



HAL
open science

Chemins de protonation et réactivité des métalloenzymes : application à la superoxide réductase

Rolf David

► **To cite this version:**

Rolf David. Chemins de protonation et réactivité des métalloenzymes : application à la superoxide réductase. Chimie théorique et/ou physique. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV087 . tel-01761451

HAL Id: tel-01761451

<https://theses.hal.science/tel-01761451v1>

Submitted on 9 Apr 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Physique Moléculaire et Structurale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Rolf DAVID

Thèse dirigée par

Anne MILET, Professeur, Université Grenoble Alpes

et coencadrée par

Yohann MOREAU, Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
et du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Chemins de protonation et réactivité des métalloenzymes

Application à la superoxyde réductase

Thèse soutenue publiquement le **28 novembre 2017**,
devant le jury composé de :

Madame Carine MICHEL

Chargée de Recherche, CNRS Délégation Rhône-Auvergne, Rapporteur

Monsieur Gerald MONARD

Professeur, Université de Lorraine, Rapporteur

Madame Élise DUMONT

Professeur, ENS Lyon, Examinateur

Monsieur Stéphane MENAGE

Directeur de Recherche, CNRS Délégation Alpes, Président

Madame Anne MILET

Professeur, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Monsieur Yohann MOREAU

Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes, Coencadrant de thèse



Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse Anne Milet pour m'avoir encadré tout en me laissant l'initiative de mener ma recherche et pour les discussions scientifiques ou non autour d'un thé.

Je remercie aussi mon coencadrant Yohann Moreau pour les nombreuses discussions scientifiques autour de la SOR.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du Jury, et en particulier aux rapporteurs, pour avoir accepté de juger ce travail.

Merci à Serge Cosnier, directeur du Département de Chimie Moléculaire et à Stéphane Ménage, directeur du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux ainsi qu'à tous les membres de ces deux laboratoires pour m'avoir accueilli.

Merci à Pierre pour le support et pour les échanges très nombreux autour d'un café, et aux structures CECIC et CIMENT pour les millions d'heures de calculs effectuées.

Merci aussi à d'un côté Vincent pour la collaboration fructueuse sur la SOR et d'un autre Hélène, Aurore, Gisèle, Catherine et James qui m'ont associés à leurs recherches.

Merci à tous les non-permanents que cela soit du LCBM (Jessy, Serge, Jérôme, Johanna, Marianne, Amel, Xavier, Sarah) ou du DCM (Margot, Gwendoline, Jules, Vianney, James) pour les nombreuses discussions scientifiques (ou pas) autour d'une bonne pinte ou d'un café.

Merci à tout le staff du O'Callaghan pour avoir éteint ma soif sans jamais faillir.

I would like to thank Jennifer for being here all these years, and also Kahlúa and Whisky for being annoying.

Pour finir, merci à mes amis Normands et à ma famille.

Ah! et bon week-end!

Table des matières

Introduction	9
I Méthodologies pour l'étude des métalloenzymes	17
Chapitre 1 Théorie : Niveaux de calculs	19
1.1 Mécanique moléculaire	19
1.1.1 Principes généraux : champ de force	19
1.1.2 Développement de paramètres	23
1.1.2.1 Charges & paramètres de Van der Waals	23
1.1.2.2 Détermination des constantes de force : méthode de Semi- nario	24
1.2 Mécanique quantique et DFT	26
1.2.1 DFT : principes généraux	27
1.2.2 Fonctions de base	31
1.3 Méthodes hybrides	32
1.3.1 QM/MM soustractive	32
1.3.2 QM/MM additive	33
1.3.3 Coupure QM/MM	34
Chapitre 2 Faire évoluer le système et simuler sa réactivité	37
2.1 Statique	37

2.2	Dynamique	38
2.2.1	Équations de mouvement	39
2.2.2	Ensembles thermodynamiques	41
2.3	Métadynamique	42
2.3.1	Principes et variables collectives	43
II	Étude de la SOR	49
Chapitre 3	La forme sauvage de la SOR	51
3.1	Description de l'état haut spin du fer du site actif	51
3.2	Étude conformationnelle	53
3.2.1	Développement des paramètres MM du site actif	53
3.2.2	Validation des paramètres et conformation du site actif	57
3.2.3	Liaisons hydrogènes : interactions avec le substrat	66
3.3	Réactivité native	72
3.3.1	Mise en place d'une méthodologie QM/MM : DFT hybride + MM .	73
3.3.2	Étude par métadynamique de la réactivité	76
3.3.2.1	Chemin de protonation pour la conformation «directe» . .	78
3.3.2.2	Chemin de protonation pour la conformation «une H ₂ O pontante»	81
3.3.2.3	Analyse des chemins réactionnels suivis	84
3.4	Étude de la réactivité non-native	91
3.4.1	Couple de variables collectives	92
3.4.2	Simulations en suivant une seule variable collective	99
3.5	Conclusions sur la forme sauvage de la SOR	103
Chapitre 4	Étude des mutants de la SOR	107
4.1	Les mutations de la SOR : étude conformationnelle	110
4.1.1	Le site actif et mutations	110

4.1.2	La forme sauvage : conformations du squelette peptidique autour du site actif et influence sur Cys ¹¹⁶	121
4.1.2.1	Liaisons hydrogènes du squelette peptidique	121
4.1.2.2	Liens entre les dièdres du squelette peptidique et les conformations	124
4.1.2.3	Liaisons hydrogène impliquant le soufre de Cys ¹¹⁶ en fonction des conformations	128
4.1.2.4	Relations entre liaisons H avec S _{Cys116} et les distances Fer-Soufre et Fer-Oxygène	131
4.1.3	Les mutations : impact sur le squelette peptidique	133
4.1.3.1	Liaisons hydrogènes du squelette peptidique	133
4.1.3.2	Variations des conformations liées aux dièdres du squelette peptidique	136
4.1.3.3	Liaisons hydrogène avec le soufre de Cys ¹¹⁶ : effets des mutations	150
4.1.3.4	Relations entre liaisons H-S _{Cys116} et liaison Fe-S _{Cys116}	156
4.1.4	Autour du ligand ⁻ OOH et son réseau de liaisons hydrogène	158
4.1.5	Analyse conformationnelle : conclusions	161
4.2	La réactivité des mutants : approche métadynamiques	162
4.2.1	N117A : mutation côté soufre de Cys ¹¹⁶	163
4.2.1.1	Réactivité native de N117A	165
4.2.1.2	Formation de Fe ⁴⁺ =O	173
4.2.2	K48I : mutation côté ligand ⁻ OOH	182
4.2.2.1	Réactivité native de K48I	183
4.2.2.2	Rupture de la liaison Op-Od dans K48I	186
4.3	Conclusion	188

Introduction

Le stress oxydatif provient d'une formation anormale des espèces d'oxygène réactives (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) dans les cellules, telles que le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) [1]. Bien que les ROS jouent également des fonctions cruciales dans la physiologie cellulaire, il est maintenant bien documenté que leur surproduction et/ou leur mauvaise gestion sont capables d'infliger de graves dommages biologiques, qui pourraient être impliqués dans la genèse des pathologies humaines telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et dégénératives [1, 2]. Pour contrer ces effets toxiques des ROS, les organismes vivants ont développé des mécanismes enzymatiques visant à catalyser très efficacement leur élimination [3]. En ce qui concerne le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, pendant des années, les enzymes de type superoxyde dismutases (SOD) étaient les seuls systèmes enzymatiques connus pour le détoxifier, en catalysant la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire [3].

Néanmoins, plus récemment, il a été découvert que certaines bactéries utilisaient un système alternatif pour éliminer $O_2^{\bullet-}$, impliquant la superoxyde réductase (SOR). Cette enzyme, contenant du fer, catalyse la réduction à un électron du superoxyde en peroxyde d'hydrogène (schéma 1), sans production d'oxygène moléculaire et implique donc une réaction différente de la SOD [4-9].

L'électron impliqué dans cette réaction est fourni par des réductases cellulaires, agissant comme partenaires physiologiques pour l'activité de la SOR :

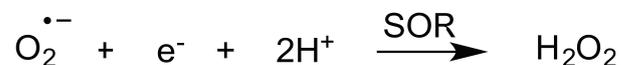


Schéma 1 – Réaction de réduction du $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 par la SOR.

Bien que SOD et SOR soient des enzymes non apparentées [9], elles éliminent le superoxyde avec un taux de réaction extrêmement rapide proche de la limite de diffusion, ce qui montre *in vivo* une efficacité dans la détoxification des superoxydes [10]. En raison de l'importance cruciale des processus de désintoxication des ROS dans les cellules, l'obtention d'informations sur ces systèmes est un grand défi. Alors que les mécanismes de réduction du superoxyde par les SOD ont été intensément documentés, celui de la SOR, caractérisé récemment, nécessite des clarifications substantielles [9].

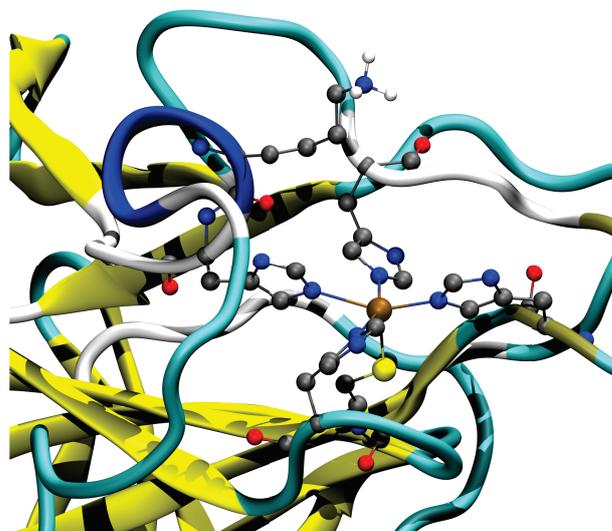


Figure 1 – Site actif de la SOR sous sa forme Fe^{2+} en surface de la protéine. Les quatre histidines, la cystéine, le fer ainsi que la lysine 48 à l'entrée sont représentées.

Le site actif de SOR (représenté figure 1) consiste en un centre de fer mononucléaire atypique, non-hémique, coordonné dans une géométrie pyramidale à base carrée par quatre azotes équatoriaux provenant d'histidines et un soufre d'une cystéine en position axiale ($[\text{FeN}_4\text{S}_1]$) [6–9]. Le site actif est très accessible au solvant puisqu'il est positionné à la surface de l'enzyme (non enfoui comme dans les SOD, par exemple). Bien que le site actif

soit identique dans toutes les SOR caractérisées jusqu'à présent, certaines enzymes comme celles de *Desulfoarculus baarsii* [11] et *Desulfovibrio vulgaris* [6] possèdent un deuxième centre de fer mononucléaire supplémentaire, localisé dans un domaine N terminal [6, 11]. Ce centre est de type désulfuredoxin (DX), avec un fer lié par quatre ligands cystéinates, dans une géométrie légèrement déformée par rapport au type rubredoxine ($[\text{FeS}_4]$) [12]. Il est situé à environ 22 Å du site actif, et jusqu'à maintenant, lorsqu'il est présent, sa fonction de catalyse n'a pas encore été définitivement établie, bien qu'il ait été proposé que ce site désulfuredoxine agisse comme un relais électronique vers le site actif [13–15].

Le cycle catalytique de la SOR a été largement étudié à la fois expérimentalement [7, 16–19] et théoriquement [19–23] et il est généralement décrit en quatre étapes principales, comme indiqué pour l'enzyme bien caractérisée de *D. baarsii* [19] (schéma 2). Pour la totalité du cycle catalytique, le centre de fer reste dans une configuration électronique haut spin [19].

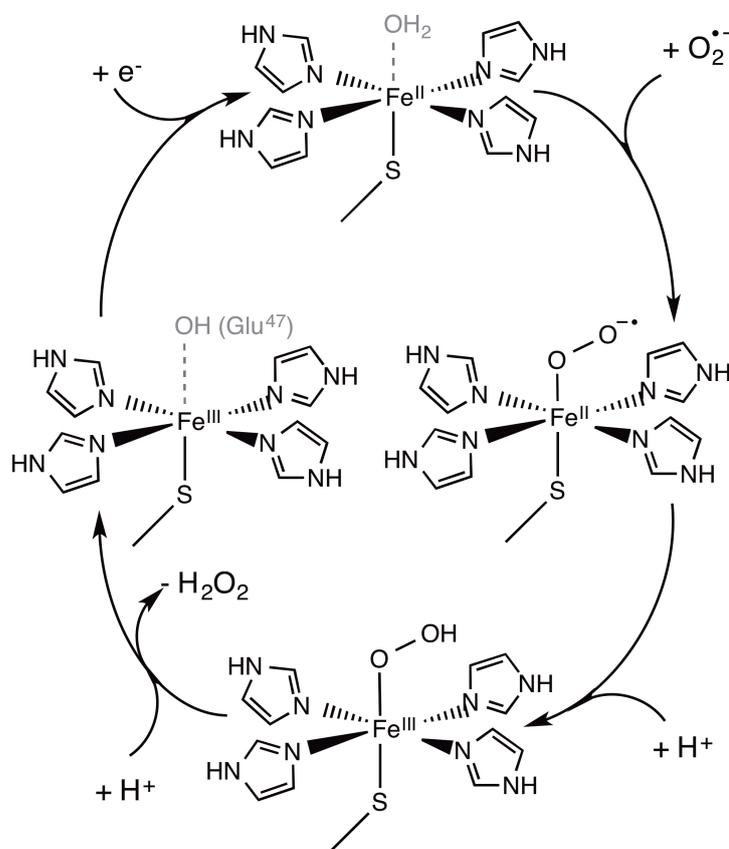


Schéma 2 – Cycle catalytique de la SOR.

À partir de l'état de repos réduit (Fe^{2+} , structure supérieure dans le schéma 2), le substrat superoxyde se lie à la sixième position libre du fer pour former un premier intermédiaire. Cet intermédiaire a été proposé comme étant une espèce fer ferreux liée au superoxyde ($\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$) [19, 22]. Ce premier intermédiaire est ensuite protoné *via* son oxygène distal (Od) avec un transfert d'un électron du fer ferreux vers le produit d'addition pour former un fer ferrique hydroperoxo ($\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$, deuxième intermédiaire, au bas du schéma 2). Dans cette première étape de protonation, il n'y a pas de preuve expérimentale claire de l'implication des résidus acides aminés appartenant à la deuxième sphère de coordination, le proton pourrait être directement fourni par un ion H_3O^+ provenant du solvant [7, 16, 17, 19]. L'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$, où l'hydroperoxyde se lie de façon *end-on* au centre de fer [24], a été expérimentalement piégé et bien caractérisé dans certains mutants du SOR de *D. baarsii* par des structures de rayons X à haute résolution [24], par résonance Raman [25–27] et par des spectroscopies Mössbauer [28]. Une deuxième étape de protonation, spécifiquement sur l'oxygène proximal (Op) de l'hydroperoxyde, a ensuite été proposée pour conduire à la formation et à la libération subséquente du produit H_2O_2 [19]. Cependant, cette deuxième étape de protonation n'a pas pu être observée directement ni étudiée expérimentalement, et il a été proposé qu'elle puisse correspondre à une étape très rapide non-limitante [19]. Néanmoins, les structures de rayons X de l'intermédiaire de $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ suggèrent que la Lys^{48} (lysine protonée numérotée en suivant la séquence de la SOR de *D. baarsii*), un résidu hautement conservé dans les différentes SOR situé près du site de fer, pourrait jouer un rôle critique dans cette deuxième étape de protonation [24]. Ces structures ont montré que Lys^{48} est impliquée dans un réseau de liaisons hydrogène avec l'oxygène proximal (Op) de $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$, via une molécule d'eau. Une telle conformation peut favoriser une protonation spécifique de l'oxygène proximal de l'intermédiaire réactionnel pour former le produit final H_2O_2 . Afin d'étudier cette hypothèse, des études utilisant le mutant K48I de la SOR de *D. baarsii* (lysine 48 remplacée par une isoleucine) ont montré qu'il y avait une modification de sa réactivité avec le superoxyde [19]. Bien que le premier intermédiaire $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ soit

encore formé et sa dégradation reste encore associée à une étape de protonation sur son oxygène distal (première étape de protonation), le produit H_2O_2 n'est plus formé. Il a été également montré que dans le mutant K48I, l'intermédiaire de $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ évolue vers une espèce fer-oxo à haut degré d'oxydation ($\text{Fe}=\text{O}$), à travers un clivage possible de la liaison O-O de l'hydroperoxo [29]. La formation de ces espèces fer-oxo dans le mutant K48I a été associée à un manque de protonation spécifique sur l'oxygène proximal de l'espèce $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$, favorisant probablement une double protonation de son oxygène distal entraînant un clivage de la liaison O-O et le départ d'une molécule d'eau [29]. Cette hypothèse a été faite en s'inspirant du cycle catalytique de P450 (site actif mononucléaire à Fer). Dans le cytochrome P450, un tel processus de double protonation de l'oxygène distal de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ (composé 0 dans P450) qui conduit à la formation d'une espèce fer-oxo à haut degré d'oxydation (composé I dans P450) a été décrit comme l'une des étapes clés dans son mécanisme de réaction, permettant la catalyse de l'oxydation de liaisons chimiques très stables de substrats [30]. Ainsi, les mécanismes par lesquels ces enzymes contrôlent la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ semblent déterminer leur activité, la détoxification pour SOR, l'oxygénation pour le cytochrome P450.

Enfin, après sa décooordiantion du fer, H_2O_2 est remplacé par un ligand $^-\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$, lui-même remplacé par la chaîne latérale du résidu de glutamate bien conservé (Glu^{47} , dans *D. baarsii*) [17, 19]. Le cycle catalytique peut redémarrer après la réduction à un électron par des réductases cellulaires de l'état de fer-ferrique vers l'état fer-ferreux [10] (schéma 2).

Lys^{48} n'est pas le seul résidu voisin qui aide à réguler la réactivité de la SOR. Les structures de rayons X de SOR ont montré qu'un résidu isoleucine (Ile^{118} dans la SOR de *D. baarsii*), placé à proximité du site actif, du côté du soufre liant le fer formait une interaction par une liaison hydrogène à travers sa chaîne principale NH avec l'atome de soufre du ligand cystéinate [11, 24]. Les expériences de mutagenèse dirigées sur ce résidu associées aux calculs DFT [23] ont montré que ce réseau de liaison H modulait l'effet *push-pull* du

ligand cystéinate [31], à savoir les propriétés électrodépresseurs du thiolate sur le fer. La modulation de cet *effet push* influançant sur le pKa du premier intermédiaire réactionnel et régulant son taux de protonation [23].

Ainsi, l'ensemble du site actif de la SOR est optimisé pour favoriser la réduction efficace du superoxyde en peroxyde d'hydrogène, et l'implication des deux protons pour former H_2O_2 représente un point central dans son mécanisme catalytique. Cependant, comme mentionné ci-dessus, contrairement aux propriétés du site actif et de sa sphère de coordination, ces étapes de protonation nécessaires pour convertir $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , et en particulier la seconde, ont été beaucoup moins bien étudiées expérimentalement [19]. Les calculs théoriques, afin de surmonter le manque d'informations expérimentales, sont particulièrement bien adaptés pour obtenir des informations détaillées sur ces processus critiques de protonation.

Les travaux antérieurs basés sur des calculs théoriques [22] ont porté sur l'étude de la première étape de protonation, c'est-à-dire la protonation de l'Od de $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ intermédiaire pour générer les espèces $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$. Il a été proposé que la lysine 48 puisse servir de relais de protons lors de cette première étape de protonation, soit *via* une interaction directe avec le substrat, soit *via* un réseau de liaison H impliquant une ou plusieurs molécule(s) d'eau. Pour évaluer le premier transfert de proton, les auteurs ont effectué des simulations de dynamique moléculaire QM/MM ainsi que des calculs QM. En termes de méthodologie, ce travail a montré l'importance d'une description appropriée de l'état du spin fer et a évalué la validité de plusieurs niveaux de calcul, y compris l'utilisation de la fonctionnelle B3LYP [32–34].

Dans cette thèse, nous présentons une série de calculs théoriques axés sur le mécanisme de la deuxième étape de protonation de la SOR, c'est-à-dire la protonation de l'intermédiaire clé $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ pour générer le produit de réaction H_2O_2 . Pour avoir une vision claire de l'ensemble du mécanisme ainsi que de l'impact de l'environnement autour du site actif et du réseau de liaison H avec des molécules de solvant, nous avons opté pour une approche

dynamique QM/MM de la protéine solvatée avec une étude exploratoire au niveau MM de la dynamique du réseau de liaison H sur l'intermédiaire de $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ainsi que de la conformation autour du site actif.

Dans un premier temps, nous avons validé la méthodologie sur le mécanisme de la seconde protonation formant H_2O (qui est la réactivité native) sur la forme sauvage de la SOR et étudié son mécanisme en détail. Ensuite nous avons étudié la réactivité non-native (formation d'une espèce Fe=O) pour comprendre la nature des intermédiaires formés. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la conformation de la seconde sphère de coordination du site actif sur la forme native ainsi que sur des mutants d'intérêt pour en comprendre la différence de réactivité. Nous avons enfin étudié le mécanisme de la réactivité native (formation de H_2O_2) et non-native (formation de Fe=O) pour des mutants sélectionnés pour mettre en évidence l'importance de certains résidus de la seconde sphère de coordination.

Première partie

Méthodologies pour l'étude des métalloenzymes

Chapitre 1

Théorie : Niveaux de calculs

Dans cette partie, nous avons utilisé principalement deux niveaux de théorie pour modéliser les systèmes étudiés : la mécanique moléculaire (MM) et la mécanique quantique (QM). La combinaison de ces deux méthodes au sein d'un même calcul donne la méthode QM/MM.

1.1 Mécanique moléculaire

Dans cette section, nous rappelons les principes généraux de la mécanique moléculaire utilisés dans cette thèse ainsi que les principes du développement de paramètres.

1.1.1 Principes généraux : champ de force

La mécanique moléculaire basée sur la mécanique classique représente l'énergie potentielle d'un système d'atomes liés entre eux. Les paramètres et équations des différentes interactions interatomiques sont "rassemblées" dans un champ de force [35–37]. Les forces sont divisées en deux catégories : les interactions liantes et les interactions non-liantes. Les forces liantes correspondent aux forces de liaisons entre deux atomes, aux forces de flexions

entre trois atomes et aux forces de torsions et forces impropres entre quatre atomes. Pour les interactions non liantes, qui agissent entre deux atomes non-liés, les champs de force incluent les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals.

Une liaison entre deux atomes (AB) correspond à la tension d'une liaison, elle s'écrit sous la forme d'un potentiel harmonique :

$$E_{liaisons} = \sum k_r (r - r_0)^2 \quad (1.1)$$

où k_r correspond à la constante de force de la liaison, r la distance entre les atomes A et B et r_0 la distance à l'équilibre entre ces deux atomes. La somme s'effectue sur toutes les paires d'atomes liés entre eux directement.

Les angles de liaisons entre trois atomes (ABC) correspondent à la flexion de l'angle reliant ces trois atomes, elle s'écrit aussi sous la forme d'un potentiel harmonique :

$$E_{angles} = \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (1.2)$$

où k_θ correspond à la constante de force de l'angle, θ l'angle entre les atomes A, B et C et θ_0 l'angle à l'équilibre entre ces trois atomes. Comme pour les liaisons, la somme s'effectue sur tous les ensembles de trois atomes liés.

Les termes dièdres correspondent à la torsion des atomes A/D autour de l'axe BC. L'énergie résultante s'écrit sous la forme :

$$E_{dièdres} = \sum k_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta)) \quad (1.3)$$

où k_ϕ correspond à la constante de force du dièdre, n le nombre de minima entre 0 et 2π , ϕ la valeur du dièdre et δ la phase.

Également, un autre type de torsion, dite impropre peut être caractérisée s'écrivant de la forme :

$$E_{impropres} = \sum k_{imp}(1 + \cos(2\omega - \pi)) \quad (1.4)$$

$$E_{impropres} = \sum k_{imp}(\omega - \omega_0)^2 \quad (1.5)$$

où k_{imp} représente la constante de force, ω la valeur de l'angle impropre qui correspond à la déviation de la planéité.

En plus des ces quatres potentiels utilisés, d'autres peuvent compléter ces représentations tels que des potentiels de Morse [38] pour les forces de liaisons ou des potentiels d'Urey-Bradley [39] pour compléter les représentations des angles de valences. Par ailleurs, certains champs de force utilise des termes croisés (par exemples regroupant élongation-flexion) ou des potentiels pour décrire les liaisons hydrogènes. N'ayant pas été utilisés dans ce travail, nous ne les détaillerons pas.

Pour les interactions non-liantes, nous avons deux termes : Van der Waals sous la forme d'un potentiel de Lennard-Jones (12-6) [40] et le terme électrostatique.

$$E_{vdW} = \sum_i \sum_{j \neq i} 4\epsilon_{i,j} \left[\frac{\sigma_{i,j}^{12}}{r_{i,j}^{12}} - \frac{\sigma_{i,j}^6}{r_{i,j}^6} \right] \quad (1.6)$$

où ϵ correspond à la profondeur du puits, σ la distance à laquelle le potentiel interatomique est nul et r la distance entre les deux atomes. Pour éviter de définir des valeurs de ϵ et σ pour chaque paire i, j spécifique, les approximations empiriques suivantes sont utilisées, pour $\epsilon_{i,j}$, le terme $\epsilon_{i,j}$ dépend de ϵ_i et de ϵ_j :

$$\epsilon_{i,j} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (1.7)$$

et pour $\sigma_{i,j}$:

$$\sigma_{i,j} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \quad (1.8)$$

ou

$$\sigma_{i,j} = \sqrt{\sigma_i \sigma_j} \quad (1.9)$$

Les approximations dépendent du champ de force utilisé.

Pour les interactions électrostatiques, l'énergie résulte directement de la loi de Coulomb.

$$E_{elect} = \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 r_{i,j}} \quad (1.10)$$

où q représente la charge, $r_{i,j}$ la distance entre les atomes i - j et ϵ_0 , la permittivité du vide.

Pour éviter des erreurs numériques, et puisque les interactions liantes sont déjà décrites par les termes de liaisons, de flexions, les interactions non-liantes ne s'appliquent généralement qu'à des paires i, j ou le nombre de liaisons entre les deux atomes est supérieure à trois (interaction supérieure à 1-4). Les interactions non-liantes 1-4 (comprenant trois liaisons séparant les atomes 1 et 4) sont modulées par un pré-facteur et les interactions non-liantes 1-2 et 1-3 sont généralement omises comme dans le cas du champ de force AMBER [35].

La somme de toutes ces forces représente l'énergie totale potentielle du système, qui alors s'écrit pour le champ de force AMBER [35], utilisé tout au long de cette thèse, sous la forme :

$$E_{total} = \sum_{liaisons} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dièdres} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\ + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{12}} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (1.11)$$

Dans cette thèse, nous avons utilisé le champ de force AMBER et développés des nouveaux paramètres pour les centres actifs métalliques dont nous avons besoin : chaque centre métallique nécessite des paramètres spécifiques pour une correcte description. La suite de cette section expliquera succinctement le modèle opératoire suivi pour développer ces paramètres, séparés en deux parties, une pour les interactions non-liantes (développement des charges principalement) et l'autre pour les interactions liantes (obtenions des constantes de forces et valeurs des distances/angles à l'équilibre).

1.1.2 Développement de paramètres

Pour simuler des résidus dits *non-standard* dans le champ de force AMBER, il faudra donc déterminer les paramètres nécessaires pour utiliser l'équation 1.11. Pour les interactions non-liantes, nous déterminerons la valeur de q pour la partie électrostatique, les valeurs de A et B (dépendantes des valeurs de ϵ et σ) pour les interactions de Van der Waals, les valeurs des différentes constantes k (ou sous la forme $\frac{V_n}{2}$) de forces et les valeurs des distances r , θ , ϕ ainsi que la phase γ et n dans le cas des interactions liantes.

1.1.2.1 Charges & paramètres de Van der Waals

Dans cette section, nous rappellerons sommairement l'utilisation de calculs *ab-initio* sur la molécule ou le résidu *non-standard* à étudier pour obtenir le potentiel électrostatique et en déduire les charges ponctuelles atomiques pour une utilisation dans le champ de force AMBER.

La première étape est de réaliser un calcul *ab-initio* sur la molécule choisie et d'en calculer le potentiel électrostatique (ESP ou *ElectroStatic Potential* [41]). L'ESP est représenté sous la forme au point r proche de la molécule par :

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|r - R_A|} - \sum_{mn} P_{mn} \int \frac{\phi_m \phi_n}{|r - r'|} dr \quad (1.12)$$

P_{mn} correspond à la matrice de densité de la fonction d'onde obtenue par cycles SCF et ϕ sont les fonctions d'onde atomiques.

Ce potentiel électrostatique peut être ensuite *fitter* [42, 43] via des méthodes de *RMS fit*, cette étape consistant à déterminer un jeu de charges atomiques permettant de reproduire aux mieux ce potentiel. La référence [44] explique en détail la méthode nommée RESP, *Restrained ElectroStatic Potential*, utilisée pour en déduire les charges atomiques dans ce travail.

La procédure utilisée dans cette thèse est décrite (programmes et détails des modèles utilisés pour les charges) dans le chapitre 3.

Pour le développement des paramètres de Van der Waals, nous renvoyons aux références [45–47] pour les ions les plus courants. Dans le cas de résidus *classiques* ou de molécules organiques, les paramètres de Van der Waals sont ceux soit du champ de force AMBER, soit du champ de force complémentaire GAFF (*Generalized Amber Force Field* [48]).

Si cette procédure utilisée pour déduire les charges atomiques est couramment utilisée, les méthodes pour développer les interactions liantes sont plus complexes et moins utilisées. Nous présenterons donc dans la prochaine section la méthode utilisée lors de cette thèse.

1.1.2.2 Détermination des constantes de force : méthode de Seminario

Dans cette partie, nous présentons la méthode de Seminario [49] utilisée dans cette thèse pour déduire les constantes de forces de liaisons, d'angles et de dièdres pour une utilisation dans le champ de force AMBER.

La première étape consiste à calculer la matrice hessienne $[k]$ d'une molécule (la double dérivée de l'énergie en fonction des coordonnées atomiques) :

$$[k] = k_{i,j} = \frac{\partial^2 E}{\partial x_i \partial x_j} \quad (1.13)$$

La force en 3N éléments δF due à un déplacement δx des N atomes s'écrit sous la forme :

$$\delta F = -[k]\delta x \quad (1.14)$$

La diagonalisation de cette matrice en coordonnées cartésiennes conduit à 3N valeurs propres. Ces valeurs propres λ_i de $[k]$ sont les 3N constantes de forces correspondant aux 3 modes de translation, 3 modes de rotation et 3N-6 modes de vibrations internes du système. Les vecteurs propres \hat{v}_i de $[k]$ indiquent les directions des déplacements correspondants aux valeurs propres. Pour connaître la constante de force entre deux atomes A et B, $[k]$ est réduite en $[k_{AB}]$ correspondant à la matrice inter-atomique. L'équation 1.15 s'écrivant alors :

$$\delta F_A = -[k_{AB}]\delta r_B \quad (1.15)$$

et nous donne la force $F_A = (\delta F_{x_A}, \delta F_{y_A}, \delta F_{z_A})$ sur l'atome A pour un déplacement $\delta r_B = (\delta_{x_B}, \delta_{y_B}, \delta_{z_B})$ de l'atome B. En forme développée, nous avons :

$$\begin{bmatrix} \delta F_{x_A} \\ \delta F_{y_A} \\ \delta F_{z_A} \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 E}{\partial x_A \partial x_B} & \frac{\partial^2 E}{\partial x_A \partial y_B} & \frac{\partial^2 E}{\partial x_A \partial z_B} \\ \frac{\partial^2 E}{\partial y_A \partial x_B} & \frac{\partial^2 E}{\partial y_A \partial y_B} & \frac{\partial^2 E}{\partial y_A \partial z_B} \\ \frac{\partial^2 E}{\partial z_A \partial x_B} & \frac{\partial^2 E}{\partial z_A \partial y_B} & \frac{\partial^2 E}{\partial z_A \partial z_B} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \delta x_B \\ \delta y_B \\ \delta z_B \end{bmatrix} \quad (1.16)$$

Cette matrice possède trois valeurs propres λ_i^{AB} et trois vecteurs propres \hat{v}_i^{AB} . Ces deux jeux de données (λ, \hat{v}) permettent avec l'équation 1.17 de retrouver k_{AB} , constante de force de liaison entre A et B avec \hat{u}^{AB} le vecteur unitaire.

$$k_{AB} = \sum_{i=1}^3 \lambda_i^{AB} |\hat{u}^{AB} \cdot \hat{v}_i^{AB}| \quad (1.17)$$

$k_{\theta_{ABC}}$ se retrouve à l'aide des deux matrices $[k_{AB}]$ et $[k_{BC}]$:

$$\frac{1}{k_{\theta_{AB}}} = \frac{1}{R_{AB}^2 \sum_{i=1}^3 \lambda_i^{AB} |\hat{u}^{PA} \cdot \hat{v}_i^{AB}|} + \frac{1}{R_{CB}^2 \sum_{i=1}^3 \lambda_i^{CB} |\hat{u}^{PC} \cdot \hat{v}_i^{CB}|} \quad (1.18)$$

où R_{AB}^2 et R_{CB}^2 sont les distances AB et CB, \hat{u}^{PA} et \hat{u}^{PC} les vecteur unitaires perpendiculaires aux liaisons AB et CB sur le plan ABC.

Les angles dièdres ne présentant pas une importance majeure dans description des sites métalliques [50], nous ne détaillerons pas leur paramétrisation ici.

Les paramètres développés dans cette thèse ainsi que dans [51] l'ont été en utilisant cette méthode au sein du programme MCPB [52]. Si MCPB a été développé pour la paramétrisation de centre métallique, son utilisation en dehors de ce cas particulier est peu conviviale. Nous avons donc développé un court programme [53] en fortran permettant de calculer les constantes de force de liaisons et de flexions pour n'importe quelle molécule entre deux (ou trois) atomes pour une matrice hessienne cartésienne obtenue avec le programme Gaussian09 [54].

1.2 Mécanique quantique et DFT

Dans cette section, nous précisons rapidement le modèle quantique utilisé, la DFT et son fonctionnement. S'il existe d'autres modèles que la DFT pour décrire la structure électronique de la matière (méthode post-HF, semi-empirique, etc), nous ne les aborderons pas car nous ne les avons pas utilisés dans le cadre de cette thèse. De même, nous nous limiterons à la description de l'état fondamental.

1.2.1 DFT : principes généraux

Les méthodes de calculs *ab initio* consistent à trouver la fonction d'onde Ψ correspondant à l'état physique du système, ce qui correspond à résoudre l'équation de Schrödinger, dans un état stationnaire. Cette équation est l'équation aux valeurs propres de l'Hamiltonien \hat{H} :

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1.19)$$

avec E , l'énergie totale du système. L'hamiltonien se décompose sous la forme de deux opérateurs l'un correspondant à l'énergie cinétique (T) et l'autre à l'interaction potentielle ici coulombienne (V) : $\hat{H} = T + V$. Chaque terme peut lui même être décomposé : T est la somme de l'énergie cinétique des noyaux (T_n) et des électrons (T_e), et V est la somme de l'interaction attractive noyaux-électrons (V_{n-e}) et répulsive noyaux-noyaux (V_{n-n}) et électrons-électrons (V_{e-e}). L'hamiltonien prend alors la forme :

$$\hat{H} = \hat{T}_n + \hat{T}_e + \hat{V}_{n-e} + \hat{V}_{n-n} + \hat{V}_{e-e} \quad (1.20)$$

Une première approximation a lieu : l'approximation de Born-Oppenheimer [55] où les noyaux sont considérés fixes ($T_n = 0$) et leur énergie potentielle d'interaction devient constante ($V_{n-n} = C_{ste} = \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$). L'hamiltonien ne dépend plus que de contribution électronique : monoélectronique (T_e, V_{n-e}) et biélectronique (V_{e-e})

$$H = T_e + V_{n-e} + V_{e-e} + V_{n-n} = T_e + V_{n-e} + V_{e-e} + C_{ste} \quad (1.21)$$

L'équation étant grandement simplifiée mais restant complexe, la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) permet de calculer l'énergie en utilisant la densité électronique (ρ) comme fonction. E est une fonctionnelle de la densité. Elle est basée sur les deux théorèmes de Hohenberg et Kohn [56].

En considérant un gaz d'électrons, le potentiel externe agissant sur eux détermine l'état fondamental du système et sa densité de charge correspondante, ce qui correspond à dire que toutes les propriétés physiques sont fonctions de ce potentiel. Et comme il y a correspondance entre le potentiel externe ($V_{ext}[\rho(r)]$), champ externe exercé par les noyaux) et la densité électronique de l'état fondamental $[\rho(r)]$, l'énergie totale du système à l'état fondamental est fonction unique de la densité électronique : $E = E[\rho(r)]$. Contrairement à la méthode Hartree-Fock où le calcul de l'énergie est basé sur la fonction d'onde, ici le calcul de l'énergie est basé sur la densité électronique de l'état fondamental. Hohenberg et Kohn ont exprimé cette fonctionnelle sous la forme :

$$E_{DFT}[\rho(r)] = F_{HK}[\rho(r)] + \int [\rho(r)]V_{ext}(r)dr \quad (1.22)$$

Où F_{HK} représente la fonctionnelle universelle de Hohenberg-Kohn.

Le deuxième théorème est énoncé : pour un potentiel V_{ext} et un nombre d'électrons M données, l'énergie totale du système atteint sa valeur minimale lorsque la densité $\rho(r)$ correspond à la densité exacte de l'état fondamental $[\rho_0(r)]$, principe variationnel, $E_{exact} < E_{DFT}[\rho(r)]$: le minimum de la fonctionnelle correspond à la solution la plus proche de l'état fondamental exact. Ce qui conduit à l'équation 1.23 :

$$\mu = \frac{\partial E[\rho(r)]}{\partial \rho(r)} = V_{ext}(r) + \frac{(\partial F_{HK}[\rho(r)])}{(\partial \rho(r))} \quad (1.23)$$

La fonction F_{HK} demeurant inconnue de façon exacte, les approximations correspondant aux équations de Kohn-Sham [57] sont utilisées. Selon 1.22, F_{HK} est indépendante du potentiel V_{ext} et contient donc une composante $T_e(\rho(r))$ et une composante $V_{e-e}(\rho(r))$. L'approche Kohn-Sham réalise une exacte correspondance entre la densité électronique et l'énergie de l'état fondamental d'un système de fermions non interactifs fictifs placés dans un potentiel effectif et le système réel à plusieurs électrons en interaction soumis au potentiel réel ce qui donne :

$$F_{HK}[\rho(r)] = T_S[\rho(r)] + E_H[\rho(r)] + E_{XC}[\rho(r)] + \int V_{ext}(r)[\rho(r)]dr \quad (1.24)$$

$$E_H[\rho(r)] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} drdr' \quad (1.25)$$

La fonctionnelle E_{XC} est dite d'échange-corrélation et rend compte des effets à plusieurs corps (contient donc les différences entre le système fictif non interactif et le système réel interactif).

$$E_{XC}[\rho(r)] = (T[\rho(r)] - T_s[\rho(r)]) + V_{e-e}[\rho(r)] - V_H[\rho(r)] \quad (1.26)$$

La différence des énergies cinétiques T étant faible et souvent négligée, E_{XC} traduit (principalement) la différence entre l'énergie coulombienne du système V_{e-e} et l'énergie coulombienne des fermions non interactifs de Kohn-Sham. La formulation de l'énergie cinétique exacte T , à l'état fondamental est :

$$T = \sum_i^M n_i \langle \varphi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \varphi_i \rangle \quad (1.27)$$

Selon Kohn et Sham, elle peut s'écrire dans leur système fictif de fermions non-interactifs :

$$T_S[\rho(r)] = \sum_i^M \langle \varphi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \varphi_i \rangle \quad (1.28)$$

L'équation 1.28 n'étant valable que dans le cas des fonctions d'ondes décrivant un système à M orbitales dépourvues de toute interaction mutuelle ($n_i = 1$ pour les M orbitales et $n_i = 0$ pour le reste). Ce qui permet de ré-écrire l'équation 1.23 sous une forme similaire 1.29 à la différence près que le système est un système fictif de fermions non-interactifs se déplaçant dans un potentiel effectif $V_{eff}(r)$ dit potentiel de Kohn-Sham.

$$\mu = V_{eff}(r) + \frac{\partial T_S[\rho(r)]}{\partial \rho r} \quad (1.29)$$

avec

$$\begin{aligned} V_{eff}(r) &= V_{ext}(r) + \frac{\partial E_H[\rho(r)]}{\partial \rho(r)} + \frac{\partial E_{XC}[\rho(r)]}{\partial \rho(r)} \\ &= V_{ext}(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + V_{XC}(r) \end{aligned} \quad (1.30)$$

avec V_{XC} le potentiel d'échange corrélation sous forme :

$$V_{XC}(r) = \frac{\partial E_{XC}[\rho(r)]}{\partial \rho(r)} \quad (1.31)$$

Dans ce système de particules de type fermions non interactifs, la densité électronique est alors décrite comme une somme de densités mono-particulaires. Pour résoudre les équations de Kohn-Sham, cette approche est de la forme :

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{eff}(r)\right] |\varphi_i(r)\rangle = \epsilon_i |\varphi_i(r)\rangle \quad (1.32)$$

avec

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^M |\varphi_i(r)|^2 \quad (1.33)$$

Les équations 1.33 et 1.32 sont résolues par itérations : en utilisant une densité initiale (ρ_{in}), un potentiel V_{eff} est calculé ce qui permet de résoudre l'équation 1.32 et obtenir une nouvelle densité électronique (ρ_{out}). Cette densité est 'réinjectée' en tant que ρ_{in} pour une nouvelle itération jusqu'à obtenir une densité ρ_{out} très proche de ρ_{in} selon un critère de convergence fixé.

Grâce aux équations de Kohn-Sham, la seule fonctionnelle de la densité qui demeure inconnue au sein de ce formalisme est la fonctionnelle d'échange-corrélation. La dépendance E_{XC} vis à vis de la densité électronique s'exprime comme une interaction entre la densité électronique et une densité d'énergie dépendante de cette densité électronique, $\epsilon_{XC}[\rho(r)]$.

$$E_{XC}[\rho(r)] \approx \int \epsilon_{XC}[\rho(r)]\rho(r)dr \quad (1.34)$$

E_{XC} est séparable en deux terme E_X pour l'échange et E_C pour la corrélation, ce qui donne l'équation 1.35 d'après 1.34.

$$E_{XC}[\rho(r)] = E_X[\rho(r)] + E_C[\rho(r)] = \int \epsilon_X[\rho(r)]\rho(r)dr + \int \epsilon_C[\rho(r)]\rho(r)dr \quad (1.35)$$

Pour résoudre ces équations, des fonctionnelles ont été proposées. La première correspond à l'approximation de la densité locale (LDA) incluant la densité locale ($\rho(r)$). Ensuite, d'autres fonctionnelles telles les GGA (prenant en compte la densité et son gradient ($\nabla\rho(r)$)), meta-GGA (prenant en compte la densité, son gradient et son énergie cinétique ($\tau(r)$)), et hybrides (incluant un pourcentage exact d'échange Hartree-Fock) tentent d'améliorer l'échange-corrélation en prenant en compte la non-homogénéité et le caractère non-local de la distribution électronique. Dans cette thèse, nous avons utilisé majoritairement la fonctionnelle B3LYP [32–34], une fonctionnelle GGA présentant 20% d'échange Hartree-Fock.

1.2.2 Fonctions de base

Deux types de bases sont utilisées : soit des orbitales atomiques (localisées), soit des ondes planes (délocalisées). Les fonctions de base localisées correspondent aux fonctions soit de Slater (STO, *Slater Type Orbitals*) soit Gaussiennes (GTO, *Gaussian Type Orbitals*), les premières étant une approximation des orbitales atomiques, les secondes des approximations des premières rendant les calculs d'intégrales plus simples. Dans cette thèse, nous avons utilisés des GTO de type Pople [58], principalement 6-31+G(d) [59–66].

Pour les ondes planes (ou PW, pour *Plane Waves*), elles ne sont pas centrées sur des atomes (délocalisées) et sont donc très utilisées pour décrire des systèmes périodiques (solides, liquides). Dans cette thèse, nous avons utilisés l'approche GAPW (*Gaussian Augmented Plane Waves* [67,68]) qui elle même dérive de l'approche GPW (*Gaussian and Plane Waves* [69]) qui est une méthode utilisant des Gaussiennes pour décrire la fonction

d'onde et des bases PW pour décrire la densité. L'approche GPW nécessite l'utilisation de pseudo-potentiels représentant les électrons de cœur. L'approche GAPW en séparant les domaine en *soft* et *hard density*, permet une représentation tout électron et sera utilisée dans cette thèse.

1.3 Méthodes hybrides

Précédemment, nous avons vu deux méthodes pour décrire un système : l'approche MM présentant l'avantage de pouvoir décrire des systèmes de taille importante (avec un nombre d'atomes supérieur à 10000) mais ne permettant pas de simuler de la réactivité du fait que les atomes sont liés par des "ressorts", et l'approche QM qui elle permet de décrire la réactivité et le réarrangement de liaison mais est limitée à de petits systèmes (une centaine d'atomes). Warshel et Levitt [70] ont proposé une approche QM/MM permettant de simuler la réactivité d'une partie spécifique du système (décrite en QM) et son environnement (décrit en MM). L'utilisation de cette méthode combinant les deux niveaux de théorie a une importance majeure en réactivité enzymatique : le site actif et le substrat est décrit en QM permettant d'étudier la réactivité, et le milieu (protéine, solvant) est modélisé en MM permettant une description plus complète (charges, contraintes conformationnelles, etc). Dans la section suivante, nous introduirons les deux méthodes QM/MM, soustractive et additive, ainsi que la représentation de la coupure entre la partie QM et la partie MM.

1.3.1 QM/MM soustractive

La méthode soustractive le plus souvent utilisée sous la forme dite ONIOM (*Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics* [71]), présente un hamiltonien de la forme :

$$\hat{H}(ES) = \hat{H}_{MM}(ES) + \hat{H}_{QM}(PS) - \hat{H}_{MM}(PS) \quad (1.36)$$

avec $\hat{H}_{MM}(ES)$ l'hamiltonien de tout le système au niveau MM, $\hat{H}_{QM}(PS)$ l'hamiltonien de la partie représentée en QM et $\hat{H}_{MM}(PS)$ l'hamiltonien de la partie QM mais au niveau MM. $ES = PS + SS$ où ES est le système entier, PS le système étudié en QM et SS le reste du système ($SS = ES - PS$). Dans sa forme initiale, cette méthode ne prend pas en compte l'effet de la perturbation électrostatique de l'environnement du SS sur la distribution de charge de la partie PS et le système PS doit être décrit au niveau MM ce qui est pénalisant lors de l'étude de la réactivité si PS_{final} présente une structure différente de PS_{init} .

1.3.2 QM/MM additive

La méthode additive est la méthode de couplage QM/MM que nous avons utilisé lors de cette thèse, l'hamiltonien est de la forme :

$$\hat{H}(ES) = \hat{H}_{MM}(SS) + \hat{H}_{QM}(PS) + \hat{H}_{QM/MM}(PS : SS) \quad (1.37)$$

avec

$$\hat{H}_{QM/MM}(PS : SS) = V_{QMMM}^{VdW} + V_{QM/MM}^{nu} + V_{QM/MM}^{el} \quad (1.38)$$

$\hat{H}_{MM}(SS)$ correspond à l'hamiltonien de la partie SS au niveau MM, $\hat{H}_{QM}(PS)$ correspond à l'hamiltonien de la partie PS (et les atomes de coupures) au niveau QM, et $\hat{H}_{QM/MM}(PS : SS)$ est l'hamiltonien QM/MM décomposé en interaction de Van der Waals et électrostatiques entre la partie QM et la partie MM.

$$V_{QM/MM}^{VdW} = \sum_{A>B} 4\epsilon_{AB} \left[\left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^6 \right] \quad (1.39)$$

Ce potentiel de Lennard-Jones ($V_{QM/MM}^{VdW}$) prend en compte les interactions entre les atomes QM et les atomes MM.

$$V_{QM/MM}^{nu} = \sum_{A=1}^M \sum_{B \in MM} \frac{Z_A q_B}{|R_B - R_A|} \quad (1.40)$$

L'interaction électrostatique ($V_{QM/MM}^{nu}$) représente les interactions des charges des noyaux QM (atomes A) avec les charges des atomes MM (atomes B).

La dernière interaction électrostatique ($V_{QM/MM}^{el}$) correspond à l'interaction entre les électrons QM et les charges MM, et peut être traitée de deux approches. L'une dite *mechanical embedding* où les charges MM interagissent avec des charges QM ponctuelles fixes définies le par champ de force (comme dans la méthode soustractive).

L'autre, dite *electronic embedding*, fait interagir les charges MM avec la densité électroniques QM permettant ainsi de la polariser.

$$V_{QM/MM}^{el} = - \sum_{i=1}^n \sum_{B \in MM} \frac{q_B}{|R_B - r_i|} \quad (1.41)$$

avec cette fois i l'indice et n le nombre d'électrons dans la partie QM, et B représentant les indices des atomes MM.

Dans cette thèse nous avons utilisée la méthode GEEP, *Gaussian Expansion of the Electrostatic Potential* [72,73], méthode *electronic embedding* qui représente les charges ponctuelles MM par des gaussiennes.

1.3.3 Coupure QM/MM

Le dernier point consiste à définir la frontière entre la zone QM et la zone MM. Dans le cas d'une molécule QM représentée dans un solvant MM, il n'y pas de coupure à effectuer entre les deux limites car les deux zones ne sont pas "liées électroniquement". Par contre dans le cas de la représentation d'un site actif QM au sein d'une protéine MM, comme dans cette thèse, nous devons couper le système entre un atome A_{QM} et un atome B_{MM} . Cette coupure, pour une meilleure description, doit avoir lieu entre deux atomes où

la distribution de charges est peu différente (par exemple, deux carbones aliphatiques). Pour représenter cette coupure, trois méthodes sont possibles : le *link atom* [71, 74, 75], la méthode des *frozen orbital* [76, 77] ou des *pseudo-potentials* [78, 79]. La méthode du *link atom*, utilisé dans cette thèse, consiste à "rajouter" un atome de saturation (ici, un atome d'hydrogène) pour compléter la valence de l'atome A_{QM} .

Chapitre 2

Faire évoluer le système et simuler sa réactivité

Dans le chapitre précédent, nous avons vu comment nous évaluons l'énergie d'un système (MM, QM ou QM/MM). Pour étudier les conformations d'un système (ou sa réactivité), nous avons utilisé deux types de calculs. Des calculs statiques pour obtenir des minima et des états de transition mais également des dynamiques qui nous permettent d'explorer des conformations pour des systèmes larges tels des systèmes biologiques (métalloprotéines par exemple) ou des systèmes en solution.

2.1 Statique

Les calculs statiques permettent de localiser des points spécifiques, minima et états de transitions (point de selle d'ordre un), sur une surface d'énergie potentielle. Ces points critiques possèdent un gradient nul et la matrice hessienne permet de différencier ces points. Un minimum a toutes les valeurs propres de la matrice hessienne positives, un maximum a les valeurs propres négatives, tandis qu'un point de selle présente une matrice hessienne avec des valeurs propres positives et négatives. Le nombre de valeurs propres

négligables correspond à l'ordre du point de selle. Dans le cas d'un état de transition, le point de selle est d'ordre un et le nombre de valeurs propres négatives doit donc être égal à un.

Pour optimiser la géométrie de minima, l'algorithme "minimiser" utilisé est un gradient analytique avec une matrice hessienne estimée puis extrapolée à chaque étape. Un calcul analytique de la matrice hessienne à la fin de l'optimisation permet de confirmer que le système est bien un minimum (pas de valeurs propres négatives), ou un état de transition (possédant une seule valeur propre négative) ou non.

Il est possible de calculer les grandeurs thermodynamiques (enthalpie et enthalpie libre de Gibbs) à partir du Hessien et des fréquences de vibrations. D'après les équations [80], l'enthalpie H est de la forme :

$$H = \epsilon_0 + E_t + E_r + E_v + E_e + k_B T \quad (2.1)$$

Avec ϵ_0 l'énergie électronique, T la température, k_B la constante de Boltzmann et E_t , E_r , E_v , E_e les contributions énergétiques des mouvements de translation, de rotation, de vibration, électronique, respectivement. L'équivalent pour l'enthalpie libre est de la forme :

$$G = H - T(S_t + S_r + S_v + S_e) \quad (2.2)$$

Chaque terme peut-être calculé à partir de la fonction partition correspondante. Les détails peuvent se retrouver dans la référence *Thermochemistry in Gaussian* pour le programme Gaussian09.

2.2 Dynamique

Si les calculs statiques permettent de calculer les ΔG ou ΔE d'une réaction spécifique *via* le calcul des réactifs, des états de transition et des produits, généralement sur des pe-

tits systèmes (n atomes < 250). Pour des systèmes de taille plus importante, comme des métalloenzymes, présentant un nombre important de degrés de liberté, et de nombreux minima, la dynamique moléculaire s'avère plus appropriée. La dynamique moléculaire permet un échantillonnage statistique autour de l'état d'équilibre (états accessibles), autrement dit une exploration de la surface présentant beaucoup de minimas à l'équilibre dans un ensemble donné.

2.2.1 Équations de mouvement

Le système est donc en mouvement (d'où le terme dynamique) au cours du temps et l'utilisation des équations de mouvement entre en jeu. Les dynamiques utilisées lors de cette thèse sont au niveau soit MM, soit QM/MM. Si pour la partie décrite en MM, les atomes sont des masses chargées liées par des ressorts, la partie QM quand à elle est décrite par des noyaux et des électrons. Dans le cas de dynamique *ab-initio*, les noyaux sont traités classiquement tandis que les électrons sont traités quantiquement. On peut distinguer des familles de méthode de dynamique, des dynamiques Car-Parinello [81] ou Born-Oppenheimer. Dans cette thèse, nous avons utilisé l'approche Born-Oppenheimer (BOMD ou *Born-Oppenheimer Molecular Dynamics*), où le traitement des mouvements des noyaux et des électrons se fait de façon séparé, de part la différence de masse entre les deux, les électrons étant beaucoup plus légers que les noyaux. La position des noyaux est propagée classiquement par les équations de mouvement, et l'énergie (et les forces) du système sont calculées en utilisant un des niveaux de théorie décrit dans le chapitre 1, MM ou QM.

$$f_i = m_i \cdot a_i \quad (2.3)$$

avec f_i la somme des forces s'appliquant sur l'atome i , m_i sa masse et a_i son accélération ($a_i = \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2}$, avec t le temps, et r_i la position de l'atome i). Nous savons également que :

$$f_i = -\frac{\partial E_i}{\partial r_i} \quad (2.4)$$

où E_i est l'énergie de i . En injectant 2.4 dans 2.3 :

$$m_i \cdot \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = -\frac{\partial E_i}{\partial r_i} \quad (2.5)$$

La solution n'étant pas possible analytiquement, la résolution de cette équation a lieu de façon numérique en utilisant un pas de temps δt en utilisant la méthode des différences finies. Il existe plusieurs algorithmes d'intégration dont les plus courants sont l'intégrateur Verlet [82, 83], Verlet-vitesse [84] ou Leap-Frog [85]. Les équations 2.6 et 2.7 correspondent à l'intégrateur Verlet (basé sur un développement de Taylor de $r_i(t)$ à l'ordre quatre)

$$r_i(t + \delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \delta t) + a_i(t)\delta t^2 + O(\delta t^4) \quad (2.6)$$

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + \delta t) - r_i(t - \delta t)}{2\delta t} + O(\delta t^2) \quad (2.7)$$

Le défaut de Verlet est que nous devons disposer des positions (r_i) à l'instant $(t + \delta t)$ et des vitesses (v_i) à l'instant (t) , en plus d'une évaluation des vitesses avec une précision en $O(\delta t^2)$. Le Verlet-vitesse permet d'améliorer la précision et de calculer les forces/positions puis les vitesses, et l'erreur est en $O(\delta t^3)$ pour les deux :

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + v_i(t)\delta t + \frac{1}{2}a_i(t)\delta t^2 + O(\delta t^3) \quad (2.8)$$

$$v_i(t + \delta t) = v_i(t) + \frac{a_i(t) + a_i(t + \delta t)}{2}\delta t + O(\delta t^3) \quad (2.9)$$

La précision se rapporte au pas de temps δt qui doit être suffisamment grand pour avoir des calculs rapides pour un temps de dynamique donné mais suffisamment petit pour conserver l'énergie du système sur la durée de la dynamique. Dans cette thèse, l'intégrateur utilisé est le Verlet-vitesse et le pas de temps utilisé est $\delta t = 0.5$ s correspondant à la vibration entre les atomes quelconques X et l'atome d'hydrogène H (vibration X-H).

2.2.2 Ensembles thermodynamiques

Les dynamiques ont lieu dans un ensemble thermodynamique définissant les conditions de simulation en fixant plusieurs grandeurs. Les ensembles utilisés dans cette thèse sont l'ensemble microcanonique (NVE), l'ensemble canonique (NVT) et l'ensemble isotherme-isobar (NPT). Si l'ensemble microcanonique NVE, où le nombre d'atomes N, le volume V et l'énergie E sont constants, n'impose pas de contrainte extérieure, l'ensemble NVT impose une modification des équations de mouvement. Pour maintenir la température T constante plusieurs méthodes sont possibles. La plus simple, un *rescaling* des vitesses, qui lorsque l'énergie cinétique du système E_c dépasse la valeur de consigne E_c^{cons} impose une modification des vitesses par un facteur adéquat. De plus, il existe différents thermostats [86–89] qui régulent la température. Dans cette thèse, nous avons utilisé le thermostat de Nosé-Hoover qui ajoute un terme de friction $\zeta = \frac{(E_c - E_c^{cons})}{Q_T}$, où Q_T correspond à la vitesse de réponse du thermostat, dans l'équation 2.3 :

$$f_i - m_i \zeta v_i = m_i \cdot a_i \quad (2.10)$$

Pour l'ensemble NPT, le volume V devient une variable qui varie en fonction d'une pression de référence.

L'ensemble NVT permet de maintenir une température constante (pour un chauffage ou pour équilibrer un système), l'ensemble NPT permet d'obtenir une densité adéquate pour une boîte de solvant (densité de 1 pour une boîte d'eau à 1 bar) et l'ensemble NVE permet de simuler un système à énergie constante.

2.3 Métadynamique

Si les dynamiques permettent d'explorer facilement la surface d'énergie libre, elles sont limitées par un temps de simulation court : les simulations durent entre quelques dizaine de picosecondes (QM) à quelques microsecondes (MM). Ce temps très court ne permet pas de rendre compte de la réactivité présentant des barrières d'activation très supérieures à $k_B T$, comme par exemple des repliements de protéines, des transitions de phases, ou des réactions chimiques. Plusieurs méthodes [90] comme l'*Umbrella Sampling* [91, 92], *local elevation method* [93], *adaptive force bias* [94], *steered MD* [95] ont été proposées pour "sortir" du minimum local et explorer toute la surface d'énergie libre (*Free Energy Surface, FES*). La solution retenue dans cette thèse est d'"accélérer" la dynamique le long d'une ou plusieurs coordonnées de réaction appelées variables collectives et notées CVs : la métadynamique [96–98]. Cette méthode permet non seulement de sortir du minimum local mais également de reconstruire la FES après son exploration pour une estimation des barrières. Elle a été utilisée dans plusieurs domaines [97–99] pour l'étude des matériaux [100–102], des systèmes biochimiques [103–107] et de la réactivité chimique [108–111].

2.3.1 Principes et variables collectives

Pour "accélérer" une dynamique, la métadynamique ajoute un potentiel sous la forme de gaussiennes pour éviter que le système ne revisite l'espace déjà exploré et pour lui permettre de franchir des barrières et d'explorer d'autres régions de la FES. Figure 2.1, il est représenté une version schématique d'une métadynamique à une variable collective. Pour un système à N atomes avec des positions r_i , le potentiel d'interaction est égal à $V \equiv V(x)$ et un hamiltonien $H = T + V$. Un potentiel de biais V_G est ajouté à l'hamiltonien du système donnant $H = T + (V + V_G)$.

Ce potentiel de biais V_G s'écrit sous la forme :

$$V_G(S(x), t) = w \sum_{\substack{t'=\tau_G, 2\tau_G, 3\tau_G, \dots \\ t' < t}} \exp\left(-\frac{(S(x) - s(t'))^2}{2\delta s^2}\right) \quad (2.11)$$

où $s(t) = S(x(t))$ correspond à la valeur prise par la variable collective CV au temps t .

Trois paramètres définissent V_G :

1. w est la hauteur des gaussiennes
2. δs la largeur des gaussiennes
3. τ_G le taux de dépôts des gaussiennes

En plus de permettre au système de franchir des barrières, la méthode permet de reconstruire la surface d'énergie libre en fonction des CVs. Le potentiel de biais V_G est relié à la surface d'énergie libre A par l'équation suivante :

$$V_G(S, t \rightarrow \infty) = -A(S) + C_{cst} \quad (2.12)$$

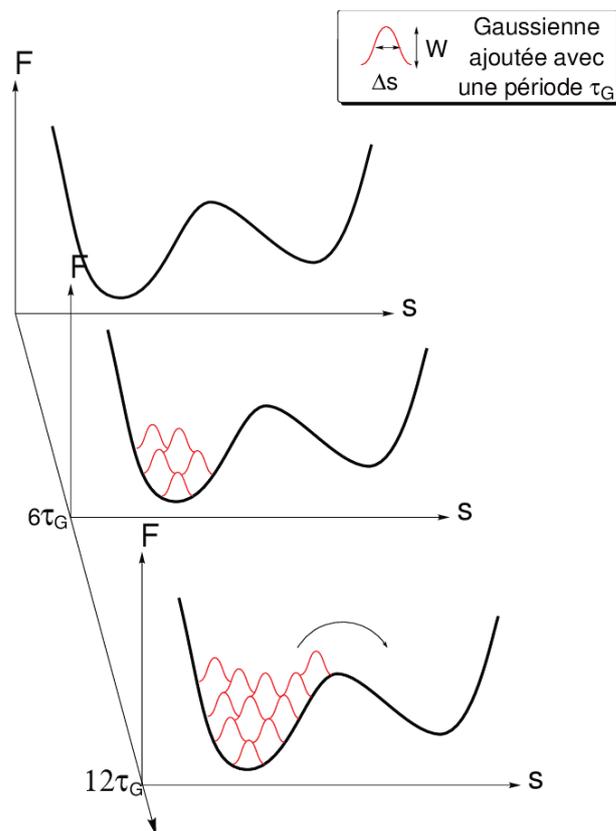


Figure 2.1 – Représentation schématique d’une métadynamique à une CV. Avec l’ajout de gaussiennes de hauteur W et de largeur ΔS toutes les τ_G , le système "sort" du puits d’énergie libre en passant la barrière.

La précision de la métadynamique et de la FES reconstruite dépend des trois paramètres :

- δs est généralement évalué à partir des fluctuations de la variable collective lors d'une dynamique non-biaisée et correspond à environ $1/2, 1/3$ de cette valeur (une fluctuation de 1.5 \AA donnera un δs de 0.5 \AA).
- w , la hauteur des gaussiennes, est dépendante de la hauteur du puits estimé. Elle doit être inférieure à la hauteur du puits sous peine de surestimer la barrière. De plus, elle est généralement définie conjointement à τ_G : si le choix se porte sur un w élevé, la fréquence de déposition τ_G doit également être élevée. w est également dépendant de δs pour éviter d'avoir des gaussiennes trop aiguës.
- τ_G est choisi pour avoir un taux de déposition rapide pour éviter des métadynamiques trop longues mais suffisamment lent pour permettre au système de s'adapter au nouveau biais en évitant de faire du "*hill surfing*" dans des états méta-stables.

En plus de ces trois paramètres cruciaux, le choix de la variable collective (ou des variables collectives) est de grande importance. Ces variables doivent correctement décrire la réactivité étudiée en séparant les produits des réactifs tout en décrivant les intermédiaires. Elles doivent comprendre les modes lents du système, pour éviter les artefacts dus à la présence d'une *slow hidden variable*. Pour finir, leur nombre doit être limité car une exploration d'un espace de grande dimension peut s'avérer coûteux en temps de calcul et difficile à analyser.

Un oubli d'une variable collective nécessaire à la réactivité peut amener à une surestimation de la barrière. La figure 2.2 représente une FES schématique à deux dimensions. En utilisant uniquement la variable collective CV1, la barrière est surestimée du fait que la réaction nécessite un biais sur la CV2.

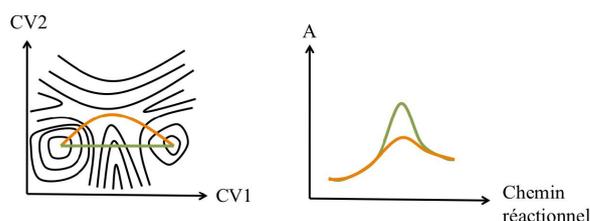


Figure 2.2 – Représentation schématique d’une surface en 2D (gauche) et 1D (droite). Le chemin en vert représente une FES reconstruite à partir d’une CV. Le chemin en orange représente une FES reconstruite à partir de deux CV.

Les variables collectives peut être variées et dépendent de la position des atomes : distances entre deux atomes ou deux groupes d’atomes, angles, dièdres, nombre de coordination, énergie potentielle, etc...

L’une des difficultés de la métadynamique est la convergence : la question de savoir quand arrêter la métadynamique et reconstruire la surface. Dans le cas où la métadynamique est utilisée dans l’optique de trouver la barrière minimale pour sortir du puits de départ, alors la métadynamique est arrêtée dès que la variable collective est sortie du puits. Si l’on veut reconstruire la surface, alors la métadynamique doit être arrêtée lorsque le régime des CVs est diffusif : quant il y a un passage d’un bassin à un autre sans ajout de gaussienne.

Un problème est que le valeur du potentiel de biais ne converge pas vers la valeur d’énergie libre mais oscille autour de cette valeur. Le calcul de la convergence se fait par un calcul de la différence d’énergie libre entre les puits d’intérêts dans le cas d’une exploration de la surface. La valeur peut osciller entre la valeur de la hauteur d’une ou deux gaussiennes, leurs ajouts se faisant successivement sur l’un puis l’autre des bassins.

L’autre désavantage est la possibilité que trop de gaussiennes soient ajoutées "au même endroit" poussant le système vers des états de hautes énergies pouvant entrainer son évolution irréversible vis-à-vis des variables collectives choisies.

Cette métadynamique porte le nom de *Untempered Metadynamics* ou *UMetaD*.

Une première solution a été proposé pour permettre meilleure une convergence de la surface d’énergie libre : *Well-Tempered Metadynamics* ou *WTMetaD* [112,113]. Le principe

est de réduire la hauteur des gaussiennes ajoutées en fonction de la position : plus une position sera "visitée", plus la hauteur des gaussiennes ajoutées à cette position diminuera.

La formule régissant la hauteur des gaussiennes en fonction du temps et de la variable collective est de la forme :

$$w = w_0 \tau_G e^{-\frac{V_G(S,t)}{k_B \Delta T}} \quad (2.13)$$

où w_0 représente la hauteur des gaussiennes initiale et ΔT un paramètre de la dimension d'une température.

$$V_G(S, t \rightarrow \infty) = -\frac{\Delta T}{(T + \Delta T)} F(S) \quad (2.14)$$

Cette equation 2.14 montre que lorsque $\Delta T = 0$, la métadynamique devient une dynamique non-biaisée. Lorsque ΔT tend vers l'infini, l'algorithme de la *UTMetaD* est retrouvé.

Le paramètre ΔT peut être considéré comme la température effective à laquelle l'exploration de l'espace de la CV aura lieu. On définit le facteur de biais γ comme étant :

$$\gamma = \frac{T + \Delta T}{T} \quad (2.15)$$

Ce facteur de biais peut être vu comme un "terme réducteur de barrière". Un facteur de biais d'une valeur X réduira la barrière d'un facteur X . Une barrière de 30 kcal mol⁻¹ explorée par *WTMetaD* avec $\gamma = 45$ sera équivalente à une barrière de 0.67 kcal mol⁻¹, sera rapidement franchie au cours de la métadynamique. Ce facteur γ permet de définir ΔT de manière plus "parlante". Dans cette thèse, nous avons utilisé $\Delta T = 6000K$ correspondant à $\gamma = 21$ permettant de franchir des barrières de 10 kcal mol⁻¹ aisément.

Ce type de métadynamique a été utilisée lors de ce travail.

La *Transition Tempered Metadynamics* ou *TTMetaD* [114] se propose, au contraire de la *WTMetaD* où une estimation de la barrière devait être connue *a priori* pour définir ΔT ,

de spécifier comme paramètres les positions approximatives des bassins. Elle permet de réduire la hauteur des gaussiennes ajoutées en fonction du nombre d'aller retour entre les bassins. Ceci présente l'avantage de garder l'exploration initiale rapide des bassins de la *UTMetaD* tout en profitant de la convergence de la *WTMetaD* lorsque la transition entre deux bassins a lieu.

Deuxième partie

Étude de la SOR

Chapitre 3

La forme sauvage de la SOR

Dans ce premier chapitre, il est présenté l'étude de la forme sauvage de la SOR de la bactérie *Desulfoarculus baarsii*. Nous nous concentrons sur l'étude de la deuxième étape de protonation, étape clé du mécanisme car déterminante pour la réactivité native la SOR. Tout d'abord, le site actif ainsi que la méthode utilisée pour sa description adéquate (au niveau QM) sera décrite. Ensuite, le développement des paramètres MM ainsi que l'étude conformationnelle par dynamique MM sera présentée. L'étude de la réactivité native ainsi que la réactivité non-native par métadynamique terminera ce chapitre.

3.1 Description de l'état haut spin du fer du site actif

Différentes études expérimentales et théoriques ont confirmé que le fer présent dans le site actif de la SOR a une configuration haut spin [24, 28]. Les fonctionnelles hybrides comme B3LYP [32–34] ou PBE0 [115, 116] prédisent l'état haut spin comme étant l'état fondamental, tandis que les fonctionnelles GGA pures (BLYP [32, 33] ou PBE [117]) favorisent un état bas spin [21, 22]. Une solution consiste à ajouter un potentiel de correction Hubbard [118–120] au fer pour éviter une surhybridation et donc, obtenir l'état haut spin comme état fondamental et entraîner des densités de spin correctes. Le coût

de cette approche équivaut à l'utilisation d'une fonctionnelle GGA alors que les fonctionnelles hybrides sont plus coûteuses en temps de calcul en raison du calcul de l'échange Hartree-Fock. Grâce à l'évolution de la puissance de calcul, les calculs QM/MM avec des fonctionnelles hybrides sont maintenant plus accessibles [121, 122]. Dans ce travail, nous avons donc choisi l'utilisation de la fonctionnelle B3YLP pour éviter l'utilisation d'un paramètre spécifique pour chaque état différent [123] du système, ce qui permet d'assurer une cohérence en fonction des mutations ou des ligands. D'après les travaux précédents [19, 23], la fonctionnelle B3LYP est adaptée à ce système, non seulement pour décrire le bon état de spin mais également pour la géométrie du site actif (pour le modèle QM), elle a donc été retenue pour toutes les études impliquant une partie QM.

Pour évaluer la validité de ce choix sur des modèles plus réalistes, des optimisations de la géométrie du système $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ au niveau QM/MM ont été réalisées, à partir de géométries extraites de la dynamique moléculaire classique (*cf. vide supra*). Dans ce calcul, seule la partie QM a été optimisée, tandis que la partie MM a été gelée. En cohérence avec les résultats obtenus sur les petits modèles QM [22, 23], la fonctionnelle hybride B3LYP (mais également PBE0) est capable de décrire le système à l'état de haut spin, $S = 5/2$ comme étant l'état fondamental alors que la fonctionnelle BLYP (GGA, mais également PBE) favorise le bas spin comme l'état fondamental (voir tableau 3.1).

Les propriétés géométriques de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ sont décrites ci-après. À l'état haut spin, la distance de liaison Fe-S est de 2.42 Å en utilisant B3LYP (B3LYP-HS) et de 2.44 Å avec BLYP (BLYP-HS). Les distances Fe-Op ont une valeur de 1.98 Å au niveau B3LYP-HS et 2.01 Å au niveau BLYP-HS alors que les distances Op-Od sont de 1.45 Å et 1.48 Å au niveau B3LYP-HS et BLYP-HS, respectivement. Pour la configuration bas-spin, BLYP (BLYP-LS) présente des distances de 2.34 Å, 1.84 Å et 1.53 Å pour respectivement Fe-S, Fe-Op et Op-Od. Cette tendance est cohérente avec la sur-hybridation des orbitales d du fer, ce qui entraîne un renforcement de la liaison Fe-Op et un affaiblissement de la liaison Op-Od.

Fonctionnelle	BLYP	PBE	B3LYP	PBE0
Haut Spin (5/2)	0	0	0	0
Moyen Spin (3/2)	-4.5	-3.3	3.3	7.4
Bas Spin (1/2)	-13.9	-10.9	3.0	*

Tableau 3.1 – Énergies des géométries à moyen et bas spin par rapport aux géométries à haut spin pour les espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. Les énergies sont exprimées en kcal mol^{-1} et obtenues avec Gaussian09 [54].(*) les valeurs n’ont pas pu être obtenues.

Comme indiqué dans le tableau 3.1, la fonctionnelle PBE0 a donné des résultats comparables à B3LYP et PBE à BLYP que cela soit géométrique ou énergétique.

Notre choix de la fonctionnelle décrivant correctement l’état de spin du site actif étant fait, nous allons utiliser cette fonctionnelle pour tous les calculs au niveau QM dans la suite de ce travail. B3LYP a été préférée à PBE0 car elle a déjà été utilisée pour ce système et nous permet ainsi un point de comparaison. Pour commencer, l’utilisation de modèles QM représentant le site actif sera utilisé pour déduire les charges des atomes et les forces représentant l’élongation de liaisons et la distorsion des angles de valence, nécessaires à l’obtention de paramètres MM. Ces paramètres développés permettront la simulation de l’enzyme au niveau dynamique MM pour effectuer une série d’analyse conformationnelle du site actif et des interactions avec son substrat et le solvant.

3.2 Étude conformationnelle

3.2.1 Développement des paramètres MM du site actif

La SOR de *Desulfoarcularius baarsii* contient deux site métalliques non-hémique mononucléaire à fer, le centre désulfuroredoxine (désigné DX) de type rubrédoxine $[\text{FeS}_4]$ et le centre site actif (désigné SOR) $[\text{FeN}_4\text{S}_1]$. Bien que le centre à fer DX soit situé assez loin du site actif de la SOR (22 Å), il a néanmoins été pris en compte pour la construction de nos modèles SOR. On peut noter que son rôle en catalyse n’est pas encore défini. Des paramètres

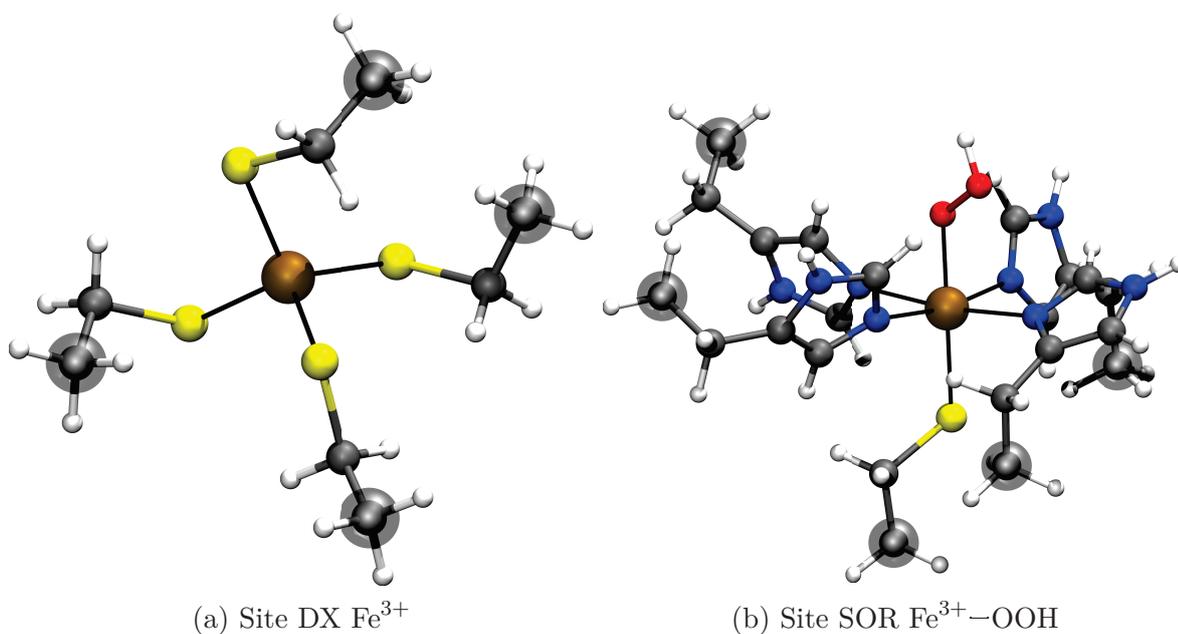


Figure 3.1 – Sous-systèmes utilisés pour la détermination des forces pour le *D. baarsii*. Les couleurs sont, pour les atomes Fe, S, O, N, C et H, respectivement ocre, jaune, rouge, bleu, gris et blanc. Les carbones surlignés ont été fixés lors de l’optimisation de géométrie.

pour le centre DX existent déjà notamment pour le centre de la protéine *Desulfovibrio gigas* [124], mais pour assurer une cohérence entre les deux centres métalliques SOR (le centre DX et le centre SOR), nous avons choisi d’effectuer un paramétrage complet de ces deux centres en utilisant la même méthodologie. Pour cela, le protocole décrit dans le chapitre 1 a été utilisé. Le programme MCPB [52] de la suite logicielle AmberTools12 [125] a été choisi pour déduire les paramètres : notre choix s’est porté sur une interaction ligand-métal décrite par un modèle lié. Les constantes de force de liaison et d’angles ont été déterminées à partir des matrices partielles de la matrice hessienne cartésienne selon la méthodologie décrite par Seminario [49]. Hoops *et al* [50] ont montré que les paramètres des dièdres n’étaient pas nécessaires pour décrire le centre métallique. Les constantes de force des angles dièdres impliquant le fer ont donc été mises à zéro. Les charges sur les atomes ont été calculées en utilisant l’approche RESP [44] utilisant le potentiel électrostatique échantillonné dans le schéma de Merz-Kollman [43]. Suivant le protocole MCPB, Gaussian03 [126] a été utilisé pour déterminer les forces et Gaussian09 [54] a été utilisé pour les charges au niveau DFT en utilisant la fonctionnelle B3LYP.

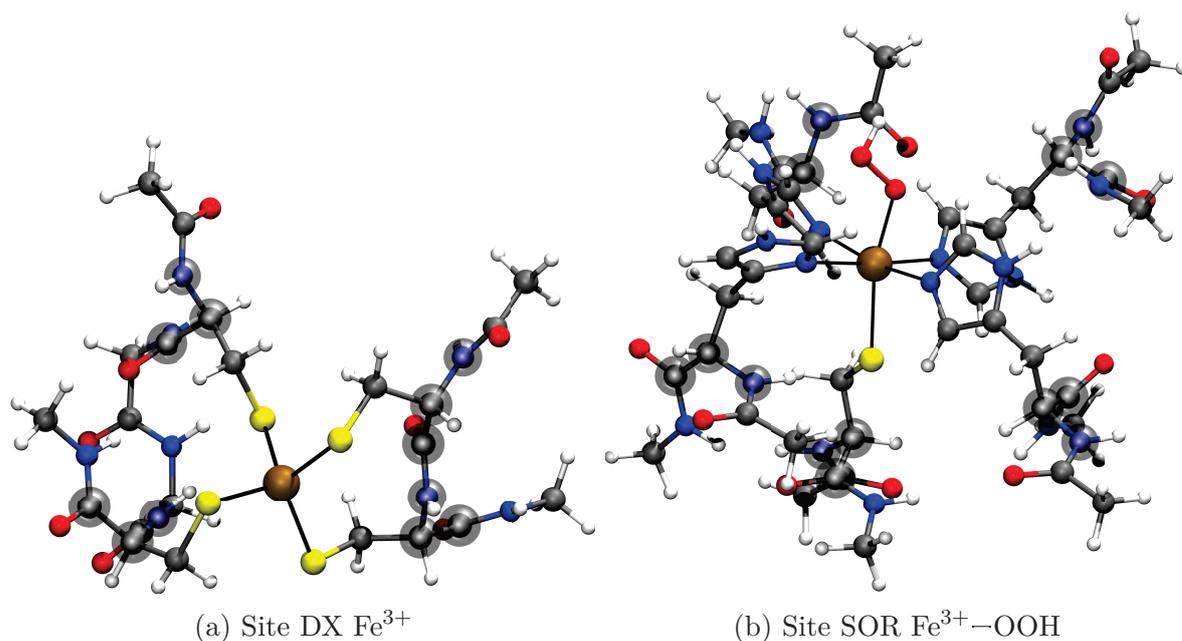


Figure 3.2 – Sous-systèmes utilisés pour la détermination des charges pour le *D. baarsii*. Les couleurs sont, pour les atomes Fe, S, O, N, C et H, respectivement ocre, jaune, rouge, bleu, gris et blanc. Les atomes surlignés sont gardés fixés lors de l’optimisation de géométrie.

Les sous-systèmes utilisés pour définir les constantes de force (modèle de forces) comprennent le fer et la première sphère de coordinations. Pour les acides aminés, les chaînes latérales sont conservées et le C_α est remplacé par un groupement méthyl. Pour le centre DX, la première sphère est constituée des quatre cystéines. Pour le centre SOR, elle est constituée de quatre histidines, d’une cystéine et du ligand (OO^{•-} ou ⁻OOH). Les sous-systèmes sont représentés figure 3.1. Les structures des sites actifs ont été extraites de la chaîne B de la structure présente dans l’entrée PDB 2JI3 [24] et une optimisation de la géométrie a été réalisée pour tous les atomes (fer et première sphère de coordination) au niveau B3LYP [32–34]/6-31+G(d) [59–66] avec les carbones alpha fixés à leur position cristallographique. Les matrices hessiennes ont été déterminées *via* des calculs de fréquence harmonique, ce qui a également permis de confirmer que les structures sont des minima réels de la surface d’énergie potentielle. Les constantes de forces ainsi obtenues pour les trois sites actifs sont répertoriés dans les SI de [127].

Pour déterminer les charges atomiques, un modèle plus conséquent comportant plus

d'atomes a été utilisé (modèle charges, voir la figure 3.2). Les acides aminés de la première sphère de coordination sont inclus en entier. L'ajout de groupe N-méthylamide aux extrémités C-terminales ou de groupe acétyl aux extrémités N-terminales comme *cap-ping group* assure la cohérence avec la procédure d'ajustement des charges utilisée dans FF9X [35] pour les acides aminés standards. Une optimisation de la géométrie a également été effectuée au niveau B3LYP/6-31G(d) en fixant les atomes C-N-O-C du squelette suivi d'un calcul de fréquence. Les charges de Mulliken ont été calculées au niveau B3LYP/6-311G(d,p) [62,64,128–131] et ont été ajustées en deux étapes. Un premier ajustement sans aucune contrainte sur les charges a été effectué. Un deuxième ajustement avec l'inclusion des charges sur les atomes du squelette (y compris les hydrogènes) des acides aminés contraints à leurs valeurs répertoriées dans Amber FF94 [35]. En outre, dans cette étape, la charge sur le fer a été fixée à la valeur trouvée dans la première étape d'ajustement pour être à la fois cohérent avec q_{Fe} et $q_{AA(Amber)}$. Les charges ainsi obtenues sont répertoriées dans les SI de [127].

Les paramètres non liés de van der Waals ont été extraits à partir de la référence [132] pour l'ion Fe^{2+} et de la référence [133] pour l'ion Fe^{3+} . Après cette procédure, trois ensembles de paramètres (forces, charges et paramètres de Van der Waals) ont été obtenus pour le centre DX (le centre de fer est à l'état d'oxydation formel Fe^{3+} et à haut spin) et pour les deux états du site actif SOR ($SOR-Fe^{2+}-OO^{\bullet-}$ et $SOR-Fe^{3+}-OOH$).

Pour le site DX, les constantes de force obtenues avec ces modèles sont proche de celles proposées par Carvalho *et al* [124]. Par exemple, la distance d'équilibre de liaison pour la distance de $Fe-S_{CC}$ est de 2.32 Å dans ce travail avec une constante de force de $\approx 78.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ pour chacun des quatre cystéines liantes en accord avec le travail de Carvalho *et al*.

Pour le site actif de la SOR, deux ensembles de paramètres ont été déduits selon la nature des intermédiaires de réaction. Un premier ensemble a donc été déterminé pour l'espèce $Fe^{2+}-OO^{\bullet-}$ et un second pour l'espèce $Fe^{3+}-OOH$. On peut remarquer deux différences

majeures entre les deux ensembles de paramètres. Tout d’abord, la constante de force pour la liaison Fe-Op est plus grande dans la structure $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ que dans celle de $\text{Fe}^{2+}\text{-OO}^{\bullet-}$, respectivement $76.4 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ et $25.5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. En toute logique, les distances d’équilibre Fe-Op sont de 2.0 \AA et de 2.2 \AA , respectivement pour les espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ et $\text{Fe}^{2+}\text{-OO}^{\bullet-}$. Par ailleurs, les distances de liaison Op-Od diffèrent entre les deux structures. Dans $\text{Fe}^{2+}\text{-OO}^{\bullet-}$, la distance d’équilibre est de 1.33 \AA avec une constante de force de $483.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, tandis que les valeurs correspondantes dans $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ sont respectivement de 1.46 \AA et $265.5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Ces différences sont cohérentes avec l’évolution d’une espèce $\text{Fe}^{2+}\text{-OO}^{\bullet-}$ vers une espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, comme cela a déjà été souligné par les calculs de QM antérieurs [23] : un renforcement de la liaison Fe-Op et un affaiblissement de la liaison Op-Od.

3.2.2 Validation des paramètres et conformation du site actif

Pour vérifier la stabilité de ces trois ensembles de paramètres ($\text{Fe}^{2+}\text{-OO}^{\bullet-}$, $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ et DX), et pour étudier la conformation des sites actifs de la SOR ainsi que la structure de la 2^{de} sphère de coordination et de solvation, des simulations de dynamique moléculaire classique en solvation explicite (eau) ont été conduites sur le dimère de SOR comprenant les chaînes A et B, extraites de la structure aux rayons-X 2JI3 [24]. Afin de simuler la forme sauvage, l’acide aminé Ala¹¹⁴ du mutant G114A a été remplacé par un résidu Glu (PDB : 2IJ1 [24]). Les deux systèmes ($\text{SOR-Fe}^{2+}\text{-OO}^{\bullet-}\text{+DX}$ et $\text{SOR-Fe}^{3+}\text{-OOH+DX}$) ont été simulés. La charge totale de chaque système a été neutralisée par ajout d’ions Na^+ puis le tout solvato dans une boîte d’eau cubique de molécules d’eau (les paramètres TIP3P [134] ont été choisis pour représenter l’eau), en considérant une couche de solvation de 8.0 \AA . Les trajectoires de la dynamique moléculaire ont été réalisées en utilisant le programme Amber12 [125] avec le champ de force Amber FF99SB [135]. Des conditions périodiques ont été appliquées *via* la méthode *Smooth Particle Mesh Ewald* [136,137] pour la prise en compte des interactions non liantes avec un seuil de 10 \AA . Après préparation du système

(Protéine+contre-ions+eau), il a été minimisé en deux étapes : une première minimisation avec la protéine fixée par une contrainte harmonique avec une constante de force globale de $500 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ afin de minimiser le solvant et de supprimer les contacts proches. La deuxième minimisation a été effectuée sans aucune contrainte. Pour toutes les simulations de dynamique moléculaire subséquentes, un pas de temps de 0.5 fs a été utilisé, dans un souci de cohérence avec les dynamiques QM/MM (où le même pas de temps sera utilisé). Après ces deux minimisations, le système a été chauffé pendant 25 ps pour atteindre une température d'équilibre de 300 K, en utilisant un thermostat de Langevin [138, 139] et une constante de friction de 5 fs^{-1} dans l'ensemble NVT. Cette étape a été suivie par 975 ps d'équilibration dans l'ensemble NPT, conduisant à une densité du système de 1. La dynamique dite 'de production' a ensuite été réalisée de nouveau dans l'ensemble NVT pour une durée de 100 ns.

Parce que la structure la SOR de *D. baarsii* est homodimérique [24] (c.-à-d. la présence des chaînes A et B dans PDB 2JI3), l'échantillonnage a été doublé pour chaque site actif SOR (deux chaînes par simulation) et quadruplé pour le site DX (deux chaînes par simulation et deux simulations : une pour chaque état de site actif SOR). Cela signifie que le temps d'échantillonnage équivalent est de 400 ns ($2 \times 2 \times 100$) pour le site DX et 200 ns (2×100) pour chacun des états du site SOR ($\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ et $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$). L'écart quadratique moyen (*Root-Mean-Square Deviation* ou RMSD) pour certaines distances importantes ont été calculés à partir des 100 ns de la dynamique moléculaire ainsi produite et sont présentés figure 3.3. Il apparaît que le RMSD pour tous les atomes de la protéine reste stable pour le temps de simulation avec une valeur inférieure à 1.8 \AA (Fig. 3.3 d, en rouge) et à 0.5 \AA pour chacun des sites actifs en moyenne des deux chaînes (c.-à-d. le centre métallique et les acides aminés directement liés à celui-ci, Fig. 3.3 a, b et c, en noir). Cela tend à montrer que les différentes simulations ont toutes été faites à l'équilibre, permettant un échantillonnage statistique de qualité.

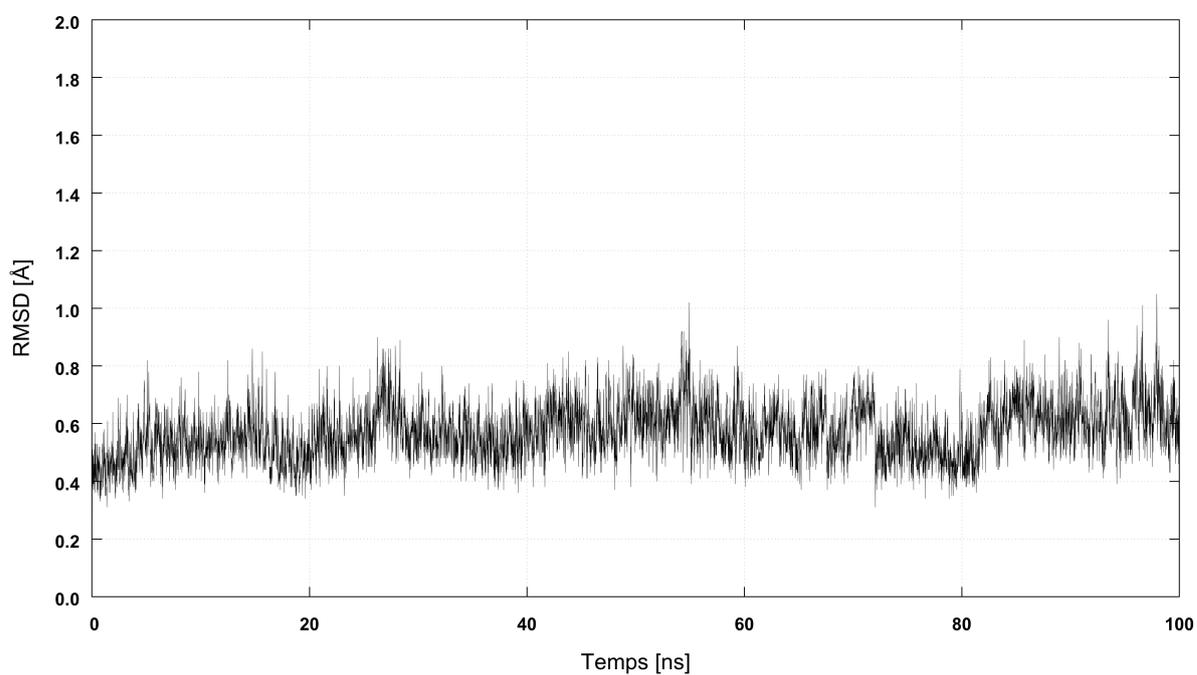
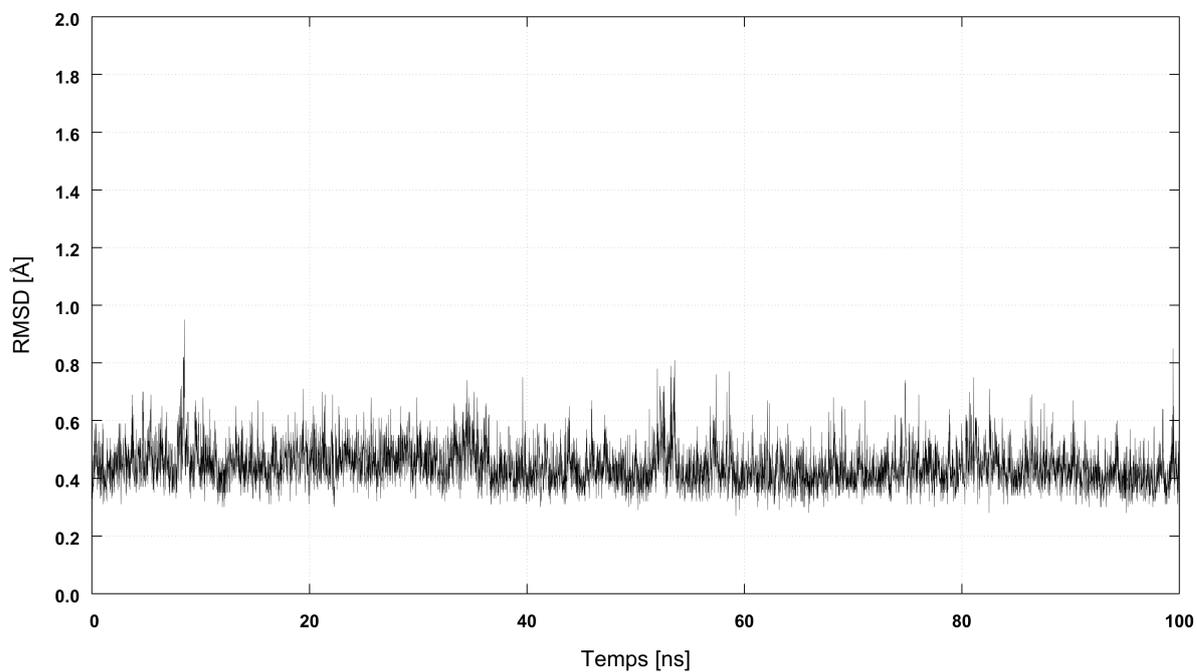


Figure 3.3 – (a) RMSD du site actif $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}\cdot^-$. (b) RMSD du site actif $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$. (c) RMSD du site DX. (d) RMSD de la protéine entière.

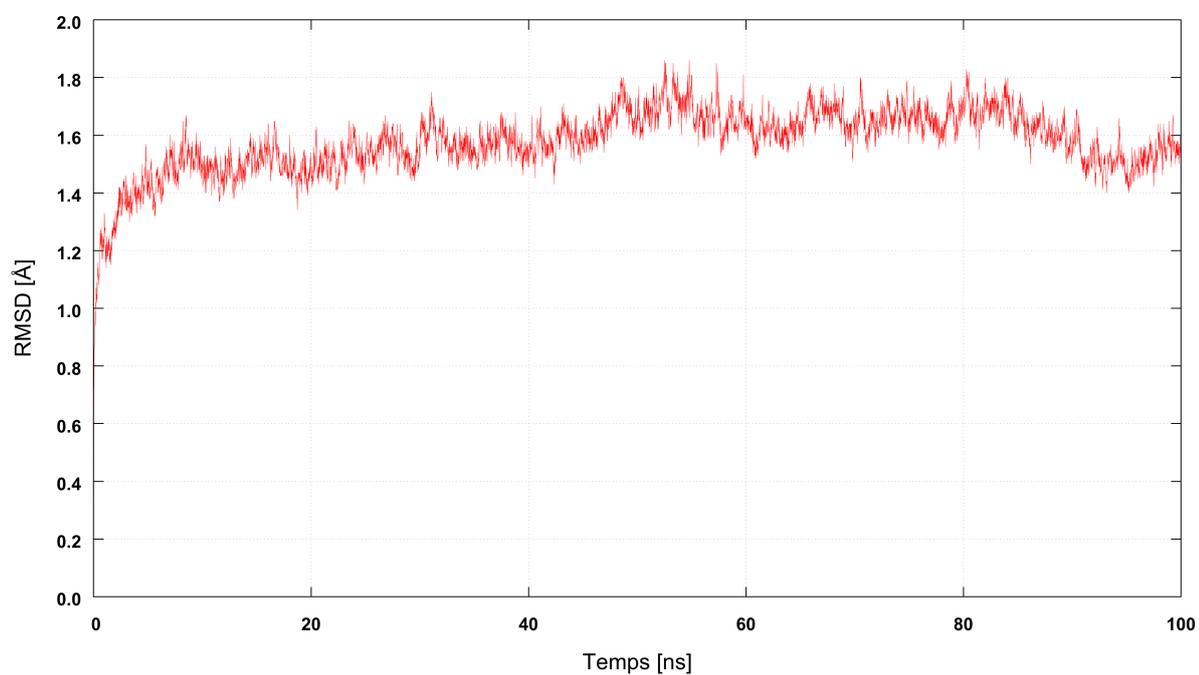
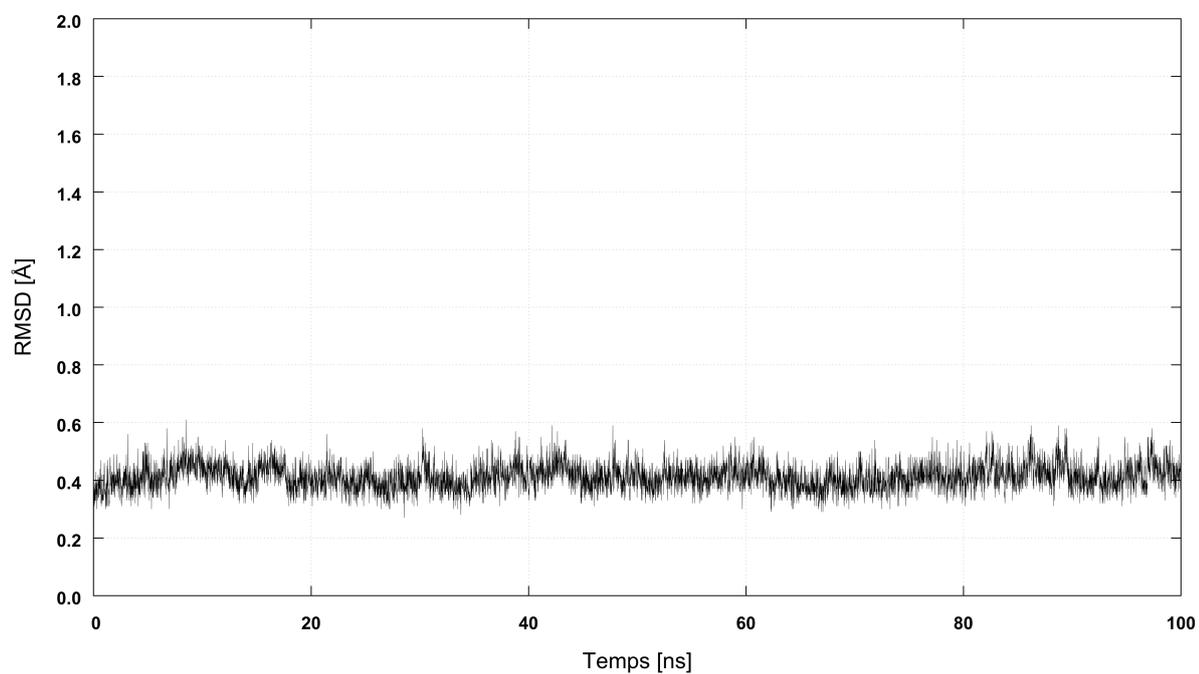


Figure 3.3 – (a) RMSD du site actif $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}\cdot^-$. (b) RMSD du site actif $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$. (c) RMSD du site DX. (d) RMSD de la protéine entière. (suite)

Le site DX. Pour évaluer la validité des paramètres DX, nous avons comparé notre travail avec des résultats expérimentaux précédents ainsi que des calculs théoriques. Pour les données expérimentales, deux structures rayons X ont été utilisées : le centre DX présent dans la structure de la SOR de *D. baarsii* avec la forme intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ (structure 2JI3) et celui présent dans la désulforedoxine de *D. gigas* (structure 1DXG) obtenue par Archer *et al* [12]. Aussi, nous avons comparé nos résultats au travail théorique précédent de Carvalho *et al* [124], qui a développé la paramétrisation pour le centre à fer DX de *D. gigas* (1DXG). Notez que le centre DX est le seul centre métallique présent dans 1DXG. Notre ensemble de paramètres permet une bonne description du centre DX dans la SOR de *D. baarsii* et est en accord avec celui de la désulforedoxine de *D. gigas*. La distance moyenne Fe-S sur les quatre liaisons obtenue *via* nos calculs est de $2.30 \pm 0.06 \text{ \AA}$, ce qui est en accord avec les deux structures cristallines. En effet, les distances moyennes de Fe-S sont de 2.27 \AA pour la structure 2JI3 et de 2.29 \AA pour la structure 1DXG [124] (valeurs moyennées sur les quatre liaisons Fe-S et les 2 chaînes). Cette distance Fe-S correspond également aux résultats des simulations de Carvalho *et al* [124] donnant une distance Fe-S de $2.30 \pm 0.06 \text{ \AA}$. En analysant de manière distincte les séquences CC et CXXC pour les angles, nous avons trouvé $108.3 \pm 3.6^\circ$ et $106.0 \pm 3.7^\circ$ respectivement pour les angles $\text{Fe-S}_{\text{CC}}\text{-C}$ et $\text{Fe-S}_{\text{CXXC}}\text{-C}$. Les valeurs moyennes obtenues à partir des structures des rayons X sont 107.2° et 105.2° pour la structure 2JI3 et 107.1° et 103.6° pour la structure 1DXG. Carvalho a obtenu des valeurs de $109.3 \pm 3.4^\circ$ dans le motif CC et $105.4 \pm 3.4^\circ$ dans le motif CXXC. Comme indiqué précédemment, les angles Fe-S-C pour les cystéines vicinales sont légèrement supérieurs à ceux pour les cystéines séparées par deux acides aminés. En étudiant le réseau de liaisons hydrogènes autour des atomes de soufre des cystéines liantes et du squelette (les valeurs sont rapportées dans le tableau 3.2), nous pouvons voir qu'il est en accord avec le réseau de liaisons hydrogène de la désulforedoxine de *Desulfovibrio gigas* rapportées par Archer *et al* [12,140] dans son travail expérimental ainsi qu'avec le travail théorique de Carvalho *et al* [124]. Malgré une séquence peptidique différente, nous avons trouvé le même réseau de liaisons hydrogènes entre les atomes

Chaîne	Accepteur	Donneur		Dist.	Dist.	Angle
				H-A (Å)	N-A (Å)	D-H-A (°)
A	S _{CXXC} Cys ¹⁰	H Val ¹²	N Val ¹²	2.70 ± 0.3	3.55 ± 0.2	144 ± 12
	S _{CXXC} Cys ¹⁰	H Cys ¹³	N Cys ¹³	2.77 ± 0.4	3.62 ± 0.3	146 ± 19
	S _{CXXC} Cys ¹³	H Asn ¹⁵	N Asn ¹⁵	2.77 ± 0.2	3.66 ± 0.2	149 ± 11
	S _{CC} Cys ²⁹	HD2 Asn ¹⁵	ND2 Asn ¹⁵	2.45 ± 0.4	3.40 ± 0.3	161 ± 13
B	S _{CXXC} Cys ¹³⁹	H Val ¹⁴¹	N Val ¹⁴¹	2.68 ± 0.3	3.53 ± 0.2	143 ± 13
	S _{CXXC} Cys ¹³⁹	H Cys ¹⁴²	N Cys ¹⁴²	2.74 ± 0.4	3.60 ± 0.3	147 ± 19
	S _{CXXC} Cys ¹⁴²	H Asn ¹⁴⁴	N Asn ¹⁴⁴	2.79 ± 0.2	3.68 ± 0.2	149 ± 12
	S _{CC} Cys ¹⁵⁸	HD2 Asn ¹⁴⁴	ND2 Asn ¹⁴⁴	2.48 ± 0.4	3.43 ± 0.3	161 ± 14

Tableau 3.2 – Liaisons hydrogène entre les atomes de soufre des cystéines du centre DX et les groupes amides des acides aminés voisins (squelette peptidique).

de soufre des cystéines et le squelette peptidique (ou la chaîne latérale) acides aminés voisins. Pour la chaîne A, il existe une liaison hydrogène entre le groupe amide de Val¹² et S_{Cys10}, qui se retrouve dans la désulforédoxine de *Desulfovibrio gigas* comme une liaison hydrogène entre Leu¹² et S_{Cys9}. Une liaison hydrogène entre le groupe amide de Cys¹³ et S_{Cys10} correspond à une liaison hydrogène entre Cys¹² et S_{Cys9}. En outre, il existe deux liaisons hydrogènes formées par l'Asn¹⁵ : une avec l'amide de son squelette peptidique *via* le soufre S_{Cys13} et la deuxième avec l'amide de sa chaîne latérale *via* le soufre S_{Cys29} (respectivement équivalentes aux deux liaisons H formées entre Gln¹⁴ et S_{Cys12}/S_{Cys28}). Nous pouvons également noter que le site DX de la chaîne A et celui de la chaîne B sont identiques.

En ce qui concerne l'interaction entre le site actif DX et le solvant (l'eau), S_{Cys30} est lié 50% du temps de simulation à un grand nombre de molécules d'eau possédant un temps de résidence faible (40 ps) car le soufre est très accessible au solvant. Il est important de noter qu'il y a qu'une seule molécule d'eau liée à la fois. Pour S_{Cys10}, le soufre est au bout d'une poche provoquant un encombrement stérique empêchant la libre circulation des molécules d'eau. Ainsi, dans ce cas, l'occupation moyenne est seulement de 10% du temps, mais contrairement à S_{Cys30}, seulement par un petit nombre de molécules d'eau

différentes, chacune d'entre elles ayant un temps de résidence autour de 5 ns. Comme pour le cas de S_{Cys30} , une seule molécule d'eau est liée. Les deux autres atomes de soufre (S_{Cys13} et S_{Cys29}) ne sont pas exposés au solvant, de sorte qu'aucune liaison hydrogène avec le solvant n'a été trouvée. Le comportant du site actif au sein de la chaîne B est en tout point analogue.

Le site $Fe^{2+}-OO^{\bullet-}$. En raison de l'absence de donnée cristallographique directe, les structures obtenues au cours des simulations du site actif SOR dans son état superoxyde ferreux ne peuvent être uniquement comparées aux modèles QM précédents décrits dans la littérature. Deux modèles QM ont été considérés. Un petit modèle de Sit *et al* [22] (56 atomes, où les histidines sont coupées en C_{β} et la cystéine en thiolate de méthyle - en phase gaz) et un plus grand de Tremey *et al* [23] (87 atomes avec une prise en compte de liaison hydrogène avec le soufre, des histidines coupées en C_{α} , la cystéine et les atomes du squelette entre Cys^{116} et His^{119} (Asn^{117} , Ile^{118})(modèle C) - avec solvant implicite). Les deux modèles ont utilisé la fonctionnelle B3LYP avec une base de qualité DZVP. Pour la distance de liaison Fe-S, nous rapportons des valeurs de 2.49 ± 0.1 Å pour la chaîne A et 2.47 ± 0.1 Å pour la chaîne B. Pour les calculs QM, le petit modèle [22] annonce une valeur de 2.50 Å et le grand [23] de 2.71 Å. Pour la liaison Fe-Op, les petits et grands modèles QM rapporte respectivement des valeurs de 2.27 Å et 2.20 Å, nous avons obtenu une valeur moyenne de 2.31 ± 0.11 Å. Pour la liaison Op-Od et l'angle Fe-Op-Od, nous avons obtenu des valeurs de 1.33 ± 0.0 Å et $136 \pm 7^{\circ}$. Pour les calculs QM, le petit modèle annonce des valeurs de 1.34 Å et 128.6° et le grand modèle 1.34 Å et 125.5° . Cette fluctuation peut s'expliquer par le fait que les paramètres MM que nous avons développé et les modèles QM antérieurs étaient basés sur des structures rayons X de la forme naturelle (forme sauvage WT dans la structure 2JI1 correspondant à Fe^{2+} , pour le grand modèle) ou d'un intermédiaire muté (mutant E114A dans la structure 2JI3 correspondant à $Fe^{3+}-OOH$, pour ce travail et le petit modèle). Néanmoins, nous pouvons noter que la corrélation indiquée dans la référence [23] entre les deux liaisons reste conservée : le raccourcissement

Chaîne	Accepteur	Donneur	Dist.		Angle	
			H-A (Å)	N-A (Å)	D-H-A (°)	
A	SCys ¹¹⁶	H Ile ¹¹⁸	N Ile ¹¹⁸	2.21 ± 0.1	3.28 ± 0.1	160 ± 9
	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹	2.23 ± 0.1	3.21 ± 0.1	164 ± 10
B	SCys ²⁴⁵	H Ile ²⁴⁷	N Ile ²⁴⁷	2.27 ± 0.1	3.23 ± 0.1	158 ± 8
	SCys ²⁴⁵	H His ²⁴⁸	N His ²⁴⁸	2.21 ± 0.1	3.20 ± 0.1	166 ± 9

Tableau 3.3 – Liaisons hydrogène entre les atomes de soufre de la cystéine du centre SOR Fe²⁺–OO^{•-} et les groupes amides des acides aminés voisins (squelette).

de la liaison Fe-S dans ce modèle MM implique un allongement de la liaison Fe-Op. Cet effet *trans* a été montré et est modulé par la présence d'un réseau de liaison hydrogène autour de l'atome de soufre qui affecte l'interaction Fe-S ce qui affecte à son tour les propriétés (géométries, réactivité) de la partie Fe–OO(H) [23]. Nous avons donc étudié le réseau de liaison hydrogène avec le soufre axial du site actif et du squelette. Dans nos simulations, les groupes amide du squelette d'Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ font des liaisons hydrogène avec le soufre avec un taux d'occupation de 39% et 35%, respectivement, pour le site de la chaîne A. Pour le site de la chaîne B, on trouve des valeurs de 24% et 62%. Les longueurs et les angles de ces liaisons hydrogène sont présentés dans le tableau 3.3.

Le site Fe³⁺–OOH. Nos valeurs calculées pour le site Fe³⁺–OOH ont été comparées aux données cristallographiques de la structure 2JI3 [24], au petit modèle de Sit *et al* [22] (composé de 45 atomes, les histidines étant représentées par des imidazoles et la cystéine par un thiolate de méthyle, en phase gazeuse) et à celui de Tremey *et al* [23] de 88 atomes, C_α des histidines, cysteine et les atomes de squelette entre Cys116 et His119 (modèle C dans la référence [23]) - eau implicite). Le tableau 3.4 regroupe les distances caractéristiques pour le site actif sous sa forme Fe³⁺–OOH, déterminée à partir de nos calculs, la structure cristallographique 2JI3 et les deux modèles QM.

Pour la liaison Fe-S, nous avons obtenu une valeur de 2.42 ± 0.1 Å. La distance moyenne dans la structure 2JI3 est de 2.53 ± 0.1 Å [24]. Le grand modèle QM a une valeur de 2.53 Å [23]. Aucune valeur n'a été indiquée pour le modèle de Sit *et al* [22]. La distance

Distance (Å)	Fe-Op	S-Fe	Op-Od
Ce travail (moyenne)	2.04 ± 0.1	2.42 ± 0.1	1.47 ± 0.0
Tremey <i>et al</i> [23]	1.99	2.52	1.44
Sit <i>et al</i> [22]	2.00		1.47
Structure 2JI3 [24] (moyenne)	2.00 ± 0.1	2.53 ± 0.1	1.47 ± 0.0

Angle (°)	Fe-Op-Od	Op-Od-Hd	C_β -S-Op-Od	Fe-Op-Od-Hd
Ce travail (moyenne)	126 ± 5	107 ± 5	-50 ± 21	-126 ± 56
Tremey <i>et al</i> [23]	119.1	100.7	105.1	-171.1
Sit <i>et al</i> [22]	123.9			
Structure 2JI3 [24]	125 ± 3		128 ± 15	

Tableau 3.4 – Distances et angles importants (courbure et dièdre) pour les espèces Fe^{3+} -OOH à partir de nos simulations (moyenne), des modèles QM et de la structure 2JI3 (moyenne sur les trois chaînes (hydro)peroxy).

Fe-Op est de 2.04 ± 0.1 Å dans nos simulations. Dans la structure cristalline, la distance Fe-Op est de 2.00 ± 0.1 Å tandis qu’avec le petit modèle QM une valeur de 2.00 Å est obtenue et avec le grand modèle, une valeur de 1.99 Å. Pour l’angle Fe-Op-Od, nous avons trouvé une valeur de $126 \pm 5^\circ$, ce qui est proche de la valeur expérimentale de $125 \pm 3^\circ$ [24]. Des valeurs de 123.9° pour le petit modèle [22] et 119.1° pour le grand modèle [23] ont été signalées. Dans l’ensemble, ces données montrent que nos paramètres conservent très bien la structure du site actif SOR, qui se révèle équivalent pour la chaîne A et la chaîne B. La valeur de l’angle dièdre C_β -S-Op-Od sera discutée plus loin dans ce manuscrit.

Le réseau de liaisons hydrogène avec le soufre de la cystéine a également été étudié pour notre modèle. De la même manière que le site Fe^{2+} -OO \cdot^- intermédiaire, nous avons trouvé que les résidus Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ sont engagés avec le le soufre dans un réseau de liaisons hydrogène *via* la fonction amide (N-H) du squelette peptidique. Dans la chaîne A, les implications de Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ *via* des liaisons hydrogène avec le soufre sont respectivement de 26% et 65% du temps de simulation, tandis que pour le site de la chaîne B, les valeurs

	Accepteur	Donneur		Dist. H-A (Å)	Dist. N-A (Å)	Angle D-H-A (°)
Chaîne A	SCys ¹¹⁶	H Ile ¹¹⁸	N Ile ¹¹⁸	2.34 ± 0.2	3.27 ± 0.1	153 ± 10
	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹	2.20 ± 0.1	3.17 ± 0.1	162 ± 11
Chaîne B	SCys ²⁴⁵	H Ile ²⁴⁷	N Ile ²⁴⁷	2.46 ± 0.2	3.39 ± 0.2	154 ± 11
	SCys ²⁴⁵	H His ²⁴⁸	N His ²⁴⁸	2.30 ± 0.2	3.24 ± 0.2	157 ± 15
Structure	SCys ¹¹⁶	H Ile ¹¹⁸	N Ile ¹¹⁸		3.41 ± 0.1	
2JI3 [24]	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹		3.20 ± 0.1	

Tableau 3.5 – Liaisons hydrogène entre les atomes de soufre de la cystéine du centre SOR Fe³⁺-OOH et les groupes amides des acides aminés voisins (squelette).

correspondantes sont de 30% et 50% du temps. Les distances et les angles pertinents sont rapportés dans le tableau 3.5. Nous pouvons noter que nos simulations n’ont montré aucune différence majeure entre les sites des chaînes A et B.

La grande cohérence de nos simulations avec les structures obtenues expérimentalement ou celles obtenues avec des modèles QM, nous permet donc de valider les paramètres obtenus pour les sites DX, Fe²⁺-OO^{•-} et Fe³⁺-OOH. Les simulations effectuées sont donc exportées dans la suite de cette thèse pour étudier les propriétés du site de la SOR.

3.2.3 Liaisons hydrogènes : interactions avec le substrat

Du fait de la position très accessible au solvant du site actif de la SOR (situé en surface de l’enzyme), il est donc important d’étudier la structuration du solvant autour de ce dernier : la structure cristallographique de l’espèce Fe³⁺-OOH [24] nous montre une proximité entre des molécules d’eau, Lys⁴⁸ et le ligand ⁻OOH. Au cours de nos simulations de dynamiques au niveau MM, nous avons trouvé que Lys⁴⁸ interagissait bien avec les intermédiaires Fe^{II}-superoxyde ou Fe^{III}-hydroperoxyde (Figure 3.4) soit directement, soit indirectement *via* une ou plusieurs molécules d’eau pontantes.

En considérant le réseau de liaisons hydrogène entre la lysine et le ligand ⁻OO^{•-} ou ⁻OOH,

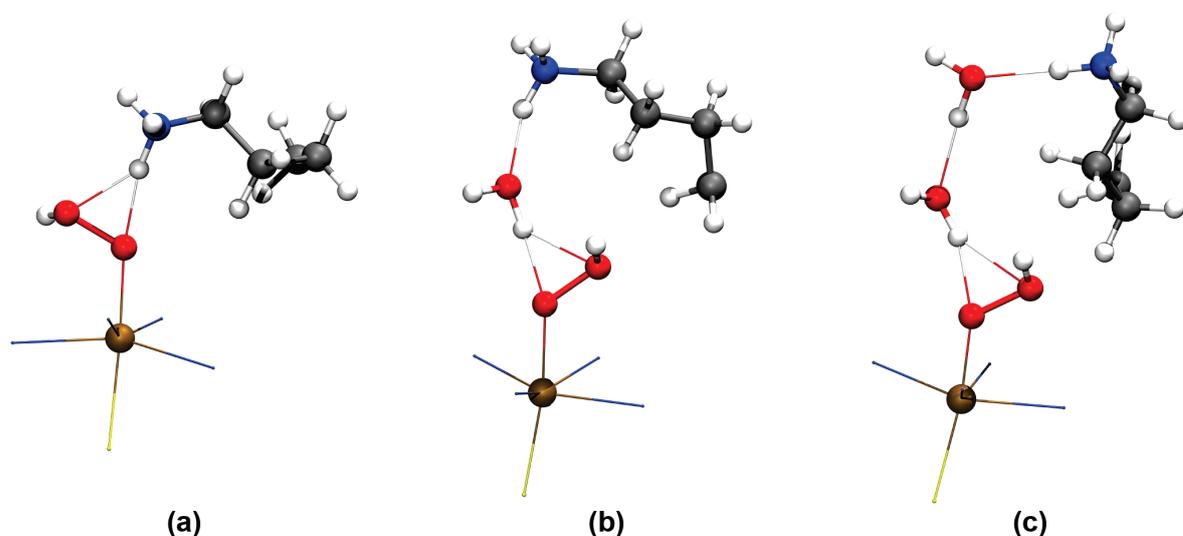


Figure 3.4 – (a) «directe». (b) «une H₂O pontante». (c) «deux H₂O pontantes».

trois arrangements différents ont été jugés pertinents. Le premier implique une interaction directe de la lysine avec les intermédiaires et sera nommé «directe». Le second, une molécule d'eau s'insère entre la lysine et les intermédiaires et est nommé «une H₂O pontante». Dans le troisième, deux molécules interstitielles d'eau sont impliquées entre la lysine et les intermédiaires, noté «deux H₂O pontantes». La figure 3.4 représente les exemples de ces conformations pour le système Fe³⁺–OOH.

A partir des simulations de dynamique moléculaire d'une durée de 100 ns, nous avons extrait des géométries toutes les 12.5 ps, générant ainsi 8000 structures. L'analyse décrite ci-dessous ne montre pas de statistiques différentes entre les chaînes A et B.

Pour définir les liaisons hydrogène (X-H...Y), nous avons utilisé les critères suivants. La longueur de liaison entre un atome d'hydrogène et un atome lourd donneur (azote ou oxygène) maximale a été fixée à 1.1 Å. Celle maximale entre un hydrogène et un atome lourd accepteur (azote ou oxygène) a été fixée à 2.2 Å. La distance entre deux atomes lourds, donneur et accepteur, est de 3.3 Å. L'analyse de ces liaisons hydrogène a été effectuée avec le programme VMD, soit en utilisant le *plugin Hydrogen Bonds* (appelé "plugin"), soit par un script reprenant les critères énoncés ci-dessus et appelé "notre méthode".

Pour la conformation «directe», notre méthode est la suivante : l'oxygène (proximal ou distal) doit être situé au maximum à 2.2 Å d'un atome d'hydrogène (H_{lys}) appartenant au groupe NH_3^+ de la lysine 48 et au maximum à 3.3 Å de l'atome d'azote (N_{lys}) appartenant au même groupe NH_3^+ . Nous avons également utilisé le plugin avec une distance de 3.3 Å pour la distance donneur (N_{lys}) - accepteur (Op/Od) avec un seuil d'angle de 40°. Les résultats obtenus par les deux méthodes d'analyse ont conduit au même nombre de conformations «directe».

Pour la conformation «une H_2O pontante», seule notre méthode a été utilisée sous la forme suivante : l'oxygène (Op ou Od) doit être situé au maximum à 2.2 Å d'un hydrogène (H_{W1}) appartenant à une molécule d'eau et au maximum à 3.3 Å de l'oxygène (O_{W1}) de cette même molécule d'eau (avec une distance maximale de 1.1 Å entre H_{W1} et O_{W1}). L'atome O_{W1} doit lui être situé à des distances maximales de 2.2 Å d'un atome H_{lys} et de 3.3 Å de l'atome N_{lys} .

Notre méthode a également été utilisée pour la conformation à «deux H_2O pontantes» : l'oxygène (Op ou Od) doit être situé au maximum à 2.2 Å d'un hydrogène (H_{W1}) appartenant à une molécule d'eau et au maximum à 3.3 Å de l'oxygène (O_{W1}) de cette même molécule d'eau (avec une distance maximale de 1.1 Å entre H_{W1} et O_{W1}). L'atome O_{W1} doit lui être situé à des distances maximales de 2.2 Å d'un atome d'hydrogène (H_{W2}) appartenant à une autre molécule d'eau et à 3.3 Å de l'oxygène (O_{W2}) appartenant à la même molécule d'eau (avec une distance maximale de 1.1 Å entre H_{W2} et O_{W2}). L'atome O_{W2} doit lui être situé à des distances maximales de 2.2 Å d'un atome H_{lys} et de 3.3 Å de l'atome N_{lys} .

Les critères d'une liaison hydrogène est habituellement définis par une couple longueur de liaison (Donneur-Accepteur) et un angle (Donneur-Hydrogène-Accepteur), or pour le réseau de liaison hydrogène avec le substrat, notre analyse implique deux ou trois liaisons hydrogène en chaîne, aussi nous justifions notre choix par le fait qu'il était plus aisé de traiter plusieurs liaisons (via des distances maximales) qu'un mélange de longueur de

conformations	Fe ²⁺ -OO ^{•-}		Fe ³⁺ -OOH	
	Op	Od	Op	Od
«directe»	0.11%	1.97%	0.08%	0.21%
«une H ₂ O pontante»	6.43%	18.97%	1.72%	1.18%
«deux H ₂ O pontantes»	11.12%	15.72%	18.11%	11.60%
«total avec lysine»	18%	37%	20%	13%
«sans lysine»	38%	25%	56%	17%
«aucune liaison hydrogène»	44%	38%	24%	70%

Tableau 3.6 – Occurences des conformations pour les intermédiaires Fe²⁺-OO^{•-} et Fe³⁺-OOH. Les occurences considèrent uniquement les oxygènes en tant qu'accepteur de liaisons hydrogène.

liaison et d'angles. En outre, pour chaque liaison hydrogène, trois distances sont utilisées comme critères, ce qui permet d'éviter de répertorier des conformations non pertinentes. En effet, parmi les 127 occurrences retenues pour la conformation Lys⁴⁸-eau-substrat («une H₂O pontante»), seulement cinq possèdent un angle inférieur à 140° (critère habituel [141]) et parmi ces cinq, une seule possède un angle inférieur à 138° avec une valeur de 126°. Pour le «deux H₂O pontantes», une vérification aléatoire, environ une structure sur 50, parmi les occurrences de conformation n'a montrée aucune structure non-pertinente suite à des angles aberrants.

Le tableau 3.6 décrit les occurrences des trois conformations («directe», «une H₂O pontante» et «deux H₂O pontantes») ainsi que la conformation où les oxygènes forment une liaison hydrogène avec une molécule de solvant sans interaction directe avec la lysine (*i.e.* à plus de 2 molécules d'eau) ainsi que des conformations sans liaisons hydrogène.

Le site Fe²⁺-OO^{•-}. La conformation «directe» est présente environ vingt fois moins par rapport aux deux motifs pontés. Cette interaction «directe» peut être faite avec les deux atomes d'oxygène du substrat (oxygène proximal et distal) mais a lieu plus souvent avec l'oxygène distal plutôt qu'avec le proximal. Avec une ou deux molécules d'eau pontantes, l'oxygène distal est également favorisé en tant qu'accepteur de liaison hydrogène. Il est important de noter que lorsqu'une liaison hydrogène se forme entre un

donneur et l'oxygène proximal, elle est également présente avec l'oxygène distal, les liaisons hydrogènes avec l'oxygène proximal ne sont donc pas, la plupart du temps, uniques. L'inverse, l'affirmation qu'une liaison hydrogène avec le distal forme également une liaison hydrogène avec le proximal n'est pas vraie : environ deux tiers de liaisons hydrogènes avec l'oxygène distal sont uniques. Ceci est cohérent avec le fait que l'oxygène proximal est plus accessible au solvant (i.e. en "bout" de substrat). Par ailleurs, les charges des deux oxygènes sont différentes (*cf.* SI de [127]) : la charge de l'oxygène distal est plus négative que celle de l'oxygène proximal. Cette distribution est cohérente avec le fait que l'oxygène distal est l'oxygène protoné lors de la première étape de protonation pour former l'intermédiaire Fe-hydroperoxy [20, 24, 142]. En outre, les résultats expérimentaux tendent à montrer que la Lys⁴⁸ a un rôle important, mais non-essentiel [23] dans cette première étape de protonation comme donneur de protons [22]. Pour l'oxygène distal, 37% des conformations impliquent une interaction avec Lys⁴⁸, directement ou indirectement (via des molécules d'eau pontantes) alors que seulement 25% des conformations se font sans lysine.

Le site Fe³⁺-OOH. Pour les espèces Fe³⁺-hydroperoxyde, la conformation «directe» entre Lys⁴⁸ avec le ligand ⁻OOH est très rare comparées aux interactions impliquant une ou deux molécules d'eau pontantes. Étant déjà protoné dans cet intermédiaire, l'oxygène distal est très peu impliqué en tant qu'accepteur de liaisons hydrogène par rapport à l'état Fe²⁺-superoxyde (70% des conformations sont sans liaisons hydrogène). D'autre part, l'oxygène proximal quant à lui est un accepteur de liaisons hydrogène avec des molécules d'eau sans implication de Lys⁴⁸ pour 56% des conformations. Lorsque Lys⁴⁸ est impliquée avec ou sans molécule d'eau pontante, la répartition est similaire à celle obtenue pour le système Fe²⁺-superoxyde. Cependant, la proportion de «deux H₂O pontantes» est plus élevée pour l'oxygène proximal de la forme Fe³⁺-hydroperoxyde (18%) par rapport à la forme Fe²⁺-superoxyde (11%). L'hydrogène porté par l'oxygène distal lui est toujours en liaison hydrogène avec une molécule d'eau (97% du temps de simulation, indépendamment

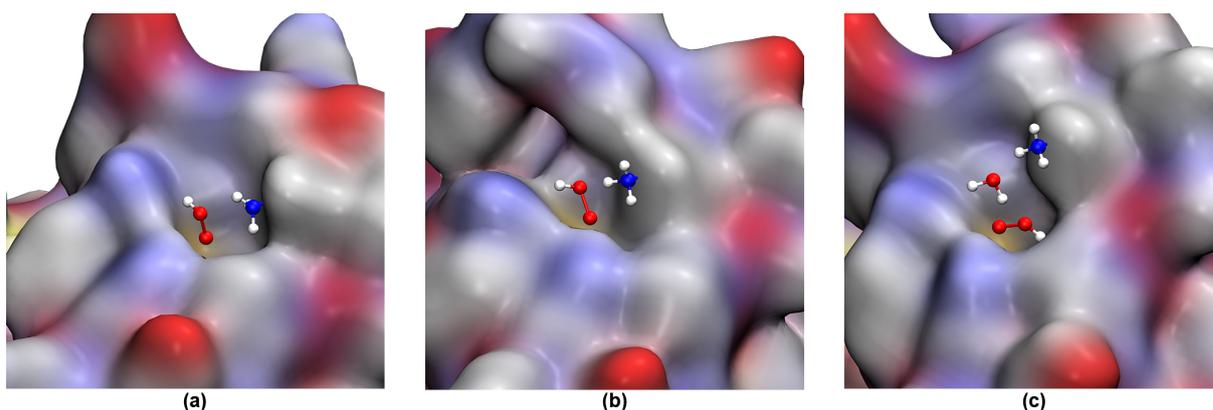


Figure 3.5 – Conformations du $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ avec différentes valeurs de l'angle dièdre $\text{C}_\beta\text{-S-Op-Od}$. (a) À partir de la structure cristallographique 2JI3, avec un dièdre $\text{C}_\beta\text{-S-Op-Od}$ est égal à 128° (b) Simulation «directe» de lysine avec un angle dièdre de 120° $\text{C}_\beta\text{-S-Op-Od}$. (c) Simulation «une H_2O pontante» et avec un angle dièdre de -50° $\text{C}_\beta\text{-S-Op-Od}$. Les conformations sont représentées avec une représentation de surface accessible au solvant.

des conformations décrites dans le tableau 3.6), ce qui fait que l'oxygène distal devient principalement donneur de liaisons hydrogène et non plus accepteur.

Dans l'ensemble, même si la lysine 48 a une interaction directe ou indirecte avec le ligand OOH^- , les conformations n'impliquant pas ce résidu directement (à plus de deux molécules d'eau) dominant clairement. Outre l'étude du réseau de liaison hydrogène lui-même, une corrélation intéressante entre la valeur de l'angle dièdre $\text{C}_\beta\text{-S-Op-Od}$ et l'apparition de la conformation «directe» (lysine uniquement) a été notée. Alors que l'angle dièdre $\text{C}_\beta\text{-S-Op-Od}$ peut adopter deux valeurs spécifiques dans nos simulations (Figure 3.5), $\approx 120^\circ$ (b) et $\approx -50^\circ$ (c), une seule valeur autour de 128° (a) se trouve dans la structure cristallographique 2JI3 [24]. Dans les simulations de dynamique moléculaires, cette conformation à 120° ne se produit que lorsque la lysine 48 est en liaison directe avec l'hydroperoxyde, ce qui est un événement relativement rare (moins de 0.2%). On peut également noter que la conformation à 120° est plus flexible (l'amplitude est plus large) que la conformation à -50° .

Dans la conformation à 120° (Figure 3.5, b), le ligand OOH^- est en position «extérieure», ce qui le rend facilement accessible pour la lysine pour engager une liaison hydrogène directe. L'agencement de l'environnement autour de la lysine donne une surface accessible

au solvant avec une cavité plus étroite. Dans la conformation à -50° (Figure 3.5, c), le ligand ^-OOH pointe vers la lysine, ce qui rend l'oxygène proximal plus facilement accessible aux molécules d'eau, avec la lysine à proximité pour former un pont. Dans ce cas, la cavité est plus exposée au solvant. Alors que la conformation à -50° est la plus prépondérante dans nos simulations, la conformation à 120° est elle observée dans la structure des rayons X, cela pourrait être lié à une stabilisation de l'énergie de cristallisation due au phénomène de "packing" [143,144], favorisant un empilement plus compact. La confirmation de 120° néanmoins est présente dans nos simulations et avec une conformation de la lysine en accord avec les données cristallographiques.

Ces données extraites de simulations de dynamiques moléculaires ont soulignées l'importance de la lysine dans la première étape (sur l'oxygène distal, premier oxygène protoné dans le cycle) et la seconde étape (sur l'oxygène proximal, second oxygène protoné donnant formation au peroxyde d'hydrogène). Ces conformations spécifiques seront utilisées comme point de départ pour une analyse de la réactivité de la seconde étape de protonation de l'enzyme dans sa forme naturelle.

3.3 Réactivité native

Comme souligné précédemment, le processus de protonation de l'intermédiaire $Fe^{3+}-OOH$ est considéré comme une étape clé du cycle catalytique de la SOR pour former le produit de réaction H_2O_2 . En effet, le site actif de la SOR permet la formation de H_2O_2 par la protonation spécifique de l'oxygène proximal, initialement lié au fer dans les espèces $Fe^{3+}-OOH$. Il faut souligner que la protonation de l'oxygène distal d'une espèce $Fe^{3+}-OOH$ pourrait conduire à un clivage de la liaison O-O et à la formation d'espèces $Fe=O$ à haut degré d'oxydation, comme cela se produit au cours du cycle catalytique des oxygénases comme le cytochrome P450 [30]. Dans ce dernier cas, la formation des espèces fer-oxo à haut degré d'oxydation permet la catalyse de l'oxydation et de l'oxygénation de

différents substrats. Ainsi l'étude et la compréhension du processus de la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ revêt un intérêt fondamental afin de comprendre la spécificité de la SOR comme n'étant pas une enzyme de type oxygénase classique.

Les simulations de dynamique moléculaire ont montré que Lys^{48} interagit fortement, soit directement, soit *via* un réseau de liaison hydrogène, avec l'hydroperoxyde intermédiaire. En conjonction avec les données expérimentales [24, 29, 145], nos résultats nous ont permis de considérer que ce résidu est la source ou le relais de proton final dans le mécanisme de protonation. Pour étudier la formation du produit de réaction de la SOR, H_2O_2 , nous nous sommes concentrés sur le mécanisme de transfert de protons de la partie NH_3^+ de Lys^{48} à l'hydroperoxyde ^-OOH au moyen de la métadynamique (au niveau QM/MM).

Deux conformations de départ ont été envisagées. Une première avec la conformation «directe» avec la partie NH_3^+ de la lysine 48 directement en interaction avec l'hydroperoxyde (c'est-à-dire que la lysine 48 est la source directe de proton) et une seconde avec une molécule d'eau intercalée entre les deux («une H_2O pontante»). Nous soumettons l'hypothèse que cette conformation («une H_2O pontante») est représentative de toutes celles qui impliquent plusieurs molécules d'eau (*via* des sauts de protons).

3.3.1 Mise en place d'une méthodologie QM/MM : DFT hybride + MM

Comme il a été noté précédemment la configuration électronique du fer du site actif est haut spin et pour sa description correcte, il est nécessaire soit d'utiliser un potentiel de Hubbard ou une fonctionnelle avec de l'échange Hartree-Fock (dite hybride). La fonctionnelle B3LYP ayant donné pour les petits modèles, des résultats cohérents (géométriquement et électroniquement) que ce soit dans cette étude (pour le développement des paramètres MM) ou dans la littérature [19, 23], nous avons donc choisi d'entreprendre des simulations QM/MM avec cette fonctionnelle pour la partie QM et le champ de

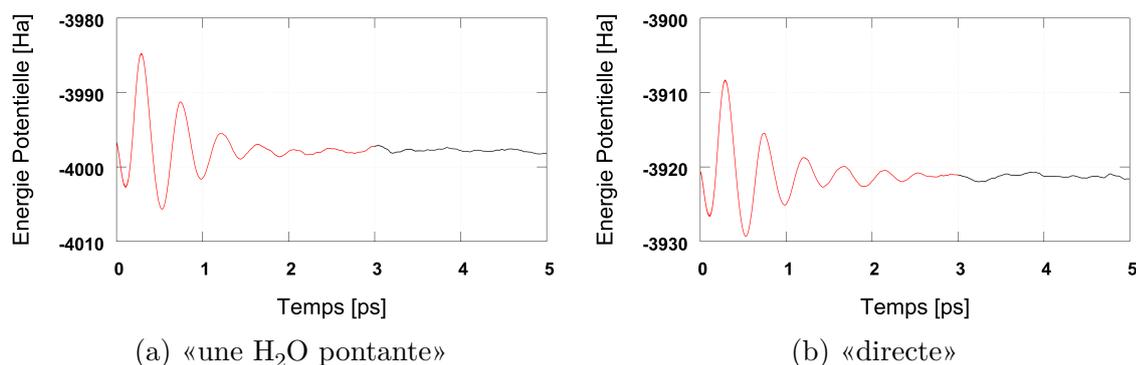


Figure 3.6 – Énergie potentielle en fonction du temps des conformations «une H₂O pontante» (a) et «directe» (b).

force AMBER précédemment utilisé pour la partie MM. Pour explorer les mécanismes de réaction le long de l'étape de protonation des intermédiaires de SOR $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, une série de simulations de dynamique QM/MM [70] ont été exécutées avec le programme CP2K [146, 147].

Dans toutes les simulations QM/MM, la partie QM (provenant d'un seul site SOR $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ d'une seule chaîne, A ou B) est constituée du fer ferrique, du substrat hydroperoxyde, des chaînes latérales des résidus His⁴⁹, His⁶⁹, His⁷⁵, His¹¹⁹ et Cys¹¹⁶ (c.-à-d. la première sphère de coordination du métal) et celle de Lys⁴⁸. Toutes les molécules d'eau à une distance de inférieure à 5 Å du ligand hydroperoxyde ainsi que celles à 3 Å du groupe NH_3^+ de Lys⁴⁸ ont également été considérées. La frontière QM/MM, entre les C_α et C_β des cinq acides aminés liant le Fe, et la Lys⁴⁸, a été traitée en utilisant la méthode du *link atom* [71]. Le schéma GEEP [72, 73] a été utilisé pour calculer les interactions QM/MM. La boîte QM est fixée à la taille du sous-système QM plus une distance de 5 Å dans chaque direction. La méthodologie GAPW [67, 68] qui prend en compte tous les électrons a été utilisée au niveau B3LYP à l'aide d'un opérateur de Coulomb tronqué [148] à 6 Å. Les effets de dispersion ont été ajoutée *via* la correction de dispersion empirique D3 [149, 150]. Le choix s'est porté sur la base 6-31G(d,p) pour tous les atomes, à l'exception des atomes d'oxygène du substrat OOH^- , des quatre azotes et du soufre qui lient le fer et l'azote du groupement NH_3^+ de la lysine, pour lesquels la base 6-31+G(d,p) avec des diffuses a été

préférée. La projection de la structure électronique a été faite avec un *cutoff* de 400 Ry ce qui est la valeur par défaut de CP2K, la méthode GAPW étant moins impactée que la méthode GPW par le cutoff. La partie MM conserve les mêmes paramètres que les précédentes dynamiques MM. Des conditions limites périodiques ont été appliquées au système MM et QM [151]. Les conformations de départ sont extraites des dynamiques MM en conservant les géométries et les vitesses. Les dynamiques QM/MM ont été réalisées dans l'ensemble NVT avec un thermostat de Nosé-Hoover [87–89] avec une constante de 100 fs⁻¹. Le pas de temps choisi pour les simulations QM/MM est 0.5 fs.

Ces simulations de dynamiques QM/MM ont servi à équilibrer le sous-système QM (transition de MM à QM/MM) avant de réaliser les métadynamiques. Les points de départs MM ont été sélectionnés à partir de trois conformations extraites des simulations MM choisies pour être représentatives de deux modèles de liaison hydrogène comme décrit précédemment. (*snapshots* '5050A', chaîne A, «une H₂O pontante»; '5741B', chaîne B, «directe», '5497B'; chaîne B, «une H₂O pontante»). La sélection des images '5050A' et '5497B' présentent la même conformation de départ et au cours des dynamiques QM/MM présentent les mêmes coordonnées géométriques, les sites A et B sont identiques : le système QM/MM «une H₂O pontante» utilisera le *snapshot* de départ '5050A'. La durée des dynamiques QM/MM est de 5 ps, afin de s'assurer que le système est rééquilibré (l'équilibre est atteint au bout de 3 ps). Les dynamiques QM/MM ont montré une stabilité géométrique du site actif, en continuité avec la dynamique classique de MM décrite dans la section précédente. Ces données confirment la validité des paramètres du champ de force que nous avons déterminés ainsi que le fait que la structure est équilibrée. En reportant l'énergie potentielle (Epot QM/MM) en fonction du temps (Figure 3.6), nous soulignons la nécessité d'exécuter une dynamique QM/MM sans biais avant de soumettre le système à des métadynamiques. Les trois premières ps (Fig. 3.6, en rouge) montrent une fluctuation qui est le résultat de la transition de la description MM du site actif à une description QM/MM. De 3 ps à 5 ps le système est équilibré (Fig. 3.6, en noir). Toutes

Distance (Å)	Fe-Op	S-Fe	Op-Od	
«directe»	1.99 ± 0.05	2.49 ± 0.10	1.45 ± 0.03	
«une H ₂ O pontante»	1.96 ± 0.05	2.48 ± 0.08	1.45 ± 0.04	

Angle (°)	Fe-Op-Od	Op-Od-Hd	C _β -S-Op-Od	Fe-Op-Od-Hd
«directe»	118 ± 7	104 ± 4	70 ± 16	94 ± 18
«une H ₂ O pontante»	116 ± 6	99 ± 5	-40 ± 17	13 ± 14

Tableau 3.7 – Les distances et les angles importants (courbure et dièdre) pour les espèces Fe³⁺–OOH à partir de nos simulations QM/MM en moyenne sur les deux dernières picosecondes. La conformation «directe» correspond au point de départ '5741B'. La conformation «une H₂O pontante» correspond provient de '5050A'.

valeurs géométriques ou électroniques extraites de dynamique QM/MM sont comprises dans ces deux dernière ps ainsi que les points de départs des métadynamiques suivantes. Dans le tableau 3.7, nous reportons les distances et angles significatifs du site actif.

Comme le montre le tableau 3.7, entre les deux structures de départ (conformation «directe» et «une H₂O pontante») peu de différence majeure ont été trouvées entre les structures : par exemple, la distance de liaison fer-soufre était de 2.49 ± 0.10 Å pour la conformation «directe» et de 2.48 ± 0.08 Å pour la conformation «une H₂O pontante». Les deux seules différences remarquables ont été trouvées pour la distance fer-oxygène, qui est légèrement plus longue dans la conformation «directe» à 1.99 ± 0.05 Å contre 1.96 ± 0.05 Å pour la conformation «une H₂O pontante». De plus, comme discuté précédemment, l'angle dièdre C_β-S-Op-Od est positif dans la conformation «directe» ($70 \pm 16^\circ$) et négatif dans la conformation «une H₂O pontante» ($-40 \pm 17^\circ$).

3.3.2 Étude par métadynamique de la réactivité

Les deux conformations de départs étant préalablement équilibrées en dynamique QM/MM, nous avons ensuite effectué des métadynamiques QM/MM pour explorer la réactivité native de la structure native de la SOR.

En considérant les résultats des dynamiques MM et QM/MM, pour chaque simulation, deux variables collectives (CV) ont été utilisées représentant le chemin de réaction. Une pour décrire le transfert de protons et l'autre pour décrire la dissociation du produit H_2O_2 du centre à fer (clivage de la liaison Fe-Op). Dans le système où le résidu Lys⁴⁸ interagit directement avec le ligand OOH^- , la CV décrivant le transfert de proton est la distance $\text{N}_{\text{Lys}}-\text{H}_{\text{Lys}}$ avec l'atome H_{Lys} le plus proche de l'hydroperoxyde (c'est-à-dire celui qui est en liaison hydrogène avec Op). Dans le système avec une molécule d'eau reliant la lysine et OOH^- , la CV correspondante est la distance $\text{O}^{\text{eau}}-\text{H}^{\text{eau}}$ avec H^{eau} l'hydrogène de la molécule d'eau en liaison hydrogène avec Op. Dans les deux cas, la deuxième variable est la distance entre l'atome de fer et l'oxygène proximal lié à celui-ci.

Le niveau de théorie est le même que celui utilisé pour les simulations de dynamique QM/MM, B3LYP/6-31G(d,p) et B3LYP/6-31+G(d,p) pour la partie QM (*vide supra*). Une première série de simulations a été effectuée à l'aide de métadynamique *untempered* (UTMetaD) avec des paramètres différents pour les Gaussiennes (hauteurs des Gaussiennes (W), rythme de dépositions (τ_G)) afin d'obtenir une barrière estimée pour les deux conformations de départ. Ces simulations préliminaires ont d'abord confirmé la faisabilité du processus supposé (protonation et dissociation) et le choix des deux CV. Elles ont également fourni une première estimation de l'énergie libre d'activation du processus de protonation, qui ne dépassait pas 15 kcal mol^{-1} . Ces résultats nous ont également permis de définir le paramètre ΔT pour la métadynamiques *Well-Tempered* [96,112] (*WTMetaD*) à une valeur de 6000 K.

Pour les paramètres de la métadynamique *Well-Tempered*, les paramètres des Gaussiennes utilisées sont les suivants : la hauteur de la Gaussienne a été fixée à $W = 1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ et la largeur a été fixée à $\sigma = 0.05 \text{ \AA}$ (ce qui correspond à $\text{Amp}/2$ avec Amp l'amplitude de la variable sans potentiel de biais). Le dépôt des gaussiennes (τ_G) se fait toutes les 10 fs (soit tous les 20 pas de métadynamique). Afin de limiter l'exploration du sous-espace, ces deux variables sont restreintes par l'utilisation de potentiel de répulsion quadratique

ayant pour constante K de 500 kcal mol⁻¹ : la distance Fe-Op est limitée à 3.5 Å et la distance N_{lys}/O_w-H_{lys}/H_w est limitée à 3.0 Å.

3.3.2.1 Chemin de protonation pour la conformation «directe»

Le premier processus réactif considéré concerne la voie de protonation «directe» de l'intermédiaire de Fe³⁺-OOH. La métadynamique a été commencée à partir de la fin de la dynamique QM/MM (après 5 ps, la position et les vitesses ont été conservées). Elle a été arrêtée après 22 ps, ce qui correspond à un ajout de 2200 gaussiennes. La surface d'énergie libre correspondante (FES) reconstruite à partir de la métadynamique *Well-Tempered* (*WTMetaD*) est illustrée à la figure 3.7.

Le chemin de réaction trouvé à partir des simulations de métadynamique pour la conformation «directe» est décrit en plusieurs étapes de (**A_D**) au produit (**E_D**). À partir de la conformation initiale (**A_D**), correspondant à la structure extraite de la dynamique QM/MM précédente dans laquelle la distance Fe-Op est de 1.9 Å, le système évolue *via* une petite barrière d'activation d'environ 1 kcal mol⁻¹ vers un second minimum énergétiquement plus favorable de 1 kcal mol⁻¹. Cet intermédiaire, (**A'_D**), se caractérise par une augmentation de la distance de Fe-Op à 2.2 Å et il est stabilisé par la chaîne voisine chargée de la chaîne latérale de la lysine. La deuxième étape consiste en la dissociation de ⁻OOH. De (**A'_D**), le système évolue vers (**B_D**), un intermédiaire dans lequel la distance de liaison Fe-Op est allongée à 2.6 Å. Lors de ces deux premières étapes, le proton H_{lys} reste lié à la lysine (1.2 Å en (**B_D**) intermédiaire).

La deuxième étape, la dissociation, possède une barrière de 7 kcal mol⁻¹, et est l'étape limitante pour ce chemin réactionnel «directe». Pour comparaison, en utilisant un modèle DFT statique (Fe³⁺ ⁻OOH, quatre ammoniacs représentant les histidines, un méthylthio-late représentant la cystéine), Attia *et al* [152] ont rapporté une barrière de 17 kcal mol⁻¹ (énergie interne) pour dissocier l'hydroperoxyde du centre Fe³⁺. La chaîne latérale chargée de la lysine contribue grandement au processus de dissociation de l'ion ⁻OOH du fer (*vide*

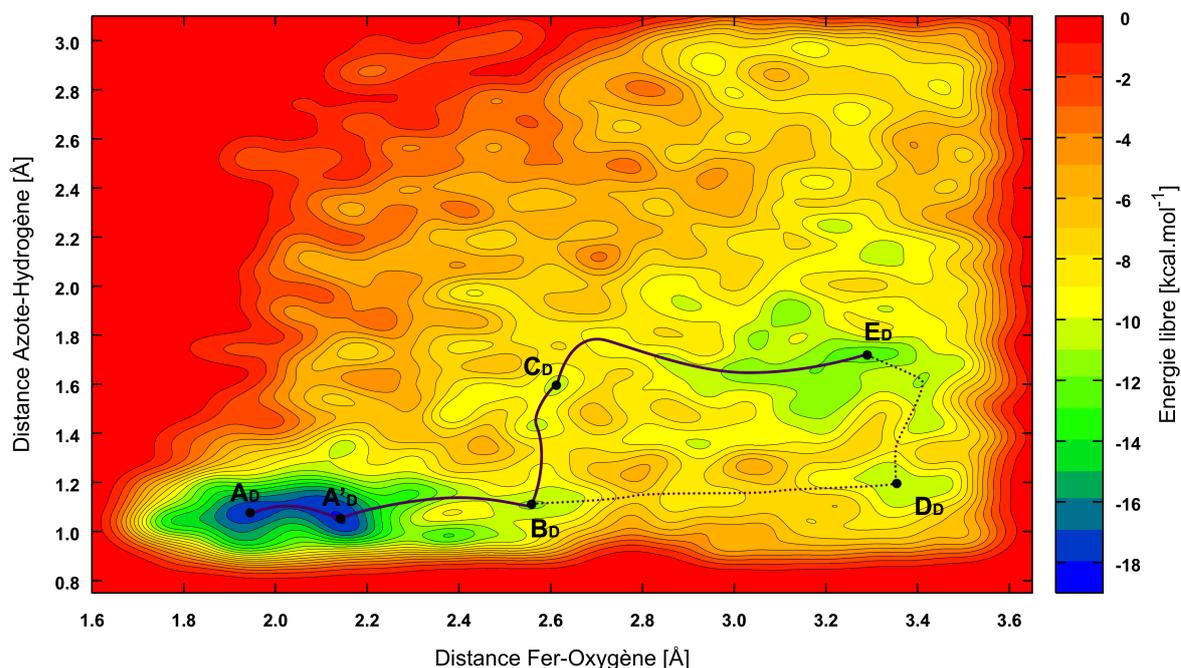


Figure 3.7 – Surface d'énergie libre pour la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ avec la conformation «directe» en fonction des CV sélectionnées. Le chemin de réaction présentant la barrière d'activation la plus faible est représenté sous la forme d'une ligne noire continue. Un chemin alternatif est montré en ligne pointillée.

infra).

À partir de (\mathbf{B}_D), deux voies sont maintenant possibles, soit *via* l'intermédiaire (\mathbf{C}_D) ou *via* l'intermédiaire (\mathbf{D}_D). Pour le chemin impliquant (\mathbf{C}_D), la protonation de l'Op se produit d'abord, formant H_2O puis est suivie de son éloignement. L'autre chemin impliquant (\mathbf{D}_D) commence par l'éloignement de OOH^- suivie de la protonation de Op pour former H_2O_2 (voir la figure 3.7). Ainsi, pour le chemin passant par (\mathbf{C}_D), la protonation de l'oxygène proximal par la lysine se produit d'abord. La distance $\text{N}_{\text{Lys}}\text{-H}_{\text{Lys}}$ passe de 1.1 Å à 1.5 Å, tandis que la distance Op-H_{Lys} diminue simultanément de 1.9 Å à 1.1 Å. Cette barrière de transition associée de (\mathbf{B}_D) à (\mathbf{C}_D) est de 3.5 kcal mol⁻¹. Le système évolue depuis (\mathbf{C}_D) avec une petite barrière de 2 kcal mol⁻¹ vers le puits de produit (\mathbf{E}_D), avec le produit H_2O_2 à bonne distance, l'ion Fe^{3+} avec le dernier site de coordination vacant et la lysine déprotonée. Le deuxième chemin évolue de (\mathbf{B}_D) vers (\mathbf{D}_D) avec une barrière de 4 kcal mol⁻¹, donc 1 kcal mol⁻¹ plus haut que le chemin précédent. Cela conduit

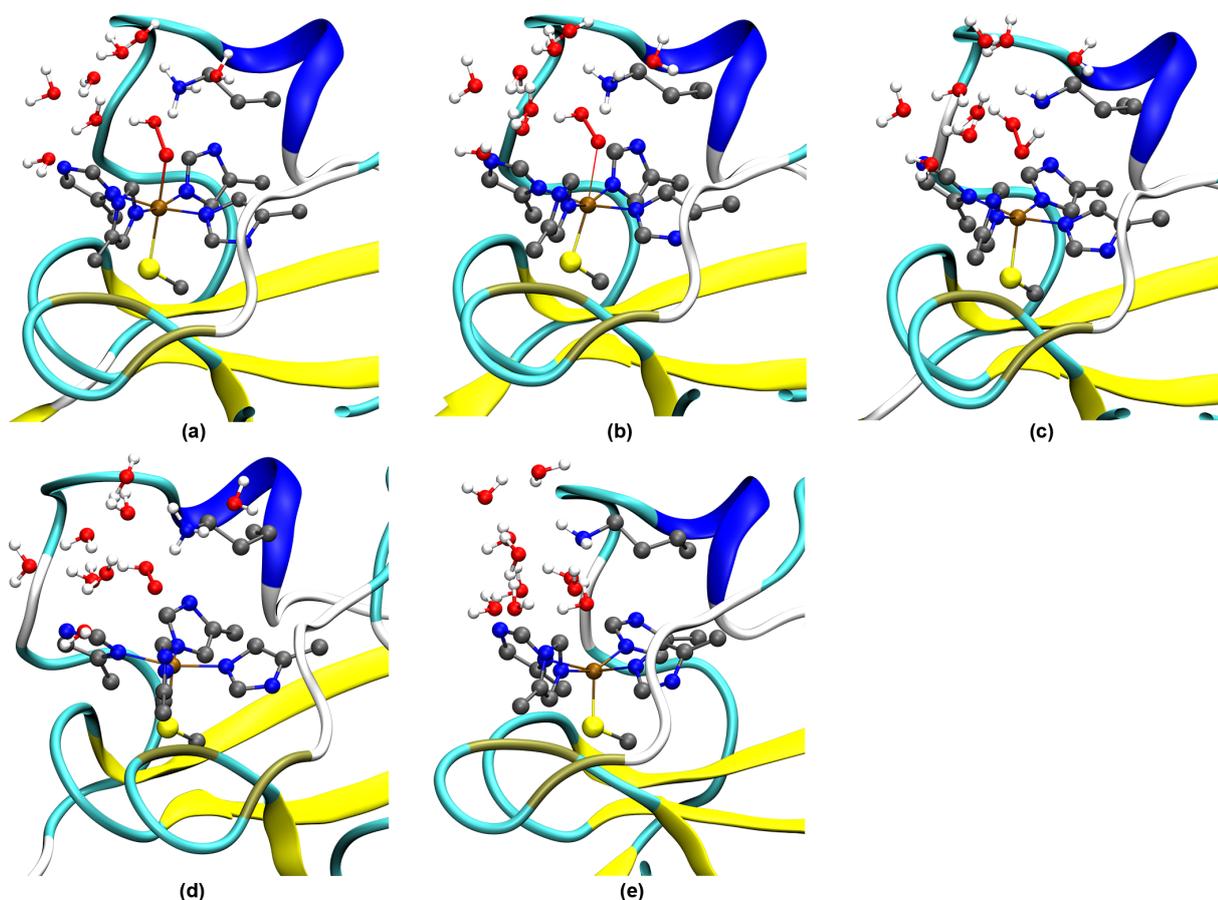


Figure 3.8 – Structures des intermédiaires de la surface de l'énergie libre le long du chemin de protonation «directe» de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. La partie QM est représenté dans le modèle *ball and stick* (les atomes d'hydrogène des résidus acides aminés ont été omis pour plus de clarté, à l'exception du groupe ammonium de la lysine 48), la protéine en MM est représenté en modèle *New Cartoon* et les molécules de solvants MM sont omises. (a) ($\mathbf{A}'_{\mathbf{D}}$), (b) ($\mathbf{B}_{\mathbf{D}}$), (c) ($\mathbf{C}_{\mathbf{D}}$), (d) ($\mathbf{D}_{\mathbf{D}}$), (e) ($\mathbf{E}_{\mathbf{D}}$).

à une dissociation complète du OOH^- du fer (La distance Fe-Op est égale à 3.2 Å). La protonation ne se produit qu'après cette étape de dissociation complète de OOH^- , avec une barrière de 1.5 kcal mol $^{-1}$ et conduit au produit ($\mathbf{E}_{\mathbf{D}}$), similaire à celui décrit dans le premier chemin passant par ($\mathbf{C}_{\mathbf{D}}$).

Les deux chemins conduisent au même produit comme l'état ($\mathbf{E}_{\mathbf{D}}$), qui est 5 kcal mol $^{-1}$ au-dessus des réactifs initiaux ($\mathbf{A}'_{\mathbf{D}}$). L'énergie de ce processus de réaction est seulement apparente puisque le produit ($\mathbf{E}_{\mathbf{D}}$) est lui-même un intermédiaire le long du chemin de réaction complet conduisant à la libération de H_2O_2 . En effet, le peroxyde d'hydrogène sera délogé et solvato alors que la sixième coordination vacant de l'ion Fe^{3+} sera occupée

par la chaîne latérale carboxylate de Glu⁴⁷ (schéma 1).

Ces processus induisent alors une stabilisation et une réorganisation de l'environnement du site actif, en particulier de la boucle de la lysine 48. Cependant, la durée nécessaire à la réalisation de ces processus est hors de portée de ce travail. En outre, les contraintes utilisées dans ces simulations limitent le sous-espace exploré et empêchent l'évolution vers l'état oxydé *resting state*, dans lequel la sixième position de coordination du Fe³⁺ est occupée par la chaîne latérale carboxylate de Glu⁴⁷ (schéma 1). En outre, les CV choisies ne sont pas adaptés pour décrire l'état de coordination du glutamate.

La figure 3.8 montre l'évolution de l'ensemble du système d'un point de vue géométrique en suivant la surface d'énergie libre. Outre les variations liées à l'exploration le long des variables collectives, les structures présentées dans la figure 3.8 montrent d'autres variations. La liaison soufre de Cys¹¹⁶ avec le fer ferrique devient plus courte passant de 2.5 Å à 2.2 Å au cours de la dé-coordination du ligand ⁻OOH, l'extrémité de la lysine 48 déprotonée s'éloigne légèrement de 5.4 Å à 5.7 Å (correspondant à la distance Fe-N_{Lys}). Cependant, le mouvement de Lys⁴⁸ est entravé, car l'une des CV est la distance N_{Lys}-H_{Lys} qui possède un mur à 3 Å.

3.3.2.2 Chemin de protonation pour la conformation «une H₂O pontante»

Dans ce paragraphe, nous étudions le deuxième processus réactif partant de la voie de protonation de l'intermédiaire de Fe³⁺-OOH impliquant une molécule d'eau. La surface d'énergie libre (FES) reconstruite à partir de la *WTMetaD* est représentée figure 3.9. La métadynamique a été commencée à partir de la fin de la dynamique QM/MM (après 5 ps, la position et les vitesses ont été conservées). Elle a été arrêtée après 15 ps, ce qui correspond à un ajout de 1500 Gaussiennes.

D'un point de vue mécanistique, cette voie est différente de la voie «directe» (*vide supra*). Cela peut être observé à partir de l'espace situé au-dessus du point de départ de la simu-

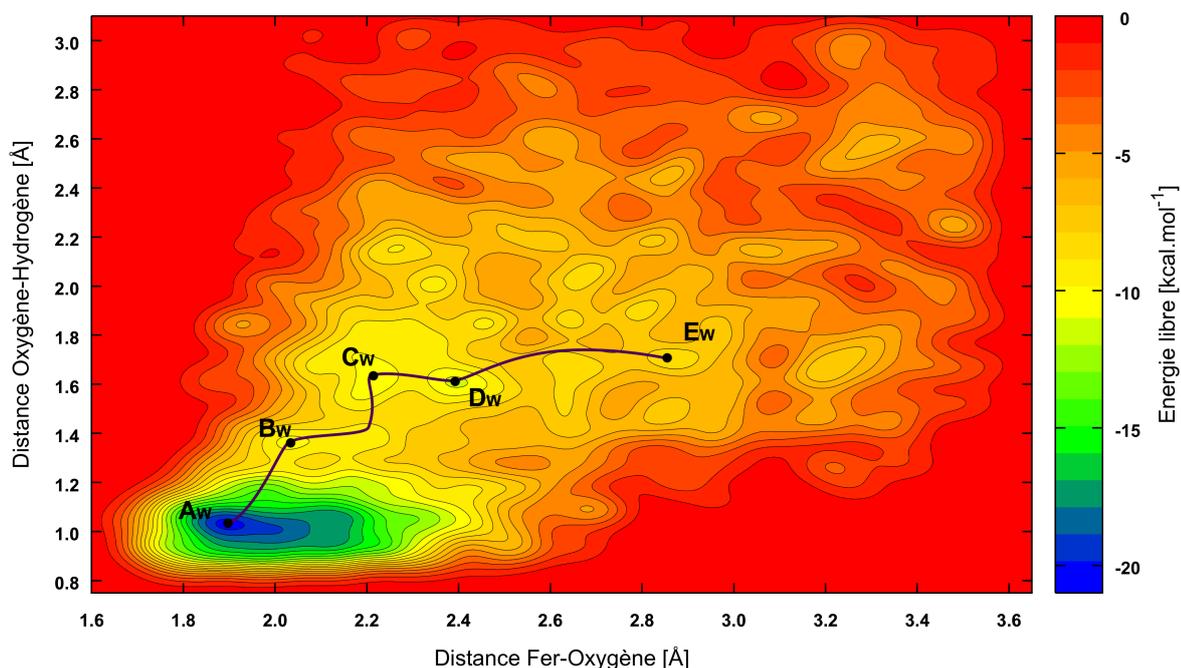


Figure 3.9 – Surface d'énergie libre pour la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ avec la conformation «une H_2O pontante» en fonction des CV sélectionnées.

lation (\mathbf{A}_w) qui est clairement visité, contrairement à la voie «directe». Ainsi, la première étape de cette voie est de façon évidente la protonation de l'intermédiaire hydroperoxyde, avec une légère elongation de la liaison Fe-Op. En passant de (\mathbf{A}_w) à (\mathbf{B}_w), le système franchit une barrière d'environ 11 kcal mol^{-1} . Les distances des liaisons $\text{H}_{\text{eau}}\text{-O}_{\text{eau}}$, $\text{H}_{\text{eau}}\text{-Op}$ et Fe-Op sont, respectivement, de 1.4 \AA , 1.2 \AA et 2.05 \AA . L'intermédiaire (\mathbf{B}_w) évolue avec une barrière de 2 kcal mol^{-1} vers (\mathbf{C}_w), qui présente des distances pour la liaison H-O_{eau} de 1.6 \AA , pour $\text{H}_{\text{eau}}\text{-Op}$ de 1.0 \AA et pour Fe-Op de 2.2 \AA . De plus, la lysine a protoné l'ion hydroxyde HO^- formé pour donner H_2O . Ensuite (\mathbf{C}_w) évolue vers (\mathbf{D}_w) avec une barrière d'activation de 1 kcal mol^{-1} . La distance Fe-Op s'allonge jusqu'à 2.4 \AA et H_2O_2 se dissocie. Plusieurs intermédiaires avec différentes distances pour les liaisons H-O_{eau} et Fe-Op sont trouvés et nous avons pu effectuer des aller-retour sur la surface de (\mathbf{D}_w) à (\mathbf{A}_w). La transition (\mathbf{A}_w) à (\mathbf{D}_w) décrit en partie le saut de protons entre la lysine et $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ *via* une molécule d'eau pour former Fe^{3+} et H_2O_2 . Cependant, le transfert de protons de cette molécule d'eau aux molécules d'eau environnantes nous empêche d'avoir

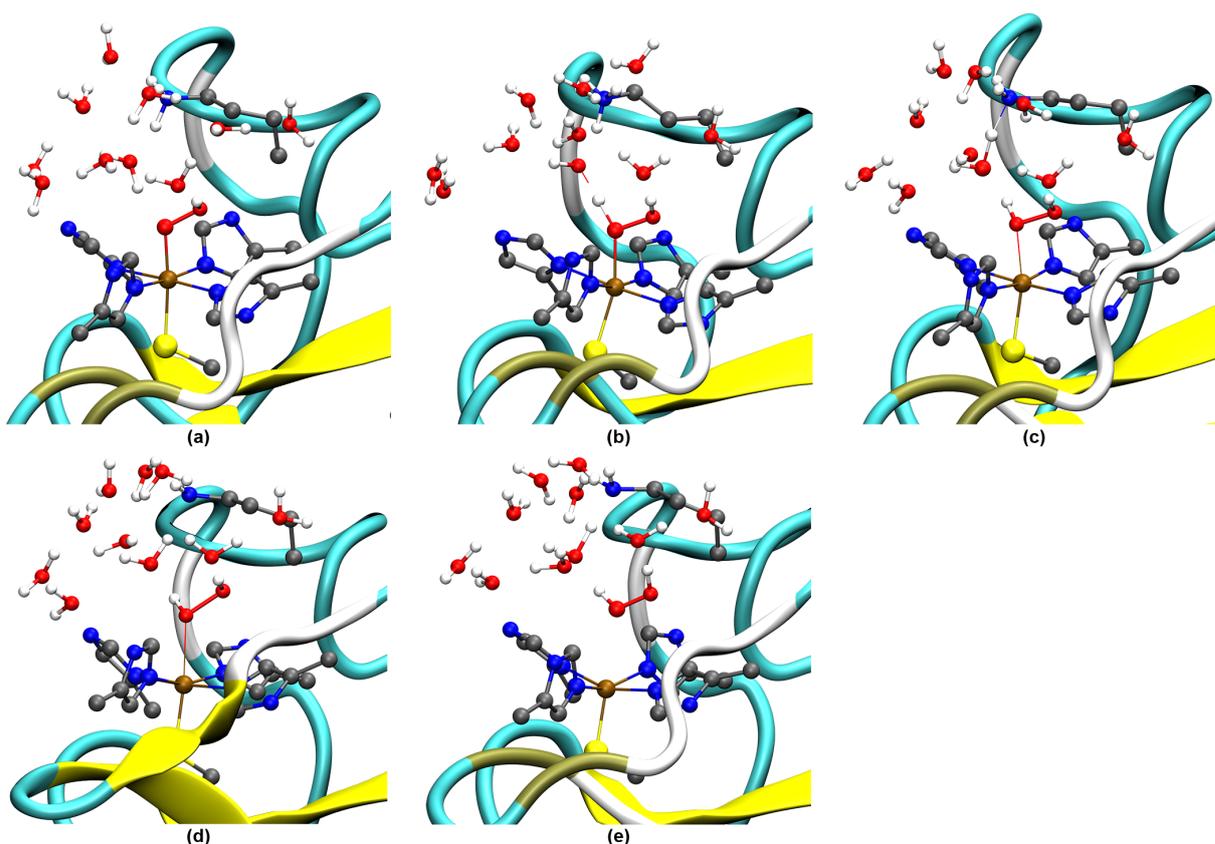


Figure 3.10 – Structures des intermédiaires de la surface de l'énergie libre le long du chemin de protonation «une H_2O pontante» de l'espèce $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$. La partie QM est représenté dans le modèle *ball and stick* (les atomes d'hydrogène des résidus acides aminés ont été omis pour plus de clarté, à l'exception du groupe ammonium de la lysine 48), la protéine en MM est représenté en modèle *New Cartoon* et les molécules de solvants MM sont omises. (a) (\mathbf{A}_W), (b) (\mathbf{B}_W), (c) (\mathbf{C}_W), (d) (\mathbf{D}_W), (e) (\mathbf{E}_W).

un produit clairement défini pour la CV utilisée (distance $\text{O}_{\text{eau}}-\text{H}_{\text{eau}}$ et donne une surface dispersée autour (\mathbf{E}_W). En dépit de tout cela, l'estimation de la barrière est encore valable car le transfert de protons subséquent ne l'influence pas.

Nous rapportons les géométries figure 3.10. La voie du «une H_2O pontante» montre une différence d'énergie libre plus importante de 4 kcal mol^{-1} par rapport à l'étape limitante de la voie «directe».

La protonation est la première étape pour la voie «une H_2O pontante». L'hydroperoxyde est toujours lié au fer et se protone par la molécule d'eau ((\mathbf{B}_W)) qui, à son tour, se protone très rapidement par la lysine ((\mathbf{C}_W), 2-5 fs). Aucun minimum n'a été trouvé pour

un intermédiaire ($\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO}^- + \text{NH}_3^+\text{-Lys}^{48}$). Dans cette conformation, le bras de lysine est plus mobile car il n'est pas dépendant d'une CV. Il peut passer de 6.8 Å à 7.3 Å du fer, alors que, la molécule d'eau impliquée dans la protonation pour laquelle la distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$ est limitée par le mur sur cette CV à 3 Å. La liaison fer-soufre suit la même tendance que pour la voie directe : dès que H_2O_2 est formé, (\mathbf{E}_W), et est dissocié, la liaison Fe-S est renforcée.

3.3.2.3 Analyse des chemins réactionnels suivis

Comme décrit ci-dessus, pour la protonation de l'intermédiaire de $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, deux voies différentes ont été identifiées. I) Le mécanisme «directe» impliquant d'abord la dissociation du ligand OOH^- du fer, suivie de la protonation de l'oxygène proximal. II) Le mécanisme du «une H_2O pontante», avec la protonation de l'oxygène proximal en premier, suivie de la dissociation du H_2O_2 du fer. Nous supposons que la voie «deux H_2O pontantes» suivra le même processus que le «une H_2O pontante». Dans les deux cas, la première étape du chemin est toujours celle limitante, soit le processus de dissociation («directe») ou de la protonation («une H_2O pontante»).

Le processus «directe» a une barrière d'activation d'énergie libre de 7 kcal mol⁻¹ inférieure de 4 kcal mol⁻¹ par rapport à l'étape «une H_2O pontante» (11 kcal mol⁻¹). Malgré le fait que la conformation «directe» soit moins probable que celle des «une H_2O pontante» d'un facteur 100, *vida supra*, cette différence d'énergie de 4 kcal mol⁻¹ pourrait être suffisante pour que la voie directe soit la plus favorisée. Ainsi, en utilisant l'équation d'Eyring-Polanyi et en supposant $\Delta F^\ddagger \approx \Delta G^\ddagger + C$ (avec $C = -PV$ qui correspond au travail d'expansion et s'annule entre les deux mécanismes), nous pouvons estimer des constantes de vitesse de $5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ pour le mécanisme «directe» et une constante de vitesse de $6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour le mécanisme «une H_2O pontante». Ces données soutiennent fermement le fait que le mécanisme «directe» associé à la dissociation de OOH^- dans une première étape suivie de sa protonation est le processus prépondérant, si ce n'est, l'unique, qui se produit pendant

la réaction de catalyse de la SOR. Cette voie directe met en évidence un mécanisme de dissociation, jamais décrit, du ligand ^-OOH pour former un intermédiaire $Fe^{3+} + ^-OOH$, se produisant sans être directement associé à la protonation de l'oxygène proximal [28].

Cette réactivité, impliquant une première étape de dissociation du substrat ^-OOH du fer était inattendue puisque des études antérieures utilisant de petits modèles quantiques (sans Lys⁴⁸) pour décrire le même processus présentaient un coût énergétique de 17 kcal mol⁻¹ [152]. Pour expliquer si cette différence de réactivité pourrait être due à la présence de la lysine à la proximité de l'espèce fer-hydroperoxo, nous avons effectué plusieurs calculs en utilisant différents modèles et niveaux de théorie. En particulier, nous avons utilisé les charges de Mulliken, directement issues des calculs QM et QM/MM pour fournir une image qualitative des effets de l'environnement sur la structure électronique des systèmes. Au cours des 2 dernières ps de la dynamique QM/MM, l'analyse de charge montre une différence de charge significative sur l'oxygène proximal de l'intermédiaire $Fe^{3+}-OOH$: $0.48 \pm 0.08 e$ pour le système «une H₂O pontante» et $0.28 \pm 0.06 e$ pour le «directe». D'autre part, l'oxygène distal présente une différence moins marquée entre les deux systèmes : $0.53 \pm 0.05 e$ pour «une H₂O pontante» et $0.45 \pm 0.05 e$ pour le processus «directe». En d'autres termes, le système «directe» montre une nette différence de charge entre les oxygènes distal et proximal, alors que les charges des deux oxygènes du «une H₂O pontante» sont plus similaires. Il convient de noter que les charges sur l'atome de fer sont cohérentes avec la charge de l'oxygène proximal de le ligand hydroperoxyde. L'atome de fer est plus négatif de $0.50 e$ dans le système «directe» par rapport au système «une H₂O pontante». Afin de comprendre si cette différence s'explique par la proximité étroite de la lysine avec l'hydroperoxyde dans le système «directe» (moins de 3 Å), nous avons procédé à des calculs statiques au niveau QM et QM/MM sur des petits modèles. Les modèles se composaient de l'atome de fer, de la cystéine, des quatre histidines et du ligand hydroperoxyde (appelé AS pour Active Site) au niveau B3LYP en utilisant la même répartition des bases que pour les simulations QM/MM sur les atomes respectifs.

	AS	AS avec lysine	AS avec eau explicite	AS avec eau explicite et lysine	Système QM/MM
q_{Op} (e)	-0.48/ <i>-0.48</i>	-0.40/ <i>-0.41</i>	-0.40/ <i>-0.41</i>	-0.28/ <i>-0.29</i>	-0.24 (-0.28)
q_{Od} (e)	-0.37/ <i>-0.37</i>	-0.40/ <i>-0.41</i>	-0.40/ <i>-0.41</i>	-0.45/ <i>-0.47</i>	-0.44 (-0.45)

Tableau 3.8 – Valeurs des charges de Mulliken pour les 2 atomes d’oxygène de l’intermédiaire $Fe^{3+}-OOH$ pour le chemin «directe» pour différents modèles en phase gaz. Les valeurs ont été extraites du logiciel CP2K. En italique, les valeurs ont été calculées avec le logiciel Gaussian09. Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs moyennes.

Ensuite, nous avons ajouté à ce modèle les molécules d’eau explicites QM et / ou la lysine également au niveau QM. Les géométries ont été extraites de différents points de la dynamique QM/MM «directe» et des calculs *single point* ont été effectués avec les programmes CP2K et Gaussian09.

Nous avons observé que les charges de Mulliken sur ce petit modèle sans environnement, même si elles proviennent des simulations QM/MM «directe», sont plus proches des charges observées pour le mécanisme «une H_2O pontante» (*vide supra*), c’est-à-dire que l’oxygène proximal est plus négatif que le distal (AS, tableau 3.8). L’addition de la lysine, qui est un fragment de charge positive à proximité du site actif, ne permet pas de renverser la population de charges (AS avec la lysine, tableau 3.8). L’addition des molécules d’eau solvant de QM seulement conduit au même résultat que l’addition de la lysine, à savoir une répartition équilibrée des charges entre les deux oxygènes (AS avec eau explicite, 3.8). Fait intéressant, la présence de la lysine et du solvant a donné des résultats proches du niveau QM/MM complet (AS avec l’eau explicite et la lysine, tableau 3.8). Cela tend à indiquer un rôle coopératif local entre les molécules d’eau et la lysine. Les charges ne sont pas très touchées par la majeure partie du solvant ou par la protéine, mais principalement par la proximité de la charge de la lysine (NH_3^+) et du réseau de liaison hydrogène impliquant les molécules d’eau, la lysine et le soluté.

En dépit d’un environnement local (micro-solvatation, résidus voisins), l’effet de polarisation décrit ci-dessus est une conséquence de l’ensemble de l’environnement et de sa

	AS	AS avec lysine	AS avec eau explicite	AS avec eau explicite et lysine
$q_{O_p} (e)$	-0.51	-0.39	-0.46	-0.26
$q_{O_d} (e)$	-0.38	-0.41	-0.46	-0.46

Tableau 3.9 – Valeurs des charges de Mulliken pour les 2 atomes d’oxygène de l’intermédiaire $Fe^{3+}-OOH$ pour le chemin «directe» pour différents modèles avec solvation implicite dans G09.

dynamique. Par conséquent, les petits modèles quantiques statiques peuvent difficilement le décrire correctement.

Afin de vérifier le rôle du solvant, nous avons aussi reconduit les calculs en incluant les effets de solvant à longue portée, *via* une description implicite (solvatation IEFPCM, eau telle que mise en œuvre dans Gaussian09). Les valeurs obtenues par ces calculs sont indiquées dans le tableau 3.9. Il y a peu d’effet sur la distribution de charge entre les deux oxygènes même lorsque la lysine est incluse dans le système. L’influence limitée de l’ajout d’un solvant implicite semble indiquer que seuls les effets couplés Lys+solvant à courte portée jouent un rôle sur la réactivité. Seul l’ajout de la lysine et des molécules d’eau explicites permet de retrouver l’inversion de la charge.

Au total, ces données mettent en évidence l’importance des liaisons hydrogène, et pas seulement d’un effet global lié à la constante diélectrique de l’eau, à savoir les effets de micro-solvatation et la façon dont il amplifie l’effet de la charge près du site actif dans la réactivité enzymatique. En outre, nos données soulignent clairement la limitation des modèles implicites pour décrire cet effet, qui souligne de nouveau le besoin d’un modèle complet pour obtenir une description correcte de la réactivité à la fois pour le mécanisme intrinsèque ainsi que pour les caractéristiques énergétiques.

Les mêmes types de calculs ont été effectués avec le système «une H_2O pontante» et les détails sont regroupés le tableau 3.10. Il est important de noter que dans le dernier cas, l’influence de la lysine est plus faible que pour l’interaction directe. La distribution de

	AS	AS avec lysine	AS avec eau explicite	AS avec eau pontante	AS avec eau pontante et lysine	AS avec eau explicite et lysine	Système QM/MM
$q_{Op} (e)$	-0.40	-0.47	-0.54	-0.55	-0.57	-0.58	-0.55
$q_{Od} (e)$	-0.40	-0.47	-0.54	-0.55	-0.57	-0.58	-0.55

Tableau 3.10 – Valeurs des charges de Mulliken pour les 2 atomes d’oxygène de l’intermédiaire $Fe^{3+}-OOH$ pour le chemin «une H_2O pontante» pour différents modèles en phase gaz. La mention ‘eau explicite’ comprend toutes les molécules d’eau. La mention ‘eau pontante’ ne comprend que la molécule d’eau pontante. Les valeurs ont été extraites du logiciel CP2K.

charge QM/MM des deux oxygènes est déjà plus proche de celle du modèle de site actif nu. Les charges sont assez équilibrées entre l’oxygène, moins de $0.10 e$ par rapport à la différence de $0.20 e$ dans le système «directe».

Étant donné que les charges de Mulliken sont sensibles à la méthode utilisée (en particulier les bases), des calculs complémentaires basés sur la partition *Atoms in Molecules* [153] (AIM) ont également été effectués pour évaluer l’influence de l’environnement sur la force de liaison Fe-O et Op-Od. Les calculs AIM ont été effectués avec la suite logiciel AIMALL 15.09.27 [154] et le programme Gaussian09. Nous avons gardé la même nomenclature utilisée pour l’analyse de la population de Mulliken et effectué quatre calculs : «directe» AS, «directe» AS avec eau explicite et lysine, système «une H_2O pontante» AS et système «une H_2O pontante» AS avec eau explicite et lysine. Les valeurs de la densité d’énergie électronique totale [155] (H) et l’indice de délocalisation [156,157] pour la liaison Fe-Op et

	H liaison Fe-Op	Indice de Délocalisation(Fe,Op)	H liaison Op-Od	Indice de Délocalisation(Op,Od)
AS	$-1.07 \cdot 10^{-2}$	0.52	$-1.74 \cdot 10^{-1}$	1.24
AS avec eau explicite et lysine	$-9.21 \cdot 10^{-3}$	0.47	$-1.76 \cdot 10^{-1}$	1.23

Tableau 3.11 – Valeurs de la densité énergétique électronique totale et de l’indice de délocalisation pour le système «directe» sans ou avec environnement. Valeurs extraites du logiciel AIMALL.

	H liaison Fe-Op	Indice de Délocalisation(Fe,Op)	H liaison Op-Od	Indice de Délocalisation(Op,Od)
AS	$-1.20 \cdot 10^{-2}$	0.52	$-1.78 \cdot 10^{-1}$	1.23
AS avec eau explicite et lysine	$-9.76 \cdot 10^{-3}$	0.59	$-1.79 \cdot 10^{-1}$	1.23

Tableau 3.12 – Valeurs de la densité énergétique électronique totale et de l'indice de délocalisation pour le système «une H₂O pontante» sans ou avec environnement. Valeurs extraites du logiciel AIMALL.

la liaison Op-Od se trouvent dans le tableau 3.11 pour le système «directe» et le tableau 3.12 pour le système «une H₂O pontante».

Pour la liaison Op-Od, il n'y a pas de différence notable entre les deux systèmes avec ou sans environnement pour les deux descripteurs. En ce qui concerne la force de liaison Fe-Op (en utilisant la densité d'énergie électronique totale, H), il existe des variations. Tout d'abord, entre le système «directe» et le système «une H₂O pontante», la liaison est plus faible dans le cas du système «directe» d'environ 10% (avec ou sans environnement) par rapport au système «une H₂O pontante». Deuxièmement, la liaison Fe-Op est également affaiblie par l'environnement d'environ 20% (pour le système «directe» et le système «une H₂O pontante»). L'indice de délocalisation fournit également des informations concernant le fait que l'environnement joue un rôle : les deux systèmes avec seulement le site actif (AS) possède un index de délocalisation pour la liaison Fe-Op de 0.52 tandis qu'avec l'environnement (AS avec eau explicite et lysine), le système «directe» prend une valeur de 0.47 et le système «une H₂O pontante», une valeur de 0.59. Il est important de noter que les distances Fe-Op sont respectivement les mêmes pour chaque système avec ou sans environnement.

Ces différences conduisent à deux conclusions : une prise en compte de l'environnement est nécessaire pour tenir compte d'une description correcte de la réactivité (car elle a un impact non négligeable sur la liaison Fe-Op). En outre, le système «directe» possède

une liaison Fe-Op affaiblie. Ces deux points correspondent aux conclusions trouvées avec l'analyse des charges de Mulliken.

Après avoir étudié la population de charge sur la géométrie de départ, nous nous sommes concentrés sur l'évolution de la charge le long du chemin réactionnel (métadynamique). Pour le système «directe», la charge de l'oxygène proximal passe de 0.28 e dans l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ (\mathbf{A}_D) à 0.45 e sous la forme dissociée ($\text{Fe}^{3+} + ^-\text{OOH}$) (\mathbf{B}_D). Après la protonation, les deux oxygènes acquièrent la même valeur de charge d'environ 0.38 e (\mathbf{C}_D)/(\mathbf{E}_D). Ce sont les mêmes valeurs que les deux oxygènes présents dans le peroxyde d'hydrogène seul (nous avons effectué les mêmes calculs pour H_2O_2 seul au même niveau de théorie). Pour le système «une H_2O pontante», la protonation se produit d'abord et au cours de cette première étape, la charge sur l'oxygène proximal qui est déjà proche de la valeur du peroxyde d'hydrogène évolue de 0.50 e (\mathbf{A}_W) à 0.40 e (\mathbf{C}_W). Ensuite, la dissociation de H_2O_2 (\mathbf{E}_W) modifie légèrement les charges vers 0.38 e comme pour le système «directe».

A partir de ces résultats, nous pouvons proposer que la dissociation se manifeste d'abord dans la conformation «directe» en raison de l'impact de la lysine à proximité et de la solvatation des molécules d'eau autour d'elle. Cela rend l'oxygène proximal moins chargé négativement lorsqu'il est lié au fer et moins susceptible de protonation directe et réduit la force de la liaison Fe-Op. L'équilibre est en outre déplacé vers la forme dissociée ($\text{Fe}^{3+} + ^-\text{OOH}$) avec l'ion ^-OOH stabilisé par la lysine proche (et son groupe NH_3^+). Lors de la dissociation, l'oxygène proximal rétablit un excès de charge négatif, ce qui déclenche facilement le transfert de protons subséquent sur l'oxygène proximal (moins de 4 kcal mol⁻¹) donnant le produit de réaction H_2O_2 .

A contrario, la conformation «une H_2O pontante» avec la lysine espacée d'une molécule d'eau a un impact beaucoup plus faible sur la charge de l'oxygène proximal (et la force de liaison Fe-Op) et l'équilibre n'est pas déplacé vers la forme dissociée $\text{Fe}^{3+} + ^-\text{OOH}$. La protonation se produit d'abord, ce qui favorise en retour la dissociation du produit de réaction H_2O_2 du fer.

Les valeurs d'énergie libres en association avec l'analyse des charges et des liaisons de l'oxygène proximal soulignent le rôle important de la lysine 48. En effet, la lysine 48 apparaît essentielle en tant que donneur de protons et a également un impact majeur sur les charges de l'oxygène proximal ainsi que la force de liaison Fe-Op. Associée à la micro solvatation de l'eau autour du site actif, elle favorise le mécanisme dans lequel se produit la dissociation du ligand hydroperoxo de l'atome de fer, suivie de sa protonation amenant la formation du produit de réaction H_2O_2 . De plus, sans être liée directement par liaison hydrogène à l'espèce OOH^- , la lysine possède encore un rôle dans la protonation de l'oxygène proximal *via* une molécule d'eau en servant de relais de proton. Cela conduit au second mécanisme, avec une barrière plus élevée, avec la protonation comme première étape puis la dissociation de H_2O_2 . Dans ce cas de figure, l'eau pourrait également être donneur de protons, en cas d'absence de lysine (mutations), même si le coût énergétique serait sans doute plus élevé.

3.4 Étude de la réactivité non-native

Dans le cas de la réactivité native de la SOR, la formation du peroxyde d'hydrogène est produite après deux transferts de proton (voir schéma 2), par contre une réactivité non-native peut aussi avoir lieu et elle se rapproche de la réactivité de P450. Dans P450, après un premier transfert de proton et la formation de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, la seconde protonation a lieu sur à nouveau l'oxygène distal (et non sur l'oxygène proximal comme dans la réactivité native de la SOR) formant une espèce Fe=O et une molécule d'eau. La première espèce étant commune à la SOR et à P450, nous partirons, comme dans l'étude de la réactivité native de la SOR, de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. L'étude de cette réactivité non-native a été réalisée afin de comprendre la nature de l'espèce Fe=O formée, le mécanisme et permettra de comparer la forme sauvage de la SOR avec les mutations présentées dans le chapitre 4 afin de comprendre les "facteurs déclenchant" dans le cas des mutations. Les

barrières trouvées permettront de valider la robustesse de la méthodologie utilisée pour la réactivité native en démontrant bien que cette réactivité est extrêmement défavorable par rapport à la formation de H_2O_2 pour la forme sauvage de la SOR.

Pour ce faire nous avons sélectionné de nouvelles variables collectives pour décrire la réaction :

- Remplacer la distance Fe-Op par la distance Op-Od et conserver la distance $N_{lys}-H_{lys}/O_{eau}-H_{eau}$ pour favoriser la rupture de la liaison Op-Od au lieu de la rupture Fe-Op
- Forcer la protonation sur Od en utilisant la variable $H_{eau/lys}-Od$ et la rupture Op-Od avec la variable Op-Od.
- Utiliser uniquement la variable Op-Od dans le cas où il n'y aurait pas de seconde protonation

Les métadynamiques ainsi produites seront analysées dans cette partie et également, nous étudierons l'influence de la conformation de départ : la conformation «directe» et la conformation «une H_2O pontante» comme dans le cas de la réactivité native.

3.4.1 Couple de variables collectives

Pour étudier la rupture de la liaison Op-Od et décrire les espèces formées, nous avons remplacé la distance Fe-Op (utilisée pour l'étude de la réactivité native) par la distance Op-Od comme variable collective en conservant la variable $N_{lys}-H_{lys}/O_{eau}-H_{eau}$ représentant une "libération de proton" dans l'optique d'avoir, comme pour P450, une protonation sur l'oxygène distal. Les autres paramètres de la *Well-Tempered* métadynamiques sont conservés (ΔT , W , τ_G et σ) pour garder une homogénéité dans l'étude : la réactivité non-native étant *a priori* plus difficile, ces paramètres rendrons juste l'exploration du sous-espace ainsi que la convergence plus longue (valable pour les paramètres : $\omega = W/\tau_G$ et ΔT). Le

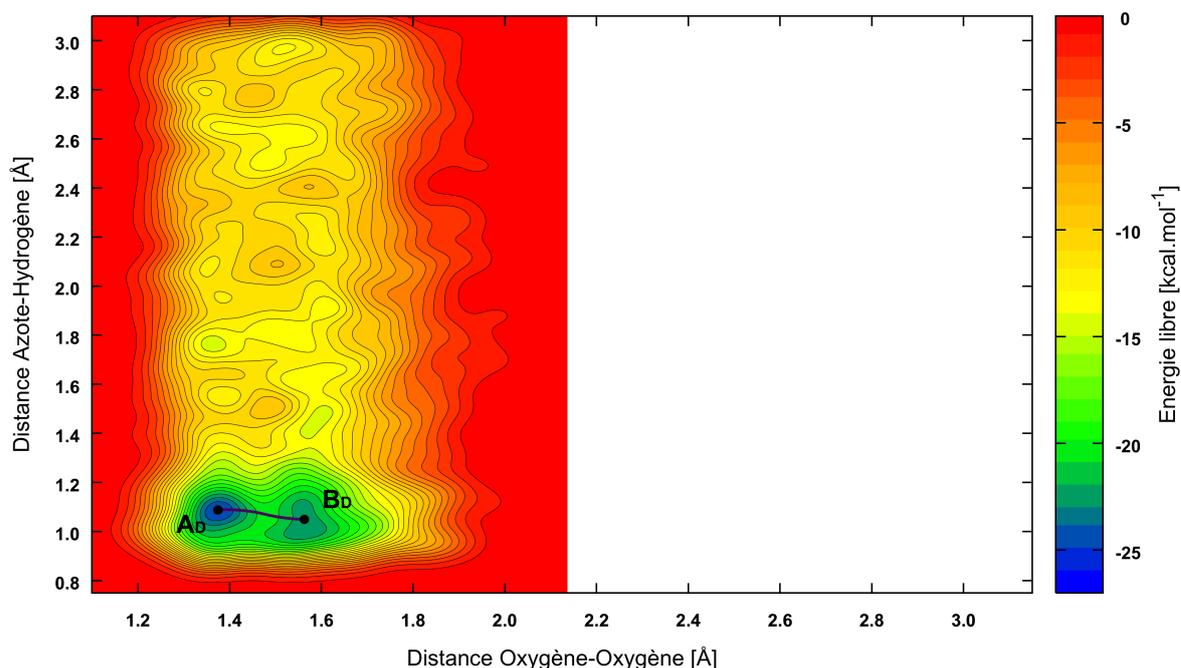


Figure 3.11 – Surface d'énergie libre pour la réactivité non-native avec la conformation «directe» en fonction des CV sélectionnées (distance Op-Od et distance $N_{lys}-H_{lys}$). Le chemin de réaction présentant la barrière d'activation la plus faible est représenté sous la forme d'une ligne noire continue. Un chemin alternatif est montré en ligne pointillée.

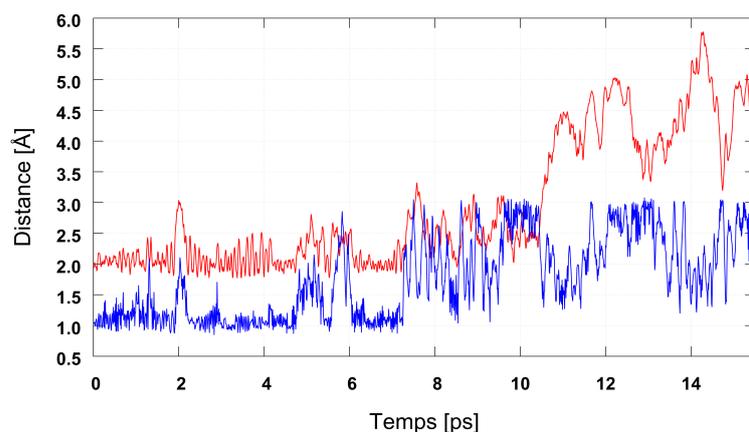
paramètre σ pour la variable collective représentant la distance Op-Od quant à lui reste identique à celui utilisé pour la CV Fe-Op utilisée précédemment : la fluctuation moyenne non-biaisée de la distance de liaison Od-Od est du même ordre de grandeur que la fluctuation de la distance de liaison Fe-Op. Comme précédemment, nous allons considérer la lysine 48 comme source de proton, et reprendre les deux conformations de départ car nous avons décrit que la conformation de départ a une importance sur le chemin réactionnel mais également sur les barrières des étapes limitantes.

Dans le cas de la conformation «directe» de l'intermédiaire de $Fe^{3+}-OOH$, nous détaillons la surface d'énergie libre correspondante (FES) reconstruite à partir de la métadynamique *Well-Tempered* (*WTMetaD*), illustrée à la figure 3.11. La métadynamique a été commencée à partir de la fin de la dynamique QM/MM (après 5 ps, la position et les vitesses ont été conservées, le point de départ est le même que celui utilisé pour la conformation «directe» dans le cadre de l'étude de la réactivité native). Elle a été arrêtée après 15.5 ps,

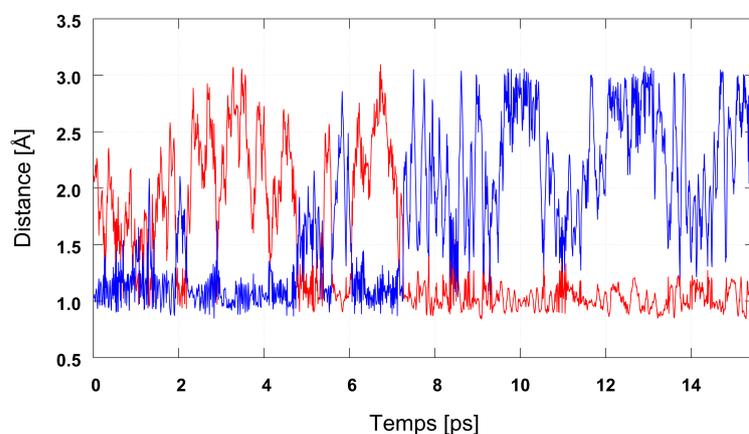
ce qui correspond à un ajout de 1500 Gaussiennes.

A l'issue de cette simulation, nous n'avons constaté aucune rupture de la liaison Op-Od. Néanmoins, nous pouvons donner une estimation de la barrière de l'ordre de 27 kcal mol⁻¹, bien au delà de la valeur de la barrière pour la réactivité native. Le premier minimum (**A_D**) possède une longueur de liaison Op-Od égale à 1.37 Å, correspondant à la valeur de la distance Op-Od dans la dynamique QM/MM sans biais. Ce minimum peut évoluer avec une barrière de 5 kcal mol⁻¹ vers l'intermédiaire (**B_D**), avec une liaison Op-Od plus longue à 1.59 Å, et une énergie libre plus élevée de 2.5 kcal mol⁻¹. Aussi une protonation a lieu avec une barrière minimum d'environ 11 kcal mol⁻¹ sans rupture de la liaison Op-Od, ce qui sous entend que ce n'est pas la protonation de l'oxygène distal qui est la première étape de la réactivité non-native! Pour analyser l'espèce protonée, d'autres variables sont représentées dans le graphique 3.12. En reportant ces variables en même temps que la variable collective N_{lys}-H_{lys}, la réactivité native est mise en évidence. Il y a protonation sur l'oxygène proximal (3.12b) et non sur l'oxygène distal (3.12c) avec la dissociation de la liaison Fe-Op (3.12a). En favorisant la formation d'un proton (*via* la variable collective N_{lys}-H_{lys}), la réactivité native est privilégiée. Le suivi de la réaction s'en trouve donc biaisé avec la variable collective non-suivie, problématique dite de *hidden variable* représentant la dissociation : la liaison Fe-Op. Cette variable évolue irréversiblement et ne permet pas une exploration convergée en un nombre de pas acceptable de la surface. Pour le système «directe», il n'a pas été possible dans ces conditions de métadynamiques d'explorer la réactivité non-native, néanmoins, deux conclusions peuvent être postulées. La réactivité native étant très favorable, l'ajout d'un proton libre (*via* la variable collective N_{lys}-H_{lys}) permet la formation de H₂O₂ à k_BT et la protonation de l'oxygène proximal, avec le groupe NH₂ de la lysine comme base conjuguée, entraîne irréversiblement la dissociation de H₂O₂.

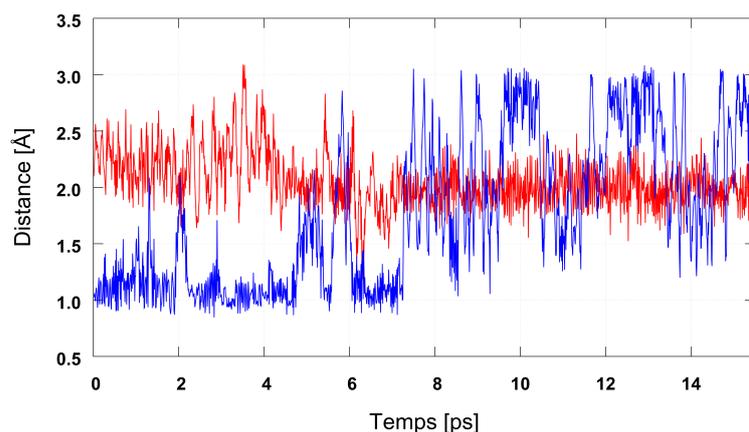
Également pour la conformation «une H₂O pontante», nous détaillons la surface d'énergie libre correspondante (FES) reconstruite à partir de la métadynamique *Well-Tempered*, illustrée à la figure 3.13. La métadynamique a été commencée à partir de la fin de la



(a) Distances $N_{lys}-H_{lys}$ (bleu) et Fe-Op (rouge) en fonction du temps.



(b) Distances $N_{lys}-H_{lys}$ (bleu) et Op- H_{lys} (rouge) en fonction du temps.



(c) Distances $N_{lys}-H_{lys}$ (bleu) et Od- H_{lys} (rouge) en fonction du temps.

Figure 3.12 – Distances clés dans la métadynamique de la conformation «directe» pour l'exploration de la réactivité non-native. En bleu est représenté la variable collective suivie $N_{lys}-H_{lys}$. En rouge, trois variables non-suivies par métadynamiques (Fe-Op (a), Op- H_{lys} (b) et Od- H_{lys} (c)).

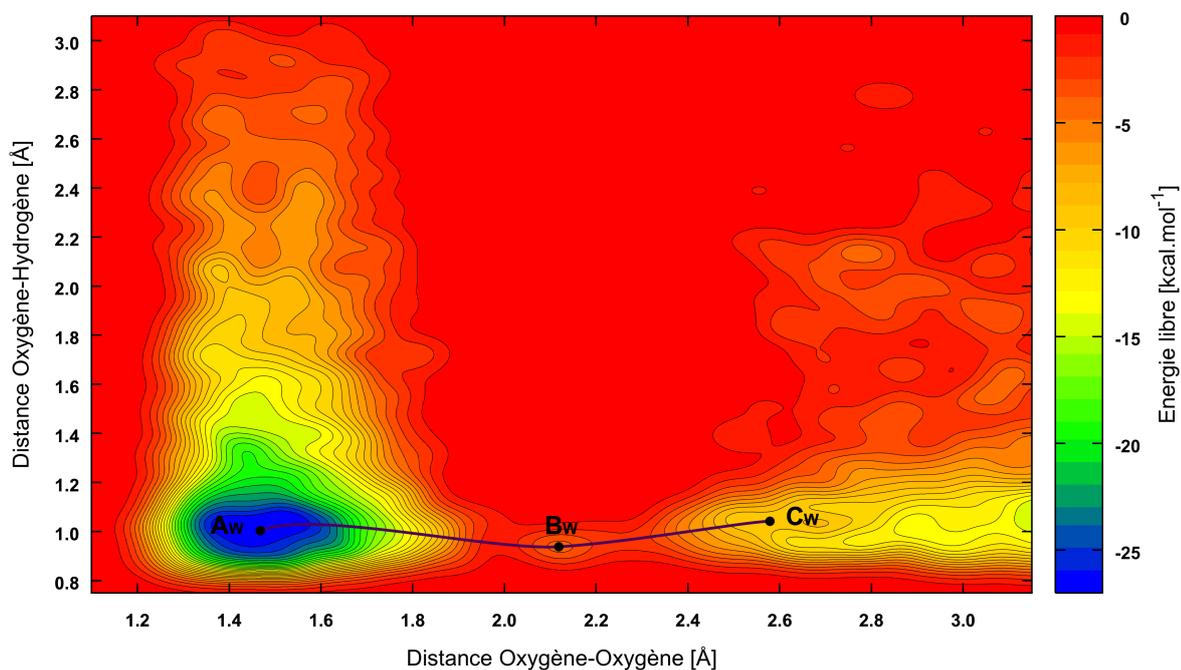


Figure 3.13 – Surface d'énergie libre pour la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ avec la conformation «une H_2O pontante» en fonction des CV sélectionnées (Distances Op-Od et distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$). Le chemin de réaction présentant la barrière d'activation la plus faible est représenté sous la forme d'une ligne noire continue. Un chemin alternatif est montré en ligne pointillée.

dynamique QM/MM (après 5 ps, la position et les vitesses ont été conservées, le point de départ est la même que celui utilisé pour la conformation «une H_2O pontante» dans le cadre de l'étude de la réactivité native). Elle a été arrêtée après 18.5 ps (correspondant à un ajout de 1850 gaussiennes).

Dans le cas de la conformation «une H_2O pontante», la surface d'énergie libre représentée à la figure 3.13 est similaire pour une distance Op-Od inférieure à 2.0 Å. Il y a protonation de l'oxygène proximal, mais la base conjuguée étant HO^- , le proton est de nouveau capté avant que le groupement NH_3^+ ne transfère un proton pour former H_2O_2 , et ne biaisant pas la distance Fe-Op, la dissociation de l'espèce H_2O_2 n'est pas favorisée outre mesure. En revanche, en partant du point (**A_w**) présentant une distance Op-Od de 1.49 Å, la rupture de la liaison à lieu avec une barrière de 25 kcal mol⁻¹, le système évoluant vers l'espèce (**B_w**) présentant une distance Op-Od de 2.12 Å pour former une espèce Fe=O. Le

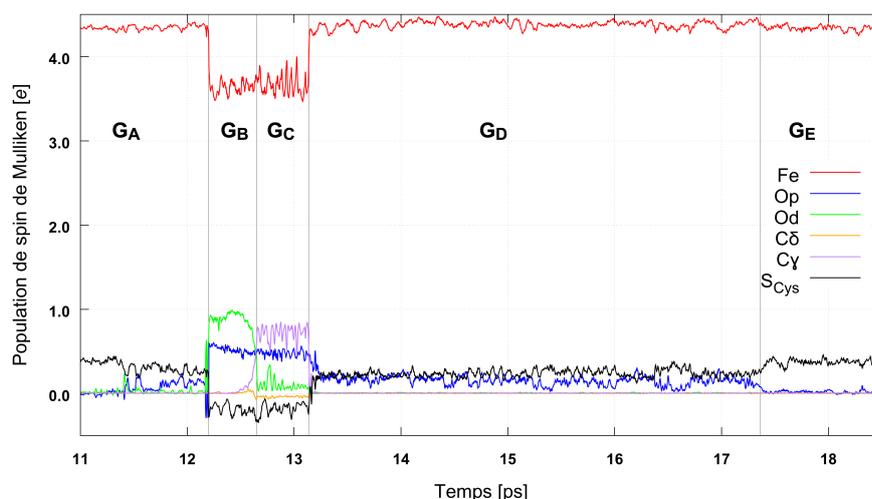


Figure 3.14 – Suivis des densités de Mulliken pour les atomes de Fer (rouge), de l'atome Op (bleu), de l'atome Od (vert), des carbones C_δ (jaune) et C_γ (violet) de His⁶⁹ et de l'atome de soufre (noir) de Cys¹¹⁶ au cours de la métadynamique.

Le système évolue irréversiblement avec une barrière de 2 kcal mol⁻¹ vers le bassin présentant une distance Op-Od supérieure à 2.4 Å : les variables choisies ne permettent plus alors de décrire correctement l'évolution du système qui évolue donc irréversiblement. Pour connaître le type de rupture (homolytique ou hétérolytique) et ainsi le degré d'oxydation de l'espèce fer-oxo, le suivi de la réaction *via* la densité de spin (de Mulliken) a été réalisé. La figure 3.14 représente les diverses densités pour les atomes choisis à partir de 11 ps (peu de temps avant que la rupture de la liaison Op-Od ait lieu) jusqu'à la fin de la métadynamique (soit 18.5 ps). En suivant les populations atomiques de spin, nous pouvons décrire cinq états différents du système : (\mathbf{G}_a), (\mathbf{G}_b), (\mathbf{G}_c), (\mathbf{G}_d), et (\mathbf{G}_e). Ces états sont représentés dans la figure 3.15 avec une proposition de mécanisme. Le premier état (\mathbf{G}_a) décrit le système de départ (\mathbf{A}_W) caractérisé notamment par la présence d'un $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, d'une molécule H_2O pontante, de la lysine 48 NH_3^+ et de l'histidine 69. Lorsque la rupture a lieu, le système passe dans l'état (\mathbf{G}_b) : la rupture homolytique provoque le changement d'état Fe^{3+} à l'état Fe^{4+} . La variation de 4.3 à 3.7 e pour l'atome de fer, de 0.1 à 0.5 e pour l'atome d'oxygène Op et de 0.3 à -0.2 e pour l'atome de soufre de la cystéine, ce qui atteste de l'existence d'une espèce formellement $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$. La variation de 0.1 e à 0.9 e pour l'atome d'oxygène distal Od implique quant à elle la formation

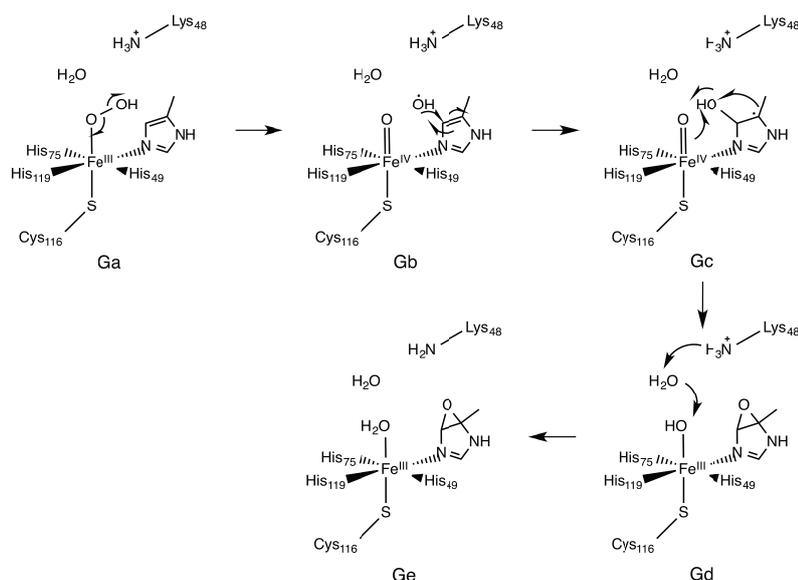


Figure 3.15 – Réactivité de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ avec la conformation «une H_2O pontante» lors de la rupture de la liaison Op-Od .

logiquement d'un radical HO^\bullet . Ensuite ce radical va s'ajouter sur le carbone *delta* de l'histidine 69 donnant l'état (**G_c**) avec un radical imidazol-4-ol (**G_c**). Le $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ va réagir sur ce radical (**G_c**) résultant en la formation d'un $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ et d'une espèce imidazole avec un epoxide (**G_d**). L'état (**G_d**) n'est caractérisé par aucun radical : l'ion Fe^{3+} récupère une charge de 4.4 *e*. Seuls les atomes directement liés au fer présentent un léger caractère radicalaire (Op et S_{Cys}) : 0.2 *e* chacun. Ensuite, il y a un transfert de proton de la lysine NH_3^+ à l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ pour arriver à l'état (**G_e**). L'espèce ferrique devient Fe^{3+} avec une molécule d' H_2O en coordination libre. Également le passage de 0.2 à 0.3 *e* pour le soufre laisse supposer une interaction renforcée entre le fer et le soufre.

L'analyse des géométries, confirme l'analyse et les conclusions faites sur la base des densités de spin de Mulliken. Notamment la distance de la liaison fer-oxygène de l'état (**G_b**) présentant un $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ est de 1.66 Å et celle de la liaison fer-soufre est de 2.47 Å.

3.4.2 Simulations en suivant une seule variable collective

Bien que le transfert de proton soit favorisé (*via* la variable $N_{\text{lys}}\text{-}H_{\text{lys}}$ ou $O_{\text{eau}}\text{-}H_{\text{eau}}$), il n'y a pas de protonation de l'oxygène distal lors de la rupture de la liaison entre l'oxygène proximal et l'oxygène distal. Il donc été entrepris de faire des métadynamiques en retirant la variable collective représentant un transfert pour éviter de surestimer la barrière de dissociation en forçant le système à aller dans un état métastable. Néanmoins, si cette variable n'a effectivement aucun impact dans la réactivité de dissociation de la liaison Op-Od alors la barrière devrait être similaire, la reconstruction de la surface d'énergie libre de réaction devrait être plus rapide (ainsi que la convergence). Également, du fait de la réactivité des deux espèces formées lors de la rupture homolytique $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ et OH^{\bullet} , il est nécessaire de limiter l'amplitude de la variable collective Op-Od avec un mur quadratique avec une distance maximum passant de 3.5 Å à 2.5 Å soit juste après l'état de transition. La modification de ces deux paramètres (une CV et une amplitude plus faible) va ainsi permettre de faire converger la métadynamique pour affiner la barrière d'énergie libre de la rupture de liaison Op-Od, tout en évitant le chemin de la réactivité native permettant ainsi de pouvoir comparer les systèmes «directe» et «une H₂O pontante».

En outre, du fait de la complexité du système et du fait que nous recherchons seulement la barrière de dissociation, nous avons choisi d'arrêter la métadynamique après un aller retour, évitant d'autre *slow hidden variable* représentant différentes conformations et pouvant avoir un impact sur la barrière (une surestimation de 3-4 kcal mol⁻¹ par exemple), même si, sur un temps infini de simulation la barrière converge. Les paramètres de métadynamiques sont les mêmes que ceux utilisés précédemment : ΔT de 6000 K, W à 1 kcal mol⁻¹, σ à 0.05 Å, τ_G à 20. Seule la distance Op-Od sera utilisée comme variable collective en limitation l'exploration de cette variable *via* un mur inférieur quadratique de constante K à 500 kcal mol⁻¹ placé à 2.5 Å.

Dans le cas du système «directe», avec une seule variable et sans la compétition avec la

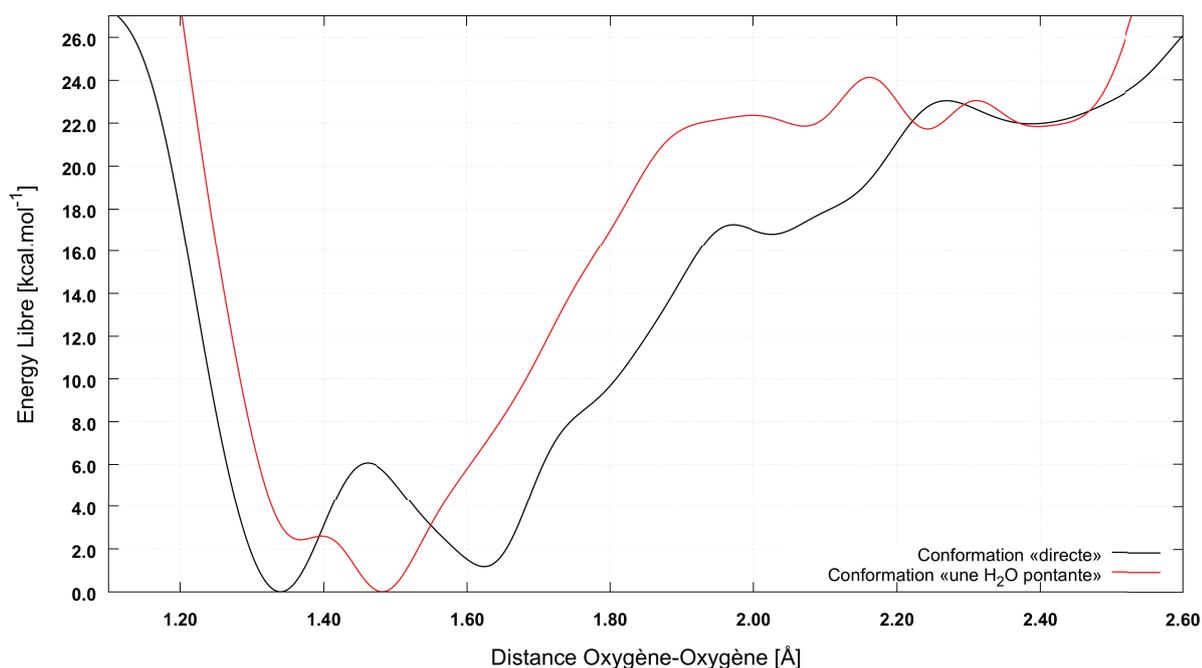
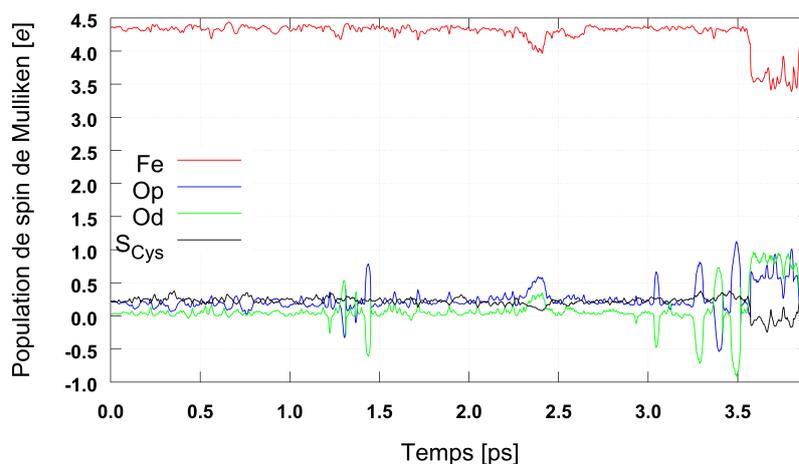


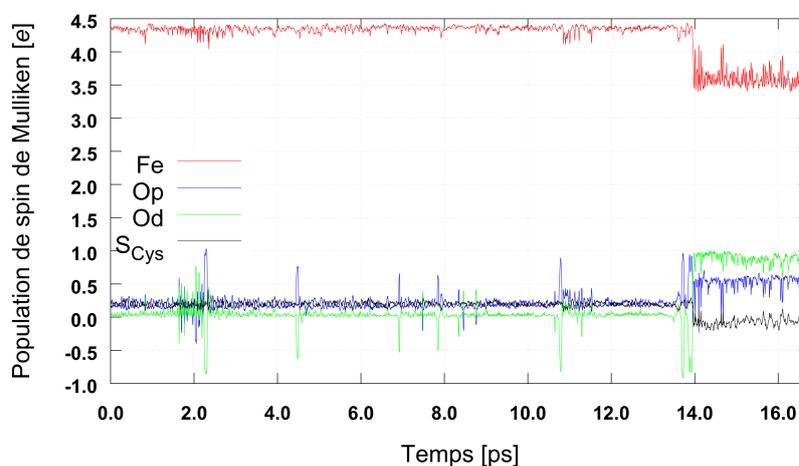
Figure 3.16 – Énergie libre en fonction de la distance de liaison Op-Od lors des métadynamiques avec une seule variable collective (distance Op-Od) pour les deux conformations d'intérêt.

réactivité native (formation de H_2O_2), la dissociation de la liaison Op-Od se produit après un temps de simulation de 3.9 ps. Pour la conformation «une H_2O pontante», la rupture a nécessité une exploration plus longue, 16.75 ps, bien que les barrières soient similaires. Aussi pour la conformation «une H_2O pontante», l'espace ou la distance Op-Od a une longueur supérieure à 2.2 Å a été explorée plus longtemps.

Dans la figure 3.16, nous reportons l'énergie libre en fonction de la longueur de la distance Op-Od. Dans le cas de la conformation «directe», pour le premier minimum, la distance de liaison Op-Od est égale à 1.34 Å. Une première barrière de 5 kcal mol⁻¹ (avec une distance Op-Od de 1.46 Å) permet de passer à une distance Op-Od égale à 1.62 Å. Ensuite, nous trouvons une barrière de dissociation de 22 kcal mol⁻¹ avec un "état de transition" possédant une distance Op-Od de 2.27 Å. Le système évolue ensuite vers une distance Op-Od supérieure à 2.35 Å. Dans le cas de la conformation «une H_2O pontante», la longueur de la distance Op-Od est plus longue et est égale 1.48 Å. Contrairement à la conformation «directe» il n'y a qu'un seul puits avant la dissociation. La barrière



(a) «directe»



(b) «une H₂O pontante»

Figure 3.17 – Suivis des densités de Mulliken pour les atomes de Fer (rouge), de l'atome Op (bleu), de l'atome Od (vert) et de l'atome de soufre (noir) de Cys¹¹⁶ au cours de la métadynamique pour les conformations «directe» (a) et «une H₂O pontante» (b).

située à 2.16 Å représentant la dissociation est de 24 kcal mol⁻¹. Ensuite comme pour la conformation de départ «directe», la liaison Op-Od va s'allonger vers des distances supérieures à 2.25 Å, correspondant à l'espèce dissociée.

Dans les deux cas considérés, conformations «directe» et «une H₂O pontante», les barrières sont similaires avec des valeurs de 22 kcal mol⁻¹ et 24 kcal mol⁻¹ respectivement. La différence entre les deux systèmes est la présence de deux puits dans la conformation directe (respectivement avec des distances Op-Od de 1.34 Å et 1.62 Å séparées par une barrière de 5 kcal mol⁻¹) tandis que dans l'autre conformation, il n'y a qu'un seul puits

à une distance Op-Od de 1.48 Å. Pour les puits de la conformation «directe», à une distance Op-Od de 1.34 Å et de 1.62 Å respectivement, il peut y avoir un impact de la lysine, comme dans le cas de la réactivité native : pour le système «directe», deux puits de départ ont été trouvés pour la valeur de la distance Fe-Op respective à 1.9 Å et 2.2 Å ((**A_D**) et (**A'_D**), cf. Figure 3.7).

Pour étudier le type d'espèces formées, nous allons analyser les densités de Mulliken et les distances caractéristiques en fonction du temps de la métadynamique pour les deux conformations. Dans le cas de la conformation «directe», il y a formation d'une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ et d'un radical HO^\bullet comme l'atteste les évolutions des populations de spin, reportées figure 3.17a. En séparant les deux bassins avec l'un où la distance Op-Od est inférieure à 2.27 Å, correspondant à la forme $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ et l'autre où elle est supérieure à 2.27 Å, correspondant à la forme $\text{Fe}^{4+}=\text{O} - \text{HO}^\bullet$, nous pouvons étudier des grandeurs caractéristiques moyennes. La densité de spin du fer passe de 4.29 à 3.68 e , celle de l'oxygène proximal de 0.23 à 0.70 e , celle de l'oxygène distal de 0.07 à 0.60 e et celle du soufre de la cystéine 116 de 0.22 à -0.03 e . En parallèle, en moyenne, la distance Fe-Op passe de 2.03 à 1.75 Å et la distance Fe-S passe de 2.47 à 2.37 Å quand la distance Op-Od passe de 1.57 à 2.42 Å. Dans le cas de la conformation «une H_2O pontante» (figure 3.17b), nous avons le même résultat. Cette fois la séparation des deux bassins se fait avec une distance limite Op-Od égale à 2.16 Å. Les densités de spin du Fer, de l'oxygène proximal, de l'oxygène distal et soufre passent respectivement de 4.31 à 3.62 e , de 0.22 à 0.59 e , de 0.08 à 0.79 e et de 0.18 à -0.07 e . Pour les distances, la distance fer-oxygène proximal se raccourcit de 1.96 à 1.69 Å, comme la liaison fer-soufre qui passe de 2.46 à 2.43 Å. La distance Op-Od s'allonge de 1.55 à 2.36 Å.

Ces résultats montrent que la rupture de la liaison Op-Od est très défavorable comparée à la formation de H_2O_2 . Nous avons une barrière plus élevée à 22-24 kcal mol⁻¹ contre une barrière de 7-11 kcal mol⁻¹ pour la réactivité native. La rupture est homolytique donnant lieu à une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ et un radical HO^\bullet . Ce radical est très réactif ainsi que

l'espèce fer=oxo formée, les radicaux évoluent librement pour former des espèces non radicales moins réactives. Notamment l'espèce fer-oxo retourne très rapidement à une espèce $\text{Fe}^{3+}-\text{OH}$, ce qui appuierait que cette espèce ne soit pas observée expérimentalement dans le cas de la forme sauvage de la SOR (en plus du fait que la barrière de sa formation soit extrêmement défavorable). Également, le radical HO^\bullet s'additionne très rapidement sur la protéine, limitant la possibilité de le capter expérimentalement avec un *spin trap* comme le DMPO. De plus, nous n'avons pas trouvé de protonation pour la réactivité non-native, du moins sur l'oxygène distal qui entrainerait la rupture de la liaison Op-Od.

3.5 Conclusions sur la forme sauvage de la SOR

L'espèce fer ferrique hydroperoxy ($\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$) est une intermédiaire clé dans le cycle catalytique de superoxyde réductase. Lors de la protonation de l'oxygène proximal, la liaison Fe-Op est clivée et le produit final H_2O_2 est libéré à partir du site actif. En dépit d'être une étape déterminante au cours du cycle catalytique, cette seconde protonation est un processus très peu documenté expérimentalement.

Une méthodologie complète de simulation a donc été conçue pour comprendre comment la protonation de l'oxygène proximal de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ est efficacement catalysée par la SOR et ainsi donnant sa spécificité en tant qu'enzyme détoxifiante et non une enzyme de type oxygénase (tel que P450, avec qui la SOR partage un $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ intermédiaire analogue et un soufre en *trans*).

Cette méthodologie se résume en une étude conformationnelle MM dynamique de l'hydroperoxyde de fer ($\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$), intermédiaire clé, suivie d'une étude *Well-Tempered* métadynamiques QM/MM du processus de protonation. Cette approche novatrice nous a permis de mettre en évidence deux mécanismes possibles de la formation du produit final H_2O_2 mais aussi de comprendre leurs spécificités. L'étude d'une réactivité non-native, mis en évidence expérimentalement dans certain mutants, nous a permis de caractériser les

espèces formées.

Pour la réactivité native, dans un premier mécanisme, l'espèce hydroperoxyde se dissocie du centre de fer avant sa protonation sur l'oxygène proximal. Ce mécanisme assez inattendu a une barrière limitante de seulement 7 kcal mol⁻¹ et implique une géométrie initiale avec une interaction directe entre le ligand hydroperoxo et la lysine 48. Pour le deuxième mécanisme, la structure de départ implique une molécule interstitielle d'eau entre la lysine et le ligand hydroperoxo *via* des liaisons hydrogène. Dans ce cas, la première étape est la protonation avec une barrière limitante de 11 kcal mol⁻¹ suivi de la dissociation, à partir du fer, du H₂O₂ formé.

Concernant l'étude de la réactivité non-native (correspondant dans ce travail à la rupture de la liaison entre l'oxygène proximal et l'oxygène distal), nous avons pu mettre en évidence la formation d'une espèce Fe⁴⁺=O *via* une rupture homolytique. Les barrières pour cette réactivité sont nettement plus élevées (22 ou 24 kcal mol⁻¹ en fonction de la conformation de départ), ce qui caractérise bien cette réactivité comme non native. L'analyse des produits formés a pu montrer leurs évolutions possibles.

Nous avons analysé le site actif avec des petits modèles pour étudier la configuration de spin du fer, qui expérimentalement est haut spin tout au long du cycle catalytique de la SOR. Nous avons testé diverses fonctionnelles pour reproduire de façon appropriée la configuration de spin ainsi que les distances clé autour du site actif. La fonctionnelle hybride B3LYP représente avec précision le haut spin du fer mais aussi les distances impliquant le fer-ligand et celles internes aux ligands de la première sphère de coordination.

Les paramètres MM développés (*via* des modèles QM en utilisant la fonctionnelle B3LYP) pour cette étude sont très cohérents et robustes pour de longues durées de simulation (100 ns) pour l'intermédiaire Fe³⁺-OOH mais également pour l'intermédiaire Fe²⁺-OO^{•-}. Ensuite la dynamique MM a permis d'échantillonner les conformations de l'enzyme, en particulier autour du site actif. Nous avons trouvé des conformations de micro-solvatation

spécifiques, conduisant à des interactions entre le ligand ($-OOH$ ou $OO^{\bullet-}$) et une source de proton, la lysine 48. En effet, les ligands sont en liaisons hydrogènes avec la lysine 48 de différentes manières : soit directement, soit avec la participation d'une ou deux molécules d'eau interstitielles. Les simulations MM de dynamiques ont donc montré la grande flexibilité de la chaîne latérale de Lys⁴⁸, qui soutient l'hypothèse de son rôle en tant que source/relais de protons au cours de la deuxième étape de protonation sur l'oxygène proximal dans le cycle catalytique de la SOR.

Au cours des simulations de métadynamique *Well-Tempered* QM/MM, la fonctionnelle hybride B3LYP a de nouveau été utilisée. À notre connaissance, aucune méthode similaire impliquant une dynamique/métadynamique QM/MM avec une fonctionnelle de la densité hybride pour décrire la partie QM n'a été utilisée sur de larges systèmes comme des métalloenzymes. La métadynamique *Well-Tempered* QM/MM permet d'aborder l'effet de l'environnement sur la structure électronique du site actif, en particulier les interactions avec la lysine 48 et les molécules d'eau, ce que des modèles QM trop succincts du site actif ne permettent pas de modéliser. Ce même environnement joue un rôle crucial dans la seconde étape de protonation, selon le type d'interaction entre la lysine et le substrat ^-OOH , deux mécanismes concurrents ont été trouvés. La barrière limitante la plus faible trouvée est celle partant de la conformation «directe» avec un mécanisme dissociation-protonation, mécanisme qui semble donc être le mécanisme préféré pour la seconde étape de protonation du cycle catalytique de la SOR. Le second mécanisme moins favorable (protonation suivi de la dissociation) a été trouvé lorsqu'une molécule d'eau est intercalée entre le substrat et la lysine 48 (ou par hypothèse, plusieurs molécules d'eau). En plus d'abaisser la barrière d'activation de l'étape limitante du mécanisme, les effets de l'environnement causés par le groupe ammonium chargé de la lysine 48 et la structure de la micro-solvatation impose le mécanisme préféré (dissociation en premier) qui ne pourrait pas être décrit avec un modèle ne prenant pas en compte l'environnement de façon explicite.

Également nous avons pu élucider la nature des espèces qui sont susceptibles de se former lors d'une réactivité non-native. En cas de rupture de la liaison Op-Od, une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ a été mise en évidence bien que sa formation, dans la forme sauvage de la SOR, implique une barrière élevée.

Des expériences de mutagenèse dirigée sur la SOR ont montré que, lors du remplacement de la lysine 48 par une isoleucine (mutant K48I), l'enzyme subi une altération de sa réactivité. Dans ce mutant, bien que lors de la réaction avec $\text{OO}^{\bullet-}$ la protonation du premier intermédiaire de réaction ne soit pas affectée par rapport au type sauvage, il n'y plus formation de H_2O_2 . Dans différentes conditions expérimentales, il été observée que l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ dans le mutant K48I, à pH élevé, conduit à la formation d'un fer à haut degré d'oxydation $\text{Fe}^{4+/5+}=\text{O}$ qui n'est pas observé dans le type natif de la SOR, montrant l'importance de la lysine 48 dans la réactivité de la SOR et de la nécessité de l'inclure dans les études théoriques. Également le mutant N117A, où l'arginine 117, placée derrière le soufre de la cystéine 116, a été remplacée par une alanine présentent une réactivité différente : expérimentalement une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ a été caractérisée par spectroscopie Raman ainsi qu'une altération de la liaison $\text{Fe}-\text{S}_{\text{Cys116}}$. Ces mutations ont attiré notre attention et elles permettent de régler finement les propriétés catalytiques de la SOR et de pouvoir transformer sa réactivité de type réductase en type oxygénase.

L'approche méthodologique développée dans ce chapitre nous a permis de clarifier certains aspects de la réactivité de la SOR, nous avons donc choisi de la mettre de nouveau en œuvre pour étudier des mutants de la SOR dans le chapitre suivant, permettant en particulier la comparaison entre la forme sauvage et les mutants, ainsi que l'étude des différentes réactivités (native H_2O_2 ou non-native $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) et la compréhension des différents facteurs ayant une incidence sur les processus réactifs.

Chapitre 4

Étude des mutants de la SOR

Nous avons, dans le chapitre 3, développé une méthode complète pour l'étude de la forme native de la SOR : analyse conformationnelle via des dynamiques MM, mise au point d'un champ de force pour le fer, étude de la réactivité native et non-native via des métadynamiques QM/MM et des études de structures électroniques via des modèles QM ou lors des simulations de (méta)dynamiques QM/MM. Dans ce chapitre, nous allons l'appliquer pour l'étude des mutations de la SOR et ainsi explorer plus en détail leur réactivités et confirmer et expliquer leurs éventuelles différences.

Il existe plusieurs mutations effectuées sur la SOR de *Desulfoarculus baarsii*. Le nom de la mutation est de la forme ABC, avec A la lettre de l'acide aminé remplacé, B son numéro dans la chaîne, et C l'acide aminé qui le remplace. Par exemple, nous avons E114A [7] qui remplace le glutamate (E) 114 par une alanine (A). Ces mutations ont été réalisées dans plusieurs optiques : stabiliser un intermédiaire réactionnel [24], comprendre l'importance de résidus en surface de la protéine à l'entrée du site actif [19], ou alors à l'arrière du site actif, en *trans* de la coordination libre du fer, dans la seconde sphère de coordination [23]. Ces mutations expérimentales ont permis d'observer des différences dans la réactivité du cycle catalytique de la SOR.

Dans le tableau 4.1 et en figure 4.1, nous répertorions les différentes mutations étudiées lors de cette thèse dont leur intérêt sera détaillé immédiatement après.

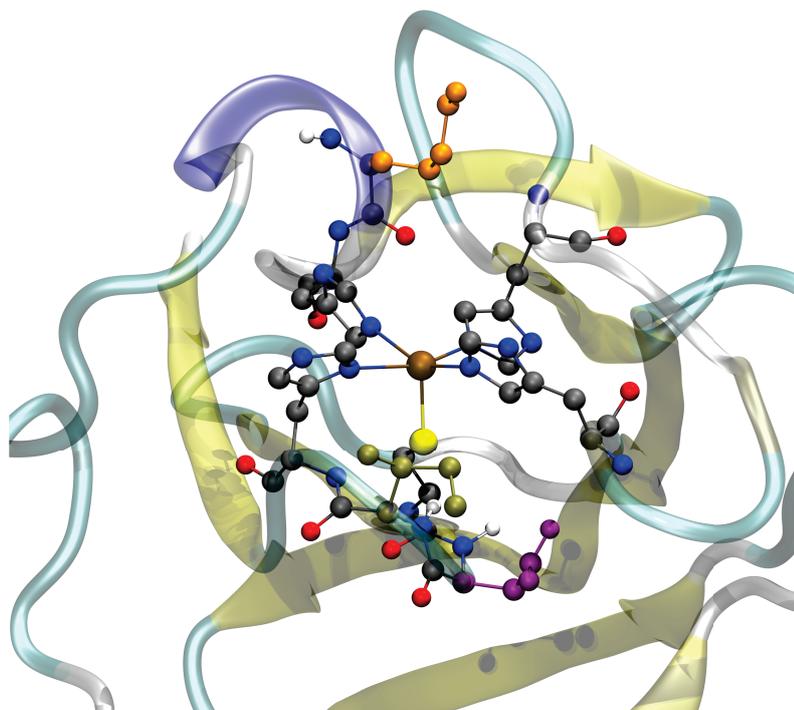


Figure 4.1 – Site actif de la SOR sous sa forme Fe^{2+} . En orange, en vert et en violet sont représentées respectivement la lysine 48, l’isoleucine 118 et l’asparagine 117. Les hydrogènes ont été omis pour plus de clarté.

Noms	Acides aminé mutés	Remplacement	Impact sur
I118S	Isoleucine 118	Sérine	Première et deuxième protonation
K48I	Lysine 48	Isoleucine	Deuxième protonation
N117A	Asparagine 117	Alanine	Deuxième protonation

Tableau 4.1 – Récapitulatif des mutations étudiées.

Concernant les mutations I118A, I118D et I118S impliquant une mutation de l’isoleucine en position 118, elles ont toutes montré une différence de vitesse de réactivité de la formation du deuxième intermédiaire du cycle catalytique de la SOR. Concernant la première étape, la formation de l’espèce $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ qui présente une constante de vitesse k_1 à partir de la forme Fe^{2+} lors d’un ajout de $\text{O}_2^{\bullet-}$, elle n’est pas affectée par les mutations (I118) :

les valeurs reportées sont de $1.2 \pm 0.2 \cdot 10^9$, $1.1 \pm 0.3 \cdot 10^9$, et $1.4 \pm 0.3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour les mutants I118A, I118D et I118S [23]. Ces valeurs sont proches de la valeur de $1.0 \pm 0.2 \cdot 10^9$ reportée pour la forme native de la SOR [7, 19]. De plus, cette première étape est indépendante du pH pour la forme native et pour les mutations [7, 19, 23]. Par contre, pour la deuxième étape, qui est la première protonation de l'espèce $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ donnant l'espèce $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$, il y a une variation de la vitesse de réaction k_2 en fonction du pH : à $\text{pH} > 8$, les mutants augmentent la vitesse de réaction d'un facteur 4. À $\text{pH} < 8$, il n'y a pas de changement de réactivité. Les auteurs ont proposé que les mutants de l'isoleucine 118 ont un impact sur le pKa de l'espèce $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ via un effet électronique *trans* par le renforcement de la liaison Fe-S_{Cys}. Cette liaison serait impactée par des liaisons hydrogène entre le soufre et le squelette de la protéine notamment via la partie amide des résidus histidine 119 et isoleucine 118. Une diminution de la force de la liaison hydrogène entre le groupe NH et le soufre renforce la liaison Fe-S_{Cys}. De même les auteurs, via des calculs QM sur des modèles, ont montrés l'impact de cette liaison hydrogène sur la liaison Fe-S_{Cys} et la liaison Fe-Op dans les espèces $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ et $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$.

Nous étudierons dans ce chapitre seulement le mutant I118S car c'est le mutant présentant les plus grandes différences de réactivité avec la forme sauvage. Ce mutant sera étudié via des dynamiques MM et des modèles QM extrait de ces dynamiques sur le deuxième intermédiaire du cycle catalytique pour comprendre en détail l'impact de la mutation de la seconde sphère de coordination sur le site actif.

La mutation K48I, où la lysine 48 a été remplacée par une isoleucine, a été réalisée dans le but de comprendre le rôle de la lysine 48 dans le cycle catalytique de la SOR [19]. Les auteurs de cet article ont montré l'importance du rôle de la lysine 48 dans le contrôle de l'évolution de l'espèce $\text{Fe}^{2+}-\text{OO}^{\bullet-}$ pour former H_2O_2 . Sans la présence de Lys⁴⁸ et en milieu non-acide, les auteurs ont montré qu'il n'y avait pas de formation de H_2O_2 et que l'espèce finale était une espèce Fe^{2+} . Pour déterminer la nature de l'espèce transitoire (ou des espèces) entre l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ et le Fe^{2+} , les auteurs ont montré la capacité

de K48I à oxyder une oléfine (2-cyclohexen-1-ol), adaptée à la caractérisation d'espèce fer-oxo. L'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ évoluerait donc par une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ en l'absence de la lysine 48. Ce mutant sera abordé dans ce chapitre pour essayer de comprendre l'impact de la lysine 48 sur la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ du cycle catalytique de la SOR et la formation d'une espèce fer-oxo.

Dans le cas du mutant N117A où l'asparagine 117 est mutée en alanine, aussi il a été observé expérimentalement, par résonance Raman, la formation d'une espèce $\text{Fe}=\text{O}$. Ce travail de Nivière *et al* n'ayant pas encore fait l'objet d'une publication, notre rôle dans cette thèse sera de confirmer la formation de l'espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ et de comprendre sa formation, qui reste inexploitée expérimentalement.

4.1 Les mutations de la SOR : étude conformationnelle

4.1.1 Le site actif et mutations

Dans cette première partie, nous allons étudier en dynamique MM les mutants décrits ci-dessus pour estimer l'impact des mutations sur la conformation du site actif. Les mutants étudiés sont donc les mutants I118S, N117A et K48I. Egalement, nous reportons juste pour cette partie, le mutant E114A où le résidu glutamate 114 est muté en alanine. Ce mutant a comme propriété de ralentir la seconde protonation pour former H_2O_2 . Il n'implique pas de différence de réactivité, cette mutation a eu comme conséquence l'isolation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ [24] et est reporté ici juste à titre de comparaison. Nous allons étudier la forme $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ car, dans la littérature, c'est à partir de cette espèce que le cycle catalytique diverge et qu'une différence de réactivité est observée : non formation de l'espèce H_2O_2 . Si dans certains mutants la vitesse de réaction change pour la formation du premier ($\text{Fe}^{2+}\text{-OO}^\bullet$) ou deuxième intermédiaire ($\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$), leur formation a néanmoins bien lieu. En soit, l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ est le "dernier déno-

minateur commun" entre la forme native et les mutants. Nous pouvons classer les mutants en deux catégories (voir Figure 4.1) :

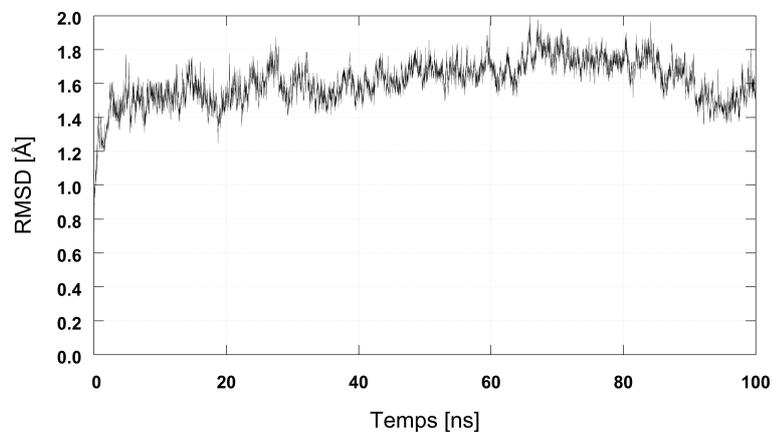
1. La mutation a lieu du côté de la sixième coordination du fer (là où se coordonne le $O_2^{\bullet-}$), c'est le cas de K48I.
2. La mutation a lieu du côté de la cystéine, en *trans*, du substrat, c'est le cas de E114A, N117A et I118S.

Premièrement, nous allons étudier le site actif des mutants et la seconde sphère de coordination du dit-site. L'étude conformationnelle va nous permettre de relever des différences notables entre la forme sauvage et les mutants sur ce second intermédiaire : notamment *via* l'étude du squelette peptidique proche de la cystéine 116.

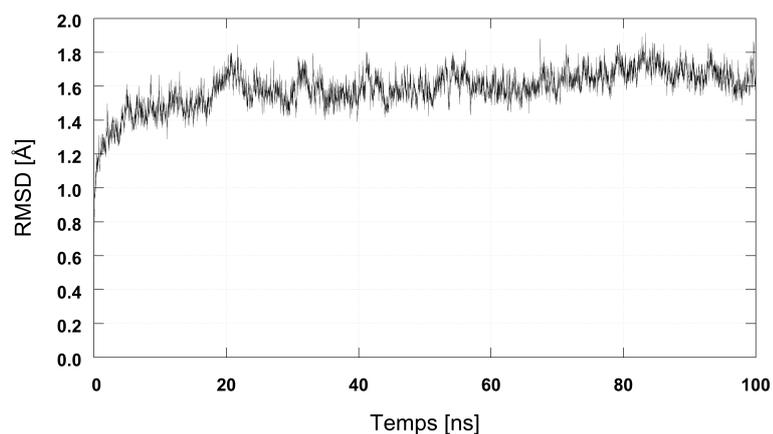
Ensuite, nous allons ré-employer l'analyse des liaisons hydrogènes avec le substrat effectuée sur forme native de la SOR, pour étudier l'impact des mutations sur la répartition entre les différentes formes d'interactions : «directe» (lysine 48 en interaction directe avec le substrat), «une H₂O pontante» (lysine espacée d'une molécule interstitielle), «deux H₂O pontantes» (lysine espacée de deux molécule d'eau), «sans lysine» (molécule d'eau seule) et «aucune liaison hydrogène» (sans interaction).

Le mode opératoire sera exactement le même que pour les dynamiques MM obtenues par nous-même pour la forme native. Les paramètres MM du site actif, développés dans le chapitre 3 par nous-même, seront utilisés ici car la première sphère de coordination est identique entre les mutants (Fe^{3+} , OOH^- , His⁴⁹, His⁶⁹, His⁷⁵, His¹¹⁹ et Cys¹¹⁶). La protéine mutée (chaîne A et B) sera insérée dans une boîte d'eau TIP3P à 8 Å et neutralisée par des ions Na^+ . Ensuite, elle sera fixée avec une constante de force K de 500 kcal mol⁻¹ Å⁻², et une minimisation des molécules d'eau et des contre ions sera effectuée pour limiter les contacts proches. La contrainte sera ensuite enlevée pour une minimisation complète du système. Une dynamique de chauffage à 300 K dans l'ensemble NVT pendant 25 ps sera réalisée suivie d'une dynamique dans l'ensemble NPT pour atteindre d'une densité de 1

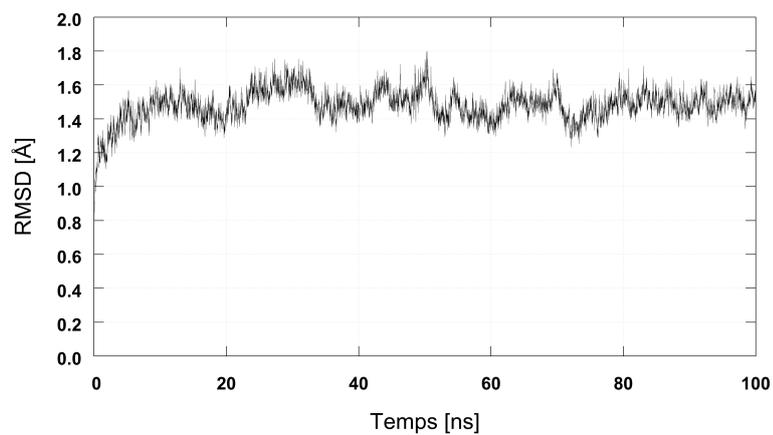
pendant 975 ps. La dynamique de production d'une durée de 100 ns sera ensuite réalisée dans l'ensemble NVT.



(a) Forme sauvage

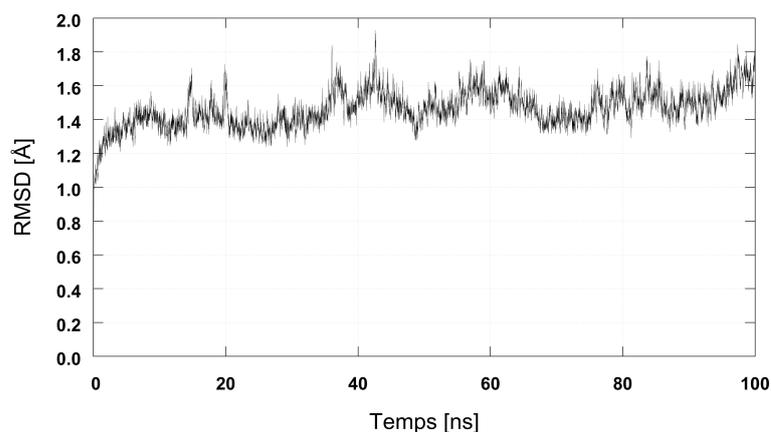


(b) Mutant N117A

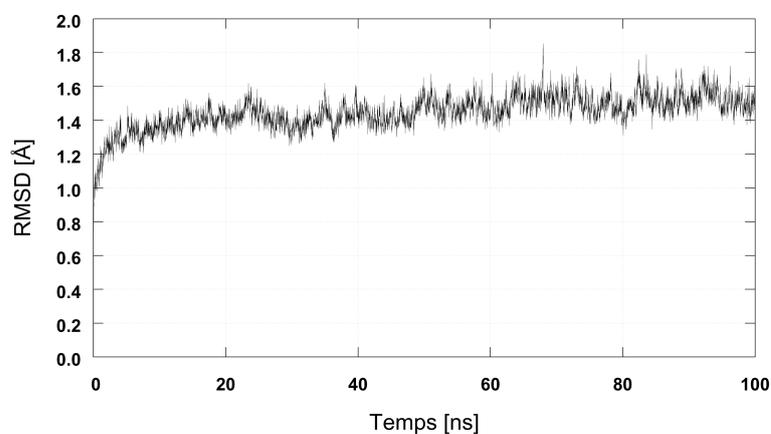


(c) Mutant I118S

Figure 4.2 – RMSD de la protéine entière pour la forme sauvage (a), les mutants étudiés (b-d), et le mutant E114A (e) au cours du temps.



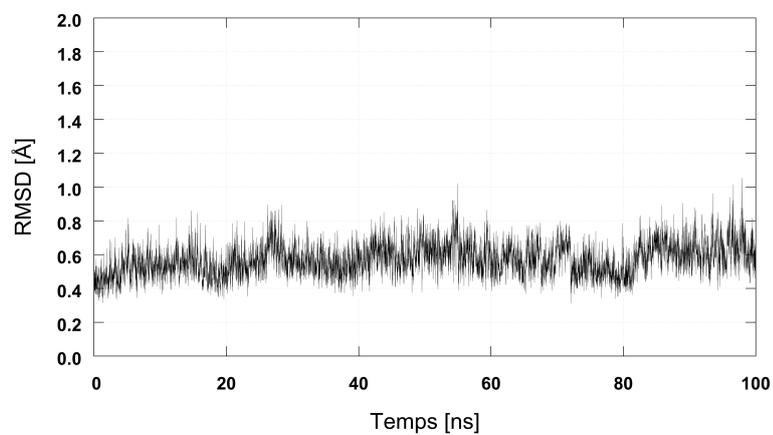
(d) Mutant K48I



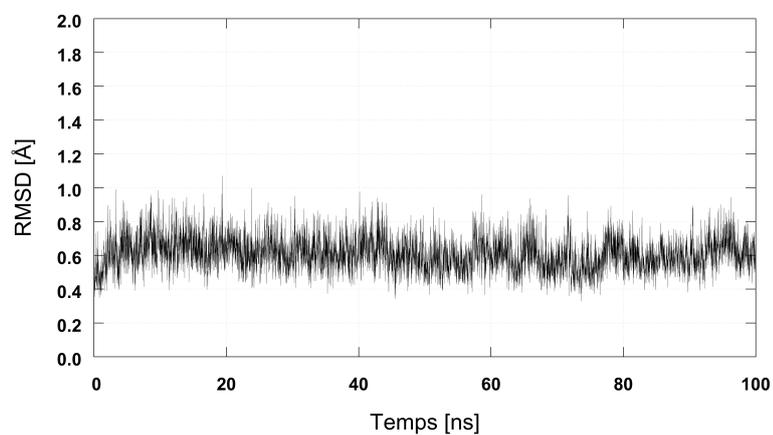
(e) Mutant E114A

Figure 4.2 – RMSD de la protéine entière pour la forme sauvage (a), les mutants étudiés (b-d), et le mutant E114A (e) au cours du temps. (suite)

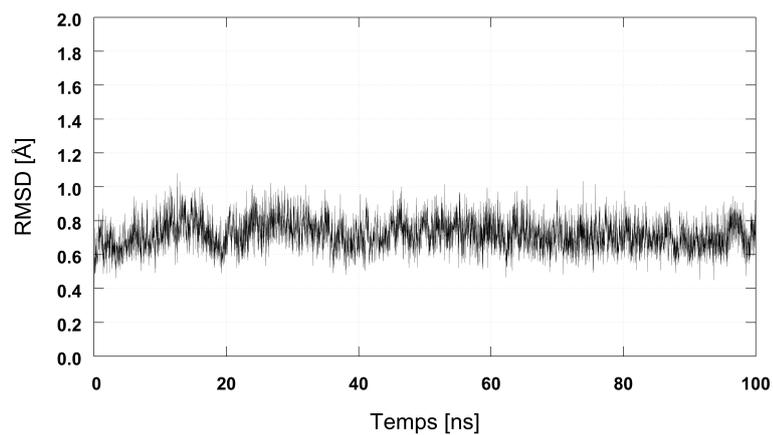
Figure 4.2, nous reportons les RMSD des quatre mutants (et également celui de la forme sauvage) sous leur forme $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. Les paramètres MM développés dans le chapitre 3 s'adaptent très bien pour l'étude des mutations. Pour les quatre mutants, les fluctuations restent sous le seuil de 2.0 Å pour tous les atomes de la protéine avec respectivement pour la forme native et les mutants N117A, I118S, K48I et E114A, des valeurs moyennes de 1.61 ± 0.13 Å, 1.59 ± 0.12 Å, 1.48 ± 0.1 Å, 1.46 ± 0.11 Å et 1.45 ± 0.10 Å. Les valeurs sont toutes très proches et ne permettent que la conclusion que les mutations n'ont pas d'effet sur la structure de la protéine : elle garde la même structure (homo)dimérique que la forme sauvage quelque soit la mutation. La figure 4.3 quant à elle montre les RMSD pour le site actif comprenant le fer et les acides aminés liés, la lysine (ou l'isoleucine dans



(a) Forme sauvage

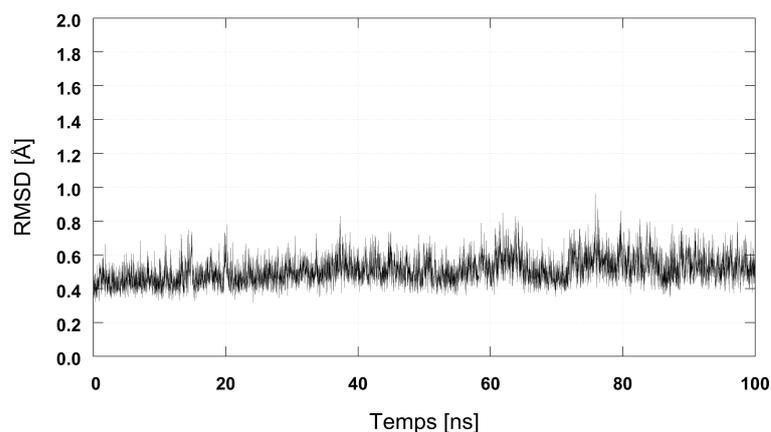


(b) Mutant N117A

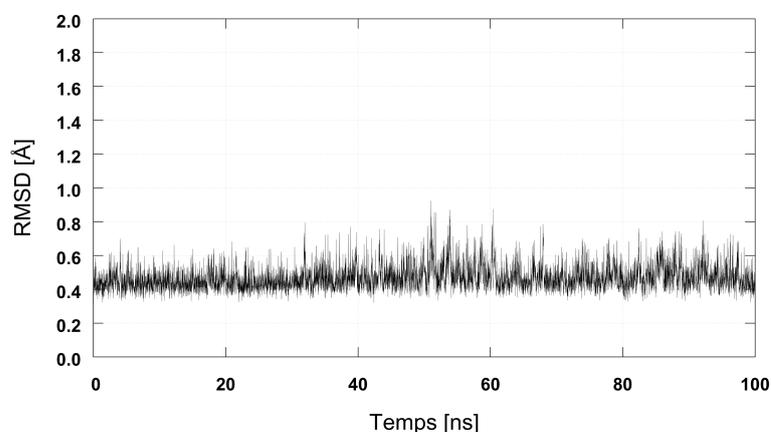


(c) Mutant I118S

Figure 4.3 – RMSD du site actif (Fe^{3+} , OOH^- , His⁴⁹, His⁶⁹, His⁷⁵, His¹¹⁹, Cys¹¹⁶ et Lys⁴⁸) pour la forme sauvage (a), les mutants étudiés (b-d) et le mutant E114A (e) au cours du temps.



(d) Mutant K48I



(e) Mutant E114A

Figure 4.3 – RMSD du site actif (Fe^{3+} , OOH^- , His⁴⁹, His⁶⁹, His⁷⁵, His¹¹⁹, Cys¹¹⁶ et Lys⁴⁸) pour la forme sauvage (a), les mutants étudiés (b-d) et le mutant E114A (e) au cours du temps. (suite)

le cas du mutant K48I) et le substrat OOH. Cela permet de visualiser si les mutations ont un impact sur le site actif uniquement par les effets stériques ou électrostatiques : les constantes de forces et paramètres non-liant sont identiques pour le site actif et non dépendant de la mutation. Par ailleurs, nous reportons dans le tableau 4.2 différentes valeurs de RMSD : le site actif uniquement, le site actif seul plus la partie squelette₁₁₄₋₁₁₉ comportant la série d'acide aminés Glu¹¹⁴, Tyr¹¹⁵, Cys¹¹⁶, Asn¹¹⁷, Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹.

Le mutant K48I donne des valeurs relativement proches de celles de forme native car la mutation de la lysine par une isoleucine n'impacte pas la structure même du site actif contrairement aux autres mutants pour qui la mutation a lieu sur la partie squelette₁₁₄₋₁₁₉

Mutants	RMSD du site actif (Å)	RMSD du site actif + squelette ₁₁₄₋₁₁₉ (Å)
WT	0.57 ± 0.10	0.89 ± 0.17
K48I	0.51 ± 0.08	0.83 ± 0.10
N117A	0.61 ± 0.10	0.85 ± 0.10
I118S	0.72 ± 0.09	0.79 ± 0.09
E114A	0.47 ± 0.07	0.66 ± 0.09

Tableau 4.2 – Moyenne du RMSD du site actif (Fe^{3+} , OOH^- , His⁴⁹, His⁶⁹, His⁷⁵, His¹¹⁹, Cys¹¹⁶ et Lys⁴⁸) et du site actif + squelette₁₁₄₋₁₁₉.

qui comprend la cystéine 116 et l’histidine 119. Le mutant N117A ne semble pas avoir un impact particulier sur la mobilité du site actif. Les mutants I118S et E114A ont un léger impact sur le site actif soit en le stabilisant (E114A) soit en le déstabilisant (I118S).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la géométrie du site actif, dans l’optique de voir la présence ou non de différence entre la forme sauvage et les mutants. Les valeurs sont reportées dans le tableau 4.3. La distance fer-oxygène dans qui dans le cas de la forme sauvage était de 2.04 ± 0.12 Å, est dans les mutants N117A, I118S, K48I et E114A également égale à 2.04 ± 0.12 Å. Il n’y a pas de différence ce qui s’explique en soit par les mêmes paramètres du champ de force utilisés dans la forme sauvage et les mutants. Il en est de même pour la distance oxygène proximal et oxygène distal, dans la forme sauvage et dans tous les mutants elle est de 1.47 ± 0.07 Å. La distance fer-soufre (de la cystéine 116) quant à elle est de 2.43 ± 0.15 Å pour la forme sauvage et de 2.44 ± 0.15 pour le mutant N117A, 2.43 ± 0.15 Å pour I118S, 2.43 ± 0.15 Å pour K48I et 2.44 ± 0.15 Å pour E114A. Également, les valeurs des distances entre le fer et les azotes portés par les quatre histidines possèdent la même valeur de respectivement de 2.36 ± 0.18 Å, 2.30 ± 0.18 Å, 2.32 ± 0.18 Å et 2.27 ± 0.18 Å pour les liaisons $\text{Fe-N}_{\text{His49}}$, $\text{Fe-N}_{\text{His69}}$, $\text{Fe-N}_{\text{His75}}$ et $\text{Fe-N}_{\text{His119}}$.

Pour les valeurs des angles, une légère différence est observée dans le cas du mutant N117A où l’angle Fe-Op-Od possède une valeur de 131 ± 16 ° contre 126 ± 9 ° pour les autres formes de la SOR (forme sauvages et autre mutations étudiées). Également, l’angle Op-Od-Hd possède une valeur de 115 ± 24 ° tandis que dans les autres formes, elle est de

Distance (Å)	Fe-Op	S-Fe	Op-Od	
WT	2.04 ± 0.12	2.43 ± 0.15	1.47 ± 0.07	
N117A	2.04 ± 0.12	2.44 ± 0.15	1.47 ± 0.07	
I118S	2.04 ± 0.12	2.43 ± 0.15	1.47 ± 0.07	
K48I	2.04 ± 0.12	2.43 ± 0.15	1.47 ± 0.07	
E114A	2.04 ± 0.12	2.44 ± 0.15	1.47 ± 0.07	

Angle (°)	Fe-Op-Od	Op-Od-Hd	C _β -S-Fe	C _β -S-Op-Od
WT	126 ± 9	107 ± 10	117 ± 7	-52 ± 39
N117A	131 ± 16	115 ± 24	118 ± 7	-56 ± 36
I118S	126 ± 9	107 ± 10	117 ± 7	-51 ± 52
K48I	126 ± 9	108 ± 10	118 ± 7	-51 ± 33
E114A	125 ± 9	107 ± 10	117 ± 7	-54 ± 33

Tableau 4.3 – Les distances et les angles importants (courbure et dièdre) pour les espèces Fe³⁺-OOH pour la forme sauvage et les quatre mutants étudiés.

107 ± 10 °. C'est un résultat surprenant car la mutation à lieu de l'autre côté du plan formé par les quatre azotes des histidines par rapport au ligand ⁻OOH.

Dans ce mutant N117A également l'angle dièdre C_β-S-Op-Od a une valeur légèrement différente des autres formes. L'angle a une valeur de -56 ± 36 ° comparée aux -52 ± 39 ° de la forme sauvage. Cet angle présente aussi une disparité pour le mutant I118S : si la valeur de l'angle moyenne est la même, la dispersion est plus large. Pour le mutant I118S l'angle dièdre C_β-S-Op-Od possède une valeur de -51 ± 52 °. Il est important de noter que les moyennes de cet angle dièdre C_β-S-Op-Od cache deux conformations, comme indiqué dans le chapitre 3, où l'une correspondant pour la forme sauvage à la conformation «directe» et l'autre à la conformation «une H₂O pontante» .

Ces subtiles différences dans le site actif de la SOR occasionnées par les mutations ou alors l'absence totale de différence comparée à la forme sauvage n'expliquent pas la différence de réactivité obtenue. Pour expliquer cette différence de réactivité pour tous les mutants étudiés sauf K48I, nous étudierons comment les modifications de la chaîne peptidique *via*

	Accepteur	Donneur		Dist. H-A (Å)	Dist. N-A (Å)	Angle D-H-A (°)
WT	SCys ¹¹⁶	H Ile ¹¹⁸	N Ile ¹¹⁸	2.44 ± 0.39	3.37 ± 0.36	155 ± 21
	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹	2.31 ± 0.47	3.23 ± 0.31	155 ± 31
N117A	SCys ¹¹⁶	H Ile ¹¹⁸	N Ile ¹¹⁸	2.34 ± 0.37	3.31 ± 0.35	160 ± 18
	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹	2.35 ± 0.53	3.26 ± 0.35	153 ± 34
I118S	SCys ¹¹⁶	H Ser ¹¹⁸	N Ser ¹¹⁸	2.29 ± 0.31	3.22 ± 0.27	153 ± 19
	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹	2.43 ± 0.51	3.27 ± 0.32	143 ± 33
K48I	SCys ¹¹⁶	H Ile ¹¹⁸	N Ile ¹¹⁸	2.46 ± 0.37	3.40 ± 0.33	156 ± 20
	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹	2.34 ± 0.48	3.25 ± 0.32	152 ± 31
E114A	SCys ¹¹⁶	H Ile ¹¹⁸	N Ile ¹¹⁸	2.42 ± 0.37	3.35 ± 0.33	154 ± 21
	SCys ¹¹⁶	H His ¹¹⁹	N His ¹¹⁹	2.31 ± 0.47	3.22 ± 0.30	154 ± 33

Tableau 4.4 – Liaisons hydrogène entre les atomes de soufre de la cystéine du centre SOR Fe³⁺-OOH et les groupes amides des acides aminés voisins (squelette peptidique).

les liaisons hydrogène qu'elle forme avec la cystéine 116 peut impacter la réactivité du mutant. Nous avons donc regardé les liaisons hydrogènes entre ces résidus et le soufre de Cys¹¹⁶ pour la forme sauvage et les mutants. Les valeurs sont répertoriées dans le tableau 4.4.

Pour la forme sauvage, concernant la liaison hydrogène entre le soufre de Cys¹¹⁶ et l'amide N-H de Ile¹¹⁸, la distance entre l'accepteur (S) et le donneur (N) est de 3.37 ± 0.36 Å avec un angle S-H-N de 155 ± 21 °. Pour le mutant N117A cette même distance est plus courte, prenant une valeur de 3.31 ± 0.35 Å et l'angle est plus grand avec une valeur moyenne de 160 ± 18 °. Ceci laisse à supposer que cette liaison est plus présente dans le mutant N117A que dans la forme native. Également, pour le mutant I118S, nous avons trouvé une distance moyenne entre le soufre et l'azote du groupement amide de la Serine 118 de 2.23 ± 0.27 Å tandis que l'angle S-H-N quant à lui possède une valeur proche de la valeur de l'angle dans la forme sauvage avec une valeur moyenne de 153 ± 19 °. Ceci laisse à supposer que cette liaison hydrogène est également renforcée dans le mutant I118S. Pour les mutants K48I et E114A, nous ne relevons pas de différence significative pour les distances S-N, S-H ou bien l'angle S-H-N comparativement à la forme sauvage

de la SOR.

Il est également important de noter que dans le mutant I118S, la sérine peut occasionnellement effectuer une liaison hydrogène entre le soufre et l'oxygène de son groupement hydroxyle. La valeur moyenne des distances S-O et S-H sont respectivement de 4.54 ± 0.76 Å et 4.31 ± 1.39 Å avec un angle S-H-O de 99 ± 55 °. Ces valeurs présentant une grande amplitude, nous pouvons admettre l'hypothèse que contrairement à la liaison hydrogène entre le soufre et l'azote de l'amide qui est toujours présente mais dont l'intensité varie, cette liaison entre le soufre et le groupement hydroxyle est soit présente, soit absente. Nous discuteront de cet aspect plus loin dans le chapitre.

Pour la forme sauvage, la liaison hydrogène entre le soufre de Cys¹¹⁶ et l'azote de l'amide de His¹¹⁹ possède une distance S-N de 3.23 ± 0.31 Å et un angle S-H-N de 155 ± 31 °. Dans le cas du mutant N117A, la distance S-N est légèrement plus longue : 3.26 ± 0.35 Å et l'angle S-H-N a une valeur semblable de 153 ± 34 °. Pour le mutant I118S, la distance moyenne S-N est de 3.27 ± 0.32 Å avec un angle S-H-N de 143 ± 33 °. Dans ce mutant la longueur de liaison est plus grande et l'angle plus petit, la liaison hydrogène est plus faible. Pour les mutants K48I et E114A, comme pour la liaison impliquant Ile¹¹⁸, la liaison hydrogène impliquant le soufre et l'amide de His¹¹⁹ ne présente pas de différence notable.

Les mutants K48I et E114A sont très proches de la forme sauvage : cela peut s'expliquer assez intuitivement. Dans le mutant K48I, la mutation a lieu à une distance lointaine du site actif, en *trans* du soufre et encore plus loin de la chaîne peptidique. Pour le mutant E114A, la mutation n'a pas lieu "entre" les acides aminés impliqués (entre Cys¹¹⁶ et His¹¹⁹). Tandis que comparativement à la forme sauvage, les mutants N117A et I118S possèdent respectivement une liaison hydrogène S-NH_{Ile/Ser118} légèrement renforcée renforcée et une liaison S-NH_{His119} légèrement affaiblie : les mutations ont lieu entre les acides aminés. Ils ont un impact sur la seconde sphère de coordination : dans N117A, il y a un remplacement d'une asparagine polaire par une alanine moins encombrante et non polaire ou dans I118S, le remplacement d'une isoleucine non polaire par une sérine polaire et moins

Angle dièdre (°)	ψ_{119}	ϕ_{119}	ψ_{118}	ϕ_{118}	ψ_{117}	ϕ_{117}
WT	13 ± 20	-113 ± 27	-25 ± 37	-114 ± 28	-18 ± 19	-64 ± 15
N117A	15 ± 20	-114 ± 27	-21 ± 36	-120 ± 26	-23 ± 22	-56 ± 19
I118S	18 ± 21	-131 ± 22	-21 ± 23	-113 ± 25	-17 ± 19	-62 ± 15
K48I	13 ± 21	-116 ± 27	-19 ± 34	-119 ± 25	-18 ± 18	-63 ± 15
E114A	14 ± 18	-113 ± 27	-27 ± 38	-111 ± 29	-18 ± 19	-64 ± 15

Tableau 4.5 – Valeurs des angles dièdres du squelette peptidique des espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ de la forme sauvage et des quatre mutants étudiés.

encombrante. Nous allons donc étudier la partie dite squelette peptidique comprenant Cys¹¹⁶, Asn/Ala¹¹⁷, Ile/Ser¹¹⁸ et His¹¹⁹.

Dans le tableau 4.5, nous répertorions les valeurs moyennes des angles dièdres suivant, ψ_{119} , ϕ_{119} , ψ_{118} , ϕ_{118} , ψ_{117} et ϕ_{117} du squelette peptidique.

Les valeurs moyennes des angles dièdres du squelette peptidique n'ont pas de sens physique à proprement parler : les moyennes sont souvent des moyennes de deux ou plusieurs conformations spécifiques. Ici, ils nous permettent de comparer les mutations "grosso modo" avant de détailler les conformations différentes. Par exemple, nous pouvons voir qu'il y a une différence pour l'angle ψ_{118} qui prend une valeur moyenne de $-21 \pm 23^\circ$ dans le mutant I118S à comparer au $-25 \pm 37^\circ$ de la forme sauvage, variation principalement sur l'amplitude de l'angle qui peut impliquer l'hypothèse suivante : l'amplitude entre deux conformations est plus importante si la distribution est identique. Il peut y avoir des différences dans la distribution des conformations. Nous avons également noté une différence de la valeur de l'angle dièdre ϕ_{119} qui est de $-131 \pm 22^\circ$ pour le mutant I118S et $-113 \pm 27^\circ$ pour la forme sauvage. Cette mutation a visiblement un impact sur le squelette₁₁₈₋₁₁₉ comme suspecté. Dans le cas du mutant N117A, la variation a lieu sur les angles dièdre ϕ_{118} , ψ_{117} , ϕ_{117} , ce qui fait que l'impact cette fois a lieu sur le squelette₁₁₇₋₁₁₈. Le mutant E114A quant à lui n'a que peu d'impact sur cette partie du squelette peptidique. Le mutant K48I présente des légères variations notamment sur l'angle ψ_{118} où il prend une valeur moyenne de $-19 \pm 34^\circ$ et l'angle ϕ_{118} où la valeur moyenne est de

-119 ± 25 °. Ces différences seront affinées par l'étude suivante. Premièrement nous analyserons la forme sauvage de la SOR, en détaillant toutes les liaisons hydrogènes, les angles dièdres et les conformations pour comprendre ces conformations et ensuite nous ferons la même étude pour les différents mutants.

4.1.2 La forme sauvage : conformations du squelette peptidique autour du site actif et influence sur Cys¹¹⁶

Un certain nombre de mutation impliquant directement le squelette peptidique, nous avons mené une analyse plus détaillée de ces conformations. La partie 4.1.2 sera consacrée à la forme sauvage, et la partie 4.1.3 aux mutations.

4.1.2.1 Liaisons hydrogènes du squelette peptidique

Nous allons d'abord étudier les liaisons hydrogènes que forment les acides aminés du *squelette*₁₁₆₋₁₁₉ avec leurs acides aminés voisins, car nous avons vu que des mutations, comme I118S ou N117A, impactaient cette partie spécifique du squelette.

L'asparagine 117 est à $82 \pm 2\%$ du temps de simulation engagée dans une liaison hydrogène via l'oxygène de sa fonction amide portée par sa chaîne latérale avec le groupement N-H de la fonction amide de la chaîne peptidique de la tyrosine 76. Également, toujours pour Asn¹¹⁷, le groupe N-H de sa chaîne latérale est également impliqué dans une liaison hydrogène avec l'oxygène de la chaîne peptidique de la lysine 74 pour $83 \pm 1\%$ du temps. Pour la chaîne peptique de Asn¹¹⁷, le groupement N-H est donneur pour former une liaison hydrogène avec l'oxygène de la chaîne peptidique de la tyrosine 76 et ce dans $90 \pm 1\%$ des cas. Ces liaisons hydrogènes sont représentées dans la figure 4.4a. Le fait que cet acide aminé possède trois liaisons hydrogène sous-entend un rôle important de cet acide aminé dans la stabilité de la seconde sphère de coordination. Aussi peut on s'attendre à un comportement différent du mutant N117A, ce qui sera discuté en section 4.1.3.

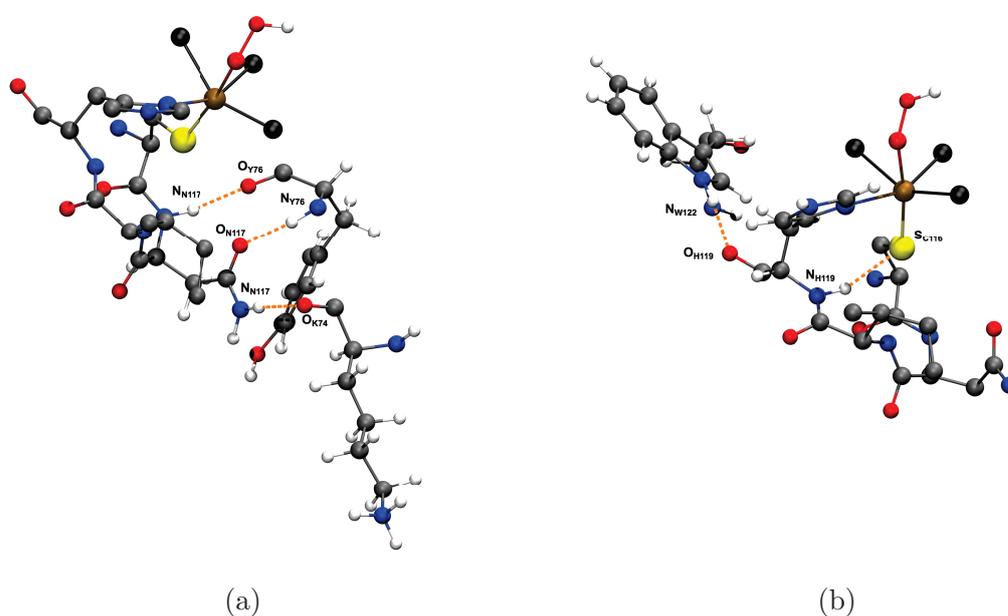


Figure 4.4 – Liaisons hydrogène pour les résidus Asn¹¹⁷ (a) et His¹¹⁹ (b). Le site actif de la forme sauvage est représenté par le Fer, la chaîne peptidique : Cys¹¹⁶, Asn¹¹⁷, Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹; et le ligand ⁻OOH. Les atomes d'azotes des trois histidines non représentées (His⁴⁹, His⁶⁹ et His⁷⁵) sont en noir. Les hydrogènes des acides aminés n'intervenant pas dans des liaisons hydrogènes ne sont pas représentés. Les couleurs sont, pour les atomes Fe, S, O, N, C et H, respectivement ocre, jaune, rouge, bleu, gris et blanc.

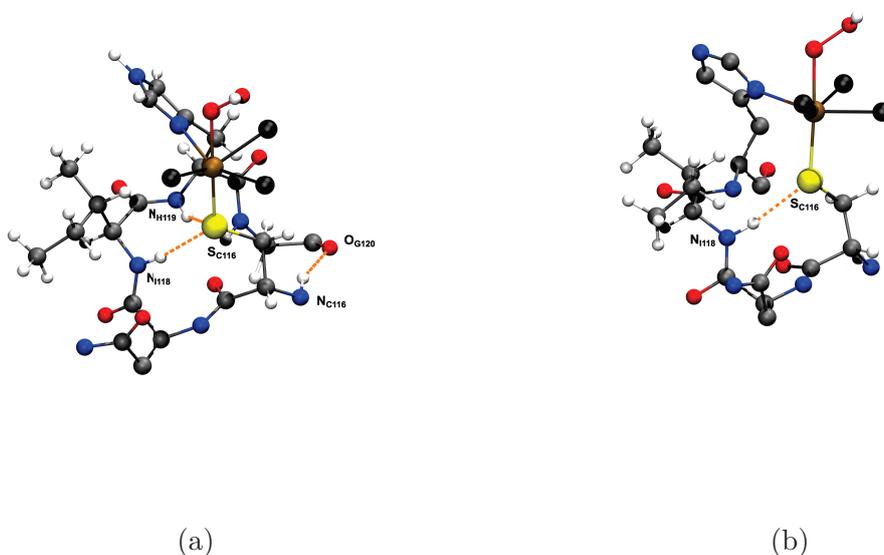


Figure 4.5 – Liaisons hydrogène pour les résidus Cys¹¹⁶ (a) et Ile¹¹⁸ (b). Le site actif de la forme sauvage est représenté par le Fer, la chaîne peptidique : Cys¹¹⁶, Asn¹¹⁷, Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ ; et le ligand ⁻OOH. Les atomes d’azotes des trois histidines non représentées (His⁴⁹, His⁶⁹ et His⁷⁵) sont en noir. Les hydrogènes des acides aminés n’intervenant pas dans des liaisons hydrogènes ne sont pas représentés. Les couleurs sont, pour les atomes Fe, S, O, N, C et H, respectivement ocre, jaune, rouge, bleu, gris et blanc.

Pour l’histidine 119, l’oxygène de sa chaîne peptidique est accepteur dans le cadre d’une liaison hydrogène avec l’azote de la fonction indole du tryptophane 122 dans $51 \pm 6\%$ du temps. Comme discuté précédemment, via son groupement (N-H)_{pepti}, His¹¹⁹ forme une liaison hydrogène avec le soufre de la cystéine 116 dans $66 \pm 12\%$ du temps de simulation. Ces deux liaisons H ajoutent de la rigidité en plus de l’action de l’histidine 119 dans la première sphère de coordination du fer.

L’isoleucine 118 ne forme qu’une liaison hydrogène seule liaison hydrogène avec les acides aminés environnants. Ile¹¹⁸ forme une liaison uniquement avec le soufre de la chaîne latérale de la cystéine 116 via son groupement (N-H)_{pepti}. Cette liaison a lieu dans $55 \pm 4\%$ du temps, ce qui peut favoriser une certaine flexibilité pour cette acide aminé.

Dans le cas de la cystéine 116, son groupement (N-H)_{pepti} est donneur dans une liaison hydrogène avec l’oxygène de chaîne peptidique de la glycine 120 dans $88 \pm 3\%$ du temps.

Comme l'histidine 119, le soufre de sa chaîne latérale fait partie de la première sphère de coordination du fer, en plus d'avoir trois liaisons hydrogène (avec Gly¹²⁰, His¹¹⁹ et Ile¹¹⁸). Le soufre possède jusqu'à deux liaisons hydrogène : si l'histidine 119 fait parti du site actif et ne peut être muté, Ile¹¹⁸ étant entre Cys₁₁₆ et His₁₁₉ tout comme Asn₁₁₇ qui ont été muté pour jouer sur ces liaisons hydrogène avec le soufre (l'isoleucine 118 de façon directe (I118S), l'asparagine 117 (N117A) de part sa proximité avec Cys₁₁₆ et Ile₁₁₈).

4.1.2.2 Liens entre les dièdres du squelette peptidique et les conformations

Avec ces informations sur la présence de liaisons hydrogènes et l'hypothèse d'une rigidité du squelette dépendante du nombre de liaisons hydrogène pour certains acides aminés, nous allons étudier les dièdres du squelette₁₁₇₋₁₁₉. Nous reportons dans la figure 4.6 les variations au cours du temps dièdres ϕ et ψ ainsi que la moyenne glissante sur 30 points.

Nous pouvons voir qu'il y a deux conformations pour les angles ψ_{118} et ϕ_{118} dans la forme sauvage. Nous définissons que la conformation est de la forme *S1* lorsque l'angle dièdre ψ_{118} est compris entre -20° et 10° . La conformation sera de la forme *S2* lorsque ce même angle dièdre (ψ_{118}) est compris entre -60° et -30° . La forme *S1* possède un angle ψ_{118} égal à $-8 \pm 15^\circ$ et un angle ϕ_{118} égal à $-125 \pm 12^\circ$. Cette conformation est présente, dans la forme sauvage, environ 40% du temps. L'autre forme, *S2*, est présente environ 41% du temps. L'angle ψ_{118} est égal à $-42 \pm 15^\circ$ et l'angle ϕ_{118} est égal à $-100 \pm 13^\circ$. Ces deux conformations ont un impact sur l'angle ϕ_{119} . L'angle ϕ_{119} prend en effet des valeurs de $-120 \pm 6^\circ$ pour la forme *S1* et de $-110 \pm 6^\circ$ *S2*. Ces deux conformations ont peu d'impact sur les angles ψ_{119} , ψ_{117} et ϕ_{117} .

Nous pouvons formuler l'hypothèse que la non-variation des conformations pour ψ_{117} et ϕ_{117} s'explique par le fait que l'asparagine 117 possède trois liaisons H lui conférant une certaine rigidité. Le fait que l'angle ψ_{119} est invariant et la faible amplitude ($\approx 10^\circ$) de ϕ_{119} s'expliquent par le fait que ce résidu est dans la première sphère de coordination du Fer et possède deux liaisons hydrogène avec des résidus voisins qui de ce fait le contraignent

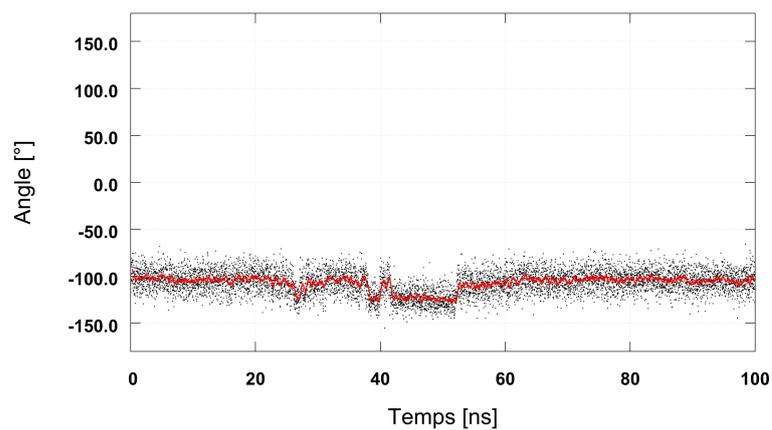
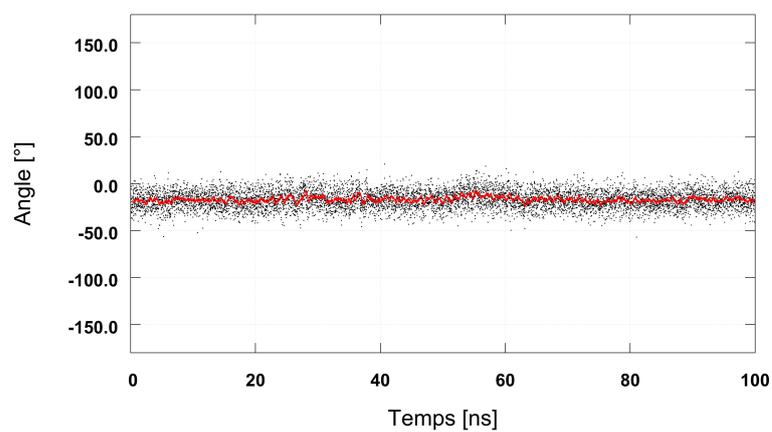
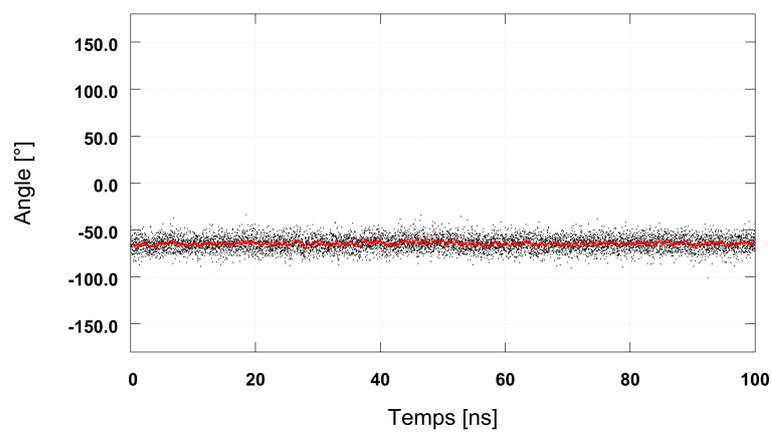
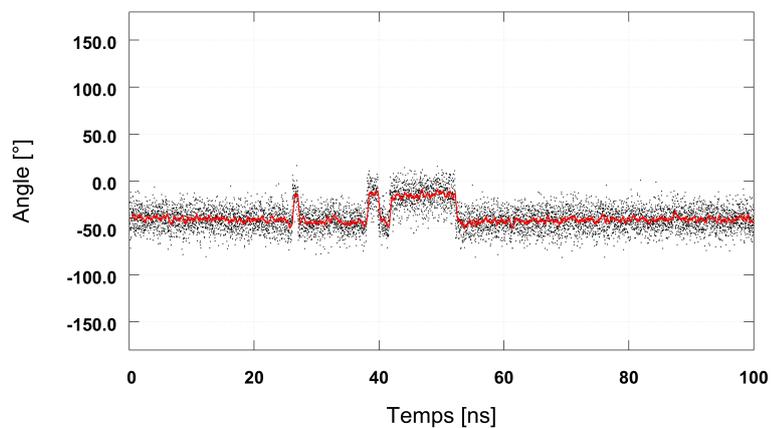
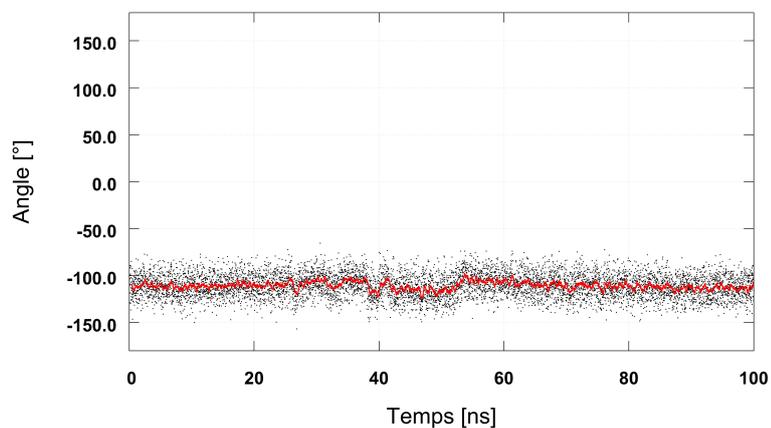


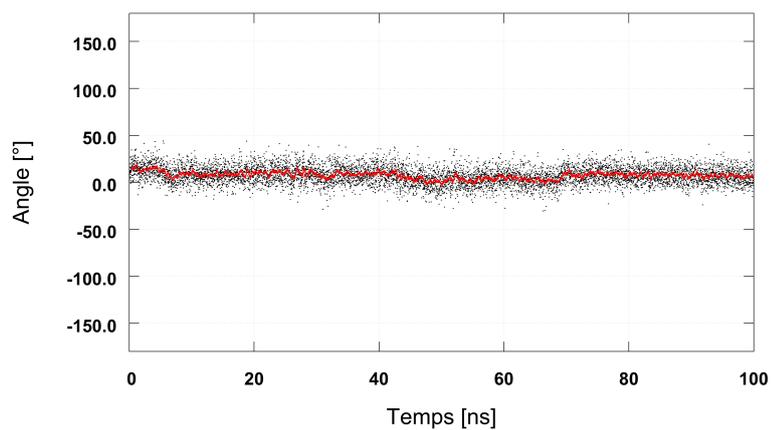
Figure 4.6 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique de la forme sauvage en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge.



(d) ψ_{118}



(e) ϕ_{119}



(f) ψ_{119}

Figure 4.6 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique de la forme sauvage en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge. (suite)

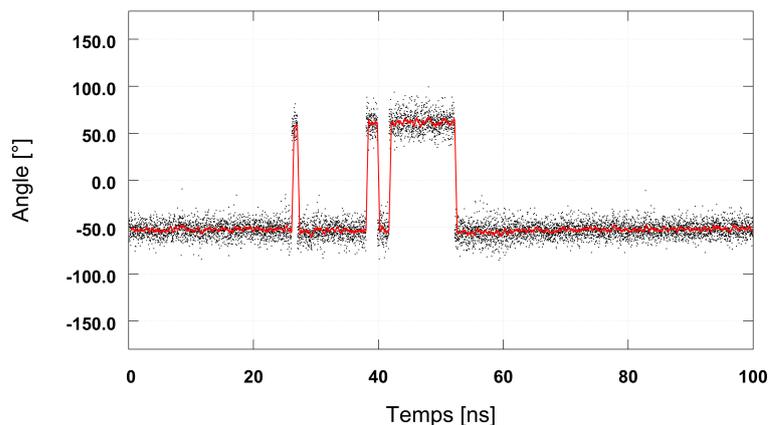


Figure 4.7 – Angle dièdre χ_{118} de la forme sauvage en fonction du temps (points noir). La moyenne glissante sur 30 points est représentée par une ligne rouge.

dans sa conformation.

Concernant Ile¹¹⁸, ce résidu ne possède qu'une seule liaison H avec le soufre de Cys₁₁₆ et que $55 \pm 4\%$ du temps, cette faible abondance (*sparsity*) de liaison hydrogène explique la facilité de passer d'une conformation à l'autre (Elles sont présentes dans un ratio $S1/S2$ égal à 1.3 environ). Également, il y a une *forte* variation des valeurs des angles dièdres d'une forme à l'autre (variant de 35° pour ψ_{118} et de 25° ϕ_{118}). La rigidité de la conformation d'Ile¹¹⁸ étant plus faible, et sa chaîne latérale étant un groupement $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ sans aucune liaison hydrogène (étant apolaire) et asymétrique via son carbone C_β , il peut exister une rotation de cette chaîne latérale via l'angle dièdre χ_{118} (représenté figure 4.7). Pour cette rotation spécifique autour du dièdre χ_{118} , nous définissons deux conformations $N1$ et $N2$. L'angle dièdre χ_{118} prend une valeur de $62 \pm 16^\circ$ pour la forme $N1$ dans environ 49% du temps. Dans 44% du temps, il prend une valeur de $-54 \pm 14^\circ$ correspondant à la forme $N2$. La corrélation entre que les dièdres du squelette peptidique ψ_{118}/ϕ_{118} et celui de la chaîne latérale χ_{118} soit dans la forme $S1/N1$ et $S2/N2$ est, respectivement, de 80% et de 83%. C'est à dire que dans 80% du temps que le système est dans la forme $N1$, il est dans la forme $S1$. Nous pouvons donc appuyer le fait que la rotation la chaîne latérale de Ile¹¹⁸ via χ_{118} et les conformations du squelette peptidique découlant de ψ_{118}/ϕ_{118} sont corellées.

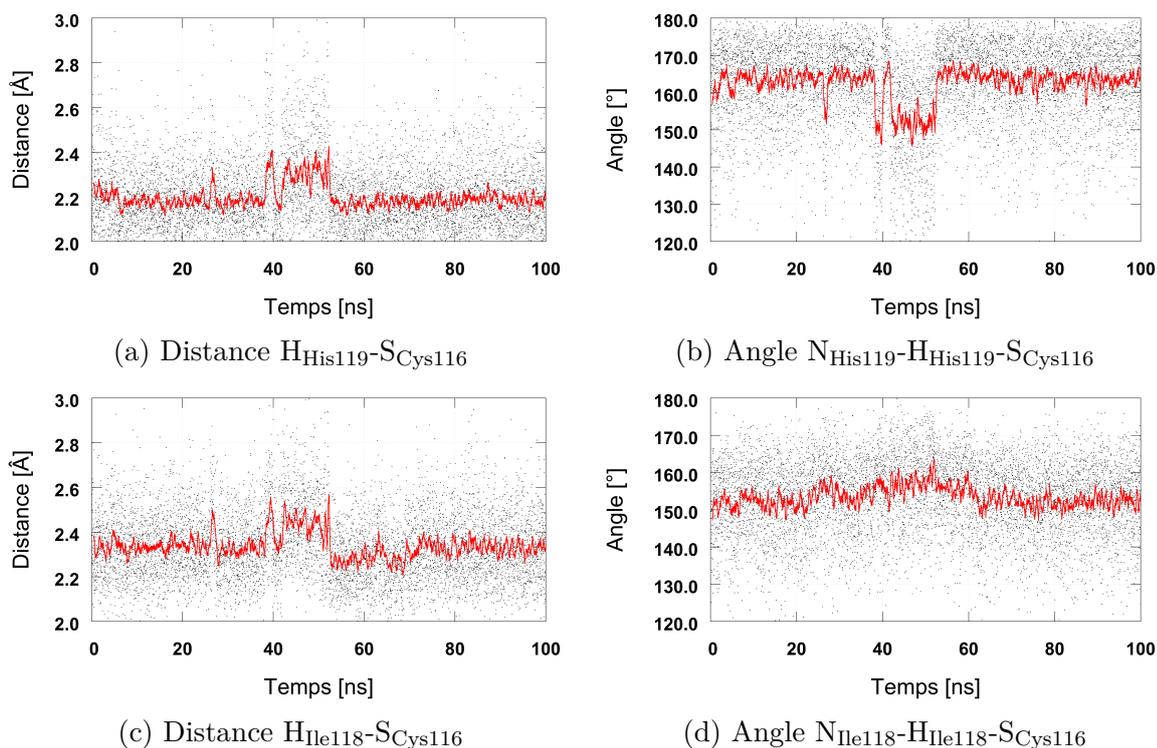


Figure 4.8 – Distances hydrogène-soufre et angle azote-hydrogène-soufre des liaisons hydrogène His¹¹⁹-Cys¹¹⁶ et Ile¹¹⁸-Cys¹¹⁶ au coups du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge.

4.1.2.3 Liaisons hydrogène impliquant le soufre de Cys¹¹⁶ en fonction des conformations

En reprenant l’hypothèse que les mutants I118S et N117A influencent sur les liaisons hydrogènes entre les fonctions amides ($(N-H)_{\text{pepti}}$) du squelette peptidique (Ile/Ser¹¹⁸ et His¹¹⁹) et le soufre de Cys¹¹⁶, et que nous avons étudiés les variations des valeurs moyennes des angles dièdres ψ/ϕ , nous avons analysé s’il y a corrélation entre les conformations du squelette et les liaisons hydrogène dans le cas de la forme sauvage : est ce qu’une des conformations *S1* ou *S2* favorise ou non les liaisons hydrogène ?

La figure 4.8 représente les variations des distances H-S et des angles N-H-S pour la forme sauvage pour les deux liaisons hydrogène d’intérêt. Nous pouvons déjà remarquer deux *conformations*. Pour la liaison hydrogène His¹¹⁹-Cys¹¹⁶, les deux conformations sont visibles avec la distance H-S (4.8a) et également avec l’angle N-H-S (4.8b), tandis que

pour la liaison H Ile¹¹⁸-Cys¹¹⁶, les deux conformations se remarquent uniquement sur la distance H-S (4.8c).

Avec ces informations, nous déduisons qu'il y a liaison hydrogène entre le S_{Cys116} et N_{Ile118} lorsque la distance H_{Ile118}-S_{Cys116} est inférieure à 2.40 Å et l'angle N_{Ile118}-H_{Ile118}-S_{Cys116} est supérieur à 140 °. Pour une distance H_{His119}-S_{Cys116} inférieure à 2.25 Å et un angle N_{His119}-H_{His119}-S_{Cys116} supérieur à 160 °, il y a liaison hydrogène entre S_{Cys116} et N_{His119}. Ces paramètres ont été choisis que les deux conformations correspondent bien à des conformations avec ou sans liaisons hydrogène. Les valeurs moyennes pour les distances N_{Ile118}-S_{Cys116}, H_{Ile118}-S_{Cys116} et l'angle N_{Ile118}-H_{Ile118}-S_{Cys116} sont respectivement de 3.24 ± 0.09 Å, 2.27 ± 0.08 Å et 158 ± 8 ° lorsqu'il y a liaison H, présente 45% du temps de simulation et de 3.45 ± 0.17 Å, 2.67 ± 0.19 Å et 134 ± 5 ° lorsqu'il n'y a pas liaison H, présente 55% du temps. Pour les distances N_{His119}-S_{Cys116}, H_{His119}-S_{Cys116} et l'angle N_{His119}-H_{His119}-S_{Cys116}, les valeurs sont respectivement de 3.13 ± 0.08 Å, 2.12 ± 0.08 Å et 168 ± 5 ° lorsqu'il y a liaison H présente à 33% et 3.34 ± 0.15 Å, 2.51 ± 0.22 et 140 ± 13 ° lorsque la liaison n'est pas présente (67%). Quatre conformations peuvent avoir lieu : *double*, *118*, *119* ou *aucune*. La conformation *double* a lieu lorsque les deux résidus Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ engagent des liaisons hydrogène avec le soufre de Cys¹¹⁶. *118* et *119* attestent de la présence d'une liaison H pour l'un ou l'autre des résidus en question. *aucune* ne présente aucune liaison H.

Les conditions ci-dessus sont choisies pour faire correspondre les conformations de liaison hydrogène en fonction des conformations *S1/S2*, elles ne définissent pas strictement les deux états : liaison H ou absence de liaison H. Lorsque le système est dans la forme *119* ou *double*, la liaison H est bien présente entre Cys¹¹⁶ et His¹¹⁹. Par contre lorsque le système est dans la forme *118* ou *aucune*, la liaison H entre Cys¹¹⁶ et His¹¹⁹ peut avoir lieu, en possédant néanmoins une distance plus longue et supérieure à 2.25 Å, critère retenu précédemment. Avec des conditions classiques (distance Accepteur-Donneur inférieure à 3.5 Å et angle Accepteur-H-Donneur supérieur à 140 °), la liaison hydrogène entre His¹¹⁹

	Occurrence/S2		Occurences/S1
Forme <i>S2</i> et <i>double</i>	39%	Forme <i>S1</i> et <i>double</i>	4%
Forme <i>S2</i> et <i>118</i>	22%	Forme <i>S1</i> et <i>118</i>	26%
Forme <i>S2</i> et <i>119</i>	20%	Forme <i>S1</i> et <i>119</i>	4%
Forme <i>S2</i> et liaison H	81%	Forme <i>S1</i> et liaison H	33%
Forme <i>S2</i> et <i>aucune</i>	19%	Forme <i>S1</i> et <i>aucune</i>	67%
Aucune corrélation S2 et liaison H	40%	Aucune corrélation S1 et liaison H	79%

Tableau 4.6 – Corrélation entre les liaisons hydrogène "fortes" et les conformations *S1/S2*.

et Cys¹¹⁶ est présente dans 66 % du temps. Nous avons donc de manière générale, une liaison H "forte" présente 33% du temps, 33% du temps une liaison H plus "faible" et 34% aucune liaison hydrogène. Dans le cas de la liaison entre Cys¹¹⁶ et Ile¹¹⁸, la liaison hydrogène est présente 55% du temps, décomposée en 45% de "forte" et 10% de plus "faible".

Le tableau 4.6 représente les corrélations entre conformations *S1/S2* et les conformations liaisons hydrogène "fortes".

D'après le tableau 4.6, lorsque que le système à la conformation *S2*, il y a 81% du temps une liaison hydrogène : 39% les deux liaisons hydrogène (*double*), 22% pour Ile¹¹⁸ et 20% His¹¹⁹ uniquement. Dans 40% du temps il n'y aucune corrélation entre la forme *S2* et les liaisons hydrogène : 19% de forme *S2* sont sans liaison hydrogène et il y a des liaisons hydrogènes mais soit avec la forme *S1* soit avec une forme intermédiaire. 19% du temps le système n'est pas dans la forme *S1* ou *S2*, les critères de sélections ne se recouvrant pas *vide infra*. Néanmoins il y a une bonne corrélation entre la forme *S2* et l'état des liaisons hydrogènes.

Pour la forme *S1*, 67% du temps quand le système passe sous cette forme, il n'y a aucune liaison hydrogène. Il est important de noter que la liaison hydrogène avec Ile¹¹⁸ à lieu également sous la forme *S1* : 26% du temps de simulation.

De ces informations nous pouvons déduire que la forme *S2* favorise les liaisons hydrogènes avec le soufre de la cystéine 116 et les deux acides aminés Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹, influençant les

Conformations	Distance Fe-S (Å)	Distance Fe-Op (Å)	Distance Op-Od (Å)
<i>double</i>	2.430 ± 0.148	2.043 ± 0.124	1.469 ± 0.066
<i>119</i>	2.429 ± 0.152	2.044 ± 0.122	1.469 ± 0.067
<i>118</i>	2.437 ± 0.148	2.044 ± 0.122	1.469 ± 0.066
<i>aucune</i>	2.429 ± 0.151	2.045 ± 0.123	1.469 ± 0.067

Tableau 4.7 – Valeurs des distances Fe-S, Fe-Op et Op-Od en fonction des conformations de liaisons hydrogène pour la forme sauvage dans nos dynamiques MM.

deux liaisons en proportion identique (59% et 61% pour His¹¹⁹ et Ile¹¹⁸ respectivement). La liaison avec Ile¹¹⁸ peut aussi avoir lieu dans la forme *S1* dans une proportion plus rare, soit dans 30%. La liaison avec His¹¹⁹ n'apparaît qu'à 8% dans la forme *S1*.

Les conformations *S1* et *S2* font varier la force de la liaison H. La forme *S2* renforce la liaison H tandis que la forme *S1* l'affaiblit voir la rompt.

4.1.2.4 Relations entre liaisons H avec S_{Cys116} et les distances Fer-Soufre et Fer-Oxygène

La dernière corrélation à étudier est celle entre les liaisons hydrogène liées aux conformations avec le soufre de la cystéine 116 et la distance fer-soufre, qui elle, va influencer par effet *trans* la liaison fer-oxygène_p et la liaison oxygène_p-oxygène_d. Nous sommes conscient que l'effet sera sûrement minime sur les liaisons au niveau MM vu que ces liaisons sont paramétrées avec une distance moyenne et une constante de force, néanmoins nous pouvons regarder l'effet et calculer les différentes conformations *via* des modèles QM comprenant une centaine d'atomes.

Dans le tableau 4.7, nous reportons les distances moyennes fer-soufre, fer-oxygène_p et oxygène_p-oxygène_d pour les conformations *double*, *118*, *119* et *aucune*. Dans le cas de la conformation *double*, la distance Fe-S est de 2.430 ± 0.148 Å, la distance Fe-Op est de 2.043 ± 0.124 Å et la distance Op-Od de 1.469 ± 0.066 Å. Pour la conformation *aucune*, les distances sont respectivement pour Fe-S, Fe-Op et Op-Od de 2.429 ± 0.151 Å,

	Distance Fe-S (Å)	Distance Fe-Op (Å)	Distance Op-Od (Å)		
<i>S1</i>	2.414	1.948	1.452		
<i>S2</i>	2.398	1.961	1.451		
	Distance H ₁₁₈ -S (Å)	Angle N ₁₁₈ -H ₁₁₈ -S (°)	Distance H ₁₁₉ -S (Å)	Angle N ₁₁₉ -H ₁₁₉ -S (°)	
<i>S1</i>	2.542	147.83	2.894	157.18	
<i>S2</i>	2.336	161.63	2.408	170.95	
	χ_{118} (°)	ψ_{118} (°)	ϕ_{118} (°)	ψ_{119} (°)	ϕ_{119} (°)
<i>S1</i>	54.91	-9.38	-120.47	26.82	-122.16
<i>S2</i>	-53.82	-43.00	-113.18	9.86	-102.23

Tableau 4.8 – Distances et angles caractéristiques du site actif pour les modèles QM en fonction des deux conformations *S1* et *S2*.

2.045 ± 0.123 Å et 1.469 ± 0.067 Å. Les différences entre ces deux formes extrêmes ne permettent pas de formuler une conclusion tant les différences sont faibles. Le tableau 4.7 référence également les deux formes *118* et *119*. De ces données nous ne pouvons pas mesurer l'impact des liaisons hydrogène avec le soufre sur les distances Fe-S et Fe-Op de part la paramétrisation des forces de liaisons qui est la même dans les deux conformations.

Nous avons donc effectué des calculs QM sur des géométries extraites des dynamiques MM. Pour définir un système nous avons conservés les acides aminés His⁴⁹, His⁶⁹, His⁷⁴, Cys¹¹⁶, Asn¹¹⁷, Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ ainsi que le fer et le ligand ⁻OOH. Les acides aminés sont *cappés* soit par un groupement *N*-méthylamide ou soit par un groupement acétyle. Les atomes N, C et C α sont gardés fixes lors de l'optimisation de géométrie au niveau B3LYP, 6-31G(d,p) pour les atomes Fe,C,H et 6-31++G(d,p) pour les atomes O,N,S. Nous sommes partis de deux géométries, l'une de conformation *S1* et l'autre de la conformation *S2*.

Nous reportons dans le tableau 4.8, les résultats obtenus. Nous remarquons que la distance Fe-S a une influence sur la distance Fe-Op. Pour la forme *S1*, la distance Fe-S est de 2.414 Å et la distance Fe-Op est de 1.948 Å. Pour la forme *S2*, la distance Fe-S est de 2.398 Å soit légèrement plus courte, en conséquence la distance Fe-Op est légèrement plus longue avec une valeur de 1.961 Å. Dans la forme *S2*, les liaisons hydrogène sont plus fortes : la distance entre les soufre et les atomes d'hydrogènes sont plus courte et les angles plus favorables. que dans la forme *S1*. Les variations des distances Fe-S et Fe-Op

restent minimales en comparaison des variations des liaisons hydrogènes. Le fait d'avoir ou non, deux liaisons hydrogène a un très faible impact sur ces distances. Des analyses AIMAll ont été effectuées sur les deux formes et montrent principalement une variation du l'indice de délocalisation sur l'atome de soufre. 11 % vs 8% entre la forme *S1* et la forme *S2*, ce qui est cohérent avec deux liaisons hydrogènes sur le soufre (délocalisation plus importante).

De ces simulations, nous avons pu extraire deux conformations différentes et corréliser ces conformations liées la rotation de la chaîne latérale de l'isoleucine 118 avec la présence de liaisons hydrogènes entre les groupements amides de la chaîne peptidique et le soufre de la cystéine 116. L'impact de ces liaisons hydrogène sur les distances fer-soufre et fer-oxygène est très faible mais perceptible et il y a une corrélation entre la distance Fe-S et Fe-Op de façon nette par effet *trans*.

Dans le paragraphe suivant, nous avons repris l'analyse effectuée sur la forme sauvage de la SOR et nous l'avons appliquée aux différents mutants pour noter les différences sur ce point et proposer des hypothèses sur la différences de réactivité.

4.1.3 Les mutations : impact sur le squelette peptidique

Dans cette partie, nous analyserons les différents mutants (N117A, K48I et I118S) en suivant la même méthodologie que la forme sauvage vu précédemment. Nous commencerons par les liaisons hydrogène du squelette peptidique, les dièdres du squelette peptidique et leurs conformations pour finir sur la corrélation entre conformations et liaisons hydrogène avec le soufre et l'effet *trans* potentiel sur la liaison Fe-Op.

4.1.3.1 Liaisons hydrogènes du squelette peptidique

Nous répertorions les probabilités de présence de chaque liaison hydrogène pour les mutants et la forme sauvage dans le tableau 4.9.

Accepteur	Donneur	WT	N117A	I118S	K48I
Asn ¹¹⁷ - O _{amidelat}	Tyr ⁷⁶ - N _{amidepepti}	82 ± 2%	Néant	66 ± 1%	80 ± 0%
Asn ¹¹⁷ - O _{amidelat}	Ser ¹¹⁸ - O _{alcool}	Néant	Néant	59 ± 2%	Néant
Lys ⁷⁴ - O _{amide}	Asn ¹¹⁷ - N _{amidelat}	83 ± 1%	Néant	81 ± 3%	82 ± 1%
Tyr ⁷⁶ - O _{amide}	Asn/Ala ¹¹⁷ - N _{amidepepti}	90 ± 1%	92 ± 3%	95 ± 0%	90 ± 2%
His ¹¹⁹ - O _{amide}	Trp ¹¹² - N _{indole}	51 ± 6%	49 ± 9%	51 ± 8%	44 ± 10%
Gly ¹²⁰ - O _{amide}	Cys ¹¹⁶ - N _{amide}	88 ± 3%	89 ± 2%	87 ± 1%	87 ± 3%
Cys ¹¹⁶ - S _{thiol}	His ¹¹⁹ - N _{amide}	66 ± 12%	61 ± 6%	35 ± 5%	58 ± 3%
Cys ¹¹⁶ - S _{thiol}	Ile/Ser ¹¹⁸ - N _{amide}	55 ± 4%	78 ± 3%	66 ± 1%	56 ± 4%

Tableau 4.9 – Présence des liaisons hydrogène entre les acides aminés *important* pour les espèces Fe³⁺-OOH de la forme sauvage et des trois mutants étudiés.

N117A. Le mutant N117A voit l'asparagine 117 remplacée par une alanine. Nous avons vu que dans la forme sauvage l'asparagine 117 fait trois liaisons hydrogène avec différents résidus (Figure 4.4a). Si aucune différence ne devrait avoir lieu pour les liaisons H impliquant le groupement amide de la chaîne peptidique, les liaisons hydrogène de la chaîne latérale, où le groupement CH₃C=ONH est remplacé par un groupement CH₃, disparaissent. Effectivement, l'alanine 117 n'engage plus aucune liaison hydrogène avec Lys⁷⁴ de part la perte de la chaîne latérale amide. Elle est toujours engagée avec une liaison hydrogène par le groupement (N-H)_{pepti} à 92 ± 3% avec l'atome d'oxygène de la chaîne peptidique de Tyr⁷⁶ mais n'en fait plus avec son atome d'azote de l'amide peptidique car elle ne possède plus le groupe amide latéral. L'alanine 117 ne possède plus qu'une seule liaison hydrogène, et dans les mêmes proportions que dans la forme sauvage. L'histidine 119 possède le même nombre de liaison hydrogène dans ce mutant que dans la forme sauvage. Nous retrouvons la liaison avec Trp¹²² dans 49 ± 9% des cas ainsi qu'avec Cys¹¹⁶ dans 61% ± 6%. Pour la cystéine 116, elle possède toujours la liaison avec Gly¹²⁰ dans 89 ± 2%. Finalement, la différence majeure du mutant se fait sur la liaison entre le soufre de Cys¹¹⁶ et le groupement (N-H)_{pepti} de Ile¹¹⁸ : la liaison hydrogène a une présence de 78 ± 3% alors que dans la forme sauvage, la présence de cette liaison H était de 55 ± 4% (Tableau 4.9).

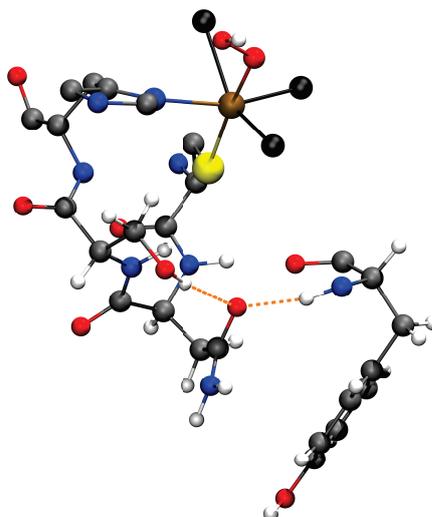


Figure 4.9 – Liaisons hydrogène entre les résidus Ser¹¹⁸, Asn¹¹⁷ et Tyr⁷⁹. Le site actif de la forme sauvage est représenté par le Fer, la chaîne peptidique : Cys¹¹⁶, Asn¹¹⁷, Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ ; et le ligand ⁻OOH. Les atomes d’azotes des trois histidines non représentées (His⁴⁹, His⁶⁹ et His⁷⁵) sont en noir. Les hydrogènes des acides aminés n’intervenant pas dans des liaisons hydrogènes ne sont pas représentés. Les couleurs sont, pour les atomes Fe, S, O, N, C et H, respectivement ocre, jaune, rouge, bleu, gris et blanc.

I118S. Pour le mutant I118S, l’isoleucine 118, corrélée de part sa chaîne latérale au deux conformations *S1* et *S2* dans la forme sauvage, est remplacée par une sérine. Le groupement CH(CH)₂ devient un groupement OH beaucoup plus petit, et surtout polaire, qui peut s’engager dans des liaisons hydrogène comme donneur. Il y a des différences notamment sur l’asparagine 117, où il y a une compétition entre le groupement (N-H)_{pepti} de Tyr⁷⁶ et la groupement (O-H)_{alcool} de Ser¹¹⁸ pour effectuer une liaison hydrogène avec l’oxygène du groupement amide de Asn¹¹⁷. Dans le premier cas, la présence est de 66 ± 1% (au lieu de 82 ± 2% pour la forme sauvage, voir tableau 4.9). Avec l’alcool de la sérine 118, il y a 59 ± 2% de liaisons hydrogène. Ces liaisons H également sont présentes simultanément dans 36 ± 1% des cas. Cette liaison H nouvelle est représentée figure 4.9. Pour les autres acides aminés, la liaison hydrogène entre le soufre de Cys¹¹⁶ et l’azote peptidique de His¹¹⁹ passe de 66 ± 12% à 35 ± 5% dans ce mutant I118S. Inversement, la liaison H entre le soufre et l’azote peptidique de Ser¹¹⁸ augmente de 55 ± 4% à 66 ± 1%.

K48I. Pour K48I, il n'y a aucune différence statistiquement pertinente, ce qui tant à montrer assez logiquement qu'une mutation de l'autre côté (*i.e.*, en *trans* du soufre de Cys₁₁₆) n'a pas d'influence sur le squelette peptidique [116-117-118-119] du site actif.

Conclusions. Nous avons vu que les mutations, notamment N117A et I118S, avaient une influence sur les liaisons hydrogènes, notamment sur les parties non mutées. Par exemple dans le cas de I118S, la mutation à un impact non négligeable avec la liaison H entre His¹¹⁹ et Cys¹¹⁶. Inversement, pour N117A, la mutation impacte la liaison H entre Ile¹¹⁸ et Cys¹¹⁶. Les mutations ont également, fort logiquement, un impact sur les parties directement mutées : par exemple le groupe alcool introduit par I118S entre en compétition avec le groupement (N-H)_{pepti} de Tyr⁷⁶ pour effectuer une liaison H avec O_{pepti} de Asn¹¹⁷.

Nous reviendrons sur les liaisons hydrogène impliquant de le soufre de Cys¹¹⁶ plus tard dans cette partie (partie 4.1.3.3).

Nous allons regarder dans le paragraphe suivant l'impact des mutations sur le squelette peptidique, notamment des résidus 117, 118 et 119.

4.1.3.2 Variations des conformations liées aux dièdres du squelette peptidique

Dans la partie sur la forme sauvage de la SOR, nous avons montré que le squelette peptidique était présent dans deux conformations et que ces conformations étaient corrélées à la rotation de la chaîne latérale de Ile¹¹⁸. Également, nous avons mis en avant le fait que si certains dièdres étaient différents en fonction de la conformation (ϕ_{118} , ψ_{118} et ϕ_{119}) d'autres ne sont que peu impactés (ψ_{119} , ψ_{117} et ϕ_{117}), *vide supra* et nous avons expliqué ce comportement par le fait que ces variations ou amplitudes de variation sont liés à la présence de liaisons H pour contraindre le résidu dans une ou l'autre des conformations.

Ayant déjà montré que les mutations ont des impacts sur les liaisons H du squelette, nous

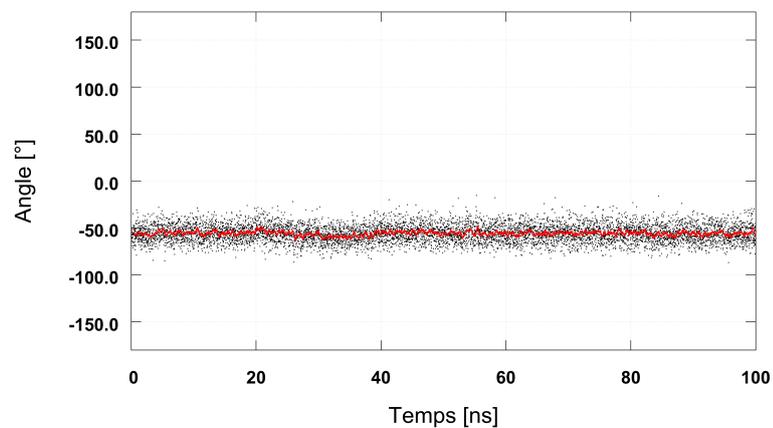
allons étudier les dièdres du *squelette*₁₁₇₋₁₁₉ et regarder les variations liées aux mutations.

N117A. Dans le cas du mutant N117A, (la mutation, pour rappel, remplace l'arginine 117 par une alanine), cette mutation a des effets sur les liaisons hydrogène par la disparition du groupe fonctionnel amide de la chaîne latérale engagé dans deux liaisons H et une augmentation de la probabilité d'avoir une liaison hydrogène entre Ile¹¹⁸ et Cys¹¹⁶. Dans la figure 4.10, nous représentons les valeurs des dièdres caractéristique ainsi que les moyennes glissantes sur 30 points associées.

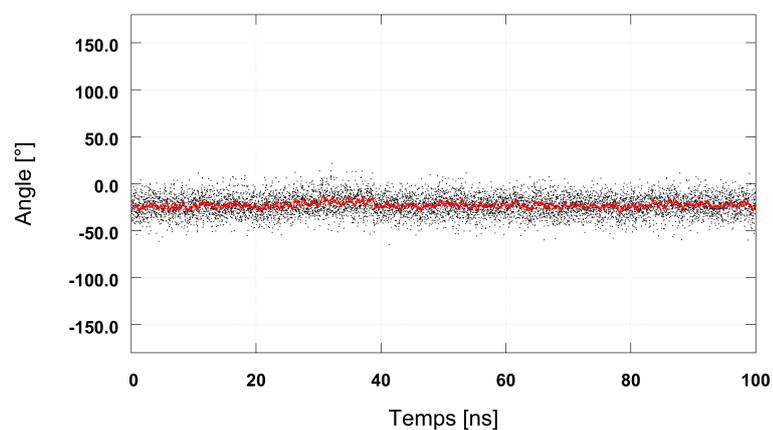
Comme pour la forme sauvage, nous pouvons voir que dans le mutant N117A, il y a deux conformations pour les angles ϕ_{118} , ψ_{118} et ϕ_{119} (Figure 4.10c, 4.10d et 4.10e).

Dans ce mutant, les deux formes sont toujours présentes avec des critères de sélections différents comparés à la forme sauvage : l'angle dièdre ψ_{118} est dorénavant entre -25° et 5° pour la forme *S1* et nous observons la forme *S2* lorsque cet angle dièdre est compris entre -65° et -35° . La forme *S1* possède un angle ϕ_{118} de $-129 \pm 12^\circ$, proche de la valeur de $-125 \pm 12^\circ$ pour la forme sauvage. L'angle ψ_{118} lui présente une valeur de $-11 \pm 17^\circ$, encore une fois proche de la valeur de la forme sauvage. L'angle ϕ_{119} présente un angle de $-120 \pm 6^\circ$ strictement identique à la valeur de $-120 \pm 6^\circ$ de la forme sauvage. Pour la forme *S2*, nous avons respectivement des valeurs de $-106 \pm 13^\circ$, $-44 \pm 13^\circ$ et $-110 \pm 6^\circ$ pour les angles ϕ_{118} , ψ_{118} et ϕ_{119} . Les angles ψ_{119} , ϕ_{117} et ψ_{117} quant à eux prennent des valeurs de $15 \pm 20^\circ$, $-56 \pm 19^\circ$ et $-23 \pm 22^\circ$, et ne dépendent pas de la forme *S1* ou *S2*. Il est important de noter que comme pour la forme sauvage, l'angle ϕ_{119} même s'il apparait clairement sous deux conformations ces même conformations sont très proches (10°) et se recoupent. Nos critères de sélection n'incluent que 50% des conformations pour éviter des recouvrements : une valeur de -114° pour ϕ_{119} pourrait correspondre aux deux conformations faussant ainsi les moyennes.

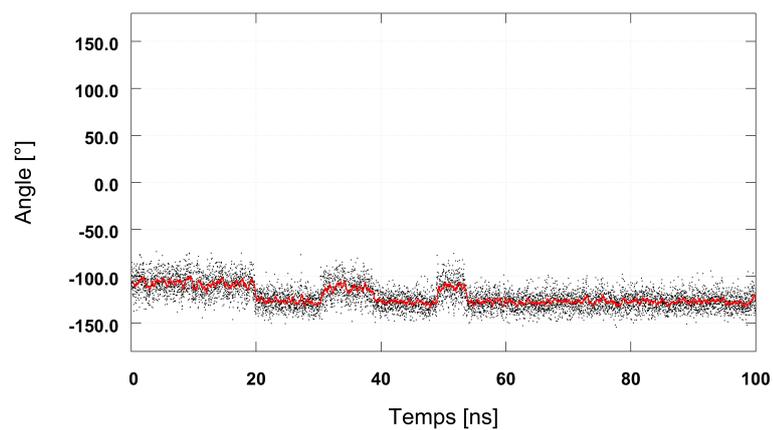
Les angles dièdres dans ce mutant ont des valeurs différentes de la forme sauvages mais leurs dispersions et séparations entre les deux conformations est identiques. La mutation a



(a) ϕ_{117}

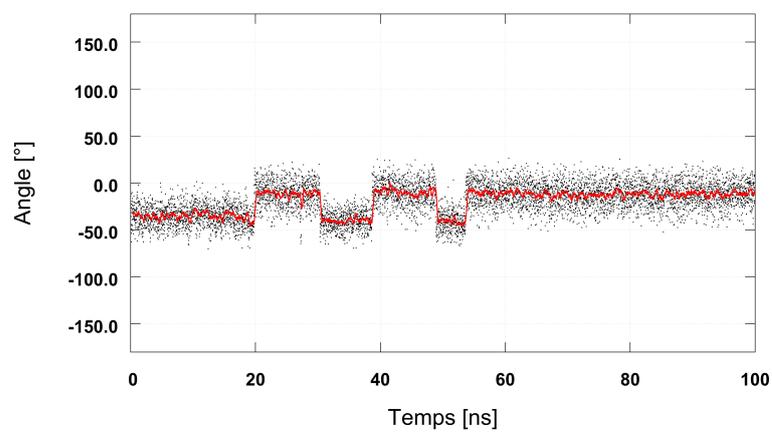


(b) ψ_{117}

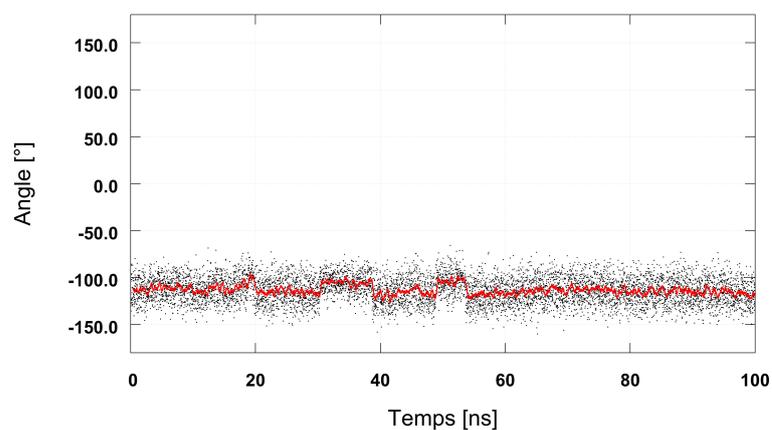


(c) ϕ_{118}

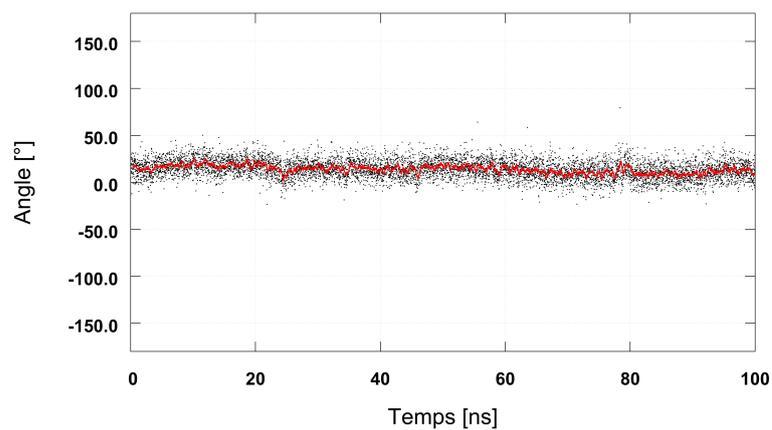
Figure 4.10 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique du mutant N117A en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge.



(d) ψ_{118}



(e) ϕ_{119}



(f) ψ_{119}

Figure 4.10 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique du mutant N117A en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge. (suite)

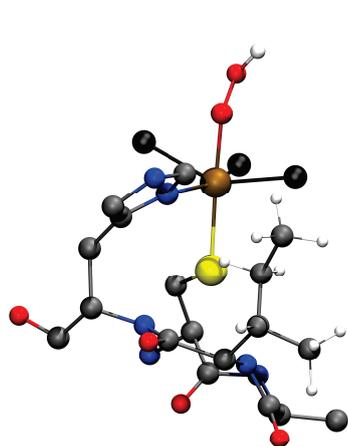
principalement un impact sur la dispersion des angles ϕ_{117} et ψ_{117} : cette partie est moins rigide du fait de la perte des deux liaisons hydrogène impliquant initialement la chaîne latérale de l'arginine 117 (remplacée ici dans ce mutant par une alanine). Par contre la perte de ces liaisons H n'a pas d'incidence sur ces dièdres, ne les faisant pas varier en fonction des conformations $S1/S2$.

L'isoleucine 118 étant toujours présente dans ce mutant, nous reportons la rotation de l'angle χ_{118} entre deux formes : $64 \pm 17^\circ$ donne lieu à la forme $N1$ et une valeur de $-55 \pm 14^\circ$ donne lieu à la forme $N2$. La corrélation entre les formes $S1$ et $N1$ est de 75%, proche de la valeur de 80% dans la forme sauvage. La corrélation est conservée. Par contre la corrélation entre $S2$ et $N2$ est différente. Dans la forme sauvage, la corrélation entre les deux était identique : la présence de la conformation $S2$ donne lieu à 85% de forme $N2$. Inversement la présence de la conformation $N2$ donne lieu à 80% de forme $S2$.

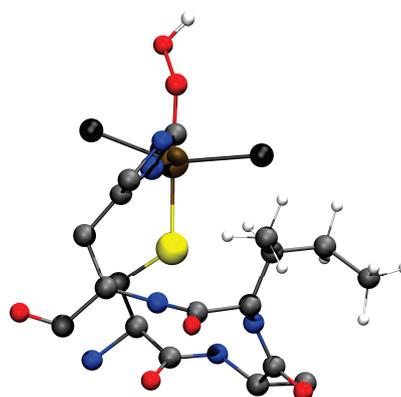
Pour le mutant N117A, si la présence de la forme $S2$ donne lieu à 89% de forme $N2$, la présence de la forme $N2$ ne donne lieu plus qu'à 56% de forme $S2$. La forme $S1$ dans ce mutant est également présente lorsque le système est dans la conformation $N2$. Il peut y avoir une troisième forme $N3$, lorsque l'angle dièdre χ_{118} prend une valeur moyenne de $-162 \pm 18^\circ$. Cette conformation est néanmoins très rare, environ 1% d'occurrences. La figure 4.11 représente les trois conformations $N1$, $N2$ et $N3$ ainsi que la variation de l'angle χ_{118} au cours du temps.

Le mutant N117A présente donc des différences dans le squelette₁₁₇₋₁₁₉ notamment par des angles dièdres ϕ_{116}/ψ_{116} différents ainsi qu'une légère décorrélation entre les formes $S2$ et $N2$ représentant respectivement la conformation du squelette₁₁₈₋₁₁₉ et la rotation de la chaîne latérale d'Ile¹¹⁸. Nous verrons dans la partie suivante les liaisons hydrogènes avec le soufre de Cys¹¹⁶ pour ce mutant.

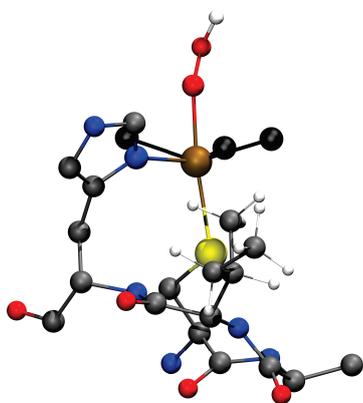
I118S. Dans ce mutant, l'isoleucine 118 est remplacée par une sérine. La rotation de la chaîne latérale de l'isoleucine, dans la forme sauvage, était corrélée avec la conformation



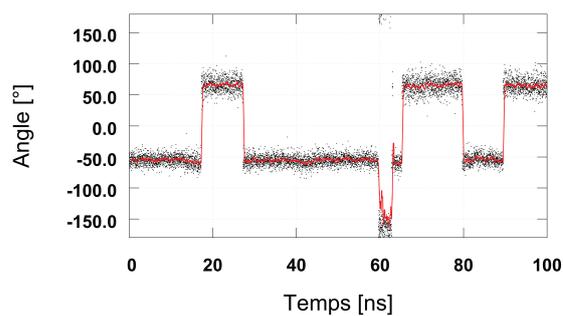
(a) conformation *N1*, $\chi_{118}=65^\circ$



(b) conformation *N2*, $\chi_{118}=-55^\circ$



(c) conformation *N3*, $\chi_{118}=-162^\circ$



(d) Angle χ_{118} au cours du temps

Figure 4.11 – Les trois conformations *N1*, *N2* et *N3* pour le mutant N117A ainsi que la variation de l'angle χ_{118} en fonction du temps (points noir). La moyenne glissante sur 30 points est représentée par une ligne rouge.

du squelette₁₁₈₋₁₁₉. Du fait que l'isoleucine 118, initialement dans la forme sauvage, soit non-polaire, elle n'était engagée dans aucune liaison hydrogène avec sa chaîne latérale. Nous allons étudier l'impact de cette sérine, plus petite et avec un groupement alcool qui peut être donneur dans une liaison hydrogène. Dans la figure 4.12, nous représentons les six dièdres du squelette₁₁₇₋₁₁₉.

Ce que l'on remarque pour ce mutant, c'est la disparition des formes *S1* et *S2*. Les angles ϕ_{118} , ψ_{118} et ϕ_{119} ne varient plus entre deux conformations. Cette fois la valeur moyenne des dièdres est représentative. Les angles dièdre ϕ_{119} et ψ_{119} prennent des valeurs respectives de $-131 \pm 22^\circ$ et $18 \pm 21^\circ$. L'angle ϕ_{119} possède une valeur inférieure par rapport à la valeur qu'il possède dans la forme sauvage que ce soit dans la conformation *S1* (-120°) ou *S2* (-110°). Pour l'angle ψ_{119} la valeur de l'angle est légèrement plus élevée (de cinq degré) que la forme sauvage. Les angles dièdres ψ_{118} et ϕ_{118} , contrairement à la forme sauvage, ne sont pas dans deux conformations distinctes et prennent des valeurs de $-21 \pm 23^\circ$ et $-113 \pm 25^\circ$ respectivement. Notamment ψ_{118} est beaucoup moins dispersé autour de sa valeur moyenne contrairement à la forme sauvage où l'amplitude entre les deux conformations était de 35° . Les angles ψ_{117} et ϕ_{117} prennent des valeurs moyennes de $-17 \pm 19^\circ$ et $-62 \pm 15^\circ$, respectivement, et proches des valeurs de ces angles de la forme sauvage.

La mutation I118S provoquent la disparition des conformations *S1* et *S2* présentent dans la forme sauvage, qui étaient corrélées à la rotation de χ_{118} de la chaîne latérale de l'isoleucine 118 remplacée par une sérine dans ce mutant. La sérine possède toujours un angle χ_{118} qui possède trois conformations *N1* avec pour valeur $65 \pm 16^\circ$, *N2* avec une valeur de $-56 \pm 15^\circ$ et *N3* avec une valeur de $-166 \pm 17^\circ$. Ces trois conformations sont représentées dans la figure 4.13.

La conformation *N2* est présente de façon très majoritaire à 90%. Les deux autres formes, *N1* et *N3* sont présentes à 3% et 3% respectivement. Il est important de noter que lorsque la sérine 118 est dans la conformation *N1*, elle forme une liaison hydrogène via

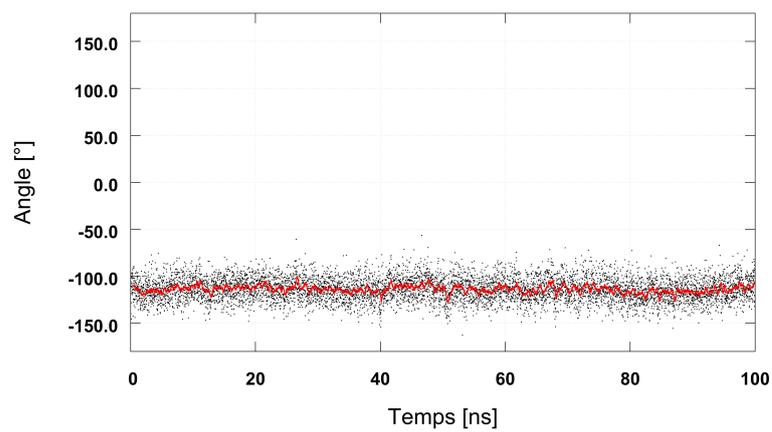
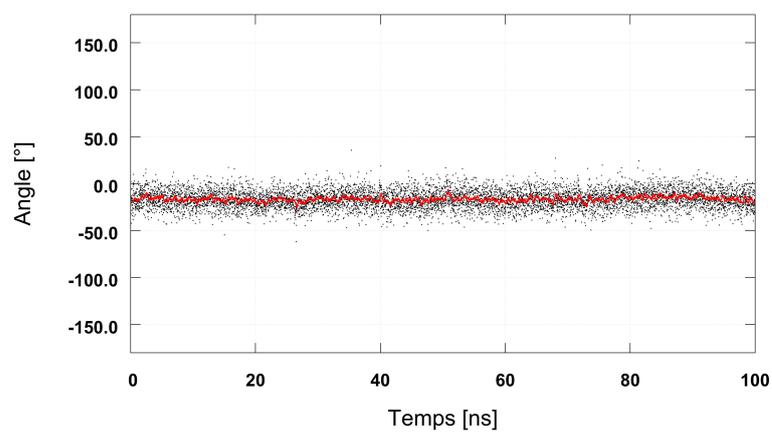
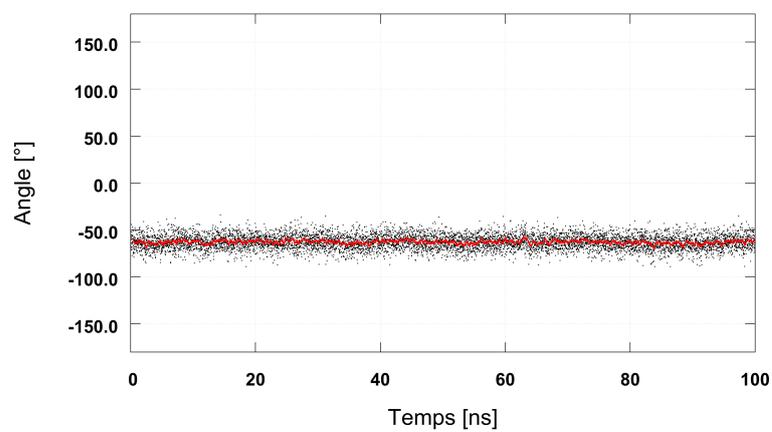
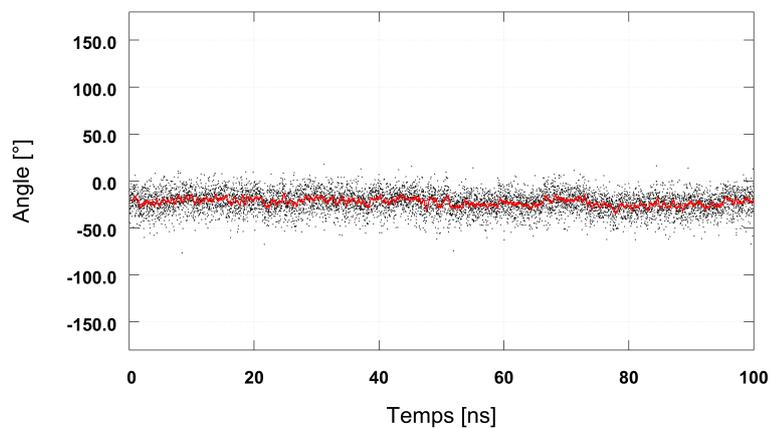
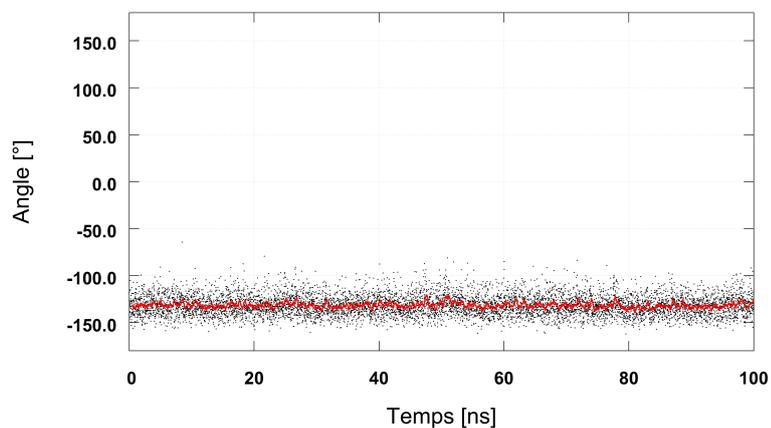


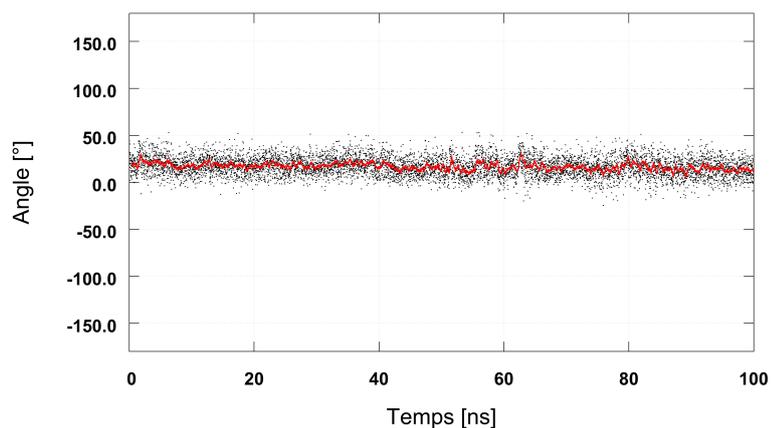
Figure 4.12 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique du mutant I118S en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge.



(d) ψ_{118}

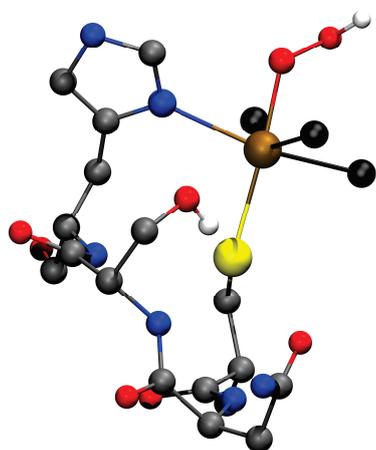


(e) ϕ_{119}

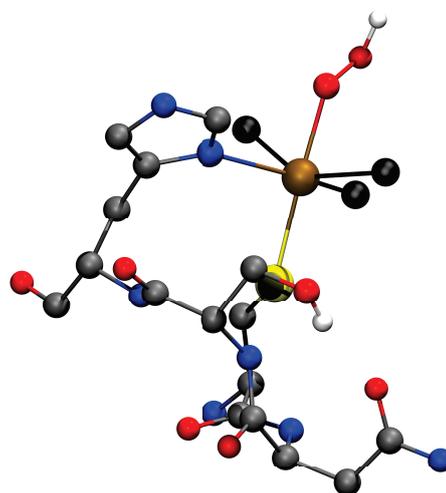


(f) ψ_{119}

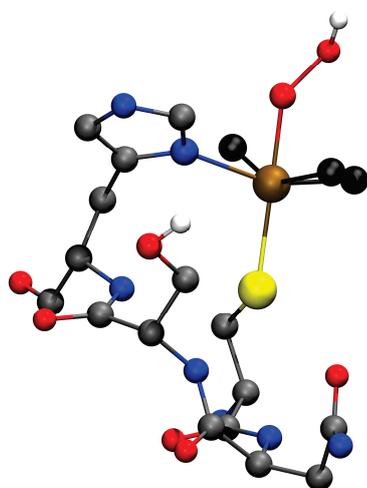
Figure 4.12 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique du mutant I118S en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge. (suite)



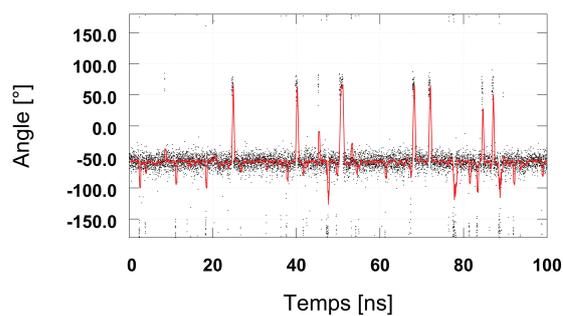
(a) conformation *N1*, $\chi_{118}=65^\circ$



(b) conformation *N2*, $\chi_{118}=-57^\circ$



(c) conformation *N3*, $\chi_{118}=-175^\circ$



(d) Angle χ_{118} au cours du temps

Figure 4.13 – Les trois conformations *N1*, *N2* et *N3* pour le mutant I118S ainsi que la variation de l'angle χ_{118} en fonction du temps (points noir). La moyenne glissante sur 30 points est représentée par une ligne rouge.

son groupement alcool avec le soufre de Cys¹¹⁶.

K48I. Le mutant K48I est différent des autres mutants car la mutation a lieu en *trans* du soufre, du côté de la sixième coordination du fer, ce qui nous amène à penser que la mutation n'aura pas d'impact sur le squelette₁₁₇₋₁₁₉. Les valeurs des six angles dièdres sont sensiblement les mêmes que dans la forme sauvage. Les deux conformations *S1* et *S2* sont présentes dans les mêmes proportions que dans la forme sauvage et sont corrélées aux conformations *N1* et *N2* (Figure 4.14). Comme dans la forme sauvage, il n'y a pas de forme *N3* pour la rotation de l'isoleucine 118. Ces données confirment qu'à cause du fait que la mutation ayant lieu en *trans* des autres mutations étudiées, il n'y a aucune différence par rapport à la forme sauvage de la SOR (figure 4.15).

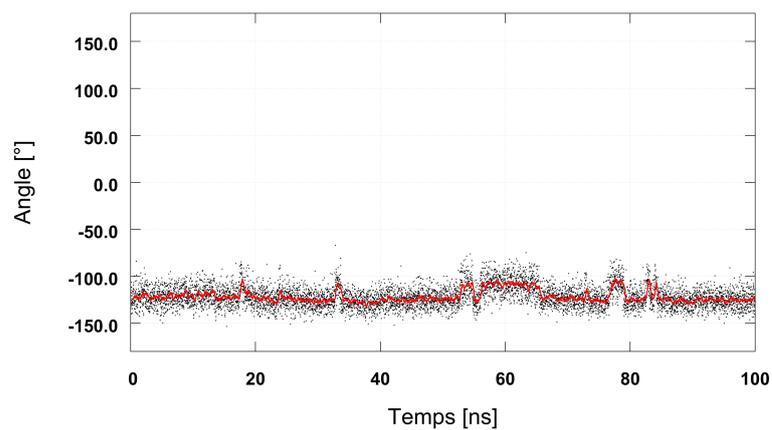
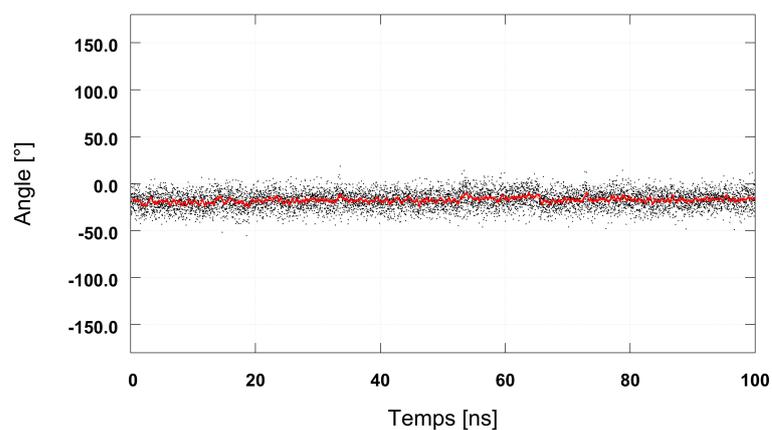
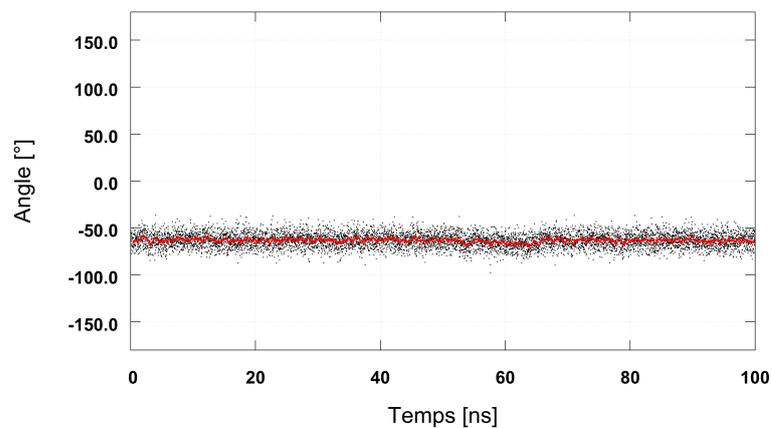
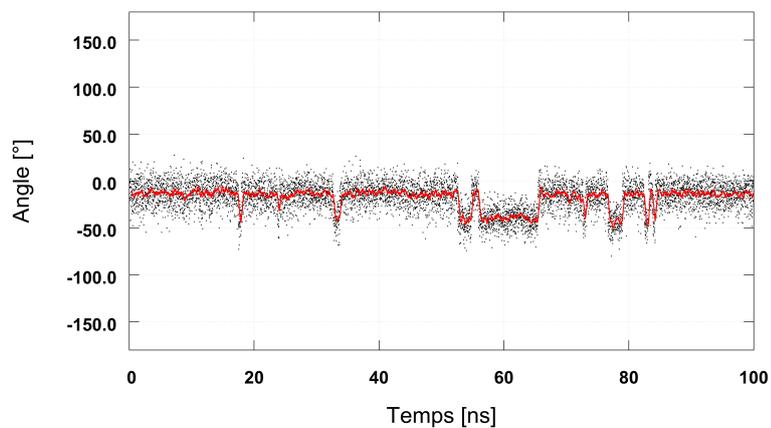
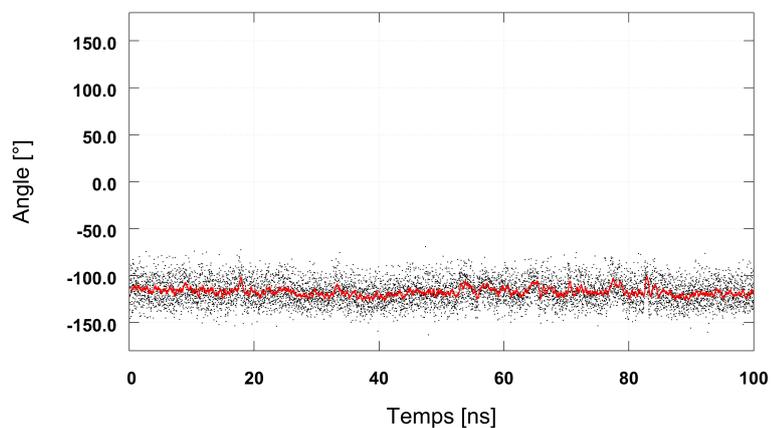


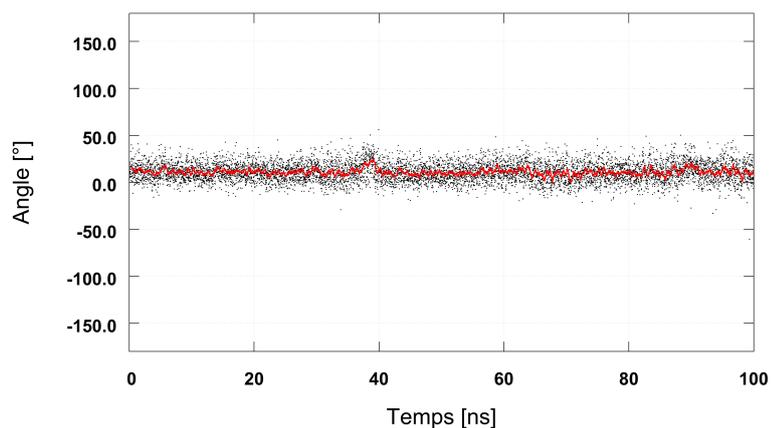
Figure 4.14 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique du mutant K48I en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge.



(d) ψ_{118}

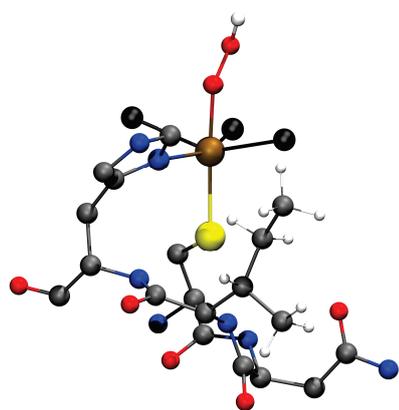


(e) ϕ_{119}

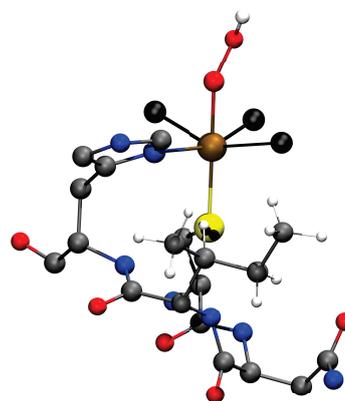


(f) ψ_{119}

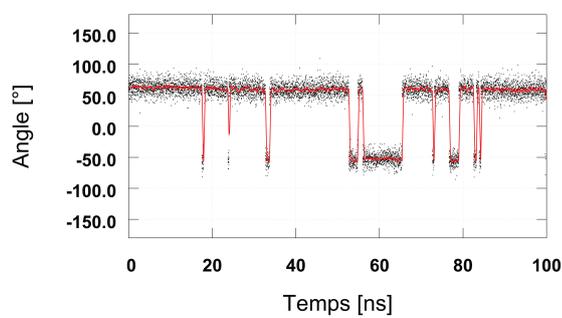
Figure 4.14 – Angles dièdres caractéristiques du squelette peptidique du mutant K48I en fonction du temps (points noir). Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge. (suite)



(a) conformation $N1$, $\chi_{118}=61^\circ$



(b) conformation $N2$, $\chi_{118}=-54^\circ$



(c) Angle χ_{118} au cours du temps

Figure 4.15 – Les deux conformations $N1$ et $N2$ pour le mutant K48I ainsi que la variation de l'angle χ_{118} en fonction du temps (points noir). La moyenne glissante sur 30 points est représentée par une ligne rouge.

4.1.3.3 Liaisons hydrogène avec le soufre de Cys¹¹⁶ : effets des mutations

Dans cette partie, nous allons étudier les liaisons hydrogène entre le soufre de Cys¹¹⁶ et le squelette peptidique : His¹¹⁹ et Ile/Ser¹¹⁸ en fonction des mutations et les corrélations avec les formes *S1* et *S2*. Pour I118S, nous étudierons comment l'absence de ces conformation impacte ces liaisons hydrogène.

N117A. Dans ce mutant nous avons toujours les deux conformations *S1* et *S2*, nous représentons en figure 4.16 les distances $H_{\text{His119}}-S_{\text{Cys116}}$ et $H_{\text{Ile118}}-S_{\text{Cys116}}$ ainsi que les angles $N_{\text{His119}}-H_{\text{His119}}-S_{\text{Cys116}}$ et $N_{\text{Ile118}}-H_{\text{Ile118}}-S_{\text{Cys116}}$. Comme pour la forme sauvage (Figure 4.8), nous pouvons voir qu'il y a deux conformations, représentées principalement pour la liaison H His¹¹⁹-Cys¹¹⁶, avec la distance (Figure 4.16a) et l'angle (Figure 4.16b). Pour la liaison H Ile¹¹⁸-Cys¹¹⁶, comme pour la forme sauvage, les conformations ne sont apparentes que sur la distance (Figure 4.16c).

Pour ce mutant les conditions "limites" de la présence d'une liaison hydrogène en fonction de la conformation sont différentes. Il y a liaison hydrogène entre Ile¹¹⁸ et Cys¹¹⁶ lorsque la distance $H_{\text{Ile118}}-S_{\text{Cys116}}$ est inférieure à 2.3 Å (la condition était inférieure à 2.4 Å pour la forme sauvage) et l'angle $N_{\text{Ile118}}-H_{\text{Ile118}}-S_{\text{Cys116}}$ est supérieur à 145 °. Pour la liaison H entre His¹¹⁹ et Cys¹¹⁶ la distance hydrogène-accepteur doit être inférieure à 2.35 Å et l'angle donneur-hydrogène-accepteur supérieur à 150 °. Avec ces conditions, les valeurs moyennes pour les distances $N_{\text{His119}}-S_{\text{Cys116}}$ et $H_{\text{His119}}-S_{\text{Cys116}}$ sont respectivement de 3.17 ± 0.09 Å et 2.18 ± 0.10 Å lorsqu'une liaison hydrogène est présente (52% du temps). Lorsque la liaison n'est pas présente, soit 48 % du temps, les distances N-S et H-S prennent respectivement des valeurs moyennes de 3.41 ± 0.17 et 2.66 ± 0.24 Å. L'angle $N_{\text{His119}}-H_{\text{His119}}-S_{\text{Cys116}}$ quant à lui prend une valeur moyenne de 164 ± 7 ° lors qu'une liaison H et 132 ± 12 ° sans liaison H. Pour la liaison H entre Ile₁₁₈ et Cys₁₁₆, les distances $N_{\text{Ile118}}-S_{\text{Cys116}}$ et $H_{\text{Ile118}}-S_{\text{Cys116}}$ ont respectivement des valeurs moyennes de 3.18 ± 0.07 Å et 2.20 ± 0.07 Å, dans 44% du temps, lorsqu'il y a liaison H. L'angle $N_{\text{Ile118}}-H_{\text{Ile118}}-S_{\text{Cys116}}$ prend une valeur moyenne

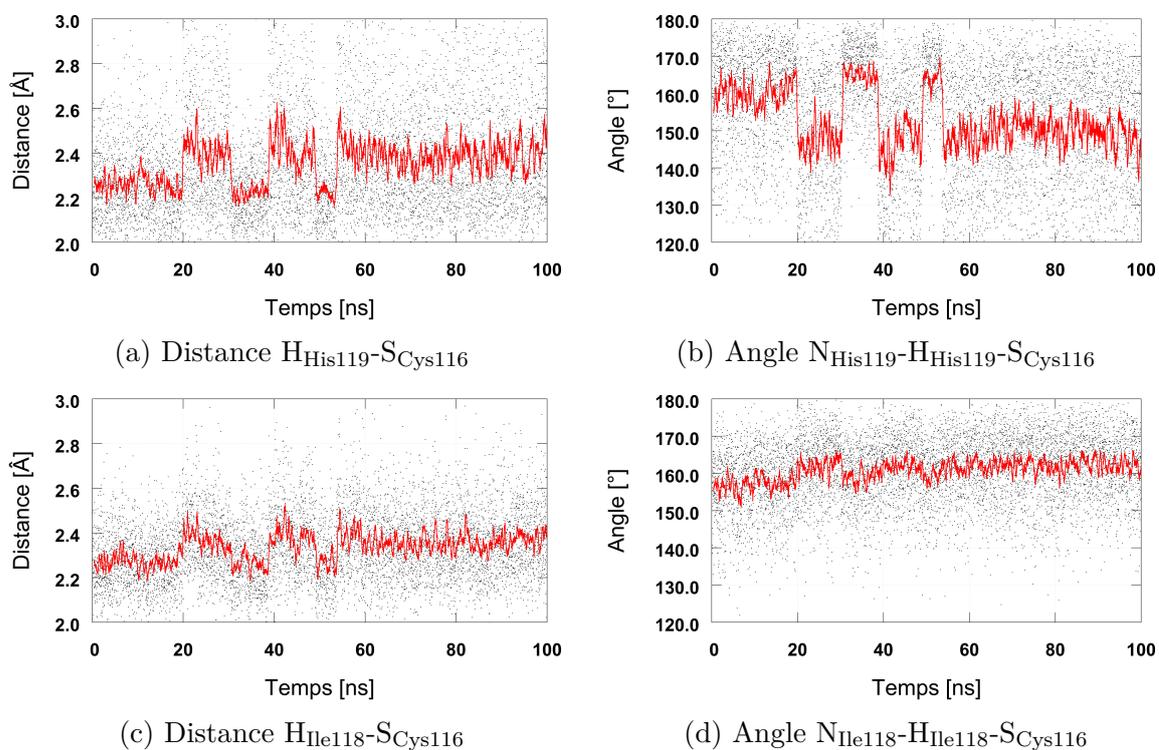


Figure 4.16 – Distances hydrogène-soufre et angle azote-hydrogène-soufre des liaisons hydrogène $\text{His}^{119}\text{-Cys}^{116}$ et $\text{Ile}^{118}\text{-Cys}^{116}$ au cours du temps (points noir) pour le mutant N117A. Les moyennes glissantes sur 30 points sont représentées en lignes rouge.

	Occurrence/S2		Occurences/S1
Forme <i>S2</i> et <i>double</i>	51%	Forme <i>S1</i> et <i>double</i>	16%
Forme <i>S2</i> et <i>118</i>	5%	Forme <i>S1</i> et <i>118</i>	20%
Forme <i>S2</i> et <i>119</i>	36%	Forme <i>S1</i> et <i>119</i>	19%
Forme <i>S2</i> et liaison H	92%	Forme <i>S1</i> et liaison H	54%
Forme <i>S2</i> et <i>aucune</i>	8%	Forme <i>S1</i> et <i>aucune</i>	46%
Aucune corrélation S2 et liaison H	54%	Aucune corrélation S1 et liaison H	71%

 Tableau 4.10 – Corrélation entre les liaisons hydrogène et les conformations *S1/S2*.

de $162 \pm 7^\circ$ dans ces conditions. Lorsque la liaison hydrogène n'est pas présente, 56% du temps, les distances $N_{\text{He118}}\text{-}S_{\text{Cys116}}$ et $H_{\text{He118}}\text{-}S_{\text{Cys116}}$ ainsi que l'angle $N_{\text{He118}}\text{-}H_{\text{He118}}\text{-}S_{\text{Cys116}}$ prennent des valeurs moyennes respectivement de $3.40 \pm 0.18 \text{ \AA}$, $2.56 \pm 0.19 \text{ \AA}$ et $139 \pm 5^\circ$.

Il est important de noter que ces conditions étant différentes de la forme sauvage, la comparaison directe n'est pas possible. Ces conditions ne servent qu'à permettre de corréler ou non les liaisons hydrogène et les formes *S1* et *S2* du *squelette117-119*.

Comme pour la forme sauvage, le système peut être dans la conformations *double*, *118*, *119*, ou *aucune*. Dans le tableau 4.10, nous représentons les corrélations entre les différentes conformations.

Dans ce mutant, lorsque le système est dans la conformation *S2*, il y a à 92% une liaison hydrogène, alors que dans la forme sauvage cette même valeur était de 81%. Ces 92 % sont divisés entre 51% du temps la conformation *double*, 5% la conformation *118* et 36% la conformation *119*. Comparativement à la forme sauvage, la liaison H avec His¹¹⁹ semble beaucoup plus présente (87% contre 59% dans la forme sauvage) lorsque le système est dans la conformation *S2*.

La grande différence dans ce mutant réside dans la conformation *S1*, qui dans le cas de la forme sauvage n'était pas la conformation favorisant les liaison hydrogène (67% de formes *S1* sont sans liaison hydrogène). Pour cette mutation, il ne semble pas d'avoir de corrélation particulière, la liaison hydrogène peut avoir également lieu dans la forme *S1*

(seulement 46% de formes *S1* sont sans liaison H). Les deux liaisons H avec His¹¹⁹ et Ile¹¹⁸ sont en proportion équivalente, respectivement de 35% et 36% du temps dans la forme *S1*.

La forme *S2* favorise quant à elle toujours les liaisons hydrogène entre le soufre de Cys¹¹⁶ et les groupement (N-H)_{pepti} de Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹. Les deux liaisons, dans cette forme, sont présentes à 87% et 56% pour His¹¹⁹ et Ile¹¹⁸ respectivement. Nous émettons l'hypothèse que la perte des liaisons hydrogène de la chaîne latérale de Asn¹¹⁷ et son remplacement par une alanine permet d'avoir un squelette peptidique "plus mobile". Cette mobilité permettant aux liaisons hydrogène d'évoluer avec une plus grande indépendance vis-à-vis du squelette₁₁₇₋₁₁₉ : le squelette n'étant plus contraint par les liaisons H de la chaîne latérale de Asn¹¹⁷, sa position étant différente, et peut s'acclimater plus facilement des conformations liées à la rotation de χ_{118} et aux conformations *S1/S2*.

En s'affranchissant des conditions spécifiques aux conformations pour les liaisons hydrogènes et en prenant les conditions classiques : une distance donneur-accepteur de 3.5 Å et un angle donneur-H-accepteur de 150 °, nous retrouvons les trois catégories dite liaison H "forte", liaison H "faible" et aucune liaison H. Pour la liaison hydrogène entre His¹¹⁹ et Cys¹¹⁶, nous la trouvons présente à 61% soit très proche de la valeur dans la forme sauvage. Elle décomposée en 52% de "forte" et 9% de plus "faible", 39% sans liaison hydrogène. Pour la liaison H entre Ile¹¹⁸ et Cys¹¹⁶ elle est présente à 78% (contre 55% du temps dans la forme sauvage), avec une proportion de 44% de forte et 34% de "fiable", et 22% sans liaison H.

Pour ce mutant nous pouvons conclure que la liaison hydrogène Ile¹¹⁸-Cys¹¹⁶ est beaucoup plus présente que dans la forme sauvage. De plus si les les conformations induites par la rotation de χ_{118} jouent toujours un rôle dans la force des liaisons hydrogène (estimées avec la distance et l'angle de liaison H), il est beaucoup moins marqué et impact moins la forme *S1* sensée ne pas favoriser les liaisons H (comparé à la forme sauvage). Ce dernier peut s'expliquer par une plus grande souplesse du squelette peptidique.

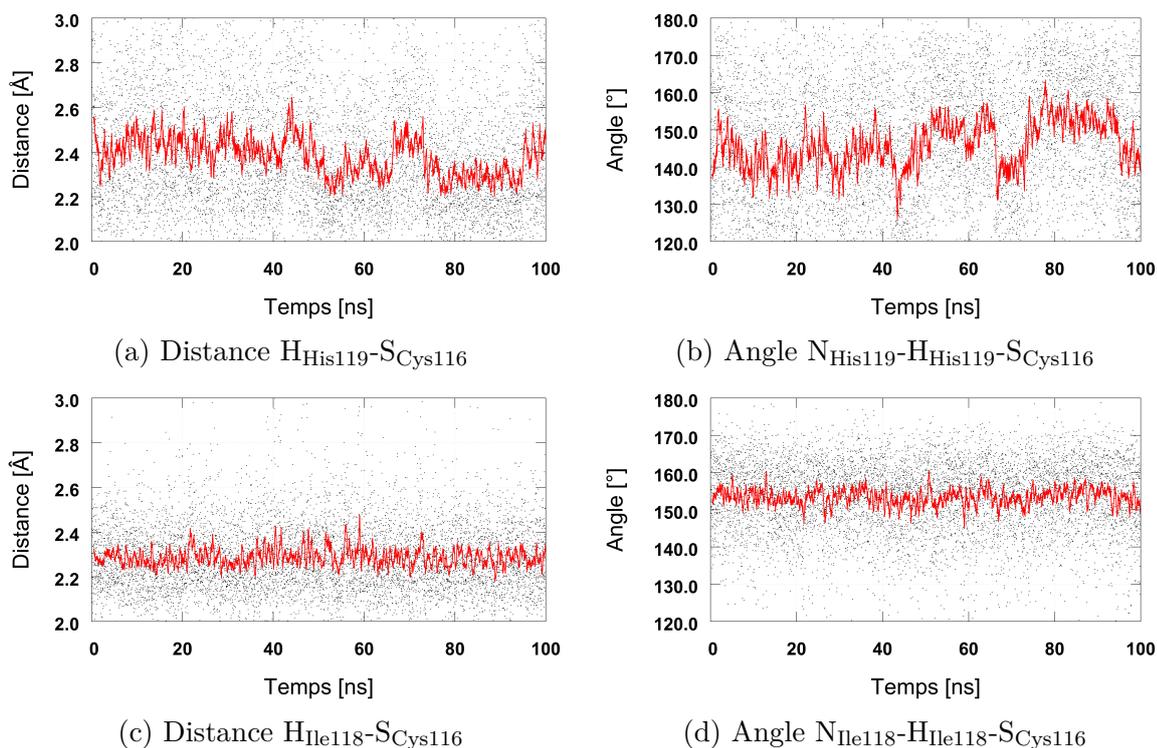


Figure 4.17 – Distances hydrogène-soufre et angle azote-hydrogène-soufre des liaisons hydrogène $\text{His}^{119}-\text{Cys}^{116}$ et $\text{Ile}^{118}-\text{Cys}^{116}$ au cours du temps (points noir) pour le mutant I118S. Les moyennes glissantes d'une moyenne de 30 points sont représentées en lignes rouge.

I118S. Pour le mutant I118S nous avons vu qu'il n'y a pas de forme *S1* et *S2*. En reportant les distances et angles caractéristiques de ces deux liaisons hydrogène dans la figure 4.17, nous pouvons voir que ces conformations sont inexistantes. Les liaisons hydrogènes possèdent toujours des conformations, mais cela ne dépend plus des formes *S1* ou *S2*. Le *squelette*¹¹⁷⁻¹¹⁹ n'est plus dépendant de la rotation de χ_{118} , la chaîne latérale de la sérine étant plus petite que la chaîne latérale de l'isoleucine et par extension, les liaisons hydrogène impliquant His^{119} et Ser^{118} sont plus "mobiles".

En l'absence de conformation liés aux liaisons hydrogène avec le soufre de Cys^{116} , que ce soit des conformations impliquées par des dièdres (*S1* ou *S2*) ou par des liaisons H (*double*, *118,119* ou *aucune*), nous ne pouvons pas pour ce mutant définir clairement des catégories liaison H "forte" ou liaison H plus "faible". Néanmoins, il est possible de définir avec ou sans liaison H. Pour la liaison impliquant His^{119} , elle est présente 35% du temps,

soit presque deux fois moins que dans la forme sauvage. *A contrario*, celle impliquant Ser118 par son groupement amide est présente à 66% soit 10% de plus que dans la forme sauvage.

Dans ce mutant le soufre de Cys¹¹⁶ peut avoir une liaison hydrogène supplémentaire venant du groupement alcool de la sérine 118. Cette liaison hydrogène est très rare et est dépendante de la configuration *N1*. Cette liaison hydrogène n'est présente que 2% du temps. Quand elle est présente, la distance O_{Ser118}-S_{Cys116} prend une valeur moyenne de 3.15 ± 0.16 Å, la distance H_{Ser118}-S_{Cys116} prend une valeur moyenne de 2.21 ± 0.17 Å et la valeur moyenne pour l'angle O_{Ser118}-H_{Ser118}-S_{Cys116} est de 162 ± 7 °. Nous étudierons plus tard l'impact de cette liaison H supplémentaire sur la liaison Fe-S.

La différence majeur dans ce mutant est sur la liaison hydrogène impliquant His¹¹⁹. Nous avons vu d'après l'étude sur les dièdres en fonction des mutations (Tableau 4.5) que l'impact majeur de la mutation était sur le dièdre ϕ_{119} , ces deux données coïncident et montrent une fois de plus qu'il y a corrélation entre ces données. De plus, ce mutant possède une liaison H supplémentaire quoi que rare.

K48I. Le mutant K48I possède exactement le même comportant que la forme sauvage. Les liaisons H impliquant His¹¹⁹ et Ile¹¹⁸ se retrouve dans les mêmes proportions, avec des conformations de liaison H "forte" et "faible". Cela conforte le fait que la mutation de la lysine 48 n'impacte pas le squelette₁₁₇₋₁₁₉ : les conformations *S1* et *S2*, qui se retrouvent identiques à la forme sauvage.

Conclusions. De cette étude nous pouvons souligner le fait que les liaisons hydrogènes sur le soufre de Cys¹¹⁶, via les groupements amides du squelette peptidique, étaient impactés par la conformation de ce même squelette peptidique, qui varie avec la rotation de la chaîne latérale du résidu Ile¹¹⁸ (χ_{118}). La présence de cette chaîne latérale CH(CH₃)(CH₂CH₃) encombrante influence le squelette peptidique *via* deux conformations (dans la forme sauvage, et les mutants N117A et K48I uniquement), qui à leur tour fa-

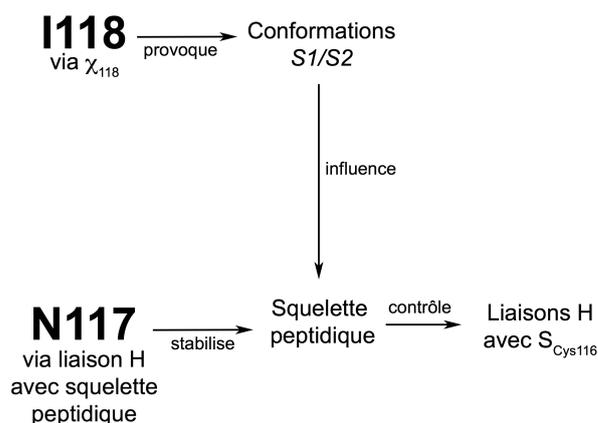


Schéma 4.1 – Relations entre les résidus I118 et N117 et les liaisons hydrogènes avec le soufre de Cys¹¹⁶.

vorisent ou non des liaison H. Dans le mutant I118S, le remplacement de ce résidu Ile¹¹⁸ par un résidu plus petit fait que sa rotation n'a plus d'impact sur les liaisons hydrogène. Également, les liaisons hydrogène que font les acides aminés du squelette peptidique *via* leur chaîne latérale (Asn¹¹⁷) ont un impact sur la conformation du squelette et leur disparition, dans le mutant N117A, provoque une adaptation du squelette peptidique facilitant des liaisons hydrogènes avec le soufre de Cys¹¹⁶ peu importe sa conformation. Les relations sont présentées schéma 4.1.

Dans la dernière partie, nous allons aller plus en détail pour essayer de comprendre les effets des liaisons hydrogène impliquant S_{Cys116} sur la liaison Fe-S, et par effet *trans* la liaison Fe-Op.

4.1.3.4 Relations entre liaisons H-S_{Cys116} et liaison Fe-S_{Cys116}

Nous avons vu que les liaisons hydrogène n'avait qu'un très faible impact sur la liaison Fe-S sur la forme sauvage où avions utilisé les conformations des liaisons hydrogène correspondant aux conformations *S1/S2*, comportant donc deux conformations : liaison "forte" ; liaison plus "faible" et aucune. Pour s'affranchir de cette situation, nous allons ici utiliser les critères classiques de liaison hydrogène précédemment utilisés (distance accepteur-donneur inférieure à 3.5 Å et un angle accepteur-hydrogène-donneur supérieur à 150 °).

Conformations	Forme Sauvage	N117A	I118S
237^{SER}	Néant	Néant	2.463
237	2.431	2.439	2.423
119^{SER}	Néant	Néant	2.474
119	2.428	2.436	2.421
118^{SER}	Néant	Néant	2.458
118	2.438	2.441	2.428
0^{SER}	Néant	Néant	2.450
0	2.428	2.435	2.427

Tableau 4.11 – Valeurs des distances Fe-S (en Å) en fonction des conformations de liaisons hydrogène pour la forme sauvage et les mutants N117A et I118S au niveau MM.

Nous reprendrons aussi la forme sauvage en plus des mutants N117A, I118S. Le mutant K48I présentant aucune différences avec la forme sauvage ne sera pas décrit ici.

Nous redéfinissons plusieurs conformations : 237 lorsque qu'il y a les deux liaisons H, 118 et 119 lorsqu'il y a respectivement uniquement liaison H avec Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹, et 0 lorsque aucune liaison H n'est présente. Pour I118S, il y a également à prendre en compte la liaison avec le groupement alcool de Ser¹¹⁸ : lorsqu'elle est présente, un _{SER} sera ajouté à la référence. Dans le tableau 4.11, nous référençons les valeurs des distances Fe-S.

Dans la forme sauvage ainsi que le mutant N117A, la liaison H avec Ile¹¹⁸ semble avoir le plus d'impact sur la distance Fe-S, et son effet est 'contré' lorsque la liaison H avec His¹¹⁹ est présente également (forme 237). De façon surprenante lorsque la distance Fe-S est la plus longue (dans la forme 118), la liaison H avec Ile¹¹⁸ est plus longue (distance donneur-accepteur égale à 3.34 Å) que lorsqu'elle est dans la forme 237 , avec une distance donneur-accepteur de 3.29 Å dans la forme sauvage. La distance donneur-accepteur pour His¹¹⁹ est la même dans les deux forme 237 et 119 , et est égale à environ 3.19 Å. Dans tous les cas, l'angle N-H-S est égal à 163 pour His¹¹⁹ et 160 pour Ile¹¹⁸. Pour le mutant N117A, la tendance est identique : une liaison H plus longue avec Ile¹¹⁸ donnera une distance Fe-S plus longue. Les valeurs caractéristiques de ces liaisons hydrogène en fonction de la conformation (237 ou $118/119$) sont indiquées dans le tableau 4.12.

	Forme Sauvage		N117A		I118S	
	237	118/119	237	118/119	237	118/119
Distance (Å)						
N-S (118)	3.29	3.34	3.25	3.30	3.21 (3.21)	3.20 (3.22)
N-S (119)	3.18	3.19	3.19	3.21	3.20 (3.20)	3.18 (3.18)
Angle (°)						
N-H-S (118)	160	160	162	163	158 (158)	158 (159)
N-H-S (119)	164	163	164	163	161 (160)	161 (159)

Tableau 4.12 – Valeurs caractéristiques des liaisons hydrogène entre le soufre et les résidus 118 et 119 en fonction des conformations 237 et 118/119 au niveau MM. Pour le mutant I118S, les valeurs entre parenthèses correspondent à la présence en plus de la liaison hydrogène avec la fonction alcool de Ser¹¹⁸.

Dans le cas du mutant, la liaison H avec Ser¹¹⁸ n'a plus autant d'importance dans la variation de la distance Fe-S, seule la troisième liaison H avec l'alcool de Ser¹¹⁸ permet d'allonger la distance Fe-S.

Ces résultats nous poussent à deux conclusions. Soit le modèle MM ne rend pas compte de la variation de la distance de la liaison Fe-S à cause de la paramétrisation de cette distance. Les fines variations de la distance des liaisons H avec le soufre ne sont pas assez fortes, car contrairement à la référence [23], où les petits modèles possèdent ou non le résidu complet portant la liaison H (I118 ou N119), nous avons ici toujours ces résidus qui peuvent avoir un impact soit par une liaison hydrogène plus ou moins forte, soit par juste un effet électrostatique. Par ailleurs, nous pouvons avoir un effet stérique dans ces liaisons.

4.1.4 Autour du ligand ⁻OOH et son réseau de liaisons hydrogène

Dans la partie précédente nous avons vu l'impact des mutations sur la partie "enfouie" du site actif, c'est-à-dire du côté de la cystéine 116, en *trans* de la sixième coordination

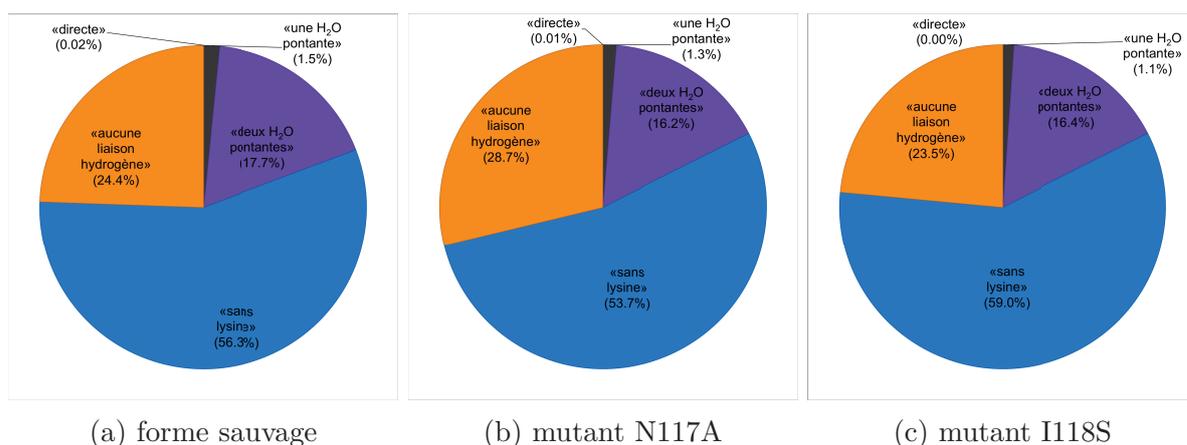


Figure 4.18 – Distribution des conformations de l'oxygène proximal en fonction des mutations.

libre du fer où les ligands $\text{OO}^{\bullet-}$, OOH^- ou H_2O_2 sont situés. Dans cette partie, nous allons étudier le côté du ligand, à l'entrée du site actif, là où se trouve la lysine 48 dans la forme sauvage. Des mutants étudiés seul le mutant K48I, où la lysine est remplacée par une isoleucine possède la mutation de ce côté, les autres mutants (N117A et I118S) étant du côté "cystéine" du site actif.

Pour analyser le réseau de liaisons hydrogène, nous reprenons l'étude et les paramètres utilisés lors de cette même étude pour la forme sauvage mais nous n'étudierons que le deuxième intermédiaire réactionnel $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$, les mutations ayant de l'impact principalement sur cet intermédiaire. Nous reportons dans la figure 4.18 les proportions des différentes configurations : «directe», «une H₂O pontante», «deux H₂O pontantes», «sans lysine» et «aucune liaison hydrogène» pour la forme sauvage et les mutants N117A et I118S.

Globalement, la distribution est similaire pour les liaisons H avec l'oxygène proximal. Il y a tout de même de légères différences. Pour la configuration «aucune liaison hydrogène», nous avons respectivement pour la forme sauvage, le mutant N117A et le mutant I118S, $24.4 \pm 2.4\%$, $28.8 \pm 3.1\%$ et $23.5 \pm 2.0\%$. Il y aurait un peu moins de liaison hydrogène avec une molécule d'eau dans le cas du mutant N117A. Pour la forme «sans lysine», nous trouvons des valeurs de $56.3 \pm 3.0\%$, $53.7 \pm 2.3\%$, $59.0 \pm 2.2\%$ respectivement pour la

forme sauvage, le mutant N117A et le mutant I118S. La forme «deux H₂O pontantes» est plus présente dans la forme sauvage, $17.7 \pm 1.1\%$ que dans les mutants N117A et I118S, respectivement à $16.2 \pm 1.8\%$ et $16.4 \pm 1.0\%$. Dans le cas de la forme «une H₂O pontante» dans la forme sauvage, elle est présente à $1.6 \pm 0.7\%$ et dans les mutants N117A et I118S, elle est présente à $1.3 \pm 0.4\%$ et $1.1 \pm 0.1\%$ respectivement. Pour la forme «directe», elle n'est pas présente dans le mutant I118S, alors qu'elle était présente à $0.02 \pm 0.05\%$ dans la forme sauvage et moitié moins pour le mutant N117A, soit $0.01 \pm 0.01\%$.

Ces fortes variations pour la forme «directe» s'expliquent par le fait que dans certaine dynamique MM de la forme sauvage, nous avons la forme «directe» à 0.1% sur 100 ns alors que pour d'autres dynamiques cette forme n'a pas été isolée. Sur un même nombre de dynamiques, le mutant N117A possède moitié moins de forme «directe» et le mutant I118S n'en possède pas. La faible proportion de configuration «directe» (entre 0.1 et 0.01%) est soumise à d'importante variations qui ne nous permette pas cerner l'impact des mutations : un très grand nombre de dynamiques pour réduire l'erreur statistique à une valeur inférieure à la valeur de la distribution permettrait une conclusion plus solide.

Pour les autres formes, cette fois, nous pouvons remarqué un léger impact des mutations. Le mutant N117A possède moins de liaison H impliquant l'eau ($71.2 \pm 3.1\%$) que la forme sauvage ($75.5 \pm 2.5\%$) ou le mutant I118S ($76.5 \pm 2.0\%$) où la distribution est équivalente. Si pour la forme «une H₂O pontante» la distribution est similaire entre la forme sauvage et les mutants, la différence est plus marquée pour la configuration «deux H₂O pontantes», les mutants (N117A et I118S) possèdent une proportion moindre de cette forme ($\approx 18\%$ vs $\approx 16\%$). La différence entre les deux mutants vient de la configuration «sans lysine» où elle est plus présente dans le mutant I118S que dans la forme sauvage, qui est elle même plus présente que dans le mutant N117A.

Par similarité, les liaisons H avec l'oxygène distal obéissent à la même tendance (figure 4.19).

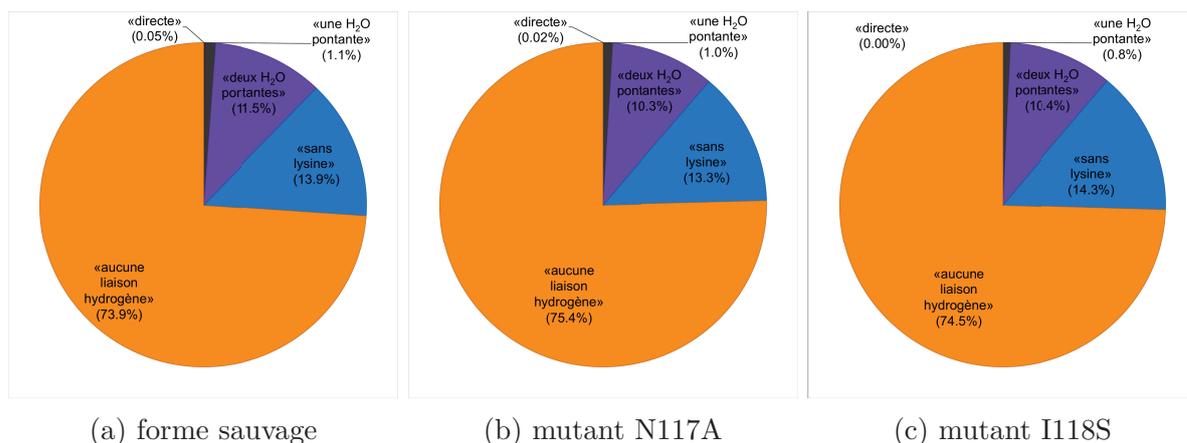


Figure 4.19 – Distribution des conformations de l’oxygène proximal en fonction des mutations.

Dans le cas du mutant K48I, la situation est différente : le remplacement de la lysine par une isoleucine apolaire ne permet pas d’utiliser la méthodologie précédente. Dans ce mutant, nous avons juste les configurations «aucune liaison hydrogène» et «liaison hydrogène». Pour l’oxygène proximal, il est accepteur de liaison H avec H₂O dans $77.4 \pm 1\%$ des cas, proche de la valeur de $75.5 \pm 2.5\%$ de la forme sauvage ou de $76.5 \pm 2.0\%$ du mutant I118S.

Cette analyse nous a permis de voir quelques différences de répartition du réseau de liaison hydrogène avec la lysine (lorsqu’elle est présente) mais ne nous permet pas de conclure quant à la différence de réactivité sur la protonation de l’espèce OOH^- . Néanmoins, un point important à souligner est que le mutant K48I avec son isoleucine encombrante apolaire ne gêne pas l’accessibilité du ligand OOH^- pour les molécules d’eau, la proportion de liaison H étant sensiblement identique.

4.1.5 Analyse conformationnelle : conclusions

Les deux études précédentes (impact des mutations sur le squelette peptidique, du côté enfoui, du site actif et impact sur le réseau de liaison H avec le ligand OOH^-) nous ont permis de noter des différences entre la forme sauvage et les mutations. Si la distribution

du réseau H avec le ligand OOH^- est sensiblement la même, il y a des différences notables dans le squelette peptidique. Ce même squelette influence les liaisons hydrogènes dans lesquelles le soufre de Cys¹¹⁶ qui auraient un effet sur la distance Fe-S, et à son tour sur la distance Fe-Op. Également, la mutation I118S "retirant" les conformations du squelette, change la distribution des liaisons hydrogène avec le soufre de Cys¹¹⁶. Si la relation entre conformations du squelette et liaison H ainsi que la relation entre distance Fe-S et la distance Fe-Op a été clairement définie, le pont entre les deux n'a pas été correctement défini. Une analyse plus complète sur des petits modèles QM est nécessaire, en partant des extrêmes : les liaisons hydrogène de Ile/Ser¹¹⁸ et His¹¹⁹ avec le soufre de Cys¹¹⁶ dans leur forme "la plus favorable" et la "moins favorable" dans la forme sauvage et les mutants. Si cette partie était principalement sur la cause de la différence de la réactivité d'un point de vue conformationnel, nous nous sommes également intéressé à la réactivité en elle-même : nous avons choisis deux mutants N117A et K48I, que nous étudierons en métadynamique QM/MM pour comprendre l'effet des mutations sur la réactivité native dans un premier temps, et non native dans un second temps, et ainsi comparer avec les données du chapitre 3 sur la forme sauvage.

4.2 La réactivité des mutants : approche métadynamiques

Dans cette dernière partie, nous présenterons la réactivité des mutants, et donc nous utiliserons la métadynamique au niveau QM/MM qui nous a déjà permis d'étudier la forme sauvage de la SOR. Deux mutants ont été choisis pour cette étude. Le mutant K48I, qui voit sa lysine 48 mutée en isoleucine, afin de confirmer le rôle de la lysine 48 dans la seconde protonation. Il a été choisi également pour connaître le mécanisme de la "disparition" de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, qui contrairement à la forme sauvage, ne conduit pas à la formation de H_2O_2 : expérimentalement il est observé la disparition

de $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ sans formation de H_2O_2 . A l'inverse, le mutant N117A a été choisi car nous avons à notre disposition des données expérimentales (non-publiées) qui attestent de la formation d'une espèce de type fer-oxo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) et que cette fois, la mutation a lieu en *trans* du ligand OOH^- , du côté du squelette peptidique proche de Cys¹¹⁶. La compréhension de la réactivité modifiée (non-native) de ce mutant permettrait d'élucider qualitativement le rôle des liaisons hydrogène sur le soufre de la cystéine 116.

Dans le chapitre 3, nous étions partis de deux conformations : «directe» et «une H_2O pontante». Nous avons démontré l'existence de deux mécanismes donnant H_2O_2 soit *via* la dissociation de l'hydroperoxyde suivi de sa protonation, soit au contraire par la protonation puis le départ du substrat. Nous avons montré que le premier mécanisme (dissociation-protonation) était celui privilégié car présentant l'énergie d'activation la plus faible. L'autre mécanisme impliquait une protonation du ligand par une molécule d'eau assistée par la lysine 48, avec une barrière d'activation plus élevée. Dans ces deux conformations, le système était dans la configuration *S2/N2* mais par contre seule la liaison hydrogène entre His¹¹⁹-Cys¹¹⁶ est présente, mais pas la liaison Ile¹¹⁸-Cys¹¹⁶.

Les études de métadynamiques dans ce chapitre seront basées sur la même méthodologie que celle utilisée dans le chapitre 3 : des géométries de dynamique MM seront extraites ainsi que leurs jeux de vitesses correspondantes. Une première équilibration en QM/MM sera effectuée pendant 5 ps pour ensuite réaliser les métadynamiques. Les paramètres QM/MM seront identiques à ceux de l'étude sur la forme sauvage.

4.2.1 N117A : mutation côté soufre de Cys¹¹⁶

Pour le mutant N117A, nous sommes partis de deux conformations de départ : une dans la forme «directe» et une dans la forme «une H_2O pontante». Comme dans le cas de la forme sauvage, deux chemins réactionnels seront explorés : soit conduisant à la formation de H_2O_2 (réactivité native), soit la rupture de la liaison Op-Od, pour former une espèce

Distance (Å)	Fe-Op	S-Fe	Op-Od				
«directe»	1.99 ± 0.06	2.46 ± 0.08	1.46 ± 0.03				
«une H ₂ O pontante»	1.95 ± 0.06	2.45 ± 0.07	1.45 ± 0.03				
Angle (°)	Fe-Op-Od	Op-Od-Hd	C _β -S-Op-Od	Fe-Op-Od-Hd			
«directe»	122 ± 5	100 ± 4	-87 ± 10	-132 ± 11			
«une H ₂ O pontante»	122 ± 6	101 ± 1	-96 ± 13	-138 ± 13			
Dièdre (°)	ψ_{119}	ϕ_{119}	ψ_{118}	ϕ_{118}	ψ_{117}	ϕ_{117}	χ_{118}
«directe»	30 ± 10	-118 ± 9	-32 ± 10	-108 ± 10	-31 ± 11	-51 ± 10	-50 ± 7
«une H ₂ O pontante»	18 ± 11	-133 ± 7	8 ± 9	-131 ± 7	-30 ± 11	-50 ± 11	61 ± 10

Tableau 4.13 – Les distances et les angles importants (courbure et dièdre) pour les espèces Fe³⁺–OOH à partir de nos simulations QM/MM en moyenne sur les deux dernières picosecondes. La conformation «directe» correspond au point de départ '4593B'. La conformation «une H₂O pontante» correspond provient de '2028B'.

fer-oxo.

Pour la configuration «une H₂O pontante», nous partons de l'image '2028B', impliquant la chaîne B. Pour la configuration «directe», l'image est '4593B', impliquant également la chaîne B. Une dynamique QM/MM en partant de l'image '6198A' impliquant cette fois la chaîne A et correspondant à une configuration «directe» a été aussi réalisée. Elle présente les mêmes caractéristiques géométriques que la forme '4593B', comme pour la forme sauvage, les chaînes A et B sont identiques pour le mutant N117A. Le site A étant de nouveau identique au site B, seul les dynamiques provenant des images '2028B' et '4593B' seront utilisées pour analyse et comme point de départ en métadynamique (*vide infra*).

Comme pour la forme sauvage, le système met environ 3 ps à s'équilibrer pour la transition MM vers QM/MM, et seules les deux dernières picosecondes seront présent en compte pour les caractéristiques géométriques ou électroniques ainsi que les points de départs des métadynamiques suivantes. Le tableau 4.13 références les distances Fe-Op, S-Fe, Op-Od ainsi que les angles caractéristiques. Les angles dièdres du squelette₁₁₇₋₁₁₉ sont également référencés.

Comparée à la forme sauvage, la distance Fe-Op est identique indépendamment de la conformation «directe» ou «une H₂O pontante». Pour la conformation directe, la distance Fe-Op est de 1.99 ± 0.06 Å dans N117A et 1.99 ± 0.05 Å dans la forme sauvage. Dans le cas de la conformation «une H₂O pontante», elle est de 1.95 ± 0.06 Å et de 1.96 ± 0.05 Å, respectivement pour N117A et la forme sauvage. Entre la forme sauvage et le mutant N117A, nous avons une distance S-Fe qui est plus courte dans N117A ($-0,03$ Å). Par exemple, dans le cas de la conformation «directe», la distance Fe-S est de 2.46 ± 0.08 Å dans le mutant N117A et d'environ 2.49 ± 0.10 dans la forme sauvage. L'angle Fe-Op-Od est également plus ouvert avec une valeur de 122° , à comparer au 117° de la forme sauvage. L'angle dièdre C_β-S-Op-Od prend une valeur négative dans les deux configurations, ce qui correspondait seulement à la configuration «une H₂O pontante» dans la forme sauvage. Les systèmes de départ sont soit dans la conformation *S1* pour la configuration «une H₂O pontante», soit dans la conformation *S2* pour la configuration «directe».

4.2.1.1 Réactivité native de N117A

Pour l'étude la réactivité native, nous avons utilisé les mêmes paramètres pour les métadynamique sur l'étude de la forme sauvage. Les mêmes variables collectives ont été utilisées : la distance Fe-Op et la distance N_{lys}-H_{lys} dans le cas de la conformation «directe», ou la distance O_{eau}-H_{eau} dans le cas de la conformation «une H₂O pontante». Le niveau de théorie QM/MM est identique également, au niveau B3LYP avec des bases de qualité DZVP.

Les paramètres de la métadynamiques *Well-Tempered* sont également identiques : ΔT avec une valeur de 6000 K, la hauteur des Gaussiennes fixée à $W = 1.0$ kcal mol⁻¹ et la largeur fixée à $\sigma = 0.05$ Å. Le dépôt des gaussiennes (τ_G) se fait toutes les 10 fs comme pour l'étude de la forme sauvage. Comme pour la forme sauvage, nous utiliserons un potentiel de répulsion quadratique avec une constante K égale à 500 kcal mol⁻¹ en limitant la distance Fe-Op à 3.5 Å et les distances N_{lys}-H_{lys} et O_{eau}-H_{eau} limitée à 3.0 Å.

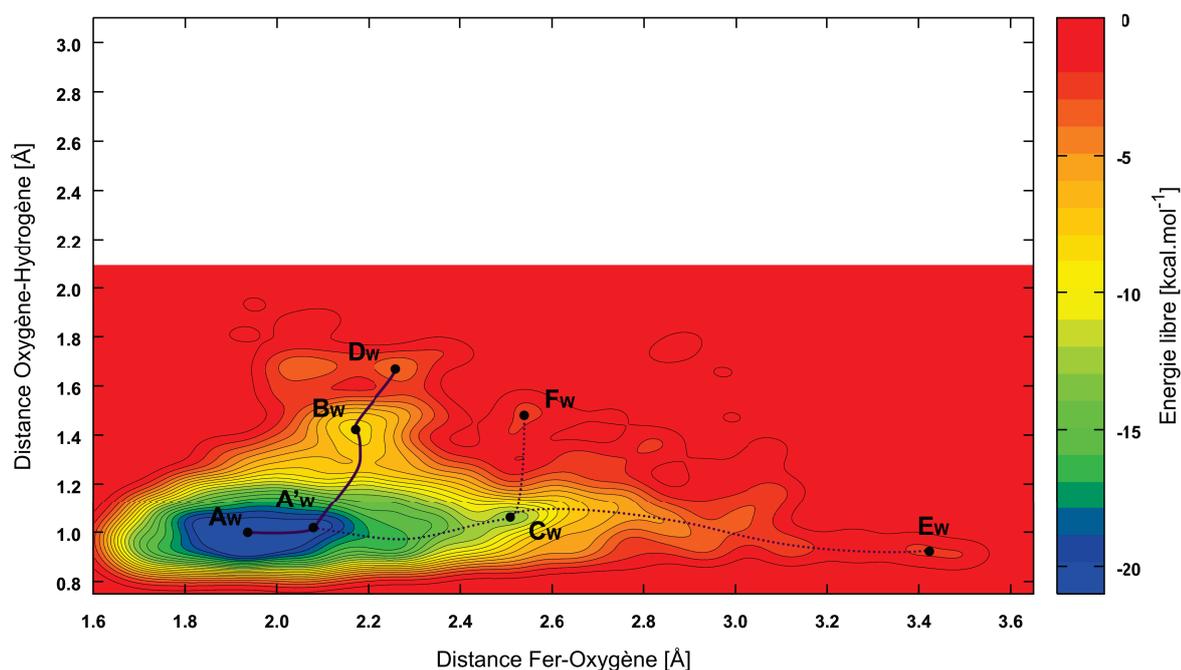


Figure 4.20 – Surface d'énergie libre pour la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ avec la conformation «une H_2O pontante» en fonction des CV sélectionnées. Le chemin de réaction présentant la barrière d'activation la plus faible est représenté sous la forme d'une ligne noire continue. Un chemin alternatif est montré en ligne pointillée.

Conformation «une H_2O pontante». La surface d'énergie libre pour la conformation «une H_2O pontante» a été reconstruite après un temps de simulation de 7.5 ps (soit après un ajout de 750 gaussiennes) et est représentée figure 4.20. Comme pour la forme sauvage, la métadynamique est 'courte' et les produits non-définis car le réseau de liaison hydrogène entre les molécules d'eau avoisinantes provoquent des sauts de protons non-contrôlés, et non-pertinents, poussant le système dans des puits irréversibles pour ce couple de variables collectives. Néanmoins la première barrière qui, comme pour la forme sauvage, est l'étape limitante est néanmoins bien définie.

Le chemin réactionnel qui peut être déduit part du puits de départ, correspondant au point (\mathbf{A}_w) où la distance Fe-Op est de 1.95 Å et la distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$ égale à 0.95 Å. Également la distance $\text{H}_{\text{eau}}\text{-Op}$ est de 1.56 Å. Le point (\mathbf{A}'_w) représente le point à partir duquel deux chemins réactionnels se distinguent. Le système peut évoluer d'un côté vers l'intermédiaire (\mathbf{B}_w), avec une barrière de 15.0 kcal mol⁻¹ : la protonation du ligand

OOH^- a lieu : la distance $\text{H}_{\text{eau}}\text{-Op}$ est de 1.03 Å et la distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$ est de 1.43 Å. La distance Fe-Op subit une légère élongation passant de 1.95 Å à 2.16 Å. Ce processus s'accompagne d'un transfert instantané de proton entre la lysine 48 et l'hydroxyde OH^- formé. La distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{lys}}$ est de 0.99 Å et la distance $\text{N}_{\text{lys}}\text{-H}_{\text{lys}}$ est de 1.70 Å au point (**B_w**). Le système peut ensuite évoluer vers l'intermédiaire (**D_w**), où les distances Fe-Op , $\text{H}_{\text{eau}}\text{-Op}$, $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$, $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{lys}}$ et $\text{N}_{\text{lys}}\text{-H}_{\text{lys}}$ sont respectivement de 2.25 Å, 0.97 Å, 1.68 Å, 1.08 Å et 1.50 Å. Cet intermédiaire est très proche de l'intermédiaire (**B_w**) : le produit H_2O_2 commence à se dissocier. Cette barrière reste élevée pour une simple dissociation, qui se faisait de manière avec une barrière de 1 kcal mol⁻¹ dans la forme sauvage. Enfin aucune évolution nette après la formation de cet intermédiaire (**D_w**) ne peut être décrite : soit le système retourne vers le point de départ (**A_w**), soit le système va évoluer le long de la variable $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$ en protonant une molécule d'eau annexe engendrant des multiples sauts de proton ce qui donne une estimation de l'énergie libre incorrecte pour ce chemins réactionnel au delà de l'intermédiaire (**D_w**).

Pour ce chemin réactionnel, une première hypothèse est que l'intermédiaire (**D_w**) ne correspondrait pas à un vrai minimum intermédiaire correspondant aux valeurs de ce couple de CV. Cet intermédiaire de haute énergie est dû à une exploration *via* un seul aller retour entre (**B_w**) et (**D_w**) et l'implication probable d'une variable non suivie : la distance Fe-S . Cette distance qui est dépendante de la distance Fe-Op est dans les espèces (**A_w**), (**B_w**) et (**D_w**) respectivement de 2.45 Å, 2.38 Å et 2.44 Å. Si la distance Fe-S c'est raccourcie entre les intermédiaires (**A_w**) et (**B_w**), en adéquation avec l'élongation de la distance Fe-Op entre ces intermédiaires, il n'en est pas de même pour l'intermédiaire (**D_w**) ce qui peut expliquer cette barrière de 5 kcal mol⁻¹.

Le système partant de (**A'_w**) peut également subir une élongation de la distance Fe-Op vers un intermédiaire (**C_w**). La distance Fe-Op est alors de 2.51 Å et la barrière est de 10.0 kcal mol⁻¹. Cet intermédiaire correspond à une dissociation du ligand OOH^- , ce qui correspond pour la forme sauvage au chemin de protonation partant de la forme

«directe». Si la barrière est plus faible que pour la formation de l'intermédiaire (\mathbf{B}_W) de $5.0 \text{ kcal mol}^{-1}$, le système doit, pour former H_2O_2 , franchir une deuxième barrière de 11 kcal mol^{-1} pour rejoindre l'intermédiaire (\mathbf{F}_W). La distance Fe-Op est toujours de 2.51 \AA , et le ligand est protoné avec une distance Op- H_{eau} égale à 0.95 \AA . La lysine à également protoné l'hydroxyde formé avec une distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{lys}}$ de 1.11 \AA . Également, une barrière de $11.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ permet de former l'intermédiaire (\mathbf{E}_W) correspondant à une dissociation totale de OOH^- avec une distance Fe-Op de 3.46 \AA . Cet intermédiaire (\mathbf{E}_W) ne se fait pas protoner : l'arrangement des liaisons hydrogènes entre la lysine et la molécule d'eau n'est pas favorable, l'angle $\text{N}_{\text{lys}}\text{-H}_{\text{lys}}\text{-O}_{\text{eau}}$ est de 141° . Cet intermédiaire est exploré une seule fois et retourne vers l'intermédiaire (\mathbf{C}_W).

Comme pour la forme sauvage, la réactivité native en partant de la conformation «une H_{20} pontante» possède un mécanisme en deux étapes : une protonation de l'oxygène proximal par une molécule d'eau (qui est protonée, instantanément par la lysine), puis une dissociation de H_2O_2 . Également, comme pour la forme sauvage, les produits sont mal définis de par la variable collective $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$: si dans le système «directe» la variable $\text{N}_{\text{lys}}\text{-H}_{\text{lys}}$ produit le même effet, à savoir 'fournir un proton', le groupe ammonium de la lysine est moins mobile qu'une molécule d'eau pendant le temps de la métadynamique : le 'proton' de la lysine «directe» reste orienté vers le ligand OO^- , la molécule d'eau quant à elle peut s'orienter rapidement différemment, impliquant d'autres saut de proton que celui du chemin réactionnel et faussant la métadynamique par des *hidden collective variables*.

Conformation «directe». La conformation «directe» du mutant N117A est différente de celle de la forme sauvage, notamment par son angle dièdre $\text{C}_\beta\text{-S-Op-Od}$ (*cf.* tableau 4.13). Cet angle dièdre était d'environ $70 \pm 16^\circ$ dans la forme sauvage, et il est d'environ $-87 \pm 10^\circ$ pour le mutant N117A, nous verrons au long de la métadynamique quels sont les possibles impacts de ce changement de conformation.

Pour la conformation «directe», nous représentons la FES reconstruite après 6.0 ps (ce qui correspond à 600 Gaussiennes ajoutées) en figure 4.21. Cette fois, contrairement à la

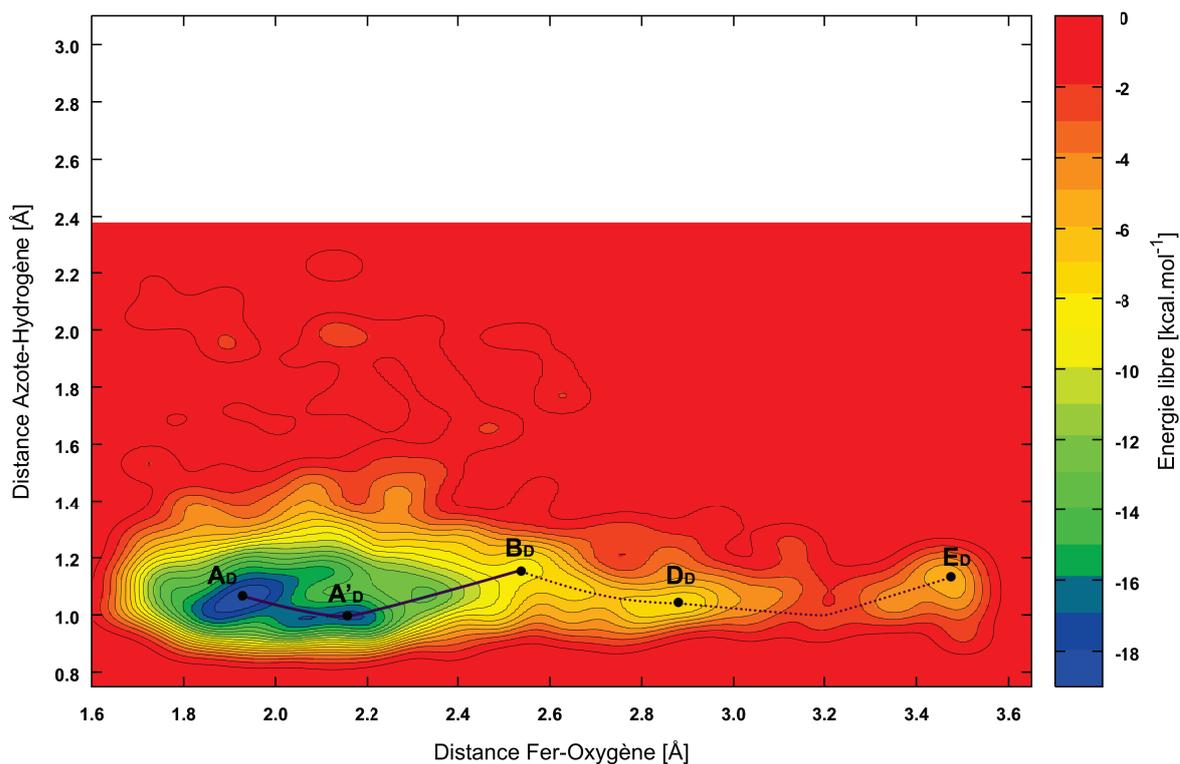


Figure 4.21 – Surface d'énergie libre pour la protonation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ avec la conformation «directe» pour le mutant N117A en fonction des CV sélectionnées. Le chemin de réaction présentant la barrière d'activation la plus faible est représenté sous la forme d'une ligne noire continue. Le chemin défini en pointillé est un des chemins possibles.

forme sauvage, le mécanisme ne semble pas aussi clairement défini.

Le système part de l'état (\mathbf{A}_D), avec une distance Fe-Op de 1.93 Å, qui évolue vers l'état (\mathbf{A}'_D), avec une élongation de la distance Fe-Op à 2.15 Å et une barrière de 2.5 kcal mol⁻¹. Contrairement à ce qui a été décrit pour la forme native, cet état (\mathbf{A}'_D) est énergétiquement plus haut de 1.5 kcal mol⁻¹ que l'état (\mathbf{A}_D). Cette différence pourrait être attribuée à deux facteurs concomitants : une conformation de la lysine et une variation du dièdre $C_\beta\text{-S-Op-Od}$ au sein du site actif. Le système évolue ensuite vers l'état (\mathbf{B}_D), avec une barrière de 9 kcal mol⁻¹. Dans cet état la distance Fe-Op est de 2.51 Å, proche de la valeur de 2.6 Å pour cet état dans la forme sauvage. La barrière est plus haute de 2 kcal mol⁻¹, ce qui rend la dissociation de OOH^- légèrement moins favorable que dans la forme sauvage sans être significativement différente. Ensuite, le système évolue vers une forme (\mathbf{C}_D) avec

une distance Fe-Op de 2.88 Å avec une barrière de 1.5 kcal mol⁻¹. Le franchissement d'une barrière supplémentaire de 5.5 kcal mol⁻¹ conduit à la dissociation totale de ⁻OOH, avec une distance Fe-Op de 2.9 Å, analogue à celle de l'état (**D_D**) dans le cas de la forme sauvage. Aucune de protonation du substrat ⁻OOH correspondant à un minimum n'a été caractérisée : la barrière semble être supérieure à 7 kcal mol⁻¹. Une possible cause est la conformation de la lysine qui occasionne une gêne stérique. Si le ligand ⁻OOH est bien protoné, sa sortie reste bloquée par une conformation non-favorable de la lysine et empêche le système d'aller vers un minimum présentant H₂O₂ : le système revient en arrière. Les valeurs de la surface, qui semblent être des minima de protonation où la distance N_{lys}-H_{lys} est supérieure à 1.4 Å sont, en fait comme pour le système «une H₂O pontante» des sauts de protons de la lysine vers des molécules d'eau voisines. Ces sauts de protons provoquent une évolution du système irréversible (par rapport aux variables collectives sélectionnées).

Malgré une fin de chemin réactionnel difficile à définir, il est certain que le processus de formation de H₂O₂ par dissociation suivie de protonation est plus difficile dans le mutant N117A que dans la forme sauvage. il est certain que la réactivité via la conformation «directe» est plus difficile : la barrière est supérieure de 2 kcal mol⁻¹ pour la dissociation de ⁻OOH et avec une protonation de cette espèce supérieure à 7 kcal mol⁻¹) que pour son analogue de la forme sauvage.

En partant des deux conformations, soit «directe», soit «une H₂O pontante», nous trouvons des barrières des premières étapes correspondantes plus haute en énergie que pour la forme sauvage. La conformation «une H₂O pontante» présente une barrière de 15 kcal mol⁻¹ (11 kcal mol⁻¹ dans la forme sauvage) pour la protonation de ⁻OOH en H₂O₂ puis de 6 kcal mol⁻¹ pour le départ partiel de H₂O₂ (environ 3 kcal mol⁻¹ pour la forme sauvage). La conformation «directe» elle présente une barrière de dissociation du ligand ⁻OOH de 9 kcal mol⁻¹ (7 kcal mol⁻¹ dans la forme sauvage) non-suivie de la formation de H₂O₂ stable.

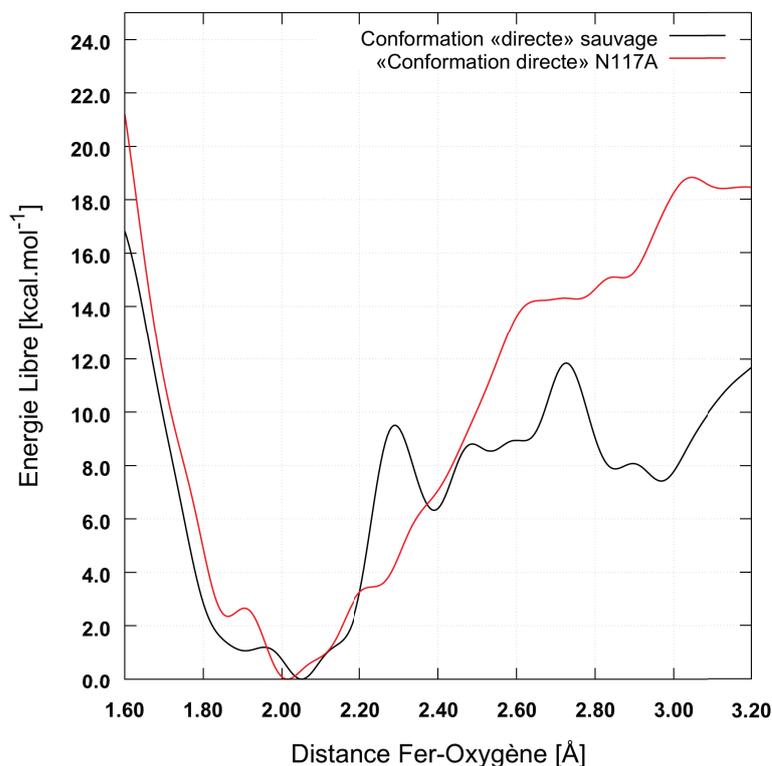


Figure 4.22 – Énergie libre en fonction de la distance de liaison Fe-Op pour les métadynamiques avec pour seule variable la distance Fe-Op pour la forme sauvage et le mutant N117A.

Dans les deux cas, la réactivité native est plus difficile que pour la forme sauvage : nous avons des barrières limitantes plus élevées et pour la formation des produits des sauts de protons concurrents au même niveau énergétique.

Pour remédier au problème posé par la variable $O_{\text{eau}}-H_{\text{eau}}$ et $N_{\text{lys}}-H_{\text{lys}}$, nous avons reconduit des métadynamiques en ne considérant que la variable collective Fe-Op pour ce mutant N117A et aussi à titre de comparaison pour la forme sauvage. Les conditions de simulation sont celles décrites précédemment (hauteur, déposition, largeur et mur) mais avec une seule variable. Nous partirons que de la conformation «directe», car avec cette CV Fe-Op unique est à même de décrire l'étape limitante correspondant à la dissociation de ^-OOH . Le profil énergétique pour la protonation «une H_2O pontante» dont la première étape est la protonation du ligand ^-OOH a donc moins de sens avec la variable correspondant à la distance Fe-Op puisque c'est la variable "protonation" qui "dirige" la réactivité

de cette conformation.

Dans la figure 4.22, nous reportons l'énergie libre en fonction de la distance Fe-Op pour la forme sauvage et le mutant N117A dans la conformation «directe». La métadynamique pour la forme sauvage a été arrêtée au bout de 3,5 ps (soit 350 gaussiennes) et pour le mutant N117A au bout de 5 ps (soit 500 gaussiennes).

Pour la forme sauvage, la barrière limitante de la dissociation de ${}^{\ominus}\text{OOH}$ est d'environ $9.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, proche de la valeur trouvée de 7 kcal mol^{-1} dans le chapitre 3 pour la réactivité de la conformation «directe» avec les deux variables Fe-Op et $N_{\text{lys}}\text{-}H_{\text{lys}}$. De plus la protonation par la lysine 48, non suivie par une variable collective a lieu et H_2O_2 est formé. Cela nous confirme que l'utilisation d'une seule CV pour décrire l'étape est suffisante, au moins qualitativement.

Pour le mutant N117A, la barrière de l'étape limitante est plus élevée, environ 14 kcal mol^{-1} . Après cette dissociation, il n'y a pas de minimum net après la dissociation malgré la protonation de ${}^{\ominus}\text{OOH}$ par la lysine comme pour la forme sauvage.

Que ce soit avec une ou deux variables collectives, sur les conformations «directe» et «une H_2O pontante» du mutant N117A, nous trouvons systématiquement des barrières plus élevées que dans la forme native de la SOR. Dans le cas de la molécule «une H_2O pontante», nous avons une barrière de d'environ 15 kcal mol^{-1} à comparer au 11 kcal mol^{-1} de la forme sauvage, correspondant à la protonation de ${}^{\ominus}\text{OOH}$ puis la dissociation de H_2O_2 . La barrière est supérieure de 4 kcal mol^{-1} pour ce mécanisme, qui d'après les résultats obtenus dans le chapitre 3, n'est pas le mécanisme favorisé pour la forme sauvage. La conformation «directe» présente dans la forme sauvage le mécanisme dissociation-protonation avec une barrière limitante de 7 kcal mol^{-1} , possède dans le mutant N117A une barrière plus haute de part la conformation du dièdre $C_{\beta}\text{-S-Op-Od}$ qui positionne ${}^{\ominus}\text{OOH}$ différemment par rapport à la lysine 48. La barrière pour la dissociation de ${}^{\ominus}\text{OOH}$ est de 9 kcal mol^{-1} et sa protonation n'est pas observée mais est estimée de se produire

avec une barrière d'au moins 7 kcal mol⁻¹. Dans le cas de la métadynamique avec une seule variable (distance Fe-Op), la barrière est d'environ 14 kcal mol⁻¹ correspondant à la dissociation de ⁻OOH qui subit une protonation par la lysine lors de son éloignement.

Dans ce mutant N117A, la formation de H₂O₂ est plus difficile à réaliser, principalement en raison d'un angle dièdre C_β-S-Op-Od non favorable à un départ H₂O₂ dans le cas de la conformation «directe». Pour la conformation «une H₂O pontante» la réactivité est plus difficile également. Une possibilité serait due à un arrangement électronique différent de la différence du squelette peptidique montrée dans l'étude MM conformationnelle.

Expérimentalement, ce mutant peut conduire à la formation d'une espèce fer=oxo, contrairement à la réactivité de la forme sauvage. Nous avons montré que la réactivité native présente des barrières plus élevées que la forme sauvage, nous allons maintenant étudier la possibilité de former l'espèce fer-oxo par métadynamique.

4.2.1.2 Formation de Fe⁴⁺=O

Comme pour la forme sauvage, la CV représentant la distance Fe-Op a été remplacée par la distance Op-Od dans les métadynamiques à deux variables. Nous reprenons la conformation «une H₂O pontante» du mutant N117A utilisé dans l'étude de la réactivité native. Nous gardons les paramètres de métadynamiques (ΔT , W , τ_G et σ). Dans la figure 4.23, nous reportons la FES de la conformation «une H₂O pontante» avec comme CV la distance Op-Od et la distance O_{eau}-H_{eau}. La durée de la métadynamique est de 6.6 ps (soit 660 gaussiennes).

Comme dans le cas de la forme sauvage avec la conformation «une H₂O pontante», nous pouvons décrire la rupture de la liaison Op-Od sans qu'une protonation ne semble être nécessaire. En regardant les géométries correspondantes avec une distance Op-Od inférieure à 1.6 Å et une distance O_{eau}-H_{eau} supérieure à 1.4 Å, comme dans la forme sauvage, nous explorons la réactivité native. Il y a une protonation de l'oxygène proximal, mais

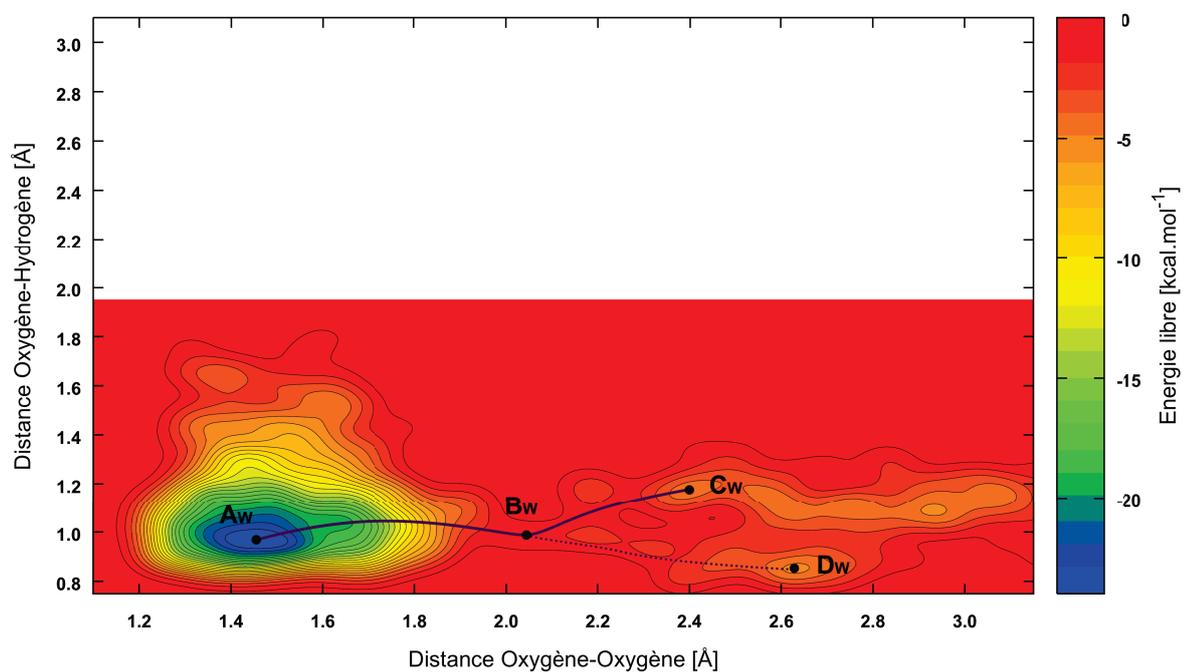


Figure 4.23 – Surface d'énergie libre pour réactivité non-native l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ avec la conformation «une H_2O pontante» en fonction des CV sélectionnées. Le chemin de réaction présentant la barrière d'activation la plus faible est représenté sous la forme d'une ligne noire continue. Le chemin de réaction en pointillé correspond à l'évolution du système après la première barrière.

à l'identique de la forme sauvage, le groupement NH_3^+ ne transfère pas un proton sur l'ion OH^- formé qui se reprotone avec le proton de H_2O_2 . Cette réaction "concurrente" est moins explorée que dans la forme native suggérant une réactivité non-native moins énergétique.

Le système part de l'état (\mathbf{A}_W) où la distance Op-Od est de 1.46 Å et la distance $\text{O}_{\text{eau}}-\text{H}_{\text{eau}}$ de 0.97 Å. Le système doit ensuite franchir une barrière de 22 kcal mol⁻¹ pour arriver à un état de transition (\mathbf{B}_W). La rupture de la distance Op-Od a lieu, sans protonation et la distance Op-Od est de 2.04 Å et la distance $\text{O}_{\text{eau}}-\text{H}_{\text{eau}}$ reste à 0.95 Å. Dans cet intermédiaire la distance Fe-Op est de 1.66 Å et la distance Fe-S est de 2.47 Å. Ces distances sont consistantes avec la formation d'une espèce de type Fe=O comme dans la forme sauvage. La barrière est plus basse de 3 kcal mol⁻¹ que pour la réactivité non-native de la forme sauvage. Le système évolue ensuite vers le bassin qui présente une distance Op-Od supérieure à 2.4 Å : les variables utilisées deviennent inadéquates pour suivre l'évolution du système. Nous avons repris l'analyse des densité de spin (de Mulliken) pour identifier les espèces formées et suivre l'évolution du système. Dans le tableau 4.14 nous représentons les densité de spin pour les atomes Fe, Op, Od et S pour les états (\mathbf{A}_W) et (\mathbf{B}_W) et les informations géométriques pertinentes (les distances Op-Od, Fe-Op et Fe-S). Également pour les états (\mathbf{C}_W) et (\mathbf{D}_W).

Les distances ainsi que la distribution de la densité de spin indiquent que la rupture de la liaison Op-Od est homolytique : il y a formation d'une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ caractérisée par le passage de la distance Fe-Op de 1.98 à 1.66 Å, et une variation densité sur le Fe de 4.32 à 3.62 *e*. Également la densité sur l'oxygène proximal passe d'une valeur de 0.17 à 0.45 *e*. La rupture donne donc un radical hydroxyde $\cdot\text{OH}$ avec une densité de spin sur l'oxygène (distal) qui varie de 0.04 à 0.83 *e*. Pour les espèces (\mathbf{C}_W) et (\mathbf{D}_W) ces minima proviennent de la formation de $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ qui influence la distance Fe-S qui s'allonge légèrement, et la densité de spin sur le soufre passe de 0.27 *e* dans l'espèce de départ ((\mathbf{A}_W)) à -0.20 *e* dans les espèces (\mathbf{C}_W) et (\mathbf{D}_W).

Distance (Å)	Fe-Op	S-Fe	Op-Od
(A_w)	1.98	2.45	1.46
(B_w)	1.66	2.47	2.05
(C_w)	1.69	2.51	2.44
(D_w)	1.61	2.55	2.64

Spin (<i>e</i>)	Fe	Op	Od	S
(A_w)	4.32	0.17	0.04	0.27
(B_w)	3.62	0.45	0.83	0.03
(C_w)	3.63	0.56	0.93	-0.16
(D_w)	3.61	0.52	0.81	-0.20

Tableau 4.14 – Valeurs des distances caractéristiques et du spin pour les atomes mis en jeu dans la réactivité non-native de N117A pour les intermédiaires réactionnels.

La métadynamique à été arrêtée avant une éventuelle réaction de $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ ou $\cdot\text{OH}$ avec l'environnement : la métadynamique été arrêté après la formation de ces deux espèces.

Comme dans la forme sauvage, la rupture de liaison Op-Od est homolytique et n'implique pas de protonation spécifique de l'oxygène distal. L'espèce formée est bien $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ (et donc, $\cdot\text{OH}$) ce qui permet de confirmer les résultats expérimentaux obtenus. Si la barrière de rupture est moins élevée de 4 kcal mol⁻¹ (22 kcal mol⁻¹) que la barrière obtenue dans la forme sauvage (26 kcal mol⁻¹), elle reste plus élevée que la barrière de la réactivité native (qui était d'environ 14-15 kcal mol⁻¹).

Ayant effectué la réactivité non-native et montrant qu'elle n'impliquait pas de protonation de l'oxygène distal (comme pour la forme sauvage), nous avons étudié ce mutant avec des métadynamiques ne comprenant qu'une variable collective pour éviter de surestimer la barrière en explorant un sous-espace non souhaité. Les deux conformations, «directe» et «une H₂O pontante» seront utilisées comme point de départ, la seule CV étant la distance Op-Od. L'espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ étant potentiellement très réactive, nous avons décidé comme pour la forme sauvage, d'arrêter la métadynamique après le premier passage de la barrière de dissociation.

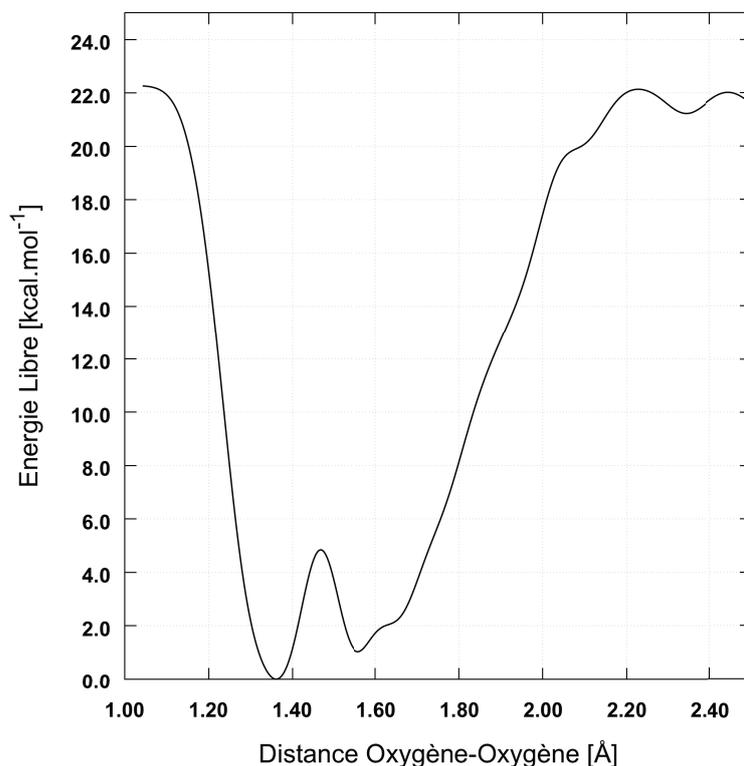


Figure 4.24 – Énergie libre en fonction de la distance de liaison Op-Od pour le mutant N117A : conformation «une H₂O pontante».

L'énergie libre en fonction de la distance Op-Od pour la conformation «une H₂O pontante» est représentée en figure 4.24. La métadynamique a été arrêtée après 2.325 ps soit un ajout de 232 gaussiennes. En partant de cette configuration nous avons deux minima : l'un possède une distance Op-Od de 1.35 Å et l'autre une pour distance Op-Od 1.55 Å. Ils sont séparés par une barrière d'environ 5 kcal mol⁻¹. Cette barrière semble élevée et non convergée du fait que la métadynamique a été arrêtée avant d'avoir exploré totalement le bassin 1.30-1.60 Å : la métadynamique a fait évoluer le système rapidement vers la dissociation. La dissociation demande une barrière d'environ 21 kcal mol⁻¹ et montre un "état de transition" présentant une distance Op-Od de 2.24 Å. Lors de cette transition, la densité de spin du fer évolue de 4.3 e à 3.6 e et celle des oxygène proximal et distal de 0.2 e à 0.5 e et de 0.1 e à 0.9 e respectivement. De nouveau, il s'agit d'une rupture homolytique formant les espèces Fe⁴⁺=O et [•]OH. La distance Fer-Op passe de 1.98 Å à 1.69 Å, et la distance Fe-S s'allonge de 2.44 Å à 2.50 Å.

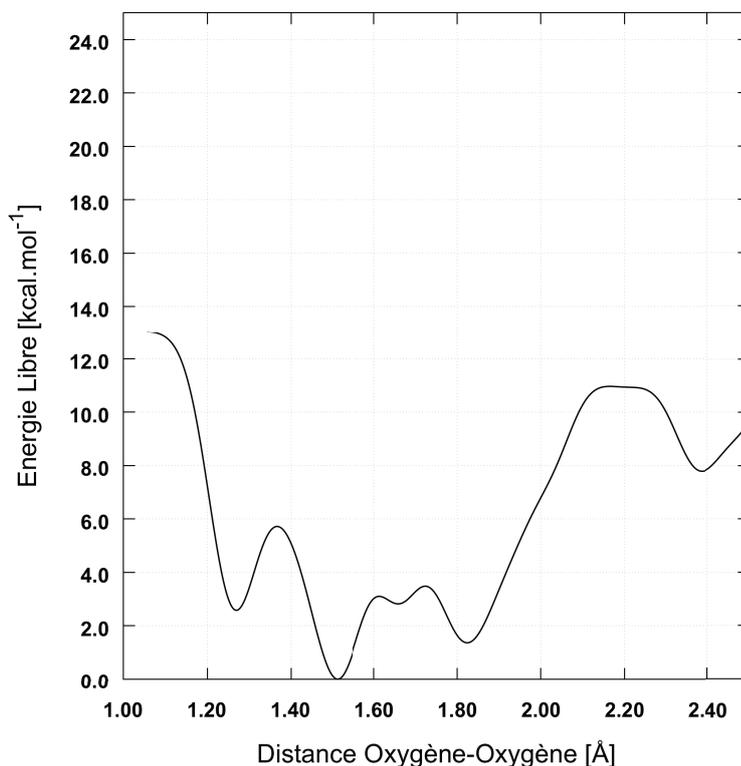


Figure 4.25 – Énergie libre en fonction de la distance de liaison Op-Od pour le mutant N117A : conformation «directe».

Dans ce cas aussi, la barrière de dissociation reste élevée comparativement à celle de la dissociation de OOH^- . Comme pour la métadynamique présentée en figure 4.23, elle présente une barrière du même ordre de grandeur d'une vingtaine de kcal mol^{-1} qui reste inférieure à la celle pour le processus analogue décrite dans la forme sauvage (26 kcal mol^{-1}).

La même métadynamique a été effectuée, cette fois, en partant de la conformation «directe», que nous représentons en figure 4.25. Cette métadynamique a été arrêtée seulement après 1.1 ps soit 110 gaussiennes ajoutées. La dissociation a été effectuée après l'ajout de peu de gaussiennes (110) et la barrière pour la dissociation est de $10.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ pour la conformation «directe» soit deux fois moins que pour la conformation «une H_2O pontante». Cette barrière est également plus faible que la réactivité native (formation de H_2O_2) pour cette conformation. Le système part d'un minimum caractérisé par une distance Op-Od de 1.52 \AA et des distances Fe-Op de 2.00 \AA et Fe-S de 2.47 \AA . La densité de spin pour le fer est de $4.35 e$, correspondant à un Fe^{3+} . Pour l'oxygène proximal elle est

de 0.15 e , le distal de 0.04 e ceci correspondant toujours à un hydroperoxide. Le système franchi ensuite une première barrière de 3 kcal mol⁻¹ où la distance Op-Od passe à 1.82 Å et les deux autres distances étant peu affectées. Ensuite la dissociation a lieu : le système franchi une barrière de 10.5 kcal mol⁻¹. La distance Op-Od passe de 1.82 Å à 2.14 Å. La densité de spin des deux oxygènes est de 0.56 e et 0.80 e pour le proximal et le distal respectivement. La densité de spin du Fer passe de 4.35 e à 3.58 e et la distance Fe-Op se raccourcit passant de 2.00 Å à 1.63 Å. Le processus est donc clairement défini comme le passage d'un état Fe³⁺-OOH à un état Fe⁴⁺=O et •OH.

Entre la conformation «une H₂O pontante» et la conformation «directe», nous trouvons une large différence entre les deux barrières pour la formation de l'espèce Fe⁴⁺=O *via* la dissociation de la liaison Op-Od. Dans le cas de la conformation «une H₂O pontante», la barrière est d'environ 21 kcal mol⁻¹, soit plus élevée que la barrière de la réactivité native (environ 15 kcal mol⁻¹), ce qui fait que pour cette conformation la réactivité native est uniquement celle qui se produit (ou très majoritairement). Pour la conformation «directe», la barrière de dissociation n'est que d'environ 10.5 kcal mol⁻¹, plus favorable que la réactivité native (estimée à 14 kcal mol⁻¹), ce qui fait que la réactivité non-native est majoritaire dans ce mutant, étant la moins élevée des barrières trouvées pour les deux conformations. L'espèce résultante de cette dissociation est une espèce Fe⁴⁺=O en accord avec les données expérimentales. Nos simulations sont donc en parfait accord avec l'expérience qui montre que le mutant N117A favorise la formation d'une espèce Fe⁴⁺=O.

Dans l'optique d'expliquer, premièrement la différence de réactivité entre les deux conformations «une H₂O pontante» et «directe» pour le mutant N117A puis dans une deuxième temps la différence de réactivité entre la conformation «directe» de la forme sauvage et celle du mutant N117A, nous nous appuyons sur l'analyse effectuée au début de ce chapitre, à l'aide des simulations classiques.

Pour la conformation «une H₂O pontante», le squelette est dans la conformation *S1* tandis que pour la conformation «directe» il est dans la conformation *S2* : nous avons vu que

la conformation *S2* favorise les liaisons hydrogène entre le squelette (les résidus His¹¹⁹ et Ile₁₁₈) et le soufre de la cystéine. En postulant, que même si nous n'avons pu démontrer ou infirmer cette hypothèse précédemment, que plus il y a de liaisons hydrogène engagée sur le soufre, plus la distance Fe-S sera grande et par effet *trans*, la liaison Fe-Op sera renforcée, plus courte. Une liaison Fe-Op plus courte permettrait une rupture de liaison Op-Od plus aisée.

Dans la conformation «une H₂O pontante», nous avons une liaison hydrogène entre le soufre His¹¹⁹ caractérisée par une distance N_{His119}-S_{Cys116} de 3.63 ± 0.20 Å et un angle N_{His119}-H-S_{Cys116} de 129 ± 14 °. La liaison entre le soufre et Ile¹¹⁸ est quand a elle caractérisée par une distance N_{Ile118}-S_{Cys116} de 3.74 ± 0.16 Å et un angle N_{Ile118}-H-S_{Cys116} de 164 ± 10 °. Pour la conformation «directe» la distance N_{His119}-S_{Cys116} est de 3.32 ± 0.11 Å et l'angle N_{His119}-S_{Cys116} possède une valeur de 116 ± 9 °. La distance N_{Ile118}-S_{Cys116} est de 3.53 ± 0.13 Å et l'angle N_{Ile118}-H-S_{Cys116} de 160 ± 8 °. D'après ces informations, dans le cas de la conformation «directe» les liaisons hydrogènes semblent plus fortes. La valeur de la distance Fe-S est de 2.47 ± 0.09 Å dans la forme «directe» et légèrement plus courte dans la conformation «une H₂O pontante» où elle prend une valeur de 2.44 ± 0.09 Å. La liaison Fe-Op elle possède une valeur de 2.00 ± 0.09 Å dans la conformation «directe» et de 1.98 ± 0.13 Å dans la conformation «une H₂O pontante».

Même limitées, ces différences pourraient expliquer la différence énergétique de la barrière entre la forme «une H₂O pontante» et la conformation «directe» dans le mutant N117A. Comme il a été indiqué en première partie de ce chapitre, le mutant N117A possède deux formes (*S1* et *S2*) comme la forme sauvage. Si la forme *S2* favorise des liaisons hydrogènes dans la forme sauvage et dans la forme N117A, la forme *S1* quant à elle ne favorise pas des liaisons hydrogènes "fortes" dans la forme sauvage, mais elles peuvent être présentes dans le mutant N117A dans sa forme *S1* également. Des liaisons hydrogènes plus "fortes" favorisant la rupture Op-Od et la dissociation en espèces Fe⁴⁺=O et •OH, ceci peut expliquer que le mutant N117A forment ces espèces expérimentalement.

L'autre question abordée est la différence des barrières entre la forme sauvage dans sa conformation «directe» et le mutant N117A dans sa conformation «directe» : dans le mutant N117A, l'angle dièdre C_{β} -S-Op-Od possède une valeur différente de la forme sauvage «directe» ($-87 \pm 10^\circ$ dans le mutant, et $70 \pm 16^\circ$ dans la forme sauvage). Dans le chapitre 3, nous avons vu qu'un angle dièdre C_{β} -S-Op-Od négatif positionnait le ligand ^-OOH à l'intérieur du site actif. Dans le cas d'une protonation-dissociation via une molécule d'eau, l'eau étant plus mobile que la lysine, le produit H_2O_2 peut s'éloigner sans barrière malgré cette contrainte. Dans le cas d'une dissociation-pronation par la lysine 48 directement, le ligand H_2O_2 reste très proche du Fe^{3+} , la lysine étant moins mobile, et retourne sous sa forme $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ montrant une barrière plus élevée de protonation. Alors que dans la forme sauvage «directe» et le mutant N117A «directe» la dissociation de ^-OOH est, dans les deux cas, aux alentours de 7 kcal mol^{-1} , une seconde barrière à 7 kcal mol^{-1} apparaît seulement pour le mutant N117A «directe». Cette contrainte géométrique serait la cause de la différence de barrière entre la forme sauvage et le mutant N117A.

Dans cette partie, nous avons vu que le mutant N117A présentait une réactivité majoritaire différente de la forme sauvage : la formation d'une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ via la dissociation homolytique de la liaison Op-Od. Plusieurs points semblent expliquer cette différence de réactivité : la présence de liaisons hydrogène plus "forte" entre les résidus His¹¹⁹ et Ile¹¹⁸ et le soufre de la cystéine allongeant la liaison Fe-S qui, par effet *trans*, renforce la liaison Fe-Op. Cette liaison renforcée a pour effet de baisser la barrière nécessaire à la dissociation, comparée aux formes sauvages ou les conformations présentant des liaisons hydrogène plus "faibles". Pour la réactivité native correspondant à la formation de H_2O_2 , des contraintes géométriques liées à l'angle dièdre C_{β} -S-Op-Od et à la position de la lysine augmentent les barrières nécessaires pour la réalisation de cette réactivité.

4.2.2 K48I : mutation côté ligand ^-OOH

Le mutant K48I ne possède plus la lysine 48 à l'entrée du site actif : elle a été remplacée par une isoleucine. Dans la partie précédente, nous avons vu que l'isoleucine ne change pas la facilité d'accès au ligand ^-OOH par des molécules d'eau. Pour la forme sauvage, nous avons vu que la lysine avait un impact majeur pour la réactivité native : lorsqu'elle est lié directement au ligand ^-OOH , elle permet une dissociation de ce ligand avec une faible barrière de 7 kcal mol⁻¹ suivie d'une protonation quasi sans barrière. Les études ont montré que le mutant K48I présentait à pH acide [19], la même réactivité que la forme native. Il est supposé que les ions H_3O^+ en grande concentration jouent le même rôle que la lysine, à savoir, permettre la dissociation de ^-OOH par effet de charge et une protonation aisée dans le cas d'une interaction «directe». Si l'interaction est indirecte, comme dans le cas de la conformation «une H_2O pontante», l'ion H_3O^+ permet une protonation *via* une molécule d'eau comme le fait le groupement NH_3^+ de la lysine. Lorsque le pH augmente et devient neutre, la réactivité native n'est plus observée. Les ions H_3O^+ ne sont plus en concentration suffisante pour pallier l'absence de la lysine. Le but de cette étude métadynamique sera de vérifier que la réactivité native présente une barrière de transition plus élevée que pour la forme sauvage en l'absence de la lysine et d'ion H_3O^+ . La réactivité native n'étant plus observée et peu d'informations expérimentales quand aux intermédiaires formés étant disponible, nous étudierons la réactivité non native *via* une rupture de la liaison Op-Od.

Nous avons étudié ce mutant en utilisant le même protocole que précédemment. Un point a été extrait de la dynamique MM correspondant où le ligand possède une liaison hydrogène avec une molécule d'eau. En partant de cette structure, une dynamique sans contrainte QM/MM a été effectuée pendant 5 ps pour équilibrer le système lors de la transition MM QM du site actif. Les caractéristiques géométriques des deux dernières ps sont répertoriées dans le tableau 4.15. Les caractéristiques géométriques de ce mutant sont très proche de la forme sauvage du fait que cette mutation n'influence pas le squelette₁₁₇₋₁₁₉. La

Distance (Å)	Fe-Op	S-Fe	Op-Od				
«H ₂ O»	1.98 ± 0.06	2.47 ± 0.09	1.46 ± 0.03				
Angle (°)	Fe-Op-Od	Op-Od-Hd	C _β -S-Op-Od	Fe-Op-Od-Hd			
«H ₂ O»	119 ± 6	102 ± 4	-58 ± 17	-132 ± 36			
Dièdre (°)	ψ_{119}	ϕ_{119}	ψ_{118}	ϕ_{118}	ψ_{117}	ϕ_{117}	χ_{118}
«H ₂ O»	53 ± 22	-121 ± 12	-13 ± 11	-121 ± 7	-13 ± 9	-63 ± 8	58 ± 13

Tableau 4.15 – Les distances et les angles importants (courbure et dièdre) pour l’espèce Fe³⁺–OOH à partir de la simulation QM/MM en moyenne sur les deux dernières picosecondes. La conformation «H₂O» correspond au point de départ ’3750B’.

conformation est ici dans la forme *S1*.

4.2.2.1 Réactivité native de K48I

La lysine 48 étant absente dans ce mutant (remplacée par une isoleucine), seul le couple de variables collectives comprenant la distance Fe-Op et la distance O_{eau}-H_{eau}. Les paramètres de la métadynamique *Well-Tempered* sont identiques aux précédentes métadynamiques. Le potentiel de répulsion quadratiques à avec une constante K égale à) 500 kcal mol⁻¹ limite la distance Fe-Op à 3.5 Å et la distance O_{eau}-H_{eau} à 3.0 Å.

La figure 4.26 représente la FES construite à partir de la métadynamique sur une durée de 11.75 ps, soit un total de 1175 Gaussiennes ajoutées. Dans cette métadynamiques, nous avons également des sauts de protons incontrôlés et non suivis du fait de l’absence de la lysine comme *donneur final de proton*.

Le chemin réactionnel pour ce mutant part de l’état (**A_W**) caractérisé par une distance Fe-Op de 2.02 Å et une distance O_{eau}-H_{eau} de 0.98 Å. Le système peut ensuite évoluer vers l’intermédiaire (**C_W**). L’intermédiaire (**C_W**) correspond à une dissociation partielle de l’espèce ⁻OOH avec une distance Fe-Op égale à 2.73 Å. La distance O_{eau}-H_{eau} est quant à elle de 1.08 Å. La barrière nécessaire pour cette dissociation est d’environ 14 kcal mol⁻¹.

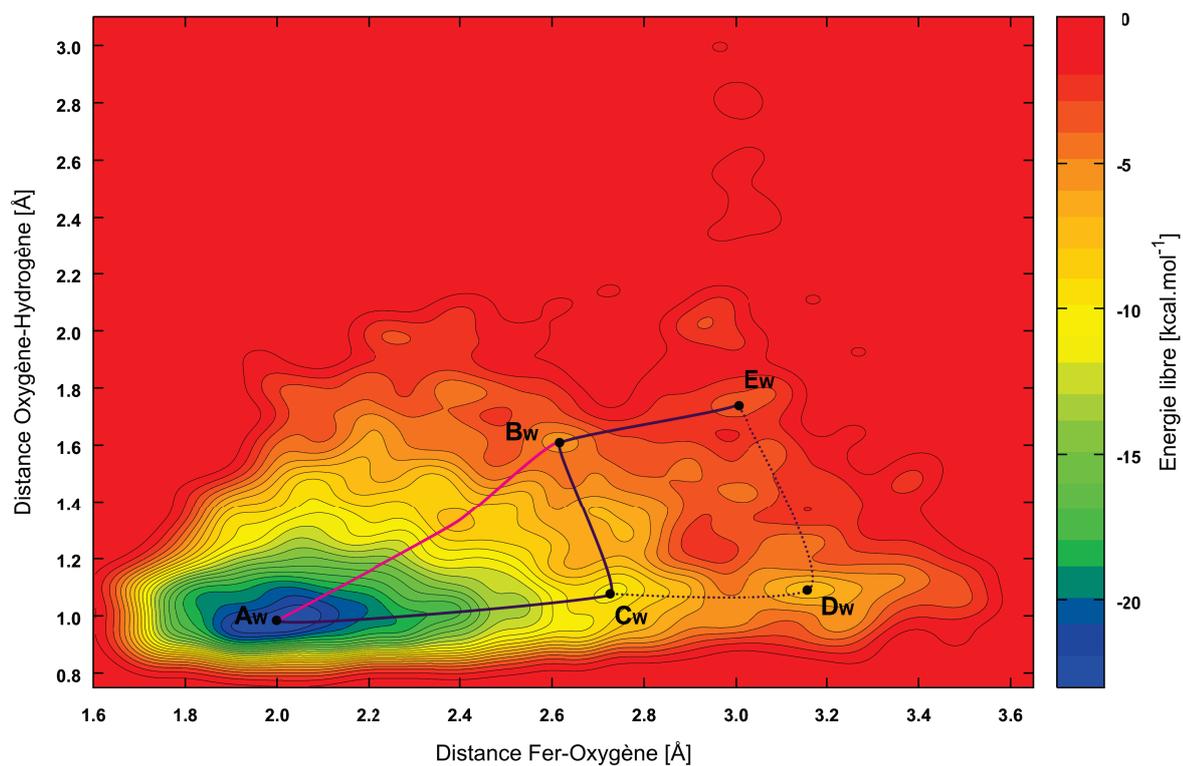


Figure 4.26 – Surface d'énergie libre pour réactivité native l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ dans le cas du mutant K48I en fonction des CV sélectionnées. Le chemin de réaction présentant la barrière d'activation la plus faible est représenté sous la forme d'une ligne noire continue.

De cet intermédiaire (\mathbf{C}_W), le système peut évoluer vers une dissociation totale de ${}^-\text{OOH}$ correspondant à l'intermédiaire (\mathbf{D}_W) où la distance Fe-Op prend une valeur de 3.18 Å et la distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$ est de 1.09 Å. Il n'y a pas eu protonation, et la barrière nécessaire est d'environ 5 kcal mol⁻¹. Nous avons trouvé également deux minimums (\mathbf{B}_W) et (\mathbf{E}_W). L'intermédiaire (\mathbf{B}_W) possède une distance Fe-Op de 2.62 Å et une distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$ de 1.61 Å : l'espèce H_2O_2 est formée ainsi qu'un ion ${}^-\text{OH}$. Une barrière d'au moins 18 kcal mol⁻¹ serait nécessaire en partant de (\mathbf{A}_W) ou 6 kcal mol⁻¹ en partant de l'intermédiaire (\mathbf{C}_W) : aucun chemin convergé n'a été trouvé reliant cet intermédiaire ((\mathbf{B}_W)). L'intermédiaire (\mathbf{E}_W) correspondrait aux produits : H_2O_2 , et ${}^-\text{OH}$. La difficulté de la convergences aux alentours de ces points ((\mathbf{B}_W) et (\mathbf{E}_W)) peut s'expliquer par la réactivité de l'espèce ${}^-\text{OH}$ provoquant de multiples sauts de proton ou déprotonant H_2O_2 nouvellement formé.

D'après ces informations, nous constatons que la réactivité native dans le mutant K48I présente une énergie d'activation plus élevée que la forme sauvage. L'eau seule n'arrive pas à protoner l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ contrairement à l'eau assistée par la lysine dans la conformation «une H_2O pontante» de la forme sauvage. Si la dissociation de ${}^-\text{OOH}$ a bien lieu et sa protonation possible, la non-protonation de ${}^-\text{OH}$ ne permet pas de faire converger la surface d'énergie libre.

Ces résultats sont cohérents avec les résultats expérimentaux [19] : la réactivité native est plus difficile que dans la forme sauvage de la SOR. Si en milieu acide la réactivité native à bien lieu, nous émettons l'hypothèse que l'abondance d'ions H_3O^+ permet de palier l'absence de la lysine en jouant le même rôle : permettre la protonation de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ formant H_2O_2 et H_2O ou permettre une dissociation préalable de ${}^-\text{OOH}$ et puis par protonation, former H_2O_2 . La présence d'un proton dans le milieu réactionnel, soit par concentration élevée d'ions H_3O^+ dans le milieu, soit la présence du groupement NH_3^+ proche, permet la réactivité native.

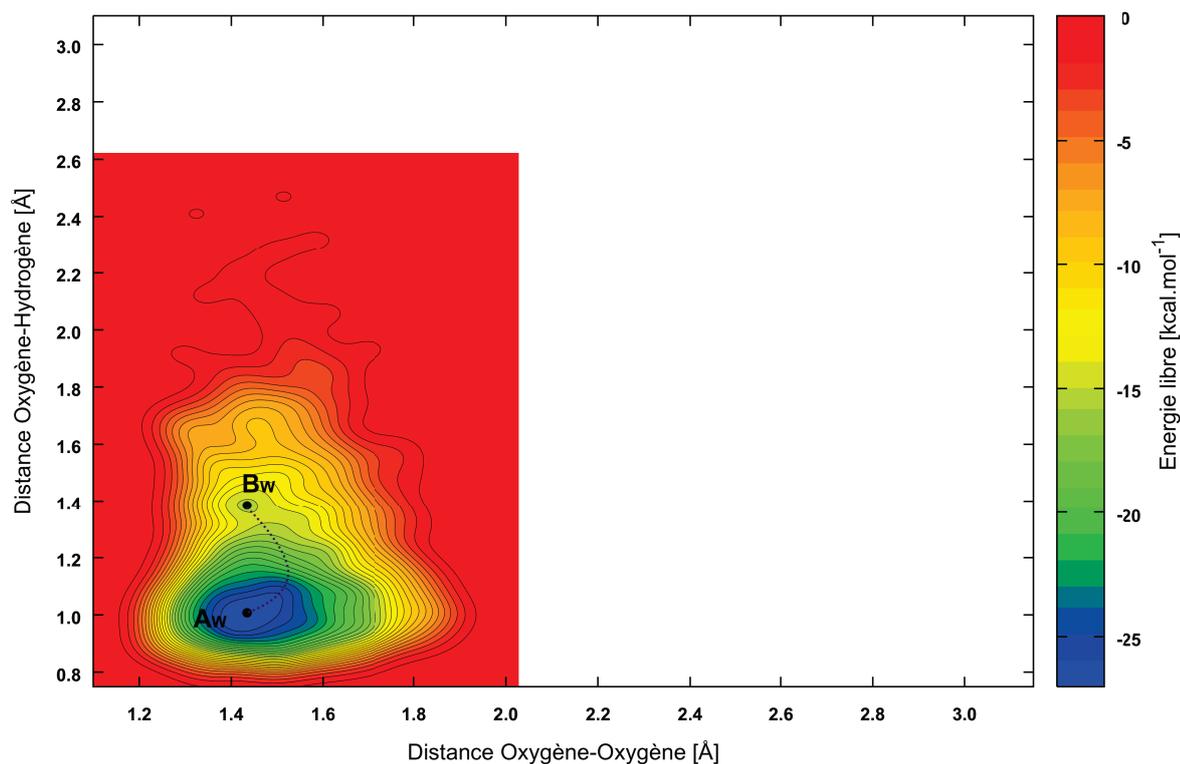


Figure 4.27 – Surface d'énergie libre pour la réactivité non native de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ dans le cas du mutant K48I en fonction des CV sélectionnées. Le chemin en pointillé représente la réactivité native.

4.2.2.2 Rupture de la liaison Op-Od dans K48I

Pour l'étude de la rupture de la liaison Op-Od par métadynamique, nous avons remplacé la distance Fe-Op par la variable Op-Od comme variable collective dans le cadre des métadynamiques à deux variables collectives (l'autre CV restant la distance $\text{O}_{\text{eau}}\text{-H}_{\text{eau}}$). Les autres paramètres de métadynamique *Well-Tempered* restent à l'identique. La métadynamique à deux CV a été arrêté au bout de 8.5 ps (soit 850 Gaussiennes ajoutées), au delà comme dans les autres métadynamiques à deux variables, des transferts de proton n'ayant pas d'intérêt pour cette étude ont lieu. Comme dans le cas de la forme sauvage, la réactivité native à lieu faussant le suivi de la réactivité non native. Nous représentons cette FES obtenue en figure 4.27.

Le système part de l'état (**A_w**) représentant le système sous sa forme $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. La dis-

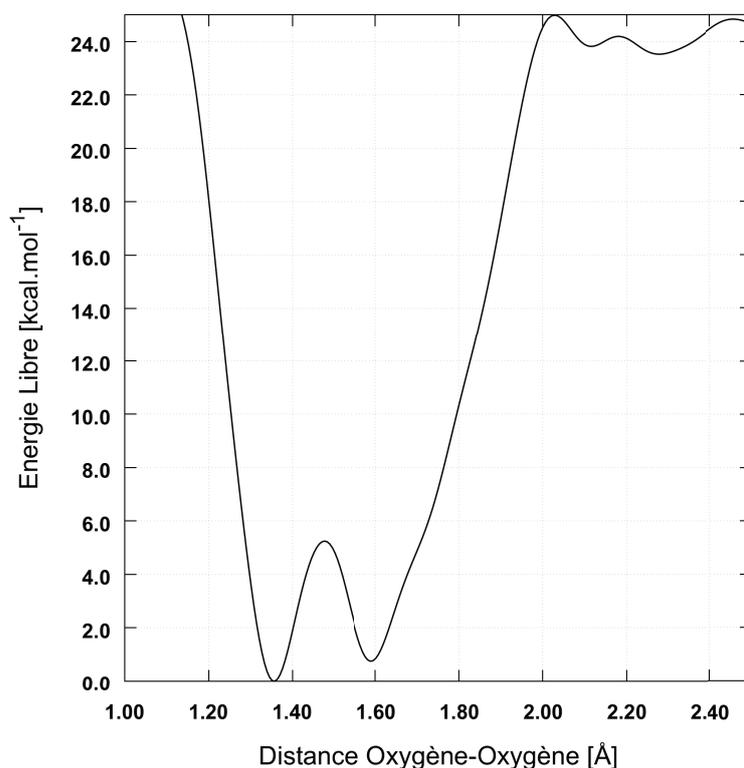


Figure 4.28 – Énergie libre en fonction de la distance de liaison Op-Od pour le mutant K48I.

tance Op-Od est de 1.46 Å. Le système évolue vers un intermédiaire (**B_W**), correspondant à la protonation de l'oxygène proximal avec une barrière de 14 kcal mol⁻¹. Pour l'intermédiaire (**B_W**), la distance Op-Od reste à 1.44 Å, la distance Oeau-Heau est de 1.41 Å et la distance Op-Heau de 1.07 Å. La distance Fe-Op est de 2.15 Å. Cet intermédiaire correspond à la première étape du mécanisme de la réactivité native dans la conformation <une H₂O pontante> de la forme sauvage, mais contrairement à la forme sauvage, le système n'évolue pas vers la dissociation de H₂O₂, l'ion ⁻OH précédemment formé évoluant vers une molécule d'eau en reprenant le proton de H₂O₂. Si la non-inclusion de la variable Fe-Op ne permet pas de suivre avec précision la réactivité native, dans la forme sauvage les deux étapes avaient lieu : protonation de Fe³⁺-OOH, l'étape limitante et dissociation de H₂O₂. Dans ce mutant, en condition identique, seule la première étape est observée confirmant les résultats obtenus en figure 4.26, d'une réactivité native plus difficile.

Comme pour la forme sauvage et les autres mutants, nous avons également étudié par

métadynamique ce mutant avec une seule variable collective, la distance Op-Od. L'énergie libre en fonction de cette distance est représentée en figure 4.28.

Le mutant K48I présentent une barrière de dissociation de la liaison Op-Od de 25 kcal mol⁻¹. Les espèces formées sont un Fe⁴⁺=O et un radical [•]OH. Les caractéristiques géométriques sont identiques à celles de la métadynamique sur le mutant N117A dans sa conformation <une H₂O pontante> : deux minimums avec pour distance Op-Od, 1.35 et 1.55 Å respectivement. Ensuite la dissociation à lieu, où la densité de spin de Mulliken du fer évolue de 4.3 à 3.6 *e*, celle de l'oxygène proximal de 0.2 à 0.6 *e* et celle du distal de 0.1 à 0.9 *e*. Ces données confirment, comme pour les autres mutants et la forme sauvage, que la dissociation Op-Od n'implique pas de protonation, donnant lieu à un Fe⁴⁺=O et un radical [•]OH.

4.3 Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié les mutations de la SOR suivant trois points de vue différents. Nous avons d'abord effectué une analyse conformationnelle au niveau MM du squelette peptidique proche de la cystéine 116, pour mesurer l'impact des mutations comme N117A ou I118S concernant le squelette₁₁₇₋₁₁₉. Ensuite, comme pour la forme sauvage, nous avons étudié le réseau de liaison hydrogène entre le ligand ⁻OOH, le solvant et la lysine 48 pour mesurer l'impact des mutations en *trans* ou celle impactant directement la lysine (K48I). Pour finir, nous avons, par métadynamique, étudié la réactivité native et non-native de deux mutants : N117A et K48I, qui expérimentalement ne donne pas une production de H₂O₂.

Dans l'étude conformationnelle sur le squelette₁₁₇₋₁₁₉, nous avons regardé pour la forme sauvage et les mutations N117A, I118S et K48I, les variations des dièdres suivants : ψ_{119} , ϕ_{119} , ψ_{118} , ϕ_{118} , ψ_{117} , ϕ_{117} et χ_{118} . De ces variations, nous avons remarqué deux conformations du squelette nommées *S1* et *S2* présentant des différences entre les mutants

(N117A et I118S) et la forme sauvage. Ces conformations, si elles sont présentes (*cf.* I118S), sont dépendantes de la rotation de la chaîne latérale de Ile¹¹⁸, lié à l'angle dièdre χ_{118} . Ensuite, nous avons reliés ces mêmes conformations *S1* et *S2* aux liaisons hydrogène qu'effectuent les groupements amides du squelette peptidique des résidus Ile¹¹⁸ et His¹¹⁹ avec le soufre de Cys¹¹⁶. Nous avons vu, par exemple, que la forme *S1* qui dans la forme sauvage ne favorise pas les liaisons hydrogène, ne possédait pas les mêmes caractéristiques dans le mutant N117A : des liaisons hydrogène sont possibles sous cette forme. Pour le mutant K48I, où la mutation n'a pas lieu sur le squelette peptidique proche de la cystéine, il n'y a pas d'impact dans la distribution des conformations *S1* ou *S2*, ou sur leur corrélation avec les liaisons hydrogène.

Nous avons également effectué des calculs d'optimisation géométriques et AIMAll sur les deux conformations *S1* et *S2*, avec ou sans liaisons hydrogène avec le soufre de Cys¹¹⁶ pour relier les variations de longueur de la distance Fer-Soufre avec le nombre de liaisons hydrogène impliquées avec le soufre. Néanmoins, il n'y a pas d'impact net entre ces deux variables : un approfondissement sera nécessaire avec un échantillonnage plus important. La relation entre la distance fer-soufre et la distance fer-oxygène par effet *trans* a été remarquée.

L'étude du réseau de liaisons hydrogène entre le ligand OOH^- , des molécules d'eau et la lysine 48 pour les mutants N117A, I118S et K48I n'a pas montré de différences significatives. Seules de petites variations ont été notées. Pour le mutant K48I, où la lysine 48 est remplacée par une isoleucine, nous avons démontré que cette isoleucine ne gênait nullement l'accessibilité du ligand OOH^- aux molécules d'eau du solvant.

Pour les études métadynamiques, dans le cas du mutant N117A, nous avons trouvé que dans une certaine configuration, la réactivité non-native résultant en la formation d'une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ (et un radical $\cdot\text{OH}$) possède une plus faible barrière que la réactivité native confirmant ainsi les données expérimentales obtenues par spectroscopie Raman. Nous avons suggéré que la différence des barrières et de la réactivité est liée à une conformation

impliquant plus de liaisons hydrogène avec le soufre de Cys¹¹⁶, effet qui se répercute par effet trans sur la liaison Fe-Op. Cette liaison Fe-Op étant renforcée, la dissociation du ligand ⁻OOH étant moins favorable, une rupture homolytique de la liaison Op-Od a lieu. Pour l'étude de la réactivité native, la barrière pour N117A semble plus élevée que dans la forme sauvage, inversant les barrières de ruptures Fe-Op et Op-Od.

Pour le mutant K48I, les métadynamiques obtenues montrent une réactivité native (formation H₂O₂) plus difficile en milieu non-acide, en accord avec les données expérimentales. La réactivité non-native à, quant-à-elle, été trouvée plus favorable que dans la forme sauvage, sans toutefois la favoriser vis-à-vis de la réactivité native. L'espèce résultant de la rupture homolytique dans ce mutant est également un Fe⁴⁺=O.

Conclusions

Dans ce travail, nous avons mis en place une méthodologie complète pour l'étude des métalloenzymes et de leurs cycles catalytiques.

La première partie de la méthodologie a été de développer des paramètres de champ de force décrivant le site actif pour une utilisation en mécanique moléculaire. L'utilisation de ces paramètres permet alors d'effectuer des simulation de dynamique comprenant la protéine complète (englobant le site actif) et le solvant. Ces dynamiques apportent des données sur la conformation de la protéine, du site actif et sur les interactions vis à vis du ligand d'intérêt ou du solvant.

Après cette analyse conformationnelle, et dans le cadre de l'étude de la réactivité, nous avons mis en place un protocole QM/MM. La méthodologie QM/MM permet une description précise du site actif avec la possibilité de simuler la réactivité *via* des réarrangements de la structure électronique (rupture et formation de liaisons par exemple). Dans le cadre de l'étude des métalloenzymes, le niveau QM est généralement décrit de manière semi-empirique ou à l'aide de la DFT à l'aide des fonctionnelles GGA. Dans certains cas, ces fonctionnelles ne décrivent pas correctement l'état de spin du métal présent dans le site actif favorisant un état qui n'est pas l'état fondamental (*i.e.* observé expérimentalement). Notre protocole utilise une fonctionnelle hybride (B3LYP) qui permet une description correcte de l'état de spin du métal. La simulation de la métalloprotéine au niveau QM/MM, soit statiquement, soit par dynamique permet d'obtenir des informations supplémentaires sur le système (*e.g.* charges et structure électronique de la partie QM).

Le cout des calculs QM/MM étant élevé, les temps de simulation de dynamiques QM/MM sont *de facto* très court (de l'ordre d'une dizaine de picosecondes) : ils ne permettent pas de simuler une réactivité dont la barrière limitante est très supérieure à $k_B T$. Nous avons donc utilisé une méthode qui permet une "accélération" de la dynamique en fonction de variables collectives représentant des coordonnées de réaction : la métadynamique. En plus de décrire le chemin réactionnel, la métadynamique permet de reconstruire la surface d'énergie libre en fonction des variables collectives choisies.

En utilisant, ces différentes méthodes/niveaux de théorie, nous arrivons à une étude de ces systèmes complexes permettant une analyse conformationnelle et de réactivité. Cette méthode à été validée sur l'étude de la deuxième étape de protonation de la forme sauvage de la SOR ainsi que sur des mutations de la SOR montrant à différents niveaux l'impact des mutations.

En premier lieu, cette méthodologie a donc été validée sur la forme sauvage de la SOR permettant une étude conformationnelle qui a mis en avant deux conformations du deuxième intermédiaire impliquant la lysine : une conformation directe et une conformation avec une molécule d'eau pontante. En partant de ces deux conformations, les métadynamiques QM/MM ont montré deux chemins réactionnels : l'un, qui est celui de plus basse énergie, présentant une dissociation-protonation, l'autre avec l'enchaînement protonation-dissociation. Dans ces étapes, la lysine voisine ainsi que le réseau de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau du solvant sont critiques pour la description adéquate du système montrant ainsi l'importance de prendre en compte ces effets comparés à l'utilisation de systèmes plus "simples". L'étude détaillée de la structure électronique a permis d'expliquer cette spécificité et d'en comprendre la cause.

En utilisant les données expérimentales à notre disposition, nous avons également utilisé cette méthodologie pour l'étude de différents mutants caractéristiques (I118S, N117A, K48I) présentant des différences de réactivité à partir du second intermédiaire. Nous avons mis en évidence différentes conformations du squelette peptidique entraînant des

modifications sur des liaisons hydrogène impliquant le soufre de la cystéine. Ces liaisons hydrogène impliquant elles-même des modifications sur la liaison fer-soufre et par effet *trans* sur la liaison fer-oxygène. A l'aide des métadynamiques, nous avons étudié la réactivité native (formation d'H₂O₂) et la réactivité non-native aboutissant à une espèce fer-oxo. Les résultats concordent avec l'expérience confirmant ainsi l'espèce formée (un Fe⁴⁺=O) et proposant une explication à la fois par l'étude conformationnelle et l'étude de la surface d'énergie libre.

Cette méthode novatrice nous a donc permis de mettre en avant un mécanisme jamais décrit dans le cas de la forme sauvage de la SOR. Elle a aussi permis l'élucidation de l'impact des mutations complétant les données expérimentales et proposant des mécanismes permettant de rationaliser cette réactivité différente dans le cas des mutants.

La méthodologie présentée dans ce travail pourra servir à de nouvelles études sur des métalloenzymes dont le mécanisme du cycle catalytique est méconnu, par exemple, présentant une étape de protonation ou alors dont le centre métallique ne peut être décrit précisément par des méthodes actuellement utilisés. Dans le cadre de mutations, elle pourra être utilisée pour décrire le nouveau mécanisme et déterminer sa cause. Elle pourra donc, avec un caractère prédictif, servir à proposer des mutations sur des enzymes en vu d'une réactivité spécifique ou pour 'isoler' un intermédiaire du cycle catalytique.

Liste des abréviations

ROS : *Reactive Oxygen Species* - Espèces Réactives de l'Oxygène

SOR : Superoxyde réductase

SOD : Superoxyde dismutase

DX : Désulforédoxine

Op : Oxygène proximal

Od : Oxygène distal

MM : Mécanique Moléculaire

QM : Mécanique Quantique

QM/MM : Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire

GAFF : *Generalized Amber Force Field*

STO : *Slater Type Orbitals*

GTO : *Gaussian Type Orbitals*

PW : *Plane Waves*

GPW : *Gaussian and Plane Waves*

GAPW : *Gaussian Augmented Plane Waves*

MetaD : Métadynamique

UTMetaD : *Untempered Metadynamics*

WTMetaD : *Well-Tempered Metadynamics*

TTMetaD : *Transition-Tempered Metadynamics*

CV : Variable Collective

Bibliographie

- [1] C. C. Winterbourn, “Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species,” *Nature Chemical Biology*, vol. 4, pp. 278–286, may 2008.
- [2] S. S. Sabharwal and P. T. Schumacker, “Mitochondrial ROS in cancer : initiators, amplifiers or an Achilles’ heel?,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 14, pp. 709–721, oct 2014.
- [3] J. A. Imlay, “Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 77, pp. 755–776, jun 2008.
- [4] F. E. Jenney Jr., M. F. J. M. Verhagen, X. Cui, and M. W. W. Adams, “Anaerobic Microbes : Oxygen Detoxification Without Superoxide Dismutase,” *Science*, vol. 286, pp. 306–309, oct 1999.
- [5] M. Lombard, M. Fontecave, D. Touati, V. Niviere, V. Nivière, and V. Niviere, “Reaction of the Desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with Superoxide Anion : EVIDENCE FOR A SUPEROXIDE REDUCTASE ACTIVITY,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 115–121, jan 2000.
- [6] D. M. Kurtz, “Microbial Detoxification of Superoxide : The Non-Heme Iron Reductive Paradigm for Combating Oxidative Stress,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 37, pp. 902–908, nov 2004.
- [7] V. Nivière, M. Asso, C. O. Weill, M. Lombard, B. Guigliarelli, V. Favaudon, and

- C. Houée-Levin, "Superoxide Reductase from *Desulfoarculus baarsii* : Identification of Protonation Steps in the Enzymatic Mechanism," *Biochemistry*, vol. 43, pp. 808–818, jan 2004.
- [8] A. S. Pereira, P. Tavares, F. Folgosa, R. M. Almeida, I. Moura, and J. J. G. Moura, "Superoxide Reductases," *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 2007, pp. 2569–2581, jun 2007.
- [9] Y. Sheng, I. a. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A.-F. Miller, M. Teixeira, and J. S. Valentine, "Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases," *Chemical Reviews*, vol. 114, pp. 3854–3918, apr 2014.
- [10] J. P. Emerson, D. E. Cabelli, and D. M. Kurtz, "An engineered two-iron superoxide reductase lacking the [Fe(SCys)₄] site retains its catalytic properties in vitro and in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, pp. 3802–3807, apr 2003.
- [11] V. Adam, A. Royant, V. Nivière, F. P. Molina-Heredia, and D. Bourgeois, "Structure of Superoxide Reductase Bound to Ferrocyanide and Active Site Expansion upon X-Ray-Induced Photo-Reduction," *Structure*, vol. 12, pp. 1729–1740, sep 2004.
- [12] M. Archer, R. Huber, P. Tavares, I. Moura, J. J. Moura, M. A. Carrondo, L. C. Sieker, J. LeGall, M. J. Romão, and M. J. Romco, "Crystal structure of desulforedoxin from *Desulfovibrio gigas* determined at 1.8 Å resolution : a novel non-heme iron protein structure.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 251, pp. 690–702, aug 1995.
- [13] F. Bonnot, S. Duval, M. Lombard, J. Valton, C. Houée-Levin, and V. Nivière, "Intermolecular electron transfer in two-iron superoxide reductase : a putative role for the desulforedoxin center as an electron donor to the iron active site," *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 16, pp. 889–898, aug 2011.

- [14] F. Folgosa, C. M. Cordas, J. A. Santos, A. S. Pereira, J. J. G. Moura, P. Tavares, and I. Moura, “New spectroscopic and electrochemical insights on a class I superoxide reductase : evidence for an intramolecular electron-transfer pathway,” *Biochemical Journal*, vol. 438, pp. 485–494, sep 2011.
- [15] M. Horch, T. Utesch, P. Hildebrandt, M. A. Mroginski, and I. Zebger, “Domain motions and electron transfer dynamics in 2Fe-superoxide reductase,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 33, pp. 23053–23066, 2016.
- [16] J. P. Emerson, E. D. Coulter, D. E. Cabelli, R. S. Phillips, and D. M. Kurtz, “Kinetics and Mechanism of Superoxide Reduction by Two-Iron Superoxide Reductase from *Desulfovibrio vulgaris*,” *Biochemistry*, vol. 41, pp. 4348–4357, apr 2002.
- [17] J. V. Rodrigues, I. A. Abreu, D. Cabelli, and M. Teixeira, “Superoxide Reduction Mechanism of *Archaeoglobus fulgidus* One-Iron Superoxide Reductase,” *Biochemistry*, vol. 45, pp. 9266–9278, aug 2006.
- [18] V. W. Huang, J. P. Emerson, and D. M. Kurtz, “Reaction of *Desulfovibrio vulgaris* Two-Iron Superoxide Reductase with Superoxide : Insights from Stopped-Flow Spectrophotometry,” *Biochemistry*, vol. 46, pp. 11342–11351, oct 2007.
- [19] F. Bonnot, T. Molle, S. Ménage, Y. Moreau, S. Duval, V. Favaudon, C. Houée-Levin, and V. Nivière, “Control of the Evolution of Iron Peroxide Intermediate in Superoxide Reductase from *Desulfoarculus baarsii*. Involvement of Lysine 48 in Protonation,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, pp. 5120–5130, mar 2012.
- [20] R. Silaghi-Dumitrescu, I. Silaghi-Dumitrescu, E. D. Coulter, and D. M. Kurtz, “Computational Study of the Non-Heme Iron Active Site in Superoxide Reductase and Its Reaction with Superoxide,” *Inorganic Chemistry*, vol. 42, pp. 446–456, jan 2003.

-
- [21] A. Dey, F. E. Jenney, M. W. W. Adams, M. K. Johnson, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, F. E. Jenney, M. W. W. Adams, M. K. Johnson, K. O. Hodgson, B. Hedman, and E. I. Solomon, "Sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy and density functional theory calculations on superoxide reductase : role of the axial thiolate in reactivity.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, pp. 12418–31, oct 2007.
- [22] P. H.-L. Sit, A. Migliore, M.-H. Ho, and M. L. Klein, "Quantum Mechanical and Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Studies of the Iron–Dioxygen Intermediates and Proton Transfer in Superoxide Reductase," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 6, pp. 2896–2909, sep 2010.
- [23] E. Tremey, F. Bonnot, Y. Moreau, C. Berthomieu, A. Desbois, V. Favaudon, G. Blondin, C. Houée-Levin, and V. Nivière, "Hydrogen bonding to the cysteine ligand of superoxide reductase : Acid-base control of the reaction intermediates," *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 18, pp. 815–830, oct 2013.
- [24] G. Katona, P. Carpentier, V. Niviere, P. Amara, V. Adam, J. Ohana, N. Tsanov, and D. Bourgeois, "Raman-Assisted Crystallography Reveals End-On Peroxide Intermediates in a Nonheme Iron Enzyme," *Science*, vol. 316, pp. 449–453, apr 2007.
- [25] C. Mathé, T. A. Mattioli, O. Horner, M. Lombard, J.-M. Latour, M. Fontecave, and V. Nivière, "Identification of Iron(III) Peroxo Species in the Active Site of the Superoxide Reductase SOR from *Desulfoarcus baarsii*," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, pp. 4966–4967, may 2002.
- [26] C. Mathé, V. Nivière, C. Houée-Levin, and T. A. Mattioli, "Fe³⁺- η^2 -peroxo species in superoxide reductase from *Treponema pallidum*. Comparison with *Desulfoarcus baarsii*," *Biophysical Chemistry*, vol. 119, pp. 38–48, jan 2006.
- [27] C. Mathe, C. O. Weill, T. A. Mattioli, C. Berthomieu, C. Houee-Levin, E. Tremey, and V. Niviere, "Assessing the Role of the Active-site Cysteine Ligand in the Su-

- peroxide Reductase from *Desulfoarculus baarsii*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 22207–22216, jul 2007.
- [28] O. Horner, J.-M. Mouesca, J.-L. Oddou, C. Jeandey, V. Nivière, T. A. Mattioli, C. Mathé, M. Fontecave, P. Maldivi, P. Bonville, J. A. Halfen, and J.-M. Latour, “Mössbauer Characterization of an Unusual High-Spin Side-On Peroxo–Fe 3+ Species in the Active Site of Superoxide Reductase from *Desulfoarculus baarsii* . Density Functional Calculations on Related Models †,” *Biochemistry*, vol. 43, pp. 8815–8825, jul 2004.
- [29] F. Bonnot, E. Tremey, D. von Stetten, S. Rat, S. Duval, P. Carpentier, M. Clemancey, A. Desbois, and V. Nivière, “Formation of High-Valent Iron-Oxo Species in Superoxide Reductase : Characterization by Resonance Raman Spectroscopy,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, pp. 5926–5930, jun 2014.
- [30] S. Shaik, S. Cohen, Y. Wang, H. Chen, D. Kumar, and W. Thiel, “P450 Enzymes : Their Structure, Reactivity, and Selectivity—Modeled by QM/MM Calculations,” *Chemical Reviews*, vol. 110, pp. 949–1017, feb 2010.
- [31] J. H. Dawson, R. H. Holm, J. R. Trudell, G. Barth, R. E. Linder, E. Bunnenberg, C. Djerassi, and S. C. Tang, “Magnetic circular dichroism studies. 43. Oxidized cytochrome P-450. Magnetic circular dichroism evidence for thiolate ligation in the substrate-bound form. Implications for the catalytic mechanism,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 98, pp. 3707–3709, jun 1976.
- [32] A. D. Becke, “Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior,” *Physical Review A*, vol. 38, pp. 3098–3100, sep 1988.
- [33] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr, “Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density,” *Physical Review B*, vol. 37, pp. 785–789, jan 1988.

-
- [34] A. D. Becke, "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, no. 7, p. 5648, 1993.
- [35] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. a. Kollman, "A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, pp. 5179–5197, may 1995.
- [36] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives, "The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 110, pp. 1657–1666, mar 1988.
- [37] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, "All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins †," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, pp. 3586–3616, apr 1998.
- [38] P. M. Morse, "Diatomic Molecules According to the Wave Mechanics. II. Vibrational Levels," *Physical Review*, vol. 34, pp. 57–64, jul 1929.
- [39] H. C. Urey and C. A. Bradley, "The Vibrations of Pentatonic Tetrahedral Molecules," *Physical Review*, vol. 38, pp. 1969–1978, dec 1931.
- [40] J. E. Jones, "On the Determination of Molecular Fields. II. From the Equation of State of a Gas," *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 106, pp. 463–477, oct 1924.
- [41] S. R. Cox and D. E. Williams, "Representation of the molecular electrostatic potential by a net atomic charge model," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 2,

- no. 3, pp. 304–323, 1981.
- [42] U. C. Singh and P. A. Kollman, “An approach to computing electrostatic charges for molecules,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 5, pp. 129–145, apr 1984.
- [43] B. H. Besler, K. M. Merz, and P. A. Kollman, “Atomic charges derived from semiempirical methods,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 11, pp. 431–439, may 1990.
- [44] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, and P. a. Kollman, “A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges : the RESP model,” *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, pp. 10269–10280, oct 1993.
- [45] P. Li and K. M. Merz, “Taking into Account the Ion-induced Dipole Interaction in the Nonbonded Model of Ions,” *Journal of chemical theory and computation*, vol. 10, pp. 289–297, jan 2014.
- [46] P. Li, L. F. Song, and K. M. Merz, “Parameterization of Highly Charged Metal Ions Using the 12-6-4 LJ-Type Nonbonded Model in Explicit Water,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, no. 3, pp. 883–895, 2015.
- [47] P. Li, L. F. Song, and K. M. Merz, “Systematic Parameterization of Monovalent Ions Employing the Nonbonded Model,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, p. 150206175228009, 2015.
- [48] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, “Development and testing of a general amber force field,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, pp. 1157–1174, jul 2004.
- [49] J. M. Seminario, “Calculation of intramolecular force fields from second-derivative tensors,” *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 60, no. 7, pp. 1271–1277, 1996.

- [50] S. C. Hoops, K. W. Anderson, and K. M. Merz, "Force field design for metallo-proteins," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 113, pp. 8262–8270, oct 1991.
- [51] N. Lalaoui, R. David, H. Jamet, M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, "Hosting Adamantane in the Substrate Pocket of Laccase : Direct Bioelectrocatalytic Reduction of O₂ on Functionalized Carbon Nanotubes," *ACS Catalysis*, vol. 6, pp. 4259–4264, jul 2016.
- [52] M. B. Peters, Y. Yang, B. Wang, L. Füst-Molnár, M. N. Weaver, and K. M. Merz, "Structural survey of zinc-containing proteins and development of the zinc AMBER force field (ZAFF)," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 6, pp. 2935–2947, 2010.
- [53] R. David, "sem_forces (https://github.com/cdavro/sem_forces)," 2016.
- [54] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery, J. A., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, "Gaussian 09 Revision D.01," 2009.
- [55] M. Born and R. Oppenheimer, "Zur Quantentheorie der Molekeln," *Annalen der*

- Physik*, vol. 389, no. 20, pp. 457–484, 1927.
- [56] P. Hohenberg and W. Kohn, “Inhomogeneous Electron Gas,” *Physical Review*, vol. 136, pp. B864–B871, nov 1964.
- [57] W. Kohn and L. J. Sham, “Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects,” *Physical Review*, vol. 140, pp. A1133–A1138, nov 1965.
- [58] R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople, “Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 54, pp. 724–728, jan 1971.
- [59] W. J. Hehre, “Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 56, no. 5, p. 2257, 1972.
- [60] J. S. Binkley, J. a. Pople, and W. J. Hehre, “Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 102, pp. 939–947, jan 1980.
- [61] M. S. Gordon, J. S. Binkley, J. A. Pople, W. J. Pietro, and W. J. Hehre, “Self-consistent molecular-orbital methods. 22. Small split-valence basis sets for second-row elements,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 104, pp. 2797–2803, may 1982.
- [62] M. M. Francl, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, M. S. Gordon, D. J. DeFrees, and J. A. Pople, “Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization-type basis set for second-row elements,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 77, no. 7, p. 3654, 1982.
- [63] T. Clark, J. Chandrasekhar, G. W. Spitznagel, and P. V. R. Schleyer, “Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21+G basis

- set for first-row elements, Li–F,” *J. Comput. Chem.*, vol. 4, pp. 294–301, jan 1983.
- [64] M. J. Frisch, J. a. Pople, and J. S. Binkley, “Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 80, no. 7, p. 3265, 1984.
- [65] K. Raghavachari and G. W. Trucks, “Highly correlated systems. Excitation energies of first row transition metals Sc–Cu,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 91, no. 2, p. 1062, 1989.
- [66] V. a. Rassolov, J. a. Pople, M. a. Ratner, and T. L. Windus, “6-31G* basis set for atoms K through Zn,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 109, no. 4, p. 1223, 1998.
- [67] J. Hutter, M. Parrinello, and G. Lippert, “The Gaussian and augmented-plane-wave density functional method for ab initio molecular dynamics simulations,” *Theor. Chem. Acc.*, vol. 103, pp. 124–140, 1999.
- [68] M. Krack and M. Parrinello, “All-electron ab-initio molecular dynamics,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 2, no. 10, pp. 2105–2112, 2000.
- [69] G. Lippert, J. Hutter, and M. Parrinello, “A hybrid Gaussian and plane wave density functional scheme,” *Molecular Physics*, vol. 92, pp. 477–488, oct 1997.
- [70] A. Warshel and M. Levitt, “Theoretical studies of enzymic reactions : Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 103, pp. 227–249, may 1976.
- [71] F. Maseras and K. Morokuma, “IMOMM : A new integrated ab initio + molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 16, pp. 1170–1179, sep 1995.
- [72] T. Laino, F. Mohamed, A. Laio, and M. Parrinello, “An efficient real space multigrid QM/MM electrostatic coupling,” *Journal of Chemical Theory and Computation*,

- vol. 1, pp. 1176–1184, nov 2005.
- [73] T. Laino, F. Mohamed, A. Laio, and M. Parrinello, “An efficient linear-scaling electrostatic coupling for treating periodic boundary conditions in QM/MM simulations,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 2, no. 5, pp. 1370–1378, 2006.
- [74] U. C. Singh and P. A. Kollman, “A combined ab initio quantum mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular systems : Applications to the CH₃Cl + Cl[?] exchange reaction and gas phase protonation of polyethers,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 7, pp. 718–730, dec 1986.
- [75] M. J. Field, P. A. Bash, and M. Karplus, “A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 11, pp. 700–733, jul 1990.
- [76] X. Assfeld and J.-L. Rivail, “Quantum chemical computations on parts of large molecules : the ab initio local self consistent field method,” *Chemical Physics Letters*, vol. 263, pp. 100–106, dec 1996.
- [77] J. Gao, P. Amara, C. Alhambra, and M. J. Field, “A Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method for the Treatment of Boundary Atoms in Combined QM/MM Calculations,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 102, pp. 4714–4721, jun 1998.
- [78] G. A. DiLabio, M. M. Hurley, and P. A. Christiansen, “Simple one-electron quantum capping potentials for use in hybrid QM/MM studies of biological molecules,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 116, pp. 9578–9584, jun 2002.
- [79] O. A. von Lilienfeld, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, and D. Sebastiani, “Variational optimization of effective atom centered potentials for molecular properties,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 122, p. 014113, jan 2005.

-
- [80] D. A. McQuarrie and J. D. Simon, *Molecular Thermodynamics*. University Science Books., 1999.
- [81] R. Car and M. Parrinello, “Unified Approach for Molecular Dynamics and Density-Functional Theory,” *Physical Review Letters*, vol. 55, pp. 2471–2474, nov 1985.
- [82] L. Verlet, “Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules,” *Physical Review*, vol. 159, pp. 98–103, jul 1967.
- [83] L. Verlet, “Computer "Experiments" on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions,” *Physical Review*, vol. 165, pp. 201–214, jan 1968.
- [84] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson, “A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules : Application to small water clusters,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 76, pp. 637–649, jan 1982.
- [85] R. W. Hockney, “The potential calculation and some applications,” *Methods, Comp. Phys.*, vol. 9, p. 136, 1970.
- [86] H. C. Andersen, “Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 72, pp. 2384–2393, feb 1980.
- [87] S. Nosé, “A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, pp. 511–519, jul 1984.
- [88] W. G. Hoover, “Canonical dynamics : Equilibrium phase-space distributions,” *Physical Review A*, vol. 31, pp. 1695–1697, mar 1985.
- [89] G. J. Martyna, M. L. Klein, and M. Tuckerman, “Nosé–Hoover chains : The canonical ensemble via continuous dynamics,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 97, pp. 2635–2643, aug 1992.
- [90] C. Dellago and P. G. Bolhuis, “Transition Path Sampling and Other Advanced Simulation Techniques for Rare Events,” in *Advanced Computer Simulation Ap-*

- proaches for Soft Matter Sciences III*, pp. 167–233, Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [91] G. Torrie and J. Valleau, “Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation : Umbrella sampling,” *Journal of Computational Physics*, vol. 23, pp. 187–199, feb 1977.
- [92] J. Kästner, “Umbrella sampling,” *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science*, vol. 1, pp. 932–942, nov 2011.
- [93] T. Huber, A. E. Torda, and W. F. van Gunsteren, “Local elevation : a method for improving the searching properties of molecular dynamics simulation.,” *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 8, pp. 695–708, dec 1994.
- [94] E. Darve and A. Pohorille, “Calculating free energies using average force,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 115, pp. 9169–9183, nov 2001.
- [95] J. R. Gullingsrud, R. Braun, and K. Schulten, “Reconstructing Potentials of Mean Force through Time Series Analysis of Steered Molecular Dynamics Simulations,” *Journal of Computational Physics*, vol. 151, pp. 190–211, may 1999.
- [96] A. Laio and M. Parrinello, “Escaping free-energy minima.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pp. 12562–6, oct 2002.
- [97] A. Barducci, M. Bonomi, and M. Parrinello, “Metadynamics,” *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science*, vol. 1, pp. 826–843, sep 2011.
- [98] L. Sutto, S. Marsili, and F. L. Gervasio, “New advances in metadynamics,” *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science*, vol. 2, pp. 771–779, sep 2012.
- [99] A. Laio and F. L. Gervasio, “Metadynamics : a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science,” *Reports*

on *Progress in Physics*, vol. 71, p. 126601, dec 2008.

- [100] M. Iannuzzi and M. Parrinello, “Proton Transfer in Heterocycle Crystals,” *Physical Review Letters*, vol. 93, p. 025901, jul 2004.
- [101] D. Quigley and P. M. Rodger, “Metadynamics simulations of ice nucleation and growth,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 128, p. 154518, apr 2008.
- [102] D. Muñoz-Santiburcio, A. Hernández-Laguna, and C. I. Sainz-Díaz, “Simulating the Dehydroxylation Reaction in Smectite Models by Car–Parrinello-like–Born–Oppenheimer Molecular Dynamics and Metadynamics,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 120, pp. 28186–28192, dec 2016.
- [103] V. Leone, F. Marinelli, P. Carloni, and M. Parrinello, “Targeting biomolecular flexibility with metadynamics,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 20, pp. 148–154, apr 2010.
- [104] X. Biarnés, A. Ardèvol, J. Iglesias-Fernández, A. Planas, and C. Rovira, “Catalytic Itinerary in 1,3-1,4- β -Glucanase Unraveled by QM/MM Metadynamics. Charge Is Not Yet Fully Developed at the Oxocarbenium Ion-like Transition State,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, pp. 20301–20309, dec 2011.
- [105] A. Gouron, A. Milet, and H. Jamet, “Conformational Flexibility of Human Casein Kinase Catalytic Subunit Explored by Metadynamics,” *Biophysical Journal*, vol. 106, pp. 1134–1141, mar 2014.
- [106] P. Tiwary, V. Limongelli, M. Salvalaglio, and M. Parrinello, “Kinetics of protein–ligand unbinding : Predicting pathways, rates, and rate-limiting steps,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, pp. E386–E391, feb 2015.
- [107] R. Sun, O. Sode, J. F. Dama, and G. A. Voth, “Simulating Protein Mediated Hydrolysis of ATP and Other Nucleoside Triphosphates by Combining QM/MM Mo-

- lecular Dynamics with Advances in Metadynamics,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 13, pp. 2332–2341, may 2017.
- [108] J. Blumberger, B. Ensing, and M. L. Klein, “Formamide Hydrolysis in Alkaline Aqueous Solution : Insight from Ab Initio Metadynamics Calculations,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 45, pp. 2893–2897, apr 2006.
- [109] B. Ensing, M. De Vivo, Z. Liu, P. Moore, and M. L. Klein, “Metadynamics as a Tool for Exploring Free Energy Landscapes of Chemical Reactions,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 39, pp. 73–81, feb 2006.
- [110] C. L. Stanton, I.-F. W. Kuo, C. J. Mundy, T. Laino, and K. N. Houk, “QM/MM Metadynamics Study of the Direct Decarboxylation Mechanism for Orotidine-5′-monophosphate Decarboxylase Using Two Different QM Regions : Acceleration Too Small To Explain Rate of Enzyme Catalysis,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, pp. 12573–12581, nov 2007.
- [111] A. K. Tummanapelli and S. Vasudevan, “Estimating successive pK_a values of polyprotic acids from ab initio molecular dynamics using metadynamics : the dissociation of phthalic acid and its isomers,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 17, no. 9, pp. 6383–6388, 2015.
- [112] A. Barducci, G. Bussi, and M. Parrinello, “Well-tempered metadynamics : A smoothly converging and tunable free-energy method,” *Physical Review Letters*, vol. 100, no. 2, pp. 1–4, 2008.
- [113] J. F. Dama, M. Parrinello, and G. A. Voth, “Well-Tempered Metadynamics Converges Asymptotically,” *Physical Review Letters*, vol. 112, p. 240602, jun 2014.
- [114] J. F. Dama, G. Rotskoff, M. Parrinello, and G. a. Voth, “Transition-Tempered Metadynamics : Robust, Convergent Metadynamics via On-the-Fly Transition Barrier Estimation,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 10, pp. 3626–3633, sep 2014.

- [115] M. Ernzerhof and G. E. Scuseria, “Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof exchange-correlation functional,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 110, no. 11, p. 5029, 1999.
- [116] C. Adamo and V. Barone, “Toward reliable density functional methods without adjustable parameters : The PBE0 model,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 110, no. 13, p. 6158, 1999.
- [117] J. P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, “Generalized Gradient Approximation Made Simple,” *Physical Review Letters*, vol. 77, pp. 3865–3868, oct 1996.
- [118] J. Hubbard, “Electron Correlations in Narrow Energy Bands,” *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 276, pp. 238–257, nov 1963.
- [119] M. Cococcioni and S. de Gironcoli, “A linear response approach to the calculation of the effective interaction parameters in the LDA+U method,” *Physical Review B*, vol. 71, p. 035105, may 2004.
- [120] H. J. Kulik, M. Cococcioni, D. A. Scherlis, and N. Marzari, “Density functional theory in transition-metal chemistry : A self-consistent hubbard U approach,” *Physical Review Letters*, vol. 97, p. 103001, sep 2006.
- [121] M. Guidon, F. Schiffmann, J. Hutter, and J. Vandevondele, “Ab initio molecular dynamics using hybrid density functionals,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 128, no. 2008, 2008.
- [122] M. Guidon, J. Hutter, and J. VandeVondele, “Robust periodic Hartree-Fock exchange for large-scale simulations using Gaussian basis sets,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 5, no. Mic, pp. 3010–3021, 2009.
- [123] P. H.-L. Sit, R. Car, M. H. Cohen, and A. Selloni, “Simple, Unambiguous Theoretical Approach to Oxidation State Determination via First-Principles Calculations,”

Inorganic Chemistry, vol. 50, pp. 10259–10267, oct 2011.

- [124] A. T. P. Carvalho, A. F. S. Teixeira, and M. J. Ramos, “Parameters for molecular dynamics simulations of iron-sulfur proteins.,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 34, pp. 1540–8, jul 2013.
- [125] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A. W. Goetz, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R. M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M. J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P. A. Kollman, “AMBER 12,” 2012.
- [126] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, “Gaussian 03 Revision C.02,” 2004.
- [127] R. David, H. Jamet, V. Nivière, Y. Moreau, and A. Milet, “Iron Hydroperoxide

- Intermediate in Superoxide Reductase : Protonation or Dissociation First? MM Dynamics and QM/MM Metadynamics Study,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 13, pp. 2987–3004, jun 2017.
- [128] a. J. H. Wachters, “Gaussian Basis Set for Molecular Wavefunctions Containing Third-Row Atoms,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 52, no. 3, p. 1033, 1970.
- [129] P. J. Hay, “Gaussian basis sets for molecular calculations. The representation of 3d orbitals in transition-metal atoms,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 66, no. 10, p. 4377, 1977.
- [130] R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger, and J. a. Pople, “Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 72, no. 1, p. 650, 1980.
- [131] a. D. McLean and G. S. Chandler, “Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11–18,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 72, no. 10, p. 5639, 1980.
- [132] P. Li, B. P. Roberts, D. K. Chakravorty, and K. M. Merz, “Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent.,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 9, pp. 2733–2748, jun 2013.
- [133] D. A. Giammona, *An Examination of Conformational Flexibility in Porphyrins and Bulky-ligand Binding in Myoglobin*. Ph.d. thesis, University of California, Davis, 1984.
- [134] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 79, no. 2, p. 926, 1983.
- [135] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, and C. Simmerling,

- “Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters,” *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 65, pp. 712–725, nov 2006.
- [136] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, “Particle mesh Ewald : An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, no. 12, p. 10089, 1993.
- [137] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, “A smooth particle mesh Ewald method,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 103, no. 19, p. 8577, 1995.
- [138] S. A. Adelman, “Generalized Langevin equation approach for atom/solid-surface scattering : General formulation for classical scattering off harmonic solids,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 64, no. 6, p. 2375, 1976.
- [139] R. W. Pastor, B. R. Brooks, and A. Szabo, “An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms,” *Molecular Physics*, vol. 65, pp. 1409–1419, dec 1988.
- [140] M. Archer, A. Carvalho, S. Teixeira, I. Moura, J. Moura, F. Rusnak, and M. Romão, “Structural studies by X-ray diffraction on metal substituted desulforedoxin, a rubredoxin-type protein,” *Protein Science*, vol. 8, no. 7, pp. 1536–1545, 1999.
- [141] J. C. Grossman, E. Schwegler, and G. Galli, “Quantum and Classical Molecular Dynamics Simulations of Hydrophobic Hydration Structure around Small Solutes,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, pp. 15865–15872, oct 2004.
- [142] T. Kitagawa, A. Dey, P. Lugo-Mas, J. B. Benedict, W. Kaminsky, E. Solomon, and J. A. Kovacs, “A Functional Model for the Cysteinate-Ligated Non-Heme Iron Enzyme Superoxide Reductase (SOR),” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 14448–14449, nov 2006.

- [143] P. Dauber and A. T. Hagler, “Crystal packing, hydrogen bonding, and the effect of crystal forces on molecular conformation,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 13, pp. 105–112, apr 1980.
- [144] H. P. G. Thompson and G. M. Day, “Which conformations make stable crystal structures? Mapping crystalline molecular geometries to the conformational energy landscape,” *Chemical Science*, vol. 5, no. 8, p. 3173, 2014.
- [145] F. Bonnot, C. Houée-Levin, V. Favaudon, and V. Nivière, “Photochemical processes observed during the reaction of superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1804, pp. 762–767, apr 2010.
- [146] J. VandeVondele, M. Krack, F. Mohamed, M. Parrinello, T. Chassaing, and J. Hutter, “Quickstep : Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach,” *Computer Physics Communications*, vol. 167, pp. 103–128, apr 2005.
- [147] J. Hutter, M. Iannuzzi, F. Schiffmann, and J. VandeVondele, “cp2k : atomistic simulations of condensed matter systems,” *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science*, vol. 4, pp. 15–25, jan 2014.
- [148] J. Spencer and A. Alavi, “Efficient calculation of the exact exchange energy in periodic systems using a truncated Coulomb potential,” *Physical Review B*, vol. 77, p. 193110, may 2008.
- [149] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, and H. Krieg, “A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 132, no. 15, p. 154104, 2010.
- [150] S. Grimme, “Density functional theory with London dispersion corrections,” *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science*, vol. 1, pp. 211–228,

mar 2011.

- [151] P. E. Blöchl, “Electrostatic decoupling of periodic images of plane-wave-expanded densities and derived atomic point charges,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 103, no. 17, p. 7422, 1995.
- [152] A. A. A. A. Attia, D. Cioloboc, A. Lupan, and R. Silaghi-Dumitrescu, “Fe-O versus O-O bond cleavage in reactive iron peroxide intermediates of superoxide reductase,” *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 18, pp. 95–101, jan 2013.
- [153] R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules : A Quantum Theory*. International series of monographs on chemistry, Clarendon Press, 1990.
- [154] T. A. Keith, “AIMAll (15.09.27),” 2015.
- [155] D. Cremer and E. Kraka, “Chemical Bonds without Bonding Electron Density? Does the Difference Electron-Density Analysis Suffice for a Description of the Chemical Bond?,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 23, pp. 627–628, aug 1984.
- [156] R. F. W. Bader and M. E. Stephens, “Spatial localization of the electronic pair and number distributions in molecules,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 97, pp. 7391–7399, dec 1975.
- [157] X. Fradera, M. A. Austen, and R. F. W. Bader, “The Lewis Model and Beyond,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 103, pp. 304–314, jan 1999.

Résumé

L'obtention, dans des conditions douces, sélectives et de chimie durable de molécules ciblées est aujourd'hui un enjeu majeur. Les métalloenzymes artificielles représentent une voie d'investigation importante, car en jouant, par exemple, sur la seconde sphère de coordination, il est possible de modifier fortement la réactivité de ces systèmes bio-inspirés. Le développement de cette chimie suppose une connaissance approfondie des différentes étapes du mécanisme de la réaction envisagée. Pour cela, la chimie théorique est essentielle à la rationalisation de la réactivité chimique mais elle souffre encore de nombreuses insuffisances pour les systèmes que nous nous proposons d'étudier.

Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier la superoxyde réductase, enzyme détoxifiante du radical superoxyde. Si de nombreuses expérimentales sont disponibles détaillant certains intermédiaires, le mécanisme précis est peu documenté. Le but a été de mettre en place une méthodologie complète allant du développement de paramètres MM spécifiques à l'étude de la réactivité par métadynamiques QM/MM.

Le développement de paramètres MM pour le site actif à fer a permis son étude en dynamique MM donnant des informations sur la conformations du squelette peptidique ainsi que l'interaction avec les molécules de solvant. De part la nature du fer, une description QM du site actif à été nécessaire via l'utilisation de DFT hybride. Les métadynamiques QM/MM ont permis quant à elles d'explorer les chemins réactionnels et de caractériser les espèces ainsi formées et les énergies d'activations.

Cette méthodologie a permis la compréhension en premier lieu de la réactivité native de la forme sauvage et elle a aussi permis d'explorer les réactivités nouvelles des mutations de la SOR permettant ainsi de définir le rôle crucial de la seconde sphère de coordination.

Mots-clés : Métadynamique, QM/MM, DFT Hybride, métalloenzymes, réactivité, mutations de protéines, sphère de coordinations

Abstract

Obtaining targeted molecules under gentle, selective and sustainable conditions is still a major challenge. Artificial metalloenzymes are an important line of enquiry, because by playing, for example, with the second sphere of coordination, it is possible to strongly modify the reactivity of these bio-inspired systems. The development of this chemistry presupposes a thorough knowledge of the different stages of the mechanism of the reaction under study. For this reason, theoretical chemistry is essential to rationalize chemical reactivity, but it still suffers from many shortcomings for the systems we propose to study.

In this work, we study the superoxide reductase, a detoxifying enzyme of the superoxide radical. While many experiments are available detailing some intermediates, the precise mechanism is not well documented. The aim was to implement a complete methodology ranging from the development of specific MM parameters to the study of reactivity by QM/MM metadynamics. The development of MM parameters for the iron active site allowed its study by MM dynamics giving informations on the conformation of the peptide backbone as well as on the interaction with solvent molecules. Due to the nature of the iron, a QM description of the active site was required using hybrid DFT. QM/MM metadynamics have allowed us to explore reaction pathways and to characterize the compounds formed to obtain the needed activation energies. This methodology made it possible to understand the native reactivity of the wild form of the SOR, but also to explore the new reactivity of the mutations of the SOR and thus to define the crucial role of the second coordination sphere.

Keywords: Metadynamics, QM/MM, Hybrid DFT, metalloenzymes, reactivity, mutations, coordination sphere