

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.

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 (examinateur)
Dr Jérôme Santolini, chargé de recherche au CEA Saclay (examinateur)
Dr Jean-Luc Boucher, directeur de recherche à l'Université Paris Descartes (directeur de thèse)

Mots clés

Analogues d'arginine – Catalyse – 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. En tant que messenger cellulaire, il participe par exemple à la régulation de la pression artérielle lorsqu'il est produit par les cellules endothéliales ou à la communication synaptique lorsqu'il est produit par les neurones. En tant qu'agent cytotoxique, il participe aux phénomènes de la réponse immunitaire lorsqu'il est produit par les macrophages.

Chez les mammifères, NO est produit par oxydation de l'acide-amino L-arginine (L-Arg) catalysée par une famille de protéines à hème-thiolate appelées NO-synthases (NOS). 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^o-hydroxy-L-arginine (NOHA). Malgré les nombreuses similitudes avec le mécanisme d'autres protéines à hème-thiolate comme les cytochromes P450, 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 $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$. Pour la première étape (oxydation de L-Arg en NOHA), il est généralement accepté que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$ soit réduit puis doublement protoné ce qui lui permettrait de former le complexe perferryl hème(π^+)- $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. 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 le complexe peroxy $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OO}^-$ ou hydroperoxy $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ 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 $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. 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. 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. Il a en effet été proposé qu'un réseau de liaisons hydrogène impliquant des molécules d'eau, le substrat, le cofacteur H_4B 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 conduit 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 faible, 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)peroxo nécessaire à l'oxydation de la fonction hydroxy-guanidine en NO.