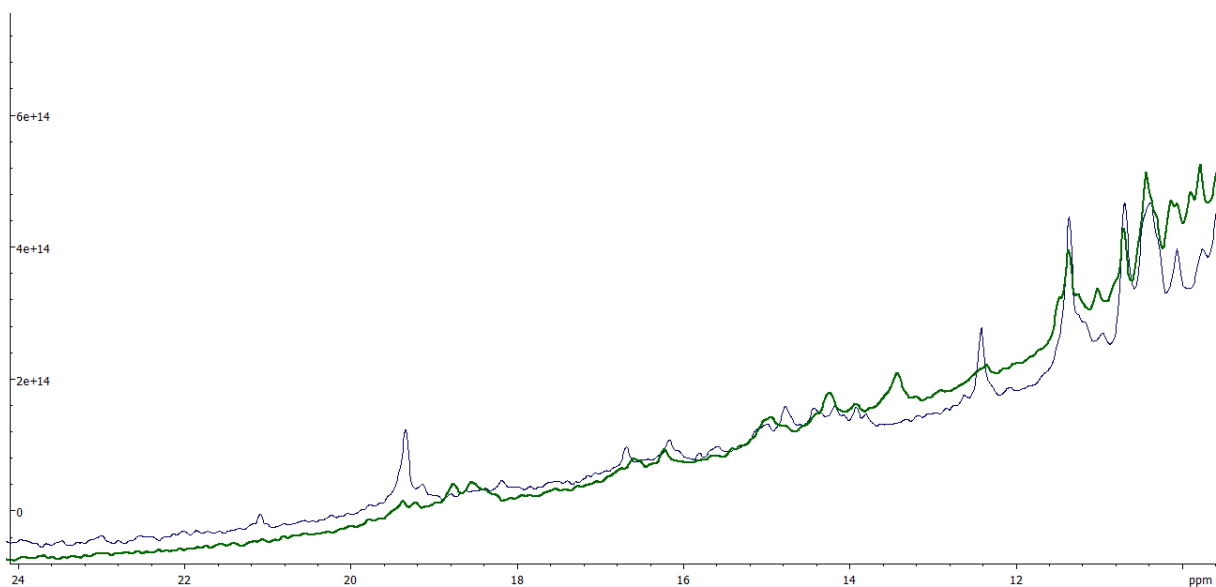
**Figure D. 2-** Spectres RMN  $^1\text{H}$  de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (vert) et de la Ngb A90P<sub>red</sub> (bleu) entre 10 et 24 ppm. Les concentrations des protéines sont de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à  $T = 25^\circ\text{C}$ .



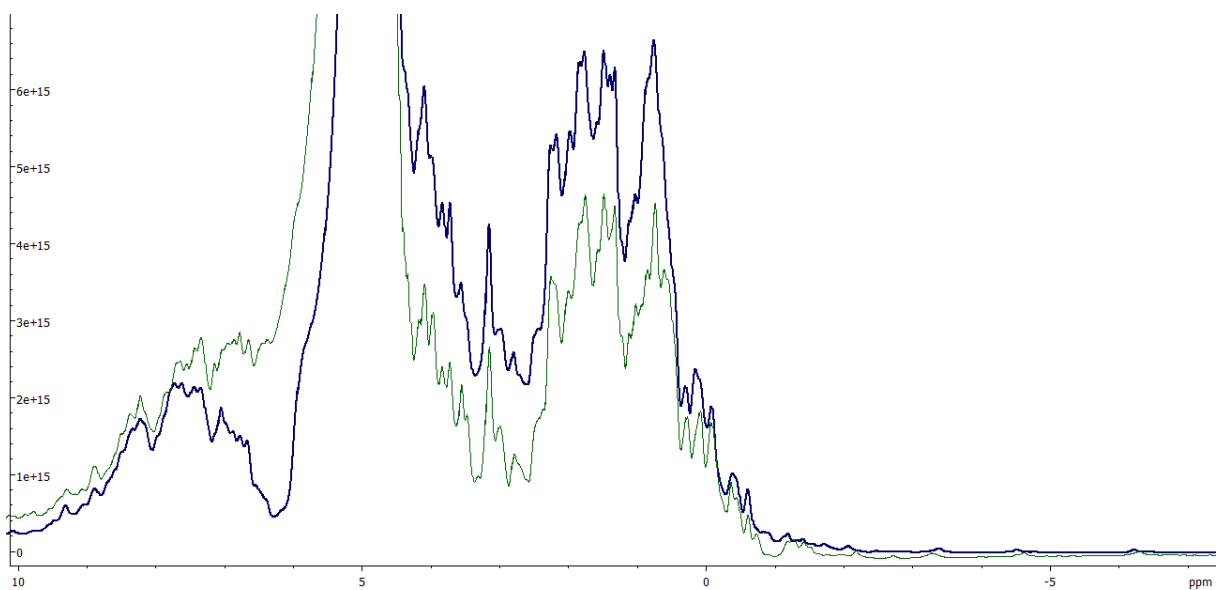
**Figure D. 3- Spectres RMN  $^1\text{H}$  de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (vert) et de la Ngb A90P<sub>red</sub> (bleu) entre -6 et 10 ppm. Les concentrations des protéines sont de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à T = 25 °C.**



**Figure D. 4- Spectres RMN  $^1\text{H}$  de la Ngb F106L<sub>ox</sub> (vert) et de la Ngb F106L<sub>red</sub> (bleu) entre 32 et 38 ppm. Les concentrations des protéines sont de 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à T = 25 °C.**

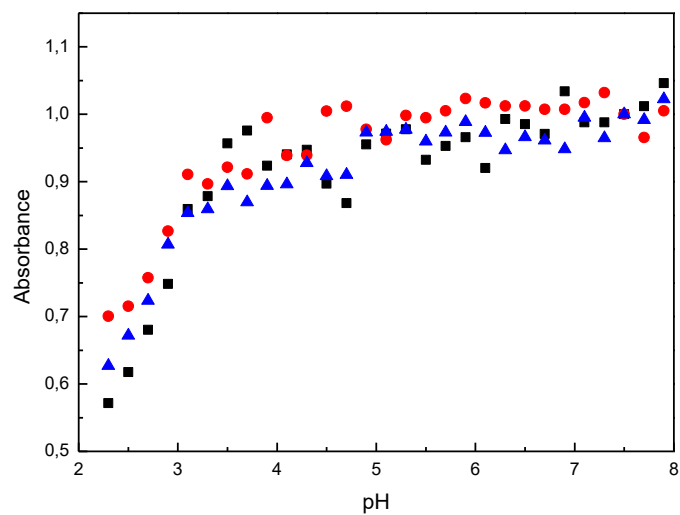


**Figure D. 5- Spectres RMN <sup>1</sup>H de la Ngb F106L<sub>ox</sub> (vert) et de la Ngb F106L<sub>red</sub> (bleu) entre 10 et 24 ppm. Les concentrations des protéines sont de 100 μM dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à T = 25 °C**



**Figure D. 6- Spectres RMN <sup>1</sup>H de la Ngb A90P<sub>ox</sub> (vert) et de la Ngb A90P<sub>red</sub> (bleu) entre -6 et 10 ppm. Les concentrations des protéines sont de 100 μM dans du tampon phosphate 65 mM pH 7,4 à T = 25 °C.**

## Annexe E : Evolution de l'absorbance de la bande de Soret en fonction du pH pour la Ngb C46G



*Figure E. 1- Evolution de la bande de Soret ( $\lambda = 411 \text{ nm}$ ) pour la Ngb C46G (carré noir), la Ngb C46G<sub>ox</sub> (triangle bleu), la Ngb C46G<sub>red</sub> (rond rouge) en fonction du Ph. Les nuages de points ont été normalisés par rapport à 1,0 à pH 7,4. La concentration des protéines est de  $8 \mu\text{M}$  dans du tampon phosphate + acide citrique au pH désiré à  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .*

## Annexe F : Spectres de DC des variants en fonction du pH

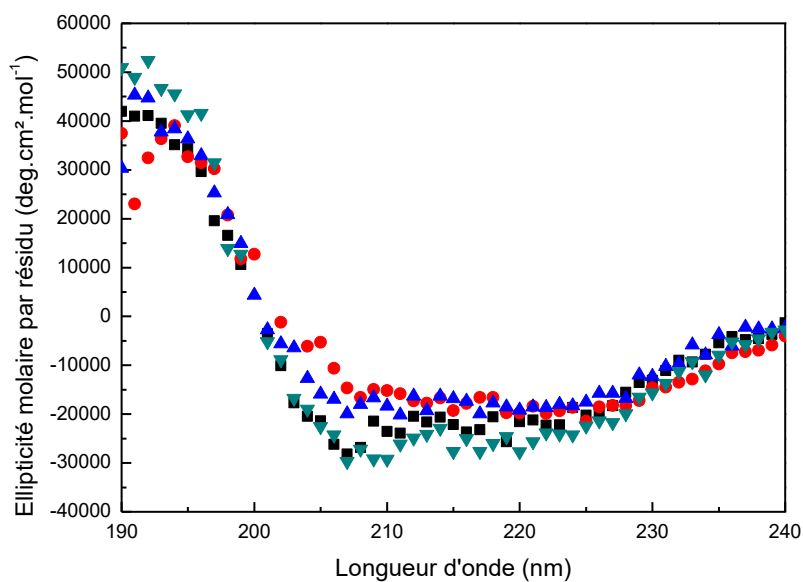


Figure F. 1- Spectres de DC de la NgB H64V ( $C = 8 \mu\text{M}$ ) à 25 °C à pH 2,3 (carré noir), pH 4,5 (rond rouge), pH 7,4 (pyramide bleue) et 9,5 (triangle vert).

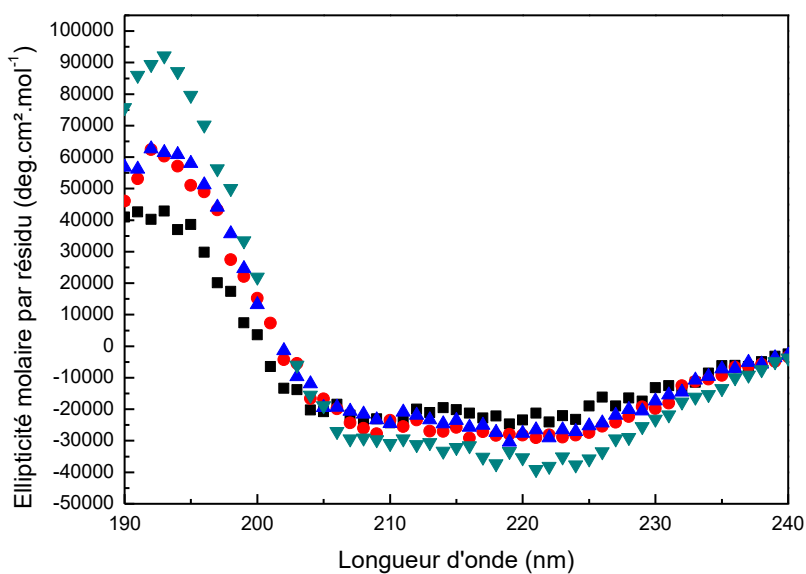


Figure F. 2- Spectres de DC de la NgB A90P<sub>ox</sub> ( $C = 8 \mu\text{M}$ ) à 25 °C à pH 2,3 (carré noir), pH 4,5 (rond rouge), pH 7,4 (pyramide bleue) et 9,5 (triangle vert).

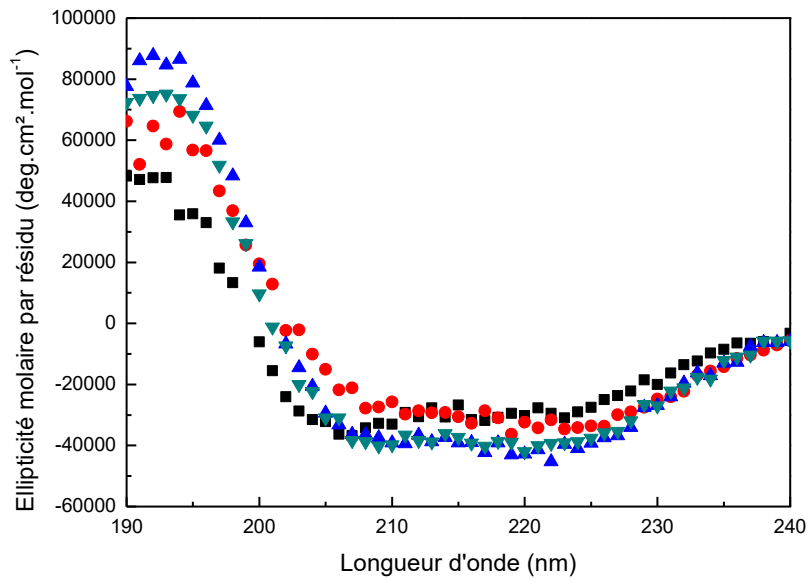


Figure F. 3- Spectres de DC de la Ngb A90P<sub>red</sub> ( $C = 8 \mu\text{M}$ ) à 25 °C pH 2,3 (carré noir), pH 4,5 (rond rouge), pH 7,4 (pyramide bleue) et 9,5 (triangle vert).

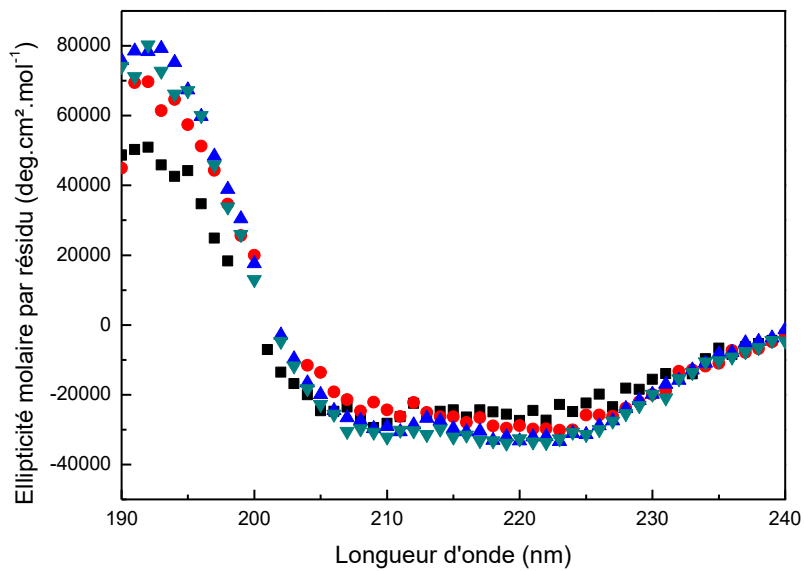
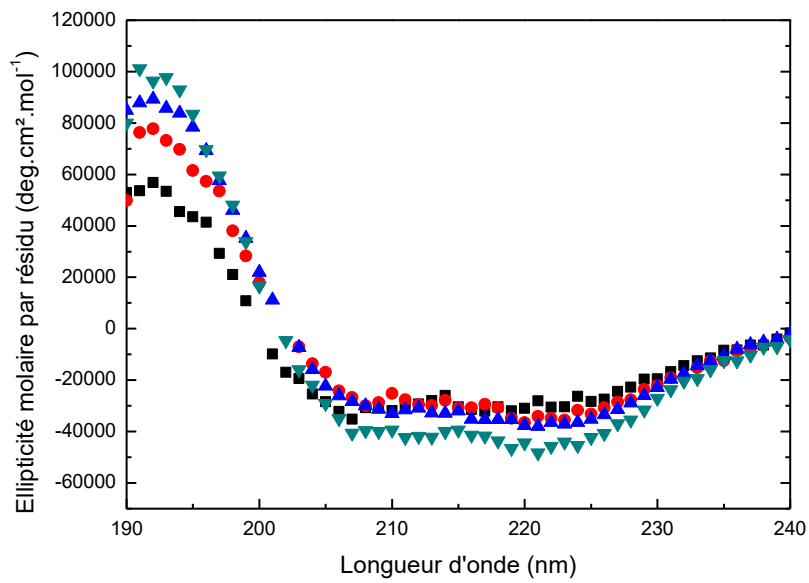
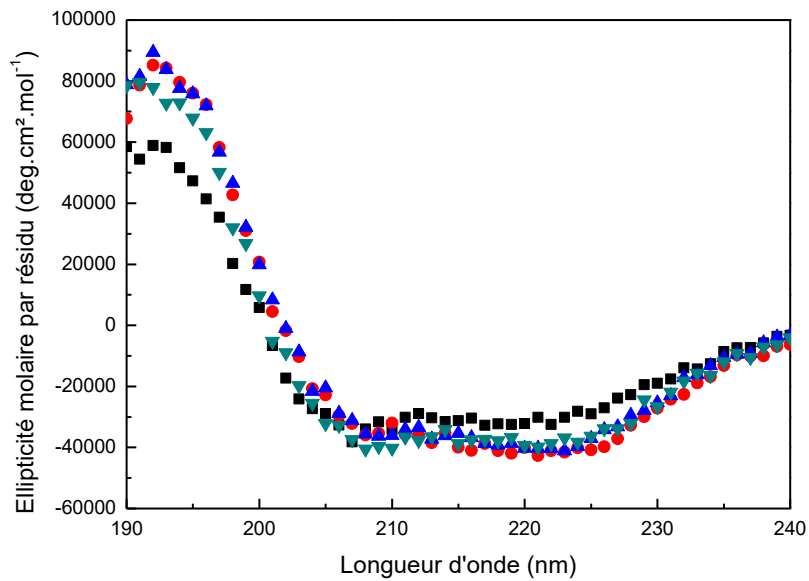


Figure F. 4- Spectres de DC de la Ngb F106L<sub>ox</sub> ( $C = 8 \mu\text{M}$ ) à 25 °C à pH 2,3 (carré noir), pH 4,5 (rond rouge), pH 7,4 (pyramide bleue) et 9,5 (triangle vert).

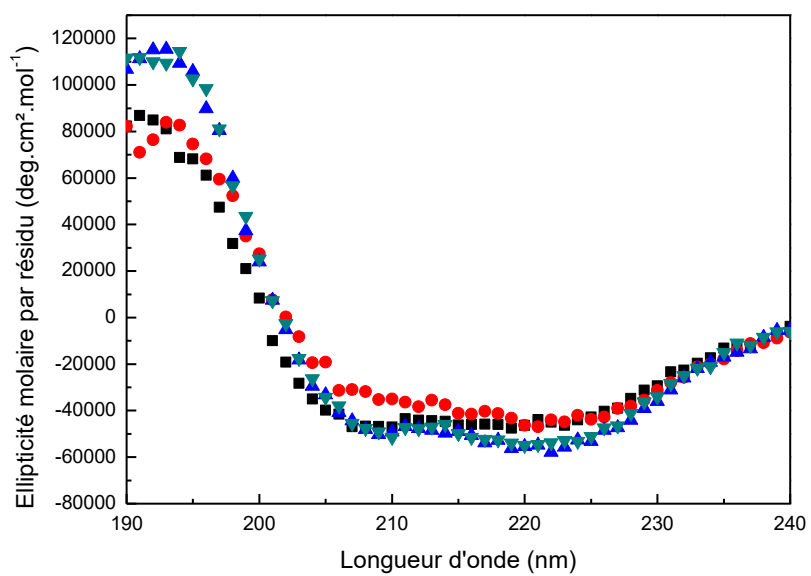


**Figure F. 5- Spectres de DC de la Ngb F106L<sub>red</sub> ( $C = 8 \mu\text{M}$ ) à 25 °C à pH 2,3 (carré noir), pH 4,5 (rond rouge), pH 7,4 (pyramide bleue) et 9,5 (triangle vert).**



**Figure F. 6- Spectres de DC de la Ngb WT<sub>red</sub> ( $C = 8 \mu\text{M}$ ) à 25 °C à pH 2,3 (carré noir), pH 4,5 (rond rouge), pH 7,4 (pyramide bleue) et 9,5 (triangle vert).**





**Figure F. 7-** Spectres de DC de la Ngb C46G ( $C = 8 \mu M$ ) à  $25^\circ C$  à pH 2,3 (carré noir), pH 4,5 (rond rouge), pH 7,4 (pyramide bleue) et 9,5 (triangle vert).

## Annexe G : Tableaux des valeurs moyennes des paramètres d'ajustement pour les cinétiques de fixation du cyanure de la Ngb WT et des variants en fonction des concentrations en cyanure

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_A$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_a$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )	$a_B$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_B$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )
0,5	115810 ± 2477	7244 ± 2920	0,6 ± 0,05	8910 ± 1342	0,1 ± 0,02
7	118416 ± 867	5777 ± 1411	2,1 ± 0,2	7824 ± 2279	0,8 ± 0,05
12	110209 ± 143	6670 ± 430	9,6 ± 1,7	15115 ± 369	1,6 ± 0,2
21	115593 ± 1580	7972 ± 3312	23 ± 3	8361 ± 1564	4,5 ± 0,4
85	116038 ± 2127	10626 ± 678	74 ± 6	5140 ± 1715	12 ± 2
150	114572 ± 863	11329 ± 414	268 ± 22	5584 ± 577	32 ± 4
256	119803 ± 1949	9979 ± 1447	341 ± 75	3073 ± 162	44 ± 3
355	121106 ± 1304	8435 ± 752	524 ± 27	2890 ± 426	56 ± 16

Figure G. 1- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb WT<sub>ox</sub> pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_A$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_a$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )	$a_B$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_B$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )
0,5	173729 ± 2181	18047 ± 861	0,11 ± 0,03	18047 ± 861	0,11 ± 0,03
43	172870 ± 355	15073 ± 292	42 ± 0,08	5443 ± 161	5,5 ± 0,2
128	172037 ± 2803	12482 ± 5598	55 ± 7	9037 ± 2249	15 ± 2
256	167814 ± 2335	9037 ± 2939	136 ± 52	17461 ± 6059	41 ± 6
363	173118 ± 598	16520 ± 1719	174 ± 17	4748 ± 1077	34 ± 9
402	166633 ± 561	12390 ± 2322	307 ± 42	15083 ± 2113	96 ± 12

Figure G. 2- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb WT<sub>red</sub> pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_A$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_a$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )	$a_B$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_B$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )
0,5	169019 ± 3623	13039 ± 3686	0,09 ± 0,01	13039 ± 3686	0,09 ± 0,01
25	164610 ± 19	15019 ± 126	3,1 ± 0,1	3153 ± 63	0,18 ± 0,01
64	156278 ± 347	4339 ± 1269	21 ± 6	22411 ± 960	6 ± 0,2
128	156437 ± 450	19548 ± 1507	65 ± 3	7785 ± 1290	24 ± 5
256	160752 ± 3823	8331 ± 1281	170 ± 22	14308 ± 3785	54 ± 7
376	160559 ± 4282	17190 ± 3403	270 ± 69	8351 ± 4974	83 ± 43

Figure G. 3- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb C46G pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_A$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_a$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )	$a_B$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_B$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )
0,5	143190 ± 4739	1157 ± 273	0,32 ± 0,08	7364 ± 4430	0,06 ± 0,02
43	132552 ± 245	8886 ± 2197	9 ± 2	10373 ± 2110	3,4 ± 0,3
145	131835 ± 315	13513 ± 1273	46 ± 3	6526 ± 1166	14 ± 3
325	138662 ± 402	6866 ± 948	169 ± 20	7295 ± 717	39 ± 5

**Figure G. 4- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb A90P<sub>ox</sub> pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.**

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_A$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )
0,5	140619 ± 192	11389 ± 378	0,081 ± 0,001
1	137517 ± 8	13788 ± 26	0,1142 ± 0,0004
7	135740 ± 22	15326 ± 186	1,41 ± 0,03
85	131622 ± 374	19555 ± 261	5,9 ± 0,4
145	131680 ± 204	19204 ± 180	30 ± 0,8

**Figure G. 5- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb A90P<sub>red</sub> pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.**

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_A$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_a$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )	$a_B$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_B$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )
0,5	130202 ± 1338	11168 ± 1136	0,13 ± 0,01	11168 ± 1136	0,13 ± 0,01
7	124990 ± 1817	11249 ± 315	1,6 ± 0,2	4959 ± 226	0,23 ± 0,01
25	126590 ± 3266	10480 ± 4042	3 ± 1	3256 ± 1936	0,31 ± 0,1
64	125832 ± 2378	10800 ± 987	17 ± 6	5087 ± 228	2,0 ± 0,6
128	125920 ± 3276	8268 ± 2287	21 ± 4	6189 ± 3634	2,4 ± 0,3
256	127095 ± 232	11826 ± 370	142 ± 5	3096 ± 223	9,4 ± 0,5
372	126179 ± 398	11530 ± 484	293 ± 43	3871 ± 417	27 ± 8

**Figure G. 6- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb F106L<sub>ox</sub> pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.**

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_A$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k$ ( $10^{-3} s^{-1}$ )
0,5	146501 ± 92	6612 ± 315	0,090 ± 0,003
7	132831 ± 1060	19699 ± 895	0,32 ± 0,05
25	133441 ± 2097	19498 ± 2170	1,2 ± 0,2
50	139061 ± 14	14138 ± 60	2,90 ± 0,02
100	123635 ± 15	29346 ± 93	8,3 ± 0,1
141	132303 ± 213	19413 ± 214	14 ± 0,3
256	133518 ± 1673	18198 ± 1685	23 ± 4
376	135164 ± 4836	16194 ± 5184	27 ± 7

**Figure G. 7- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb F106L<sub>red</sub> pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.**

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_1$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_1$ ( $s^{-1}$ )	$a_2$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )
0,4	84057 ± 448	8645 ± 3725	0,08 ± 0,02	2658 ± 261	0,015 ± 0,002
4	88358 ± 1515	4437 ± 550	0,34 ± 0,04	2033 ± 45	0,029 ± 0,002
13	87332 ± 5122	4495 ± 573	0,88 ± 0,21	1800 ± 119	0,059 ± 0,015
21	87929 ± 4182	4977 ± 1305	1,51 ± 0,41	1664 ± 141	0,118 ± 0,020
64	103047 ± 7037	4153 ± 334	1,06 ± 0,16	1011 ± 357	0,136 ± 0,043
128	90763 ± 3554	2799 ± 268	2,01 ± 0,18	1786 ± 118	0,250 ± 0,009
256	1105595 ± 972	2601 ± 154	2,24 ± 0,21	1799 ± 46	0,415 ± 0,020

[CN] (mM)	$y_0$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$a_3$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )
0,4	84057 ± 448	24146 ± 4591	0,17 ± 0,02
4	88358 ± 1515	30834 ± 3739	1,40 ± 0,04
13	87332 ± 5122	43544 ± 17873	5,85 ± 0,50
21	87929 ± 4182	35872 ± 12533	10,7 ± 0,7
64	103047 ± 7037	38731 ± 28400	22 ± 4
128	90763 ± 3554	40225 ± 7088	30 ± 1
256	1105595 ± 972	11001 ± 8793	68 ± 17

**Figure G. 8- Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement de la Ngb H64V<sub>ox</sub> pour les expériences en UV-Visible de la cinétique de fixation du cyanure. Les paramètres sont présentés avec leurs écarts types.**

## **Bibliographie**

- Abbruzzetti, S., Faggiano, S., Bruno, S., Spyraakis, F., Mozzarelli, A., Dewilde, S., . . . Viappiani, C. (2009). Ligand migration through the internal hydrophobic cavities in human neuroglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *106*(45), 18984-18989. doi:10.1073/pnas.0905433106
- Abu-Soud, 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*(35), 11167-11175.
- Anselmi, M., Brunori, M., Vallone, B., & Di Nola, A. (2007). Molecular dynamics simulation of deoxy and carboxy murine neuroglobin in water. *Biophysical Journal*, *93*(2), 434-441. doi:10.1529/biophysj.106.099648
- Anselmi, M., Brunori, M., Vallone, B., & Di Nola, A. (2008). Molecular dynamics simulation of the neuroglobin crystal: comparison with the simulation in solution. *Biophysical Journal*, *95*(9), 4157-4162. doi:10.1529/biophysj.108.135855
- Antao, S. T., Duong, T. T., Aran, R., & Witting, P. K. (2010). Neuroglobin overexpression in cultured human neuronal cells protects against hydrogen peroxide insult via activating phosphoinositide-3 kinase and opening the mitochondrial K(ATP) channel. *Antioxidants & redox signaling*, *13*(6), 769-781. doi:10.1089/ars.2009.2977
- Aojula, H. S., Wilson, M. T., & Morrison, I. G. (1987). Functional consequences of haem orientational disorder in sperm-whale and yellow-fin-tuna myoglobins. *The Biochemical Journal*, *243*(1), 205-210.
- Ascenzi, P., di Masi, A., Leboffe, L., Fiocchetti, M., Nuzzo, M. T., Brunori, M., & Marino, M. (2016). Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. doi:10.1016/j.mam.2016.10.004
- Ascenzi, P., Gustincich, S., & Marino, M. (2014). Mammalian nerve globins in search of functions. *IUBMB Life*, *66*(4), 268-276. doi:10.1002/iub.1267
- Astudillo, L., Bernad, S., Derrien, V., Sebban, P., & Miksovská, J. (2010). Probing the role of the internal disulfide bond in regulating conformational dynamics in neuroglobin. *Biophysical Journal*, *99*(2), L16-18. doi:10.1016/j.bpj.2010.04.033
- Astudillo, L., Bernad, S., Derrien, V., Sebban, P., & Miksovská, J. (2012). Conformational Dynamics in Human Neuroglobin: Effect of His64, Val68, and Cys120 on Ligand Migration *Biochemistry*, *51*(50), 9984-9994. doi:10.1021/bi301016u
- Avella, G., Ardiccioni, C., Scaglione, A., Moschetti, T., Rondinelli, C., Montemiglio, L. C., . . . Vallone, B. (2014). Engineering the internal cavity of neuroglobin demonstrates the role of the haem-sliding mechanism. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, *70*(Pt 6), 1640-1648. doi:10.1107/s1399004714007032
- Bashford, D., Chothia, C., & Lesk, A. M. (1987). Determinants of a protein fold. *Journal of Molecular Biology*, *196*(1), 199-216. doi:10.1016/0022-2836(87)90521-3
- Berry, E. A., & Trumppower, B. L. (1987). Simultaneous Determination of Hemes a, b, and c' from Pyridine Hemochrome Spectra. *Analytical Biochemistry*, *161*, 15.
- Bocahut, A. (2011). *Etudes théoriques et expérimentales de la Neuroglobine humaine*. Université Paris Sud.
- Bocahut, A., Bernad, S., Sebban, P., & Sacquin-Mora, S. (2009). Relating the diffusion of small ligands in human neuroglobin to its structural and mechanical properties. *The journal of Physical Chemistry. Section B*, *113*(50), 16257-16267. doi:10.1021/jp906854x
- Bocahut, A., Derrien, V., Bernad, S., Sebban, P., Sacquin-Mora, S., Guittet, E., & Lescop, E. (2013). Heme orientation modulates histidine dissociation and ligand binding kinetics in the hexacoordinated human neuroglobin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *18*(1), 111-122. doi:10.1007/s00775-012-0956-2
- Bolognesi, M., Cannillo, E., Ascenzi, P., Giacometti, G. M., Merli, A., & Brunori, M. (1982). Reactivity of ferric Aplysia and sperm whale myoglobins towards imidazole. X-ray and binding study. *Journal of Molecular Biology*, *158*(2), 305-315.

- Boron, I., Capece, L., Pennacchietti, F., Wetzler, D. E., Bruno, S., Abbruzzetti, S., . . . Nadra, A. D. (2015). Engineered chimeras reveal the structural basis of hexacoordination in globins: a case study of neuroglobin and myoglobin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1850(1), 169-177. doi:10.1016/j.bbagen.2014.10.006
- Bourgeois, D., Vallone, B., Arcovito, A., Sciara, G., Schotte, F., Anfinrud, P. A., & Brunori, M. (2006). Extended subnanosecond structural dynamics of myoglobin revealed by Laue crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103(13), 4924-4929. doi:10.1073/pnas.0508880103
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117-127. doi:10.1038/349117a0
- Brancaccio, A., Cutruzzola, F., Allocatelli, C. T., Brunori, M., Smerdon, S. J., Wilkinson, A. J., . . . Olson, J. S. (1994). Structural factors governing azide and cyanide binding to mammalian metmyoglobins. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 13843-13853.
- Brittain, T., & Skommer, J. (2012). Does a redox cycle provide a mechanism for setting the capacity of neuroglobin to protect cells from apoptosis? *IUBMB Life*, 64(5), 419-422. doi:10.1002/iub.566
- Brittain, T., Skommer, J., Henty, K., Birch, N., & Raychaudhuri, S. (2010). A role for human neuroglobin in apoptosis. *IUBMB Life*, 62(12), 878-885. doi:10.1002/iub.405
- Brittain, T., Skommer, J., Raychaudhuri, S., & Birch, N. (2010). An antiapoptotic neuroprotective role for neuroglobin. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2306-2321. doi:10.3390/ijms11062306
- Brucker, E. A., Olson, J. S., Ikeda-Saito, M., & Phillips, G. N., Jr. (1998). Nitric oxide myoglobin: crystal structure and analysis of ligand geometry. *Proteins*, 30(4), 352-356.
- Brunori, M. (1999). Hemoglobin is an honorary enzyme. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(4), 158-161.
- Brunori, M. (2001). Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(4), 209-210.
- Brunori, M., & Gibson, Q. H. (2001). Cavities and packing defects in the structural dynamics of myoglobin. *EMBO Reports*, 2(8), 674-679. doi:10.1093/embo-reports/kve159
- Brunori, M., Giuffre, A., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U., Scandurra, F. M., & Vallone, B. (2005). Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: Functional pathways and conformational changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(24), 8483-8488. doi:10.1073/pnas.0408766102
- Brunori, M., & Vallone, B. (2006). A globin for the brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(13), 2192-2197. doi:10.1096/fj.06-6643rev
- Brunori, M., & Vallone, B. (2007). Neuroglobin, seven years after. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(10), 1259-1268. doi:10.1007/s00018-007-7090-2
- Brunori, M., Vallone, B., Cutruzzola, F., Travaglini-Allocatelli, C., Berendzen, J., Chu, K., . . . Schlichting, I. (2000). The role of cavities in protein dynamics: crystal structure of a photolytic intermediate of a mutant myoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(5), 2058-2063. doi:10.1073/pnas.040459697
- Burmester, T., Weich, B., & Reinhardt, S. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain: Letters to Nature.
- Carugo, O., & Argos, P. (1998). Accessibility to internal cavities and ligand binding sites monitored by protein crystallographic thermal factors. *Proteins*, 31(2), 201-213.
- Casado, B., Pannell, L. K., Whalen, G., Clauw, D. J., & Baraniuk, J. N. (2005). Human neuroglobin protein in cerebrospinal fluid. *Proteome Science*, 3(1), 2. doi:10.1186/1477-5956-3-2
- Codutti, L., Picotti, P., Marin, O., Dewilde, S., Fogolari, F., Corazza, A., . . . Fontana, A. (2009). Conformational stability of neuroglobin helix F--possible effects on the folding pathway within the globin family. *The FEBS journal*, 276(18), 5177-5190. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07214.x

- Couture, M., Burmester, T., Hankeln, T., & Rousseau, D. L. (2001). The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36377-36382. doi:10.1074/jbc.M103907200
- Cox, R. A. (1970). Conformation of nucleic acids and the analysis of the hypochromic effect. *Biochemical Journal*, 120(3), 539-547.
- D'Aprile, A., Scrima, R., Quarato, G., Tataranni, T., Falzetti, F., Di Ianni, M., . . . Capitanio, N. (2014). Hematopoietic stem/progenitor cells express myoglobin and neuroglobin: adaptation to hypoxia or prevention from oxidative stress? *Stem Cells*, 32(5), 1267-1277. doi:10.1002/stem.1646
- Das, T. K., Lee, H. C., Duff, S. M., Hill, R. D., Peisach, J., Rousseau, D. L., . . . Wittenberg, J. B. (1999). The heme environment in barley hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4207-4212.
- de Duve, C. (1948). A spectrophotometric method for the simultaneous determination of myoglobin and hemoglobin in extract human muscles. *Acta Chimica Scandinavica*, 2, 264-290.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(3), 277-293.
- Delanty, N., & Dichter, M. A. (1998). Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurologica Scandinavica*, 98(3), 145-153.
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuz, V., Aerts, T., . . . Moens, L. (2001). Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38949-38955. doi:10.1074/jbc.M106438200
- Dewilde, S., Mees, K., Kiger, L., Lechauve, C., Marden, M. C., Pesce, A., . . . Moens, L. (2008). Expression, purification, and crystallization of neuro- and cytoglobin. *Methods in Enzymology*, 436, 341-357. doi:10.1016/s0076-6879(08)36019-4
- Di Giulio, C., Zara, S., Cataldi, A., Porzionato, A., Pokorski, M., & De Caro, R. (2012). Human carotid body HIF and NGB expression during human development and aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 758, 265-271. doi:10.1007/978-94-007-4584-1\_36
- Di Giulio, C., Zara, S., De Colli, M., Ruffini, R., Porzionato, A., Macchi, V., . . . Cataldi, A. (2013). Cytoglobin and neuroglobin in the human brainstem and carotid body. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 788, 59-64. doi:10.1007/978-94-007-6627-3\_9
- Dietz, G. P. (2011). Protection by neuroglobin and cell-penetrating peptide-mediated delivery in vivo: a decade of research. Comment on Cai et al: TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*. 2011; 227(1): 224-31. *Experimental Neurology*, 231(1), 1-10. doi:10.1016/j.expneurol.2011.05.010
- Docherty, J. C., & Brown, S. B. (1982). Haem disorder in reconstituted human haemoglobin. *The Biochemical Journal*, 207(3), 583-587.
- Dou, Y., Olson, J. S., Wilkinson, A. J., & Ikeda-Saito, M. (1996). Mechanism of Hydrogen Cyanide Binding to Myoglobin. *Biochemistry*, 35(22), 7017-7013. doi:10.1021/bi9600299
- Droge, J., Pande, A., Englander, E. W., & Makalowski, W. (2012). Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins. *PLoS One*, 7(10), e47972. doi:10.1371/journal.pone.0047972
- Du, W., Syvitski, R., Dewilde, S., Moens, L., & La Mar, G. N. (2003). Solution 1H NMR characterisation of equilibrium heme orientational disorder with functional consequences in mouse neuroglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 125(27), 8080-8081. doi:10.1021/ja034584r
- Duong, T. T., Witting, P. K., Antao, S. T., Parry, S. N., Kennerson, M., Lai, B., . . . Harris, H. H. (2009). Multiple protective activities of neuroglobin in cultured neuronal cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury. *Journal of Neurochemistry*, 108(5), 1143-1154. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05846.x
- Eich, R. (1997). *Reactions of Nitric Oxide with Myoglobin*. Rice University, Houston, TX.



- Evans, S. V., & Brayer, G. D. (1990). High-resolution study of the three-dimensional structure of horse heart metmyoglobin. *Journal of Molecular Biology*, 213(4), 885-897. doi:10.1016/S0022-2836(05)80270-0
- Ezhevskaya, M., Trandafir, F., Moens, L., Dewilde, S., & Van Doorslaer, S. (2011). EPR investigation of the role of B10 phenylalanine in neuroglobin - evidence that B10Phe mediates structural changes in the heme region upon disulfide-bridge formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(9), 1131-1137. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.05.020
- Fago, A., Hunda, C., Dewilde, S., Gilany, K., Moens, L., & E., W. R. (2004). Allosteric Regulation and Temperature Dependence of Oxygen Binding in Human Neuroglobin and Cytoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44417-44426. doi:10.1074/jbc.M407126200
- Fago, A., Mathews, A. J., & Brittain, T. (2008). A role for neuroglobin: resetting the trigger level for apoptosis in neuronal and retinal cells. *IUBMB Life*, 60(6), 398-401. doi:10.1002/iub.35
- Fago, A., Mathews, A. J., Moens, L., Dewilde, S., & Brittain, T. (2006). The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c. *FEBS Letters*, 580(20), 4884-4888. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.003
- Fago, A., Mathews, A. J., Dewilde, S., Moens, L., Brittain, T. (2006). The reactions of neuroglobin with CO: Evidence for two forms of the ferrous protein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(8), 1339-1343. doi:10.1016/j.jinorgbio.2006.03.009
- Fasman, G. D. (Ed.) (1996). *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Plenum Press, New York: Springer US.
- Felsenfeld, G., & Sandeen, G. (1962). The dispersion of the hyperchromic effect in thermally induced transitions of nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 5, 587-610.
- Fiocchetti, M., De Marinis, E., Ascenzi, P., & Marino, M. (2013). Neuroglobin and neuronal cell survival. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1834(9), 1744-1749. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.015
- Flogel, U., Merx, M. W., Godecke, A., Decking, U. K., & Schrader, J. (2001). Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98(2), 735-740. doi:10.1073/pnas.011460298
- Fordel, E., Geuens, E., Dewilde, S., De Coen, W., & Moens, L. (2004). Hypoxia/ischemia and the regulation of neuroglobin and cytoglobin expression. *IUBMB Life*, 56(11-12), 681-687. doi:10.1080/15216540500037406
- Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Lenjou, M., Laufs, T., Van Bockstaele, D., . . . Dewilde, S. (2006). Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death. *Neuroscience Letters*, 410(2), 146-151. doi:10.1016/j.neulet.2006.09.027
- Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Schrijvers, D., Moens, L., & Dewilde, S. (2007). Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: a step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions. *Gene*, 398(1-2), 114-122. doi:10.1016/j.gene.2007.03.022
- Frauenfelder, H., McMahon, B. H., & Fenimore, P. W. (2003). Myoglobin: the hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(15), 8615-8617. doi:10.1073/pnas.1633688100
- Gerd N. La Mar, H. T., R. Krishnamoorthi. (1984). Proton NMR investigation of the rate and mechanism of heme rotation in sperm whale myoglobin: evidence for intramolecular reorientation about a heme two-fold axis. *Journal of the American Chemical Society*, 106(21), 6395-6401.
- Gibson, Q. H., Parkhurst, L. J., & Geraci, G. (1969). The reaction of methemoglobin with some ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(17), 4668-4676.
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 615-649. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.003151
- Giovannetti, R. (2012). *The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins*: INTECH Open Access Publisher.

- Giuffrè, A., Moschetti, T., Vallone, B., Brunori, M. (2008). Neuroglobin: Enzymatic reduction and oxygen affinity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367 (4), 893-898. doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.021
- Gorren, A. C., Schrammel, A., Schmidt, K., & Mayer, B. (1997). Thiols and neuronal nitric oxide synthase: complex formation, competitive inhibition, and enzyme stabilization. *Biochemistry*, 36(14), 4360-4366. doi:10.1021/bi962381s
- Gouterman, M. (1959). Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin. *The Journal of Chemical Physics*, 30(5), 1139-1161. doi:10.1063/1.1730148
- Gouterman, M. (1961). Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 6, 138-163. doi:10.1016/0022-2852(61)90236-3
- Guidolin, D., Agnati, L. F., Tortorella, C., Marcoli, M., Maura, G., Albertin, G., & Fuxe, K. (2014). Neuroglobin as a regulator of mitochondrial-dependent apoptosis: a bioinformatics analysis. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(1), 111-116. doi:10.3892/ijmm.2013.1564
- Guimaraes, B. G., Hamdane, D., Lechauve, C., Marden, M. C., & Golinelli-Pimpaneau, B. (2014). The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 70(4), 1005-1014. doi:10.1107/S1399004714000078
- Haines, B., Mao, X., Xie, L., Spusta, S., Zeng, X., Jin, K., & Greenberg, D. A. (2013). Neuroglobin expression in neurogenesis. *Neuroscience Letters*, 549, 3-6. doi:10.1016/j.neulet.2013.04.039
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., . . . Marden, M. C. (2003). The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51713-51721. doi:10.1074/jbc.M309396200
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., . . . Marden, M. C. (2004). Coupling of the heme and an internal disulfide bond in human neuroglobin. *Micron*, 35(1-2), 59-62.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., . . . Marden, M. C. (2005). Hyperthermal stability of neuroglobin and cytoglobin. *The FEBS journal*, 272(8), 2076-2084. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04635.x
- Hankeln, T., & Burmester, T. (2009). *What is the function of neuroglobin?* : The Journal of Experimental Biology.
- Hankeln, T., Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Gerlach, F., Saaler-Reinhardt, S., . . . Burmester, T. (2004). The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function? *IUBMB Life*, 56(11-12), 671-679. doi:10.1080/15216540500037794
- Hardison, R. C. (1996). *A brief history of hemoglobins : plant, animal, protist, and bacteria:* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States.
- Hepler, J. R., & Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(10), 383-387.
- Herold, S., Fago, A., Weber, R. E., Dewilde, S., & Moens, L. (2004). Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 22841-22847. doi:10.1074/jbc.M313732200
- Hubbard, S. J., Gross, K. H., & Argos, P. (1994). Intramolecular cavities in globular proteins. *Protein Engineering*, 7(5), 613-626.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38, 27-38.
- Hundahl, C. A., Allen, G. C., Nyengaard, J. R., Dewilde, S., Carter, B. D., Kelsen, J., & Hay-Schmidt, A. (2008). Neuroglobin in the rat brain : localization. *Neuroendocrinology*, 88 (3), 173-182. doi:10.1159/000129698
- Hundahl, C. A., Kelsen, J., & Hay-Schmidt, A. (2013). Neuroglobin and cytoglobin expression in the human brain. *Brain Structure and Function*, 218(2), 603-609. doi:10.1007/s00429-012-0480-8
- Ikeda-Saito, M., Horill, H., Andersson, L. A., Prince, R. C., Pickering, I. J., George, G. N., . . . Mattera, R. (1992). Coordination Structure of the Ferric Heme Iron in Engineered Distal Histidine Myoglobin Mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(32), 10.

- Imai, K. (1999). The haemoglobin enzyme. *Nature*, *401*(6752), 437, 439. doi:10.1038/46707
- Ishikawa, H., Takahashi, S., Ishimori, K., & Morishima, I. (2004). Steric effects of isoleucine 107 on heme reorientation reaction in human myoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *324*(3), 1095-1100. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.163
- Jin, K., Mao, X., Xie, L., & Greenberg, D. A. (2011). Neuroglobin expression in human arteriovenous malformation and intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, *111*, 315-319. doi:10.1007/978-3-7091-0693-8\_52
- Jin, K., Mao, Y., Mao, X., Xie, L., & Greenberg, D. A. (2010). Neuroglobin expression in ischemic stroke. *Stroke*, *41*(3), 557-559. doi:10.1161/strokeaha.109.567149
- Johnson, K. A., Olson, J. S., & Phillips, G. N., Jr. (1989). Structure of myoglobin-ethyl isocyanide. Histidine as a swinging door for ligand entry. *Journal of Molecular Biology*, *207*(2), 459-463.
- Jue, T., & La Mar, G. N. (1984). Heme orientational heterogeneity in deuterohemin-reconstituted horse and human hemoglobin characterized by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *119*(2), 640-645.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, D. C., & Shore, V. C. (1960). Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, *185*(4711), 422-427.
- Kendrew, J. C., & Parrish, R. G. (1957). The Crystal Structure of Myoglobin. III. Sperm-Whale Myoglobin. *Proceedings of the Royal Society of London. Section A, Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *238*(1214). doi:10.1098/rspa.1957.0002
- Khan, A. A., Mao, X. O., Banwait, S., DerMardirossian, C. M., Bokoch, G. M., Jin, K., & Greenberg, D. A. (2008). Regulation of hypoxic neuronal death signaling by neuroglobin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *22*(6), 1737-1747. doi:10.1096/fj.07-100784
- Kiger, L., Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., . . . Marden, M. C. (2004). Neuroglobin Ligand Binding Kinetics. *IUBMB Life*, *56*(11-12), 709-719. doi:10.1080/15216540500037711
- Kim, G. W., Noshita, N., Sugawara, T., & Chan, P. H. (2001). Early decrease in dna repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, *32*(6), 1401-1407.
- Kitatsuji, C., Kurogochi, M., Nishimura, S., Ishimori, K., & Wakasugi, K. (2007). Molecular basis of guanine nucleotide dissociation inhibitor activity of human neuroglobin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, *368*(1), 150-160. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.002
- Kriegel, J. M., Bhattacharyya, A. J., Nienhaus, K., Deng, P., Minkow, O., & Ulrich Nienhaus, G. (2002). Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *99*(12), 7992-7997. doi:10.1073/pnas.082244399
- La Mar, G. N., Anderson, R. R., Budd, D. L., Smith, K. M., Langry, K. C., Gersonde, K., & Sick, H. (1981). Proton nuclear magnetic resonance investigation of the nature of solution conformational equilibria of monomeric insect deoxyhemoglobins. *Biochemistry*, *20*(15), 4429-4436.
- La Mar, G. N., Budd, D. L., Viscio, D. B., Smith, K. M., & Langry, K. C. (1978). Proton nuclear magnetic resonance characterization of heme disorder in hemoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *75*(12), 5755-5759.
- La Mar, G. N., Burns, P. D., Jackson, J. T., Smith, K. M., Langry, K. C., & Strittmatter, P. (1981). Proton magnetic resonance determination of the relative heme orientations in disordered native and reconstituted ferricytochrome b5. Assignment of heme resonances by deuterium labeling. *The Journal of Biological Chemistry*, *256*(12), 6075-6079.
- La Mar, G. N., Smith, K. M., Gersonde, K., Sick, H., & Overkamp, M. (1980). Proton nuclear magnetic resonance characterization of heme disorder in monomeric insect hemoglobins. *The Journal of Biological Chemistry*, *255*(1), 66-70.

- La Mar, G. N., Yamamoto, Y., Jue, T., Smith, K. M., & Pandey, R. K. (1985). <sup>1</sup>H NMR characterization of metastable and equilibrium heme orientational heterogeneity in reconstituted and native human hemoglobin. *Biochemistry*, *24*(15), 3826-3831.
- Lane, N. (2003). *Oxygen: the molecule that made the world*. usa: Oxford University Press.
- Laufs, T. L., Wystub, S., Reuss, S., Burmester, T., Saaler-Reinhardt, S., & Hankeln, T. (2004). Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neuroscience Letters*, *362*(2), 83-86. doi:10.1016/j.neulet.2004.02.072
- Lechauve, C., Augustin, S., Cwerman-Thibault, H., Bouaita, A., Forster, V., Célier, C., . . . Corral-Debrinski, M. (2012). Neuroglobin involvement in respiratory chain functions and retinal ganglion cell integrity. *Biochimica and Biophysica Acta*, *1823*(12), 2261-2273. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.09.009
- Li, R. C., Morris, M. W., Lee, S. K., Pouranfar, F., Wang, Y., & Gozal, D. (2008). Neuroglobin protects PC12 cells against oxidative stress. *Brain Research*, *1190*, 159-166. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.022
- Li, R. C., Pouranfar, F., Lee, S. K., Morris, M. W., Wang, Y., & Gozal, D. (2008). Neuroglobin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury. *Neurobiology of Aging*, *29*(12), 1815-1822. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.001
- Light, W. R., Rohlfs, R. J., Palmer, G., & Olson, J. S. (1987). Functional effects of heme orientational disorder in sperm whale myoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(1), 46-52.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113), 787-795. doi:10.1038/nature05292
- Liu, A., & Brittain, T. (2015). A Futile Redox Cycle Involving Neuroglobin Observed at Physiological Temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(8), 20082-20094. doi:10.3390/ijms160820082
- Liu, J., Yu, Z., Guo, S., Lee, S. R., Xing, C., Zhang, C., . . . Wang, X. (2009). Effects of neuroglobin overexpression on mitochondrial function and oxidative stress following hypoxia/reoxygenation in cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(1), 164-170. doi:10.1002/jnr.21826
- Liu, Y., Li, B., Li, Q., & Zou, L. (2015). Neuroglobin up-regulation after ischaemic pre-conditioning in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Brain Injury*, *29*(5), 651-657. doi:10.3109/02699052.2014.1002004
- Makino, M., Sugimoto, H., Sawai, H., Kawada, N., Yoshizato, K., & Shiro, Y. (2006). High-resolution structure of human cytoglobin : identification of extra n-and c-termini and a new dimerization mode. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, *62*(6), 671-677. doi:10.1107/S0907444906013813
- Marzatico, F., & Cafe, C. (1993). Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Functional Neurology*, *8*(1), 51-66.
- Mathews, A. J., & Brittain, T. (2001). Haem disorder in recombinant- and reticulocyte-derived haemoglobins: evidence for stereoselective haem insertion in eukaryotes. *The Biochemical Journal*, *357*(Pt 1), 305-311.
- Merx, M. W., Flogel, U., Stumpe, T., Godecke, A., Decking, U. K., & Schrader, J. (2001). Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(6), 1077-1079.
- Morishima, I., & Inubushi, T. (1977). NMR studies of the binding of <sup>15</sup>N-labeled ligands to hemoproteins. pH-Dependent features of heme-bound C<sup>15</sup>N-resonances in cyanide complexes of myoglobin and cytochrome c and some implications for their heme environmental structures. *FEBS Letters*, *81*(1), 57-60.
- Morozov, A. N., Roach, J. P., Kotzer, M., & Chatfield, D. C. (2014). A possible mechanism for redox control of human neuroglobin activity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(7), 1997-2003. doi:10.1021/ci5002108

- Moschetti, T., Giuffrè, A., Ardiccioni, C., Vallone, B., Modjtahedi, N., Kroemer, G., & Brunori, M. (2009). Failure of apoptosis-inducing factor to act as neuroglobin reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(1), 121-124. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.078
- Nadra, A. D., Marti, M. A., Pesce, A., Bolognesi, M., & Estrin, D. A. (2008). Exploring the molecular basis of heme coordination in human neuroglobin. *Proteins*, 71(2), 695-705. doi:10.1002/prot.21814
- Nicolis, S., Monzani, E., Ciaccio, C., Ascenzi, P., Moens, L., & Casella, L. (2007). Reactivity and endogenous modification by nitrite and hydrogen peroxide : does human neuroglobin act only as a scavenger? *The Biochemical Journal*, 407(1), 89-99. doi:10.1042/BJ20070372
- Ordway, G. A., & Garry, D. J. (2004). Myoglobin : an essential hemoprotein in striated muscle. *The Journal of Experimental Biology*, 207(20), 3441-3446. doi:10.1242/jeb.01172
- Orlowski, S., & Nowak, W. (2008). Topology and thermodynamics of gaseous ligands diffusion paths in human neuroglobin. *Biosystems*, 94(3), 263-266. doi:10.1016/j.biosystems.2008.04.016
- Ouellet, Y., Milani, M., Couture, M., Bolognesi, M., & Guertin, M. (2006). Ligand interactions in the distal heme pocket of Mycobacterium tuberculosis truncated hemoglobin N: roles of TyrB10 and GlnE11 residues. *Biochemistry*, 45(29), 8770-8781. doi:10.1021/bi060112o
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science : a publication of the Protein Society*, 4(11), 2411-2423. doi:10.1002/pro.5560041120
- Paul, K. G., Theorell, H., & Akeson, A. (1953). The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine hemochrom). *Acta Chimica Scandinavica*, 7, 4.
- Perutz, M. F. (1979). Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annual Review of Biochemistry*, 48, 327-386. doi:10.1146/annurev.bi.48.070179.001551
- Perutz, M. F. (1989). Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(2), 42-44.
- Perutz, M. F. (1990). Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Annual Review of Physiology*, 52, 1-25. doi:10.1146/annurev.ph.52.030190.000245
- Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S. . (2002). Neuroglobin and cytoglobin, Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Reports*, 3(12), 1146-1151. doi:10.1093/embo-reports/kvf248
- Pesce, A., Couture, M., Dewilde, S., Guertin, M., Yamauchi, K., Ascenzi, P. . (2000). A novel two-over-two  $\alpha$ -helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family. *The EMBO Journal*, 19(11), 2424-2434. doi:10.1093/emboj/19.11.2424
- Pesce, A., De Sanctis, D., Nardini, M., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., . . . Bolognesi, M. (2004). Reversible hexa- to penta-coordination of the heme Fe atom modulates ligand binding properties of neuroglobin and cytoglobin. *IUBMB Life*, 56(11-12), 657-664. doi:10.1080/15216540500078830
- Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., . . . Bolognesi, M. (2003). Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure*, 11(9), 1087-1095.
- Picotti, P., Dewilde, S., Fago, A., Hundahl, C., De Filippis, V., Moens, L., & Fontana, A. (2009). Unusual stability of human neuroglobin at low pH--molecular mechanisms and biological significance. *The FEBS journal*, 276(23), 7027-7039. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07416.x
- Picotti, P., Marabotti, A., Negro, A., Musi, V., Spolaore, B., Zamboni, M., & Fontana, A. (2004). Modulation of the structural integrity of helix F in apomyoglobin by single amino acid replacements. *Protein Science : a publication of the Protein Society*, 13(6), 1572-1585. doi:10.1110/ps.04635304
- Provencher, S. W., & Glockner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20(1), 33-37.

- Ptitsyn, O. B., & Ting, K. L. H. (1999). Non-functional conserved residues in globins and their possible role as a folding nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 291(3), 671-682. doi:10.1006/jmbi.1999.2920
- Qin, H. J., Zhang, L. S., Wu, N., Guo, Y. D., Zhang, L., Li, M. Y., & Guan, P. (2008). Study on the distribution and location of neuroglobin in human tissues and cells. *Journal of Sichuan University, Medical science edition*, 39(4), 609-611.
- Raychaudhuri, S., Skommer, J., Henty, K., Birch, N., & Brittain, T. (2010). Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death. *Apoptosis*, 15(4), 401-411. doi:10.1007/s10495-009-0436-5
- Reuss, S., Banica, O., Elgurt, M., Mitz, S., Disque-Kaiser, U., Riemann, R., . . . Wolf, N. K. (2016). Neuroglobin Expression in the Mammalian Auditory System. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1461-1477. doi:10.1007/s12035-014-9082-1
- Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T., & Hankeln, T. (2002). Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*, 115(3), 645-656.
- Ringe, D., Petsko, G. A., Kerr, D. E., & Ortiz de Montellano, P. R. (1984). Reaction of myoglobin with phenylhydrazine: a molecular doorstop. *Biochemistry*, 23(1), 2-4.
- Roberts, P. A., Gaffney, E. A., Luthert, P. J., Foss, A. J., & Byrne, H. M. (2015). Retinal oxygen distribution and the role of neuroglobin. *Journal of Mathematical Biology*. doi:10.1007/s00285-015-0931-y
- Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., Burmester, T. . (2005). A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates : evidence for two distinct globin families in animals. *Molecular Biology and Evolution*, 22(1), 12-20. doi:10.1093/molbev/msh258
- Rwere, F., Mak, P. J., & Kincaid, J. R. (2008). Resonance Raman interrogation of the consequences of heme rotational disorder in myoglobin and its ligated derivatives. *Biochemistry*, 47(48), 12869-12877. doi:10.1021/bi801779d
- Sawai, H., Kawada, N., Yoshizato, K., Nakajima, H., Aono, S., & Shiro, Y. (2003). Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans. *Biochemistry*, 42(17), 5133-5142. doi:10.1021/bi027067e
- Sawai, H., Makino, M., Mizutani, Y., Ohta, T., Sugimoto, H., Uno, T., . . . Shiro, Y. (2005). Structural characterization of the proximal and distal histidine environment of cytoglobin and neuroglobin. *Biochemistry*, 44(40), 13257-13265. doi:10.1021/bi050997o
- Schmidt, M., Giessl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., & Burmester, T. (2003). How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1932-1935. doi:10.1074/jbc.M209909200
- Scholander, P. F. (1960). Oxygen transport through hemoglobin solutions. *Science*, 131(3400), 585-590.
- Schwarze, K., Singh, A., & Burmester, T. (2015). The Full Globin Repertoire of Turtles Provides Insights into Vertebrate Globin Evolution and Functions. *Genome Biology and Evolution*, 7(7), 1896-1913. doi:10.1093/gbe/evv114
- Scott, E. E., & Gibson, Q. H. (1997). Ligand migration in sperm whale myoglobin. *Biochemistry*, 36(39), 11909-11917. doi:10.1021/bi970719s
- Shang, A., Yang, Y., Wang, H., Wang, J., Hang, X., Wang, Z., & Zhou, D. (2015). Upregulation of neuroglobin expression and changes in serum redox indices in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 1693-1698. doi:10.3892/mmr.2015.3593
- Shulman, R. G., Wuthrich, K., Yamane, T., Antonini, E., & Brunori, M. (1969). Nuclear magnetic resonances of reconstituted myoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 63(3), 623-628.
- Simon, R. (2013). Neuroglobin: neuroprotection and neurogenesis. *Neuroscience Letters*, 549, 1-2. doi:10.1016/j.neulet.2013.05.016

- Skommer, J., & Brittain, T. (2012). Extended survival of SH-SY5Y cells following overexpression of Lys67Glu neuroglobin is associated with stabilization of DeltapsiM. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81(7), 602-610. doi:10.1002/cyto.a.22046
- Smagghe, B. J., Sarath, G., Ross, E., Hilbert, J. L., & Hargrove, M. S. (2006). Slow ligand binding kinetics dominate ferrous hexacoordinate hemoglobin reactivities and reveal differences between plants and other species. *Biochemistry*, 45(2), 561-570. doi:10.1021/bi051902l
- Smith, K. M. (Ed.) (1975). *Porphyryns and metalloporphyryns*: Elsevier scientific publishing company.
- Sono, M., Andersson, L. A., & Dawson, J. H. (1982). Sulfur donor ligand binding to ferric cytochrome P-450-CAM and myoglobin. Ultraviolet-visible absorption, magnetic circular dichroism, and electron paramagnetic resonance spectroscopic investigation of the complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(14), 8308-8320.
- Sprang, S. R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 639-678. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.639
- Sreerama, N., & Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 252-260. doi:10.1006/abio.2000.4880
- Sugawara, T., & Chan, P. H. (2003). Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxidants & redox signaling*, 5(5), 597-607. doi:10.1089/152308603770310266
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y., & Greenberg, D. A. (2001). Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98(26), 15306-15311. doi:10.1073/pnas.251466698
- Suto, D., Sato, K., Ohba, Y., Yoshimura, T., & Fujii, J. (2005). Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a haem redox state-independent mechanism. *The Biochemical Journal*, 392(Pt 2), 399-406. doi:10.1042/bj20050580
- SX20 Hardware User Guide (2006). *Applied photophysics*.
- Takahashi, N., Watanabe, S., & Wakasugi, K. (2013). Crucial roles of Glu60 in human neuroglobin as a guanine nucleotide dissociation inhibitor and neuroprotective agent. *PLoS One*, 8(12), e83698. doi:10.1371/journal.pone.0083698
- Tilton, R. F., Jr., Kuntz, I. D., Jr., & Petsko, G. A. (1984). Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin-xenon complex solved to 1.9 Å. *Biochemistry*, 23(13), 2849-2857.
- Tiwari, P. B., Astudillo, L., Miksovskaja, J., Wang, X., Li, W., Darici, Y., & He, J. (2014). Quantitative study of protein-protein interactions by quartz nanopipettes. *Nanoscale*, 6(17), 10255-10263. doi:10.1039/c4nr02964j
- Tomita, A., Kreutzer, U., Adachi, S., Koshihara, S., Jue, T. . (2010). 'It's hollow': the function of pores within myoglobin. *The Journal of Experimental Biology*, 213(16), 2748-2754. doi:10.1242/jeb.042994
- Uno, T., Ryu, D., Tsutsumi, H., Tomisugi, Y., Ishikawa, Y., Wilkinson, A. J., . . . Hayashi, T. (2004). Residues in the distal heme pocket of neuroglobin. Implications for the multiple ligand binding steps. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5886-5893. doi:10.1074/jbc.M311748200
- Urry, D. W. (1967). The heme chromophore in the ultraviolet. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(19), 4441-4448.
- Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane, D., . . . Kiger, L. (2004). Neuroglobin and Other Hexacoordinated Hemoglobins Show a Weak Temperature Dependence of Oxygen Binding. *Biophysical Journal*, 87(2), 1196-1204. doi:10.1529/biophysj.104.042168
- Vallone, B., Nienhaus, K., Brunori, M., & Nienhaus, G. U. (2004). The structure of murine neuroglobin: Novel pathways for ligand migration and binding. *Proteins*, 56(1), 85-92. doi:10.1002/prot.20113

- Vallone, B., Nienhaus, K., Matthes, A., Brunori, M., & Nienhaus, G. U. (2004). The structure of carbonmonoxy neuroglobin reveals a heme-sliding mechanism for control of ligand affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *101*(50), 17351-17356. doi:10.1073/pnas.0407633101
- Van Doorslaer, S., Dewilde, S., Kiger, L., Nistor, S. V., Goovaerts, E., Marden, M. C., & Moens, L. (2003). Nitric Oxide Binding Properties of Neuroglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(7), 4919-4925. doi:10.1074/jbc.M210617200
- Van Leuven, W., Cuypers, B., Desmet, F., Giordano, D., Verde, C., Moens, L., . . . Dewilde, S. (2013). Is the heme pocket region modulated by disulfide-bridge formation in fish and amphibian neuroglobins as in humans? *Biochimica and Biophysica Acta*, *1834*(9), 1757-1763. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.042.
- Van Stokkum, I. H., Spoelder, H. J., Bloemendal, M., van Grondelle, R., & Groen, F. C. (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry*, *191*(1), 110-118.
- Ver Ploeg, D. A., & Alberty, R. A. (1968). Kinetics of binding of cyanide to sperm whale metmyoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, *243*(2), 435-440.
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, *294*(5545), 1299-1304. doi:10.1126/science.1062023
- Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., & Gough, J. (2006). A phylogenomic profile of globins. *BMC Evolutionary Biology*, *6*(31). doi:10.1186/1471-2148-6-31
- Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Mizuguchi, K., Dewilde, S., & Moens, L. (2007). A model of globin evolution. *Gene*, *398*(1-2), 132-142. doi:10.1016/j.gene.2007.02.041
- Vinogradov, S. N., & Moens, L. (2008). Diversity of globin function : enzymatic, transport, storage and sensing. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(14), 8773-8777. doi:10.1074/jbc.R700029200
- Vogel, K. M., Spiro, T. G., Shelver, D., Thorsteinsson, M. V., & Roberts, G. P. (1999). Resonance Raman evidence for a novel charge relay activation mechanism of the CO-dependent heme protein transcription factor CooA. *Biochemistry*, *38*(9), 2679-2687. doi:10.1021/bi982375r
- Vorasubin, N., Hosokawa, S., Hosokawa, K., Ishiyama, G., Ishiyama, A., & Lopez, I. A. (2016). Neuroglobin immunoreactivity in the human cochlea. *Brain Research*, *1630*, 56-63. doi:10.1016/j.brainres.2015.11.002
- Vosler, P. S., Graham, S. H., Wechsler, L. R., & Chen, J. (2009). Mitochondrial targets for stroke: focusing basic science research toward development of clinically translatable therapeutics. *Stroke*, *40*(9), 3149-3155. doi:10.1161/strokeaha.108.543769
- Wakasugi, K., & Morishima, I. (2005). Identification of residues in human neuroglobin crucial for Guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochemistry*, *44*(8), 2943-2948. doi:10.1021/bi0477539
- Wakasugi, K., Nakano, T., & Morishima, I. (2003). Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(38), 36505-36512. doi:10.1074/jbc.M305519200
- Watanabe, S., Takahashi, N., Uchida, H., & Wakasugi, K. (2012). Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(36), 30128-30138. doi:10.1074/jbc.M112.373381
- Watanabe, S., & Wakasugi, K. (2008). Neuroprotective function of human neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *369*(2), 695-700. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.089
- Weber, R. E., & Vinogradov, S. N. (2001). Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiological Reviews*, *81*(2), 569-628.
- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, *32*(Web Server issue), W668-673. doi:10.1093/nar/gkh371



- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, *89*(5), 392-400. doi:10.1002/bip.20853
- Wittenberg, B. A., & Wittenberg, J. B. (1989). Transport of oxygen in muscle. *Annual Review of Physiology*, *51*, 857-878. doi:10.1146/annurev.ph.51.030189.004233
- Wittenberg, J. B., & Wittenberg, B. A. (2003). Myoglobin function reassessed. *The Journal of Experimental Biology*, *206*(Pt 12), 2011-2020.
- Woese, C. R., Kandler, O., & L., W. M. (1990). Toward a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *87*(12), 4576-4579.
- Wu, L. B., Yuan, H., Zhou, H., Gao, S. Q., Nie, C. M., Tan, X., . . . Lin, Y. W. (2016). An intramolecular disulfide bond designed in myoglobin fine-tunes both protein structure and peroxidase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *600*, 47-55. doi:10.1016/j.abb.2016.04.012
- Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., . . . Reuss, S. (2003). Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neuroscience Letters*, *346*(1-2), 114-116.
- Xu, J., Li, L., Yin, G., Li, H., & Du, W. (2009). Ligand orientation of human neuroglobin obtained from solution NMR and molecular dynamics simulation as compared with X-ray crystallography. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *103*(12), 1693-1701. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.09.016
- Xu, J., Yin, G., & Du, W. (2011). Distal mutation modulates the heme sliding in mouse neuroglobin investigated by molecular dynamics simulation. *Proteins*, *79*(1), 191-202. doi:10.1002/prot.22872
- Xu, J., Yin, G., Huang, F., Wang, B., & Du, W. (2010). Molecular dynamics simulation of a carboxy murine neuroglobin mutated on the proximal side: heme displacement and concomitant rearrangement in loop regions. *Journal of Molecular Modeling*, *16*(4), 759-770. doi:10.1007/s00894-009-0581-3
- Yamamoto, Y., & La Mar, G. N. (1986). <sup>1</sup>H NMR study of dynamics and thermodynamics of heme rotational disorder in native and reconstituted hemoglobin A. *Biochemistry*, *25*(18), 5288-5297.
- Yamashita, T., Hafsi, L., Masuda, E., Tsujino, H., & Uno, T. (2014). Ferric human neuroglobin scavenges superoxide to form oxy adduct. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *62*(6), 613-615.
- Yee, S., & Peyton, D. H. (1991). Proton NMR investigation of the reconstitution of equine myoglobin with hemin dicyanide. Evidence for late formation of the proximal His93F8-iron bond. *FEBS Letters*, *290*(1-2), 119-122.
- Yonetani, T., & Laberge, M. (2007). Common dynamics of globin family proteins. *IUBMB Life*, *59*(8-9), 528-534. doi:10.1080/15216540701222914
- Yu, C., Gunsalus, I. C., Katagiri, M., Suhara, K., & Takemori, S. (1974). Cytochrome P-450cam. I. Crystallization and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *249*(1), 94-101.
- Yu, Z., Liu, N., Liu, J., Yang, K., & Wang, X. (2012). Neuroglobin, a novel target for endogenous neuroprotection against stroke and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(6), 6995-7014. doi:10.3390/ijms13066995
- Yu, Z., Poppe, J. L., & Wang, X. (2013). Mitochondrial mechanisms of neuroglobin's neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*, 756989. doi:10.1155/2013/756989

**Titre : Etude de l'influence de modifications structurales sur la Neuroglobine humaine**

**Mots clés : Neuroglobine, Mutagenèse dirigée, Cinétiques de réaction**

**Résumé :** La neuroglobine humaine (Ngb) est une globine découverte en 2000 dont la fonction principale demeure encore inconnue. La Ngb possède une séquence en acides aminés particulière. Il en résulte des caractéristiques structurales propres à la Ngb. L'hème, qui constitue le site actif de la Ngb, est hexacoordiné par l'histidine distale 64 et existe sous deux formes isomères A et B. La Ngb comprend également un pont disulfure Cys46-Cys55 intramoléculaire.

La relation entre ces spécificités et d'éventuelles fonctions de la Ngb demeure cependant assez mal explorée. Notre objectif durant la thèse, était de mettre en évidence *in vitro* l'influence de différents éléments structuraux sur les propriétés et la réactivité de la Ngb. Pour ce faire, les mutations H64V, F106L, A90P et C46G ont été réalisées. Des études expérimentales à l'aide de spectrophotométrie UV-visible, de dichroïsme circulaire et de RMN, ont été effectuées pour

caractériser les mutants synthétisés, tester leur stabilité en fonction du pH et évaluer leur réactivité vis-à-vis de la fixation du ligand CN.

Nous avons ainsi montré que la structure de la Ngb était influencée par la présence de l'histidine distale, du pont disulfure et de l'environnement de l'hème. L'étude, pour la première fois, des coefficients d'extinction molaire des protéines mutées a permis de souligner l'impact des acides aminés au voisinage de l'hème mais aussi du pont disulfure sur l'environnement électronique de l'hème. Nous avons aussi mis en évidence que le pont disulfure et les acides aminés mutés influent sur la capacité de la forme isomère A de la Ngb à fixer le cyanure. La forme isomère B est en revanche peu impactée par ces deux paramètres. Cela soulève la question de l'existence et de la fonction des deux formes isomères de l'hème *in vivo*.

**Title : Study of the influence of structural modifications in the human Neuroglobin**

**Mots clés : Neuroglobin, Site-directed mutagenesis, Ligand binding kinetics**

**Résumé :** The physiological function of Human Neuroglobin (Ngb), discovered in 2000, is still unknown. Ngb has some structural specificities. Its haem, which is its reactive centre, is hexacoordinated by distal histidine 64 and exists under two isomer forms A and B. Moreover, Ngb possesses an intramolecular disulfide bridge between two cysteines 46 and 55.

The relationship between its structural characteristics and its functions *in vivo* does not remain well-understood. The goal of this thesis was to underline the impact of some structural features on the Ngb properties and reactivity *in vitro*. Thus Ngb variants H64V, F106L, A90P and C46G were produced. Experimental studies were performed by UV-Visible spectrophotometry, circular dichroism and NMR. Variants were

characterized : their stability as a function of pH were tested and their reactivity through the CN binding reaction were evaluated.

We have shown that the Ngb structure was strongly dependant on the presence of the distal histidine, the disulfide bridge and the haem environment. The first and unique determination of variants' molar absorption coefficients underlined the influence of the haem vicinity and disulfide bridge on the electronic haem environment. We have brought some evidence that the disulfide bridge and the mutated amino acids have an impact on the isomer A Ngb ability to bind the cyanide whereas isomer B is poorly affected by those two parameters. This phenomenon raises the issue of the existence and function of the two isomer forms *in vivo*.

