

Claire GIROUD

Née le 12 août 1980
Nationalité française

16 passage Gatbois
75012 Paris
01 44 73 48 22
06 85 96 34 63
giroud@phare.normalesup.org
<http://www.normalesup.org/~giroud/>

Laboratoire des BioMolécules - UMR 7203
Département de Chimie
École Normale Supérieure
24 rue Lhomond
75230 Paris cedex 05
01 44 32 24 20

Poste actuel

2008 – 2010 **ATER à l'École Normale Supérieure de Paris** en tant que professeur agrégée titulaire
Travail de recherche au sein du Laboratoire des BioMolécules du Département de Chimie, sous la direction de Clotilde Policar.
Enseignement au centre de préparation à l'agrégation de sciences physiques de Montrouge, sous la direction de Jean-Bernard Baudin.

Formation universitaire

2005 – 2008 **Thèse de Chimie**
Soutenue le 17 octobre 2008 à l'Université Paris Descartes
direction : Jean-Luc Boucher (UMR 8601, Université Paris Descartes)
en collaboration avec Jérôme Santolini (iBiTec-S, CEA Saclay)
Sujet : *Étude du mécanisme des NO synthases : importance du réseau de liaisons hydrogène dans l'environnement et la réactivité de l'hème.*

2001 – 2005 **Élève à l'École Normale Supérieure de Paris**

2005 Master de Chimie Bioorganique et Bioinorganique, Université Paris 11

2004 Agrégation de sciences physiques option chimie, rang 17

2003 Maîtrise de chimie, ENS de Paris

2002 Licence de chimie, ENS de Paris

2001 Admission à l'ENS de Paris

Enseignement

2008 – 2010 ATER à l'École Normale Supérieure de Paris : cours, TD et TP de chimie

2005 – 2008 Monitorat à l'Université Paris Descartes (UFR Biomédicale) : TD de chimie en PCEM1

2004 – 2005 Colles de chimie en PCSI au Lycée Fénelon-Sainte Marie, Paris

Publications

Articles publiés

- Cantat T., Génin E., Giroud C., Meyer G., Jutand A. *Structural and kinetic effects of chloride ions in the palladium catalyzed allylic substitutions*. J. Org. Chem. 687, 365-376 (2003).
- Ask K., Dijols S., Giroud C., Casse L., Frapart Y.-M., Sari M.-A., Kim K.-S., Stuehr D. J., Mansuy D., Camus P., and Boucher J.-L. *Reduction of Nitlutamide by NO Synthases: Implications for the Adverse Effects of This Nitroaromatic Antiandrogen Drug*. Chem. Res. Toxicol. 16, 1547-1554 (2003)
- Giroud C., Moreau M., Mattioli T. A., Balland V., Boucher J.-L., Xu, Y., Stuehr D. J., and Santolini J. *Role of Arginine Guanidinium Moiety in Nitric Oxide Synthase Mechanism of Oxygen Activation*. J.B.C. (2009) *in press*.

Articles soumis ou en cours de révision

- Giroud C., Moreau M., Sagami I., Shimizu T., Mansuy D., and Boucher J.-L. *Role of Tyr 588 on Binding and Oxidation to NO of Guanidines and Hydroxyguanidines by Neuronal Nitric Oxide Synthase*.
- Maréchal A., Giroud C., Santolini J. and Balland V. *Redox Investigation of NOS heme Environment: Cross-Effects of pH and Cofactors*.

Communications

Communications orales dans des congrès nationaux ou internationaux

- Réunion du Club Métalloprotéines et Modèles à Fréjus, France, septembre 2009
- Cinquième conférence internationale du NO à Bregenz, Autriche, août 2008
- Réunion du Club Métalloprotéines et Modèles à Fréjus, France, mars 2008

Exposés dans des séminaires ou groupes de travail

- Séminaire : Matinales des jeunes chercheurs, ENS Paris, novembre 2008
- Séminaire des doctorants et post-docs du CEA Saclay, mars 2008
- Groupe de travail de l'iBiTec-S, CEA Saclay, février 2008

Posters

- Journée de l'École Doctorale du Médicament à Paris, avril 2008
- Réunion du Club Métalloprotéines et Modèles à Aussois, octobre 2006

Compétences techniques et linguistiques

Techniques spectroscopiques et analytiques	UV-visible, infrarouge, ATR-FTIR, Raman de résonance, RPE, RMN, spectro-électrochimie, spectrométrie de masse, HPLC, voltamétrie cyclique, ultramicro-ampérométrie
Biochimie	Expression de protéines dans <i>E. Coli</i> , purification de protéines, électrophorèse, suivi de réaction enzymatique par utilisation de substrats marqués, culture de la lignée RAW 264.7
Synthèse	Phényl-guanidines, porphyrines, ligands et complexes de Mn(II)
Informatique	Logiciels de traitement du signal (GRAMS/32, Origin 6.0, Speclab, OPUS) Modélisation de site actif, docking, Fortan 90, HTML
Langues	Anglais : lu, écrit, parlé - Allemand : scolaire

1. Activités de recherche

Mes travaux de recherche portent sur l'étude des métalloprotéines à activité redox et des complexes inorganiques modèles de ces protéines. La **chimie bioinorganique** se situe à l'interface entre la biologie, la chimie et la physique. L'aspect **biologie** montre que de très nombreuses métalloprotéines sont impliquées à tous les niveaux dans le fonctionnement cellulaire, ce qui permet d'espérer des applications directes des recherches effectuées en termes de développement d'outils thérapeutiques et pharmaceutiques. L'aspect **chimie** est nécessaire à la fois à la synthèse des complexes et analogues utilisés et à la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans les transformations cellulaires. Enfin l'aspect **physique** permet d'apporter un regard précis et rigoureux sur les techniques d'analyse employées, en particulier les techniques spectroscopiques et électrochimiques, et sur les informations que ces techniques permettent d'apporter sur le système étudié.

Travaux de recherche antérieurs à la thèse

- Janvier - juin 2005 Stage de Master, direction : Jean-Luc Boucher (Université Paris 5)
Sujet : *Reconnaissance et transformation de différentes guanidines et hydroxy-guanidines par la NO synthase neuronale : effets des mutations Y588F et Y588H.*
- Janvier - juin 2003 Stage de Magistère, direction : Jean-Luc Boucher (Université Paris 5)
Sujet : *Réduction du Nilutamide catalysée par des systèmes enzymatiques à hème-thiolate. Implications dans la toxicité de cet antiandrogène.*
- Septembre 2002 Stage de Magistère, direction : Anny Jutand (ENS Paris)
Sujet : *Étude cinétique de l'attaque d'un nucléophile sur des complexes cationiques allyliques du palladium II.*
- Mai 2002 Stage de Magistère, direction : Richar Taïeb (Université Paris 6)
Sujet : *Étude comparée de deux méthodes de résolution numérique de l'équation de Schrödinger.*
- Décembre 2001 Stage de Magistère, direction : Bernold Hasenknopf (Université Paris 6)
Sujet : *Coordination d'une porphyrine sur un polyoxométallate.*

Thèse

Étude du mécanisme des NO-synthases : importance du réseau de liaisons hydrogène dans l'environnement et la réactivité de l'hème

Ma thèse s'est déroulée de septembre 2005 à juillet 2008 dans le cadre de l'École Doctorale du Médicament sous la direction de Jean-Luc Boucher au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (UMR 8601 CNRS) à l'Université Paris Descartes. Une grande partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec Jérôme Santolini au Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication (iBiTec-S) au CEA Saclay.

Le manuscrit est téléchargeable à l'adresse :

<http://www.normalesup.org/~giroud/Documents/These-ClaireGiroud.pdf>

Thèse soutenue le 17 octobre 2008 à l'Université Paris Descartes devant le jury suivant :

Pr Catherine Marchand-Leroux, professeur à l'Université Paris Descartes (présidente)
Dr Anny Slama-Schwok, chargée de recherche à l'INRA de Jouy en Josas (rapporteur)
Dr Reinhard Lange, directeur de recherche à l'INSERM de Montpellier (rapporteur)
Pr Jean-Pierre Mahy, professeur à l'Université Paris-Sud (examineur)
Dr Jérôme Santolini, chargé de recherche au CEA Saclay (examineur)
Dr Jean-Luc Boucher, directeur de recherche à l'Université Paris Descartes (directeur de thèse)

Mots clés

Analogues d'arginine – Catalyse – Enzyme redox – Hème – Intermédiaires réactionnels – Liaisons hydrogène – Mécanisme moléculaire – Métabolisme de l'oxygène – Monoxyde d'azote – Monoxyde de carbone – Mutagenèse dirigée – NO-synthase – Oxydoréduction – Spectro-électrochimie – Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique – Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier – Spectroscopie Raman – Transport de protons

Objectifs du projet

Le monoxyde d'azote (NO) exerce des rôles physiologiques particulièrement importants chez les mammifères [1-5]. En tant que messenger cellulaire, il participe par exemple à la régulation de la pression artérielle lorsqu'il est produit par les cellules endothéliales [3] ou à la communication synaptique lorsqu'il est produit par les neurones [4]. En tant qu'agent cytotoxique, il participe aux phénomènes de la réponse immunitaire lorsqu'il est produit par les macrophages [5].

Chez les mammifères, NO est produit par oxydation de l'acide aminé L-arginine (L-Arg) catalysée par une famille de protéines à hème-thiolate appelées NO-synthases (NOS) [6-8]. Les pathologies liées à des dérèglements de la production de NO étant nombreuses, **la recherche de nouveaux précurseurs de NO, d'inhibiteurs spécifiques de NOS, et la compréhension précise du mécanisme des NOS constituent des enjeux pharmacologiques majeurs.**

Le mécanisme d'oxydation de L-Arg par les NOS se déroule en deux étapes avec formation d'un intermédiaire, la N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) [6-8]. Malgré les nombreuses similitudes avec le mécanisme d'autres protéines à hème-thiolate comme les cytochromes P450 [9], le déroulement exact du mécanisme des NOS reste mal connu.

Chacune des deux étapes débute par la réduction de l'hème et la formation du complexe Fe^{II}-O₂. Pour la première étape (oxydation de L-Arg en NOHA), il est généralement accepté que le complexe Fe^{II}-O₂ soit réduit puis doublement protoné ce qui lui permettrait de former le complexe perferryl hème(π⁺)-Fe^{IV}=O. Le complexe perferryl est ensuite supposé réaliser l'hydroxylation de L-Arg pour former NOHA. Pour la deuxième étape (oxydation de NOHA en citrulline et NO), il est généralement accepté que les complexes peroxy Fe^{III}-OO[•] ou hydroperoxy Fe^{III}-OOH soient suffisamment réactifs pour constituer l'espèce oxydante de cette deuxième étape. Par conséquent, l'oxydation de NOHA ne nécessiterait pas la formation du complexe perferryl Fe^{IV}=O. Cependant, d'autres mécanismes d'oxydation ont été proposés afin d'expliquer des observations expérimentales parfois contradictoires.

Toutefois, quel que soit le modèle proposé, il est clair que les deux étapes du cycle catalytique empruntent des chemins réactionnels différents, ce qui soulève la question suivante : **comment les NOS sont-elles capables de catalyser successivement deux réactions chimiques fondamentalement différentes au sein du même site actif alors que les premières étapes du mécanisme sont pratiquement identiques ?**

Les processus de transfert de protons constituent manifestement la clé de la compréhension du mécanisme des NOS et en particulier de la nature des espèces oxydantes impliquées dans chacune des deux étapes.

C'est pourquoi au cours de ce travail, nous avons étudié le rôle du pKa du substrat et des résidus polaires du site actif dans la formation de NO par les NOS, afin de mieux comprendre le déroulement des étapes de transfert de protons et d'apporter des éléments permettant d'éclaircir la question de la formation des espèces oxydantes au cours du cycle catalytique des NOS.

Des études préliminaires ont montré que seules quelques guanidines et hydroxy-guanidines analogues des substrats naturels L-Arg et NOHA peuvent être transformées en NO par les NOS, et qu'aucun de ces substrats alternatifs n'est aussi efficace que les substrats naturels [10-12]. Parmi les analogues de type guanidine, quelques alkyl-guanidines non α -amino-acides ont pu être transformées en NO par iNOS alors qu'aucune des aryl-guanidines testées n'a conduit à la formation de NO. C'est pourquoi au cours de ce travail, nous avons également cherché à comprendre pourquoi les NOS présentent une telle spécificité de substrat afin d'avancer dans la conception de nouveaux substrats efficaces des NOS.

Résultats

Importance de la Tyrosine 588 chez nNOS

Nous avons dans un premier temps cherché à comprendre l'importance des résidus polaires du site actif et en particulier le rôle du résidu Tyr588 dans la reconnaissance et la transformation de diverses guanidines et hydroxy-guanidines par nNOS [13]. Il a en effet été proposé qu'un réseau de liaisons hydrogène impliquant des molécules d'eau, le substrat, le cofacteur H₄B et des résidus du site actif, dont le résidu Tyr588, joue un rôle majeur dans les processus d'acheminement des protons depuis l'extérieur de l'enzyme jusqu'au site catalytique des NOS. Nous avons donc réalisé l'étude de deux mutants de nNOS, Tyr588Phe et Tyr588His, en présence d'analogues de L-Arg et de NOHA.

Nous avons utilisé les techniques de spectroscopie d'absorption UV-visible et de spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) pour étudier la conformation du réseau de molécules d'eau au sein du site actif, la reconnaissance des substrats et la formation de NO à partir de ces substrats.

L'ensemble de nos résultats apporte plusieurs éléments de réponse permettant de mieux comprendre le déroulement des processus de transfert de protons.

Ces résultats montrent en effet que la structuration fine du site actif et du réseau de liaisons hydrogène à l'intérieur du site actif de nNOS est directement contrôlée à la fois par le résidu Tyr588 et par la fixation du substrat. Une modification légère de ce réseau, par une mutation ou par une modification de la chaîne latérale de l'analogue, est capable de modifier fortement les caractéristiques de l'hème, et donc d'affecter le bon déroulement du cycle catalytique.

Il est également intéressant de remarquer que, dans le cas du mutant Y588F comme dans le cas de l'enzyme sauvage, le taux de transformation en NO n'est pas directement corrélé avec l'affinité de nNOS pour le composé, ce qui suggère que la capacité d'un analogue de substrat à être efficacement transformé en NO par nNOS dépend beaucoup plus de sa capacité à structurer le réseau de liaisons hydrogène que de son affinité pour le site actif.

Les résultats que nous avons obtenus confirment enfin que les guanidines sont beaucoup plus difficilement susceptibles d'être substrats de NOS que les hydroxy-guanidines. Ces données suggèrent que la structuration précise du site actif induite par la fixation du substrat serait différente dans le cas des guanidines et dans le cas des hydroxy-guanidines, et que ces différences permettraient au cycle catalytique d'emprunter deux chemins réactionnels distincts pour chacune des étapes du mécanisme.

Influence d'analogues de L-Arg sur le site actif de iNOS_{ox}

Nous avons dans un deuxième temps cherché à comprendre le rôle précis du pKa du substrat dans le déroulement des étapes de transfert de protons au cours du cycle catalytique des NOS. En effet, les différences de chemin catalytique entre la première et la deuxième étape du mécanisme sont souvent attribuées à la différence de pKa qui existe entre L-Arg et NOHA. C'est pourquoi nous avons étudié les interactions entre le site actif de iNOS et une série d'analogues de L-Arg représentant une large gamme de pKa.

Nous avons utilisé les techniques de spectroscopie d'absorption UV-visible, de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR), de spectroscopie Raman de résonance (RR) et de spectro-électrochimie pour étudier l'effet du pKa sur le site actif de iNOS et sur le déroulement du cycle catalytique.

Nos résultats montrent tout d'abord que les paramètres physico-chimiques de l'hème et de l'environnement proximal du site actif ne sont pas modifiés lorsqu'on remplace le substrat naturel L-Arg par un de ses analogues. Les paramètres tels que la force de la liaison proximale, le potentiel d'oxydoréduction ou la conformation géométrique de l'hème ne semblent donc impliqués ni dans les différences de réactivité observées entre les analogues de L-Arg ni dans les différences entre les deux étapes du mécanisme.

Nous avons ensuite étudié l'effet des analogues de L-Arg sur l'environnement distal du site actif en utilisant CO comme sonde. Les paramètres spectroscopiques du complexe Fe^{II}-CO obtenus par spectroscopie Raman de résonance et ATR-FTIR montrent que le pKa de l'analogue de L-Arg fixé au site actif a un effet direct et significatif sur l'environnement distal de l'hème. Les principales caractéristiques spectroscopiques des complexes formés par iNOS_{ox} en présence des différents analogues nous ont conduits à regrouper ces analogues en trois familles. De manière très intéressante, ce regroupement en trois familles s'est révélé présenter une bonne corrélation avec les données publiées au sujet de la stabilité du complexe Fe^{II}-O₂, de la transformation en NO de l'analogue et de l'intensité du découplage observé.

L'ensemble de ces résultats nous a permis d'élaborer **un modèle structural sur la base des données spectroscopiques que nous avons obtenues en présence des trois familles d'analogues d'arginine** et en accord avec les données de structure du site actif des NOS récemment publiées. Nos résultats montrent que **le pKa du guanidinium joue également un rôle déterminant dans la stabilité et le devenir catalytique du complexe Fe^{II}-O₂** ce qui nous a ensuite permis de proposer **un modèle fonctionnel pour le cycle catalytique des NOS**.

La première famille regroupe les guanidines dont les caractéristiques spectroscopiques sont similaires à celles de L-Arg. Le pKa de ces analogues est proche de celui de L-Arg. En présence de ces guanidines, une molécule d'eau sert de pont entre le proton du guanidinium et le ligand distal du fer. Les guanidines de la première famille sont capables d'être transformées en NO par iNOS, ce qui prouve que cette configuration est essentielle pour conduire à la formation du complexe perferryl.

Parmi les analogues présentant un pKa plus bas, on peut distinguer ceux dont les caractéristiques spectroscopiques sont semblables à celles de NOHA et qui sont regroupés dans la famille 2, de ceux dont les caractéristiques spectroscopiques sont semblables à celles de iNOS en absence de substrat et qui sont regroupés dans la famille 3.

En présence de guanidines de la deuxième famille, l'interaction entre le guanidinium et le ligand distal du fer ne nécessite pas l'intervention de la molécule d'eau, ce qui protège la liaison O-O de la rupture et empêche la formation du complexe perferryl, mais favorise la formation du complexe (hydro)peroxo.

En présence des analogues de la troisième famille, le réseau de liaisons hydrogène est peu structuré, ce qui provoque la faible stabilité du complexe Fe^{II}-O₂ et son incapacité à conduire spécifiquement à un complexe perferryl ou (hydro)peroxo.

Conclusion

Nos résultats ont apporté des éléments de réponse décisifs pour une meilleure compréhension du mécanisme d'oxydation de L-Arg en NO par les NOS et des différences de réactivité entre les analogues des substrats naturels.

Nos résultats prouvent que les deux étapes du cycle catalytique des NOS se déroulent selon deux mécanismes distincts et que la partition entre ces deux mécanismes est en grande partie déterminée par la structuration du réseau de liaison hydrogène au sein du site actif. La structuration de ce réseau de liaisons hydrogène dépend à la fois des résidus polaires du site actif, de la chaîne latérale du

substrat et du pKa de la fonction guanidine. La régulation fine de ces liaisons hydrogène par le substrat et l'environnement distal de l'hème permet de conduire au cours de la première étape du cycle catalytique à la rupture hétérolytique de la liaison O–O et à la formation du complexe perferryl nécessaire à l'hydroxylation de la fonction guanidine, et au cours de la deuxième étape du cycle catalytique à la protection de la liaison O–O et à la formation du complexe (hydro)peroxy nécessaire à l'oxydation de la fonction hydroxy-guanidine en NO.

Références

- [1] Murad F. (1999) Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* 38(13-14), 1857-1868.
- [2] Pfeiffer S., Mayer B. and Hemmens B. (1999) Nitric oxide: Chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angewandte Chemie-International Edition* 38(12), 1715-1731.
- [3] Ignarro L. J. (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: A historical overview. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53(4), 503-514.
- [4] Duncan A. J. and Heales S. J. (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol. Aspects Med.* 26(1-2), 67-96.
- [5] Lowenstein C. J. and Padalko E. (2004) INOS (NOS2) at a glance. *Journal of Cell Science* 117(14), 2865-2867.
- [6] Stuehr D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et biophysica acta* 1411(2-3), 217-230.
- [7] Stuehr D. J., Santolini J., Wang Z. Q., Wei C. C. and Adak S. (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *Journal of Biological Chemistry* 279(35), 36167-36170.
- [8] Li H. Y. and Poulos T. L. (2005) Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(1), 293-305.
- [9] Gorren A. C. F. and Mayer B. (2007) Nitric-oxide synthase: A cytochrome P450 family foster child. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1770(3), 432-445
- [10] Dijols S., Boucher J. L., Lepoivre M., Lefevre-Groboillot D., Moreau M., Frapart Y., Rekka E., Meade A. L., Stuehr D. J. and Mansuy D. (2002) First non-alpha-amino acid guanidines acting as efficient NO precursors upon oxidation by NO-synthase II or activated mouse macrophages. *Biochemistry* 41(30), 9286-9292.
- [11] Mansuy D. and Boucher J. L. (2004) Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free radical biology & medicine* 37(8), 1105-1121.
- [12] Moreau M., Boucher J. L., Mattioli T. A., Stuehr D. J., Mansuy D. and Santolini J. (2006) Differential effects of alkyl- and arylguanidines on the stability and reactivity of inducible NOS heme-dioxygen complexes. *Biochemistry* 45(12), 3988-3999.
- [13] Sato Y., Sagami I., Matsui T. and Shimizu T. (2001) Unusual role of Tyr588 of neuronal nitric oxide synthase in controlling substrate specificity and electron transfer. *Biochemical and biophysical research communications* 281(3), 621-626.

Travaux en cours

Étude de complexes de Mn(II) à propriété anti-superoxyde

Mon travail de recherche actuel s'inscrit au sein du Département de Chimie de l'École Normale Supérieure de Paris, sous la direction Clotilde Policar (Laboratoire des BioMolécules - UMR 7203), en collaboration avec Frédéric Lemaître de l'équipe de Christian Amatore (Laboratoire PASTEUR - UMR 8640).

Mots clés

Activité Super Oxyde Dismutase – Anti-oxydants – Catalyse – Complexes de manganèse (II) – Électrochimie – Espèces réactives de l'oxygène – Métabolisme de l'azote – Métabolisme de l'oxygène – Micro-électrochimie sur cellule unique – Oxydoréduction – Pénétration cellulaire – RAW 264.7 – Stress oxydant

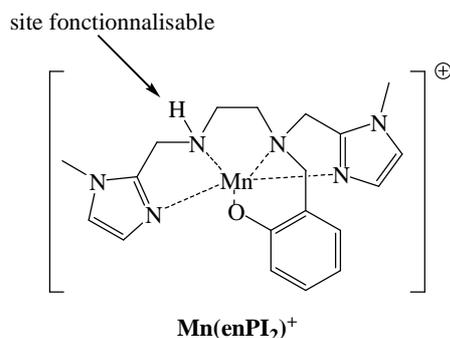
Objectifs du projet

Les espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) exercent des rôles physiologiques essentiels dans le monde vivant (métabolisme de l'oxygène et respiration, signalisation cellulaire, défense immunitaire, cycle cellulaire). Cependant, ces espèces présentent une réactivité chimique extrême vis-à-vis de l'ensemble des biomolécules (ADN, protéines, lipides, composés redox), ce qui impose aux êtres vivants de contrôler étroitement leur concentration *in vivo* par une régulation fine des systèmes de production et des systèmes de protection. L'augmentation du flux des ROS, généralement associée à une perturbation de cet équilibre, est la source du « stress oxydant » et conduit à de nombreux processus pathologiques ou s'y trouve associée (phénomènes inflammatoires, vieillissement cellulaire, cancers, maladies neuro-dégénératives, diabète) [14-16].

Le superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est le premier maillon dans la chaîne de réduction du dioxygène. Sa concentration est en partie contrôlée par une famille d'enzymes, les superoxyde dismutases (SOD). Il a été montré que la supplémentation en SOD ou en complexes synthétiques reproduisant l'activité des SOD a des effets bénéfiques dans des situations de stress oxydant [14, 15]. Cependant, l'utilisation thérapeutique de ces complexes synthétiques reste peu développée, en particulier parce que leur stabilité *in vivo*, leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur toxicité est mal connue.

Notre équipe dispose de différents complexes de manganèse (II) dont l'activité anti-superoxyde a été démontrée *in vitro* [17-22], où ils présentent une activité catalytique de dismutation du superoxyde comparable à celle de complexes dont l'activité a été démontrée *in vivo* [14, 23-25]. Notre objectif est d'étudier ces complexes en milieu biologique et sur des modèles cellulaires, afin de trouver comment obtenir des complexes présentant *in cellulo* une activité de protection contre le stress oxydant.

Le complexe que nous utilisons pour nos études est le complexe de manganèse (II) $Mn(enPI_2)^+$. Ce complexe présente d'une part la meilleure activité *in vitro* parmi les complexes dont nous disposons [20] et comporte d'autre part un site susceptible d'être fonctionnalisé pour améliorer les caractéristiques physico-chimiques du complexe.



Résultats

Stabilité du complexe $Mn(enPI_2)^+$

Nous avons étudié par spectroscopie d'absorption UV-visible et par voltampérométrie cyclique la stabilité du complexe $Mn(enPI_2)^+$ tout d'abord en présence de différents cations susceptibles d'être présents en concentration significative en milieu biologique (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}), puis directement en solution dans différents milieux de culture cellulaire. Nous avons montré que les propriétés spectroscopiques et redox du complexe $Mn(enPI_2)^+$ sont conservées plus de 48h dans les conditions de culture cellulaire, ce qui nous a permis d'envisager la mise en place des tests d'activité sur cellules.

L'étude de la stabilité du complexe en présence de ligands du manganèse (II) nous a également permis d'estimer la constante d'association du manganèse (II) pour le ligand $enPI_2$.

Effet de l'effet du complexe Mn(enPI₂)⁺ sur des modèles cellulaires

Nous avons effectué des études préliminaires sur des systèmes cellulaires afin de déterminer une fenêtre de concentration pour laquelle le complexe Mn(enPI₂)⁺ n'est pas cytotoxique. Ces études devront être affinées et reproduites pour chaque type cellulaire étudié.

Nous avons mis en place une collaboration avec F. Lemaître (équipe de C. Amatore, UMR 8640) [26] afin de mesurer par ampérométrie sur ultramicroélectrode les quantités de ROS produites par des macrophages RAW 264.7 incubés en présence ou en absence de complexe Mn(enPI₂)⁺. La méthode développée s'appuie sur le principe de « synapse semi-artificielle » : une ultramicroélectrode de carbone platiné (10 µm de diamètre) permet de détecter l'émission de quantités extrêmement faibles (attomoles à femtomoles) de dérivés de l'anion superoxyde O₂^{•-} et du monoxyde d'azote NO[•] (H₂O₂, ONOO⁻, NO₂⁻, ...) par une cellule placée en condition de stress oxydant induit par stimulation biochimique. Les caractéristiques quantitatives, spatiales et cinétiques de cette réponse sont étudiées en temps réel à l'échelle d'une cellule unique.

Développement du projet

L'objectif suivant est de modifier la structure du ligand enPI₂ en le fonctionnalisant. Nous souhaitons d'une part favoriser la pénétration cellulaire du complexe en conjuguant le ligand avec des sucres ou des peptides vecteurs (collaboration avec l'équipe de S. Lavielle, UMR7203), et d'autre part permettre de détecter sa localisation subcellulaire par différentes techniques d'imagerie en couplant le ligand avec des sondes fluorescentes par exemple (plateforme d'imagerie ENS).

Références

- [14] D. Salvemini, C. Muscoli, D.P. Riley and S. Cuzzocrea, *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2002**, 15, 439-447.
- [15] J.M. McCord, M.A. Edeas, *Biomed. Pharmacother.* **2005**, 59, 139-142.
- [16] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, 39,44-84.
- [17] C. Policar, S. Durot, M. Cesario, F. Lambert, F. Ramiandrasoa, I. Morgenstern-Badarau, *Eur. J. Inorg. Biochem.* **2001**, 1807-1817.
- [18] S. Durot, F. Lambert, J.P. Renault, C. Policar, *Eur. J. Inorg. Biochem.* **2005**, 14, 2789-2793.
- [19] S. Durot, C. Policar, F. Cisnetti, F. Lambert, J.P. Renault, G. Pelosi, G. Blain, H. Korri-Youssoufi, J.P. Mahy, *Eur. J. Inorg. Biochem.* **2005**, 14, 3513-3523.
- [20] F. Cisnetti, A.S. Lefèvre, R. Guillot, F. Lambert, G. Blain, E. Anxolabéhère-Mallart, C. Policar, *Eur. J. Inorg. Biochem.* **2007**, 4472-4480.
- [21] S. Grony, G. Blain, R. Guillot, C. Policar, E. Anxolabéhère-Mallart, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 1951-1953.
- [22] F. Bellot, R. Hardré, G. Pelosi, M. Therisod, C. Policar, *Chem. Commun.* **2005**, 5414-5417.
- [23] G.M.P. Giblin, P.C. Box, I.B. Campbell, A.P. Hancock, S. Roomans, G.I. Mills, C. Molloy, G.E. Tranter, A.L. Walker, S.R. Doctrow, K. Huffman, B. Malfroy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1367-1370.
- [24] S.R. Doctrow, K. Huffman, C. Bucay Marcus, G. Tocco, E. Malfroy, C.A. Adinolfi, H. Kruk, K. Baker, N. Lazarowych, J. Mascarenhas, B. Malfroy, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4549-4558.
- [25] I. Spasojevic, Y. Chen, T.J. Noel, Y. Yu, M.P. Cole, L. Zhang, Y. Zhao, D.K. St. Clair, I. Batinic-Haberle, *Free Rad.Biol.Med.* **2007**, 42, 1193-1200.
- [26] C. Amatore, S. Arbault, D. Bruce, P. de Oliveira, M. Erard, M. Vuillaume, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 4171-4179.

2. Activités d'enseignement

Depuis 2004, j'ai la chance de bénéficier d'expériences d'enseignement riches et diversifiées aussi bien concernant le public (étudiants en classes préparatoires, étudiants en université, candidats au concours de l'agrégation), le niveau (du niveau L1 au master), la forme pédagogique (cours, travaux dirigés, travaux pratiques, colles) que le contenu (thermodynamique, équilibres en solutions aqueuses, modèles quantiques de l'atome et de la molécule, cinétique chimique, réactivité en chimie organique, chimie physique). À chacune de ces occasions, j'ai pris un grand plaisir à enseigner comme à m'impliquer dans le fonctionnement de l'équipe pédagogique.

Colles de Chimie au Lycée Fénélon-Sainte Marie (2 × 40h)

Pendant deux années consécutives (2004 - 2005), j'ai exercé la fonction d'interrogatrice au lycée Fénélon Sainte Marie de Paris pour des élèves de classes préparatoires PCSI ayant choisi l'option PC (deuxième semestre).

Contenu

Le programme de chimie en classe de PCSI option PC couvre une gamme de connaissances assez large : modèle quantique de l'atome, structure électronique des molécules, interactions de faible énergie, réactivité des liaisons simples carbone-oxygène, carbone-azote et carbone-halogène, applications du premier principe de la thermodynamique, équilibres chimiques en solution aqueuse.

Démarche pédagogique

Ce type d'enseignement très spécifique par groupes de deux ou trois élèves est très enrichissant à la fois pour les élèves et pour l'enseignant. L'heure d'interrogation permet en effet de contrôler si l'élève a acquis les connaissances de base du cours, de l'entraîner à réaliser des exercices complexes et de l'habituer à la prise de parole en public, mais l'heure d'interrogation peut être également l'occasion de réexpliquer un point du cours à un élève en difficulté ou d'engager une discussion scientifique intéressante avec un élève particulièrement motivé.

Bilan

L'hétérogénéité des groupes de travail m'a appris à faire preuve de flexibilité face aux élèves, j'ai ainsi effectué un travail de préparation consciencieux pour apporter aux élèves des exercices de niveaux variés. Ce premier contact avec la fonction d'enseignant devant le public très exigeant que sont les élèves en classes préparatoires m'a également appris à faire preuve de rigueur et d'honnêteté intellectuelle.

Monitorat à l'UFR Biomédicale, Université Paris Descartes (3 × 64h)

Dans le cadre de mon monitorat, j'ai assuré pendant trois années successives (2005 - 2008) les enseignements dirigés de chimie pour des étudiants qui préparent le concours de première année de médecine (PCEM1) à l'Université Paris Descartes.

Contenu

Les enseignements de chimie en PCEM1 portent sur un programme très complet de chimie générale (thermodynamique à l'équilibre et hors équilibre, équilibres acido-basiques, équilibres d'oxydoréduction, modèles de liaison chimique, chimie de coordination, cinétique chimique) et de chimie organique (isomérisation et stéréoisomérisation, mécanismes réactionnels, réactivité des principales fonctions).

Déroulement des enseignements

Chacune de mes trois années de monitorat, deux groupes de travaux dirigés (TD) de 35 à 50 élèves m'ont été confiés. Les séances de TD duraient 1h30 suivies d'une demi-heure d'interclasse où les étudiants venaient me poser de nombreuses questions au sujet des exercices abordés au cours de la séance et à préparer pour la séance suivante, au sujet du cours magistral ou au sujet du déroulement du concours.

Afin d'assurer une égalité d'enseignement la plus parfaite possible entre tous les étudiants candidats au concours de première année de médecine (environ 2000 étudiants par an à Paris Descartes), chaque enseignant de cours magistral comme chaque enseignant chargé de TD se doit d'avancer exactement au même rythme tout au long du semestre et d'apporter exactement le même contenu aux étudiants des différents groupes. C'est pourquoi les exercices à aborder au cours de chaque séance ainsi que les réponses à donner à ces exercices étaient définis très précisément dans un planning détaillé qu'il était nécessaire de suivre au plus près.

Au cours de ces séances de TD, les étudiants corrigeaient les exercices au tableau. Chaque étudiant d'un groupe passait au tableau plusieurs fois dans le semestre. Mon rôle en tant que chargée de TD était d'amener les élèves à comprendre la démarche logique qui permet d'aboutir à la méthode de résolution de l'exercice.

Je me suis également efforcée au cours des séances de TD de montrer aux étudiants que les sciences qu'ils étudient de manière abstraite à l'université ont de très nombreuses applications concrètes dans leur vie quotidienne en leur posant des questions mettant à l'épreuve leur sens pratique (pH du Coca-Cola par rapport au pH du jus de citron ou au pH de l'estomac, quantité de différents ions dans l'eau du robinet, thermodynamique vs cinétique de différentes réactions d'oxydoréduction, etc.).

Concertation avec l'équipe pédagogique

Une fois par semaine, les chargés de TD et les enseignants de cours magistraux se réunissaient pour connaître et harmoniser l'avancement des différents groupes. Ces réunions servaient également à discuter des problèmes rencontrés au cours des séances, que ce soit d'ordre scientifique (erreur dans l'énoncé ou dans le corrigé, problème général de compréhension d'un point précis du programme) ou d'ordre humain (problème de discipline, manque d'assiduité ou au contraire afflux d'étudiants dans un groupe de TD).

Ces réunions régulières m'apparaissent indispensables pour assurer la cohésion à la fois de l'équipe enseignante et des groupes d'élèves en permettant aux enseignants de mettre en commun leurs expériences. Il pourrait être intéressant d'organiser ce genre de réunion également avec les enseignants des autres matières qui dispensent des cours aux mêmes groupes d'élèves.

Corrections des copies

Au début du second semestre, tous les enseignants de chimie en PCEM1 se retrouvent pendant une semaine pour corriger les épreuves du concours. Avant de commencer les corrections, le barème est commenté à toute l'équipe de manière extrêmement détaillée afin de limiter au maximum les écarts entre les correcteurs. Chaque copie est ensuite corrigée deux fois en aveugle ce qui permet d'assurer une certaine égalité de traitement entre les candidats.

Cet exercice est très éprouvant au niveau physique et au niveau intellectuel car le nombre de copies à corriger est grand (environ 150 copies par personne en quelques jours). À cette occasion, j'ai dû apprendre à m'efforcer de corriger de la même manière les premières et les dernières copies du paquet.

Bilan

Enseigner à des étudiants qui préparent un concours difficile est un travail très exigeant car les élèves attendent beaucoup de leurs enseignants. Ces trois années d'enseignement m'ont appris à être extrêmement rigoureuse dans mes explications et dans les réponses que je donne aux élèves, à ne pas me contenter d'approximations ou de généralités. Il m'a fallu apprendre à trouver des exemples pertinents, explicites et persuasifs. Il est également nécessaire de se montrer honnête face aux élèves, avouer qu'on ne sait pas tout et reconnaître qu'on peut aussi faire des erreurs. Il m'a fallu enfin repenser ma manière de considérer de nombreuses notions qui me semblent évidentes après plusieurs années d'étude et qui sont loin d'être triviales pour les élèves qui les découvrent pour la première fois.

Mais enseigner devant un public aussi demandeur est aussi une grande source de bonheur. Voir un élève s'éveiller à la curiosité scientifique, persuader un élève que la science n'est pas juste un domaine théorique, prouver à un élève qu'il peut résoudre un exercice alors qu'il ne s'en croyait pas capable, sont autant d'instantanés précieux qui récompensent tous les efforts fournis.

ATER au Département de Chimie de l'ENS de Paris (2 × 192h)

En tant qu'ATER, j'enseigne pour la deuxième année consécutive au centre de préparation à l'agrégation de sciences physiques de Montrouge. Je m'occupe principalement des candidats qui préparent l'agrégation de sciences physiques option physique, et en quelques occasions des candidats qui préparent l'agrégation de sciences physiques option chimie.

Contenu

À la fin de l'année de préparation, les candidats à l'agrégation de sciences physiques option physique doivent posséder un niveau en chimie équivalent à celui d'un bon élève sortant de classe préparatoire PC*. Nous sommes deux enseignants à nous partager les cours de chimie pour ces étudiants. Je m'occupe en détail de la partie du programme qui traite de chimie physique et théorique (théorie quantique de l'atome, modèles classique et quantique de la liaison covalente, théorie du champ cristallin, interactions faibles, méthodes physiques d'analyse, notions de cristallographie) et la partie qui traite de chimie organique (cinétique chimique macroscopique et microscopique, stéréochimie, réactivités de quelques fonctions organiques de référence : alcènes, composés aromatiques, organomagnésiens, alcools, amines, dérivés carbonyles).

Démarche pédagogique et déroulement des enseignements

Environ un tiers des candidats à l'agrégation de sciences physiques option physique ont suivi un cursus universitaire complètement dépourvu de cours de chimie, et la majorité des autres candidats proviennent de cursus à grande majorité de cours de physique. Les différences entre le niveau réel des étudiants et le niveau demandé aux épreuves de l'agrégation nous a conduit à convertir une grande partie des séances de TD en séances de cours afin de remettre à niveau l'ensemble des étudiants. Je demande en contrepartie aux étudiants de préparer attentivement les exercices que je leur distribue à la fin de chaque séance, afin de n'avoir besoin de corriger effectivement au tableau que les exercices les plus difficiles et ceux qui ont posé le plus de problèmes. Je leur prépare également un feuille de correction complète afin qu'ils puissent ensuite revoir les exercices en travail personnel.

J'ai la chance de pouvoir suivre ces étudiants à la fois en cours, en travaux dirigés et en séances de travaux pratiques. Cette continuité de l'enseignement depuis le cours jusqu'à la pratique et la petite taille de la promotion (30 à 40 étudiants) permettent d'instaurer dès le début de l'année une relation de confiance entre les étudiants et les enseignants, ce qui crée des conditions très favorables à l'apprentissage.

Contrôle des connaissances

Toutes les 6 semaines, je propose aux étudiants un devoir écrit du format des épreuves écrites du concours de l'agrégation. Je m'inspire grandement des épreuves des années précédentes pour réaliser le sujet, de manière à entraîner les étudiants à faire face aux sujets de concours et à développer une vraie stratégie de résolution des exercices.

Les étudiants s'exercent également aux épreuves orales du concours en préparant des leçons qui sont présentées devant la classe et devant un correcteur. Cet exercice académique demande une grande rigueur aux étudiants qui doivent respecter le programme et le niveau défini pour la leçon tout en présentant un ensemble cohérent et intéressant accompagné de petites manipulations. La correction des leçons est l'occasion de montrer à l'étudiant où se situent ses points faibles et comment mettre en avant ses points forts.

La correction de leçons est aussi très instructive pour le correcteur qui peut se remettre en situation d'écoute face à un autre enseignant. Cet exercice permet de ne pas se reposer sur ses acquis et de toujours chercher à améliorer son attitude face à ses étudiants.

J'ai également eu l'occasion de corriger des leçons de candidats à l'agrégation de sciences physiques option chimie (leçons niveau licence ou maîtrise) avec qui il est agréable de pouvoir débattre de notions assez pointues.

Bilan

L'enseignement au centre de préparation à l'agrégation de sciences physiques se déroule dans une ambiance à la fois studieuse et décontractée. Au-delà de la préparation du concours, l'objectif est de montrer aux élèves qu'il est possible d'allier rigueur des connaissances et plaisir de l'apprentissage. Il est très agréable d'enseigner à des élèves matures et motivés avec qui il est possible d'avoir des discussions scientifiques de qualité. Notre rôle est également de leur apporter quelques conseils pour leur futur métier d'enseignant.

Autres activités

Écriture d'un article pour le site CultureSciences-Chimie

Nicolas Lévy, responsable éditorial et scientifique du site CultureSciences-Chimie, m'a proposé d'écrire un article sur la thématique que je développe dans mes travaux de recherche au Département de Chimie de l'ENS de Paris : « Le stress oxydant : comment concevoir et tester de nouvelles molécules anti-oxydantes » (à paraître).

Secrétariat pédagogique du concours 2009 d'entrée à l'ENS

De juin à juillet 2009, j'ai participé en tant que secrétaire pédagogique à l'organisation et à la tenue du concours d'entrée à l'École Normale Supérieure de Paris pour la banque d'épreuves BCPST. Ce travail consiste à s'assurer heure par heure du bon déroulement des épreuves orales : réservation des salles, contact avec les examinateurs et avec les candidats, etc.

Co-encadrement d'étudiants en stage

Je participe à l'encadrement de plusieurs étudiants en stage dans l'équipe de Clotilde Policar au Laboratoire des BioMolécules (L3, M1, M2) : intégration à l'équipe, explication des règles de sécurité, initiation aux méthodes de synthèse organique et aux méthodes d'électrochimie analytique, relecture et correction du rapport de stage, etc.