

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Centre Universitaire des Saints-Pères
UFR Biomédicale

ÉCOLE DOCTORALE DU MÉDICAMENT

THÈSE

présentée le 17 octobre 2008 pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
en Sciences de la Vie et de la Matière

par

M^{lle} Claire GIROUD

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

Composition du jury :

Pr Catherine MARCHAND-LEROUX	<i>présidente du jury</i>
Dr Anny SLAMA-SCHWOK	<i>rapporteur</i>
Dr Reinhard LANGE	<i>rapporteur</i>
Dr Jean-Pierre MAHY	<i>examineur</i>
Dr Jérôme SANTOLINI	<i>examineur</i>
Dr Jean-Luc BOUCHER	<i>examineur</i>

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Centre Universitaire des Saints-Pères
UFR Biomédicale

ÉCOLE DOCTORALE DU MEDICAMENT

THÈSE

présentée le 17 octobre 2008 pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
en Sciences de la Vie et de la Matière

par

M^{lle} Claire GIROUD

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

Composition du jury :

Pr Catherine MARCHAND-LEROUX	<i>présidente du jury</i>
Dr Anny SLAMA-SCHWOK	<i>rapporteur</i>
Dr Reinhard LANGE	<i>rapporteur</i>
Dr Jean-Pierre MAHY	<i>examineur</i>
Dr Jérôme SANTOLINI	<i>examineur</i>
Dr Jean-Luc BOUCHER	<i>examineur</i>

L'ensemble de ce travail a été réalisé sous la direction de Jean-Luc BOUCHER au :

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

UMR8601 CNRS

45 rue des Saints Pères

75270 Paris Cedex 06

en collaboration avec Jérôme SANTOLINI au :

Laboratoire Stress Oxydant et Détoxification

iBiTec-S

CEA Saclay

91191 Gif-sur-Yvette Cedex

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

Résumé

Les NO-synthases sont des protéines à hème-thiolate qui catalysent l'oxydation de la L-arginine en NO. Malgré les similitudes avec le mécanisme d'autres protéines comme les cytochromes P450, le déroulement exact des étapes du mécanisme des NOS reste mal connu.

Nous avons étudié le rôle du proton du guanidinium de L-Arg dans la stabilité et la réactivité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ grâce à une série d'analogues de L-Arg possédant une large gamme de valeurs de pKa. Par des expériences de spectroélectrochimie, de spectroscopie infrarouge et Raman de résonance, nous avons analysé l'effet de ces guanidines sur les paramètres physico-chimiques de l'hème et du ligand proximal de l'hème ainsi que sur les propriétés de l'environnement distal de l'hème.

Cette étude indique que le pKa du guanidinium du substrat contrôle le réseau de liaisons H autour du ligand distal : il contrôle ainsi les processus de transfert de protons et régule la stabilité et la réactivité des intermédiaires du cycle catalytique.

Mots Clés

Analogues d'arginine

Analyse de spectres

Complexe fer-oxygène

Cycle catalytique

Guanidinium

Hème

Liaison hydrogène

Mécanisme moléculaire

Métabolisme de l'oxygène

Monoxyde d'azote

Monoxyde de carbone

Mutagénèse dirigée

NO-Synthase

Oxydoréduction

Protéines à hème-thiolate

Spectroscopie FTIR

Spectroscopie Raman

Spectroscopie RPE

Transfert de protons

Study of the mechanism of NO-synthases: Importance of hydrogen bond network in the environment and the reactivity of heme.

Abstract

NO-synthases are hemo-thiolate proteins that catalyze the oxidation of L-arginine to NO. Despite the analogies with the mechanism proposed for other hemo-proteins such as the cytochrome P450 family, the detailed molecular mechanism of NOS remains mostly elusive.

We investigated the role of the proton of L-Arg guanidinium on the stability and reactivity of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ complex by exploiting a series of L-Arg analogues that display a wide range of pKa values. Using a combination of spectroelectrochemistry, infrared and resonance Raman spectroscopies, we analyzed the effects of these analogues on the proximal ligand characteristics, the porphyrin conformation, the heme redox potential and the electrostatic properties of heme distal environment.

Our results strongly suggest that the pKa of the substrate guanidinium controls the H-bond network surrounding the distal ligand: it finely controls the proton transfer event, tune NOS oxidative chemistry and determine the nature of NOS production.

Key words

Arginine analogues	Nitric oxide
Carbon monoxide	Nitric oxide synthase
Catalytic cycle	Oxidation-reduction
Directed mutagenesis	Oxygen metabolism
Guanidinium	Proton transfer
Heme	Spectroscopy, FTIR
Hemo-thiolate proteins	Spectroscopy, Raman
Hydrogen bond	Spectroscopy, RPE
Iron-oxygen complex	Spectrum analysis
Molecular mechanism	

Table des matières

Chapitre I

Introduction : le monoxyde d'azote et les NO-synthases 1

1. Réactivité de NO dans les milieux biologique 3

2. Rôles physiologiques de NO 6

2.1. Dans le système cardiovasculaire 6

2.2. Dans les systèmes nerveux central et périphérique 7

2.3. Dans le système immunitaire 8

3. Les NO-synthases 9

3.1. Source de NO chez les mammifères 9

3.2. Structure générale des NOS 10

3.2.1. Structure des monomères de NOS 10

3.2.2. Structure quaternaire des NOS 13

3.2.3. Structure du site actif 15

3.3. Les différents isoformes de NOS 18

3.3.1. Les NOS de mammifères 18

3.3.2. Les NOS de bactéries 19

3.4. Synthèse de NO par les NOS 21

3.4.1. Première étape de la synthèse : oxydation de L-Arg en NOHA 21

3.4.2. Deuxième étape de la synthèse : oxydation de NOHA en NO 26

3.5. Régulation de l'activité NO-synthase 30

4. Enjeux de l'étude des NOS 31

4.1. Pathologies liées au dérèglement de l'activité NO-synthase 31

4.2. Production d'espèces activées de l'oxygène 33

4.3. Substrats alternatifs des NOS 34

4.4. Objectifs de la thèse 35

Chapitre II

Matériel et méthodes 39

1. Obtention et caractérisation des protéines 41

1.1. Surexpression et purification de NOS 41

1.1.1. Surexpression et purification de nNOS 41

1.1.2. Surexpression et purification de iNOS_{ox} 44

1.2. Analyse des protéines 47

1.2.1. Mesure de la concentration en protéines : méthode de Bradford 47

1.2.2. Migration par électrophorèse 47

1.3. Mesure de l'activité NO-synthase 49

1.3.1. Test de Griess 49

1.3.2. Test à l'hémoglobine 51

1.3.3. Test au Fe(DETC)₂ 53

1.3.4. Détection de la citrulline marquée 54

1.4. Caractérisation des NOS par spectroscopie d'absorption UV-visible 55

1.4.1. Les espèces Fe^{III} de NOS 55

1.4.2. Les espèces Fe^{II} des NOS, détermination de la concentration en NOS 57

1.5. Caractérisation des espèces Fe^{III} des NOS par spectroscopie RPE	59
2. Obtention et caractérisation des analogues de L-Arg	60
2.1. Synthèse des analogues de L-Arg	60
2.1.1. Principe de synthèse des guanidines	60
2.1.1.1. À partir d'amines réactives	61
2.1.1.2. À partir d'amines faiblement réactives	62
2.1.2. Cas des guanidines fluorées	64
2.1.3. Cas de l'agmatine	65
2.2. Détermination du pKa des analogues de L-Arg	66
2.2.1. Principe : point de demi-équivalence et pKa	66
2.2.2. Conductivité d'une solution aqueuse	67
2.2.3. Mesure du pKa des aryl-guanidines	68
2.2.4. Estimation du pKa des alkyl-guanidines par corrélation de Hammett	69
3. Mesures biophysiques	71
3.1. Détermination des constantes d'affinité de NOS pour les analogues de L-Arg	71
3.2. Étude de iNOS_{ox} par spectroscopie Raman de résonance	72
3.3. Étude de iNOS_{ox} par spectroscopie ATR-FTIR	75
3.4. Détermination des potentiels d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOS_{ox}	77
3.4.1. Principe et choix du médiateur	77
3.4.2. Cellule de spectro-électrochimie	80
3.4.3. Mesure du potentiel redox de iNOS_{ox}	82
 Chapitre III	
Importance de la Tyrosine 588 chez nNOS	87
1. Structure de la partie distale du site actif des NOS	89
1.1. Résidus de la partie distale essentiels à l'activité des NOS	89
1.2. Positionnement des substrats naturels et des analogues de substrat	90
1.3. Le résidu Tyr588	92
2. Caractérisation de la nNOS sauvage et des mutants Y588F et Y588H	93
2.1. Expression et purification des enzymes	93
2.2. Caractérisation spectroscopique	94
2.2.1. Par spectroscopie UV-visible	94
2.2.2. Par spectroscopie RPE	96
3. Reconnaissance des substrats naturels et d'analogues de substrats	101
3.1. Affinité pour l'imidazole	101
3.2. Affinités pour les substrats naturels et des analogues de substrats	102
3.3. Étude de la reconnaissance par spectroscopie RPE	106
4. Effets des mutations sur l'activité enzymatique des mutants Y588X	109
4.1. Méthodes de détection de l'activité NO-synthase	109
4.2. Activité NO-synthase de nNOS	111
5. Conclusions	113
5.1. Géométrie globale de la protéine	113
5.2. Structuration du site actif	114
5.3. Reconnaissance et transformation des substrats et analogues de substrats	115

Chapitre IV

Influence d'analogues de L-Arg sur le site actif de iNOS_{ox}	119
1. Étude préliminaire : à la recherche de substrats de NOS	121
1.1. Spécificité de substrats des NOS	121
1.2. Oxydation de certaines guanidines non amino-acides par iNOS	122
1.2.1. Production de NO	122
1.2.2. Consommation d'électrons et découplage	123
1.2.3. Le complexe Fe ^{II} -O ₂	124
1.3. Objectifs	125
2. Choix des analogues d'arginine étudiés	127
2.1. Positionnement des analogues d'arginine dans le site actif des NOS	127
2.2. Réactivité des analogues d'arginine	129
2.3. Détermination du pKa des analogues d'arginine	129
3. Influence d'analogues de L-Arg sur l'hème et la partie proximale du site actif	131
3.1. Les conformations de l'hème	131
3.1.1. Différentes conformations, rôle dans la catalyse	131
3.1.2. Étude par spectroscopie Raman de résonance	132
3.1.2.1. Vibrations de l'hème à l'état Fe ^{III}	133
3.1.2.2. Vibrations de l'hème dans le complexe Fe ^{II} -CO	135
3.2. La liaison fer-cystéine	138
3.2.1. Importance du ligand proximal chez les hémoprotéines	138
3.2.2. Étude de la liaison Fe-S par spectroscopie Raman de résonance	139
3.3. Le potentiel d'oxydoréduction de l'hème	141
3.3.1. Importance du potentiel d'oxydoréduction dans la catalyse	141
3.3.2. Mesure du potentiel d'oxydoréduction par spectro-électrochimie	142
3.4. Conclusions	146
4. Étude du complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox} en présence d'analogues de L-Arg	147
4.1. Le monoxyde de carbone : une sonde du site actif des hémoprotéines	147
4.2. Étude du complexe Fe ^{II} -CO par spectroscopie ATR-FTIR	152
4.3. Étude du complexe Fe ^{II} -CO par spectroscopie Raman de résonance	155
4.3.1. Mode de déformation $\delta_{\text{Fe-CO}}$	155
4.3.2. Mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$	156
4.3.3. Déconvolution du signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$	159
4.4. Conclusion	163
5. Importance de l'état de solvatation du site actif	164
5.1. Données structurales	164
5.2. Rôle du pKa du guanidinium dans le réseau de liaisons hydrogène	167
5.3. Implications dans la compréhension du mécanisme des NOS	171
5.3.1. Un cycle catalytique : deux étapes différentes	171
5.3.2. Rôle du réseau de liaisons H dans la stabilité du complexe Fe ^{II} -O ₂	172
5.3.3. Rôle du réseau de liaisons H dans les étapes de la catalyse	174
5.3.3.1. Modèle fonctionnel pour la première étape	174
5.3.3.2. Modèle fonctionnel pour la deuxième étape	176
5.3.3.3. Conclusion	177
6. Développement d'un outil prédictif	179
6.1. L'agmatine (décarboxy-arginine)	179
6.2. La désamino-arginine	181

7. Conclusion	183
 Chapitre V	
Conclusions générales	185
 Annexe 1	
Le modèle de Michaelis-Menten	195
1. Le modèle de Michaelis-Menten en cinétique enzymatique	197
2. Extension du modèle de Michaelis-Menten	200
 Annexe 2	
Techniques spectroscopiques	203
1. Spectroscopie vibrationnelle	206
1.1. Principe des techniques de spectroscopie vibrationnelle	206
1.1.1. Modes normaux de vibration	206
1.1.2. Modèle de l'oscillateur harmonique	207
1.1.3. Population des états	208
1.1.4. Règles de sélection	208
1.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge	209
1.2.1. Principe de la spectroscopie d'absorption infrarouge	209
1.2.2. Principe de la spectroscopie ATR-FTIR	210
1.2.3. Application à l'étude des hémoprotéines	211
1.3. Spectroscopie de diffusion Raman	212
1.3.1. Principe de la spectroscopie Raman	212
1.3.2. Principe de la spectroscopie Raman de résonance	213
1.3.3. Application à l'étude des hémoprotéines	214
2. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)	214
2.1. Principe de la RPE	214
2.2. Application à l'étude des hémoprotéines	216
2.2.1. Théorie du champ de ligands	216
2.2.2. Configuration Fe^{III} bas spin ($S = 1/2$)	217
2.2.3. Configuration Fe^{III} haut spin ($S = 5/2$)	218
 Annexe 3	
Role of Arginine Guanidinium Moiety in Nitric Oxide Synthase	221
Mechanism of Oxygen Activation	
 Références bibliographiques	257

Liste des abréviations

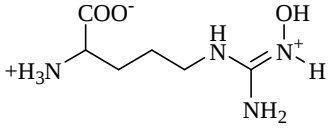
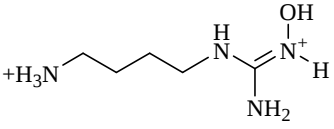
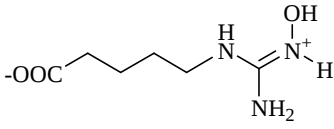
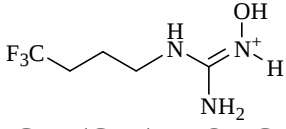
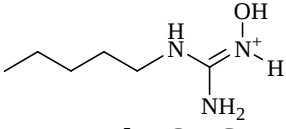
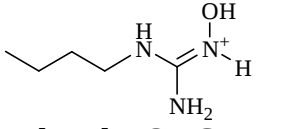
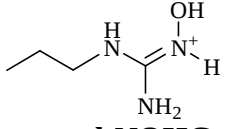
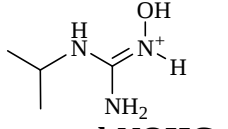
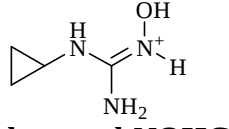
Arg (L-Arg)	L-arginine
ATR-FTIR	<i>Attenuated Total Reflection – Fourier Transformed InfraRed</i>
Boc	Tertiobutyl-oxy-carbonyl
BS	Bas spin
BSA	Albumine de sérum bovin
bsNOS	NO-synthase isolée de <i>Bacillus subtilis</i>
CaM	Calmoduline
CCM	Chromatographie sur couche mince
Cit (L-Cit)	L-citrulline
CO	Monoxyde de carbone
CPO	Chloroperoxydase
CytC	Cytochrome C
DETC	Diéthylldithiocarbamate
DIEA	Di-isopropyl-éthyl-amine
DMF	N,N-diméthylformamide
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGTA	Acide éthylène-glycol-tétra-acétique
ENH	Électrode normale à hydrogène
eNOS	NO-synthase endothéliale
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ B	7,8-dihydro-L-bioptérine
H ₄ B	(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-bioptérine
Hb	Hémoglobine
HbO ₂	Oxyhémoglobine
HEPES	Acide N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-éthanesulfonique
HS	Haut spin
ImH	Imidazole
iNOS	NO-synthase inductible
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
KPi	Phosphate inorganique de potassium
MCAC	<i>Metal Chelate Affinity Chromatography</i>
MetHb	Méthémoglobine
NADPH	Nicotamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NAME (L-NAME)	Ester méthylique de N ^o -nitro-L-arginine
nNOS	NO-synthase neuronale

NO	Monoxyde d'azote
NO [•]	Nitroxyle
NO ₂	Dioxyde d'azote
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
N ₂ O ₃	Trioxyde d'azote
N ₂ O ₄	Tétraoxyde d'azote
NOHA	N ^ω -hydroxy-L-arginine
NOS	NO-synthase
NOS _{ox}	Domaine oxygénase de NO-synthase
NOS _{red}	Domaine réductase de NO-synthase
O ₂ ^{•-}	Superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyle
RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
RPE	Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique
RR	Spectroscopie Raman de résonance
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEITU	S-éthyl-isothio-urée
SOD	Superoxyde dismutase
THF	Tétrahydrofurane
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
WT	Enzyme sauvage (<i>wild type</i>)
ZFS	<i>Zero Field Splitting</i>

Arginine et analogues

$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{+H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ Arginine		
$ \begin{array}{c} \text{+H}_3\text{N}-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ Homo-arginine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O}-\text{C}-\text{CH}(\text{+H}_3\text{N})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ Arg-COOMe	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{N}-\text{C}-\text{CH}(\text{+H}_3\text{N})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ Arg-CO-NH-OH
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{+H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ H₂N-(CH₂)₄-Gua (Agmatine)	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{-OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ HOOC-(CH₂)₄-Gua	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ HO-(CH₂)₄-Gua
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ Alkyl-guanidines	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{F}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ CF₃-(CH₂)₃-Gua	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{FH}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ CH₂F-(CH₂)₃-Gua
	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{O}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ NO₂-(CH₂)₃-Gua	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{O}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ NO₂-(CH₂)₄-Gua
	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ pentyl-Gua	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{Cyclopropyl}-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ cyclopropyl-Gua
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{X}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ Aryl-guanidines	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ Ph-Gua	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ CH₃OPh-Gua
	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{F}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ FPh-Gua	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ ClPh-Gua
	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{F}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ CF₃Ph-Gua	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ NO₂Ph-Gua

NOHA et analogues

 NOHA		
 H₂N-(CH₂)₄-NOHG (N-hydroxy-agmatine)	 HOOC-(CH₂)₄-NOHG	
 CF₃-(CH₂)₃-NOHG	 pentyl-NOHG	 butyl-NOHG
 propyl-NOHG	 isopropyl-NOHG	 cyclopropyl-NOHG

Chapitre I

Introduction : le monoxyde d'azote et les NO-synthases

Lorsqu'en 1977, un pharmacologiste américain, Ferid Murad, découvre que la nitroglycérine, utilisée comme médicament vasorelaxant, libère du monoxyde d'azote (NO), ce composé radicalaire est alors surtout connu pour être un gaz toxique présent dans la fumée de cigarette et les gaz d'échappement. Ferid Murad émet l'hypothèse selon laquelle NO pourrait réguler d'importantes fonctions cellulaires. Trois ans plus tard, Robert F. Furchgott met en évidence l'existence d'un agent de communication cellulaire produit par l'endothélium et responsable de la dilatation des vaisseaux sanguins. Cette molécule, baptisée EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*), devient alors le sujet de nombreuses études, et en 1986 les travaux de Furchgott, au même moment que ceux de Louis J. Ignarro, permettent d'aboutir à une découverte majeure : l'EDRF et NO sont la même molécule.

Les résultats de ces travaux déclenchent une véritable avalanche d'activités de recherche au sujet de cette petite molécule, et aujourd'hui, de nombreux domaines de recherche médicale (immunologie, neurophysiologie, physiologie cardiovasculaire, etc.) s'accordent pour donner à NO le rôle d'un messenger cellulaire de première importance chez les mammifères [1]. Ainsi en 1992, le journal *Science* nomme NO « Molécule de l'année » et en 1998, le prix de Nobel de médecine ou de physiologie récompense les trois pharmacologistes américains, R. F. Furchgott, L. J. Ignarro et F. Murad, pour leurs travaux de recherche sur le rôle de NO dans le système cardiovasculaire.

1. Réactivité de NO dans les milieux biologiques

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique, est un gaz incolore dans les conditions normales de température et de pression. Au contact du dioxygène de l'air, NO gazeux s'oxyde rapidement pour former du dioxyde d'azote (NO₂), caractérisé par des vapeurs rousses.

NO est une molécule soluble à la fois dans l'eau et dans les lipides, ce qui lui permet de diffuser rapidement dans de nombreux milieux, en particulier en milieu biologique où il peut atteindre facilement de nombreux compartiments cellulaires.

NO et les métaux

En tant que ligand, NO est capable de réagir avec de nombreux métaux pour donner des complexes nitrosyles du même type que ceux formés avec le monoxyde de carbone CO,

l'angle de la liaison M-N=O variant en général entre 120° et 180° [2]. Il peut ainsi interagir avec de nombreuses protéines héminiques, qu'elles soient sous forme Fe^{III} ou Fe^{II} , comme la myoglobine, l'hémoglobine ou la guanylate cyclase. Il peut également interagir avec des enzymes à fer non héminique, comme la ferritine, et avec les enzymes à cluster fer-soufre dont il est capable d'extraire un fer, ce qui les rend inactives [3].

NO et le dioxygène dissous

La nature mono-radicalaire de NO en fait un composé très instable : son temps de demi-vie est estimé entre 1 et 30 secondes en solution. Il peut en effet réagir avec le dioxygène dissous pour former NO_2 qui est un agent fortement oxydant responsable de nitrations en conditions biologiques, avec pour cible tout groupe aromatique porté par une biomolécule (résidus tyrosine, tryptophane, phénylalanine des protéines) ou encore des thiols [4-7]. La nitration des protéines enzymatiques sur des résidus clefs peut induire soit leur inhibition soit une modification de leur activité [8-10]. Ce phénomène de nitration est principalement observé en conditions de stress oxydant et a été associé à tout un panel de pathologies [11]. Le radical NO_2 en solution peut aussi dimériser en tétraoxyde d'azote (N_2O_4) puis se décomposer en ions nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-), ou réagir avec NO pour former du trioxyde d'azote (N_2O_3) (figure I.1).

Les formes réduite et oxydée de NO

Selon l'environnement, NO peut se trouver sous sa forme réduite NO^- ou oxydée NO^+ . L'anion nitroxyle (NO^-) peut réagir avec des thiols, participer à des réactions d'oxydation de l'ADN et nitrosyler les hèmes ferriques (Fe^{III}) [12, 13]. Le cation nitrosonium (NO^+) est un agent nitrosant qui intervient dans des réactions d'addition ou de substitution électrophile, la plus courante étant la S-nitrosation des thiols (glutathion, cystéine) [14]. La réaction de S-nitrosation est également permise à partir des oxydes d'azote N_2O_3 et N_2O_4 eux-mêmes formés à partir de NO [15]. Les nitrosothiols ont des temps de demi-vie assez longues (de quelques minutes à plusieurs heures) et ils sont potentiellement des donneurs d'oxydes d'azote (NO^+ ou NO). Par ailleurs, il a récemment été postulé que la modification de l'activité de certaines protéines par nitrosation de résidus cystéine clefs puisse être comparable à la réaction de phosphorylation des voies de signalisation [16].

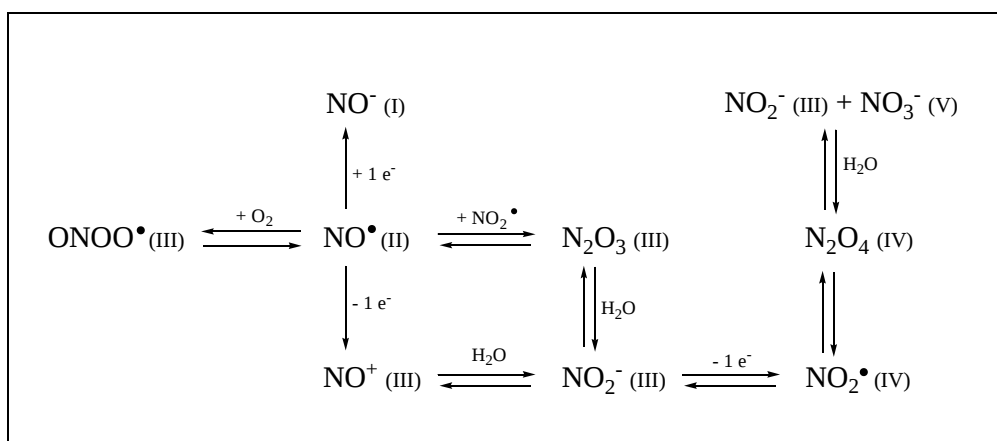


Figure I.1 : Les formes réactives de l'azote. Le degré d'oxydation de l'azote est indiqué entre parenthèses.

Le peroxynitrite

Il semblerait cependant que la forme la plus réactive de l'azote, et très certainement la plus nocive *in vivo*, soit le peroxynitrite ONOO⁻, formé par réaction stoechiométrique de NO avec l'anion superoxyde O₂^{•-} [17-20]. Cette réaction très rapide est contrôlée principalement par la diffusion dans le milieu ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). On suppose que les sites de formation *in vivo* du peroxynitrite sont étroitement liés à ceux de formation du superoxyde (NAD(P)H-oxydases de la membrane plasmique ou complexes de la chaîne respiratoire des mitochondries). En effet, si NO est relativement stable et peut diffuser rapidement dans les différents compartiments cellulaires, les ions superoxyde ont une durée de vie beaucoup plus faible et diffusent de manière très restreinte dans les membranes biologiques. Ainsi *in vivo*, c'est à proximité des macrophages et des mitochondries que la production de peroxynitrite est potentiellement la plus significative.

Le peroxynitrite est un composé à haut potentiel d'oxydoréduction qui a fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années du fait de sa capacité à oxyder et nitrer diverses biomolécules, et de son implication dans de nombreuses pathologies [11, 21]. Il peut en effet se décomposer en radicaux comme HO[•] et NO₂[•] susceptibles de réagir avec de nombreuses biomolécules comme les résidus tyrosine des protéines, les thiols, les phospholipides et l'ADN. Cependant à pH physiologique, le peroxynitrite se décompose rapidement en nitrites et nitrates, éléments moins nocifs pour la cellule.

La biosynthèse de NO doit donc être extrêmement régulée si l'organisme veut réussir à contrôler l'équilibre entre les fonctions physiologiques de NO et la réactivité nocive des espèces dérivées de NO.

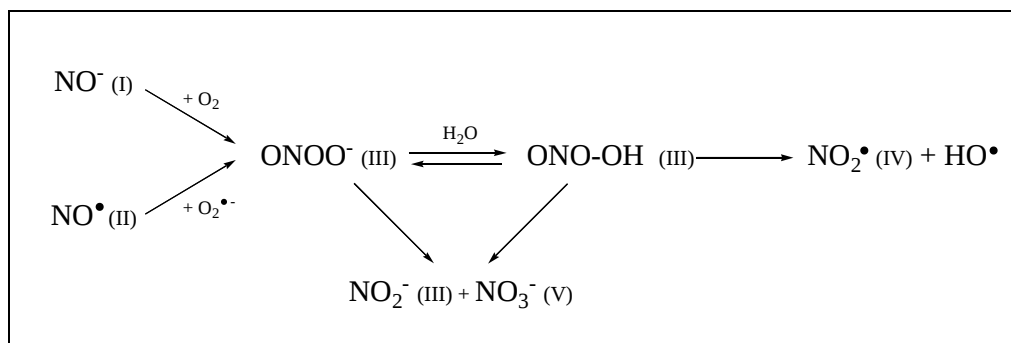


Figure I.2 : Formation et réactivité du peroxynitrite. Le degré d'oxydation de l'azote est indiqué entre parenthèses.

2. Rôles physiologiques de NO

2.1. Dans le système cardiovasculaire

C'est au niveau du système cardiovasculaire que le rôle de messager cellulaire de NO a été mis en évidence pour la première fois [22-26].

Lorsque les parois internes des vaisseaux sanguins sont soumises à une augmentation des forces de frottement exercées par le flux sanguin, un influx de calcium se crée au niveau des cellules de l'endothélium, ce qui active la production de NO par ces cellules [3]. L'influx de calcium peut également être induit en réponse à différents stimuli hormonaux (bradykinine, histamine, thrombine et sérotonine). Une fois produit par la cellule endothéliale, NO peut diffuser aux travers des parois cellulaires jusqu'aux cellules des muscles lisses, où l'interaction entre NO et une enzyme appelée guanylate cyclase soluble (GCs) entraîne la relaxation du muscle lisse. La GCs possède en effet un hème ferreux (Fe^{II}) auquel peut se fixer NO, ce qui conduit à un changement de conformation de la protéine [27] qui est alors active et peut transformer la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le GMPc est un important facteur de régulation des fonctions cellulaires, il est en particulier capable d'activer des protéines kinases, ce qui provoque au sein des cellules du muscle lisse une cascade d'événements cellulaires conduisant à la désensibilisation de la myosine au calcium et donc à la relaxation du muscle.

En tant qu'activateur de la GCs, NO est également impliqué dans un mécanisme qui prévient l'adhésion des monocytes et l'agrégation des plaquettes [28, 29].

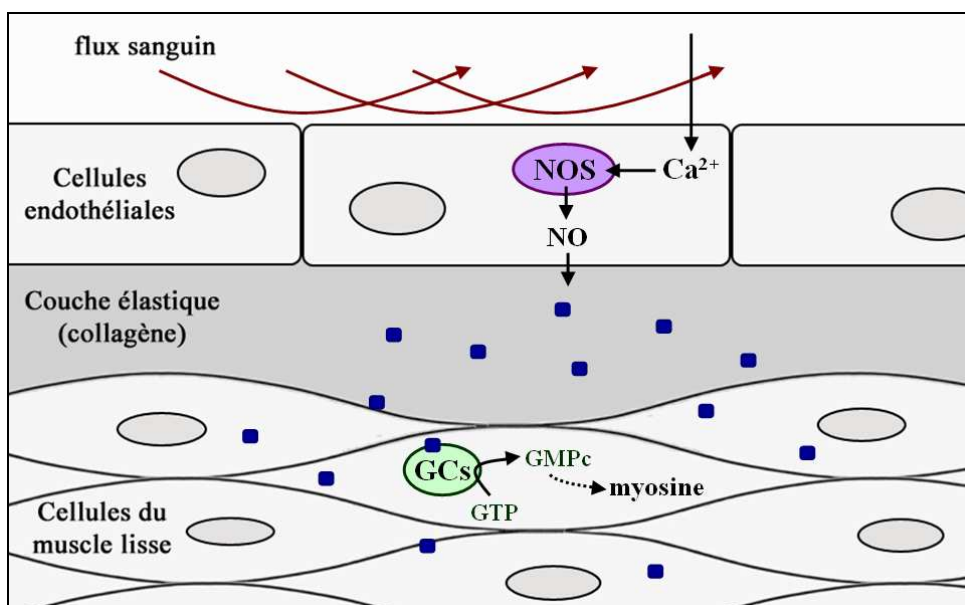


Figure I.3 : Vue schématique de la paroi interne d'un vaisseau sanguin et rôle de NO dans le système cardiovasculaire.

2.2. Dans les systèmes nerveux central et périphérique

Comme dans le système cardiovasculaire, NO agit au niveau du système nerveux en tant qu'activateur de la GCs.

Dans le système nerveux central, lorsqu'un influx nerveux arrive au niveau du neurone pré-synaptique, des neurotransmetteurs comme le glutamate sont libérés dans l'espace synaptique, puis captés par des récepteurs spécifiques au niveau du neurone post-synaptique, ce qui provoque l'ouverture de canaux ioniques à calcium. L'influx de calcium dans le neurone post-synaptique permet la propagation du signal nerveux et active la production de NO par ce neurone. NO peut alors diffuser aux travers des parois cellulaires jusqu'aux neurones voisins, et en particulier jusqu'au neurone pré-synaptique où il interagit avec la GCs et l'active. L'augmentation de la concentration en GMPc dans le neurone pré-synaptique a pour effet d'augmenter la libération de glutamate et donc d'augmenter la transmission synaptique. Ces phénomènes de potentialisation à long terme sont impliqués entre autres dans la régulation de la signalisation, dans la mémorisation, ainsi que dans la plasticité synaptique [30-32].

NO est également impliqué au niveau du système nerveux périphérique dans la régulation du transit gastro-intestinal, de la fonction respiratoire et de la fonction érectile en tant que neurotransmetteur ou modulateur des fibres nerveuses non-adrénergiques non-cholinergiques

[31]. C'est aussi par ce moyen que NO pourrait être impliqué dans la perception de la douleur [33].

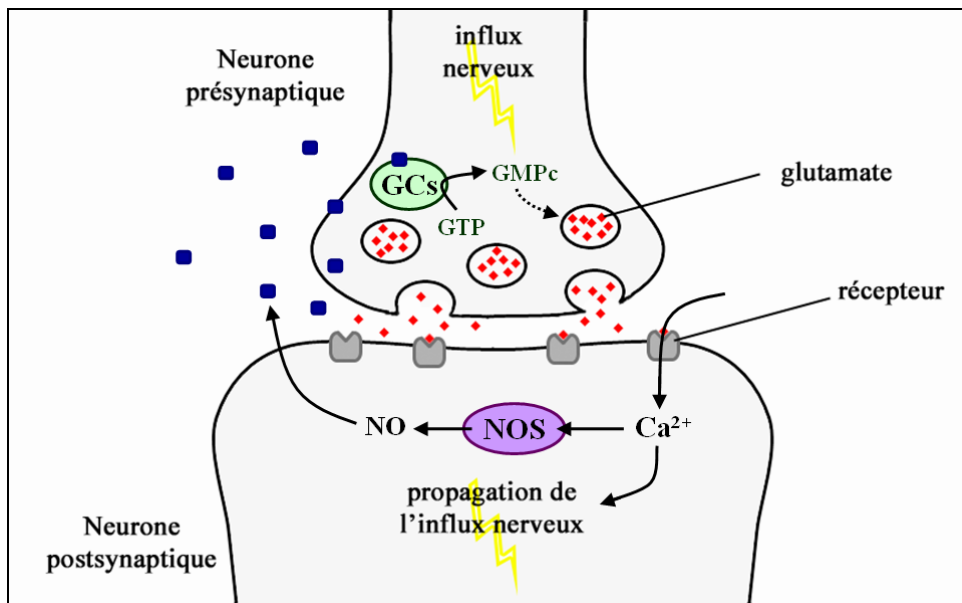


Figure I.4 : Vue schématique d'une synapse et rôle de NO dans le système nerveux.

2.3. Dans le système immunitaire

Lorsqu'un élément étranger est détecté par le système immunitaire, dans un premier temps, des cellules spécialisées telles que les neutrophiles ou les macrophages libèrent ponctuellement une grande quantité d'agents toxiques dans le but de détruire le pathogène ou la cellule anormale. La production de NO au sein des macrophages est un de ces mécanismes de la réponse immunitaire non-spécifique [3, 34]. En effet, l'exposition prolongée d'une cellule cible à de fortes concentrations en NO peut conduire à l'inhibition de plusieurs enzymes de son cycle respiratoire tels que la cytochrome c oxydase des mitochondries pour les eucaryotes ou le cytochrome bd pour les procaryotes [35, 36]. De plus, NO peut bloquer la synthèse d'ADN des bactéries par inhibition des nucléotides réductases [37].

On suppose cependant que les différents processus toxiques liés à la biosynthèse de NO seraient dus à une réactivité secondaire de NO plutôt qu'à NO lui-même. De manière intrinsèque NO est relativement inerte, mais il est susceptible de réagir avec d'autres composés produits par les macrophages, comme le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, ou directement avec le dioxygène dissout dans le milieu pour former des espèces au pouvoir hautement oxydant comme le peroxynitrite (voir I.1.) [11].

Différents stimuli peuvent induire la production de NO par les macrophages [38]. Par exemple, les lipo-polysaccharides qui constituent la paroi de certaines bactéries provoquent une cascade de réponses qui activent des protéines kinases, des facteurs nucléaires ou des cytokines, et qui conduisent à l'induction de la production de NO par le macrophage. Les cytokines pro-inflammatoires libérées par des cellules infectées peuvent aussi induire la production de NO par le macrophage [39].

Il a été proposé que NO soit également un agent antiviral, grâce à son action d'inhibition des enzymes nécessaires à la virulence et à la réplication du virus [40], et un agent antitumoral responsable de l'activité cytostatique des macrophages sur les tumeurs [15]. Il serait aussi impliqué dans le déclenchement du processus d'apoptose.

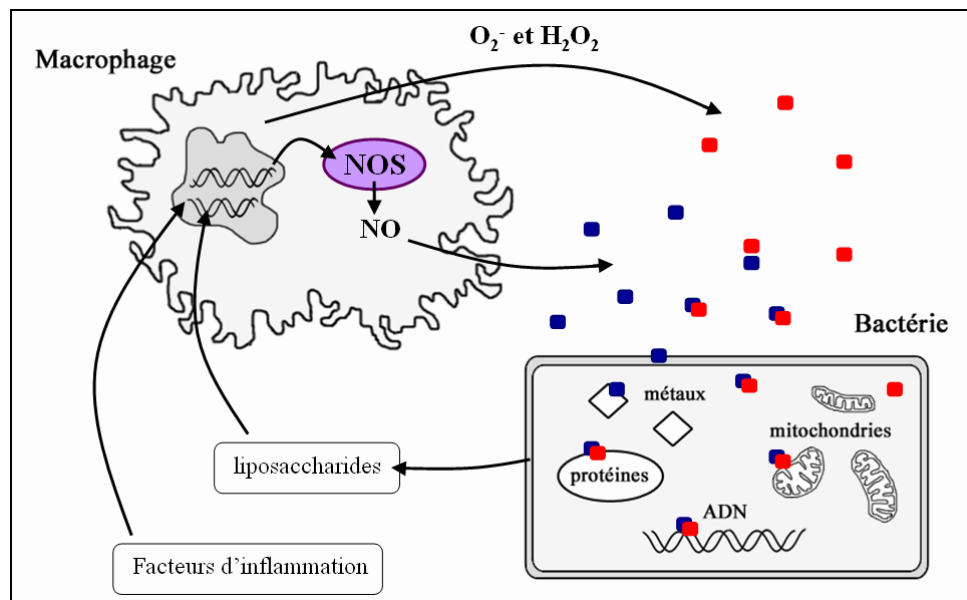


Figure I.5 : Vue schématique d'un macrophage et rôle de NO dans le système immunitaire.

3. Les NO-synthases

3.1. Source de NO chez les mammifères

Dès 1987, soit peu après la découverte du premier rôle physiologique de NO dans le système cardio-vasculaire, les nombreux travaux engagés pour découvrir l'origine biologique de ce

messager cellulaire montrent dans un premier temps que l'oxydation de l'acide-amino L-arginine (L-Arg) est reliée à la production de L-citrulline et de nitrates [41], puis montrent que L-Arg est directement la source de NO chez les mammifères avec formation intermédiaire de N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) [42].

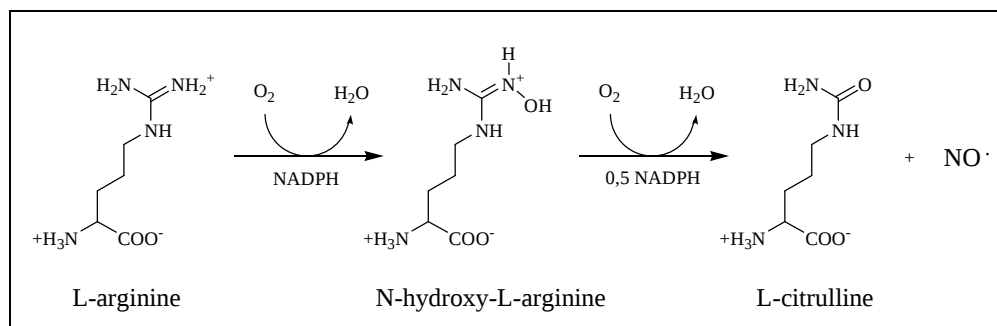


Figure I.6 : Réaction d'oxydation de L-Arg en NO, catalysée en deux étapes par les NO-synthases.

Une enzyme capable de catalyser l'oxydation de L-Arg en L-citrulline et NO est isolée en 1990 à partir d'extraits de cellules neuronales de rat, elle est logiquement baptisée NO-synthase neuronale (nNOS) [43, 44]. Une isoforme inductible de NO-synthase (iNOS) est découverte en 1991 dans des extraits de macrophages de souris [45], puis en 1992 une troisième isoforme est découverte dans les cellules endothéliales humaines, elle est baptisée NO-synthase endothéliale (eNOS) [46]. Les trois isoformes de NOS catalysent l'oxydation de l'arginine en deux étapes avec formation intermédiaire de NOHA et constituent l'unique source connue de NO chez les mammifères.

Ces enzymes se révèlent rapidement être des hémoprotéines actives sous forme de dimères, chaque monomère étant constitué d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase. Il faut cependant attendre 1997 pour que les premières structures soient obtenues par cristallographie aux rayons X [47] et permettent de mieux appréhender l'organisation et le fonctionnement des NOS.

3.2. Structure générale des NOS

3.2.1. Structure des monomères de NOS

De nombreuses structures obtenues par cristallographie aux rayons X sont aujourd'hui disponibles et permettent de comprendre l'organisation protéique des NOS.

Le domaine réductase (NOS_{red})

La partie C-terminale des NOS est très similaire aux cytochrome P450 réductases avec lesquelles elle a environ 50 % d'homologie : elle possède un site de fixation de deux flavines, flavine adénine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN), ainsi qu'un site de fixation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). Le rôle de la partie réductase est principalement d'assurer le transfert séquentiel vers le domaine oxygénase des électrons fournis deux par deux par le NADPH [48-51].

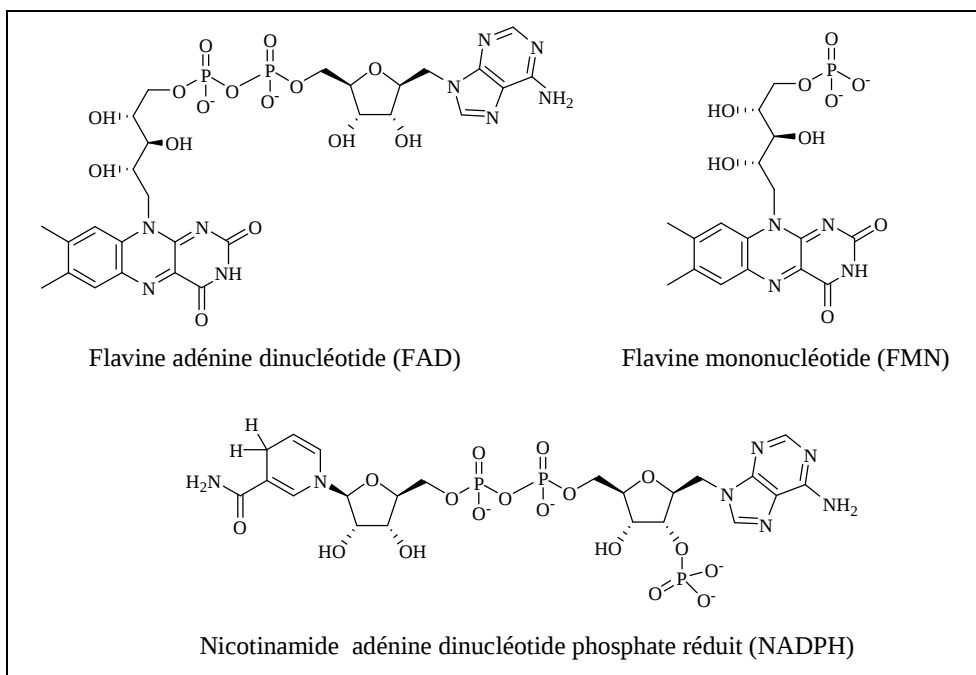


Figure I.7 : Cofacteurs du domaine réductase des NOS.

Le domaine oxygénase (NOS_{ox})

La partie N-terminale des NOS contient le site catalytique constitué du site de fixation de l'hème (une protoporphyrine de type IX avec un atome de fer au centre), du site de fixation du substrat L-arginine et du site de fixation du cofacteur (6R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (H₄B). L'hème est ancré dans la protéine par une cystéine qui sert de ligand proximal au fer [52-55].

Les NOS font donc partie de la famille des enzymes à hème-thiolate, comme les cytochromes P450, ce qui leur confère des propriétés spectroscopiques très semblables à celles des cytochromes P450, en particulier l'absorption UV-visible vers 450 nm du complexe Fe^{II}-CO [56, 57]. Il n'y a cependant aucune homologie de structure entre le domaine oxygénase des NOS et les cytochromes P450, ce qui en fait un exemple intéressant d'évolution convergente.

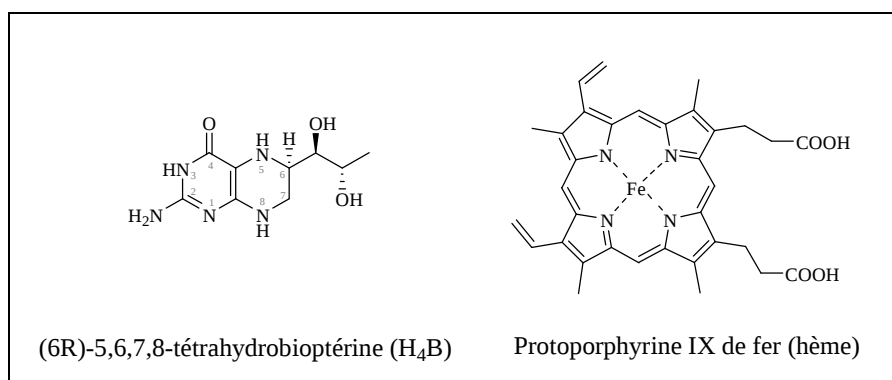


Figure I.8 : Cofacteurs du domaine oxygénase des NOS.

L'interdomaine

Les deux domaines NOS_{red} et NOS_{ox} sont reliés par une hélice d'une trentaine de résidus spécialisée dans la fixation de la calmoduline (CaM) [50, 58]. Cette petite protéine de 17 kDa est un senseur de Ca²⁺ capable d'activer un certain nombre de protéines cibles lorsque la concentration en Ca²⁺ est suffisante. En particulier chez les NOS, le transfert d'électrons entre NOS_{red} et NOS_{ox} n'est possible que lorsque la calmoduline s'est fixée à l'interdomaine [59-61].

L'effet de la calmoduline sur les NOS n'est toujours pas complètement élucidé, mais il semble cependant qu'il soit plus d'ordre cinétique et allostérique que thermodynamique [48, 49, 58, 62-65]. Le domaine réductase des NOS présente en effet différents éléments de régulation du transfert d'électrons susceptibles d'interagir avec le domaine de fixation de la calmoduline. En absence de calmoduline, une boucle de 45 résidus insérée dans le domaine de fixation du FMN chez nNOS et eNOS, mais pas chez iNOS, bloque le transfert d'électrons entre le FMN et l'hème. La fixation de la calmoduline à l'interdomaine induit des changements de conformation dans le domaine de fixation du FMN qui permettent de lever cette auto-inhibition. Le domaine de fixation de la calmoduline est également capable d'interagir avec une boucle située dans le domaine de connection entre les domaines de fixation du FMN et du FAD et dont la longueur dépend de l'isoforme de NOS. De plus, il semble que les changements de conformation du domaine de fixation du FMN liés à la fixation de la calmoduline à l'interdomaine soient capables de moduler l'action d'une extension C-terminale du domaine réductase également impliquée dans la régulation du transfert d'électrons. Il est généralement accepté que l'ensemble des changements de conformation induits par la fixation de la calmoduline à l'interdomaine permette au domaine de fixation du FMN de se rapprocher de l'hème auquel il doit transférer les électrons.

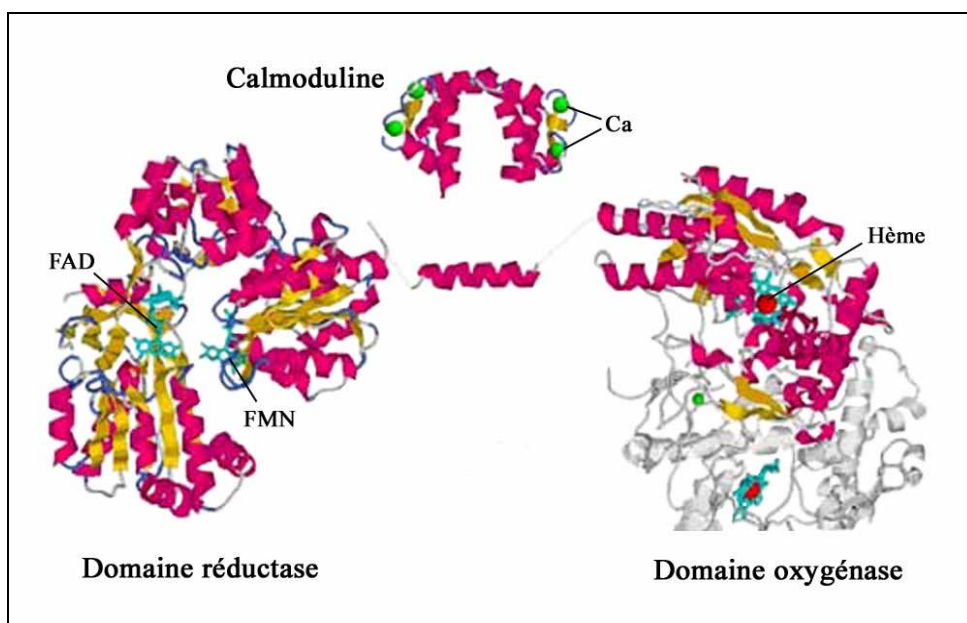


Figure I.9 : Représentation schématique d'un monomère de NO-synthase (adapté de la page internet de S. Daff, <http://ch-www.st-andrews.ac.uk/eastchem/profiles/ed/daff.html>).

3.2.2. Structure quaternaire des NOS

Dimérisation

Les NOS sont actives pour la biosynthèse de NO uniquement sous la forme de dimères [66, 67]. La surface de dimérisation se situe au niveau de chacun des deux domaines oxygénases, avec en particulier une structure en lasso hélicoïdal qui interagit avec les cofacteurs H₄B et avec les extrémités N-terminales en forme de crochet de chaque monomère [54]. La surface de dimérisation accueille aussi un atome de zinc coordonné par quatre cystéines, deux de chaque monomère NOS_{ox} [55]. Cependant, les structures cristallographiques de dimères de NOS_{ox} ont montré que ce zinc pouvait être présent ou non à la surface de dimérisation, ce qui pose la question de la pertinence de cet atome de zinc dans la structure des NOS *in vivo*. En effet, l'atome de zinc interagit avec les crochets N-terminaux et contribue à la stabilisation du dimère ainsi qu'à l'intégrité du site de fixation du cofacteur H₄B. Cependant, il ne semble essentiel ni à l'activité des NOS ni à leur structuration en dimère puisqu'en absence de zinc les cystéines forment des ponts disulfures qui maintiennent la conformation dimérique [68, 69]. Par ailleurs cette variabilité suggère que le site de fixation du zinc peut être sensible à la protéolyse ou jouer un rôle allostérique de régulation [52-54].

La présence de l'hème dans chaque monomère est nécessaire à la dimérisation [70, 71]. En revanche, le cofacteur H₄B et le substrat L-Arg ne sont pas strictement nécessaires à la

dimérisation, mais leur présence la facilite et bloque l'enzyme dans sa conformation dimérique [72-74].

La figure I.10 présente la structure en dimère des NOS_{ox}, avec son axe de symétrie très marqué, les hélices en T qui délimitent en haut le domaine oxygénase et la structure en lasso hélicoïdal au centre qui constitue une grande partie de la surface de dimérisation [54].

Les domaines réductases des NOS sont également capables de s'organiser en dimères dans les conditions de cristallisation, mais on ignore encore si *in vivo* les dimères de NOS s'associent uniquement par leurs domaines oxygénases ou à la fois par leurs domaines oxygénases et réductases [48, 75].

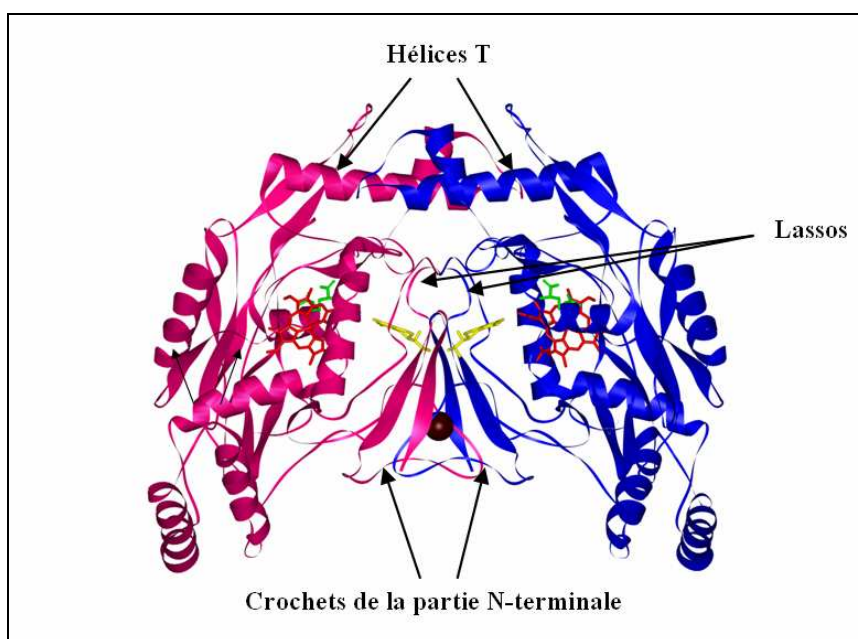


Figure I.10 : Représentation de la structure en dimère des domaines oxygénases de l'isoforme inducible de NOS humaine (iNOS_{ox}) [54]. Chaque monomère (l'un rose, l'autre bleu) comporte un hème (rouge), une molécule de H₄B (jaune), et une molécule de substrat Arg (vert). L'atome de zinc à l'interface est représenté en marron.

Transfert des électrons

Au sein du dimère, le transfert des électrons du domaine réductase au domaine oxygénase se fait préférentiellement de manière croisée, c'est-à-dire que le domaine réductase du monomère a transfère ses électrons au domaine oxygénase du monomère b, et que le domaine réductase du monomère b transfère ses électrons au domaine oxygénase du monomère a [76].

La figure I.11 présente les deux chemins proposés pour le transfert des électrons au sein d'un dimère de NOS selon que la dimérisation a lieu entre les domaines oxygénase seuls, ou à la fois entre les domaines oxygénases et réductases.

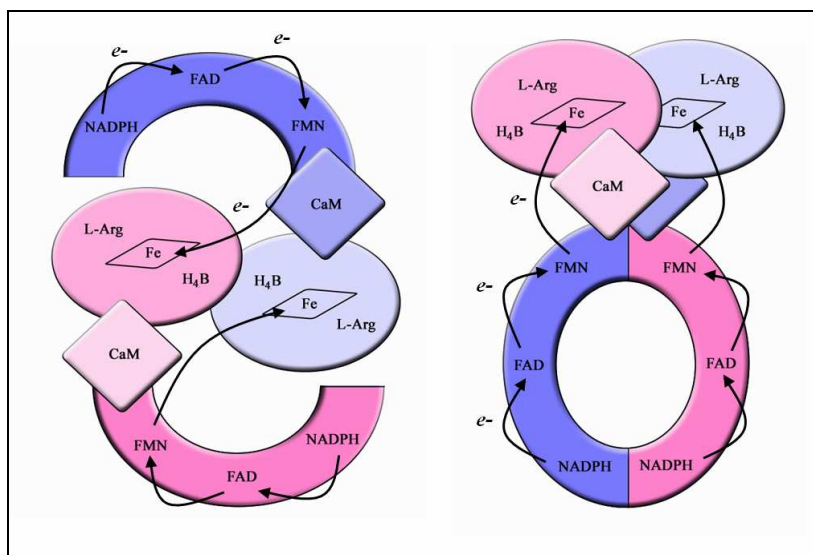


Figure I.11 : Représentation schématique du transfert des électrons au sein d'un dimère de NOS selon le mode de dimérisation.

3.2.3. Structure du site actif

La dimérisation des domaines oxygénases des NOS permet de créer une cavité de $10 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA}$ environ pour le site actif au bout d'un canal d'accès qui débouche à la surface de la protéine au niveau de l'interface de dimérisation [52-55]. La faible longueur du canal d'accès (seulement $30 \text{ \AA}$ environ) permet une bonne accessibilité du site actif pour le substrat mais aussi pour de nombreuses autres molécules ou ligands, ce qui différencie les NOS des cytochromes P450 dont le site actif est généralement enfouis au cœur de la protéine.

La position de l'hème dans la cavité définit deux parties distinctes du site actif. La partie proximale se situe du côté du ligand cystéine du fer, dit ligand proximal, elle est de faible volume et ne communique pas avec l'extérieur, contrairement à la partie distale du site actif qui se situe du côté opposé au ligand proximal, qui est de plus grand volume et qui est directement ouverte sur l'extérieur par l'intermédiaire du canal d'accès.

Position de l'hème

L'hème est fixé à la protéine principalement par le ligand cystéine proximal, lui-même engagé dans une liaison hydrogène avec un tryptophane en interaction de type π -stacking avec l'hème (figure I.12). L'orientation de l'hème est telle que ses deux groupes propionates sont tournés du côté distal vers l'extérieur de la protéine et encadrent le canal d'accès au site actif. De manière extrêmement remarquable, un des propionates établit à la fois une liaison

hydrogène avec la fonction amine α du substrat L-Arg et deux liaisons hydrogène avec le cofacteur H_4B , ce qui crée un lien direct entre ces trois éléments essentiels pour la catalyse. Il est possible qu'en solution les deux groupes propionates établissent également des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau engagées dans le canal d'accès.

Position du cofacteur H_4B

Le site de fixation du cofacteur H_4B se situe à l'interface entre les deux monomères de NOS_{ox} : la structure aromatique de H_4B est prise en sandwich entre deux résidus aromatiques, un résidu tryptophane d'une sous-unité (Trp467 dans la numérotation iNOS de souris) et un résidu phénylalanine de la deuxième sous-unité (Phe470). Le fait que H_4B se positionne à l'interface entre les deux monomères le rend particulièrement susceptible d'établir des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau se trouvant à la surface de la protéine.

La quasi-totalité des hétéro-atomes de H_4B sont engagés dans les liaisons hydrogène avec les chaînes latérales ou avec le squelette des résidus environnants. Mais l'interaction la plus importante est sans doute le réseau de liaisons hydrogène qui le relie à un propionate de l'hème, et par cet intermédiaire au substrat L-Arg (figure I.12).

Position de l'arginine

Bien que la cavité du site actif soit largement ouverte sur le canal d'accès, la poche où se fixe le substrat est en fait assez petite et un important réseau de liaisons hydrogène confine étroitement l'arginine dans une position précise.

L'extrémité guanidinium de l'arginine est maintenue dans une position parallèle au plan de l'hème, légèrement décalée par rapport au fer, par deux liaisons hydrogène avec la chaîne latérale du glutamate Glu371 (numérotation iNOS de souris) et une avec le groupe carbonyle du résidu tryptophane Trp366. Le guanidinium de l'arginine établit aussi une liaison hydrogène avec une molécule d'eau très conservée parmi les différentes structures de NOS_{ox} disponibles (figure I.12 A).

L'extrémité amino-acide de l'arginine est également maintenue précisément à la fois par les liaisons hydrogène que la partie acide carboxylique établit avec les chaînes latérales des résidus Gln257, Tyr367 et Asp376, et par les liaisons hydrogène que la partie amine établit avec le résidu Glu371 (également en interaction avec l'extrémité guanidinium) et avec un des propionates de l'hème (également en interaction avec H_4B).

Les structures de NOS obtenues en présence de NOHA [77, 78] ont montré que NOHA et L-Arg sont positionnées pratiquement de la même manière dans le site actif. La différence la

plus notable est la liaison hydrogène supplémentaire que le groupe OH de l'hydroxy-guanidinium établit avec le résidu Gly365.

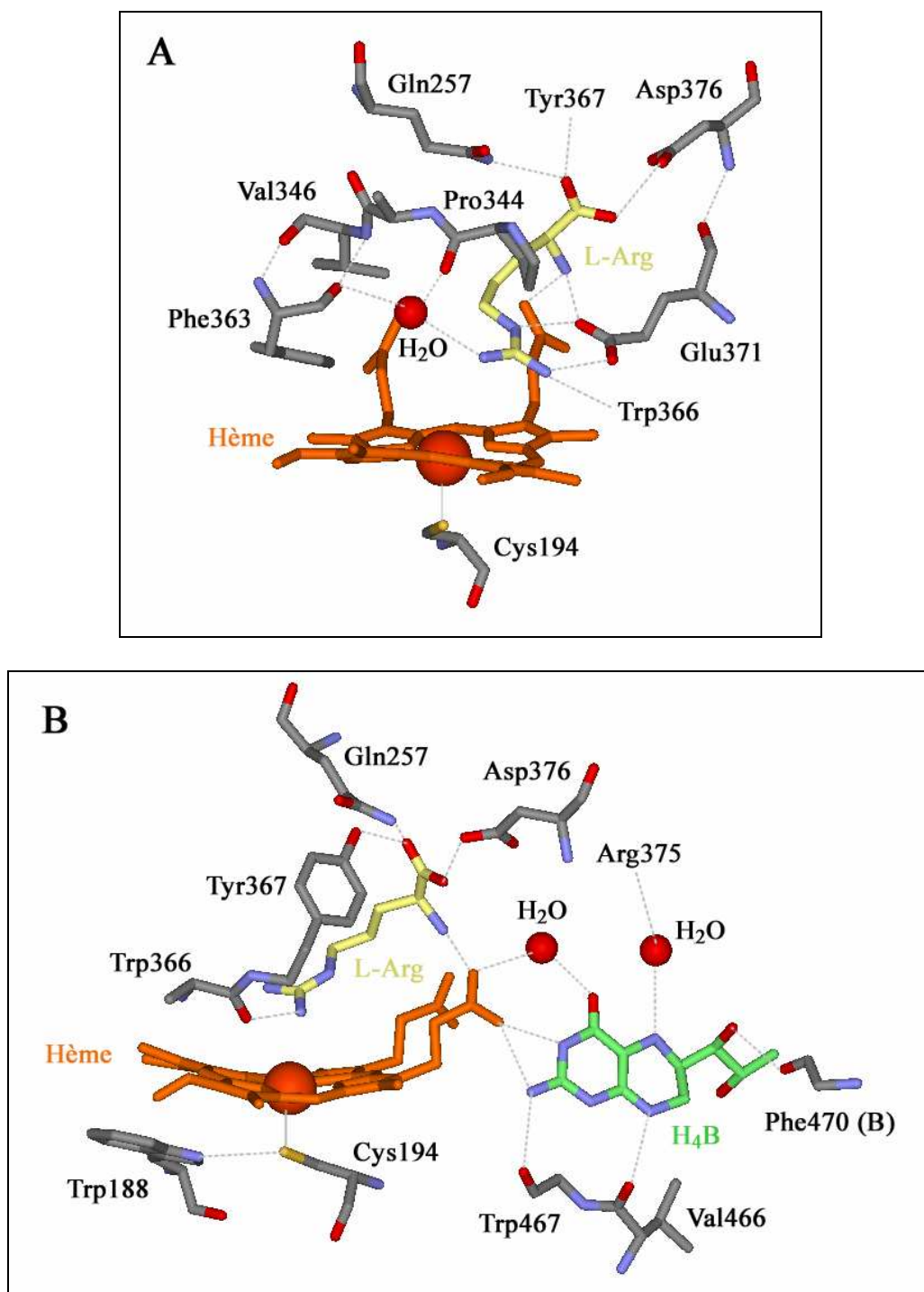


Figure I.12 : Représentations « de face » (A) et « de profil » (B) du site actif des NOS (PDB : 1NOD, numérotation : iNOS de souris) avec les principales liaisons hydrogène entre les résidus du site actif (gris), l'hème (orange), le substrat L-arginine (jaune) et le cofacteur H₄B (vert). Tous les résidus représentés appartiennent au même monomère sauf le résidu Phe470(B) qui appartient au deuxième monomère. Les deux molécules d'eau (rouge) représentées dans la vue B se situent dans le canal d'accès au site actif.

3.3. Les différents isoformes de NOS

3.3.1. Les NOS de mammifères

Chez les mammifères, trois isoformes principales de NOS ont été isolées : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible (iNOS). Par convention, les trois isoformes de NOS sont désignées en fonction du type cellulaire où elles ont été identifiées pour la première fois, même s'il a été montré depuis que chaque isoforme est exprimée dans de nombreux types cellulaires.

Bien que chaque isoforme soit exprimée à partir d'un gène distinct, elles présentent tout de même environ 60 % d'homologie de séquence entre elles, et les différences pour une même isoforme provenant de mammifères différents sont faibles. Plus remarquable, leurs structures quaternaires et en particulier leurs sites actifs sont pratiquement superposables [53]. Malgré ce haut degré de similitude dans la structure, les trois isoformes présentent des propriétés catalytiques distinctes, aussi bien au niveau de la vitesse du transfert des électrons entre NOS_{red} et NOS_{ox} [52, 79-81] qu'au niveau de l'efficacité de l'activité de formation de NO à partir de L-Arg [74, 82]. La stabilité du dimère est également légèrement différente selon l'isoforme considérée [73].

Les différences les plus importantes entre les trois isoformes se situent au niveau de leurs modes d'expression et de régulation [32, 34, 83]. En effet, la eNOS et la nNOS sont des protéines constitutives alors que l'expression de la iNOS est induite par la présence de certains messagers cellulaires comme les facteurs d'inflammation. Cependant, les NOS constitutives (eNOS et nNOS) ne produisent de NO que lorsque la concentration en ions Ca²⁺ est au moins de l'ordre du $\mu\text{mol.L}^{-1}$ [84], c'est-à-dire lors d'un afflux de calcium dans la cellule, ce qui leur permet de fixer la calmoduline nécessaire au transfert des électrons de NOS_{red} vers NOS_{ox}, au contraire de la iNOS qui présente une affinité pour la calmoduline tellement grande que la calmoduline lui est toujours fixée même aux plus faibles concentrations de Ca²⁺ accessibles dans les conditions physiologiques, ce qui rend le transfert des électrons toujours possible [85].

Les différents éléments de régulation du transfert d'électrons présents au niveau de domaine réductase des NOS et leurs interactions avec le domaine de fixation de la calmoduline varient beaucoup d'une isoforme à l'autre. En particulier, les NOS constitutives possèdent une boucle de 45 résidus insérée dans le domaine de fixation du FMN. Cette boucle interagit avec

la calmoduline lorsque la concentration en calcium est trop faible pour permettre une fixation complète de la calmoduline à l'interdomaine [65]. Il a été proposé que cette structure, inexistante chez iNOS, puisse être un élément d'auto-inhibition des NOS constitutives qui empêcherait le transfert des électrons au sein d'un même monomère [48, 62].

	eNOS	nNOS	iNOS
Poids moléculaire	131 kDa	161 kDa	133 kDa
Taille (acides aminés)	1153 aa	1434 aa	1203 aa
Type cellulaire	Endothélium	Neurone Muscle squelettique	Macrophage
	Epithélium		Hépatocyte
	Cardiomyocyte		Muscle lisse, etc.
Expression	Constitutive	Constitutive	Inductible
Régulation de l'activité	Ca ²⁺ dépendante	Ca ²⁺ dépendante	Ca ²⁺ indépendante
Stabilité dimère [73]	+++	++	+
Vitesse de transfert des e⁻ (NOS_{red} → NOS_{ox}) [59, 79-81]	+	+++	++
k_{cat} (/min/dimère) (L-Arg → L-Cit + NO) [74, 82]	28	256	390

Table I.1 : Principales caractéristiques des formes prédominantes des trois isoformes de NOS de mammifère.

3.3.2. Les NOS de bactéries

Bien que découvertes chez les mammifères, les NOS sont aujourd'hui connues pour être largement répandues dans le monde vivant, à la fois chez les vertébrés et les invertébrés [86, 87]. Au contraire, l'activité de synthèse de NO chez les bactéries est le plus souvent associée à des réactions de dénitrification impliquant des enzymes qui ne présentent aucune homologie de séquence avec les NOS de mammifères. Cependant grâce aux avancées réalisées récemment dans le domaine de la génomique, les campagnes de séquençage extensif de génomes de plusieurs milliers d'organismes ont permis de découvrir des gènes présentant des homologies de séquence significatives avec ceux des domaines oxygénase des NOS de mammifères, en particulier chez de nombreuses bactéries, principalement à Gram positif. Les protéines correspondant à ces gènes ont été baptisées NO-synthases bactériennes, bien que leur rôle *in vivo* reste inconnu et bien qu'il semble aujourd'hui que, si elles ont un rôle, ce ne soit pas celui de biosynthèse de NO.

Plusieurs de ces NOS bactériennes ont été clonées et exprimées dans *E. coli* ce qui a permis de les comparer avec leurs homologues de mammifères [88-96]. Les NOS de bactéries sont dimériques, sont capables de fixer l'arginine et le cofacteur H₄B, présentent des caractéristiques spectroscopiques similaires à celles des NOS de mammifères [97] et sont capables de produire NO à partir d'arginine, si toutefois on les met en présence de NADPH et d'un domaine réductase de NOS isolé. Car en effet, la principale différence entre les deux familles est que les NOS de bactéries ne présentent qu'un domaine oxygénase sans domaine réductase. On peut également remarquer que l'atome de zinc présent à la surface de dimérisation dans certaines structures cristallographiques des monomères NOS_{ox} de mammifères [55] n'a jamais été observé chez les NOS bactériennes.

Cependant, la structure obtenue par cristallographie aux rayons X des NOS bactériennes présente de grandes similitudes avec la structure des domaines oxygénases de NOS de mammifères, comme le montre la figure I.13.

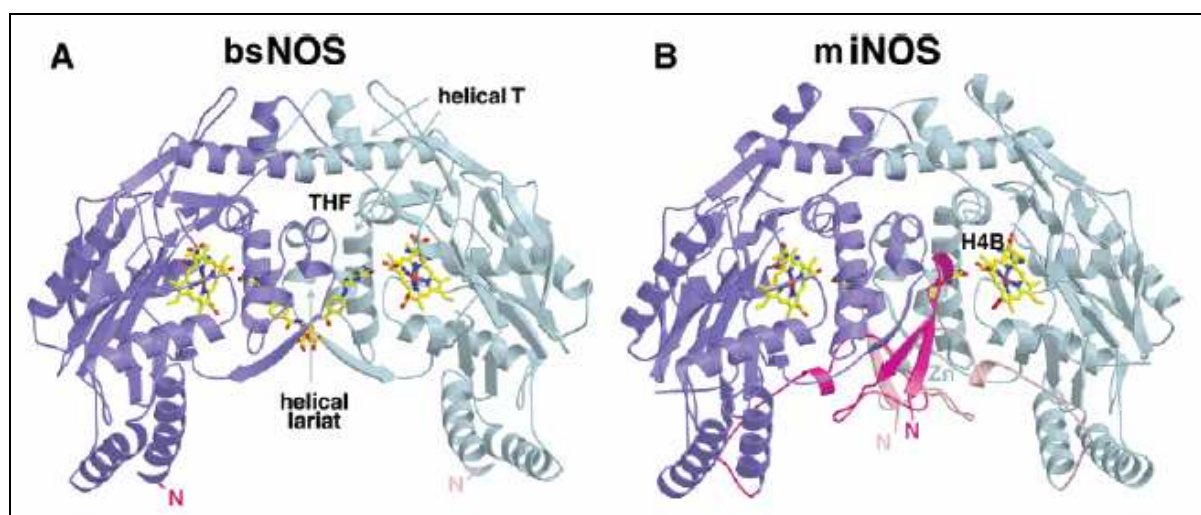


Figure I.13 : Comparaison des structures des dimères de NOS de *Bacillus subtilis* (bsNOS) cristallisée avec du tétrahydrofolate (THF) [94] (A) et des domaines oxygénase de l'isoforme inducible de mammifère (iNOS_{ox}) cristallisés avec leur co-facteur naturel H₄B (B).

Malgré les ressemblances entre les NOS de bactéries et les NOS de mammifères, il semble que le rôle *in vivo* des NOS de bactéries ne soit pas de synthétiser NO en tant que médiateur biologique, en particulier parce qu'aucun système de signalisation pouvant impliquer NO n'est à ce jour connu chez les procaryotes. Des raisons fonctionnelles s'opposent également au fait que les NOS de bactéries aient la même activité biologique que les NOS de mammifères. Tout d'abord, les caractéristiques cinétiques des NOS de bactéries montrent qu'elles ne sont pas adaptées pour relâcher NO [95]. Il faut ensuite que ces protéines disposent d'une source d'électron : il a été récemment proposé que le système flavodoxine-

réductase/flavodoxine présent chez les bactéries puisse jouer ce rôle [98]. Et enfin, la plupart des bactéries ne sont pas capables de synthétiser le cofacteur H_4B indispensable à la biosynthèse de NO par les NOS de mammifères [99]. Il pourrait cependant être substitué par une autre molécule, le tétrahydrofolate [88].

L'activité réelle des NOS de bactéries *in vivo* n'est toujours pas élucidée. Des activités de nitration sélective ont été rapportées chez un pathogène de la pomme de terre, *Streptomyces turgidiscabies*, dont la NOS catalyserait la nitration, en position 4, d'un groupement tryptophanyle de la toxine thaxtamine [92], ainsi que chez *Deinococcus radiodurans* dont la NOS associée à une tryptophanyl-tRNA synthétase est capable de réaliser des nitrations régiosélectives de tryptophanes [100, 101]. Cette activité apparaît donc comme une première piste pour la détermination d'un rôle physiologique des NOS bactériennes.

Il semble que les NOS de bactéries soient également impliquées dans la défense de la bactérie contre le système immunitaire de l'hôte et participent ainsi à la pathogénicité de la bactérie. Il a en effet été montré chez *Bacillus subtilis* et *Bacillus anthracis* que la NOS bactérienne est capable de protéger la cellule de diverses réactions d'oxydation [102, 103].

Même si ces protéines n'ont pas un vrai rôle *in vivo* de synthèse de NO, leur étude permet d'apporter des éléments de réponse pour l'étude des NO-synthases de mammifères.

3.4. Synthèse de NO par les NOS

L'activité principale des NOS de mammifères *in vivo* est la biosynthèse de NO. Cette oxydation, réalisable en présence de dioxygène et de NADPH, se déroule en deux étapes successives : la première étape consiste en l'oxydation à deux électrons de L-Arg en NOHA, et la deuxième en l'oxydation à (formellement) un électron de NOHA en L-Cit et NO (voir figure I.6) [42]. Les deux étapes de la réaction catalysées par les NOS sont donc différentes et empruntent des chemins réactionnels distincts.

3.4.1. Première étape de la synthèse : oxydation de L-Arg en NOHA

Des études de cinétique rapide et de spectroscopies résolues en temps ont montré qu'il est possible que la première étape de la synthèse de NO emprunte un chemin réactionnel similaire à celui de nombreux cytochromes P450, à l'intervention du cofacteur H_4B près [104-108].

État de spin du fer et déclenchement de la réaction

Structurellement, le fer compte 5 ligands : les 4 atomes d'azotes de la porphyrine (ligands équatoriaux) et l'atome de soufre de la cystéine proximale (ligand axial). À l'état natif, l'hème est au degré d'oxydation Fe^{III} et présente un équilibre entre la forme 5-coordinée qui est de spin 5/2 (forme haut spin, HS) et la forme 6-coordinée qui comporte une molécule d'eau comme sixième ligand et qui est de spin 1/2 (forme bas spin, BS). L'équilibre entre les formes HS et BS est déplacé en présence de H_4B et d'arginine qui favorisent la forme HS [109, 110], ce qui est aussi observé pour les cytochromes P450 lors de la fixation du substrat. Chez iNOS, la transition de la forme BS vers la forme HS entraîne une augmentation du potentiel électrochimique de l'hème d'environ 100 mV, qui devient alors suffisamment oxydant pour recevoir un électron du domaine réductase et passer à l'état d'oxydation Fe^{II} [111]. La fixation du substrat L-Arg agit dans ce cas comme une sorte d'interrupteur en entraînant le changement d'état de spin de l'hème qui permet de déclencher la réaction avec le premier transfert d'électron. Chez nNOS et eNOS, il semble que ce soit la fixation de la calmoduline à l'interdomaine qui contrôle la réduction de l'hème.

Ce premier transfert d'électron est l'étape cinétiquement limitante du cycle catalytique, avec des vitesses allant de $0,01$ à 3 s^{-1} selon l'isoforme considérée [59, 107].

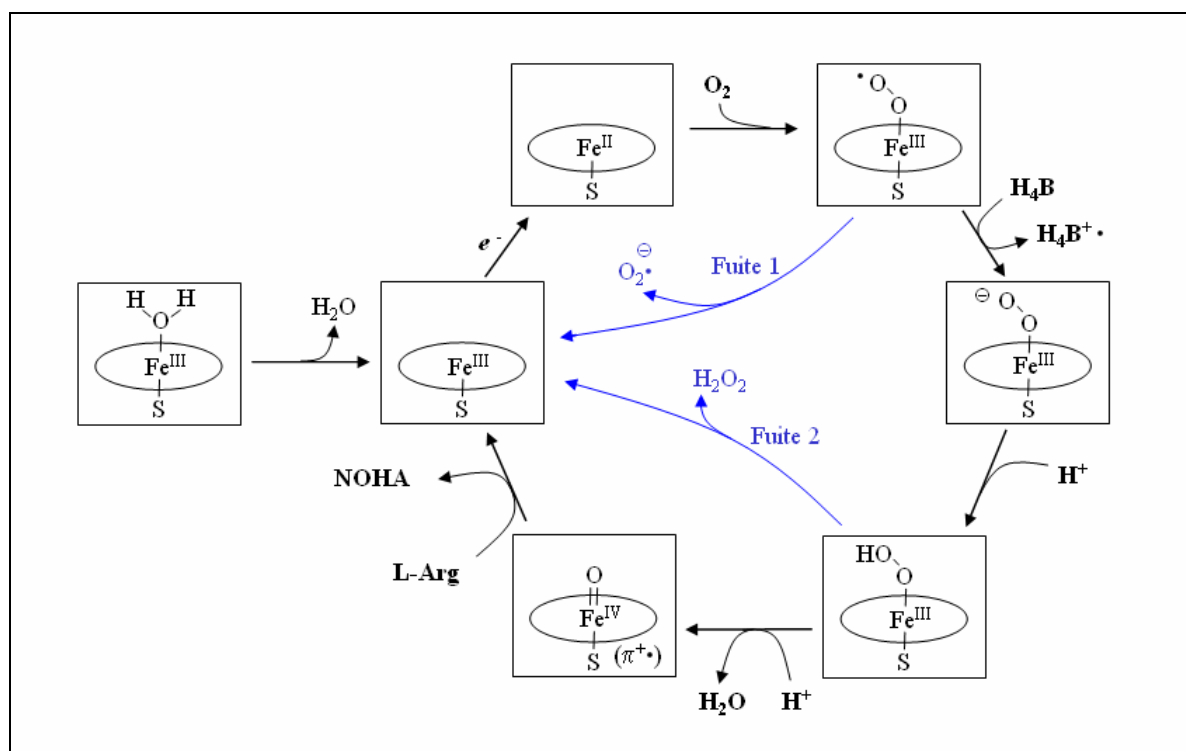


Figure I.14 : Proposition de mécanisme pour l'oxydation de L-Arg en NOHA : un mécanisme de type P450.

Activation du dioxygène

L'affinité du dioxygène étant beaucoup plus forte pour Fe^{II} que pour Fe^{III} , une fois le fer réduit à l'état Fe^{II} une molécule de dioxygène (O_2) peut venir se fixer à l'hème. On observe la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ qui est équivalent au complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^\bullet$ [112-115].

Dans le cas des cytochromes P450, ce complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ est relativement stable et donc facilement observable. Dans le cas des NOS, ce complexe est beaucoup moins stable et a tendance à se dissocier spontanément en Fe^{III} et superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$), ce qui constitue le phénomène d'autoxydation (figure I.14, fuite 1). Pour poursuivre le cycle catalytique, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ doit recevoir un électron supplémentaire, mais dans le cas des NOS, la réaction d'autoxydation peut être jusqu'à cent fois plus rapide que le transfert d'un électron provenant du domaine réductase. Il est donc très peu probable que le transfert d'électron puisse avoir lieu depuis le domaine réductase [59, 107]. Le problème est résolu par la présence du cofacteur H_4B qui sert de source d'électron auxiliaire capable de réduire le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ plus vite qu'il ne s'autoxyde [108, 113, 114, 116-119]. Le cofacteur H_4B réalise la réduction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ en complexe hème peroxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^-$ en s'oxydant à un électron en radical $\text{H}_4\text{B}^{+\bullet}$ [120]. La présence essentielle du cofacteur H_4B est donc l'élément principal qui distingue le mécanisme de la première étape d'oxydation de L-Arg par les NOS des mécanismes rencontrés chez les cytochromes P450 où les deux électrons sont fournis directement par la réductase.

L'étape de transfert d'électron entre H_4B et le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ étant nécessairement très rapide, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ est le dernier intermédiaire du cycle catalytique facilement observable. Les étapes suivantes du mécanisme sont donc toujours sujettes à discussion. L'oxydation de L-Arg en NOHA étant une réaction de mono-hydroxylation, une hypothèse couramment admise consiste à assimiler le chemin réactionnel à celui des cytochromes P450 qui catalysent également des mono-hydroxylations.

Formation de l'espèce oxydante et mono-hydroxylation de L-Arg

Les mécanismes de mono-hydroxylations catalysées par les cytochromes P450 se poursuivent par la protonation du complexe peroxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}^-$. Le complexe hydroperoxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ formé reçoit un deuxième proton, ce qui conduit à la formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-OH}_2^+$ qui, par rupture hétérolytique de la liaison O-O, perd une molécule d'eau et forme le complexe hème-perferryle (hème($\pi^{+\bullet}$)- $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$) [121]. Ces deux étapes successives de protonation

doivent être extrêmement contrôlées afin d'éviter la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (figure I.14, fuite 2).

On suppose ensuite que c'est le complexe perferryle qui réalise l'hydroxylation du groupe guanidinium de l'arginine par un mécanisme radicalaire de type « oxygen rebound » pour former l'hydroxy-arginine [104]. Le complexe hème(π^+)- $Fe^{IV}=O$ réaliserait une attaque radicalaire sur un atome d'hydrogène du groupe guanidinium, puis le radical hydroxyl formé serait rattaché à l'atome d'azote qui a perdu $H^\bullet$. Le fer serait ainsi régénéré sous sa forme Fe^{III} (figure I.15).

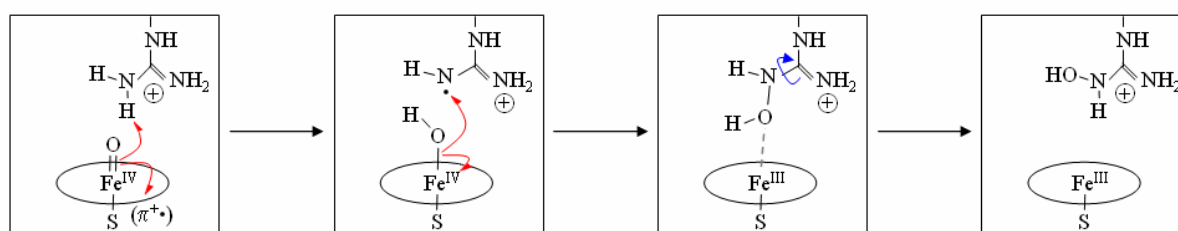


Figure I.15: Proposition pour le mécanisme d'hydroxylation de L-Arg en NOHA.

Des observations réalisées par cryoréduction de NOS en présence de L-Arg et d'un analogue inactif de H_4B corroborent cette hypothèse. En effet ces travaux ont montré qu'en remontant la température, on observe un complexe qui pourrait être Fe^{III} -NOHA où la NOHA serait fixée au fer par l'atome d'oxygène de la fonction hydroxyle (figure I.15 [120]. Lorsque la température remonte encore, la NOHA se repositionnerait ensuite dans le site actif, avec le groupe hydroxyle pointé vers un résidu du site actif à l'opposé du fer [78, 122].

Des études réalisées par des techniques de mélange rapide [123, 124] ainsi que les résultats de calculs de mécanique moléculaire [125] appuient également l'hypothèse d'un mécanisme d'oxydation de L-Arg qui utilise le complexe perferryle comme espèce oxydante.

Cependant, d'autres études apportent des résultats contradictoires avec cette hypothèse et tendent à montrer que l'espèce oxydante ne serait pas le complexe perferryle [126, 127]. En effet, des essais d'oxydation de L-Arg par NOS réalisés en présence de iodosobenzène ou en présence de H_2O_2 n'ont conduit à aucune hydroxylation du substrat, contrairement à ce qui est observé chez les cytochromes P450. Afin de concilier ces résultats expérimentaux contradictoires, il a été proposé d'autres mécanismes d'oxydation de L-Arg ne faisant pas intervenir le complexe perferryle mais utilisant directement le complexe peroxy ou hydroperoxy comme espèce oxydante [128].

Cette méconnaissance du mécanisme d'oxydation de L-Arg par les NOS provient fondamentalement de la **méconnaissance des étapes de transfert de protons vers le complexe hème-dioxygène**. La stœchiométrie de la réaction d'oxydation de L-Arg en NOHA oblige en effet à considérer que deux protons doivent à un moment ou un autre être ajoutés aux réactifs (figure I.14). **Ce sont précisément les paramètres de ces étapes de transfert de protons (nombre de protons, source, géométrie du transfert) qui déterminent l'évolution du complexe hème-dioxygène vers l'une ou l'autre des espèces oxydantes proposées.**

La poche distale du site actif des NOS ne comporte pas de résidus pouvant jouer le rôle de donneur de proton, comme c'est le cas chez certains cytochromes P450 [121]. Il a donc été proposé que ce soient l'arginine, H₄B ou une molécule d'eau qui donnent les deux protons nécessaires au cycle catalytique [52, 106, 120, 122, 129, 130]. Cependant, des contraintes géométriques empêchent l'arginine comme le cofacteur H₄B d'être des donneurs directs de proton [122, 131]. Il a été proposé, pour les NOS [86, 130] comme pour les cytochromes P450 [121, 132-134], que l'intérieur du site actif soit en communication avec l'extérieur de l'enzyme par un réseau de liaisons hydrogène comprenant des molécules d'eau et des résidus acido-basiques, ainsi que l'arginine et le H₄B dans le cas des NOS. Ce réseau de liaisons hydrogène serait capable de relayer l'arrivée des protons jusqu'à l'hème (figure I.16).

Une meilleure connaissance de ces étapes de transfert de proton est cruciale pour la compréhension de l'oxydation de L-Arg en NOHA par les NOS.

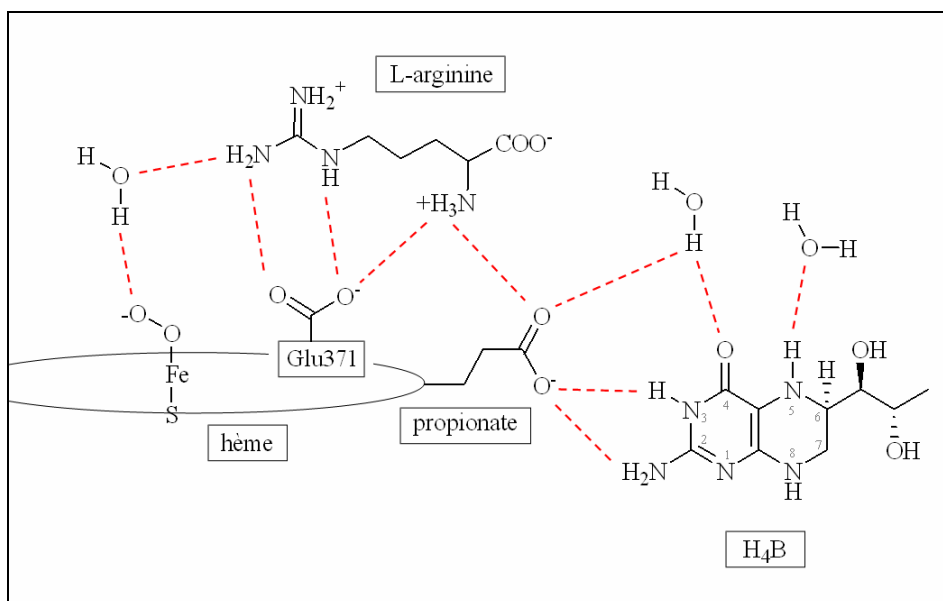


Figure I.16: Vue schématique du réseau de liaisons hydrogène susceptible d'apporter des protons depuis l'extérieur jusqu'au site actif des NOS [86, 130].

Régénération du cofacteur H₄B

Quelle que soit l'espèce oxydante qui intervient dans l'oxydation de L-Arg en NOHA, avant de poursuivre le cycle catalytique, l'enzyme doit encore régénérer le cofacteur H₄B qui avait fourni le deuxième électron lors de l'activation du dioxygène. L'électron nécessaire à la réduction de H₄B⁺⁺ en H₄B est fourni par le domaine réductase, où le deuxième électron du NADPH était transitoirement stocké par la semi-quinone FMNH^{*} [135, 136].

3.4.2. Deuxième étape de la synthèse : oxydation de NOHA en NO

Contrairement à la première étape du mécanisme, la deuxième étape est complètement spécifique des NOS, et donc encore moins bien connue. La première particularité est que l'intermédiaire NOHA ne sort pas du site actif entre les deux étapes du cycle catalytique : il reste positionné dans la poche du site actif et le transfert d'un électron depuis le domaine réductase peut avoir lieu immédiatement. L'activation du dioxygène se déroule de la même manière que lors de la première étape jusqu'à la formation du complexe Fe^{II}-O₂.

Il est manifeste que **le chemin réactionnel emprunté au cours de la deuxième étape du cycle catalytique des NOS est différent de celui emprunté lors de la première. Les étapes de transfert de proton vers le complexe hème-dioxygène sont donc vraisemblablement différentes** de celles qui ont lieu au cours de la première étape, ce qui conduit à **des espèces oxydantes différentes** pour chacune des étapes du cycle catalytique.

Des études de cinétique par mélange rapide ont montré que le premier intermédiaire observable après le complexe Fe^{II}-O₂ est un complexe Fe^{III}-NO, qui se dissocie ensuite en Fe^{III} et NO [123, 124]. Aucun des complexes intermédiaires n'a pu être observé à ce jour, les étapes du cycle catalytique qui mènent du complexe Fe^{II}-O₂ au complexe Fe^{III}-NO en présence de NOHA restent donc inconnues.

Nature du proton de NOHA impliqué dans la réaction

Les différentes structures de NOS obtenues par diffraction des rayons X en présence de cofacteur H₄B et de NOHA montrent que le groupe hydroxyle de NOHA établit une liaison hydrogène avec le résidu Gly365 (numérotation iNOS de souris) et qu'il est mal orienté pour entrer en interaction directe avec le ligand fixé au fer de l'hème [77, 78]. Ces résultats tendent à montrer que, contrairement à ce qui était supposé aux débuts de l'étude des NOS et à ce qui a été proposé récemment sur la base de calculs moléculaires [137], la rupture de la

liaison O–H n'interviendrait pas dans la formation de l'espèce oxydante au cours de la deuxième étape du cycle catalytique des NOS. En revanche, le proton porté directement par l'atome d'azote $N^{\oplus}$ lié au groupe hydroxyle de NOHA est situé à distance d'interaction avec le fer et dans une géométrie qui lui permettrait d'interagir à la fois avec l'atome proximal (O_p) et l'atome distal (O_d) du ligand fixé au fer (figure I.17).

Des études réalisées par spectroscopie ENDOR [138] ou en présence d'analogues de NOHA modifiés au niveau du groupe hydroxyle [139] confirment que le proton porté par le groupe hydroxyle n'intervient pas directement dans la transformation de NOHA par les NOS alors que le proton porté par l'atome d'azote $N^{\oplus}$ est nécessaire à la transformation de NOHA en L-Cit.

Bien que les étapes de transfert de proton des deux étapes du cycle catalytique des NOS se déroulent selon deux chemins réactionnels distincts, il semble donc que le proton de NOHA qui est impliqué dans la deuxième étape du cycle catalytique des NOS soit le proton directement porté par l'atome d'azote $N^{\oplus}$, c'est-à-dire qu'il est positionné de la même manière que le proton de L-Arg qui est impliqué dans la première étape du cycle catalytique.

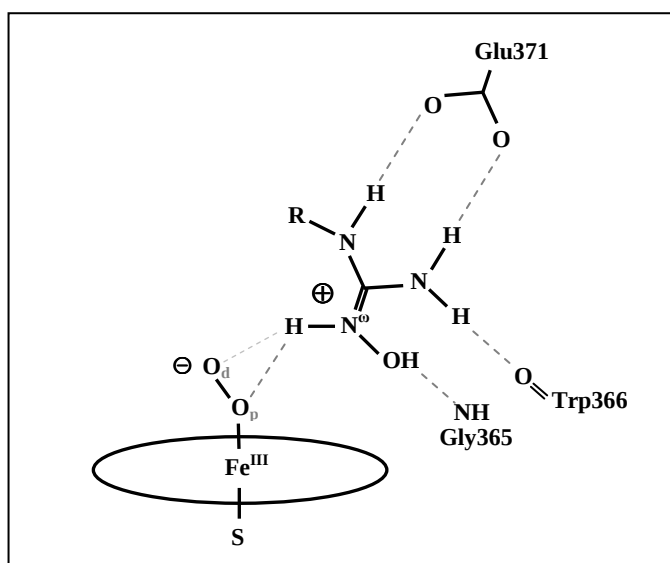


Figure I.17 : Représentation schématique de la position de NOHA au sein du site actif de NOS (numérotation : iNOS de souris) [77].

Oxydation de NOHA en L-Cit

Un mécanisme assez généralement accepté fait intervenir le cofacteur H_4B dans l'oxydation de NOHA de la même manière que dans la première étape du cycle catalytique, c'est-à-dire en tant que source d'électron auxiliaire capable de réduire le complexe $Fe^{II}-O_2$ plus vite qu'il ne s'autoxyde [107, 116, 119, 120, 123, 135, 136, 140]. Le complexe peroxy $Fe^{III}-OO^-$ ou le

complexe hydroperoxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ ainsi formés seraient suffisamment réactifs pour réaliser l'oxydation de la NOHA en L-Cit, sans qu'il soit nécessaire de passer par un composé de type perferryl $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (figure I.18).

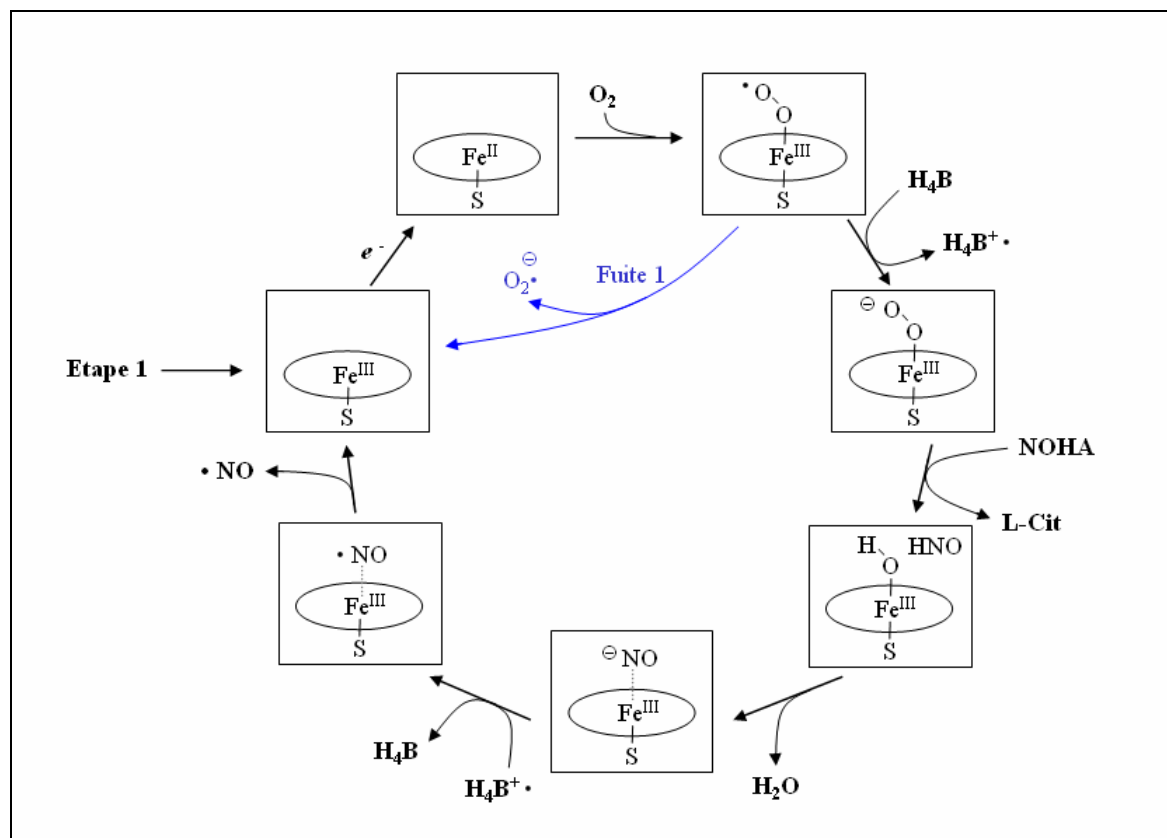


Figure I.18 : Proposition de mécanisme pour l'étape d'oxydation de NOHA en L-Cit et $\text{NO}^\bullet$.

L'hypothèse la plus souvent citée pour la transformation de NOHA considère que le **complexe (hydro)peroxo pourrait réaliser une attaque nucléophile** sur la fonction oxime de la NOHA, ce qui conduirait à un intermédiaire de type tétraédrique qui se réarrangerait en L-Cit et en NO^- ou en HNO (figure I.19). **Il a également été proposé que le complexe (hydro)peroxo ait plutôt une réactivité de type électrophile** et que la réaction passe par un intermédiaire cyclique de type oxaziridine qui se réarrangerait également en L-Cit et NO^- ou HNO (figure I.19) [77, 127].

Dans chacun des cas considérés, l'oxydation de la NOHA en L-Cit conduit à la formation de NO^- ou de HNO et non pas à la formation directe de $\text{NO}^\bullet$. De plus, à ce stade de la réaction, le cofacteur H_4B est toujours sous sa forme oxydée $\text{H}_4\text{B}^{+\bullet}$. On sait que l'étape de transformation de la NOHA en L-Cit et $\text{NO}^\bullet$ ne consomme qu'un demi équivalent de NADPH, soit un seul électron utilisé pour activer le dioxygène, ce n'est donc pas un deuxième électron provenant du domaine réductase qui réduit $\text{H}_4\text{B}^{+\bullet}$.

Un des mécanismes possibles fait intervenir une recombinaison de NO^- avec le fer pour former un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ [107, 136, 140, 141]. Ce complexe réduirait le cofacteur H_4B^{+} en H_4B , ce qui conduirait au complexe final $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$, qui est le premier produit observé lors de la réaction [107, 117, 140].

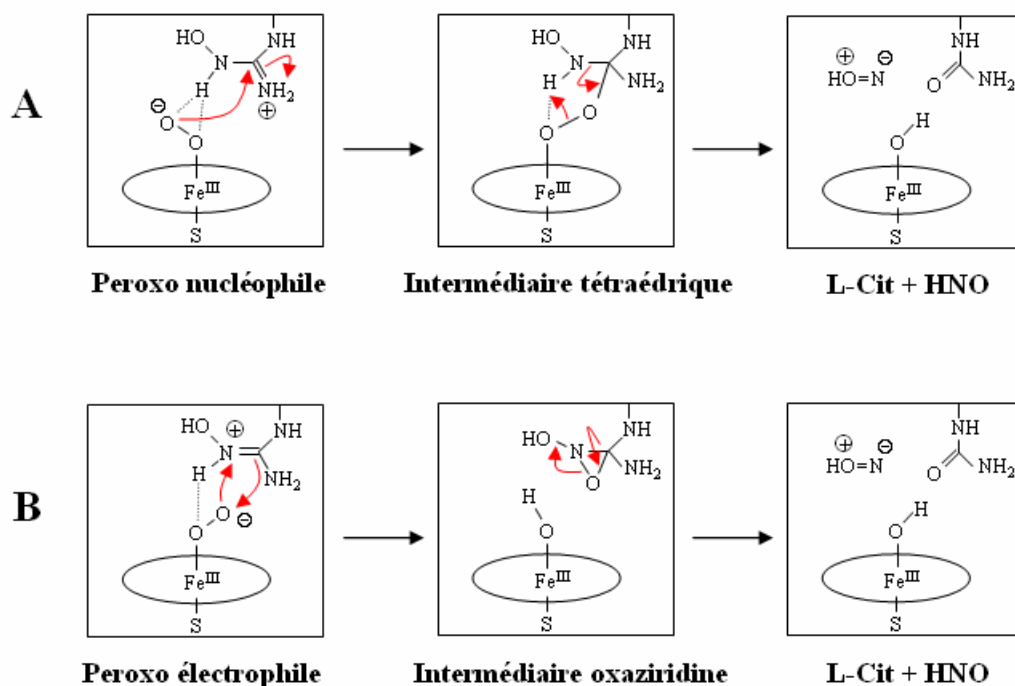


Figure I.19 : Proposition de mécanismes pour l'oxydation de la NOHA en L-Cit.

Cependant, des études réalisées en présence de NOHA et de H_2O_2 apportent des résultats contradictoires avec cette proposition de mécanisme et remettent en question le rôle du cofacteur H_4B dans la deuxième étape du cycle catalytique des NOS [126, 127]. Un mécanisme proposé fait ainsi intervenir une coupure homolytique de la liaison N–H de la NOHA fournissant à la fois un électron et un proton au complexe hème-oxygène et rendant l'intervention du cofacteur H_4B inutile [128, 137, 142, 143]. Des résultats de calculs de mécanique moléculaire ont montré que selon ce modèle le complexe perferryl pourrait être l'espèce oxydante au cours de cette étape du cycle catalytique [137].

Comme pour la première étape du cycle catalytique, une **meilleure connaissance des étapes de transfert de proton vers le complexe hème-dioxygène** au cours de la deuxième étape du cycle catalytique permettrait **une meilleure compréhension de l'oxydation de NOHA en L-Cit par les NOS**.

Libération de NO[•]

Le premier produit observé lors de la réaction d'oxydation de NOHA est le complexe Fe^{III}-NO. Suivant l'isoforme considérée et les paramètres cinétiques qui lui sont intrinsèquement associés, le complexe Fe^{III}-NO peut soit se dissocier et libérer NO[•] (figure I.18), soit être réduit en Fe^{II}-NO par le domaine réductase et entrer dans un nouveau cycle réactionnel avec une molécule de dioxygène pouvant conduire à la formation d'espèces actives de l'azote comme le peroxynitrite [80, 81, 144].

3.5. Régulation de l'activité NO-synthase

La biosynthèse de NO par les NOS est régulée par un grand nombre de mécanismes post-traductionnels [106].

Interactions NOS-protéine

Outre la calmoduline dont l'interaction avec les NOS permet d'activer ou d'inactiver le transfert des électrons en fonction de la concentration en Ca²⁺ (voir I.3.2.1. et I.3.3.1), d'autres protéines sont susceptibles d'interagir avec les NOS et de réguler son activité, comme la protéine de choc thermique Hsp90 (eNOS), la kariline (iNOS) ou la cavéoline (eNOS et nNOS) [145-149].

Phosphorylation

Le domaine réductase de toutes les isoformes de NOS de mammifères possède une petite séquence de 20 à 40 acides aminés en C-terminal que les réductases de cytochrome P450 n'ont pas [84]. Il a été proposé que la phosphorylation de certains résidus sérine de cette séquence permette de lever l'autoinhibition provoquée par cette boucle et améliore la fixation de la calmoduline à l'interdomaine, ce qui contribue à augmenter le transfert d'électrons à travers les flavines et l'activité réductase de l'enzyme [48, 79]. Par exemple, en réponse aux forces de frottement exercées par le flux sanguin, eNOS est phosphorylée par la kinase Akt ce qui a pour effet d'augmenter sa production de NO (voir 2.1.) [150, 151].

Auto-inhibition par NO

Le produit final du cycle catalytique d'oxydation de l'arginine est le complexe Fe^{III}-NO (voir 3.4.2.). Ce complexe se dissocie assez vite en Fe^{III} et NO ($k_d \sim 1 \text{ s}^{-1}$), mais si le domaine

réductase transfère un électron à ce complexe plus vite qu'il ne se dissocie, on peut observer la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ [59, 152-154]. Au contraire de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ se décompose très lentement ($k_d \sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), ce qui a pour effet de bloquer l'enzyme en empêchant un nouveau cycle catalytique [107, 155, 156]. Dans le cas des NOS de mammifères, cette auto-inhibition se manifeste par la présence en phase stationnaire d'environ 20 % et 80 % d'enzyme sous forme de complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ pour iNOS et nNOS respectivement [80, 81]. Au contraire, les caractéristiques cinétiques de eNOS entraînent une très faible formation de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ ce qui tend à montrer que eNOS n'est pas sensible à ce mode d'inhibition [59].

4. Enjeux de l'étude des NOS

4.1. Pathologies liées au dérèglement de l'activité NO-synthase

Surproduction de NO

La surproduction de NO par une isoforme de NOS peut entraîner des dysfonctionnements liés au rôle de signalisation normalement dévolu à une autre isoforme [157, 158].

Par exemple, lors d'une infection généralisée, les macrophages produisent NO en très grandes quantités pour lutter contre les pathogènes qui envahissent l'organisme (voir I.2.3.), mais ce même NO diffuse jusque dans les cellules des parois des vaisseaux sanguins et entraîne une importante relaxation générale des vaisseaux sanguins dans tout l'organisme (voir I.2.1.), ce qui est responsable de la grave hypotension que l'on observe lors d'un choc septique.

On retrouve également ce problème de signalisation lors des crises d'apoplexie (ischémie cérébrale). En fonctionnement normal, lors d'une forte baisse de l'afflux sanguin, les cellules endothéliales produisent et libèrent NO pour relaxer le vaisseau et rétablir la circulation. De même, lors d'une hémorragie ou d'un blocage thrombotique, la diminution de l'afflux sanguin dans une partie du cerveau provoque une libération très importante de NO par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux (voir I.2.1.). Lors de la reperfusion, le NO formé réagit avec les espèces activées de l'oxygène générées dans le milieu et aggrave les dommages subis par les cellules du cerveau [159, 160].

La surproduction de NO intervient également dans les pathologies de l'inflammation. Dans les premiers instants qui suivent une lésion, eNOS produit de grandes quantités de NO afin de faciliter la vasodilatation pour que le flux sanguin apporte rapidement les éléments nécessaires au traitement et à la réparation de la lésion. Cependant NO peut être produit en trop grandes quantités si la lésion est importante ou si elle met du temps à se résorber, et le NO en surplus peut alors devenir une source de stress oxydant et nitrosant, ce qui aggrave la lésion. De plus, les cellules soumises aux détériorations causées par les espèces dérivées de NO (voir I.1.) libèrent des messagers de l'inflammation qui à leur tour activent la production de NO par iNOS chez les macrophages, ce qui participe aux mécanismes de l'inflammation chronique.

Considérant l'importance et le nombre des situations physiologiques où l'excès de NO est néfaste, la recherche d'inhibiteurs des NOS a donné lieu à un grand nombre de travaux [104, 158]. Trois grandes classes d'inhibiteurs ont été explorées. Les analogues de L-Arg, comme les guanidines substituées, les amidines, les amino-guanidines, les isothiourées, se positionnent au site de fixation du substrat et entrent en compétition avec lui [47, 53, 129, 161-163]. Les analogues de H₄B, comme le 4-amino-H₄B, le H₂B, les dérivés du 7-nitroindazole, sont des inhibiteurs compétitifs du site de fixation de H₄B [55, 164]. Enfin, des inhibiteurs du transfert d'électrons ont également été étudiés, comme le diphénylèneiodonium qui est un inhibiteur de flavines, la trifluoroperazine qui est un inhibiteur de la calmoduline ou des imidazolopyrimidines qui bloquent la formation des dimères de NOS [104, 165].

Sous-production de NO

Le déficit de production de NO par les cellules de l'endothélium est caractéristique de nombreuses maladies cardiovasculaires, en particulier celles qui sont associées à des problèmes d'hypertension artérielle et pulmonaire [3]. La sous-production de NO apparaît également comme un facteur aggravant de l'athérosclérose, où l'on observe une agrégation trop importante des plaquettes et une prolifération des cellules du muscle lisse.

Des inhalations directes de NO peuvent être réalisées, en particulier dans les cas d'hypertension pulmonaire, mais ce traitement conduit à des phénomènes d'inflammation. De nombreux médicaments agissant comme donneurs de NO sont utilisés pour lutter contre les maladies cardiovasculaires [166-169]. Le plus connu et le plus vieux d'entre eux est la nitroglycérine, qui a servi de médicament à Alfred Nobel après lui avoir assuré sa fortune en tant qu'explosif. Outre les nitrates organiques, d'autres donneurs de NO sont aussi utilisés dans le traitement de ces maladies. Le nitroprussiate de sodium est utilisé dans les cas de

crises hypertensives aiguës [166], mais sa décomposition entraîne la libération de cyanure ce qui donne lieu à des effets secondaires dus à sa toxicité. Ces médicaments sont cependant peu sélectifs et libèrent NO dans tout l'organisme. Ils entraînent également le développement de tolérance chez les patients ce qui les rend difficiles à utiliser pour des traitements de longue durée [170].

La famille des nitrosothiols présente l'avantage de ne pas induire de tolérance chez les patients, mais leur décomposition rapide les rend peu sélectifs du tissu où NO est libéré, et limite leur utilisation [171, 172]. La famille des sydnonimines, dont le représentant le plus connu est la molsidomine, est en réalité une famille de précurseurs de donneurs de NO : le médicament doit subir une métabolisation au niveau des cellules hépatiques pour donner un composé qui se décompose ensuite en libérant NO [166-169]. Des médicaments hybrides ont également été conçus : ils combinent un médicament dont les effets sur le système cardiovasculaire sont connus avec un groupement donneur de NO.

Les nitrates organiques restent toutefois les médicaments les plus utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle, bien que leur utilisation présente de nombreux inconvénients [168, 170, 173]. Il serait intéressant de disposer de donneurs de NO pouvant délivrer NO sur une longue période et ciblant un tissu précis.

4.2. Production d'espèces activées de l'oxygène

Il existe une forte barrière cinétique qui empêche le dioxygène (biradical, état triplet) de réagir facilement avec la plupart des biomolécules (électrons appariés, état singulet) bien qu'il possède un potentiel électrochimique très élevé. Cette barrière cinétique protège les organismes aérobies et les empêche de subir de gros dommages au contact du dioxygène. Au contraire, les espèces réduites du dioxygène comme le superoxyde $O_2^{\bullet -}$ ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont des monoradicaux (ou générateurs de monoradicaux $HO^{\bullet}$ dans le cas de H_2O_2), donc à l'état doublet : ils subissent une barrière cinétique beaucoup plus faible pour réagir avec la plupart des biomolécules. C'est pourquoi on les appelle « espèces activées de l'oxygène ». Elles sont à l'origine de nombreuses réactions néfastes pour les cellules qui sont regroupées sous le terme de stress oxydant.

Au cours du cycle catalytique des NOS et en particulier au cours de l'activation du dioxygène, la compétition cinétique entre les étapes catalytiques et la dissociation des complexes oxydés de l'hème est normalement orientée en faveur de la poursuite du cycle

catalytique. Lorsque les étapes catalytiques deviennent trop lentes, la dissociation des intermédiaires catalytiques devient prépondérante, ce qui entraîne la rupture du cycle catalytique (voir I.3.4.1.), c'est le phénomène de découplage : des électrons provenant du NADPH sont consommés mais ne conduisent à aucune formation de NO. Les deux fuites les plus significatives dans le flux des électrons ont lieu lorsque les concentrations en L-Arg et/ou en H₄B sont insuffisantes, et conduisent à la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (figure I.14), qui deviennent donc une source de stress oxydant pour les tissus environnants [174, 175]. Les NOS sont également capables de produire O₂^{•-} et H₂O₂ par réduction directe de O₂ au niveau du domaine réductase [176].

En tant que monoradicaux ou générateurs de monoradicaux, O₂^{•-} et H₂O₂ sont susceptibles de réagir très facilement avec NO[•] qui est également un monoradical. Les produits formés sont très souvent encore plus toxiques pour la cellule que les radicaux de départ, en particulier le peroxynitrite qui est responsable de nombreuses réactions d'oxydation et de nitration *in vivo*. La production conjointe de NO[•] et de O₂^{•-} dans un même compartiment cellulaire, et a fortiori par la même enzyme, peut donc conduire à la fois à une baisse de la concentration en NO qui diminue son efficacité en temps que messenger cellulaire et à une augmentation des réactions d'oxydation et de nitration néfastes pour la cellule.

Les conditions physiologiques normales résultent donc d'un équilibre délicat entre la production de NO et la production des espèces activées de l'oxygène [177], le contrôle de cet équilibre est un enjeu majeur pour la santé et la survie de l'organisme.

4.3. Substrats alternatifs des NOS

Depuis la découverte des rôles physiologiques de NO chez les mammifères, un grand nombre de composés comportant des fonctions CNH ou CNOH ont été synthétisés et étudiés dans le but de découvrir de nouveaux substrats des NOS. En particulier, des composés dérivés de L-Arg et de NOHA ont fait l'objet de nombreuses recherches : guanidines et hydroxyguanidines monosubstituées ou disubstituées, mais aussi amidoximes, ketoximes et aldoximes [178]. Cependant, seuls quelques composés comportant une fonction guanidine [178-180] ou hydroxyguanidine [181-184] se sont montrés susceptibles d'être oxydés en NO par les NOS.

L'étude d'une série d'alkyl-hydroxyguanidines non amino-acides a montré que l'oxydation de ces composés en NO se déroule suivant un mécanisme semblable à l'oxydation de la

NOHA et que la longueur optimale de la chaîne latérale est de 4 carbones. Plusieurs aryl-hydroxyguanidines simples se sont également révélées être substrats des NOS, avec une certaine spécificité d'isoforme. Cependant, ces composés induisent de forts taux de découplage et conduisent également à la formation de $O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2 . De plus, la fonction hydroxyguanidine est peu stable et s'oxyde facilement en solution [185, 186], ce qui rend ces composés peu attractifs pour le développement de nouveaux médicaments donneurs de NO.

Les recherches se sont donc orientées vers la famille des guanidines non amino-acides qui présentent l'avantage d'être moins facilement oxydables et plus stables en solution. La famille des alkyl-guanidines comporte plusieurs composés capables d'être oxydés en NO suivant un mécanisme similaire à l'oxydation de L-Arg, bien que cette oxydation s'accompagne d'un fort taux de découplage. En revanche, aucune des aryl-guanidines testées n'a conduit à la formation de NO et toutes conduisent à un découplage important.

L'étude des analogues de L-Arg et de NOHA et des différences observées en présence de NOS (formation de NO ou non, découplage fort ou faible) constituent des outils pour l'étude et la compréhension du mécanisme des NOS.

4.4. Objectifs de la thèse

Le monoxyde d'azote exerce des rôles physiologiques particulièrement importants chez les mammifères en tant que messenger cellulaire et agent cytotoxique. Les pathologies liées à des dérèglements de la production de NO étant nombreuses, la recherche de nouveaux précurseurs de NO et d'inhibiteurs spécifiques de NOS constituent des enjeux pharmacologiques majeurs.

Des études préliminaires au laboratoire ont montré que les NOS présentent une grande spécificité de substrat. Ainsi quelques alkyl-guanidines non 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. Un des objectifs de ce travail est de **comprendre les différences de réactivité observées entre les analogues de L-Arg**, ce qui nous permettra d'avancer vers la conception de nouveaux substrats de NOS.

L'importance des rôles physiologiques de NO rend extrêmement importante la compréhension des mécanismes de formation de NO et des espèces activées de l'oxygène par

les NOS, afin de mieux évaluer leurs rôles dans les nombreuses pathologies liées au stress oxydant et au stress nitrosant.

Malgré le grand nombre d'études réalisées au sujet du mécanisme d'oxydation de L-Arg en NO par les NOS, celui-ci présente encore de nombreuses zones d'incertitude. En particulier, la nature de l'espèce oxydante générée au cours des deux étapes du cycle catalytique reste largement méconnue et des hypothèses contradictoires ont été proposées dans les différentes études publiées. Des différences subtiles dans l'apport des protons, comme leur provenance ou leur vitesse de transfert comparée à la vitesse de transfert des électrons, jouent vraisemblablement un rôle fondamental dans la distinction entre les deux étapes du cycle catalytique ainsi que dans la production d'espèces activées de l'oxygène au détriment d'une production efficace de NO. Un des objectifs de ce travail est de **comprendre le déroulement précis des étapes de transfert de protons** afin d'apporter une meilleure connaissance de la nature des espèces oxydantes impliquées dans l'oxydation de L-Arg par les NOS.

Il a été proposé que le processus d'acheminement des protons nécessaires au déroulement du cycle catalytique depuis l'extérieur de l'enzyme implique un réseau de liaisons hydrogène qui serait capable de relayer l'arrivée des protons jusqu'à l'hème. Ce réseau de liaisons hydrogène comporterait des molécules d'eau, le substrat, le cofacteur H₄B et plusieurs résidus du site actif. De plus, les différences dans les étapes de transfert de protons entre la première et la deuxième étape du cycle catalytique ont souvent été attribuées à la différence de pKa qui existe entre L-Arg et NOHA.

L'objectif de cette thèse est donc de mieux **comprendre la structuration et le rôle de ce réseau de liaisons hydrogène** dans les deux étapes du mécanisme afin d'apporter des éléments permettant une meilleure compréhension de chacune de ces deux problématiques fondamentales au sujet des NOS que sont la recherche de nouveaux substrats et la compréhension du mécanisme d'oxydation de L-Arg en NO.

Pour cela, nous avons réalisé **l'étude de deux mutants de nNOS, Tyr588Phe et Tyr588His, en présence d'analogues de L-Arg et de NOHA (chapitre III)**. Le résidu Tyr588 (numérotation de nNOS de rat) est en effet directement impliqué dans le réseau de liaisons hydrogène en interaction avec l'extrémité α -amino-acide du substrat dans le site actif de nNOS. L'étude de l'importance du résidu Tyr588 dans la reconnaissance et la transformation des guanidines et hydroxy-guanidines non amino-acides par nNOS nous a permis de mieux comprendre le rôle de ce résidu tyrosine et de la chaîne latérale du substrat dans le réseau de

liaisons hydrogène et le rôle de ce réseau de liaisons hydrogène dans la distinction entre les deux étapes du cycle catalytique des NOS.

Afin de mieux comprendre le rôle précis du substrat dans ce réseau de liaisons hydrogène, nous avons réalisé **l'étude des interactions entre le site actif de la NOS inducible (iNOS) et une série d'analogues de L-Arg présentant une large gamme de pKa (chapitre IV).**

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode de mesure du pKa des analogues de L-Arg (chapitre IV.2).

Nous avons dans un deuxième temps vérifié l'influence du substrat sur la structure et les propriétés de l'environnement proximal du site actif. Pour cela, nous avons recherché si les paramètres physico-chimiques de l'hème pouvaient être modifiés en présence de ces différentes guanidines (chapitre IV.3). Nous avons utilisé les techniques de spectroscopie Raman de résonance et de spectro-électrochimie pour déterminer l'influence des analogues de L-Arg sur la force de la liaison entre le fer et son ligand proximal, sur les modes de vibrations caractéristiques de la porphyrine et sur le potentiel électrochimique de l'hème.

Nous avons ensuite réalisé l'étude des interactions entre l'environnement distal du site actif de iNOS et les analogues de L-Arg en utilisant CO comme sonde du site actif (chapitre IV.4). L'utilisation des techniques de spectroscopies Raman de résonance et ATR-FTIR a permis de mettre en évidence les principales caractéristiques spectroscopiques des complexes formés par iNOS_{ox} en présence des différents analogues.

L'ensemble des résultats obtenus apporte de nouveaux éléments pour la compréhension de la réactivité des différents analogues de L-Arg et pour la compréhension du cycle catalytique des NOS. L'étude que nous avons réalisée met en évidence le rôle fondamental du pKa du guanidinium dans la distinction entre les deux étapes du mécanisme. Nos travaux apportent également des preuves supplémentaires en faveur de l'existence au sein du site actif d'un réseau de liaisons hydrogène dont la structuration dépend du pKa du guanidinium et des résidus du site actif et qui détermine le devenir catalytique de l'oxygène activé.

Chapitre II

Matériel et méthodes

Tous les produits chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich, Alexis ou Calbiochem, sauf H₄B qui provient des Laboratoires Schircks (Jona, Switzerland) et du CO qui est acheté à Messer (Messer France SA, France).

1. Obtention et caractérisation des protéines

1.1. Surexpression et purification de NOS

Les solutions et verreries utilisées sont stérilisées au préalable par autoclavage.

1.1.1. Surexpression et purification de nNOS

Les plasmides dont nous disposons pour la préparation de nNOS sauvage et des mutants Y588F et Y588H nous ont été gracieusement donnés par l'équipe de T. Shimizu (Institute for Chemical Reaction Science, Tohoku University, Sendai, Japan).

Préparation des bactéries compétentes

En conditions stériles, des bactéries de la souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3) sont inoculées dans 20 mL de milieu LB (*Luria Broth*). Le tube est incubé à 37 °C pendant 14 heures sous agitation (250 tr.min⁻¹). Le lendemain, 2 mL de cette préculture sont reinoculés dans 200 mL de milieu LB et mis à incuber à 37 °C pendant 2 heures sous agitation (250 tr.min⁻¹). Les bactéries sont ensuite rassemblées par centrifugation à 5000 tr.min⁻¹ (centrifugeuse Beckman, rotor JA-14) pendant 15 minutes à 4 °C, puis subissent trois cycles de lavage : re-suspension dans 10 mL de tampon au calcium (KPi 100 mM pH=7,4, CaCl₂ 1M), centrifugation à 3000 tr.min⁻¹ (centrifugeuse Beckman, rotor JA-14) pendant 5 minutes à 4 °C. Les cellules sont finalement re-suspendues dans 100 µL de tampon au calcium. La présence de calcium concentré dans le milieu a pour effet de rendre la paroi des bactéries poreuse ce qui permet en particulier à des plasmides étrangers de pénétrer dans la bactérie.

Transformation des bactéries compétentes

On ajoute 1 µL de plasmide de nNOS et 1 µL de plasmide des protéines chaperonnes pGroESL à la solution contenant les bactéries préparées. Le vecteur d'expression de nNOS

contient également un gène de résistance à l'ampicilline, celui des protéines chaperonnes contient un gène de résistance au chloramphénicol.

La suspension de bactéries est laissée à reposer à 4 °C pendant 20 minutes, puis subit un choc thermique à 42 °C pendant 60 secondes, ce qui a pour effet d'accentuer la fragilisation de la paroi des bactéries et de permettre aux plasmides d'entrer dans les bactéries. La suspension de bactéries est ensuite ajoutée à 1 mL de milieu LB et mise à incuber à 37 °C pendant 1 heure.

Sélection des bactéries transformées

Les bactéries transformées sont inoculées dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 50 mL de milieu LB. Le milieu de culture contient également 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ampicilline et 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de chloramphénicol, ce qui permet de sélectionner les bactéries qui contiennent les deux plasmides d'intérêt. L'erlenmeyer est incubé à 37 °C pendant 16 heures sous agitation (250 tr.min^{-1}). Une partie de cette pré-culture est utilisée pour reconstituer le stock de bactéries transformées et conservée en solution cryoprotectrice (glycérol/eau, 1:1) à -80 °C.

Induction et culture

La pré-culture est répartie dans 8 erlenmeyer de 2,5 L avec chacun 450 mL de milieu de culture (tryptone 12 g.L^{-1} , extrait de levure 24 g.L^{-1}) contenant 2 % glycérol, 200 mM de KPi, 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ampicilline et 100 μM d'acide δ -aminolévulinique (précurseur dans la biosynthèse de l'hème). Les erlenmeyers sont incubés à 37 °C sous agitation (250 tr.min^{-1}) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm des cultures atteigne 0,8 à 1 (environ 2 heures d'incubation). La température est abaissée à 25 °C et les erlenmeyers sont incubés sous agitation (250 tr.min^{-1}) pendant 1 heure. On ajoute alors 400 μM d'isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) pour induire l'expression de nNOS, 500 μM d'acide δ -amino-lévulinique pour permettre la synthèse d'hème par la bactérie, 2 μM de FAD et 2 μM de FMN qui sont cofacteurs du domaine réductase des NOS et 100 μM d'hème.

Les cultures sont laissées à incuber pendant 6 heures à 25 °C sous agitation (200 tr.min^{-1}). On ajoute à nouveau 500 μM d'acide δ -amino-lévulinique dans chaque erlenmeyer. Les cultures sont laissées à incuber pendant 14 heures à 25 °C sous agitation (200 tr.min^{-1}).

Lyse cellulaire

Les bactéries sont rassemblées par centrifugation à 5000 tr.min^{-1} (centrifugeuse Beckman, rotor JA-14) pendant 10 minutes à 4°C, puis re-suspendues dans 10 mL de tampon de lyse à

4 °C (Tris HCl 50 mM pH=7,4, glycérol 20 %, NaCl 150 mM, benzamidine 2 mM, DTT 3mM, CaCl₂ 2 mM, FAD 4 µM, FMN 4 µM, PMSF 1mM, aprotinine 1 µg.mL⁻¹, leupeptine 0,5 µg.mL⁻¹, pepstatine 7 µg.mL⁻¹). Le tampon de lyse contient également 5 µM de H₄B dans le cas des cultures en présence de H₄B. Les cellules sont à nouveau centrifugées à 5000 tr.min⁻¹ pendant 10 minutes à 4°C et re-suspendues dans 50 mL de tampon de casse à 4 °C, avant d'être congelées dans l'azote liquide. La pression osmotique et le choc thermique permettent la rupture de la membrane des bactéries.

Après une lente décongélation à 4 °C, on ajoute aux cellules 1 µg.mL⁻¹ de RNase, 10 µg.mL⁻¹ de DNase, 4 µg.mL⁻¹ d' aprotinine, 2 µg.mL⁻¹ de leupeptine, 28 µg.mL⁻¹ de pepstatine et 10 mg.mL⁻¹ de lysosyme. On laisse l'ensemble à température ambiante sous agitation douce pendant 30 minutes. La lyse des cellules est achevée par 4 cycles de 20 secondes de sonication à 4 °C, avec 30 secondes de repos entre chaque cycle.

Séparation et purification des protéines

La purification de la NOS est réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne de calmoduline (4%) sur sépharose reconnaissant le site de fixation de la calmoduline de la nNOS. La phase de la colonne est rincée au préalable avec du tampon (Tris HCl 50 mM pH=7,4, NaCl 150 mM, benzamidine 2 mM) et équilibrée avec du tampon contenant du calcium (Tris HCl 50 mM pH=7,4, NaCl 150 mM, benzamidine 2 mM, glycérol 20 %, DTT 3mM, CaCl₂ 2 mM).

Les extraits cellulaires lysés sont ultracentrifugés à 11 000 tr.min⁻¹ pendant 30 minutes à 4 °C (JA-20), ce qui permet de séparer les extraits solubles des résidus membranaires qui précipitent et sont éliminés. Le surnageant est mélangé à la phase de la colonne sous agitation douce à 4 °C pendant 1 heure, ce qui permet à la NOS de se fixer aux sites spécifiques à calmoduline de la phase. La phase est ensuite lavée par des cycles de centrifugation (1500 tr.min⁻¹ pendant 5 minutes à 4 °C) et re-suspension dans 20 mL de tampon de lavage (Tris HCl 50 mM pH=7,4, NaCl 150 mM, benzamidine 2 mM, glycérol 10 %, DTT 3mM, CaCl₂ 2 mM, FAD 4 µM, FMN 4 µM). Lorsque le tampon de lavage ne présente plus de traces de protéines non fixées (coloration au test de Bradford [187]), la phase est déposée dans la colonne et éluée avec du tampon d'élution contenant de l'EGTA (Tris HCl 50 mM pH=7,4, NaCl 150 mM, benzamidine 2 mM, glycérol 10 %, DTT 3mM, EGTA 5 mM). L'EGTA a pour effet de complexer les ions calcium ce qui diminue l'affinité de la NOS pour les sites à calmoduline et permet l'écoulement de la NOS. Les tampons de lavage et d'élution contiennent également 5 µM de H₄B dans le cas des cultures en présence de H₄B.

L'écoulement de la protéine est apprécié visuellement grâce à son chromophore héminique et vérifié au test de Bradford [187]. Des fractions de 2 mL sont collectées puis rassemblées, et concentrées en Centricon® YM-30 à 3000 tr.min⁻¹ pendant 30 minutes à 4 °C. Enfin, la solution de nNOS obtenue est échantillonnée à raison de 100 ou 200 µL dans des tubes cryogéniques, congelée dans l'azote liquide et conservée à -80 °C.

La colonne calmoduline-sépharose est lavée avec du tampon d'élution contenant 1 M de NaCl, puis stockée à 4 °C dans un mélange eau/éthanol (80 : 20).

1.1.2. Surexpression et purification de iNOS_{ox}

La surexpression et la purification de iNOS_{ox} ont été réalisées en collaboration avec le Dr Jérôme Santolini au Laboratoire de Stress Oxydant et Détoxification de l'iBiTec-S au CEA de Saclay.

Le plasmide dont nous disposons pour la préparation de iNOS_{ox} nous a été gracieusement donné par l'équipe de D. J. Stuehr (Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, USA).

Bactéries transformées

La souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3) est transformée par ajout du vecteur d'expression pcWORI qui contient la séquence du domaine oxygénase de iNOS (résidus 1 à 498) auquel une étiquette de six histidines a été fusionnée en position C-terminale. Le vecteur d'expression contient également un gène de résistance à l'ampicilline. L'étiquette histidine ne modifie ni les propriétés spectroscopiques ni la réactivité de l'enzyme [56, 188, 189]. La surexpression de iNOS_{ox} est placée sous le contrôle du promoteur de la β-galactosidase.

Les bactéries transformées sont conservées en solution cryoprotectrice à -80 °C.

Pré-culture

En conditions stériles, les bactéries transformées sont inoculées dans un tube de 6 mL de milieu de culture TB (*Terrific Broth* de Sigma) contenant 10 % glycérol. Le milieu de culture contient également 125 µg.mL⁻¹ d'ampicilline ce qui permet de sélectionner les bactéries qui contiennent le plasmide d'intérêt. Le tube est incubé à 37 °C pendant 8 heures sous agitation (250 tr.min⁻¹). Une partie de cette pré-culture est utilisée pour reconstituer le stock de bactéries compétentes et conservée en solution cryoprotectrice (glycérol/eau, 1:1) à -80 °C.

Le reste de la solution est ensuite transplanté dans un erlenmeyer de 2 L avec 450 mL de milieu de culture TB contenant 10 % glycérol et 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ampicilline. L'erlenmeyer est incubé à 37 °C pendant 16 heures sous agitation (250 tr.min⁻¹).

Induction et culture

La pré-culture est répartie dans 4 erlenmeyer de 2 L avec chacun 400 mL de milieu de culture TB contenant 10 % glycérol et 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ampicilline. Les erlenmeyers sont incubés à 37 °C sous agitation (250 tr.min⁻¹) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm des cultures atteigne 0,8 à 1 (environ 15 minutes d'incubation). On ajoute alors 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) pour induire l'expression de iNOS_{ox} et 400 μM d'acide δ -amino-lévilinique pour permettre la synthèse d'hème par la bactérie.

Les cultures sont laissées à incuber pendant 3 jours à 25 °C sous agitation (200 tr.min⁻¹).

Lyse cellulaire

Les bactéries sont rassemblées par centrifugation à 3000 g (centrifugeuse Beckman, rotor JA-10) pendant 35 minutes à 4 °C, puis re-suspendues dans 80 mL de tampon de lyse à 4 °C (KPi 40 mM pH=7,4, glycérol 10 %, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM, aprotinine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, leupeptine 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pepstatine A 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pefabloc SC 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, lysozyme 1 mg.mL⁻¹, PMSF/DMSO 1 mM). Le tampon de lyse contient également 50 μM de H₄B dans le cas des cultures en présence de H₄B.

L'action combinée des lysozymes et de la pression osmotique permet la rupture de la membrane des bactéries. La lyse est accentuée par 3 cycles de choc thermique : congélation rapide dans l'azote liquide, amorçage de la décongélation dans un bain-marie à 37 °C, lente décongélation sur glace. Le lysat finalement obtenu est maintenu dans la glace.

L'ADN bactérien, responsable de la viscosité du lysat, est fragmenté par addition de 50.000 unités.L⁻¹ de DNase, puis par sonication (Vibra-Cell 75042, Bioblock, amplitude 40, 50 W, impulsions de 2 s) en 3 cycles de 20 secondes par 15 mL de lysat.

Séparation des protéines

Les extraits cellulaires lysés sont ultracentrifugés à 20 000 g pendant 30 minutes à 4 °C, ce qui permet de séparer les extraits solubles des résidus membranaires qui précipitent et sont éliminés. Les protéines contenues dans le surnageant sont ensuite séparées par précipitation au sulfate d'ammonium. Une première fraction de protéines est lentement précipitée par addition de 0,1 g.mL⁻¹ de sulfate d'ammonium. La solution est laissée pendant 1 heure sous

agitation douce à 4 °C, puis le précipité est culotté à 20 000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Ce précipité est éliminé.

Le surnageant contenant la deuxième fraction de protéines solubles est lentement précipité par addition de 0,191 g.mL⁻¹ de sulfate d'ammonium supplémentaires, soit une concentration totale de 0,291 g.mL⁻¹, toujours à 4 °C. La solution est laissée pendant 2 heures sous agitation douce à 4 °C. Le précipité est culotté à 20 000 g pendant 30 minutes à 4 °C. On conserve cette fois-ci le précipité qui est solubilisé dans 50 mL de tampon de re-suspension (Tris 40 mM pH=7,4, glycérol 10 %, NaCl 250 mM, PMSF 1 mM, $\pm$ 50 μ M H₄B).

La solution obtenue est centrifugée à 20 000 g pendant 45 minutes à 4 °C ce qui permet de se débarrasser des dernières impuretés avant la chromatographie.

Purification de iNOS_{ox}

La purification de iNOS_{ox} est réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne de résine chargée en nickel (résine His-Bind®, Novagen).

La résine est d'abord lavée avec du tampon MCAC (*Metal Chelate Affinity Chromatography* : Tris 40 mM pH=7,4, glycérol 10 %, NaCl 250 mM, PMSF 1 mM, $\pm$ 50 μ M H₄B) contenant 5 mM d'imidazole afin d'occuper les sites de fixation non spécifiques. La solution de protéines obtenue précédemment est mélangée avec la résine dans un bécher de 1 L à fond large pendant 1 heure sous agitation douce à 4 °C. La résine chargée de protéines subit ensuite 3 cycles de lavage : centrifugation à 1500 tr.min⁻¹ pendant 10 minutes à 4 °C, re-suspension de la résine dans du tampon MCAC contenant 5 mM, puis 15 mM, puis 60 mM d'imidazole. A ce stade, les protéines retenues sur la résine sont majoritairement iNOS_{ox} qui se fixe spécifiquement aux sites à nickel grâce à son étiquette histidine.

La résine chargée en protéines est introduite dans une colonne en chambre froide (8 °C). Les protéines retenues sur la résine sont éluées avec du tampon MCAC contenant 160 mM d'imidazole. La protéine iNOS_{ox} possède un chromophore hémunique reconnaissable à sa couleur orangée, l'écoulement de la protéine est donc apprécié visuellement. Des fractions de 2 mL sont collectées puis rassemblées.

La solution obtenue subit 2 cycles de lavage : concentration en Centriprep® YM-30 (Millipore Corp., USA) à 3000 tr.min⁻¹ pendant 30 minutes à 4 °C, dilution dans 4 volumes de tampon phosphate (KPi 50 mM pH=7,4, 250 mM NaCl, $\pm$ 50 μ M H₄B). Cette étape permet d'éliminer une partie de l'excès d'imidazole.

La solution concentrée est ensuite dialysée à 2 reprises pendant 24 heures contre 2 L de tampon phosphate (KPi 50 mM pH=7,4, 250 mM NaCl, $\pm$ 50 μ M H₄B) afin d'éliminer

complètement l'imidazole. Enfin, la solution de iNOS_{ox} obtenue est échantillonnée à raison de 100 ou 200 µL dans des tubes cryogéniques, congelée dans l'azote liquide et conservée à -80 °C.

Ce protocole de purification, inspiré des protocoles standard [56, 188, 189], a été modifié et amélioré au fur et à mesure des préparations au laboratoire, ce qui a permis d'en augmenter grandement le rendement et la qualité. Nous avons ainsi pu obtenir jusqu'à 200 mg de iNOS_{ox} par préparation, contre un maximum de 80 mg suivant le protocole standard.

1.2. Analyse des protéines

1.2.1. Mesure de la concentration en protéines : méthode de Bradford

La concentration totale en protéine dans un échantillon est estimée par la méthode colorimétrique de Bradford [187]. Le réactif de Bradford est une solution acide de bleu de Coomassie de couleur rouge-brun qui devient bleu vif en présence de protéine, le changement d'absorbance étant proportionnel à la quantité de protéine dans la solution.

On mélange 10 µL de la solution de protéine à analyser avec 90 µL du réactif de Bradford, et on mesure l'absorbance à 595 nm après 5 minutes d'incubation à température ambiante. On réalise également une gamme d'étalonnage en utilisant l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme référence, ce qui permet d'estimer la concentration en protéine de l'échantillon.

La méthode de Bradford n'étant linéaire que sur un intervalle de concentrations assez étroit (de 2 µg.mL⁻¹ à 200 µg.mL⁻¹), il est nécessaire de réaliser différentes dilutions de l'échantillon à tester avant l'analyse.

1.2.2. Migration par électrophorèse

L'électrophorèse sur gel de poly-acrylamide SDS-PAGE permet de séparer des protéines en fonction de leur poids moléculaire sous l'effet d'un champ électrique.

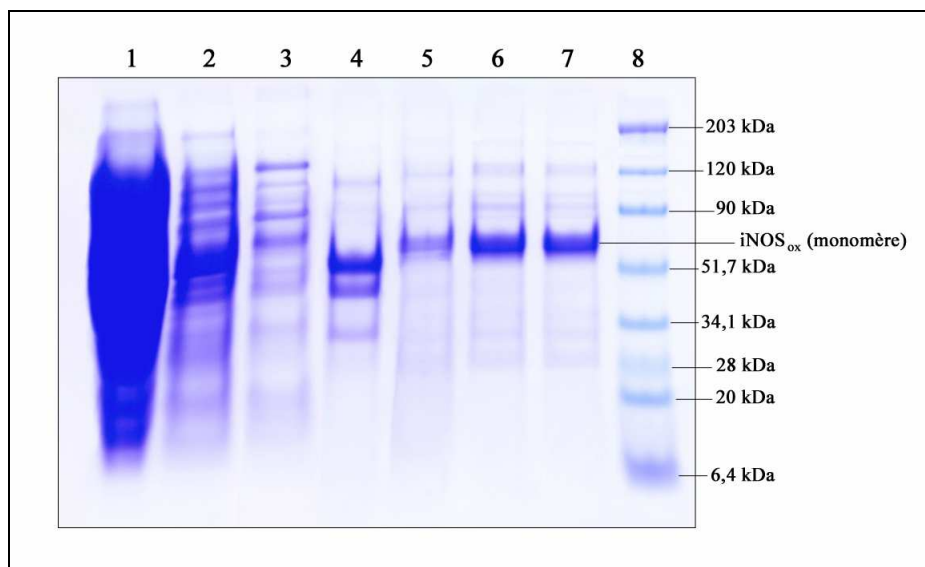


Figure II.1 : Gel de poly-acrylamide obtenu après migration par électrophorèse de différents échantillons collectés lors de la purification d'une solution de iNOS_{ox} surexprimée dans *E. coli*. La pureté de la solution de iNOS_{ox} obtenue est estimée à environ 92 %.

Puit 1 : solution brute obtenue après précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.

Puit 2 : solution de rinçage de la résine (5 mM d'imidazole).

Puit 3 : solution de rinçage de la résine (60 mM d'imidazole).

Puit 4 : témoin iNOS_{ox}-T, iNOS_{ox} sans les 65 premiers résidus.

Puit 5 : solution de iNOS_{ox} en sortie de colonne, fraction de tête.

Puit 6 : solution de iNOS_{ox} en sortie de colonne, fraction de cœur.

Puit 7 : solution de iNOS_{ox} en sortie de colonne, fraction de queue.

Puit 8 : mélange de protéines de poids moléculaires connus.

Le gel est composé dans sa partie supérieure d'une zone à pores larges qui sert au dépôt et à la concentration des protéines (pH = 6,8, 4 % d'acrylamide) et dans sa partie inférieure d'une zone dense à pores plus petits nécessaire à la séparation des protéines (pH = 8,8, 8,5 % d'acrylamide). Le pourcentage d'acrylamide qui détermine la densité du gel et la taille des pores de chaque zone a été optimisé pour iNOS_{ox}.

Les protéines sont diluées dans un tampon de dénaturation (TRIS 50 mM pH=7,0, 10 % glycérol, 4 % SDS, quelques cristaux de bleu de Coomassie), puis dénaturée en bain sec à 95°C pendant 10 minutes. Chacune des solutions de protéines est ensuite introduite dans un puit en haut du gel (environ 5 µg de protéines par puit), puis le gel est immergé dans un bain de tampon et soumis à un champ électrique de quelques volts appliqué verticalement entre le haut et le bas du gel.

Le gel obtenu peut être coloré par incubation 1 heure dans une solution de coloration (40 % éthanol absolu, 7 % acide acétique, 0,25 % bleu de Coomassie, H₂O) puis rincé (40 % éthanol absolu, 7 % d'acide acétique, H₂O) ce qui permet de marquer la position des protéines dans le gel.

Un marqueur de migration (BIO-RAD, USA) constitué d'un mélange de protéines de poids moléculaires connus est introduit dans un des puits du gel (figure II.1, puit 8) : myosine (203 kDa), β -galactosidase (120 kDa), albumine de sérum de bovin (90 kDa), ovalbumine (51,7 kDa), anhydrase carbonique (34,1 kDa), inhibiteur de la trypsine du soja (28 kDa), lysozyme (20 kDa) et aprotinine (6,4 kDa). La migration des éléments de ce mélange permet d'apprécier le poids moléculaire des protéines introduites dans les autres puits : de cette manière, le poids moléculaire des monomères de iNOS_{ox} est estimé entre 55 et 60 kDa (figure x, puits 5 à 7). Le nombre et la largeur des bandes issues de chaque puit permettent également d'apprécier la pureté de la solution introduite.

1.3. Mesure de l'activité NO-synthase

1.3.1. Test de Griess

Le test de Griess est une méthode colorimétrique de détection des ions nitrites (NO_2^-). Le sulfanilamide réagit de manière stœchiométrique avec les ions nitrites pour donner un composé diazonium, qui réagit lui-même avec le N-(1-naphtyl)éthylènediamine pour donner un composé diazo de couleur rose vif ($\lambda_{\text{max}} = 548 \text{ nm}$).

Un étalonnage réalisé à partir d'une gamme de nitrite de sodium de 0 à 50 μM permet de déterminer la concentration en ions nitrites dans la solution testée.

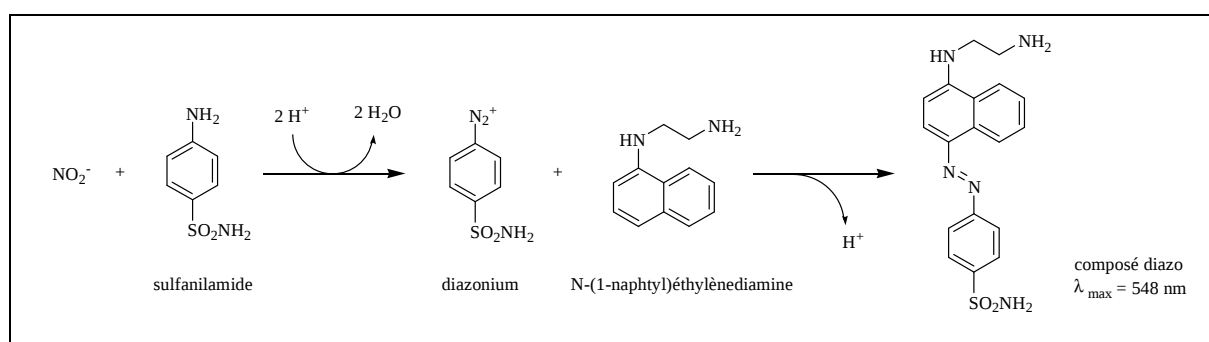


Figure II.2 : Réaction permettant la détection colorimétrique des ions nitrites grâce au réactif de Griess.

Mesure de la formation de NO par les NOS

La détection des ions nitrites permet de mesurer indirectement l'activité NO-synthase. Le NO formé au cours du cycle catalytique peut en effet réagir facilement avec le dioxygène dissous dans le milieu et s'oxyder en ions nitrites (chapitre I.1).

On incube pendant 5 minutes à 37°C 100 μ L d'une solution contenant le composé à tester comme substrat potentiel en concentration variable (100 μ M pour L-Arg ou NOHA à 10 mM pour les autres composés) et les cofacteurs nécessaires au fonctionnement de iNOS (HEPES 50 mM pH=7,4, NADPH 1 mM, H₄B 100 μ M, DTT 5 mM, SOD 1000 unités.mL⁻¹, catalase 1000 unités.mL⁻¹). Dans le cas des mesures de formation de NO par eNOS et nNOS, on ajoute également 10 mM de CaCl₂ et 10 μ g.mL⁻¹ de CaM dans la solution. La présence de catalase et de superoxyde dismutase (SOD) sert à éviter les réactions parasites avec les espèces O₂^{•-} et H₂O₂ qui peuvent être produites au cours de l'activité des NOS. La réaction est déclenchée par l'ajout de 2 μ L de solution de NOS dans l'échantillon, puis arrêtée au bout de 2 minutes par un choc thermique (5 minutes dans un bain à 95°C) ce qui dénature l'enzyme.

On prélève 50 μ L de l'échantillon auxquels sont ajoutés 50 μ L du réactif de Griess (sulfanilamide 5g. L⁻¹ et N-(1-naphtyl)éthylènediamine 0,5 g.L⁻¹ dans HCl 250 mM). La comparaison de l'absorbance à 548 nm de l'échantillon obtenu avec la gamme d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions permet de déterminer la concentration en nitrites dans l'échantillon de départ.

Mesure de la formation de NO par iNOS_{ox}

Il n'est pas possible de tester l'activité de iNOS_{ox} de la même manière que celle de l'enzyme entière à cause de l'absence de domaine réductase qui empêche iNOS_{ox} de disposer d'une source d'électrons. Afin de vérifier que l'enzyme obtenue après surexpression et purification est bien active, on réalise l'oxydation de NOHA par le domaine oxygénase de NOS en présence de H₂O₂ [126]. Cette réaction mène à la formation d'un équivalent de L-citrulline et d'un équivalent de NO⁻. En conditions aérobies, NO⁻ réagirait de nouveau avec l'enzyme pour former un ion nitrite, qui est ensuite détecté grâce au réactif de Griess.

L'enzyme (environ 150 nM) est incubée pendant 30 minutes à 30°C dans le tampon « oxygénase » (KPi 100 mM pH = 7,4, glycérol 10 %, H₄B 100 μ M, DTT 1 mM, BSA 0,1 g.L⁻¹, SOD 25 000 unités.L⁻¹). La réaction est déclenchée par l'addition de 1 mM de NOHA et 30 mM de H₂O₂, puis arrêtée au bout de 10 minutes par l'ajout de 7 mg.L⁻¹ de catalase qui consomme H₂O₂ restant. On prélève 50 μ L de l'échantillon auxquels sont ajoutés 50 μ L du réactif de Griess (sulfanilamide 5g. L⁻¹ et N-(1-naphtyl)éthylènediamine 0,5 g.L⁻¹ dans HCl 250 mM). On compare ensuite l'absorbance à 548 nm de l'échantillon obtenu avec la gamme d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions.

La vitesse initiale de production de nitrites par iNOS_{ox} a été mesurée pour des concentrations variables en cofacteur H₄B, ce qui peut être modélisé par une courbe de saturation hyperbolique de Michaelis (Annexe 1). On en déduit les valeurs de la vitesse maximale de formation de nitrites (V_{max}) et de la constante apparente de dissociation de H₄B (K_S). Les valeurs de V_{max} mesurées pour l'ensemble des préparations de iNOS_{ox} réalisées au laboratoire varient entre 16 et 38 mol NO₂⁻ / min / mol iNOS_{ox} (moyenne ≈ 30), avec un K_S pour H₄B compris entre 1,1 et 3,4 μ M (moyenne $\approx 2,1$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec iNOS_{ox} par d'autres équipes de recherche.

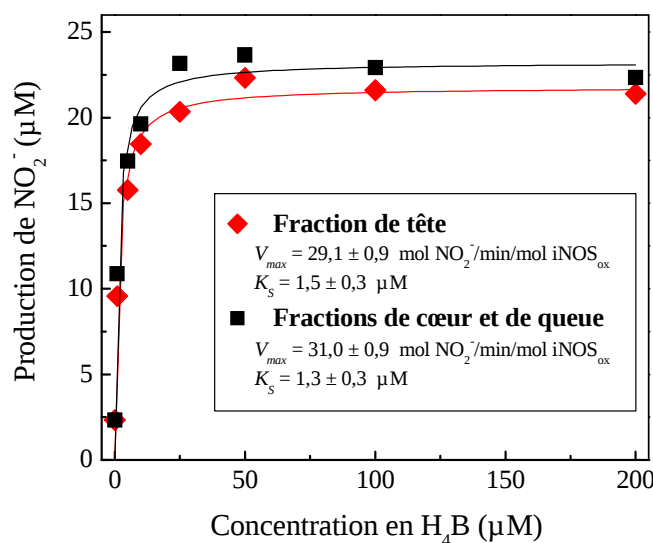


Figure II.3 : Courbes de production de nitrites (NO₂⁻) représentatives de l'activité des fractions de iNOS_{ox} obtenues à l'issue d'une préparation de protéines réalisée au laboratoire.

1.3.2. Test à l'hémoglobine

En présence de NO, l'oxyhémoglobine HbO₂ (Fe^{II}-O₂) est oxydée irréversiblement et de manière stœchiométrique en méthémoglobine MetHb (Fe^{III}) [190], ce qui se traduit par un déplacement du maximum d'absorption dans le spectre UV-visible de la solution (figure II.4) de 414 nm pour HbO₂ à 401 nm pour MetHb.

L'apparition de MetHb en solution est soit suivie directement par l'augmentation de l'absorbance à 401 nm, soit suivie en spectroscopie différentielle par l'apparition symétrique d'un pic à 401 nm et d'une vallée à 418 nm. La deuxième méthode est grandement préférable car elle permet de s'affranchir des variations d'absorbance dues à des dégradations de HbO₂ indépendantes de la présence de NO.

La concentration de la solution de HbO₂ utilisée est déterminée grâce au pic d'absorption à 415 nm ($\epsilon_{415} = 131\,000\text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$).

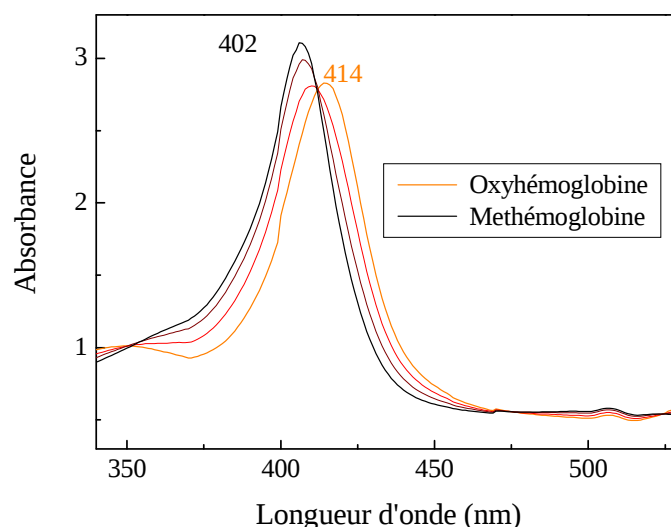


Figure II.4 : Spectres d'absorption UV-visible de Hb-O₂ et MetHb.

La cuve de référence et la cuve de mesure sont remplies avec chacune 150 μL d'une solution de HbO₂ contenant également le composé à tester comme substrat potentiel en concentration variable (100 μM pour L-Arg ou NOHA, 10 mM pour les analogues de L-Arg et de NOHA) et les cofacteurs nécessaires au fonctionnement de iNOS (HEPES 50 mM pH=7,4, HbO₂ 20 μM , NADPH 1 mM, H₄B 100 μM , DTT 5 mM, SOD 1000 unités.mL⁻¹, catalase 1000 unités.mL⁻¹). Dans le cas des mesures de formation de NO par eNOS et nNOS, on ajoute également 10 mM de CaCl₂ et 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de CaM dans la solution. La présence de catalase et de superoxyde SOD sert à éviter les réactions parasites avec les espèces O₂^{•-} et H₂O₂ qui peuvent être produites au cours de l'activité des NOS.

Les deux cuves sont préincubées 2 minutes à 37°C, puis la réaction est déclenchée par l'addition de 1 à 5 μL de solution de NOS dans la cuve de mesure. La quantité de NOS ajoutée est ajustée au cours d'essais préliminaires afin d'obtenir une réponse linéaire du système sur environ 3 minutes.

La quantité de HbO₂ convertie en MetHb, c'est-à-dire la quantité de NO formé, est donnée par $\Delta\epsilon_{401-418} = 77\,000\text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$, ce qui permet de déterminer la vitesse de formation de NO en fonction de la concentration en composé testé.

La répétition de cette expérience avec des concentrations variable en composé à tester permet de déterminer les constantes K_m et V_{max} associées à ce composé (Annexe 1).

1.3.3. Test au Fe(DETC)₂

Le monoxyde d'azote, grâce à sa nature radicalaire, est capable de réagir avec des molécules qui servent de piègeurs de spin (*spin trap*) ce qui permet de le détecter indirectement par spectroscopie RPE (Annexe 2). Par exemple, le complexe de diéthylldithiocarbamate ferreux Fe(DETC)₂ réagit quantitativement avec NO pour former un complexe paramagnétique qui présente un signal caractéristique en spectroscopie RPE [191]. L'intensité du signal RPE est proportionnelle à la quantité d'espèce paramagnétique Fe(DETC)₂-NO présente dans l'échantillon, et donc proportionnelle à la quantité de NO produit.

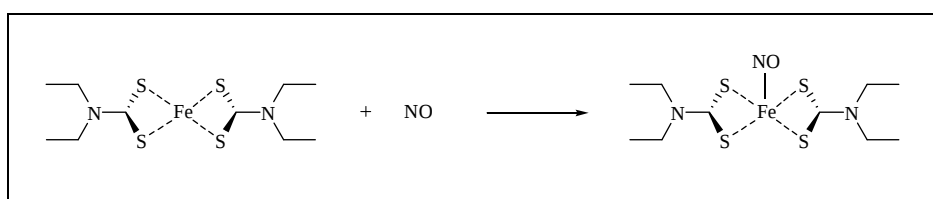


Figure II.5 : Formation du complexe paramagnétique Fe(DETC)₂NO

Le complexe Fe(DETC)₂ étant insoluble dans l'eau pure, on réalise une solution de Fe(DETC)₂ en présence de BSA (NaDETC 10 mM, sel de Mohr 2 mM, BSA 2 mg.mL⁻¹). Nous avons vérifié que la présence de BSA dans ces proportions ne perturbe pas le fonctionnement de NOS.

La solution de Fe(DETC)₂ est mélangée avec une solution contenant les cofacteurs nécessaires au fonctionnement de iNOS (HEPES 50 mM pH=7,4, NADPH 1 mM, H₄B 100 μM, DTT 5 mM, SOD 100 unités.mL⁻¹, catalase 100 unités.mL⁻¹ final) et le composé à tester comme substrat potentiel en concentration variable (100 μM pour L-Arg ou NOHA, 10 mM pour les autres composés). Dans le cas des mesures de formation de NO par eNOS et nNOS, on ajoute également 10 mM de CaCl₂ et 10 μg.mL⁻¹ de CaM dans la solution. Le mélange est incubé pendant 2 minutes à 37 °C.

La réaction est déclenchée par l'addition d'environ 50 nM d'enzyme dans l'échantillon, puis arrêtée par congélation dans l'azote liquide. Le spectre RPE de l'échantillon est enregistré à 80 K ± 5 K (puissance 20,12 mW, fréquence 9,36 GHz, modulation : amplitude 1 G et fréquence 100 kHz, atténuation 10 dB).

On réalise également une gamme d'étalonnage en utilisant comme référence une solution de NO obtenue par bullage de NO gazeux dans du tampon (KPi 100 mM pH=7,4). La concentration en NO de la solution de référence est déterminée grâce au test à l'hémoglobine,

ce qui permet d'estimer la quantité de NO produite dans l'échantillon contenant le complexe Fe(DETC)₂.

1.3.4. Détection de la citrulline marquée

Contrairement aux méthodes précédentes, cette méthode de détection de l'activité des NOS ne repose pas sur la mesure de la quantité de NO produite mais sur la mesure de la quantité de citrulline formée au cours de la réaction. La NOS est incubée en présence d'arginine marquée, et la quantité de citrulline marquée obtenue est mesurée par un compteur de radioactivité.

On incube pendant 5 minutes à 37 °C une solution contenant les cofacteurs nécessaires au fonctionnement de iNOS (HEPES 50 mM pH=7,4, NADPH 1 mM, H₄B 20 µM, FAD 4 µM, FMN 4 µM, DTT 5 mM) et environ 500 000 cpm de [2,3,4,5-³H]L-arginine pour un volume total de 100 µL. On ajoute aussi de l'arginine non-marquée (environ 50 µM) afin de placer l'enzyme dans les conditions classiquement utilisées pour la conversion du substrat. Dans le cas des mesures de formation de NO par eNOS et nNOS, on ajoute également 1 mM de CaCl₂ et 10 µg.mL⁻¹ de CaM dans la solution.

La réaction est déclenchée par l'addition d'environ 50 nM d'enzyme dans l'échantillon, puis arrêtée par addition de 500 µL de tampon stop à 4 °C (acétate de sodium 20 mM pH=5,5, L-citrulline 1 mM, EDTA 2 mM, EGTA 0,2 mM).

L'échantillon est ensuite déposé sur une petite colonne contenant 1 mL de résine Dowex AG 50W-X8 (forme Na⁺) qui avait été pré-équilibrée avec du tampon stop. On élue ensuite avec 1,5 mL de tampon stop. La résine ne retient que les espèces chargées positivement, elle permet donc de séparer l'arginine (marquée ou non) qui est chargée positivement à ce pH et donc retenue sur la colonne, de la citrulline (marquée ou non) qui est neutre à ce pH et qui est éluee.

On prélève 400 µL de filtrat auxquels on ajoute 2 mL de scintillant Pico-Fluor 40, ce qui permet de mesurer la radioactivité de chaque échantillon avec un spectromètre à scintillation liquide (Packard Tri-Carb 2300). On estime que 90 à 95 % de la citrulline produite dans l'échantillon est éluee, ce qui permet d'estimer la quantité de NO produit au cours de la réaction.

1.4. Caractérisation des NOS par spectroscopie d'absorption UV-visible

La spectroscopie d'absorption UV-visible permet d'observer les transitions entre les couches électroniques externes d'une molécule. Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés sur un appareil UvikonXL (SECOMAM, France).

Malgré les étapes de lavage et de dialyse réalisées au cours du protocole de purification de iNOS_{ox}, il reste possible qu'une faible concentration résiduelle d'imidazole soit présente dans la solution finale de iNOS_{ox}. L'imidazole étant un excellent ligand d'hème, la présence de ce composé perturbe fortement les propriétés spectroscopiques de la protéine. Avant chaque expérience, l'échantillon de iNOS_{ox} utilisé subit donc trois cycles de lavage supplémentaires : dilution dans le tampon final, concentration en Ultrafree-0.5, Biomax-30 (Millipore Corporation, USA) à 5 000 tr.min⁻¹ pendant 10 minutes à 4 °C. Ces dernières étapes de lavage permettent à la fois d'éliminer l'imidazole résiduel et de conditionner la protéine dans le tampon final au pH souhaité contenant éventuellement d'autres composés et/ou un cofacteur.

1.4.1. Les espèces Fe^{III} de NOS

État natif

À l'état natif, c'est-à-dire en absence de substrat et de cofacteur, l'hème des NOS est au degré d'oxydation Fe^{III} et présente un équilibre entre la forme 5-coordinée (forme haut spin, HS) et la forme 6-coordinée qui comporte une molécule d'eau comme sixième ligand (forme bas spin, BS). La forme majoritaire à l'état natif dépend de l'isoforme de NOS considérée : dans le cas des isoformes iNOS et nNOS l'équilibre favorise grandement la forme 6-coordinée BS [192], alors que l'isoforme eNOS est majoritairement sous la forme 5-coordinée HS, comme c'est également le cas pour l'isoforme bactérienne bsNOS.

Le spectre d'absorption UV-visible du complexe Fe^{III} 6-coordiné BS présente une bande de Soret dont le maximum se situe à 420 nm (iNOS_{ox} native, figure II.6). Dans ces conditions, la structure dimérique de l'enzyme est fragile et la proportion de monomères et de dimères est difficile à estimer. Au contraire, le spectre d'absorption UV-visible du complexe Fe^{III} 5-coordiné HS présente une bande de Soret dont le maximum se situe autour de 395 nm et une bande d'absorption vers 650 nm associée au transfert de charge (Cys)S→Fe^{III} (bsNOS native, figure II.6).

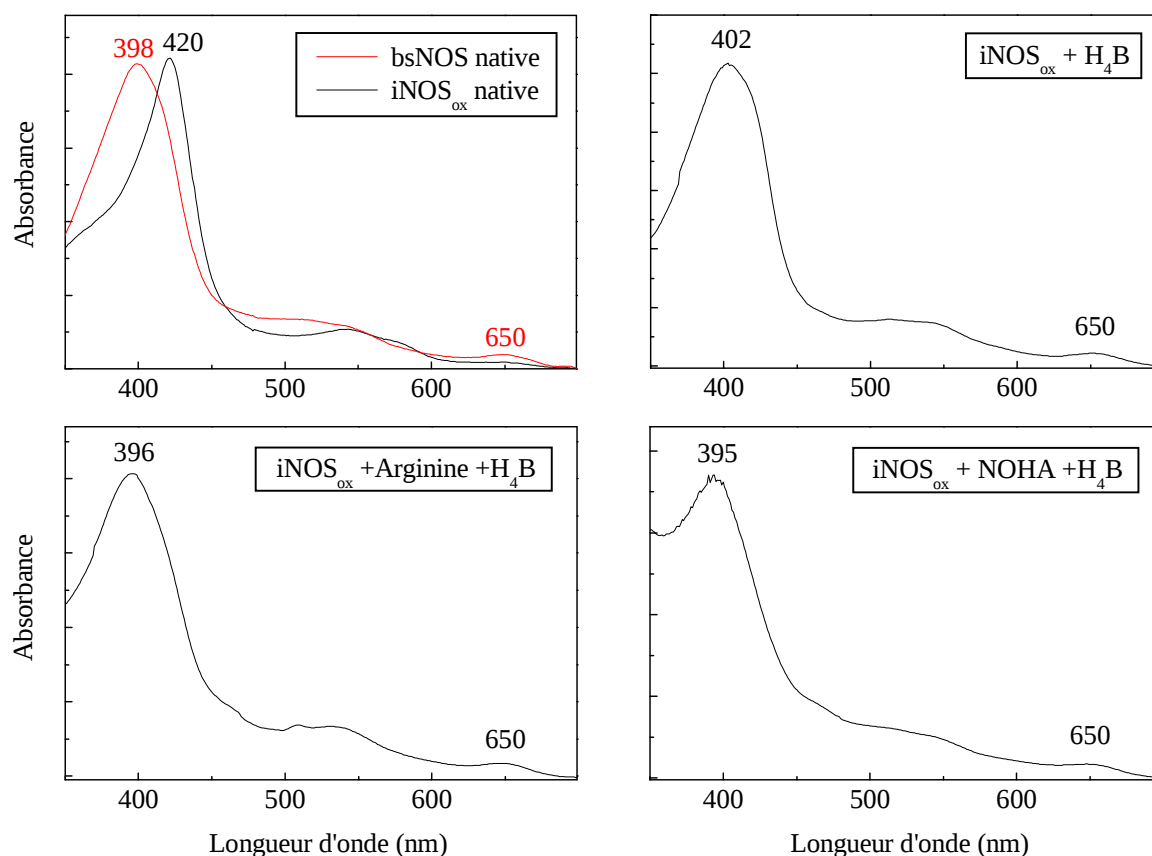


Figure II.6 : Spectres d'absorption UV-visible de 1) iNOS_{ox} et bsNOS natives en absence de substrat et de cofacteur, 2) iNOS_{ox} en présence de 100 μ M H₄B, 3) iNOS_{ox} en présence de 5mM de L-Arg et 100 μ M H₄B et 4) iNOS_{ox} en présence de 5mM NOHA et 100 μ M H₄B (KPi 100 mM, pH 7 ,4).

En présence de cofacteur et de substrat

L'équilibre entre les formes HS et BS est déplacé en présence de H₄B ou d'arginine qui favorisent la forme HS [109, 110]. En effet, la fixation de H₄B au voisinage du site actif se fait par l'établissement de plusieurs liaisons hydrogène à la fois avec des résidus du site actif et avec les propionates de l'hème (voir I.3.2.3), qui déplacent partiellement la molécule d'eau qui sert de sixième ligand au fer et rendent la structure du site actif et de l'enzyme plus rigide. Ce phénomène favorise également la dimérisation des monomères de NOS. L'ajout des substrats L-Arg ou NOHA renforce et complète le réseau de liaisons hydrogène au niveau du site actif, ce qui déplace complètement la molécule d'eau sixième ligand du fer.

Après ajout de H₄B en concentrations saturantes dans une solution de iNOS_{ox} native, le spectre d'absorption UV-visible montre un déplacement de la bande de Soret de 420 nm vers 400 nm et l'apparition à 650 nm de la bande de transfert de charge (Cys)S $\rightarrow$ Fe^{III} caractéristique des espèces Fe^{III} HS (figure II.6). Une fois le cofacteur H₄B fixé, l'ajout de L-Arg ou de NOHA accentue le déplacement de l'équilibre vers la forme 5-coordinée HS : on observe un déplacement de la bande de Soret de 400 nm vers 395 nm (figure II.6). On estime

qu'en présence à la fois de H_4B et de L-Arg ou de NOHA, la totalité de l'enzyme se présente sous forme 5-coordinée HS [192].

En présence d'autres composés

Les NOS peuvent fixer le dithiothréitol (DTT) qui forme un complexe Fe^{III} 6-coordiné BS caractérisé par un spectre d'absorption UV-visible présentant deux pics à 375 et 460 nm. Dans la plupart des expériences réalisées au laboratoire, les solutions de H_4B sont protégées de l'oxydation par la présence de 3 mM de DTT, sauf lorsque les propriétés redox du DTT sont incompatibles avec l'expérience.

En présence de H_4B , la citrulline produite au cours de l'oxydation de NOHA se fixe à l'hème et forme un complexe Fe^{III} 6-coordiné BS (figure II.7), mais ce complexe se dissocie très vite avec une constante de dissociation élevée [80].

En présence d'imidazole, les NOS forment un complexe Fe^{III} 6-coordiné BS caractérisé par un spectre d'absorption UV-visible présentant un pic à 428 nm (figure II.7).

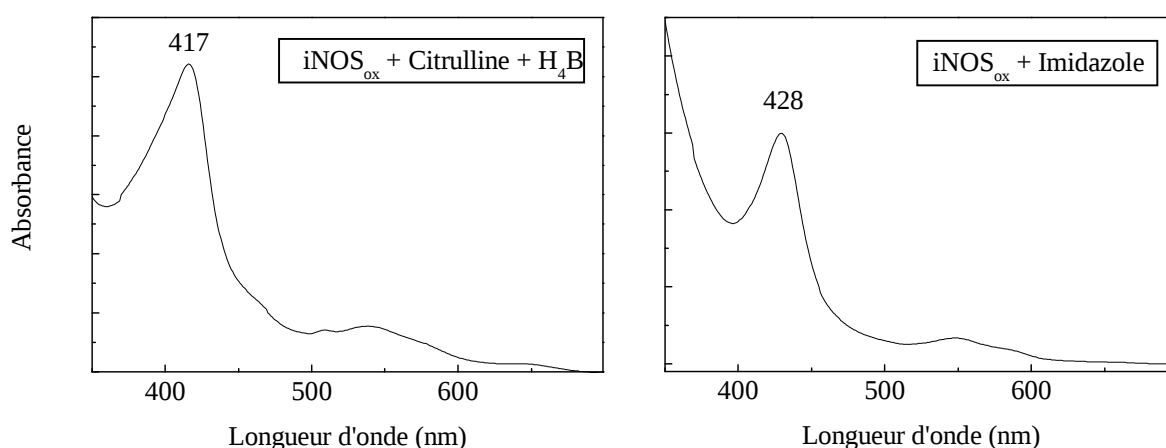


Figure II.7 : Spectres d'absorption UV-visible des espèces Fe^{III} obtenues après incubation de $iNOS_{ox}$ avec 1) 5 mM de L-Cit et 100 μM de H_4B , 2) 3 mM imidazole (KPi 100 mM, pH 7,4).

1.4.2. Les espèces Fe^{II} des NOS, détermination de la concentration en NOS

Le spectre d'absorption UV-visible du complexe Fe^{II} -CO des NOS est caractéristique des hémoprotéines de la famille des cytochromes P450 : le spectre présente en effet un maximum très intense autour de 450 nm correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du complexe. C'est d'ailleurs la position de ce maximum qui a donné leur nom aux cytochromes P450. Dans le

cas des NOS, le maximum d'absorption du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ se situe plutôt vers 445 nm (figure II.8) et le fort coefficient d'extinction associé à ce pic permet de l'utiliser pour mesurer la concentration en NOS de la solution.

L'enzyme native Fe^{III} 6-coordiné BS est incubée directement dans la cuve de mesure 30 minutes à 30 °C dans un tampon contenant le substrat L-Arg et le cofacteur H_4B (KPi 100 mM pH 7,4, L-Arg 10 mM, H_4B 100 μM et DTT 3 mM). La position du maximum d'absorption de la bande de Soret à 395 nm permet de vérifier que le substrat et le cofacteur sont bien fixés par l'enzyme (figure II.8).

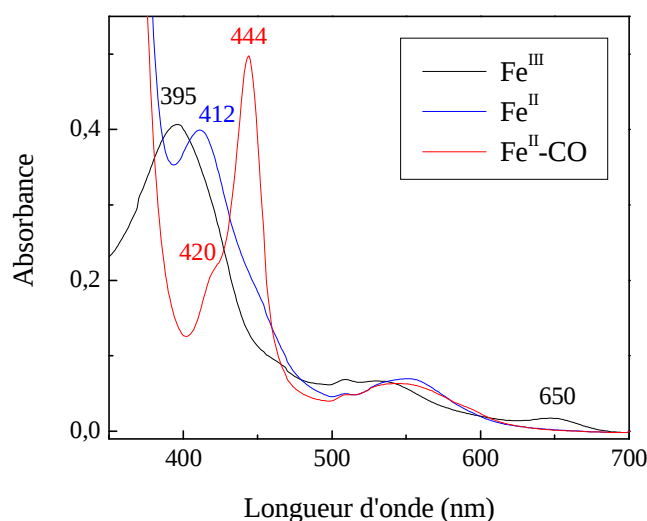


Figure II.8 : Spectres d'absorption UV-visible de solutions de iNOS_{ox} en présence de L-Arg et H_4B (Fe^{III}), après addition d'un excès de dithionite de sodium (Fe^{II}) et après addition de CO gaz ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$). La saturation de l'absorbance en-dessous de 390 nm est due à l'absorption du dithionite.

On ajoute un excès d'hydrosulfite de sodium solide (dithionite de sodium, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) dans la cuve de mesure en quartz, ce qui permet de réduire l'enzyme Fe^{III} en enzyme Fe^{II} . Le spectre d'absorption UV-visible montre un déplacement de la bande de Soret de 395 nm vers 412 nm (figure II.8). L'addition de CO gaz par bullage directement dans la cuve de mesure permet de former le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ caractérisé par un déplacement de la bande de Soret jusqu'à 444 nm (figure II.8). On observe également un épaulement dans la bande de Soret autour de 420 nm, l'absorbance de cet épaulement étant plus ou moins intense selon les préparations de NOS. Comme dans le cas des cytochromes P450, cet épaulement correspond à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ 5-coordiné lorsque la liaison entre le fer et la cystéine proximale a été rompue, il s'agit donc d'une proportion d'enzyme qui n'est plus fonctionnelle. La concentration en NOS fonctionnelle ayant conservé la liaison entre le fer et la cystéine proximale est calculée à partir de la valeur de l'absorbance à 444 nm ($\epsilon = 74\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Le rapport des absorptions à 444 et 420 nm varie de 1,5 à 4 en fonction de la qualité de la préparation protéique. Il semble que ce rapport soit intrinsèquement lié aux précautions prises lors des différentes étapes de la purification de iNOS_{ox}, en particulier au maintien permanent des solutions de protéines en dessous d'une température de 8 °C.

1.5. Caractérisation des espèces Fe^{III} des NOS par spectroscopie RPE

La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) permet la détection des espèces paramagnétiques, c'est-à-dire qui possèdent des électrons non appariés ou encore à spin non nul (Annexe 2).

Tous les spectres ont été enregistrés avec un spectromètre RPE Bruker Elexsys 500 équipé d'une cavité SHQ qui fonctionne en bande X (9,4 GHz) et muni d'un système de refroidissement à l'hélium liquide. Comme la plupart des spectromètres RPE, le spectromètre que nous avons utilisé est construit de manière à détecter les espèces à spin demi-entier.

La spectroscopie RPE est donc particulièrement indiquée pour l'observation des deux espèces Fe^{III} des NOS [193-197], la forme 6-coordinée bas spin (BS) étant de spin $S=1/2$ et la forme 5-coordinée haut spin (HS) étant de spin $S=5/2$ (Annexe 2). Les interactions entre le fer porteur des électrons non appariés et son environnement immédiat (hème et résidus du site actif) modulent les énergies des états électroniques du fer et contribuent aux paramètres du signal RPE mesuré. L'analyse du signal RPE permet donc d'obtenir des informations sur la géométrie de coordination du fer, la nature des ligands, son état de spin et son degré d'oxydation.

L'écart énergétique entre les différents états de spin des formes HS étant très faible, la mesure du signal des formes HS n'est possible que si on place l'échantillon à très basse température (10 K) ce qui permet de peupler complètement l'état fondamental. En revanche, l'écart énergétique entre les différents états de spin des formes BS est beaucoup plus grand, ce qui permet d'observer le signal associé à des températures plus élevées : au-delà de 25 K, seul le signal des formes BS est visible (Annexe 2).

L'échantillon (environ 80 µL) est préparé dans du tampon (HEPES 50 mM pH=7,4, glycérol 10 %, NaCl 100 mM) contenant éventuellement des cofacteurs et d'autres composés, puis congelé dans l'azote liquide. La concentration finale en protéine doit être au moins de 50 µM

pour obtenir un rapport signal/bruit suffisant. Le spectre RPE de l'échantillon est enregistré à $10\text{ K} \pm 2\text{ K}$ pour l'observation des espèces haut spin et à $35\text{ K} \pm 5\text{ K}$ pour l'observation des espèces bas spin (puissance 20,1 mW, fréquence 9,35 GHz, modulation : amplitude 5 G et fréquence 100 kHz).

2. Obtention et caractérisation des analogues de L-Arg

2.1. Synthèse des analogues de L-Arg

Le dioxane et l'éther diéthylique anhydres sont préalablement distillés sous atmosphère inerte en présence d'un mélange de sodium et de benzophénone. Les réactions chimiques sont suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques pré-enduites d'un gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur (Merck 60F254) et révélées sous une lampe UV ou grâce au test à la ninhydrine (bain de ninhydrine 1 % dans l'éthanol, puis chauffage).

Les points de fusion sont déterminés grâce à un banc Kofler. Les spectres de RMN du proton sont enregistrés avec un spectromètre Bruker ARX 250 MHz, les déplacements chimiques sont indiqués en parties par millions (ppm) et utilisent le tétraméthylsilane comme référence (s : singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet).

Les méthodes de synthèse des guanidines et hydroxyguanidines réalisées au laboratoire ont été mises au point par Sylvie Dijol [179, 181, 183, 184, 198, 199].

2.1.1. Principe de synthèse des guanidines

La synthèse du motif guanidine repose sur la substitution d'un agent de guanylation électrophile par une amine primaire ou secondaire nucléophile. Les agents de guanylation les plus couramment utilisés possèdent un motif guanidine dont une des branches est substituée par un groupe électro-attracteur (bon groupe partant et capable de stabiliser une charge négative). Pour une meilleure réactivité de l'agent de guanylation, le caractère électrophile du carbone central peut être renforcé par conjugaison avec des groupes électro-attracteurs comme le groupe tertibutyl-oxy-carbonyl (Boc) comme substituant des hydrogènes latéraux.

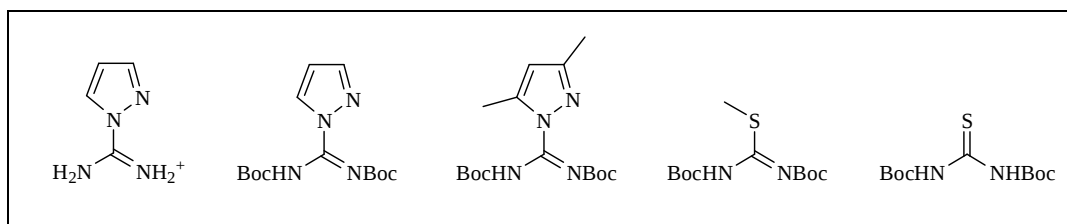


Figure II.9 : Différents agents de guanylation utilisés dans la synthèse des guanidines.

2.1.1.1. À partir d'amines réactives

Les amines primaires de type alkylamines sont suffisamment nucléophiles pour pouvoir réagir directement avec le chlorhydrate de pyrazole-1-carboxamidine [179, 198].

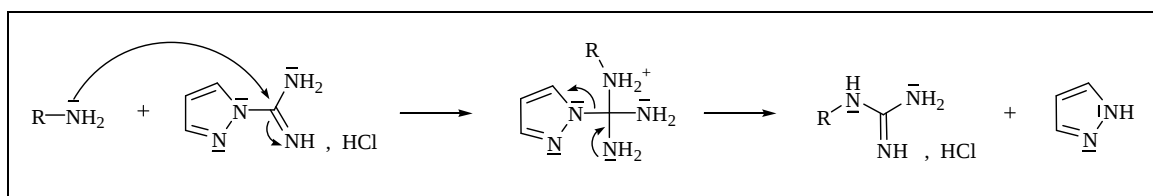


Figure II.10 : Synthèse d'une guanidine à partir d'une amine nucléophile.

L'amine primaire (3,0 mmol) et le chlorhydrate de pyrazole-1-carboxamidine (3,0 mmol) sont dissous dans 2 mL de N,N-diméthylformamide (DMF) anhydre sous atmosphère inerte (argon ou azote). On ajoute également de la diisopropyléthylamine (DIEA, 3,0 mmol). Le mélange est maintenu sous agitation et sous atmosphère inerte à température ambiante. Le déroulement de la réaction est suivi par CCM (méthanol 5 %, acétate d'éthyle 95 %). Lorsque la réaction est terminée, c'est-à-dire au bout de 1 à 4 heures, on ajoute environ 1 à 2 mL d'éther diéthylique anhydre ce qui entraîne la précipitation du produit brut de la réaction. Le produit brut est lavé avec environ 5 mL d'éther diéthylique anhydre, puis purifié sur colonne de gel de silice (gradient d'élution de 0 à 20 % de méthanol dans l'acétate d'éthyle). Cette étape de séparation doit être réalisée avec beaucoup de soin car le pyrazole-1-carboxamidine est un excellent inhibiteur de NOS [200]. L'évaporation du solvant des fractions sélectionnées conduit à la formation d'une poudre blanche, dont l'analyse montre qu'il s'agit du dérivé guanidine recherché [179].

Acide 5-guanidino-pentanoïque (HOOC-(CH₂)₄-Gua) : Rendement 68%. ¹H RMN (DMSO-d₆) : 11.78 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.17 (s, 4H), 3.39 (m, 2H), 3.07 (m, 2H), 1.45 (m, 4H).

n-Pentyl-guanidine (Pentyl-Gua) : Rendement 87 %. ^1H RMN (DMSO- d_6) : 7.70 (s, 1H), 7.16 (s, 4H), 3.07 (m, 2H), 1.37 (m, 2H), 1.24 (m, 4H), 0.89 (t, 3H).

Cyclopropyl-guanidine (Cyclopropyl-Gua) : Rendement 72 %. ^1H RMN (DMSO- d_6) : 7.72 (s, 1H), 7.15 (s, 4H), 2.54 (m, 1H), 0.43 (m, 2H), 0.21 (m, 2H).

2.1.1.2. À partir d'amines faiblement réactives

Les arylamines ne sont pas suffisamment nucléophiles pour réagir directement avec le chlorhydrate de pyrazole-1-carboxamidine, c'est pourquoi nous avons utilisé le N,N'-bis(tert-butyloxycarbonyl)pyrazole-1-carboxamidine qui est un agent de guanylation plus électrophile et donc plus réactif [179, 199]. La synthèse des dérivés guanidine demande dans ce cas plusieurs étapes successives.

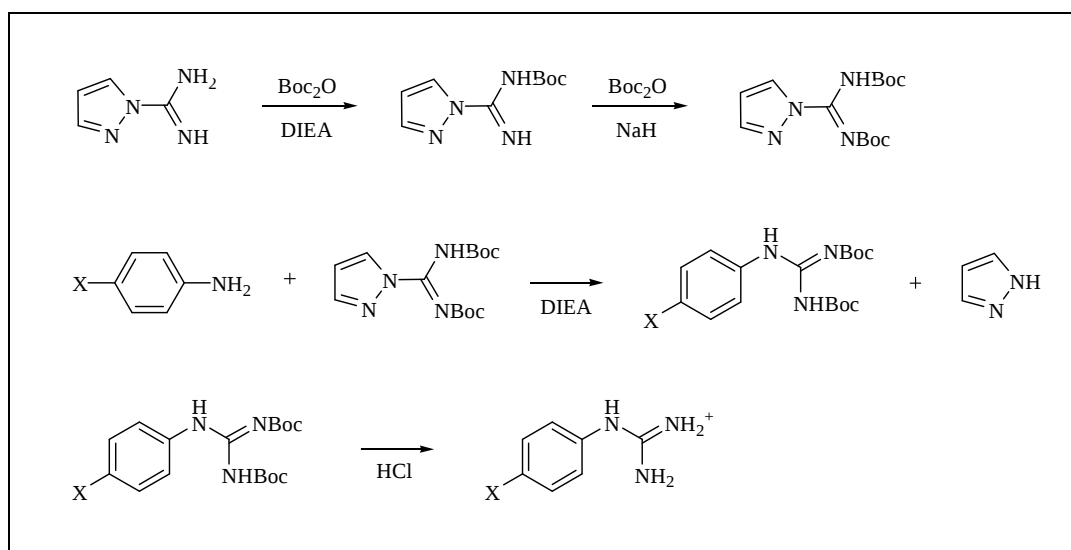


Figure II.11 : Synthèse d'une guanidine à partir d'une amine faiblement nucléophile.

Synthèse de l'agent de guanylation : N,N'-di(Boc)pyrazole-1-carboxamidine

Le chlorhydrate de pyrazole-1-carboxamidine (6,0 mmol) et le di-tertobutyl-pyrocarbonate (Boc_2O , 6,0 mmol) sont dissous dans 5 mL de CH_2Cl_2 et 5 mL de DMF séché sur tamis. On ajoute également du DIEA (6,0 mmol). Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 2 heures, et le déroulement de la réaction est suivi par CCM (acétate d'éthyle 40 %, cyclohexane 60 %). On évapore ensuite le solvant et on redissout l'huile orange obtenue dans un peu de CH_2Cl_2 . Le produit brut est purifié sur colonne de gel de silice (gradient d'élution de 10 à 30 % d'acétate d'éthyle dans le cyclohexane). L'évaporation du

solvant des fractions sélectionnées conduit à la formation d'un solide blanc, dont l'analyse montre qu'il s'agit du dérivé mono-substitué du pyrazole-1-carboxamidine.

Le dérivé mono-substitué obtenu est dissous dans 10 mL de THF anhydre, puis additionné à une suspension de NaH (20 mmol) dans le THF anhydre sous atmosphère inerte à 0 °C. Le mélange est maintenu sous agitation sous atmosphère inerte dans un bain de glace pendant 30 minutes. On ajoute ensuite du Boc₂O en excès (10 mmol) et on laisse le mélange revenir à température ambiante sous agitation pendant 2 heures. Le mélange est ensuite chauffé à reflux à 65 °C pendant 2 heures. Après refroidissement de la solution, on ajoute 10 mL d'une solution saturée de NaHCO₃, et on extrait la phase aqueuse avec 3 fois 20 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit brut est purifié sur colonne de gel de silice (gradient d'élution de 30 à 40 % d'acétate d'éthyle dans le cyclohexane). L'évaporation du solvant des fractions sélectionnées conduit à la formation d'une huile transparente qui cristallise au bout de plusieurs heures, dont l'analyse montre qu'il s'agit du dérivé di-substitué du pyrazole-1-carboxamidine.

Réaction de guanylation et hydrolyse

L'amine (1,0 mmol) et le N,N'-di(Boc)pyrazole-1-carboxamidine (1,0 mmol) sont dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂ anhydre sous atmosphère inerte (argon ou azote). Le mélange est maintenu sous agitation et sous atmosphère inerte à température ambiante, et le déroulement de la réaction est suivi par CCM (acétate d'éthyle 40 %, cyclohexane 60 %). Lorsque la réaction est terminée, c'est-à-dire au bout de 2 à 48 heures, le milieu réactionnel est concentré puis purifié directement sur colonne de gel de silice (gradient d'élution de 0 à 50 % d'acétate d'éthyle dans le cyclohexane). L'évaporation du solvant des fractions sélectionnées conduit à la formation d'une poudre blanche, dont l'analyse montre qu'il s'agit du dérivé N,N'-di(Boc)guanidine recherché.

Le dérivé di-substitué est dissous dans 5 mL de méthanol auxquels on additionne 5 mL de HCl 10 M. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes, puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est redissous dans 1 mL d'eau puis lyophilisé, ce qui conduit à la formation d'une poudre blanche, dont l'analyse montre qu'il s'agit du chlorhydrate de la guanidine attendue [179].

Phényl-guanidine (Ph-Gua) : Rendement 54%. ¹H RMN (DMSO-d₆) : 9.88 (s, 1H), 7.51 (s, 4H), 7.45 (m, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.28 (m, 2H).

4-Méthoxyphényl-guanidine (CH₃OPh-Gua) : Rendement 71%. Point de fusion : 143-144 °C. ¹H RMN (DMSO-d₆) : 9.62 (s, 1H), 7.31 (s, 4H), 7.15 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 3.76 (s, 3H).

4-Fluorophényl-guanidine (FPh-Gua) : Rendement 60%. Point de fusion : 130-131 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) : 9.93 (s, 1H), 7.48 (s, 4H), 7.26 (m, 4H).

4-Chlorophényl-guanidine (ClPh-Gua) : Rendement 68%. Point de fusion : 167-168 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) : 10.00 (s, 1H), 7.53 (s, 4H), 7.48 (d, 2H), 7.25 (d, 2H).

4-Trifluorométhylphényl-guanidine ($\text{CF}_3\text{Ph-Gua}$) : Rendement 58 %. ^1H RMN (DMSO- d_6) : 9.73 (s, 1H), 7.43 (m, 4H), 7.23 (m, 4H).

4-Nitrophényl-guanidine ($\text{NO}_2\text{Ph-Gua}$) : Rendement 47 %. ^1H RMN (DMSO- d_6) : 10.14 (s, 1H), 7.63 (m, 4H), 7.36 (m, 4H).

2.1.2. Cas des guanidines fluorées

La plupart des amines primaires fluorées ne sont pas disponibles commercialement. Une étape supplémentaire de préparation de l'amine est donc nécessaire dans le cas de la synthèse de guanidines possédant une chaîne latérale fluorée. Le dérivé bromé correspondant subit deux substitutions nucléophiles successives, la première sert à remplacer le brome par un meilleur groupe partant (le phthalimide), et la deuxième à former le groupe amine sur le carbone activé.

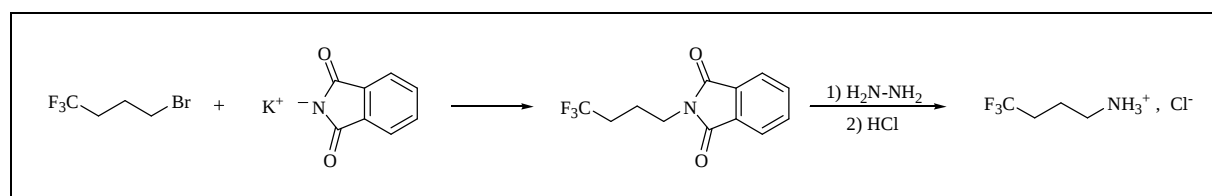


Figure II.12 : Étapes de préparation d'une amine fluorée à partir du dérivé bromé correspondant.

Le dérivé bromé (1,3 mmol) est mélangé à du phthalimide de potassium (1,8 mmol) dans 15 mL de DMF anhydre sous atmosphère inerte. Le mélange est laissé sous agitation et sous atmosphère inerte à température ambiante pendant 24 heures. Le DMF est ensuite évaporé et le résidu est redissous dans du dichlorométhane, puis purifié par chromatographie sur silice avec le dichlorométhane comme éluant.

Le dérivé phthalimide obtenu (1,2 mmol) est dissous dans 2,5 mL de tétrahydrofurane (THF) auxquels on ajoute une solution d'hydrazine (7,8 mmol) dans 1,5 mL d'éthanol. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 15 heures, puis hydrolysé par addition de 30 mL d'acide chlorhydrique 1 M. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec

environ 30 mL d'acide chlorhydrique 1 M. L'amine recherchée se trouve sous forme protonée dans la phase aqueuse. On ajoute de la soude dans la phase aqueuse jusqu'à obtenir un pH de 10, et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. L'amine se trouve maintenant sous forme basique dans la phase organique, qui est séchée sur Na_2CO_3 et filtrée. On ajoute une solution de HCl gazeux dans l'éther diéthylique à la phase organique, qui est ensuite évaporée ce qui conduit à la formation d'une huile incolore dont l'analyse montre qu'il s'agit de l'amine recherchée sous forme de chlorhydrate.

L'amine obtenue peut ensuite être mélangée avec un agent de guanylation, ce qui permet d'obtenir le dérivé guanidine recherché [179].

4,4,4-Trifluorobutyl-guanidine ($\text{CF}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-Gua}$) : Rendement 29 %. ^1H RMN (DMSO-d_6) : 7.86 (s, 1H), 7.22 (s, 4H), 3.17 (m, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.67 (m, 2H).

4,4-Difluorobutyl-guanidine ($\text{CH}_2\text{F-(CH}_2\text{)}_3\text{-Gua}$) : Rendement 25 %. ^1H RMN (DMSO-d_6) : 7.79 (s, 1H), 7.19 (s, 4H), 4.43 (m, 2H), 3.28 (m, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.45 (m, 2H).

2.1.3. Cas de l'agmatine

L'agmatine, ou 4-aminobutyl-guanidine ($\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{)}_4\text{-Gua}$), est disponible commercialement sous la forme de sulfate. Cependant, l'agmatine commerciale peut contenir de faibles quantités d'arginine. Afin d'éviter que la présence d'arginine dans les échantillons d'agmatine ne perturbe les études réalisées en présence de NOS, une méthode de préparation de l'agmatine a été mise au point au laboratoire.

Une solution diluée de Boc_2O dans du dioxane anhydre (10 mmol dans 30 mL) est additionnée goutte à goutte à 0 °C à une solution de 1,4-diaminobutane en excès (75 mmol) dans 30 mL de dioxane anhydre. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. On évapore ensuite le dioxane et le résidu est repris dans 70 mL d'eau. On élimine le précipité par filtration et le filtrat est extrait avec 3 fois 20 mL de CH_2Cl_2 , la phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée. Le produit brut obtenu est purifié directement sur colonne de gel de silice (80 % CH_2Cl_2 , 15 % CH_3OH , 5 % NH_4OH). L'évaporation du solvant des fractions sélectionnées conduit à la formation d'une huile incolore, dont l'analyse montre qu'il s'agit du 1-amino-4-Boc-aminobutane.

L'amine obtenue est ensuite guanylée suivant le protocole utilisé pour les amines peu réactives avec le N,N'-di(Boc)pyrazole-1-carboxamide comme agent de guanylation, puis

hydrolysée en milieu acide, ce qui conduit à la formation d'un solide blanc dont l'analyse montre qu'il s'agit bien de l'agmatine sous forme de chlorhydrate.

4-Aminobutyl-guanidine ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4\text{-Gua}$) : Rendement 70%. Point de fusion : 174 °C. ^1H RMN (DMSO-d_6) : 8.20 (m, 4H), 7.25 (m, 4H), 3.12 (m, 2H), 2.75 (t, 2H), 1.55 (m, 4H).

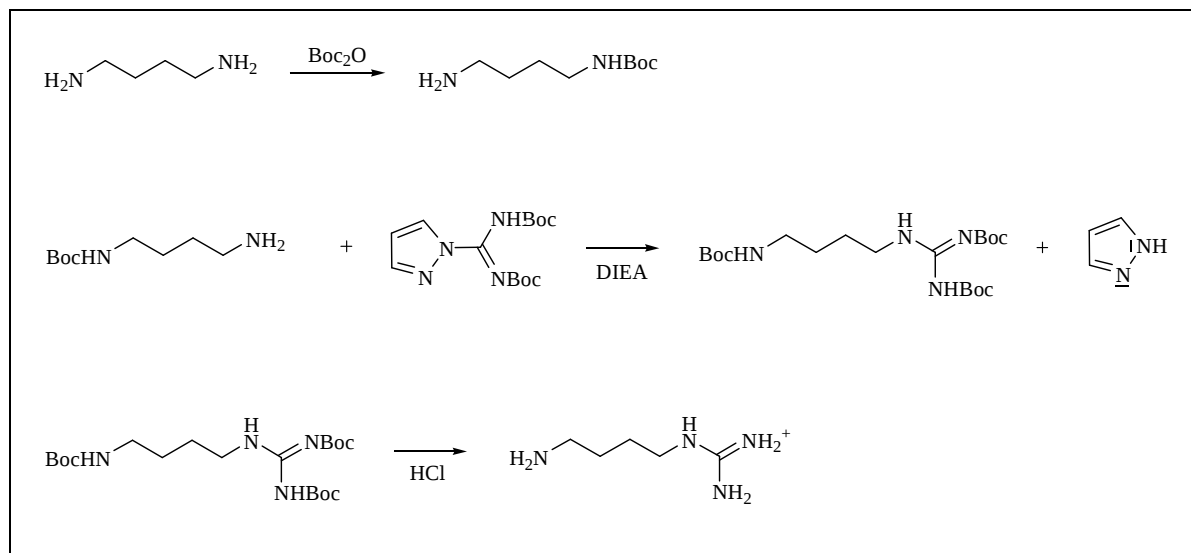


Figure II.13 : Méthode de synthèse de l'agmatine.

2.2. Détermination du pKa des analogues de L-Arg

2.2.1. Principe : point de demi-équivalence et pKa

Le pKa d'un acide faible peut être déterminé grâce au titrage de la forme acide par une base forte. En effet, pour un couple faible (AH^+ / A), le pH est donné par :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}]}{[\text{AH}^+]}$$

Au cours du titrage, au point de demi-équivalence les concentrations en espèce acide et en espèce basique sont égales, donc le pH mesuré en ce point est égal au pKa du couple. La principale difficulté consiste à déterminer le point de demi-équivalence avec une précision suffisante.

Pour les acides faibles dont le pKa est compris entre 2 et 7 environ, l'observation directe de la courbe de titrage permet de déterminer le point d'équivalence avec une bonne précision

grâce à la présence d'un saut de pH très net autour du point d'équivalence. En revanche pour les acides faibles dont le pKa est supérieur à 7 le saut de pH est peu marqué et pratiquement invisible pour les pKa les plus élevés. La mesure de la conductivité de la solution au cours du titrage permet alors de déterminer le point d'équivalence avec une bonne précision.

2.2.2. Conductivité d'une solution aqueuse

Principe

Les ions présents dans une solution aqueuse sont capables de se déplacer sous l'effet d'un champ électrique, ce phénomène est responsable de la conductance de la solution. La mobilité d'un ion dépend de son état de solvation, de sa charge, de la viscosité de la solution et donc de la température.

Dans l'approximation des solutions faiblement concentrées, la conductivité associée à chaque ion est proportionnelle à sa concentration dans la solution. La conductivité spécifique totale κ de la solution dépend donc de la nature des ions présents en solution (représentée par le coefficient de conductivité molaire λ_i propre à chaque ion), de leur charge z_i et de leur concentration c_i .

Conductivité spécifique : $\kappa = \sum (\lambda_i \times z_i \times c_i)$

Titrage d'un acide

Au cours du titrage d'un acide (AH^+) par une base forte (NaOH), on observe deux phases distinctes, avant et après le point d'équivalence. On suppose que le volume v de soude ajoutée est négligeable devant le volume initial de la solution, c'est-à-dire que le volume total V de la solution ne varie pas au cours du titrage.

Entre le début du titrage et le point d'équivalence, les ions HO^- ajoutés réagissent immédiatement avec les ions AH^+ pour former les molécules non chargées A et H_2O , les ions Na^+ ajoutés ne réagissent pas et s'accumulent dans la solution. La conductivité totale de la solution évolue donc linéairement en fonction du volume v de soude ajoutée et la pente de la droite obtenue est proportionnelle à $\lambda(Na^+) - \lambda(AH^+)$. Après le point d'équivalence, les ions HO^- et les ions Na^+ ajoutés ne réagissent pas et s'accumulent dans la solution. La conductivité totale de la solution évolue donc linéairement en fonction du volume v de soude ajoutée et la pente de la droite obtenue est proportionnelle à $\lambda(Na^+) + \lambda(HO^-)$.

Le point d'équivalence du titrage est donc déterminé par l'intersection des droites correspondant à chacune des deux phases du titrage (figure II.14).

2.2.3. Mesure du pKa des aryl-guanidines

Le pKa de chaque aryl-guanidine a été déterminé grâce au suivi du pH et de la conductivité lors du titrage d'une solution d'aryl-guanidine (environ 15 mM dans 10 mL d'eau pure) par de la soude 1 M. Le bécher contenant la solution est placé dans un bain d'eau maintenu à température ambiante afin de limiter les variations de température au cours du titrage. Le point d'équivalence est attendu pour un volume de soude ajoutée d'environ 150 μ L, on peut donc négliger l'augmentation du volume total de la solution au cours du titrage.

Détermination du point de début du titrage

Les aryl-guanidines que nous avons synthétisées se présentent sous la forme de chlorhydrate de guanidinium. La dernière étape du protocole de synthèse étant une étape d'hydrolyse en présence de HCl, il est possible que le solide obtenu présente un certain nombre de molécules d'HCl co-cristallisées. En effet, si on réalise le titrage d'une solution d'aryl-guanidine préparée sans précaution particulière, on observe au début du titrage une augmentation du pH et une diminution rapide de la conductivité caractéristiques du titrage d'un acide fort par une base forte.

Afin de déterminer avec précision, le point de début réel du titrage du guanidinium par la soude, nous avons ajouté dans la solution environ 50 μ L de HCl 1M, soit environ 5 mM final. De cette manière, la zone de titrage de l'acide fort est suffisamment grande pour que le point de fin du titrage de l'acide fort, correspondant au point de début du titrage du guanidinium, soit déterminé avec précision (figure II.14).

Détermination du pKa

Le titrage du mélange d'acide fort et de guanidinium par la soude présente maintenant 3 zones distinctes (figure II.14) : une première zone de titrage d'acide fort par une base forte, une deuxième zone de titrage d'acide faible par une base forte, et une troisième zone d'addition de base forte dans une solution inerte. La courbe représentant la variation de la conductivité de la solution au cours du titrage peut donc être décrite par 3 droites : l'intersection des deux premières droites indique le point de début du titrage du guanidinium

(V_0), l'intersection de la deuxième et de la troisième droite indique le point d'équivalence du titrage du guanidinium (V_{eq}).

La position précise de ces deux points permet de déterminer le point de demi-équivalence ($V_{1/2 eq}$). La valeur du pH en ce point du titrage indique directement la valeur du pKa du guanidinium présent dans la solution.

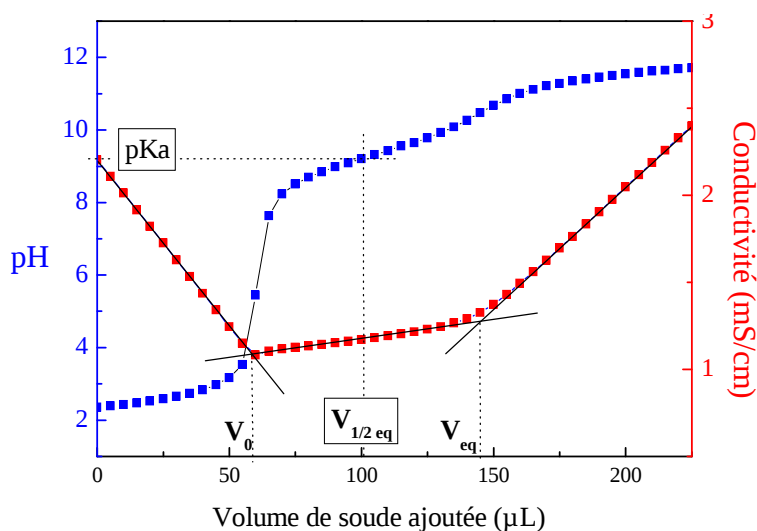


Figure II.14 : Titrage d'un mélange de HCl et de $\text{NO}_2\text{Ph-GuaH}^+$ par NaOH, suivi par pH-métrie et par conductimétrie.

Les aryl-guanidines Ph-Gua et $\text{NO}_2\text{Ph-Gua}$ ont déjà été étudiées et leur pKa a été décrit à 10,77 pour Ph-Gua [201] et 9,13 pour $\text{NO}_2\text{Ph-Gua}$ [202]. Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans la table II.1 et sont en bon accord avec les valeurs décrites.

L'erreur sur les valeurs de pKa que nous avons mesurées est estimée à environ $\pm 0,1$ unité.

2.2.4. Estimation du pKa des alkylguanidines par corrélation de Hammett

Erreur alcaline

Les électrodes de verre utilisées dans la mesure du pH des solutions aqueuses fonctionnent sur le principe d'échange des ions Na^+ ou Li^+ de la surface solide de l'électrode par les ions H^+ présents dans la solution. Cet échange local provoque une différence de potentiel entre la paroi interne et la paroi externe de l'électrode qui dépend de la concentration en ions H^+ dans la solution, ce qui permet de déterminer le pH.

Cependant, lorsque la concentration en ions H^+ dans la solution devient très faible (de l'ordre de 10^{-12} à $10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$) et en présence de grandes concentrations en ions Li^+ , Na^+ ou K^+ dans

la solution, les contributions des ions alcalins dans le potentiel mesuré par l'électrode ne sont plus négligeables et la mesure du pH n'est plus possible. L'erreur alcaline des électrodes de verre rend donc impossible la mesure directe d'un pH supérieur à 12 environ.

En raison de cette propriété des électrodes de verre, il n'est pas possible de mesurer le pKa d'un acide faible par titrage direct si ce pKa est supérieur à 11,5.

Corrélation de Hammett

Une corrélation de Hammett désigne toute relation linéaire entre des constantes thermodynamiques ou cinétiques d'une série de composés et les paramètres électroniques correspondants.

Différentes corrélations de Hammett ont été décrites concernant le pKa de plusieurs familles de guanidines mono ou poly-substituées [201, 203]. Afin d'affiner ces résultats et de les rendre utilisables dans le cadre de l'étude des analogues de L-Arg, nous avons réalisé une corrélation de Hammett entre le pKa mesuré pour les aryl-guanidines et les paramètres électroniques de champ σ_I des substituants du motif guanidine [204]. Nous avons également intégré à cette corrélation la valeur de référence du pKa de L-Arg [205].

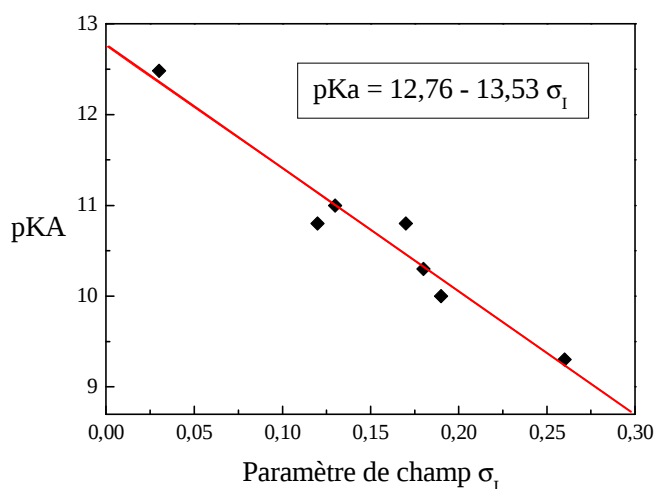


Figure II.15 : Corrélation de Hammett entre le pKa des aryl-guanidines et de l'arginine et le paramètre électronique de champ σ_I .

La figure II.15 représentant le pKa des aryl-guanidines et de l'arginine en fonction du paramètre de champ σ_I montre qu'on obtient une relation linéaire :

$$\text{pKa} = 12,76 (\pm 0,23) - 13,53 (\pm 1,36) \times \sigma_I, \quad R^2 = 0,95.$$

Nous avons ensuite utilisé les paramètres obtenus grâce à cette corrélation pour estimer par extrapolation le pKa des alkyl-guanidines. Les résultats obtenus sont résumés dans la table II.1. L'erreur sur ces valeurs de pKa est évaluée à environ $\pm 0,5$ unité.

Guanidine	σ_1 [204]	pK _a mesuré	pK _a calculé
Arginine	0.03	12.48 [205]	
pentyl-Gua	0.01		12,6
CH ₂ F-(CH ₂) ₃ -Gua	0.05		12,1
CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua	0.07		11,8
cyclopropyl-Gua	0.07		11,8
Ph-Gua	0.12	10.8	
CH ₃ OPh-Gua	0.13	11.0	
FPh-Gua	0.17	10.8	
ClPh-Gua	0.18	10.3	
CF ₃ Ph-Gua	0.19	10.0	
NO ₂ Ph-Gua	0.26	9.3	

Table II.1 : Valeurs des paramètres électroniques de champ σ_1 et des pK_a des analogues de L-Arg.

3. Mesures biophysiques

3.1. Détermination des constantes d'affinité de NOS pour les analogues de L-Arg

La constante d'affinité de NOS pour divers composés peut être déterminée par spectroscopie UV-visible différentielle [110]. À l'état natif, l'hème des NOS est au degré d'oxydation Fe^{III} et présente un équilibre entre la forme 5-coordinée HS dont le pic d'absorption dans l'UV-visible se situe vers 395 nm et la forme 6-coordinée BS dont le pic d'absorption se situe à 420 nm (voir II.1.4.1). L'équilibre entre les formes HS et BS est déplacé en présence de H₄B ou d'arginine qui favorisent la forme HS, ce qui se traduit par un déplacement du pic de Soret vers 395 nm. La plupart des guanidines analogues de L-Arg provoquent également un déplacement de l'équilibre en faveur de la forme HS. Cependant, le spectre d'absorption du mélange des formes HS et BS et le spectre de la forme HS seule ne sont pas suffisamment distincts pour permettre de déterminer avec précision quelle proportion d'enzyme a fixé le composé.

Mesure de la constante d'affinité de l'imidazole

L'imidazole (ImH) est un ligand d'hème connu pour être un inhibiteur des NOS. En présence d'imidazole, le spectre d'absorption UV-visible d'une solution de NOS présente une bande

d'absorption à 430 nm caractéristique d'une espèce 6-coordinée BS (voir II.1.4.1). L'intensité de cette bande d'absorption reflète la proportion d'enzyme complexée par l'imidazole.

La cuve de référence et la cuve de mesure du spectromètre UV-visible sont remplies avec chacune 150 μ L d'une solution tampon (HEPES 50 mM pH=7,4) contenant 1 μ M de NOS. On ajoute des quantités croissantes d'une solution d'imidazole dans la cuve de mesure et le même volume de tampon dans la cuve de référence, de manière à ce que le facteur de dilution soit le même dans les deux cuves. On mesure la différence d'absorbance entre le pic qui apparaît à 430 nm et celui qui disparaît vers 400 nm, ce qui permet de déterminer $K_s(\text{ImH})$ en utilisant un modèle hyperbolique de type Michaelis (Annexe 1).

Mesure des constantes d'affinité des analogues de L-Arg

La cuve de référence et la cuve de mesure sont maintenant remplies avec chacune 150 μ L d'une solution tampon (HEPES 50 mM pH=7,4) contenant 1 μ M de NOS et une concentration d'imidazole égale à 5 fois la constante $K_s(\text{ImH})$. L'enzyme est donc saturée en imidazole. On ajoute dans la cuve de mesure des quantités croissantes du composé dont on veut mesurer l'affinité et le même volume de tampon dans la cuve de référence. On observe la disparition du pic d'absorption à 430 nm et l'apparition d'un pic vers 390 à 395 nm, ce qui indique que le composé ajouté déplace l'équilibre de complexation de l'imidazole en se fixant au niveau du site actif. Cette fois, le spectre de la forme BS en présence d'imidazole et le spectre de la forme HS en présence du composé testé sont suffisamment différents pour que la proportion d'enzyme qui a fixé le composé soit déterminée avec précision. On peut alors calculer la constante d'affinité de l'enzyme pour le composé testé en utilisant un modèle de compétition sur un site d'occupation unique de type Michaelis (Annexe 1).

3.2. Étude de iNOS_{ox} par spectroscopie Raman de résonance

Les expériences de spectroscopie Raman de résonance ont été réalisées en collaboration avec le Dr Jérôme Santolini au Laboratoire de Stress Oxydant et Détoxication de l'iBiTec-S au CEA de Saclay.

La spectroscopie Raman de résonance (RR) est une technique de spectroscopie qui permet de détecter les modes propres de vibration d'une molécule par excitation des états électroniques de cette molécule (Annexe 2). Cette technique est très utilisée pour obtenir des informations

détaillées sur la structure des complexes métalliques dans les systèmes biologiques, comme la nature chimique des ligands du métal, la force de la liaison, les conformations et les configurations des ligands ou le type et l'intensité des interactions du métal avec son environnement (interactions électrostatiques, liaisons hydrogène) [206-208]. La spectroscopie RR est en particulier largement utilisée dans l'étude des hémoprotéines car les transitions électroniques sont bien caractérisées pour cette famille de protéines.

Préparation des échantillons de iNOS_{ox} Fe^{III}

Afin d'éliminer toute trace d'imidazole résiduel dans la solution d'enzyme, l'échantillon de iNOS_{ox} utilisé subit trois cycles de lavage : dilution dans le tampon final, concentration en Ultrafree-0.5, Biomax-30 (Millipore Corporation, USA) à 5 000 tr.min⁻¹ pendant 30 minutes à 4 °C. Ces étapes de lavage permettent également de conditionner l'enzyme dans le tampon final (KPi 100 mM, H₄B 400 µM, DTT 3 mM) au pH souhaité (pH=7,4 sauf indication contraire) et contenant selon l'expérience un analogue de L-Arg (20 mM).

L'échantillon est concentré jusqu'à un volume final de 50 à 60 µL et transféré dans un tube de quartz. Le tube est scellé grâce à un bouchon souple en caoutchouc puis subit 20 cycles de dégazage : mise sous vide et re-pressurisation sous atmosphère d'argon. Cette étape permet d'éliminer le dioxygène dissous dans la solution afin d'éviter les phénomènes d'oxydation et de dégradation de l'échantillon au cours de l'expérience.

Le tube de quartz contenant la solution de NOS est ensuite directement introduit dans le porte-échantillon du spectromètre Raman.

La concentration finale en NOS dans l'échantillon (environ 150 µM) a été optimisée par l'enregistrement d'une série de spectres RR avec différentes concentrations en NOS. En effet, si la NOS n'est pas assez concentrée, le signal Raman est trop faible, mais si la NOS est trop concentrée, le signal est réabsorbé par la protéine avant de sortir de l'échantillon.

Préparation des échantillons de iNOS_{ox} Fe^{II}-CO

Les premières étapes de préparation de l'échantillon Fe^{II}-CO sont les mêmes que pour l'échantillon Fe^{III} : 3 cycles de lavage, concentration et dégazage.

Une fois l'échantillon conditionné sous atmosphère d'argon, on ajoute 5 µL d'une solution concentrée et dégazée de dithionite de sodium (5mM final) directement dans le tube de quartz au moyen d'une seringue Hamilton© étanche aux gaz. La solution de NOS Fe^{III} de couleur brun-rouge devient rouge, ce qui indique que la NOS est maintenant au degré d'oxydation Fe^{II}. On fait ensuite circuler un courant de CO gazeux dans le tube à la surface de

l'échantillon pendant 10 minutes. La solution de NOS prend une couleur rouge vif caractéristique du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$.

Le tube de quartz contenant l'échantillon conditionné sous atmosphère de CO est ensuite introduit dans le porte-échantillon du spectromètre Raman.

Matériel utilisé

La longueur d'onde d'excitation est choisie en fonction du spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon (Annexe 2). Les échantillons Fe^{III} sont excités par un faisceau incident à 363,8 nm obtenu avec un laser à Argon ionisé (Coherent Innova 90) ce qui permet d'observer à la fois les vibrations caractéristiques de l'hème (absorption électronique vers 395 nm) et la vibration Fe-S (absorption électronique vers 340 nm). Les échantillons $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ dont le pic d'absorption UV-visible se situe à 445 nm sont excités par un faisceau incident à 441,6 nm obtenu avec un laser à Helium-Cadmium ionisé (Kimmon IK).

Afin d'éviter la photo-oxydation et la dégradation de l'échantillon pendant l'expérience, la puissance du faisceau incident est maintenue inférieure à 5 mW grâce à un filtre placé entre le laser et l'échantillon. Le porte-échantillon est également équipé d'un moteur qui permet la rotation de l'échantillon sur lui-même de manière à ne pas exposer toujours la même partie de l'échantillon à la lumière incidente.

Tous les spectres sont enregistrés à 20 °C avec un spectromètre Jobin-Yvon T64000 modifié au laboratoire et équipé d'un détecteur CCD (*Charged Coupled Device*) de 2000 pixels refroidi à l'azote liquide. Un filtre holographique coupe-bande (Kaiser Optical Systems) spécifique de la longueur d'onde d'excitation permet de rejeter la lumière diffusée par l'échantillon par diffusion Rayleigh.

Le spectromètre est relié à un système informatique permettant le pilotage, l'enregistrement et l'accumulation des données par le logiciel Speclab v 3.03 (Jobin Yvon).

Enregistrement des spectres RR

Un premier alignement du montage optique est réalisé en utilisant un échantillon d'éthanol. Le signal Raman de l'éthanol est très intense ce qui permet de trouver une géométrie convenable pour l'acquisition du signal. Un alignement plus fin est ensuite réalisé avec l'échantillon de protéine de manière à optimiser le rapport signal/bruit. Enfin, le monochromateur du spectromètre est calibré en utilisant la longueur d'onde de la lumière d'excitation comme référence. La précision des spectres obtenus dans ces conditions est estimée à environ 1 cm^{-1} .

Chaque spectre enregistré est le résultat de l'accumulation de 40 à 240 spectres obtenus avec des temps d'exposition de 10 à 30 secondes, soit un temps d'accumulation total de 20 à 60 minutes pour chaque spectre enregistré. Selon la qualité du rapport signal/bruit, on réalise ensuite la moyenne de 5 à 20 de ces spectres afin d'obtenir le spectre moyen final.

Le traitement des données par GRAMS/32 (Galactic Industries Corp., USA) permet de supprimer des contributions parasites (bruit électronique, pixel défaillant) et de corriger la ligne de base des spectres afin d'éliminer la contribution de la fluorescence de l'échantillon. Aucun des spectres analysés durant ce travail n'a été lissé.

Analyse des données

Les analyses des données ont été réalisées en utilisant les logiciels GRAMS/32 (Galactic Industries Corp., USA) et Origin 6.0 (OriginLab Corp., USA).

Dans le cas des pics étroits (largeur inférieure à environ 20 cm^{-1}), l'identification de la composante spectrale associée à chaque pic est réalisée directement en approximant le pic par une fonction gaussienne.

Dans le cas des signaux plus larges et plus complexes, le signal est déconvolué par approximations successives en une somme de plusieurs fonctions gaussiennes. Le paramètre d'initiation du processus d'approximation pour la position de chaque contribution spectrale est déterminé en combinant la déconvolution de Fourier et l'analyse de la dérivée seconde du signal. Les différents paramètres de chaque contribution gaussienne (position, largeur, et hauteur) sont ensuite laissés librement évoluer jusqu'à obtenir la meilleure approximation du signal initial.

Les différentes bandes des spectres RR ont été attribuées par analogie avec les données connues sur iNOS et sur les autres isoformes de NOS [97, 209-216].

3.3. Étude de iNOS_{ox} par spectroscopie ATR-FTIR

Les expériences de spectroscopie ATR-FTIR ont été réalisées en collaboration avec le Dr Jérôme Santolini au Laboratoire de Stress Oxydant et Détoxification de l'iBiTec-S au CEA de Saclay.

Comme la spectroscopie Raman de résonance, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) est une technique de spectroscopie qui permet de détecter les modes propres de vibration d'une molécule. Cependant, les règles de

sélection des modes observables par chacune des techniques font que ces deux méthodes de spectroscopie sont souvent complémentaires (Annexe 2). La spectroscopie ATR-FTIR est en particulier largement utilisée pour observer les vibrations caractéristiques des complexes Fe^{II} -CO d'hémoprotéines comme les cytochromes P450 [217-219] ou les NOS [220-222].

Préparation des échantillons de iNOS_{ox} Fe^{II} -CO

Les premières étapes de préparation de l'échantillon Fe^{II} -CO pour la spectroscopie ATR-FTIR sont les mêmes que pour la spectroscopie RR.

La chambre du spectromètre a été munie au laboratoire d'un couvercle en plexiglas qui permet de la rendre étanche aux gaz. De 10 à 15 μL de l'échantillon sont prélevés avec une seringue Hamilton© étanche aux gaz et déposés sous la forme d'une goutte à la surface du cristal ZnSe dans la chambre ATR. On fait circuler un léger courant de CO gazeux à la surface de la goutte pendant 15 minutes, ce qui permet à la fois d'assécher, de concentrer l'échantillon et de saturer la chambre du spectromètre en CO.

La chambre est ensuite replacée à l'intérieur du spectromètre pour procéder aux mesures.

Matériel utilisé et enregistrement des spectres ATR-FTIR

Tous les spectres sont enregistrés à température ambiante avec un spectromètre FTIR Bruker IFS 66/S couplé à une unité ATR (Pike Technologies). Le spectromètre est relié à un système informatique permettant le pilotage, l'enregistrement et l'accumulation des données par le logiciel OPUS (OPTics Users Software, Brucker).

Chaque spectre enregistré est le résultat de l'accumulation de 20 à 50 interférogrammes, chaque interférogramme étant le résultat de 250 mesures réalisées avec une durée d'exposition de 1 seconde. Selon la qualité du rapport signal/bruit, on réalise ensuite la moyenne de 2 à 6 spectres afin d'obtenir le spectre moyen final. On réalise également un enregistrement de la chambre du spectromètre à vide, ce qui permet d'obtenir le spectre de la vapeur d'eau.

Le traitement des données par GRAMS/32 (Galactic Industries Corp., USA) permet de corriger la ligne de base des spectres et d'éliminer la contribution de la vapeur d'eau au signal. Aucun des spectres analysés durant ce travail n'a été lissé.

Analyse des données

Les composantes spectrales des signaux ATR-FTIR ont été déterminées de la même manière que dans le cas des spectres RR, en utilisant le logiciel Origin 6.0 (OriginLab Corp., USA).

3.4. Détermination des potentiels d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOS_{ox}

Les expériences de spectro-électrochimie ont été réalisées en collaboration avec le Dr Véronique Balland au Laboratoire d'Électrochimie Moléculaire de l'Université Paris 7 - Diderot.

Toutes les valeurs de potentiel de solution et de potentiel standard sont données par rapport au potentiel standard de l'électrode normale à hydrogène (ENH). Par défaut, le pH est fixé à 7,4.

3.4.1. Principe et choix du médiateur

Équation de Nernst

Une méthode simple et directe pour mesurer le potentiel d'un couple redox consiste à déterminer en conditions d'équilibre à un potentiel donné quelle fraction est présente sous la forme oxydée et quelle fraction est présente sous la forme réduite. En effet, le rapport entre ces deux fractions est déterminé à l'équilibre par l'équation de Nernst. Pour un couple Red/Ox de potentiel standard à pH fixé $E^{\circ'}$ qui échange n électrons et dont les deux espèces sont solubles, le potentiel V de la solution à l'équilibre est donné par :

$$V = E^{\circ'} + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

où R est la constante des gaz parfaits ($8,3146 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T la température en kelvin et F la constante de Faraday ($96\,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$).

En théorie, une seule mesure du rapport des concentrations des espèces oxydées et réduites pour un potentiel en solution donné suffit donc à déterminer le potentiel $E^{\circ'}$ du couple. En pratique, on réalise une série de mesures pour plusieurs potentiels en solution de manière à déterminer le potentiel $E^{\circ'}$ du couple avec une bonne précision.

Le couple $\text{iNOS}_{\text{ox}} \text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$

Les spectres d'absorption UV-visible des espèces Fe^{III} et Fe^{II} de NOS possèdent des caractéristiques différentes et bien distinctes ce qui permet de déterminer facilement la proportion de protéine sous forme Fe^{III} et sous forme Fe^{II} dans une solution de NOS. La mesure du spectre d'absorption UV-visible d'une solution de NOS en fonction du potentiel de la solution est donc une bonne méthode pour déterminer le potentiel du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$.

Nous avons effectué ces mesures uniquement sur le domaine oxygénase de la protéine de manière à nous affranchir des propriétés redox des flavines du domaine réductase.

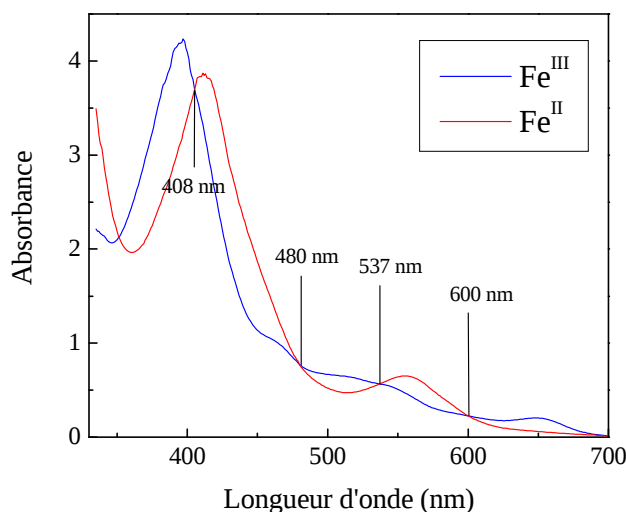


Figure II.16 : Spectres d'absorption UV-visible des espèces Fe^{III} (en bleu) et Fe^{II} (en rouge) de iNOS_{ox} en présence de L-Arg et de H_4B et points isobestiques du couple.

Choix du médiateur

Pour que la protéine soit en équilibre électrochimique avec les électrodes qui imposent un potentiel donné à la solution, il est nécessaire d'introduire un médiateur dans la solution. En effet, les protéines sont des molécules très grosses et souvent avec une surface chargée en contact avec la solution. Elles ne sont donc pas capables d'approcher suffisamment près de la surface de l'électrode pour d'échanger directement les électrons. Le médiateur est une petite molécule soluble qui possède des propriétés redox et qui sert de navette dans le transport des électrons entre la protéine et les électrodes.

Pour que le médiateur soit efficace, il est nécessaire qu'il soit absolument stable dans les conditions de l'expérience et que sa cinétique propre d'oxydoréduction soit très rapide afin de ne pas freiner l'établissement de l'équilibre en solution. Il faut également que son propre potentiel E° soit proche de celui de la protéine, de manière à ce que les formes oxydées et réduites du médiateur soient présentes en quantité suffisante pour pouvoir assurer efficacement le transport des électrons entre la protéine et les électrodes au moment où la protéine passe du domaine de prédominance de la forme oxydée à celui de la forme réduite.

Dans la plupart des études décrivant le potentiel d'oxydoréduction des NOS, le transport des électrons dans la solution est assuré par un mélange de médiateurs (anthraquinone-2-sulfonate, anthraquinone-2,6-disulfonate, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, pyocyanine,

phénosafranine, résorufine, phénazine, rouge neutre, benzyl-viologène, méthyl-viologène), de sorte qu'une large gamme de potentiels est accessible à la mesure [111, 223, 224]. Cependant, la quasi-totalité des médiateurs présentent des spectres d'absorption UV-visible intenses qui recouvrent partiellement ou totalement le signal de la protéine. Le spectre d'absorption UV-visible de la NOS est dans ce cas déduit par soustraction du spectre du mélange de médiateurs, ce qui induit qu'une très faible dégradation d'un ou plusieurs médiateurs au cours de l'expérience risque d'influer fortement sur les valeurs calculées de l'absorption de l'enzyme.

Afin de s'affranchir partiellement de ce problème, un protocole utilisant un seul médiateur a été mis au point au laboratoire. Le potentiel attendu pour iNOS_{ox} à pH=7,4 en présence d'analogues de L-Arg est estimé approximativement d'après les données publiées précédemment pour iNOS_{ox} à pH=7,4 en présence de L-Arg ($E^{\circ'} = -263$ mV [111]). Les analogues testés étant assez similaires à L-Arg, il est en effet probable que les potentiels en présence des analogues se situent dans la même zone que le potentiel en présence de L-Arg. Nous avons donc choisi d'utiliser la phénosafranine comme médiateur ($E^{\circ'} = -255$ mV à pH=7,4). Si l'estimation du potentiel attendu est trop éloignée du potentiel réel de la protéine, l'état d'équilibre ne peut pas être atteint dans la solution au cours de l'expérience, et l'expérience doit être recommencée en présence d'un autre médiateur.

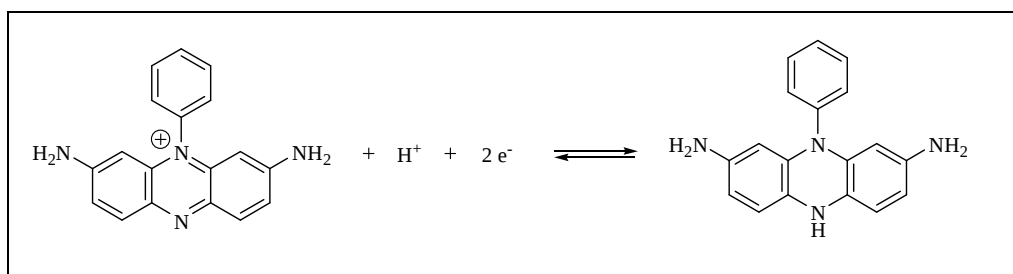


Figure II.17 : Demi-équation redox de la phénosafranine.

L'évolution de la phénosafranine au cours de l'expérience est suivie par la mesure de l'absorbance à 480 nm, ce qui correspond à un point isobestique de la protéine (figure II.16). L'évolution de la protéine est suivie à 406 nm, ce qui correspond à un point isobestique de la phénosafranine, et à 650 nm où la phénosafranine n'absorbe pas (figure II.18).

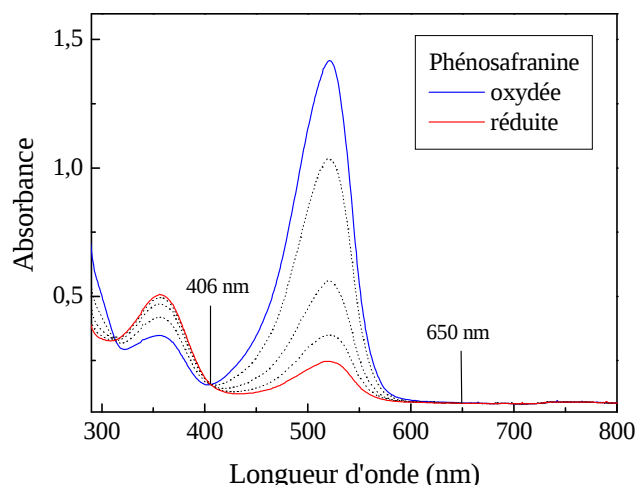


Figure II.18 : Spectres d'absorption UV-visible des espèces oxydée (en bleu) et réduite (en rouge) de la phénosafranine à pH=7,4 et points isobestiques du couple.

3.4.2. Cellule de spectro-électrochimie

La cuve

La cellule de spectro-électrochimie utilisée au laboratoire a été réalisée sur mesure. Elle est composée dans sa partie inférieure d'une cuve en quartz standard (trajet optique de 1 cm) et dans sa partie supérieure d'un rodage qui permet de fermer la cellule hermétiquement avec un bouchon en caoutchouc (figure II.19). Le bouchon est percé de manière à laisser passer les électrodes qui plongent dans la cuve et un fin tuyau en caoutchouc qui sert d'arrivée pour la circulation du courant d'argon. La sortie d'air est assurée par une petite aiguille de faible diamètre, ce qui permet de maintenir une légère surpression d'argon à l'intérieur de la cellule. Le maintien strict de l'ensemble du montage sous atmosphère d'argon permet d'éviter les réactions parasites avec le dioxygène dissous.

Les électrodes

L'électrode de référence est une microélectrode Ag|AgCl|KCl (3 M) (DriRef 2, World Precision Instruments). Son potentiel, déterminé par voltamétrie cyclique, est de 208 mV à 20 °C. Ce potentiel est régulièrement vérifié afin d'éviter toute dérive de l'électrode de référence.

L'électrode de travail est une grille d'or fixée sur une structure en polyméthacrylate de méthyle de manière à ce que la grille occupe deux faces et le fond de la cuve en quartz, laissant les deux autres faces de la cuve libres pour le passage du faisceau de lumière du spectromètre UV-visible.

La contre-électrode est un fil de platine relié à la solution par un pont salin composé d'un fritté Vycor (Princeton Applied Research) et d'un tube en Téflon rempli de tampon (KPi 100 mM pH=7,4, NaCl 100 mM). Un petit bouchon en caoutchouc assure l'étanchéité de la contre-électrode et permet le passage d'un fin tuyau en caoutchouc qui sert à maintenir une légère surpression d'argon à l'intérieur de l'électrode de manière à éliminer le dioxygène éventuellement produit à la surface du fil de platine.

Toutes les électrodes sont connectées à un potentiostat fabriqué au laboratoire. Le volume d'échantillon nécessaire pour qu'il y ait un bon contact entre les électrodes et la solution est d'environ 1,4 mL. Un petit barreau aimanté est déposé sur le fond de la grille d'or et sert à assurer l'homogénéité de l'échantillon au cours de l'expérience.

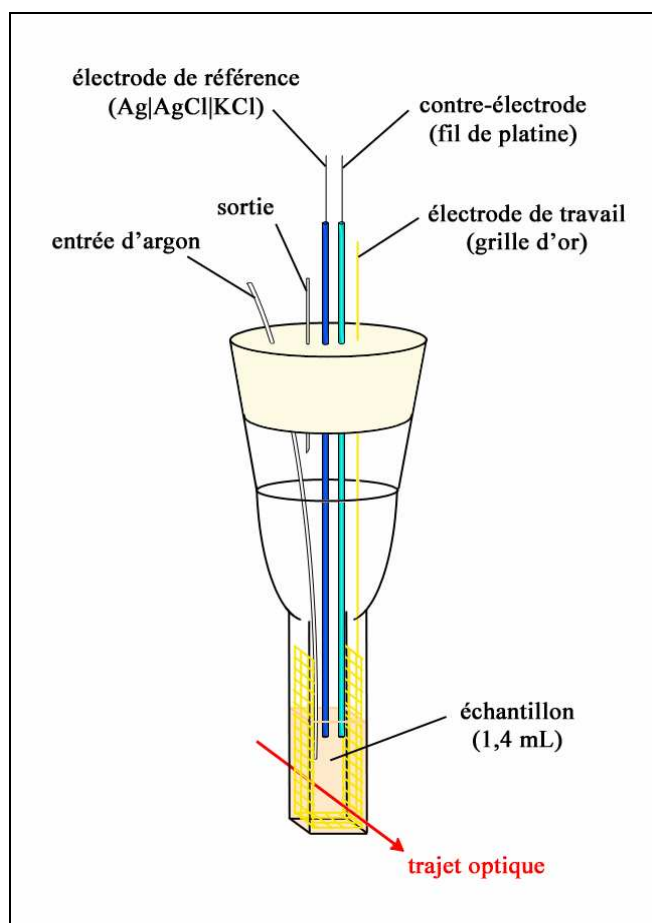


Figure II.19 : Cellule utilisée pour les expériences de spectro-électrochimie.

3.4.3. Mesure du potentiel redox de iNOS_{ox}

Préparation des échantillons de iNOS_{ox} Fe^{III}

L'échantillon de iNOS_{ox} subit d'abord deux cycles de lavage : concentration en Millipore-30 à 5 000 tr.min⁻¹ pendant 30 minutes à 4 °C, dilution dans le tampon final (KPi 100 mM pH=7,4, NaCl 100 mM, H₄B 400 µM, L-Arg 5 mM ou analogue de L-Arg 20 mM). Le tampon ne doit pas contenir de DTT à cause des propriétés redox de ce composé. L'échantillon de iNOS_{ox} est ensuite concentré jusqu'à un volume final de 50 µL.

Pendant ce temps, 1350 µL de tampon final sans enzyme contenant 5 mM de phénosfranine sont placés dans la cellule de spectro-électrochimie et mis à dégazer sous un courant d'argon. La cellule est thermostatée à 20 °C.

Cycles de réduction et d'oxydation

Lorsque la cellule est purgée de toute trace de dioxygène (au bout de 2 heures environ), on réalise un premier cycle de réduction-oxydation afin de vérifier le bon fonctionnement du montage électrique de la cellule. Pendant cette étape, le spectre d'absorption UV-visible de la solution est enregistré à intervalles réguliers, ce qui permet de déterminer la position des points isobestiques du médiateur dans les conditions de l'expérience et de vérifier que le système électrodes-médiateur est bien réversible (figure II.18).

On ajoute alors l'échantillon de iNOS_{ox} concentré dans la cellule grâce à une seringue étanche aux gaz, la concentration finale en iNOS_{ox} dans la cellule est de 30 µM environ. Le spectre d'absorption UV-visible de la solution présente alors les caractéristiques de iNOS_{ox} Fe^{III} HS : pic de Soret à 395 nm, présence d'une bande d'absorption à 650 nm (figure II.20). La cellule est à nouveau mise à dégazer sous un courant d'argon pendant 1 heure.

Lorsque la cellule est complètement anaérobie, on commence l'étude de la vague de réduction en imposant un potentiel de plus en plus réducteur par paliers de 50 mV. Pendant cette étape, le spectre d'absorption UV-visible de la solution est enregistré toutes les 2 minutes. Pour chaque palier, on laisse le système évoluer sous agitation douce jusqu'à ce que deux spectres d'absorption successifs soient parfaitement superposables et jusqu'à ce que le potentiel libre de la solution soit égal au potentiel imposé par le potentiostat, on considère alors que le système a atteint l'état d'équilibre correspondant à ce potentiel. Le spectre d'absorption UV-visible de la solution est enregistré et le potentiel est amené à la valeur du palier suivant. Chaque palier nécessite un temps de mise à l'équilibre de 5 à 25 minutes.

Lorsque le spectre d'absorption UV-visible de la solution n'évolue plus sous l'effet de la diminution du potentiel imposé, on considère que la vague de réduction est terminée. On vérifie que le spectre d'absorption UV-visible de la solution présente bien les caractéristiques de $\text{iNOS}_{\text{ox}} \text{Fe}^{\text{II}}$: pic de Soret à 412 nm, absence de bande d'absorption à 650 nm (figure II.20).

On commence alors l'étude de la vague d'oxydation en imposant un potentiel de plus en plus oxydant par paliers de 30 mV. Comme pour la vague de réduction, le spectre d'absorption UV-visible de la solution est enregistré à chaque palier lorsque le système a atteint l'état d'équilibre. On considère que la vague d'oxydation est terminée lorsque le spectre d'absorption UV-visible de la solution n'évolue plus sous l'effet de l'augmentation du potentiel imposé. On vérifie que le spectre d'absorption UV-visible de la solution présente bien les caractéristiques de $\text{iNOS}_{\text{ox}} \text{Fe}^{\text{III}}$: pic de Soret à 395 nm, présence d'une bande d'absorption à 650 nm (figure II.20).

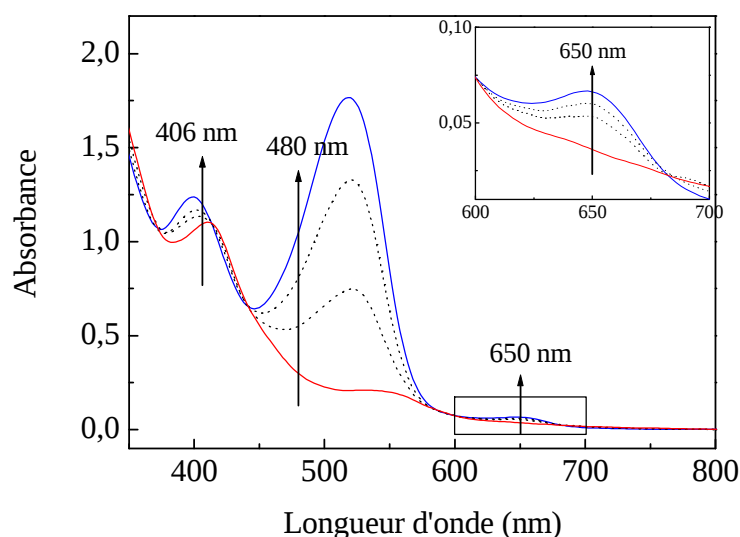


Figure II.20 : Spectres d'absorption UV-visible enregistrés lors de la vague d'oxydation de iNOS_{ox} en présence de H_4B et de FPh-Gua . Pour un potentiel imposé de - 500 mV, le spectre montre les caractéristiques d'un mélange de $\text{iNOS}_{\text{ox}} \text{Fe}^{\text{II}}$ et de phénosafranine réduite (rouge). Pour un potentiel imposé de 0 mV, le spectre montre les caractéristiques d'un mélange de $\text{iNOS}_{\text{ox}} \text{Fe}^{\text{III}} \text{HS}$ et de phénosafranine oxydée (bleu).

Traitement des données

Les absorbances enregistrées à 406, 480 et 650 nm sont corrigées par soustraction de la valeur mesurée à 820 nm de manière à éliminer la contribution de l'enzyme dégradée qui précipite petit à petit dans la cellule. L'expérience est considérée comme valide seulement si moins de 10 % de la protéine a précipité au cours des vagues de réduction et d'oxydation.

La solution au début de la vague de réduction ou à la fin de la vague d'oxydation (vers 0 mV) est considérée comme contenant 100 % de fraction oxydée de iNOS_{ox} et 100 % de fraction oxydée de phénosafranine. La solution à la fin de la vague de réduction ou au début de la vague d'oxydation (vers - 500 mV) est considérée comme contenant 100 % de fraction réduite de iNOS_{ox} et 100 % de fraction réduite de phénosafranine. La comparaison de la valeur d'absorbance mesurée pour un potentiel donné V avec les valeurs mesurées pour ces deux solutions de référence permet de déterminer la fraction de iNOS_{ox} et de phénosafranine réduites et oxydées dans la solution pour ce potentiel.

$$\text{Fraction oxydée (V)} = \frac{\text{Abs (V)} - \text{Abs (-400mV)}}{\text{Abs (0 mV)} - \text{Abs (-400mV)}}$$

L'évolution de la fraction oxydée en fonction du potentiel imposé peut être modélisée grâce à l'équation de Nernst, ce qui nous permet de déterminer le nombre n d'électrons échangés par le couple redox et le potentiel standard à pH=7,4 E°' de ce couple.

$$\text{Fraction oxydée (V)} = \frac{\exp \frac{nF}{RT} (V-E^{\circ'})}{1 + \exp \frac{nF}{RT} (V-E^{\circ'})}$$

Le potentiel E°' représente le potentiel de solution pour lequel la moitié de l'espèce est sous la forme oxydée et l'autre moitié sous la forme réduite (fraction oxydée = 0,5). Le nombre n d'électron échangés est représenté par la pente de la courbe au niveau du point où le potentiel imposé vaut E°'.

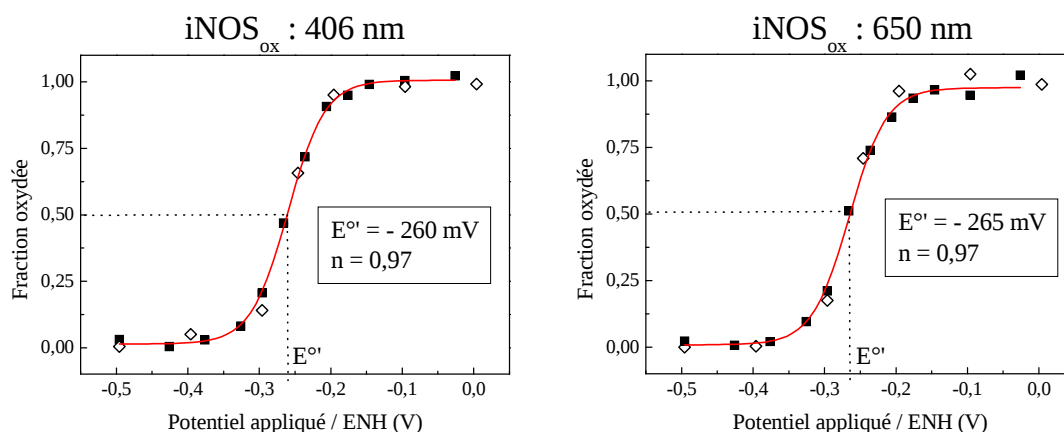


Figure II.21 : Fraction oxydée de iNOS_{ox} en présence de phénosafranine, de H₄B et de FPh-Gua, mesurée à 406 nm et à 650 nm (◇ vague de réduction, ■ vague d'oxydation), en fonction du potentiel imposé dans la solution (pH=7,4).

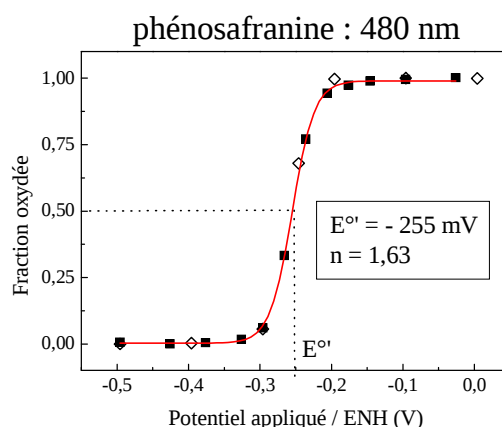


Figure II.22 : Fraction oxydée de phénosafranine en présence de iNOS_{ox}, de H₄B et de FPh-Gua, mesurée à 480 nm (◇ vague de réduction, ■ vague d'oxydation), en fonction du potentiel imposé dans la solution (pH=7,4).

L'expérience est considérée comme valide si, d'une part la valeur de $E^{\circ'}$ obtenue pour la phénosafranine présente une différence avec la valeur publiée inférieure à 5 mV, et si d'autre part les valeurs de $E^{\circ'}$ obtenues pour iNOS_{ox} à partir des mesures à 406 et à 650 nm présentent entre elles une différence inférieure à 10 mV. Pour iNOS_{ox}, le nombre théorique d'électrons échangés entre Fe^{III} et Fe^{II} est de 1, les valeurs de n mesurées varient entre 0,8 et 1,3. Pour la phénosafranine, le nombre théorique d'électrons échangés entre la forme oxydée et réduite est de 2, les valeurs de n mesurées varient entre 1,6 et 2,3.

Chapitre III

Importance de la Tyrosine 588 chez nNOS

La configuration précise des résidus qui entourent le centre catalytique d'une enzyme joue un rôle central dans la fonction catalytique de l'enzyme. Chez les NOS, de nombreuses études réalisées par diffraction des rayons X et par mutagenèse dirigée ont montré que le site actif est pratiquement identique pour les différentes isoformes et que plusieurs résidus sont absolument indispensables à la reconnaissance et à la transformation en NO des substrats.

1. Structure de la partie distale du site actif des NOS

1.1. Résidus de la partie distale essentiels à l'activité des NOS

L'alignement des séquences des trois isoformes de NOS de mammifère montre que les résidus constituant la partie distale du site actif sont extrêmement bien conservés d'une isoforme à l'autre (table III.1). Les structures des différentes isoformes obtenues par diffraction des rayons X présentent en effet des sites actifs parfaitement superposables, à l'exception d'un résidu aspartate (représenté en bleu table III.1) commun aux isoformes nNOS et iNOS qui est remplacé par un résidu asparagine chez eNOS. Des études par mutagenèse dirigée ont cependant montré que le remplacement de ce résidu aspartate par un résidu asparagine n'a pas d'influence sur la reconnaissance et la transformation de L-Arg par les NOS [225, 226].

nNOS de rat	564	LPA VS	NMLLE	I GGLE	FSACP	FSG WY	MGTEI	GVR DY	CDNSR	603
nNOS humaine	568	LPA VS	NMLLE	I GGLE	FSACP	FSG WY	MGTEI	GVR DY	CDNSR	607
iNOS de souris	343	LPA VA	NMLLE	VGGLE	FPACP	F NGWY	MGTEI	GVR DF	CDTQR	382
iNOS humaine	349	LPA VA	NMLLE	VGGLE	FPGCP	F NGWY	MGTEI	GVR DF	CDVQR	388
eNOS bovine	335	LPA VS	NMLLE	I GGLE	FSAAP	FSG WY	MSTEI	GTR NL	CDPHR	374
eNOS humaine	333	LPA VS	NMLLE	I GGLE	FPAAP	FSG WY	MSTEI	GTR NL	CDPHR	372

Table III.1 : Alignement des séquences de résidus au voisinage du site actif des NOS de mammifère. Les résidus Gly586, Trp587, Tyr588 (rouge), Glu592 (rose) et Asp597 (bleu) sont visibles figure III.1, le résidu Val567 (orange) est visible sur la figure III.2 (numérotation nNOS de rat).

La stricte conservation des résidus impliqués dans le positionnement du substrat dans le site actif montre que le positionnement précis de l'arginine au cœur de la poche du site actif des NOS joue un rôle prépondérant dans sa métabolisation en NOHA puis en NO. Des études par mutagenèse dirigée ont en particulier montré que le résidu Glu592 (numérotation nNOS de rat, représenté en rose table III.1) est absolument nécessaire à la fois à la reconnaissance et à

la transformation de L-Arg par les NOS [227-229]. Les résidus Val567 (orange), Tyr588 (rouge) et Arg596 se sont également révélés très importants pour l'activité catalytique des NOS [229-234]. L'étude du résidu Val567 est particulièrement intéressante car ce résidu est conservé chez les NOS de mammifère mais est remplacé par un résidu isoleucine chez les NOS de bactéries [232].

1.2. Positionnement des substrats naturels et des analogues de substrat

Positionnement de L-Arg et de NOHA

Les résidus de la poche distale du site actif des NOS sont à l'origine d'un important réseau de liaisons hydrogène qui confine étroitement l'arginine dans une position précise [52-55]. L'extrémité guanidinium de l'arginine est maintenue dans une position parallèle au plan de l'hème par deux liaisons hydrogène avec le résidu Glu592 et une avec le résidu Trp587 (numérotation de nNOS de rat), pendant que l'extrémité α -amino-acide est maintenue par des liaisons hydrogène avec les résidus Glu592, Asp597, Gln478, Tyr588 et avec un des propionates de l'hème (figure III.1).

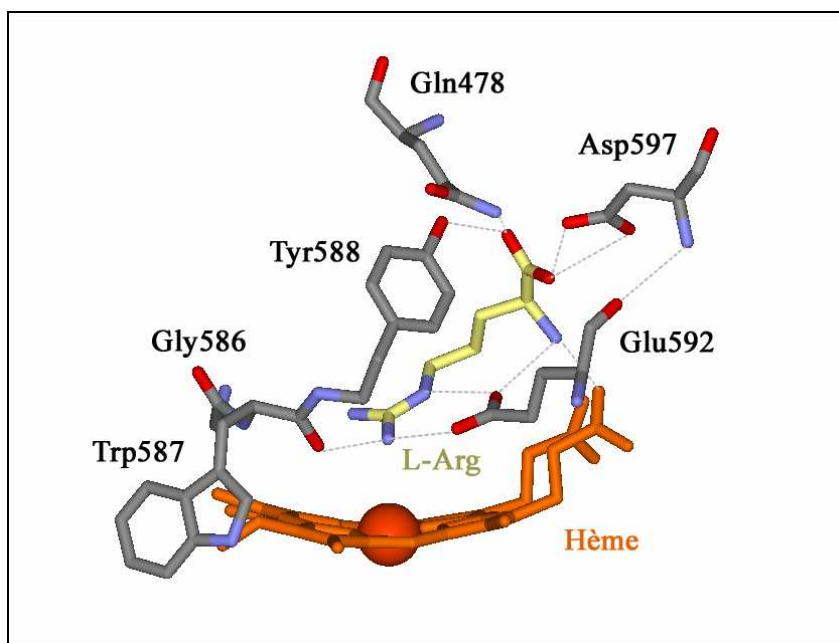


Figure III.1 : Positionnement de l'arginine dans le site actif des NOS (nNOS de rat), représentation des principales liaisons hydrogène entre les résidus du site actif (gris), l'hème (orange) et le substrat L-Arg (jaune).

Les structures de NOS obtenues en présence de NOHA ont montré que NOHA et L-Arg sont positionnées pratiquement de la même manière dans le site actif, à l'exception d'une liaison

hydrogène supplémentaire que le groupe OH de l'hydroxy-guanidinium établit avec le résidu Gly586 [77, 78].

Positionnement des analogues de L-Arg et de NOHA dans le site actif

Quelques guanidines et hydroxy-guanidines non amino-acides se sont montrées susceptibles d'être oxydées en NO par les NOS selon un mécanisme semblable à l'oxydation des substrats naturels L-Arg et NOHA, bien qu'elles induisent un taux de découplage important [178-184]. Cependant, de nombreuses autres guanidines et hydroxy-guanidines ne sont pas substrat des NOS.

Les données obtenues par diffraction des rayons X de nNOS cristallisée en présence de n-butyl-hydroxyguanidine et d'isopropyl-hydroxyguanidine [78] et de eNOS cristallisée en présence de chlorophényl-hydroxyguanidine [235] montrent que la partie hydroxy-guanidinium de ces analogues de NOHA est fixée à proximité du fer par des liaisons hydrogène avec les résidus Glu592, Trp587 et Gly586 (numérotation : nNOS de rat) de la même manière que dans le cas de NOHA (figure III.2). En revanche le positionnement de la chaîne latérale semble dépendre fortement de sa nature chimique : la chaîne latérale ne se positionne pas à proximité des propionates de l'hème comme dans le cas de NOHA, mais elle se replie en direction d'une poche hydrophobe formée par deux résidus Pro565 et Val567 situés au-dessus de l'hème (figure III.2).

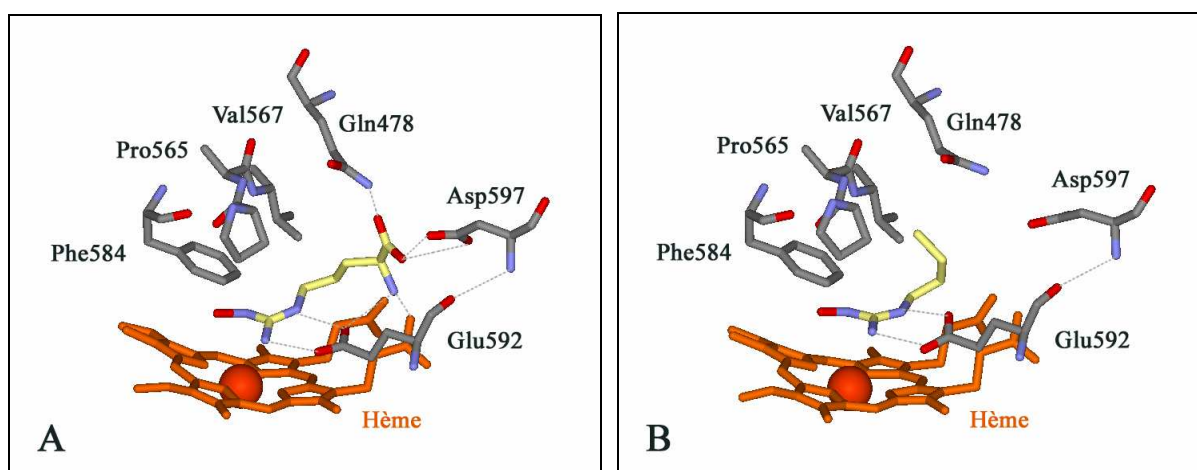


Figure III.2 : Positionnement de NOHA (A) et de la n-butyl-hydroxyguanidine (B) dans le site actif de nNOS [78] et représentation schématique des principales liaisons hydrogène.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données de diffraction des rayons X de NOS en présence de guanidines analogues de L-Arg. Cependant, comme L-Arg et NOHA se positionnent de manière identique dans le site actif des NOS, on peut raisonnablement supposer que les

guanidines analogues de L-Arg se positionnent d'une manière similaire à celle des hydroxyguanidines analogues de NOHA, c'est-à-dire que le positionnement de l'extrémité guanidinium est conservé bien que la conformation de la chaîne latérale soit susceptible de varier.

Il a été proposé que ces différences dans le positionnement de la chaîne latérale puissent être impliquées dans les différences de réactivité observées entre les analogues de L-Arg et de NOHA. Il est cependant plus vraisemblable que le positionnement et la réactivité de l'extrémité (hydroxy)guanidine soit plus importante pour la métabolisation du substrat [179-181, 183].

1.3. Le résidu Tyr588

Les données obtenues par diffraction des rayons X montrent que le résidu Tyr588 (numérotation nNOS de rat) est en interaction directe avec l'extrémité α -amino-acide des substrat L-Arg et NOHA par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène entre l'extrémité hydroxyle du résidu tyrosine et la fonction carboxylate du substrat [52-55] (figure III.1).

Plusieurs études ont été réalisées par mutagenèse dirigée afin de mesurer l'importance de ce résidu dans l'activité catalytique des NOS : les mutants de nNOS Tyr588Phe, Tyr588His et Tyr588Ser [230] et le mutants de eNOS Tyr357Phe [233] ont été étudiés en présence des substrats naturels L-Arg et NOHA. Les résultats obtenus au cours de ces études montrent que l'affinité des différents mutants pour les substrats naturels L-Arg et NOHA est de 3 à 20 fois plus faible que l'affinité de l'enzyme sauvage. La formation de NO à partir de L-Arg est fortement diminuée par la mutation de ce résidu tyrosine, mais de manière intéressante la formation de NO à partir de NOHA est beaucoup moins perturbée par la mutation. Cependant, les différents mutants ont montré des taux d'oxydation du NADPH supérieurs à ceux de l'enzyme sauvage, ce qui indique que la formation de NO a lieu avec un taux de découplage élevé à partir de L-Arg comme à partir de NOHA.

Ces résultats montrent que le résidu Tyr588 est important pour la reconnaissance et la transformation des substrats naturels des NOS, et qu'il joue un rôle différent dans les deux étapes du cycle catalytique des NOS. L'étude des mutations de ce résidu est donc particulièrement intéressante pour une meilleur compréhension du mécanisme des NOS.

D'autre part, il a été proposé que les étapes de transfert de protons au cours du cycle catalytique des NOS impliquent un réseau de liaisons hydrogène constitué par des molécules d'eau, le substrat, le cofacteur H_4B et plusieurs résidus du site actif, dont le résidu Tyr588. Selon la nature de leur chaîne latérale, les analogues de L-Arg et de NOHA sont susceptibles ou non d'interagir directement par liaison hydrogène avec le résidu Tyr588, ce qui pourrait expliquer les différences de réactivité observées entre ces analogues.

Nous avons donc choisi d'étudier deux mutants Tyr588Phe et Tyr588His de nNOS en présence de guanidines et d'hydroxyguanidines analogues de L-Arg et de NOHA. Ces deux mutations se traduisent par la délétion du groupement hydroxyle pour Tyr588Phe et par le remplacement du cycle phénol en cycle imidazole pour Tyr588His (figure III.3).

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre à la fois le rôle de la chaîne latérale du substrat et du résidu Tyr588 dans le réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif et le rôle de ce réseau de liaisons hydrogène dans les deux étapes du cycle catalytique des NOS.

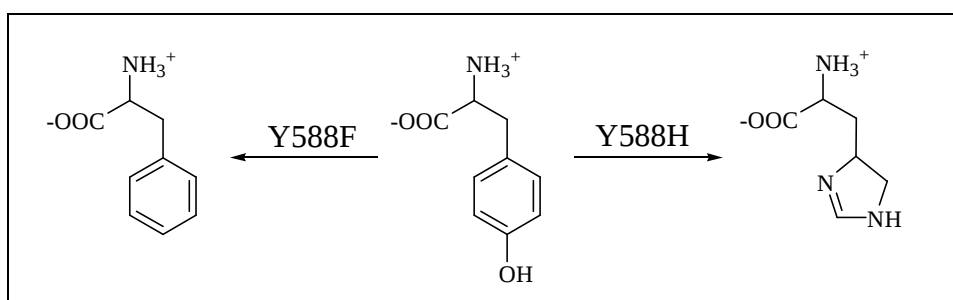


Figure III.3 : Mutations du résidu Tyr588.

2. Caractérisation de la nNOS sauvage et des mutants Y588F et Y588H

2.1. Expression et purification des enzymes

La nNOS sauvage et les mutants Y588F et Y588H ont été surexprimés dans *E. Coli* grâce à des plasmides gracieusement donnés par l'équipe de T. Shimizu (Tohoku University, Sendai, Japan). Les protéines ont été ensuite purifiées sur une colonne d'affinité à la calmoduline en présence de H_4B dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.1.1.1.

Le mutant Y588F a été obtenu avec un rendement similaire à celui de la nNOS sauvage (4 à 5 mg de protéine purifiée par litre de culture) et présente une bonne stabilité en solution à pH=7,4 et à 4 °C, ce qui indique que la mutation Y588F n'affecte pas la structure globale de la protéine. Au contraire, la culture et la purification du mutant Y588H se sont révélées beaucoup plus délicates : le mutant Y588H n'a pu être obtenu qu'avec un rendement très faible (inférieur à 1 mg de protéine purifiée par litre de culture) et présente une mauvaise stabilité en solution à pH=7,4 et à 4 °C.

La pureté des échantillons de nNOS obtenus a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE (voir II.1.2.2.) : comme la nNOS sauvage, les deux mutants présentent une bande de migration majoritaire correspondant à un poids moléculaire de 150 kDa.

2.2. Caractérisation spectroscopique

2.2.1. Par spectroscopie UV-visible

nNOS sauvage

À l'état natif, c'est-à-dire en absence de substrat et de cofacteur, l'hème des NOS est au degré d'oxydation Fe^{III} et présente un équilibre entre la forme 5-coordinée HS dont le maximum d'absorption UV-visible se situe vers 395 nm et la forme 6-coordinée BS qui comporte une molécule d'eau comme sixième ligand et dont le maximum d'absorption se situe vers 420 nm (voir II.1.4.1.). Dans le cas de l'isoforme nNOS, la forme majoritaire à l'état natif est la forme BS [56]. L'addition du cofacteur H_4B déplace l'équilibre en faveur de la forme HS [110].

Le protocole de purification de nNOS que nous avons utilisé permet d'obtenir nNOS en présence de cofacteur H_4B (5 μM), ce qui permet de garantir une meilleure stabilité de la protéine au cours des différentes étapes de purification. Le spectre d'absorption UV-visible de la nNOS sauvage telle qu'obtenue après purification est présenté figure III.4 : il montre une bande d'absorption de Soret très large autour de 395 à 405 nm, ce qui indique que la solution de nNOS sauvage comporte un mélange des formes HS et BS avec une grande proportion de forme HS.

L'addition de dithionite de sodium puis la saturation de l'échantillon en CO provoquent la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ (voir II.1.4.2.) dont l'absorption UV-visible est caractérisée

par le déplacement de la bande de Soret à 445 nm. Le spectre d'absorption UV-visible du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de la nNOS sauvage présente le spectre d'absorption UV-visible attendu (figure III.4 : spectre d'absorption différentielle du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ par rapport à l'enzyme à l'état Fe^{II}). L'absence d'épaule à 420 nm indique que la protéine n'a pas perdu le lien entre l'hème et la cystéine proximale, donc qu'elle est intègre et fonctionnelle.

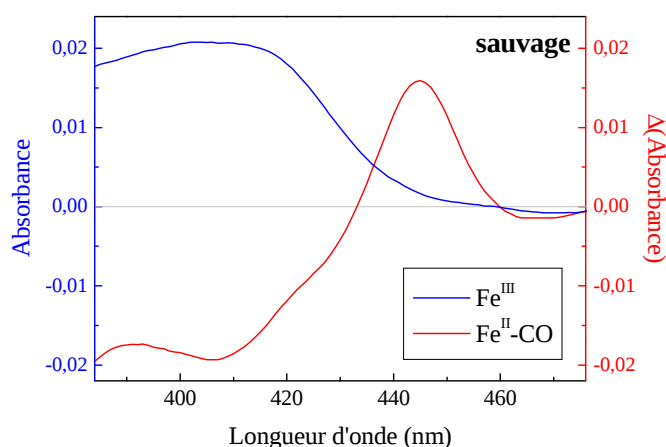


Figure III.4 : Spectres d'absorption UV-visible de nNOS sauvage en présence de H_4B à l'état Fe^{III} (bleu) et spectre d'absorption différentielle du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ par rapport à l'enzyme à l'état Fe^{II} (rouge).

Mutants Y588F et Y588H

Les spectres d'absorption UV-visible des mutants Y588F et Y588H à l'état Fe^{III} tels qu'obtenus après purification, c'est-à-dire en présence de H_4B (5 μM), montrent une bande d'absorption de Soret très large autour de 400 à 415 nm ce qui indique un mélange des formes HS et BS en proportions similaires (figure III.5).

Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ du mutant Y588F présente un spectre d'absorption UV-visible semblable à celui de la nNOS sauvage avec un pic d'absorption caractéristique à 445 nm sans épaule à 420 nm, ce qui indique que la protéine est intègre et fonctionnelle (figure III.5 : spectre d'absorption différentielle du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ par rapport à l'enzyme à l'état Fe^{II}). En revanche, le spectre d'absorption UV-visible du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ du mutant Y588H montre distinctement deux pics d'absorption : le pic d'absorption attendu à 445 nm qui représente la fraction d'enzyme intègre et un pic d'absorption à 420 nm caractéristique d'une fraction d'enzyme dénaturée où le lien entre l'hème et le ligand cystéine proximal a été rompu. Les proportions relatives de ces deux pics indiquent qu'environ la moitié seulement du mutant Y588H est purifiée sous forme active. De plus, la proportion d'enzyme inactive augmente au cours du temps si on laisse la solution de mutant Y588H à 4 °C.

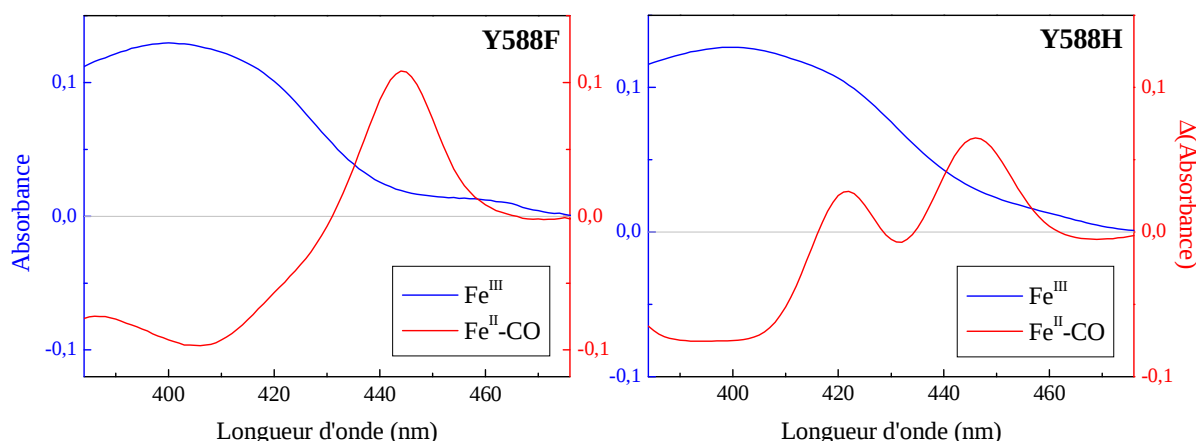


Figure III.5 : Spectres d'absorption UV-visible des mutants nNOS Y588F et Y588H en présence de H_4B à l'état Fe^{III} (bleu) et spectre d'absorption différentielle du complexe Fe^{II} -CO par rapport à l'enzyme à l'état Fe^{II} (rouge).

Il est possible que la mauvaise stabilité du mutant Y588H soit causée par une dimérisation partielle due à une faible affinité du mutant pour le cofacteur H_4B . Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons augmenté la concentration en cofacteur H_4B jusqu'à $100\ \mu M$, mais sans obtenir une meilleure stabilité du mutant Y588H en solution. La mauvaise stabilité du mutant Y588H n'est pas causée par une faible affinité pour le cofacteur H_4B .

2.2.2. Par spectroscopie RPE

Afin d'étudier plus finement l'équilibre entre les formes HS et BS, nous avons réalisé les spectres RPE des échantillons de nNOS tels qu'obtenus après purification, c'est-à-dire en présence du cofacteur H_4B ($5\ \mu M$) mais en absence de substrat. La concentration en protéine de l'échantillon est d'environ $70\ \mu M$. L'analyse du signal RPE permet en effet d'obtenir des informations sur la géométrie de coordination du fer, la nature des ligands, son état de spin et son degré d'oxydation (Annexe 2). Le spectre RPE des échantillons est enregistré à $10\ K \pm 2\ K$ pour l'observation du mélange des formes HS et BS, et à $35\ K \pm 2\ K$ où seul le signal des formes BS peut être observé (Annexe 2).

Les spectres RPE des deux mutants et de l'enzyme sauvage étant enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales de concentration d'enzyme et de cofacteur, de température, et avec les mêmes réglages du spectromètre RPE (voir II.1.5.), il est possible de comparer les intensités respectives des signaux RPE associés à un même radical pour chacun des trois échantillons.

Enregistrement à 10 K

Le signal obtenu par spectroscopie RPE confirme les résultats obtenus par spectroscopie d'absorption UV-visible : en présence de cofacteur H_4B mais en absence de substrat, l'hème de nNOS est au degré d'oxydation Fe^{III} et présente un équilibre entre la forme 5-coordinée HS et la forme 6-coordinée BS. Le signal RPE de la forme HS ($S=5/2$) est caractérisé par une rhombicité assez importante avec $g_x \sim 7,6$, $g_y \sim 4,0$ et $g_z \sim 1,8$. Le signal de la forme BS ($S=1/2$) apparaît vers $g_x \sim 1,9$, $g_y \sim 2,3$ et $g_z \sim 2,4$, mais il est assez difficilement observable à 10 K (figure III.6). Ces résultats sont en bon accord avec les résultats décrits pour les différentes isoformes de NOS de mammifère [56, 193-197, 236].

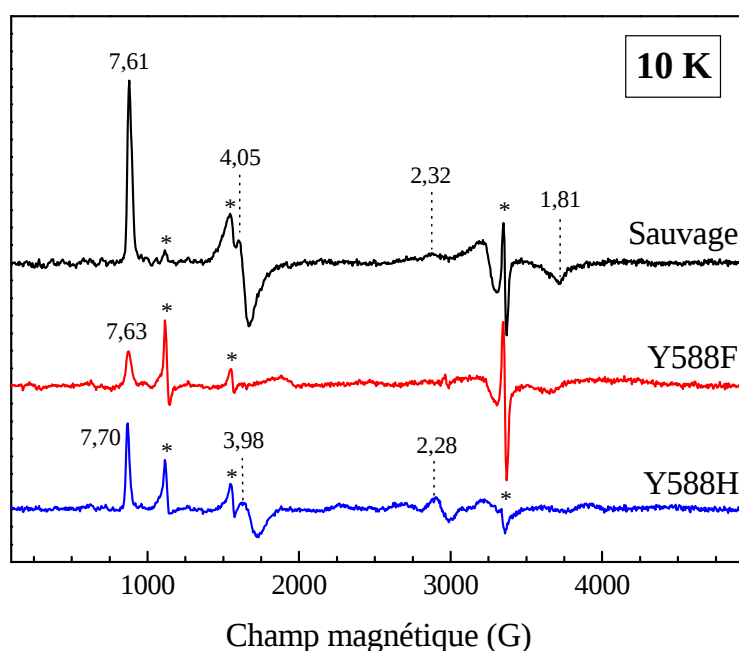


Figure III.6 : Spectres RPE de nNOS sauvage (noir) et des mutants Y588F (rouge) et Y588H (bleu) à l'état Fe^{III} en présence de H_4B à 10 K.

Pour nNOS sauvage (en noir figure III.6), le spectre montre un signal intense associé à la forme HS à $g = 7,61$ et un signal très peu intense associé à la forme BS à $g = 2,32$. Pour les mutants Y588F et Y588H, le spectre montre également les caractéristiques d'un mélange des formes HS et BS, mais les intensités des signaux respectifs sont différentes.

Pour le mutant Y588H (en bleu figure III.6), on observe un signal d'intensité moyenne à $g = 7,70$ caractéristique de la forme HS. L'intensité de ce signal est plus faible que celle du signal correspondant chez l'enzyme sauvage ce qui indique que la forme HS est moins présente chez le mutant Y588H que chez l'enzyme sauvage. En revanche, le signal à $g = 2,28$ caractéristique de la forme BS est nettement plus intense chez le mutant Y588H que chez

l'enzyme sauvage. Ces résultats indiquent que dans les conditions de mesure des spectres RPE, l'équilibre entre les formes HS et BS est plus déplacé en faveur de la forme BS dans le cas du mutant Y588H que dans le cas de l'enzyme sauvage.

Le signal observé pour le mutant Y588F (en rouge figure III.6) est également caractéristique d'un mélange des formes HS et BS, mais l'intensité générale du signal est beaucoup plus faible.

Le signal $g_y \sim 4,0$ de la forme HS est souvent difficile à observer en raison de la présence à $g = 4,3$ d'un signal assez intense (signal marqué d'une étoile, figure III.6) correspondant à une faible concentration de Fe^{III} HS libre dans la solution, c'est-à-dire dans un environnement rhombique isotrope [195]. Dans le cas des solutions de NOS entière (domaine oxygénase et domaine réductase), on observe également un signal intense et très fin à $g = 2$ (signal marqué d'une étoile, figure III.6) qui est attribué à un radical de flavo-semiquinone, probablement $FMNH^\bullet$ [56]. Le signal d'intensité variable à $g = 6$ (signal marqué d'une étoile, figure III.6) a déjà été décrit mais n'est pas attribué jusqu'à présent [195]. Il est possible que ce signal corresponde à de l'hème dissocié de la protéine et présent dans la solution, le Fe^{III} HS se trouve alors dans un environnement de symétrie axiale (Annexe 2).

On peut remarquer que le signal à $g = 2$ associé à un radical de flavine est intense pour nNOS sauvage et très intense pour le mutant Y558F. Au contraire, ce signal est très faible dans le cas du mutant Y588H.

Enregistrement à 35 K

Le signal des formes HS n'est pas visible à 35 K (Annexe 2), on observe donc uniquement le signal des formes BS. Pour nNOS sauvage (en noir figure III.7), le signal enregistré est d'intensité très faible, ce qui empêche de déterminer précisément la position des différentes contributions du signal, seule la partie centrale du signal à $g = 2,32$ peut être identifiée. Les spectres enregistrés pour les deux mutants montrent un signal BS beaucoup plus intense (figure III.7), ce qui indique que les deux mutants présentent une proportion de forme BS à l'état natif plus importante que l'enzyme sauvage.

Le signal observé pour les deux mutants comporte des contributions multiples, en particulier pour le mutant Y588F (en rouge figure III.7) avec des contributions supplémentaires à $g = 2,60$, $2,39$ et $2,30$ et pour le mutant Y588H (en bleu figure III.7) qui présente plusieurs signaux larges. Ces résultats indiquent qu'il existe vraisemblablement plusieurs espèces pour le complexe BS de chaque mutant.

Ces résultats sont cohérents avec celui obtenu à 10 K et montrent que l'équilibre entre les formes HS et BS est plus déplacé en faveur de la forme BS chez les deux mutants à l'état natif que chez l'enzyme sauvage à l'état natif.

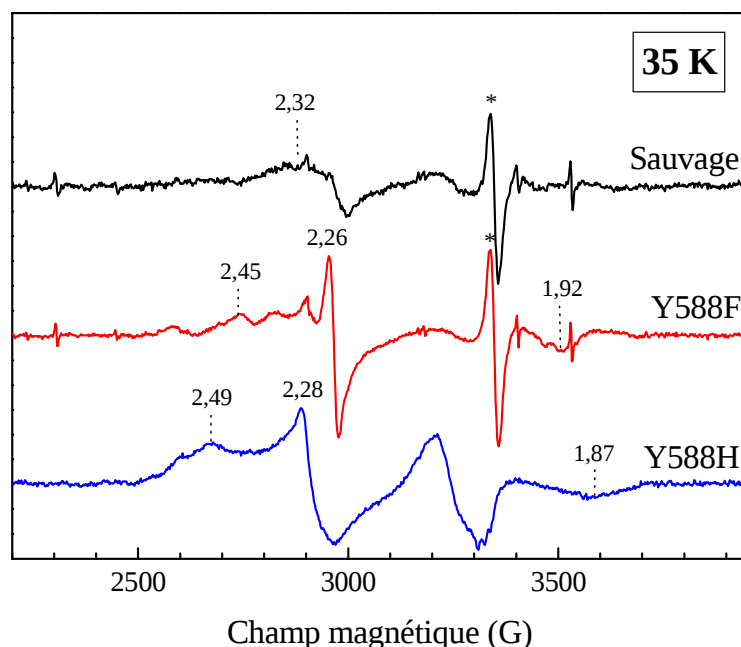


Figure III.7 : Spectres RPE de nNOS sauvage (noir) et des mutants Y588F (rouge) et Y588H (bleu) à l'état Fe^{III} en présence de H_4B à 35 K.

Comme pour les spectres enregistrés à 10 K, on observe également à 35 K que le signal à $g = 2$ associé à un radical de flavine (signal marqué d'une étoile, figure III.7) est intense pour nNOS sauvage et pour le mutant Y588F, alors qu'il est absent dans le cas du mutant Y588H. Il est possible que cette différence d'intensité traduise un état d'équilibre du système de flavines du domaine réductase différent chez le mutant Y588H de chez nNOS sauvage et le mutant Y588F.

Modifications de la géométrie de l'hème

La rhombicité de l'environnement du fer peut être évaluée à partir des valeurs mesurées pour les différentes composantes du tenseur g (Annexe 2).

Pour les formes Fe^{III} HS, la rhombicité de l'hème est évaluée par le calcul du rapport E/D [237-239] : pour un rapport E/D=0 la géométrie est parfaitement axiale, plus le rapport E/D est grand plus la géométrie est rhombique. Ces valeurs calculées (table III.2) montrent que la mutation Y588F affecte peu la rhombicité de l'hème par rapport à la nNOS sauvage, en revanche le mutant Y588H présente une légère augmentation de la rhombicité, ce qui indique

que la mutation Y588H provoque un changement sensible de géométrie du site actif par rapport à la nNOS sauvage.

	g_x	g_y	g_z	E/D
nNOS	7,61	4,05	1,81	0,074
nNOS Y588F	7,63	4,02	nd	0,075
nNOS Y588H	7,70	3,98	nd	0,078
nNOS [195]	7,65	4,04	1,8	0,075
iNOS _{ox} [196]	7,69	4,0	1,77	0,077
eNOS [236]	7,67	4,34	1,84	0,070
P450 [238]	8,02	3,68	1,71	0,090

Table III.2 : Composantes du tenseur g et paramètres de rhombicité pour les espèces Fe^{III} HS de plusieurs protéines à hème-thiolate (nd=non détecté).

Pour les formes Fe^{III} BS, la rhombicité de l'environnement du fer est évaluée par le calcul du rapport V/Δ [237-239]. Les paramètres de champ rhombique V et de champ tétraédrique Δ obtenus (table III.3) montrent que les formes BS des deux mutants présentent une géométrie fortement rhombique. Dans les formes BS, le sixième ligand du fer est une molécule d'eau, ces résultats indiquent donc que les deux mutations Y588F et Y588H entraînent des modifications importantes dans la géométrie locale du fer 6-coordiné probablement dues à des modifications du réseau de molécules d'eau au sein du site actif de la nNOS.

	g_z	g_y	g_x	V	Δ	V/Δ
nNOS	nd	2,32	nd	-	-	-
nNOS Y588F	2,45	2,26	1,92	2,94	6,14	0,479
nNOS Y588H	2,49	2,28	1,87	2,40	5,27	0,455
nNOS [195]	2,43	2,28	1,89	2,01	5,63	0,357
iNOS _{ox} [196]	2,42	2,28	1,9	1,98	5,78	0,343
eNOS [236]	2,45	2,3	1,87	1,73	5,23	0,331

Table III.3 : Composantes du tenseur g et paramètres de rhombicité pour les espèces Fe^{III} BS de plusieurs isoformes de NOS (nd=non détecté).

L'ensemble de ces résultats montre que les mutations Y588F et Y588H modifient de manière sensible l'environnement du fer et la géométrie de l'hème à l'état natif de la protéine. Le résidu Tyr588 n'interagit pas directement avec l'hème, mais la capacité des mutations de ce

résidu à modifier l'état de spin et la rhombicité du fer montre clairement que le résidu Tyr588 est directement impliqué dans la conformation précise de la poche distale du site actif et de son réseau de molécules d'eau.

3. Reconnaissance des substrats naturels et d'analogues de substrats

3.1. Affinité pour l'imidazole

Comme la nNOS sauvage, les mutants Y588F et Y588H forment en présence d'imidazole un complexe Fe^{III} BS. Ce complexe présente en spectroscopie d'absorption UV-visible un pic de Soret à 430 nm caractéristique des complexes d'enzyme à hème-thiolate 6-coordinés avec un sixième ligand azoté.

L'affinité des nNOS sauvage, Y588F et Y588H pour l'imidazole a été déterminée par spectroscopie d'absorption UV-visible différentielle [110] en utilisant un modèle hyperbolique de type Michaelis (voir II.3.1. et annexe 1). Les résultats obtenus montrent que les mutants Y588F et Y588H ont respectivement une affinité pour l'imidazole 3 fois et 2 fois plus faible que celle de la nNOS sauvage (table III.4).

nNOS WT	nNOS Y588F	nNOS Y588H
30 μM	100 μM	70 μM

Table III.4 : Constantes de dissociation des nNOS sauvage, Y588F et Y588H complexées avec l'imidazole.

Cependant, les trois valeurs de K_s pour l'imidazole sont du même ordre de grandeur. En effet, l'imidazole se fixe dans la poche du site actif par complexation directe avec l'hème en tant que sixième ligand du fer. Des modifications fines de la conformation du site actif, comme des changements locaux des résidus susceptibles d'engager des liaisons hydrogène, ne peuvent modifier que légèrement la capacité de l'imidazole à complexer le fer. Seules des modifications directes de l'hème ou un blocage complet du canal d'accès au site actif sont susceptibles de modifier de manière importante l'affinité de la protéine pour un ligand direct du fer comme l'imidazole.

3.2. Affinités pour les substrats naturels et des analogues de substrats

Les composés testés sont des analogues de L-Arg et de NOHA dont la fonction guanidine ou hydroxy-guanidine est conservée mais la partie amino-acide modifiée.

Les solutions de nNOS sont préalablement saturées avec des concentrations en imidazole égales à 5 fois la constante de dissociation de l'enzyme pour l'imidazole, c'est-à-dire 150 μ M pour la nNOS sauvage, 500 μ M pour le mutant Y588F et 350 μ M pour le mutant Y588H. Chacun des composés testés s'est montré capable de déplacer l'équilibre de complexation de l'imidazole en se fixant au niveau du site actif, ce qui s'observe par la disparition du pic d'absorption à 430 nm caractéristique du complexe BS hème-ImH et l'apparition d'un pic vers 390 à 395 nm caractéristique du complexe HS.

L'affinité des nNOS sauvage, Y588F et Y588H pour différentes guanidines et hydroxy-guanidines a donc été déterminée par spectroscopie d'absorption UV-visible différentielle en utilisant un modèle de compétition sur un site d'occupation unique de type Michaelis (voir II.3.1. et annexe 1). L'erreur sur les valeurs de K_S obtenues est estimée à environ ± 10 % dans le cas de l'enzyme sauvage et du mutant Y588F. En revanche dans le cas du mutant Y588H l'erreur relative est plus importante (jusqu'à ± 40 %) en raison de la faible stabilité de ce mutant en solution.

Les valeurs de K_S mesurées sont obtenues sur une échelle de 4 ordres de grandeur (table III.5). En effet, les analogues de L-Arg et de NOHA testés ont tous conduit à la formation d'un complexe HS, caractérisé en spectroscopie d'absorption UV-visible par un pic de Soret vers 395 nm, ce qui signifie qu'aucun de ces composés n'est ligand direct du fer, mais qu'au contraire ils se fixent tous dans le site actif grâce à un réseau d'interactions faibles, comme des liaisons hydrogène ou des interactions de Van der Waals, d'une manière similaire au mode de fixation de L-Arg et de NOHA. Des modifications fines dans ce réseau d'interactions, dues à des modifications de la chaîne latérale du composé, à des perturbations des interactions avec les propionates de l'hème ou à des changements locaux des résidus susceptibles d'engager des liaisons hydrogène, peuvent donc être responsables de variations très importantes dans l'affinité de la nNOS pour le composé testé.

Affinité pour les substrats naturels

On constate tout d'abord que chacune des trois nNOS a la même affinité pour L-Arg que pour NOHA, ce qui indique que le remplacement de la fonction guanidine par une fonction

hydroxy-guanidine ne modifie pas de manière significative le mode de positionnement du substrat dans le site actif.

En revanche, le mutant Y588F présente une affinité 10 fois plus faible et le mutant Y588H une affinité 100 fois plus faible pour ces deux substrats que l'enzyme sauvage. La modification des liaisons hydrogène entre le résidu 588 et la fonction amino-acide du substrat peut à elle seule expliquer la perte d'affinité du mutant Y588F pour L-Arg et NOHA. La perte d'affinité encore plus importante du mutant Y588H pour ces deux substrats est probablement due au changement de conformation du site actif observé par RPE pour ce mutant.

Pour la nNOS sauvage comme pour les deux mutants, on constate également que L-Arg et NOHA sont les composés les mieux reconnus par l'enzyme, ce qui indique que l'évolution du génome des mammifères a permis d'optimiser la structure protéique des NOS de manière à assurer une excellente reconnaissance des substrats naturels.

	K _S WT (μM)	K _S Y588F (μM)	K _S Y588H (μM)
Arginine	0,12	1,1	10
Homo-arginine	1,5	12	140
Arg-COOMe	5,0	30	22
Arg-CO-NH-OH	16	5,6	110
HOOC-(CH ₂) ₄ -gua	10	25	16
NH ₂ -(CH ₂) ₄ -gua	4,9	11	83
NO ₂ -(CH ₂) ₃ -gua	16	16	14
NO ₂ -(CH ₂) ₄ -gua	26	92	140
CF ₃ -(CH ₂) ₃ -gua	47	> 500	> 500
HO-(CH ₂) ₄ -gua	130	> 500	~ 500
NOHA	0,14	1,3	10
HOOC-(CH ₂) ₄ -NOHG	> 500	> 500	~ 260
NH ₂ -(CH ₂) ₄ -NOHG	7,7	9,9	18
CF ₃ -(CH ₂) ₃ -NOHG	36	97	~ 320
n-pentyl-NOHG	24	150	~ 480
n-butyl-NOHG	11	19	120
n-propyl-NOHG	10	8,8	15
isopropyl-NOHG	6,0	4,9	14
cyclopropyl-NOHG	16	7,0	14

Table III.5 : Constantes de dissociation des nNOS sauvage, Y588F et Y588H complexées avec différents analogues de L-Arg et de NOHA.

Affinité pour l'homo-arginine

L'homo-arginine est une molécule identique à l'arginine mais pour laquelle la chaîne carbonée qui sépare la fonction guanidine de la fonction α -amino-acide est plus longue d'un carbone. Dans le cas de la nNOS sauvage comme dans celui des deux mutants, on constate que l'affinité pour l'homo-arginine est 10 fois plus faible que l'affinité pour l'arginine.

On en déduit que la cavité du site actif de la nNOS est de taille optimale pour assurer la reconnaissance de l'arginine mais trop petite pour assurer une aussi bonne reconnaissance de l'homo-arginine. L'allongement de la chaîne latérale oblige en effet l'homo-arginine à adopter une conformation repliée contrainte stériquement de manière à conserver les liaisons hydrogène avec les résidus du site actif qui maintiennent l'extrémité guanidine au voisinage du fer et l'extrémité α -amino-acide au voisinage des propionates de l'hème (structure PDB 1DM7).

On en déduit également que, malgré les distorsions provoquées par les mutations, la taille globale du site actif ne doit pas varier de manière notable entre la nNOS sauvage et les deux mutants Y588F et Y588H, puisque le rapport des affinités de l'arginine et de l'homo-arginine est le même pour les trois protéines.

Affinité pour des analogues dont la fonction α -amino-acide est modifiée

Dans tous les cas, la modification de la fonction α -amino-acide entraîne une baisse de l'affinité de la protéine pour le composé par rapport à L-Arg ou à NOHA.

Lorsqu'on remplace l'arginine par son ester méthylique (Arg-COOMe), la constante d'affinité de la nNOS sauvage est multipliée par 50, celle du mutant Y588F est multipliée par 30 alors que celle du mutant Y588H est seulement multipliée par 2. En effet, la fonction ester est un moins bon accepteur de liaison hydrogène que la fonction carboxylate de l'arginine, ce remplacement a donc un effet important sur la nNOS sauvage où de nombreuses liaisons hydrogène sont engagées entre le carboxylate, les propionates de l'hème et les résidus du site actif, un effet légèrement moins important sur le mutant Y588F où la liaison avec le résidu 588 est manquante, et un effet très faible sur le mutant Y588H où la forte distorsion du site actif a déjà déstructuré le réseau de liaisons hydrogène.

Lorsqu'on remplace la fonction carboxylate par la fonction hydroxamate (Arg-CO-NH-OH), l'affinité de l'enzyme sauvage est divisée par 100, alors que l'affinité du mutant Y588F n'est divisée que par 5 et celle du mutant Y588H divisée par 10. Le mutant Y588F a donc une meilleure affinité pour l'arginine-hydroxamate que l'enzyme sauvage. Il est possible que l'absence du groupe hydroxyle sur le résidu 588 chez le mutant Y588F permette à la fonction

hydroxamate d'avoir la place de se positionner de manière à établir des liaisons hydrogène supplémentaires avec les résidus voisins et les propionates de l'hème, lui assurant une bonne reconnaissance par la protéine. Au contraire, chez l'enzyme sauvage la présence du groupe hydroxyle entraînerait une contrainte stérique plus forte sur l'extrémité hydroxamate ce qui induirait la faible affinité de l'enzyme sauvage pour ce composé.

Dans tous les cas, lorsqu'on supprime la fonction carboxylate ou la fonction amine de L-Arg ou de NOHA, l'affinité de la nNOS pour le composé est fortement diminuée. De même, lorsqu'on remplace complètement la fonction α -amino-acide par un autre groupe fonctionnel, comme OH, NO₂ ou CF₃, on observe une forte diminution de l'affinité des trois nNOS pour le composé jusqu'à une absence de reconnaissance. En effet, la délétion d'une partie de la fonction α -amino-acide ou son remplacement par un autre groupe fonctionnel entraînent à la fois une modification du caractère accepteur ou donneur de liaison hydrogène du composé et un changement important de conformation de la chaîne latérale, ce qui induit probablement un réarrangement complet du positionnement de l'analogue dans le site actif.

Ces résultats montrent le rôle essentiel de la fonction α -amino-acide dans la reconnaissance du composé bien qu'elle n'intervienne absolument pas dans la transformation du substrat en NO, ce qui souligne l'importance des interactions de la fonction α -amino-acide avec les propionates de l'hème et les résidus du site actif.

Affinité pour des alkyl-hydroxyguanidines

Nous avons également testé des analogues dérivés de NOHA pour lesquels la fonction α -amino-acide est complètement supprimée. Le mode de fixation de ces analogues dans le site actif des NOS est différent du mode de fixation de NOHA (voir III.1.2) : l'extrémité hydroxy-guanidine est fixée à proximité du fer par des liaisons hydrogène avec les résidus Glu592, Trp587 et Gly586 comme dans le cas de NOHA, mais la chaîne latérale alkyle ne se positionne pas à proximité des propionates de l'hème, au contraire elle se replie en direction d'une poche hydrophobe au-dessus de l'hème formée par les résidus Pro565 et Val567.

La longueur de la chaîne alkyl semble être le facteur dominant dans la reconnaissance des alkyl-hydroxyguanidines par la nNOS sauvage et par les deux mutants. On constate que les trois enzymes ont pratiquement la même affinité pour les trois alkyl-hydroxyguanidines les plus petites (cyclopropyl-, isopropyl- et n-propyl-NOHG), ce qui indique que la chaîne latérale de ces composés interagit avec une partie du site qui est assez peu affectée par la

mutation du résidu 588, probablement la cavité hydrophobe formée par les résidus Pro565 et Val567.

Lorsqu'on augmente la longueur de la chaîne alkyle, les contraintes stériques entre la poche hydrophobe et la chaîne alkyle sont de plus en plus fortes, ce qui diminue l'affinité de la protéine pour le composé. L'affinité de la nNOS sauvage et du mutant Y588F reste bonne pour la n-butyl-hydroxyguanidine, mais est divisée par 10 dans le cas du mutant Y588H. L'affinité pour la n-pentyl-hydroxyguanidine est un peu diminuée par rapport aux plus petits composés dans le cas de la nNOS sauvage, divisée par 10 dans le cas du mutant Y588F et divisée par environ 50 dans le cas du mutant Y588H. Ces résultats montrent que les changements de géométrie induits par la mutation Y588F au niveau du site actif, et plus particulièrement au niveau de la poche hydrophobe, sont faibles : seul le composé le plus grand est gêné dans ses interactions avec la poche hydrophobe. Au contraire, la mutation Y588H induit des changements de conformation plus importants qui affectent l'ensemble du site actif : seuls les alkyl-hydroxyguanidines les plus petites sont bien reconnues par le mutant Y588H.

3.3. Étude de la reconnaissance par spectroscopie RPE

Afin de compléter l'étude du mode de fixation des analogues de substrats dans le site actif de la nNOS, nous avons réalisé les spectres RPE de la nNOS sauvage et du mutant Y588F en présence d'arginine et d'imidazole. Les échantillons d'enzyme utilisés contiennent 5 μ M de cofacteur H₄B, l'arginine et l'imidazole sont ajoutés à une concentration finale de 10 mM ce qui permet de saturer l'échantillon. Le spectre RPE des échantillons est enregistré à 10 K $\pm$ 2 K pour l'observation du mélange des formes HS et BS, et à 35 K $\pm$ 2 K où seul le signal des formes BS peut être observé (voir II.1.5.).

Nous n'avons pas réalisé les spectres RPE du mutant Y588H car la préparation des échantillons nécessite de grandes quantités de protéine dont nous ne disposons pas en raison des difficultés rencontrées lors de l'expression et de la purification de ce mutant.

nNOS sauvage

Le signal obtenu par spectroscopie RPE confirme les résultats obtenus par spectroscopie d'absorption UV-visible à température ambiante. En effet en présence du cofacteur H₄B seul l'intensité du signal à $g = 2,32$ associé à la forme BS est faible et ce signal disparaît complètement en présence d'arginine (figure III.8). Dans le même temps, le signal associé à

la forme HS à $g \sim 7,6$, intense en présence de H_4B seul, devient encore plus intense lorsqu'on ajoute de l'arginine, ce qui indique que l'équilibre entre les formes HS et BS est déplacé par la présence d'arginine qui conduit à la conversion de la totalité de la population sous forme HS.

La rhombicité de la forme HS en présence d'arginine et de H_4B est légèrement plus grande qu'en présence du cofacteur H_4B seul (table III.6) ce qui montre que ces deux formes HS sont des formes distinctes.

Comme attendu, l'addition d'imidazole déplace l'équilibre entre les formes HS et BS en faveur de la forme BS (figure III.8). Cependant, le signal associé à la forme HS ne disparaît pas complètement, ce qui est en accord avec l'affinité de la nNOS beaucoup plus faible pour l'imidazole que pour l'arginine.

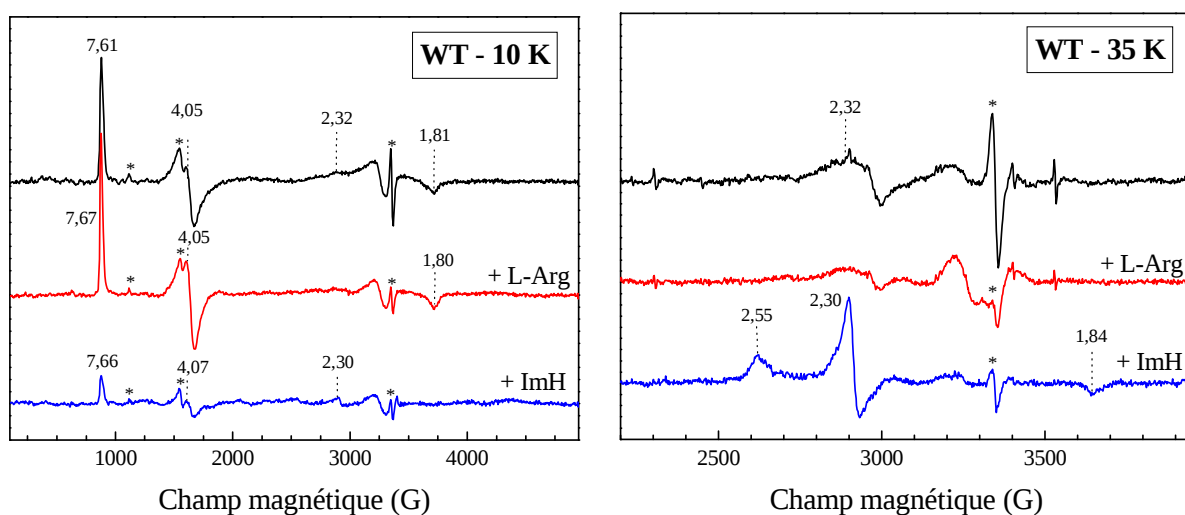


Figure III.8 : Spectres RPE de nNOS sauvage à l'état Fe^{III} en présence de H_4B (noir), de H_4B et d'arginine (rouge), de H_4B et d'imidazole (bleu).

nNOS WT

	g_x	g_y	g_z	E/D		
native	7,61	4,05	1,81	0,074		
HS + L-Arg	7,67	4,05	1,80	0,075		
+ ImH	7,66	4,07	1,82	0,075		
	g_z	g_y	g_x	V	Δ	V/ Δ
native	nd	2,32	nd	-	-	-
BS + L-Arg	nd	nd	nd	-	-	-
+ ImH	2,55	2,30	1,84	2,304	4,771	0,483

Table III.6 : Composantes du tenseur g et paramètres de rhombicité pour les espèces Fe^{III} HS et BS de la nNOS sauvage.

Mutant Y588F

En présence de cofacteur H_4B seul, le signal associé à la forme HS à $g \sim 7,6$ est assez intense chez nNOS sauvage et beaucoup plus faible chez le mutant Y588F, ce qui indique que l'équilibre entre les formes HS et BS est plus déplacé en faveur de la forme BS chez le mutant que chez l'enzyme sauvage. Cependant, l'addition d'arginine provoque le déplacement de l'équilibre et la conversion de la totalité de l'échantillon sous forme HS, chez le mutant Y588F comme chez l'enzyme sauvage, ce qui s'observe par la disparition complète du signal associé à la forme BS et par la forte augmentation du signal associé à la forme HS (figure III.9).

Le signal obtenu pour la forme HS du mutant Y588F en présence d'arginine est très similaire au signal de la forme HS l'enzyme sauvage en présence d'arginine (tables III.6 et III.7). Ces résultats montrent que le mutant Y588F est capable de fixer l'arginine selon une conformation très proche de celle de l'enzyme sauvage bien que la conformation du site actif en l'absence de substrat soit assez différente de celle de l'enzyme sauvage.

L'addition d'imidazole déplace l'équilibre entre les formes HS et BS pratiquement totalement en faveur de la forme BS, ce qui s'observe par une forte diminution de l'intensité du signal associé à la forme HS et par une augmentation importante de l'intensité du signal associé à la forme BS (figure III.9). En l'absence de substrat le spectre RPE à 35 K du mutant Y588F présente des contributions multiples qui indiquent qu'il existe plusieurs espèces pour le complexe BS. Au contraire en présence d'imidazole le signal de la forme BS présente une seule contribution bien déterminée qui montre que la structure est plus homogène avec des interactions plus spécifiques.

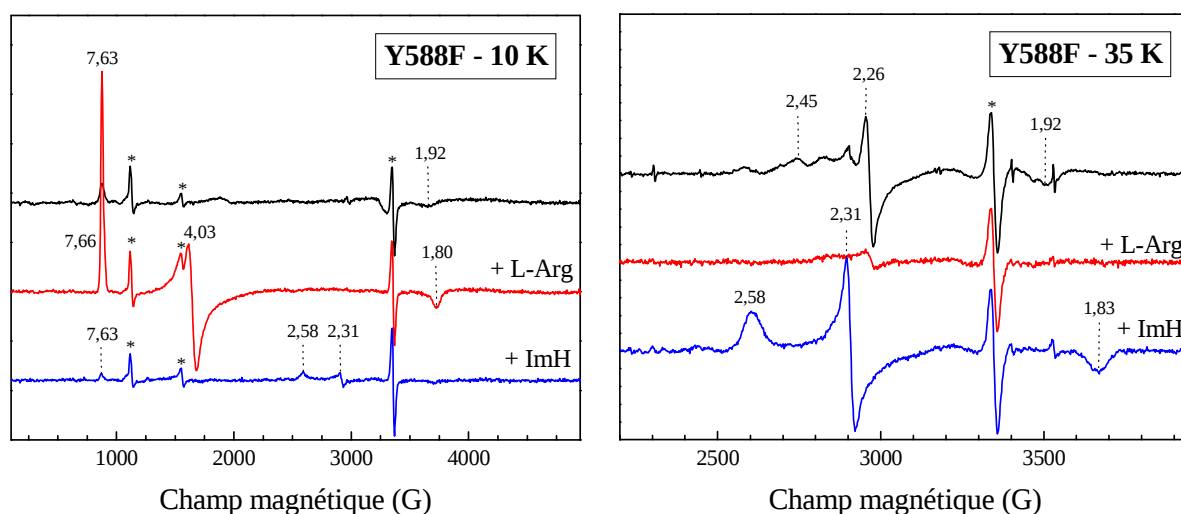


Figure III.9 : Spectres RPE de nNOS Y588F à l'état Fe^{III} en présence de H_4B (noir), de H_4B et d'arginine (rouge), de H_4B et d'imidazole (bleu).

nNOS Y588F

		g_x	g_y	g_z	E/D		
HS	native	7,63	4,02	nd	0,075		
	+ L-Arg	7,66	4,03	1,80	0,076		
	+ ImH	7,63	nd	nd	-		
		g_z	g_y	g_x	V	Δ	V/ Δ
BS	native	2,45	2,26	1,92	2,94	6,14	0,479
	+ L-Arg	nd	2,26	nd	-	-	-
	+ ImH	2,58	2,31	1,83	2,295	4,602	0,499

Table III.7 : Composantes du tenseur g et paramètres de rhombicité pour les espèces Fe^{III} HS et BS de la nNOS Y588F.

Ces résultats montrent que, malgré les différences observées à l'état natif entre la nNOS sauvage et le mutant Y588F, la conformation adoptée par le site actif du mutant Y588F est très similaire à celle de l'enzyme sauvage à la fois en présence de substrat et en présence d'un inhibiteur de NOS. Nous pouvons en déduire que, malgré l'absence de l'extrémité hydroxyle du résidu 588 dans le cas du mutant Y588F, le substrat L-Arg est capable de structurer fortement le site actif du mutant et de conduire à une conformation très proche de la conformation induite par la fixation de L-Arg dans le site actif de l'enzyme sauvage.

4. Effets des mutations sur l'activité enzymatique des mutants Y588X

4.1. Méthodes de détection de l'activité NO-synthase

Les résultats d'activité spécifique de formation de NO que nous avons obtenus ne sont pas en accord avec les résultats publiés au sujet des mutants Y588F et Y588H de nNOS [230]. L'étude précédente réalisée au sujet des mutants Y588F et Y588H de nNOS ne mentionne qu'une seule méthode de détermination de l'activité spécifique de formation de NO : seule la détection par le test à l'hémoglobine par suivi direct de l'absorption UV-visible à 401 nm a été utilisée (II.1.3.2). Nous estimons que cette méthode de détermination de l'activité spécifique de formation de NO est peu fiable. En effet, l'absorption UV-visible de la solution d'oxyhémoglobine est susceptible de varier assez fortement au cours du temps en absence de

NO en fonction des produits qui sont ajoutés dans la solution. Le suivi de l'absorbance à une seule longueur d'onde ne permet donc pas de distinguer les dérives du spectre dus à ces phénomènes complexes de la formation réelle de méthémoglobine due à la présence de NO.

C'est pourquoi nous avons mis un soin particulier à vérifier la validité de nos résultats : nous avons utilisé trois méthodes différentes afin de déterminer l'activité de formation de NO de la nNOS sauvage et des mutants Y588F et Y588H.

Nous avons également utilisé la méthode du test à l'hémoglobine (II.1.3.2) qui consiste à mesurer la transformation d'oxyhémoglobine en méthémoglobine en présence de NO, mais nous avons réalisé nos mesures par spectroscopie différentielle d'absorption UV-visible en observant l'apparition symétrique d'un pic à 401 nm et d'une vallée à 418 nm. Cette manière de mesurer l'apparition de méthémoglobine à deux longueurs d'onde différentes permet de s'assurer que l'évolution du spectre d'absorption UV-visible est bien causée par la transformation d'oxyhémoglobine en méthémoglobine et pas par des réactions parasites. De plus, nous avons d'une part réalisé chaque mesure au moins trois fois avec le test à l'hémoglobine à deux longueurs d'onde et d'autre part vérifié les résultats obtenus grâce à deux autres méthodes de détection de l'activité NO-synthase.

Le test au Fe(DETC)_2 (II.1.3.3.) permet de s'assurer que l'espèce détectée est bien du NO. En effet en présence de NO, le complexe ferreux Fe(DETC)_2 réagit quantitativement pour former le complexe paramagnétique $\text{Fe(DETC)}_2\text{-NO}$ qui présente un signal caractéristique en spectroscopie RPE [191].

Le test de formation de citrulline marquée (II.1.3.4.) ne repose pas sur la détection du NO formé mais sur la mesure de la transformation de l'arginine marquée. Cette méthode présente donc l'avantage de ne pas être dépendante des diverses réactions que peut subir NO en solution (I.1.) et qui diminuent potentiellement la quantité de NO mesurée par rapport à la quantité réelle de NO produite par l'enzyme. Cette méthode nécessite néanmoins de disposer de composés radiomarqués et n'a été utilisée que pour vérifier l'activité NO-synthase à partir du substrat naturel L-Arg.

Les trois méthodes de détection de l'activité NO-synthase que nous avons utilisées (test à l'hémoglobine à deux longueurs d'onde, test au Fe(DETC)_2 et test de formation de citrulline marquée) ont donné quantitativement les mêmes résultats d'activité spécifique de formation de NO à partir de L-Arg. À partir de L-Arg-CO-NH-OH, de $\text{NO}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-gua}$, de NOHA, de n-butyl-NOHG, de n-propyl-NOHG, de cyclopropyl-NOHG et d'isopropyl-NOHG les deux

tests utilisés (test à l'hémoglobine à deux longueurs d'onde et test au Fe(DETC)₂) ont également donné des résultats similaires. Nous avons donc considéré comme valides nos résultats obtenus avec le test à l'hémoglobine à deux longueurs d'onde pour les autres analogues d'arginine et de NOHA.

4.2. Activité NO-synthase de nNOS

nNOS sauvage

Les résultats que nous avons obtenus pour l'enzyme sauvage correspondent aux résultats déjà publiés pour cette isoforme de NOS [178]. Très peu d'analogues de L-Arg sont capables d'être transformés en NO par nNOS. Seuls les analogues dont la fonction α -amino-acide a subi les plus faibles modifications (homo-arginine, ester méthylique d'arginine et arginine-hydroxamate) sont substrats de NO. Toute autre modification de la fonction α -amino-acide conduit à une absence totale de formation de NO.

Au contraire, les analogues de NOHA capables d'être transformés en NO sont plus nombreux. La famille des alkyl-hydroxyguanidines (F₃C-(CH₂)₃-NOHG, n-pentyl-NOHG, n-butyl-NOHG, n-propyl-NOHG, cyclopropyl-NOHG et isopropyl-NOHG) comporte de nombreux substrats de la nNOS sauvage avec des taux de transformation compris entre 30 et 70 % de celui de la NOHA. En revanche, les composés dont la fonction α -amino-acide a été modifiée sans être complètement supprimée (HOOC-(CH₂)₄-NOHG et H₂N-(CH₂)₄-NOHG) ne conduisent à aucune formation de NO.

Mutant Y588H

Les mesures réalisées montrèrent que le mutant Y588H que nous avons exprimé et purifié est totalement inactif : aucune formation de NO ou de citrulline marquée n'a été détectée même en présence de grandes concentrations de L-Arg ou de NOHA.

Mutant Y588F

Le mutant Y588F présente une activité NO-synthase en présence des substrats naturels L-Arg et NOHA ainsi qu'en présence de certains analogues des substrats naturels. L'activité spécifique du mutant a été comparée pour chaque composé à l'activité spécifique de l'enzyme sauvage (figure III.10).

De manière très intéressante, le mutant Y588F s'est révélé capable d'oxyder exactement les mêmes composés que l'enzyme sauvage, mais avec des taux d'activité 2 à 10 fois plus faibles. Parmi les analogues de L-Arg, seuls l'homo-arginine, l'ester méthylique d'arginine et l'arginine-hydroxamate ont conduit à une formation de NO. Parmi les analogues de NOHA, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_4\text{-NOHG}$ et $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4\text{-NOHG}$ ne sont pas substrats mais toutes les alkyl-hydroxy-guanidines testées conduisent à une formation de NO faible mais mesurable (figure III.10).

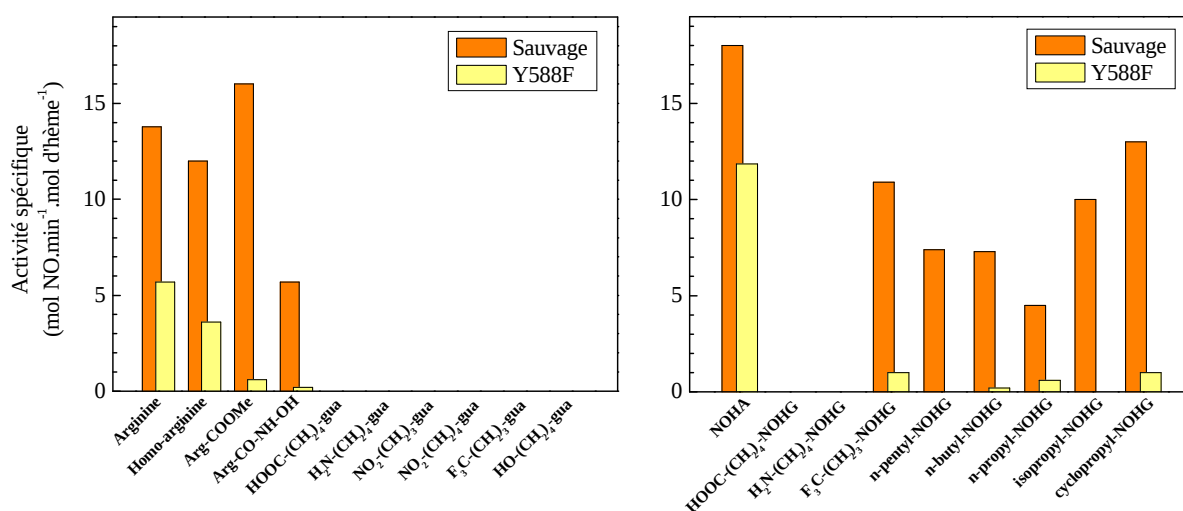


Figure III.10 : Activité spécifique de formation de NO à 30 °C de la nNOS sauvage et du mutant Y588F à partir de différentes guanidines et hydroxyguanidines, mesurée par le test à l'hémoglobine.

Ces résultats montrent que l'extrémité hydroxyle du résidu Tyr588 n'est pas absolument indispensable au fonctionnement de nNOS dans le déroulement de chacune des deux étapes du cycle catalytique. En effet, le mutant Y588F conserve une certaine capacité à transformer exactement les mêmes substrats que nNOS sauvage, guanidines comme hydroxyguanidines. Cependant, les taux de transformation en NO mesurés pour le mutant Y588F sont nettement inférieurs à ceux de l'enzyme sauvage, ce qui indique que le groupe hydroxyle du résidu Tyr888 est probablement impliqué dans la structuration précise du site actif et que son absence empêche un déroulement optimal du cycle catalytique.

5. Conclusions

5.1. Géométrie globale de la protéine

La bonne stabilité en solution du mutant Y588F ainsi que ses caractéristiques spectroscopiques semblables à celles de l'enzyme sauvage montrent que la délétion du groupe hydroxyle du résidu 588 n'a pas d'effet majeur ni sur la structure globale de la protéine ni sur la conformation générale du site actif. Au contraire, le mutant Y588H est beaucoup moins stable en solution que la nNOS sauvage et ses caractéristiques spectroscopiques montrent que le remplacement du cycle phénol par un cycle imidazole modifie à la fois la structure globale de l'enzyme et la conformation générale du site actif.

Le résidu tyrosine ($pK_R = 10,46$) et le résidu histidine ($pK_R = 6,04$) sont tous les deux non chargés à pH physiologique, cependant la tyrosine est légèrement acide avec un caractère donneur de liaison hydrogène alors que l'histidine est légèrement basique avec un caractère à la fois accepteur et donneur de liaison hydrogène.

Les structures de NOS obtenues par diffraction des rayons X montrent que le groupe hydroxyle du résidu Tyr588 pointe vers la cavité du site actif où il peut engager des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau ou avec le substrat, ce qui contribue à assurer une structuration optimale du site actif. Les résultats que nous avons obtenus montrent que la perturbation de cette structuration par la mutation Y588F n'induit pas de changement majeur dans la conformation générale de la protéine ce qui indique que la structuration précise des liaisons hydrogène au sein du site actif des NOS n'est pas indispensable au bon repliement de la protéine.

Au contraire du résidu Tyr588 qui ne peut établir de liaison hydrogène qu'avec l'intérieur de la cavité du site actif, au moins un des deux atomes d'azote du cycle imidazole de l'histidine dans le mutant Y588H pointe vers l'intérieur de la structure protéique où il peut engager des liaisons hydrogène avec les autres résidus qui entourent le site actif. Ces interactions hydrophiles avec les autres résidus ont probablement pour effet d'empêcher le repliement optimal de la protéine autour du site actif. La faible stabilité du mutant Y588H montre que le mauvais repliement de la protéine autour du site actif est suffisamment important pour entraîner une mauvaise stabilité de l'ensemble de la protéine. Un résidu 588 ne pouvant engager que des interactions hydrophobes avec les résidus voisins est donc probablement indispensable à la structuration correcte du squelette protéique de nNOS.

5.2. Structuration du site actif

En absence de substrat

Les résultats que nous avons obtenus par spectroscopie d'absorption UV-visible et par spectroscopie RPE montrent que, bien qu'elle conserve la structure globale de la protéine, la mutation Y588F a un effet direct sur l'équilibre entre les formes HS et BS de l'hème en l'absence de substrat. En effet en l'absence de substrat, le groupe hydroxyle du résidu Tyr588 établit une liaison hydrogène avec une molécule d'eau présente dans le site actif, ce qui participe à la structuration d'un réseau de molécules d'eau au sein du site actif. La délétion de ce groupe hydroxyle par la mutation Y588F perturbe le réseau de molécules d'eau. L'équilibre entre les formes HS et BS des NOS est gouverné par la présence ou l'absence d'une molécule d'eau suffisamment proche du fer pour pouvoir jouer le rôle de sixième ligand. Le déplacement de l'équilibre entre les formes HS et BS en faveur de la forme BS chez le mutant Y588F montre donc que le changement d'état de solvation du site actif au voisinage du résidu 588 est suffisamment important pour entraîner des modifications significatives au niveau de l'hème.

Les résultats de ce travail montrent donc à la fois que le résidu Tyr588 est clairement impliqué dans la structuration précise du réseau de molécules d'eau au sein du site actif des NOS et que ce réseau de molécules d'eau a un effet direct sur l'environnement immédiat du fer.

En présence de substrat

Malgré les modifications de l'équilibre entre les formes HS et BS en absence de substrat, le mutant Y588F est capable de fixer au niveau de son site actif les substrats naturels de NOS. Les résultats que nous avons obtenus par spectroscopie d'absorption UV-visible et par spectroscopie RPE montrent que la fixation de L-Arg ou d'un analogue de substrat provoque le rétablissement de l'équilibre en faveur de la forme HS, comme ce qui est observé chez l'enzyme sauvage. La présence d'un substrat ou d'un analogue de substrat dans le site actif semble donc rétablir les interactions spécifiques à l'intérieur de la cavité, qui adopte alors une conformation similaire à celle de l'enzyme sauvage.

Le rétablissement de la structuration par la présence d'un substrat ou d'un analogue de substrat n'est cependant pas complet. En effet, les caractéristiques RPE du mutant Y588F en

présence de L-Arg ne sont pas strictement identiques à celles de l'enzyme sauvage en présence de L-Arg. Ce résultat montre que l'absence de liaison hydrogène entre le résidu 588 et l'extrémité α -carboxylate de L-Arg entraîne des modifications légères mais tout de même suffisamment importantes pour être sensibles au niveau de l'hème.

Les résultats de ce travail montrent donc que le substrat est également impliqué dans la structuration précise du réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif des NOS et qu'une modification de ce réseau au niveau de la chaîne latérale du substrat est capable de modifier les caractéristiques de l'hème.

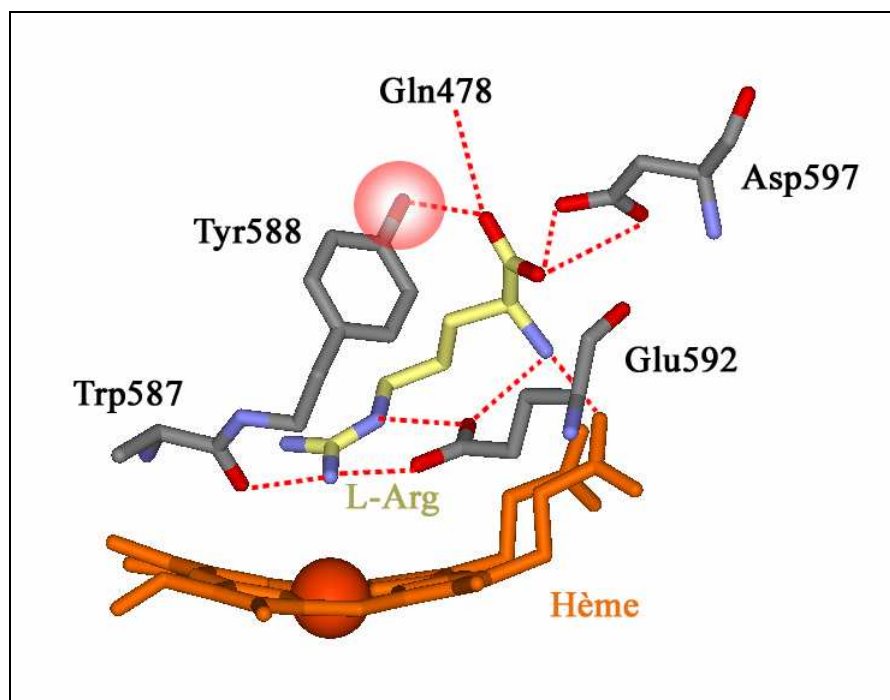


Figure III.11 : Représentation schématique du réseau de liaisons hydrogène dans le site actif des NOS (nNOS de rat), impliquant le substrat L-Arg et les résidus du site actif (gris).

5.3. Reconnaissance et transformation des substrats et analogues de substrats

Nous avons vu que la mutation Y588H entraîne probablement un mauvais repliement de la protéine, ce qui expliquerait la mauvaise stabilité du mutant Y588H. De manière cohérente, le mutant Y588H reconnaît mal à très mal les substrats naturels des NOS et la plupart des analogues testés, et il ne présente aucune trace d'activité de formation de NO, ce qui montre que la mauvaise structure de la protéine induite par la mutation est trop importante pour que l'enzyme reste active.

La mutation Y588F perturbe moins fortement le site actif de nNOS. La fixation de substrat ou d'analogue de substrat suffit en effet à rétablir au niveau du site actif une conformation similaire à celle de l'enzyme sauvage. Les résultats que nous avons obtenus montrent que ce mutant est capable de transformer en NO exactement les mêmes substrats que l'enzyme sauvage, guanidines comme hydroxy-guanidines, ce qui indique que la structuration du site actif induite par la fixation du substrat est un élément essentiel à l'activité de synthèse de NO de l'enzyme.

Cependant, les taux de transformation en NO mesurés pour le mutant Y588F sont nettement inférieurs à ceux de l'enzyme sauvage. Ces résultats montrent que le rétablissement de la structuration du site actif par la présence d'un substrat ne suffit pas à assurer complètement les fonctions de l'enzyme sauvage. Nous pouvons en déduire que le groupe hydroxyle du résidu Tyr888 intervient indirectement dans le déroulement du cycle catalytique des NOS.

Ces résultats sont en accord avec les données publiées qui montrent le rôle déterminant dans la synthèse et le relargage de NO du réseau de liaisons hydrogène entre les propionates de l'hème et le substrat [234, 240].

Il est 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 la nNOS pour le composé. Par exemple, L-Arg et NOHA ont pratiquement la même affinité pour le mutant Y588F mais NOHA a un taux de transformation en NO par ce mutant deux fois plus élevé que celui de L-Arg. De même, l'affinité du mutant Y588F pour NOHA est 10 fois plus faible que l'affinité de l'enzyme sauvage, pourtant l'activité de formation de NO n'est diminuée que d'un tiers. On constate même que les composés qui sont substrats ne sont pas forcément les composés pour lesquels l'enzyme a la meilleure affinité. Ainsi le composé $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NOHG}$ est mieux reconnu par la nNOS sauvage et par le mutant Y588F que la plupart des alkyl-hydroxyguanidines, pourtant il n'est substrat d'aucune de ces deux enzymes alors que toutes les alkyl-hydroxyguanidines le sont.

Ces résultats montrent que l'élément déterminant pour l'oxydation de la fonction guanidine ou hydroxyguanidine par nNOS n'est pas la stabilité des interactions entre le composé et le site actif. Il semble en effet que la capacité d'un analogue de substrat à être transformé en NO dépende beaucoup plus de sa capacité à structurer correctement le site actif que de sa capacité à se fixer dans le site actif. De plus, nos résultats montrent que les interactions entre la chaîne latérale de l'analogue de substrat et le résidu Tyr588 interviennent directement dans la structuration correcte du site actif.

Les résultats que nous avons obtenus montrent également que les guanidines sont beaucoup plus difficilement substrats de NOS que les hydroxyguanidines. Par exemple, le composé $F_3C-(CH_2)_3-NOHG$ est substrat de la nNOS sauvage et du mutant Y588F alors que la guanidine correspondante $F_3C-(CH_2)_3-gua$ ne conduit à aucune formation de NO. Ce résultat est en accord avec les données publiées [178] et montre clairement que les deux étapes du cycle catalytique des NOS sont différentes. Il est possible que la structuration précise du site actif induite par la fixation du substrat soit différente dans le cas des guanidines et dans le cas de hydroxyguanidines, ce qui expliquerait les différences de réactivité observées entre ces familles d'analogues.

L'ensemble de ces résultats montre que le résidu Tyr588 et le substrat sont deux éléments essentiels dans la structuration précise du site actif et du réseau de liaisons hydrogène à l'intérieur du site actif de nNOS. Des modifications fines dans la structuration de ce réseau de liaisons hydrogène au niveau de la chaîne latérale du substrat par modification du résidu Tyr588 ou par modification du substrat sont capables de modifier les caractéristiques de l'hème, et donc de modifier l'activité catalytique de nNOS.

Nos résultats montrent également que les deux étapes du cycle catalytique des NOS sont manifestement différentes. Il est extrêmement probable que les guanidines et les hydroxyguanidines induisent des structurations du site actif subtilement différentes, et que ces différences permettent au cycle catalytique d'emprunter deux chemins réactionnels distincts pour chacune des étapes du mécanisme.

Chapitre IV

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

L'implication de NO dans la régulation de plusieurs phénomènes physiologiques majeurs chez les mammifères et son rôle dans de nombreuses pathologies font de la compréhension précise du mécanisme des NO-synthases un enjeu pharmacologique de première importance. La découverte des pathologies liées à un dérèglement de l'activité NO-synthase a également constitué le point de départ de nombreuses études dont le but était de trouver de nouveaux substrats efficaces et des inhibiteurs spécifiques des NOS.

Les analogues des substrats naturels étudiés en tant que candidats dans la recherche de nouveaux substrats se sont révélés être de bons outils pour l'étude des différentes étapes du mécanisme des NOS. Ainsi, nous avons vu au chapitre III que la nature de la chaîne latérale du substrat ainsi que les résidus du site actif sont deux éléments essentiels dans la structuration du réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif des NOS.

L'objectif de ce travail est d'étudier plus précisément les interactions entre l'extrémité guanidine des analogues du substrat naturel L-Arg et le site actif des NOS afin de mieux comprendre le rôle du substrat dans ce réseau de liaison hydrogène, ce qui permettra à la fois une meilleure compréhension du mécanisme d'oxydation de L-Arg en NO par les NOS et d'avancer dans la recherche de nouveaux substrats des NOS.

1. Étude préliminaire : à la recherche de substrats de NOS

1.1. Spécificité de substrats des NOS

Un grand nombre de molécules comportant des fonctions CNH ou CNOH ont été synthétisés et étudiés en tant que substrats potentiels des NOS. En particulier, des composés dérivés de L-Arg et de NOHA ont fait l'objet de nombreuses recherches : guanidines et hydroxyguanidines monosubstituées ou disubstituées, mais aussi amidoximes, ketoximes et aldoximes [178]. Contrairement aux cytochromes P450 qui sont capables de catalyser des réactions d'oxydation sur un grand nombre de substrats différents, les NO-synthases ne se sont révélées capables de catalyser la transformation en NO que d'un nombre très limité de composés [86, 178] : seuls quelques composés comportant une fonction guanidine [178-180, 241] ou hydroxyguanidine [82, 181-184] se sont montrés susceptibles d'être oxydés en NO par les NOS.

Différentes études ont porté en particulier sur des analogues de L-Arg et de NOHA dont la chaîne latérale est plus ou moins modifiée : allongement, raccourcissement, cyclisation, ajout

ou retrait de groupes fonctionnels, remplacement par un groupe phényle portant un substituant de petite taille. Parmi toutes les guanidines et hydroxyguanidines testées, les substrats naturels L-Arg et NOHA se sont montrés les plus efficacement transformés en NO par les NOS.

La fonction hydroxyguanidine est relativement peu stable et s'oxyde facilement [185, 186] ce qui rend ces composés peu attractifs pour le développement de nouveaux médicaments donneurs de NO. Les recherches de substrats de NOS se sont donc orientées vers la famille des guanidines qui présentent l'avantage d'être moins facilement oxydables et plus stables en solution.

1.2. Oxydation de certaines guanidines non amino-acides par iNOS

De nombreux analogues d'arginine modifiés au niveau de la chaîne latérale ont été testés en tant que substrats potentiels de iNOS [178, 180, 242].

1.2.1. Production de NO

Les guanidines non amino-acides les plus efficacement transformées en NO sont la 4,4,4-trifluorobutyl-guanidine et la 4,4-difluorobutyl-guanidine avec environ 40 % d'activité par rapport à L-Arg, et la nitrobutyl-guanidine avec 25 % d'activité par rapport à L-Arg (table IV.1). D'autres analogues d'arginine ont également conduit à la formation de quantités mesurables de NO, comme les 4-fluorobutyl-guanidine, 3,3,3-trifluoropropyl-guanidine, n-butyl-guanidine, n-pentyl-guanidine et 3-méthyl-butyl-guanidine avec de 5 à 15 % d'activité par rapport à L-Arg. Aucune autre modification de la chaîne latérale de L-Arg n'a permis d'obtenir une guanidine capable d'être oxydée en NO par iNOS (table IV.1).

De nombreux analogues d'arginine de la famille des aryl-guanidines ont également été testés en tant que substrats potentiels de iNOS. En effet, plusieurs analogues de NOHA de la famille des aryl-hydroxyguanidine sont des substrats de iNOS [181, 183]. Cependant, aucune des aryl-guanidines testées n'a conduit à la formation de NO.

Des expériences de contrôle ont montré que l'oxydation de ces analogues d'arginine en NO requiert la présence de NADPH, de O₂ et de cofacteur H₄B, qu'elle est insensible à la présence de SOD ou de catalase et qu'elle est inhibée par la présence de N^o-nitro-L-Arg qui

est un inhibiteur de NOS, ce qui indique que l'oxydation de ces guanidines en NO est bien catalysée au niveau du site actif de iNOS et se déroule suivant un mécanisme semblable à celui de l'oxydation de L-Arg.

	% L-Arg		% L-Arg
HOOC-(CH ₂) ₄ -Gua	< 0,5	Cyclopropyl-Gua	< 0,5
NH ₂ -(CH ₂) ₄ -Gua	1	Cyclobutyl-Gua	< 0,5
n-ethyl-Gua	< 0,5	Cyclopentyl-Gua	< 0,5
n-propyl-Gua	< 0,5	CF ₃ -(CH ₂) ₂ -Gua	12
n-butyl-Gua	6	CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua	41
n-pentyl-Gua	14	CHF ₂ -(CH ₂) ₃ -Gua	41
n-hexyl-Gua	< 0,5	CH ₂ F-(CH ₂) ₃ -Gua	13
CH ₂ =CH-(CH ₂) ₂ -Gua	< 0,5	CF ₃ -(CF ₂) ₂ -CH ₂ -Gua	< 0,5
(CH ₃) ₂ -CH-(CH ₂) ₂ -Gua	9	HO-(CH ₂) ₄ -Gua	< 0,5
(CH ₃) ₃ -C-(CH ₂) ₂ -Gua	< 0,5	CH ₃ O-(CH ₂) ₂ -Gua	< 0,5
CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -Gua	< 0,5	CH ₃ O-(CH ₂) ₃ -Gua	< 0,5
(CH ₃) ₂ -CH-Gua	< 0,5	NO ₂ -(CH ₂) ₄ -Gua	24

Table IV.1 : Formation de NO par iNOS à partir d'analogues d'arginine (exprimée en pourcentage de la formation de NO par iNOS à partir de L-Arg) [178, 242].

1.2.2. Consommation d'électrons et découplage

La production de NO à partir de L-Arg nécessite l'apport de 3 électrons qui sont fournis par le NADPH *via* le domaine réductase (voir I.3.4.). Le NADPH étant un réducteur à 2 électrons, dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme le rapport entre la quantité de NO produit et la quantité de NADPH consommé est donc formellement de 1,5.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction (voir I.4.2.), au cours du cycle catalytique des NOS, certaines étapes peuvent devenir trop lentes ce qui favorise la décomposition spontanée des intermédiaires réactionnels en espèces activées de l'oxygène ou de l'azote et conduit à une consommation de NADPH accrue sans formation concomitante de NO. La première source possible de découplage se situe au niveau du domaine réductase de l'enzyme où les flavines sont susceptibles de s'oxyder en présence de O₂ [175, 243]. La deuxième source de découplage se situe au niveau du site actif de l'enzyme où les intermédiaires catalytiques Fe^{II}-O₂ et Fe^{III}-OOH peuvent conduire respectivement à la formation de superoxyde (O₂^{•-}) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [244, 245].

En l'absence de cofacteur et de substrat, les NOS possèdent une activité de consommation d'électrons non nulle. Cette activité est assez faible chez iNOS et eNOS, et importante chez nNOS. L'addition d'arginine et de H_4B permet de coupler la consommation d'électrons à la production de NO, ce qui a pour effet d'augmenter la consommation de NADPH dans le cas de iNOS et eNOS et de la diminuer dans le cas de nNOS [42, 60, 61, 174, 175, 243].

L'addition d'analogues d'arginine module également la consommation d'électrons, même dans le cas où l'analogue n'est pas capable d'être oxydé en NO. Les valeurs mesurées varient de 40 % à 200 % de la valeur mesurée en présence de L-Arg [242], mais il est difficile d'établir une corrélation entre la structure des analogues, leur caractère substrat ou non-substrat de iNOS et les valeurs de consommation d'électrons mesurées. Les résultats obtenus montrent toutefois une tendance générale à l'augmentation de la consommation d'électrons en présence des analogues d'arginine. Pour les analogues capables d'être oxydés en NO, le rapport entre la quantité de NO produit et la quantité de NADPH consommé varie de 3 à 18 [242], ce qui suggère que des espèces activées de l'oxygène ou de l'azote sont également produites en présence de ces substrats.

Des expériences contrôle en présence de SOD, de catalase, de ligands d'hème ou d'inhibiteurs du domaine réductase ont montré que la principale source du découplage observé se situe au niveau du site catalytique de l'enzyme [242] où les électrons consommés sont transférés vers le dioxygène et conduisent à la formation de $O_2^{\bullet -}$ et de H_2O_2 .

1.2.3. Le complexe $Fe^{II}-O_2$

Chez les NOS, le complexe $Fe^{II}-O_2$ formé au cours du cycle catalytique a tendance à se décomposer spontanément en Fe^{III} et $O_2^{\bullet -}$ ce qui constitue une source de découplage. La faible stabilité du complexe $Fe^{II}-O_2$ oblige les NOS à utiliser un donneur d'électron auxiliaire, le cofacteur H_4B , qui est capable de réduire le complexe $Fe^{II}-O_2$ plus vite qu'il ne s'autoxyde [108, 113, 114, 116-119]. Cette faible stabilité a également pour conséquence le fait que le complexe $Fe^{II}-O_2$ est le dernier intermédiaire catalytique facilement observable chez les NOS (voir I.3.4.).

Stabilité du complexe $Fe^{II}-O_2$

La dihydrobioptérine (H_2B) est un analogue de H_4B qui n'est pas capable de transférer un électron au complexe $Fe^{II}-O_2$. Des études de cinétique rapide en présence de H_2B permettent

donc d'observer le cycle catalytique des NOS jusqu'à la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, dont on peut alors suivre la cinétique d'autoxydation [116, 118, 246].

La présence d'arginine dans le site actif de l'enzyme permet de stabiliser le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ [113] probablement par l'intermédiaire de liaisons hydrogène engagées avec le dioxygène. Les études de cinétique rapide en présence de H₂B et de différents analogues d'arginine ont montré que la présence de ces guanidines dans le site actif de l'enzyme est également capable de moduler la vitesse d'autoxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ [180, 242] : en présence d'alkyl-guanidines, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ se décompose environ 10 fois plus vite qu'en présence d'arginine, la déstabilisation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ est encore plus importante en présence d'aryl-guanidines où la décomposition peut être jusqu'à 100 fois plus rapide qu'en présence d'arginine.

Activation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$

Les études en présence de H₄B permettent de mesurer la vitesse d'activation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, c'est-à-dire sa conversion en intermédiaire catalytique compétent pour la poursuite de la réaction [118, 180].

La vitesse d'activation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ en présence d'arginine est environ 100 fois plus grande que la vitesse d'autoxydation, ce qui est cohérent avec le fait que le découplage est très faible en présence d'arginine. En revanche, en présence d'alkyl-guanidines, l'activation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ n'est environ que 10 fois plus rapide que sa décomposition en Fe^{III} et $\text{O}_2^{\bullet -}$, ce qui explique les valeurs élevées de découplage observées avec ces analogues d'arginine.

1.3. Objectifs

Les études préliminaires de l'oxydation de différents analogues d'arginine par iNOS ont montré que l'oxydation de la fonction guanidine en NO par les NOS semble plus difficile que l'oxydation de la fonction hydroxyguanidine. En effet, les guanidines substrats de NOS ont été trouvées en nombre beaucoup plus faible que les hydroxyguanidines substrats de NOS. Ainsi, aucune aryl-guanidine n'a conduit à la formation de NO alors que plusieurs aryl-hydroxyguanidines sont substrats des NOS.

Ces études ont également montré qu'il existe de grandes différences de comportement entre les différentes guanidines analogues d'arginine. Ainsi quelques alkyl-guanidines non 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.

Ces différences de réactivité ne sont manifestement pas corrélées à des différences majeures de positionnement de l'extrémité guanidine au niveau du site actif (voir IV.2.1.) ni aux différences d'affinité de l'enzyme pour ces composés [179, 242]. Les différences de réactivité observées entre les analogues d'arginine sont donc encore mal comprises, ce qui constitue un obstacle à la conception de nouveaux substrats de NOS.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer ces différences de réactivité. La modulation de la consommation d'électrons en présence des analogues d'arginine pourrait être reliée à une modification du potentiel de l'hème. Dans le même temps, les différences observées dans les cinétiques de décomposition et d'activation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ pourraient provenir d'une modification du caractère donneur du thiolate proximal, ou encore de changements dans les étapes de transfert de protons dus aux différences d'acidité entre les analogues d'arginine.

L'étude des interactions entre différents analogues d'arginine et le site actif des NOS permettrait de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses et de mieux comprendre les paramètres qui déterminent la réactivité des substrats de NOS.

D'autre part, malgré les nombreuses études réalisées au sujet du mécanisme d'oxydation de L-Arg par les NOS, le déroulement précis du cycle catalytique est aujourd'hui encore très mal connu, comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction (voir I.3.4.). En particulier, les processus de transfert de protons, qui sont supposés jouer un rôle majeur dans la formation des espèces oxydantes, dans la distinction entre les deux étapes du mécanisme et dans les phénomènes de découplage, ne sont toujours pas élucidés.

L'étude des interactions entre différents analogues d'arginine, substrats et non-substrats, possédant des pKa différents, permettrait de mieux comprendre l'importance du pKa du substrat dans les étapes de transfert de protons et dans l'ensemble du cycle catalytique des NOS.

L'objectif de ce travail est donc d'étudier les interactions entre des analogues du substrat naturel L-Arg et le site actif de iNOS afin de mieux comprendre d'une part la cause des différences de réactivité observées entre les différents analogues de L-Arg et d'autre part le rôle du substrat et plus particulièrement du pKa du substrat dans le cycle catalytique des NOS.

2. Choix des analogues d'arginine étudiés

2.1. Positionnement des analogues d'arginine dans le site actif des NOS

Comme nous l'avons vu au chapitre III.1.2., les données obtenues par diffraction des rayons X de NOS cristallisées en présence de quelques hydroxyguanidines [78, 235] montrent que la partie hydroxy-guanidinium de ces analogues de NOHA est fixée à proximité du fer par des liaisons hydrogène avec plusieurs résidus proches de l'hème de la même manière que NOHA (figure IV.1). En revanche le positionnement de la chaîne latérale semble dépendre fortement de sa nature chimique : dans le cas d'un analogue de NOHA possédant une chaîne latérale hydrophobe, celle-ci ne se positionne pas à proximité des propionates de l'hème comme dans le cas de NOHA, mais elle se replie en direction d'une poche hydrophobe formée par deux résidus Pro565 et Val567 situés au-dessus de l'hème (figure IV.1).

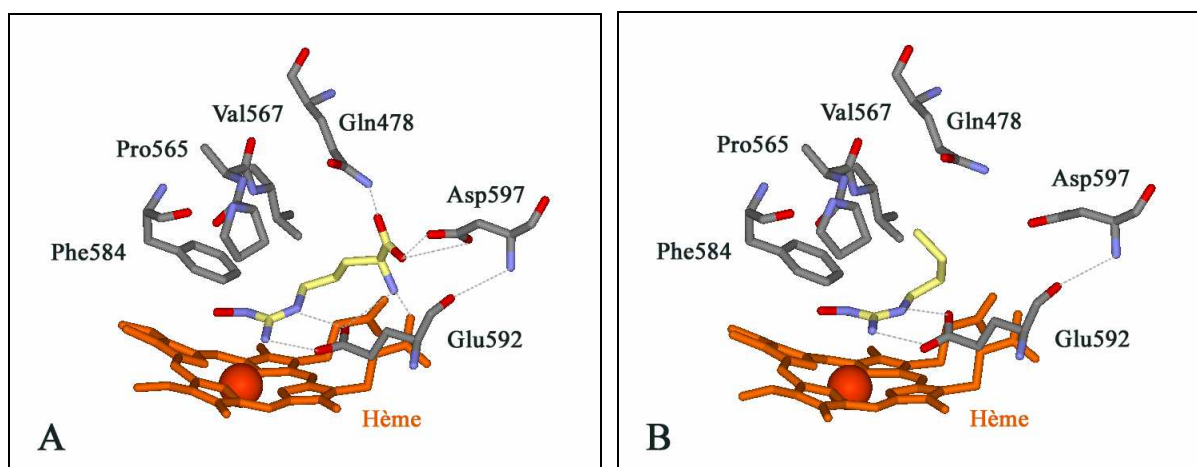


Figure IV.1 : Positionnement de NOHA (A) et de la n-butyl-hydroxyguanidine (B) dans le site actif de nNOS [78] et représentation schématique des principales liaisons hydrogène.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données de diffraction des rayons X de NOS en présence de guanidines analogues de L-Arg. Cependant, les caractéristiques spectroscopiques de iNOS en présence de différents analogues d'arginine [242] montrent que le mode de fixation de l'extrémité guanidine de ces composés est très similaire à celui de L-Arg. En outre, toutes ces guanidines sont capables de provoquer le déplacement total de l'équilibre entre les formes HS et BS de l'hème Fe^{III} en faveur de la forme HS (voir II.1.4.1.).

De plus, comme L-Arg et NOHA se positionnent de manière identique dans le site actif des NOS, on peut raisonnablement supposer que les guanidines analogues de L-Arg se positionnent d'une manière similaire à celle des hydroxyguanidines analogues de NOHA,

c'est-à-dire que le positionnement de l'extrémité guanidinium est conservé bien que la conformation de la chaîne latérale soit susceptible de varier.

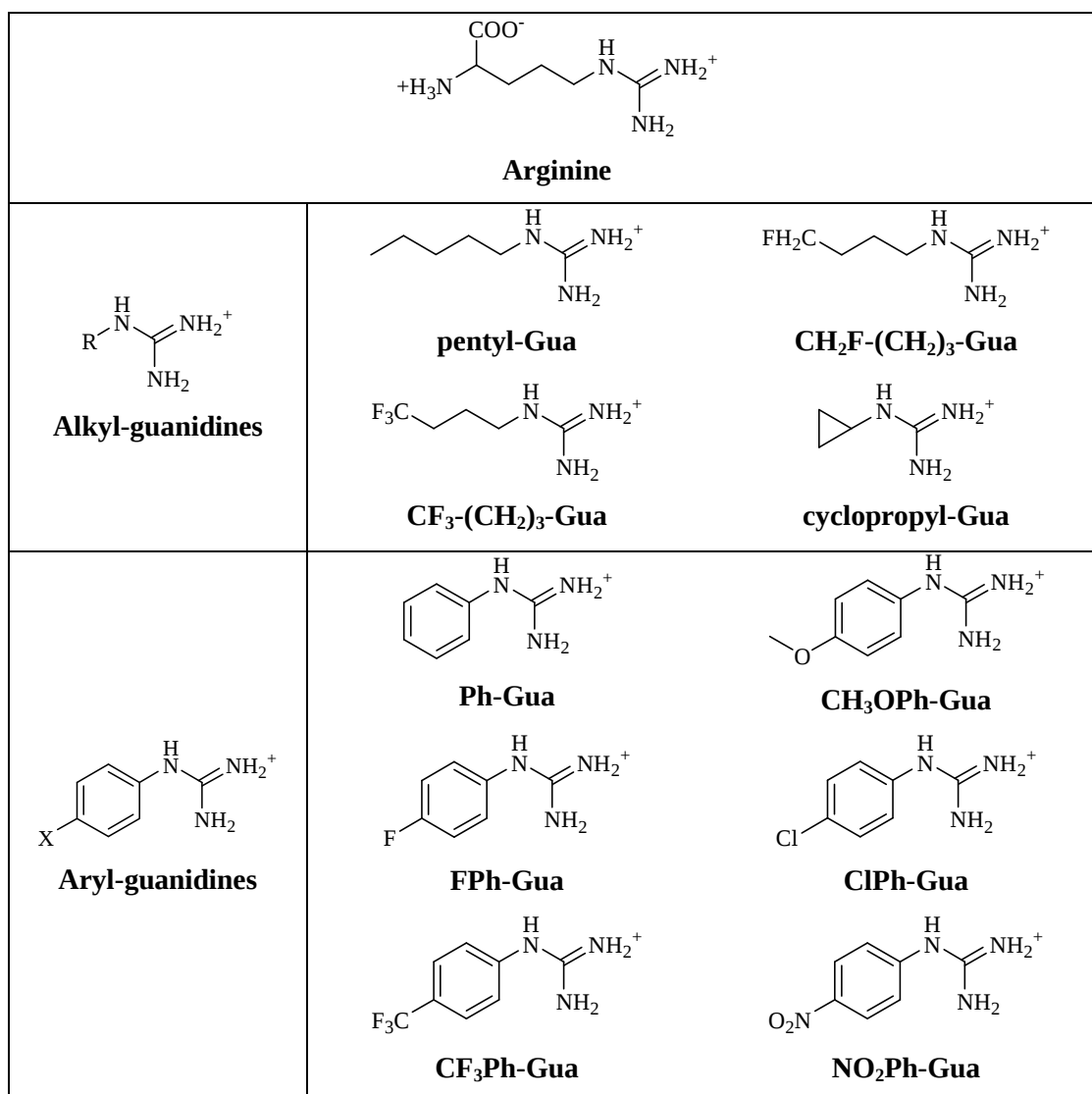


Figure IV.2 : Arginine et analogues d'arginine utilisés au cours de cette étude.

Nous avons choisi d'étudier une série d'analogues de L-Arg qui possèdent tous une chaîne latérale hydrophobe : des alkyl-guanidines simples ou fluorées et des aryl-guanidines possédant un groupe de petite taille plus ou moins électro-attracteur en position para (figure IV.2). Les différents substituants ont été choisis de manière à moduler la densité électronique sur la fonction guanidine de l'analogue : les groupes CH₃O, F ou CH₂F sont moyennement électro-attracteurs alors que les groupes NO₂ et CF₃ sont fortement électro-attracteurs, ce qui permet d'obtenir des analogues de L-Arg avec des pKa très différents.

La chaîne latérale de tous ces analogues de L-Arg étant hydrophobe, nous pouvons supposer que tous les analogues étudiés se positionnent de manière similaire dans la poche du site actif

de iNOS avec l'extrémité guanidinium fixée à proximité de l'hème dans une conformation proche de celle de L-Arg et avec la chaîne latérale repliée en direction de la poche hydrophobe. De cette manière, nous pouvons étudier les interactions de l'extrémité guanidinium avec l'hème et les ligands de l'hème avec pour seul paramètre variable le pKa du guanidinium sans avoir besoin de tenir compte de différences au niveau du positionnement de la chaîne latérale.

2.2. Réactivité des analogues d'arginine

Afin de mieux comprendre le rôle du substrat dans les deux étapes du cycle catalytique des NOS, nous avons choisi une gamme d'analogues de L-Arg avec des réactivités variées. Parmi les alkyl-guanidines, pentyl-Gua, $\text{CH}_2\text{F}-(\text{CH}_2)_3\text{-Gua}$ et $\text{CF}_3-(\text{CH}_2)_3\text{-Gua}$ sont susceptibles d'être oxydés en NO par iNOS alors que cyclopropyl-Gua n'est pas substrat de iNOS. Parmi les aryl-guanidines, aucune n'est substrat de iNOS, mais les hydroxyguanidines correspondantes peuvent ou non être transformées en NO (table IV.2).

Guanidine	Autoxydation (s^{-1}) $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ [180]	Production de NO (% Arg) [178]	NO / 1,5 NADPH [242]	Production de NO de l'hydroxyguanidine (% NOHA) [178]
L-Arg	$0.2 \pm 0,04$	100	1,09	100
pentyl-Gua	$1,9 \pm 0,4$	14 ± 2	0,08	32 ± 5
$\text{CH}_2\text{F}-(\text{CH}_2)_3\text{-Gua}$	nd	13 ± 2	nd	nd
$\text{CF}_3-(\text{CH}_2)_3\text{-Gua}$	$1,6 \pm 0,5$	41 ± 2	0,18	95 ± 8
cyclopropyl-Gua	nd	< 0.5	0	10 ± 3
$\text{CH}_3\text{O-Ph-Gua}$	19 ± 5	< 0.5	0	6 ± 2
F-Ph-Gua	12 ± 3	< 0.5	0	41 ± 6
Cl-Ph-Gua	$7,3 \pm 1,1$	< 0.5	0	13 ± 3
$\text{CF}_3\text{-Ph-Gua}$	nd	< 0.5	0	$0,5 \pm 0,2$
$\text{NO}_2\text{-Ph-Gua}$	nd	< 0.5	0	2 ± 1

Table IV.2 : Réactivité de iNOS en présence de différents analogues de L-Arg et de NOHA.

2.3. Détermination du pKa des analogues d'arginine

Un des objectifs de cette étude est de mieux comprendre le rôle du pKa du substrat dans le déroulement des étapes de transfert de protons au cours du cycle catalytique des NOS.

Cependant, les seules guanidines analogues d'arginine dont le pKa a déjà été publié sont les aryl-guanidines Ph-Gua et NO₂Ph-Gua avec un pKa de 10,77 pour Ph-Gua [201] et de 9,13 pour NO₂Ph-Gua [202].

Les guanidines sont des bases faibles dont le pKa est approximativement compris entre 8 et 13. Le titrage pH-métrique direct d'une base faible dont le pKa est supérieur à 8 ne permet pas de déterminer ce pKa avec une assez bonne précision (voir II.2.2.1.). Nous avons donc mis au point une méthode de mesure du pKa des analogues de L-Arg qui combine le suivi de la conductivité et du pH lors du titrage d'une solution de guanidinium par de la soude concentrée et qui permet de déterminer le pKa des aryl-guanidines avec une bonne précision, estimée à environ $\pm 0,1$ unité pour nos mesures (voir II.2.2.3.).

Les résultats obtenus pour Ph-Gua et NO₂Ph-Gua (table IV.3) sont en bon accord avec les valeurs déjà publiées [201, 202]. Comme attendu, les aryl-guanidines présentent un pKa très inférieur à celui de L-Arg (table IV.3) en raison de la présence d'un cycle phényle substitué par des groupes électro-attracteurs qui diminuent la densité électronique sur la fonction guanidine. Le pKa varie ainsi de 9,3 pour NO₂Ph-Gua dont le substituant nitro est fortement électro-attracteur, à 11,0 pour CH₃OPh-Gua dont le substituant méthoxy est faiblement électro-attracteur.

En raison de l'erreur alcaline des électrodes de verre pour la mesure des hauts pH, cette méthode de détermination du pKa n'a pas pu être utilisée pour les alkyl-guanidines dont les pKa sont attendus assez proches de celui de l'arginine à 12,48 [205]. Nous avons donc réalisé une corrélation de Hammett entre les pKa mesurés pour les aryl-guanidines et les paramètres électroniques de champ σ_I des substituants du motif guanidine [204], et nous avons ensuite utilisé les paramètres obtenus grâce à cette corrélation pour estimer par extrapolation le pKa des alkyl-guanidines (voir II.2.2.4.). L'erreur sur ces valeurs de pKa est évaluée à environ $\pm 0,5$ unité.

Comme attendu, les valeurs de pKa calculées pour les alkyl-guanidines sont très proches de la valeur du pKa de L-Arg (table IV.3) et varient de 11,8 pour CF₃-(CH₂)₃-Gua et cyclopropyl-Gua qui possèdent des chaînes latérales assez électro-attractrices, à 12,6 pour pentyl-Gua qui présente une chaîne latérale dont le caractère électro-attracteur est quasi-nul.

La large gamme de pKa couverte par les différentes guanidines analogues de L-Arg nous permettra de mieux appréhender l'importance du pKa du guanidinium dans le réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif et son rôle dans le cycle catalytique des NOS.

Guanidine	σ_1 [204]	pK _a mesuré	Guanidine	σ_1 [204]	pK _a calculé
Arginine [205]	0.03	12.48	pentyl-Gua	0.01	12,6
Ph-Gua	0.12	10.8	CH ₂ F-(CH ₂) ₃ -Gua	0.05	12,1
CH ₃ OPh-Gua	0.13	11.0	CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua	0.07	11,8
FPh-Gua	0.17	10.8	cyclopropyl-Gua	0.07	11,8
ClPh-Gua	0.18	10.3			
CF ₃ Ph-Gua	0.19	10.0			
NO ₂ Ph-Gua	0.26	9.3			

Table IV.3 : Valeurs des paramètres électroniques de champ σ_1 et des pK_a des analogues de L-Arg.

3. Influence d'analogues de L-Arg sur l'hème et la partie proximale du site actif

Les différences de réactivité observées entre les guanidines analogues de L-Arg sont encore mal comprises. Il a été proposé que la modulation de la consommation d'électrons ainsi que les cinétiques de décomposition et d'activation du complexe Fe^{II}-O₂ en présence des analogues d'arginine puissent être reliées à une modification du potentiel de l'hème ou à des variations du caractère donneur du thiolate proximal [112, 113, 118, 180, 242].

Afin de vérifier la validité de ces hypothèses et de mieux comprendre le rôle des paramètres physico-chimiques de l'hème dans le déroulement du cycle catalytique des NOS, nous avons utilisé les techniques de spectroscopie Raman de résonance et de spectro-électrochimie pour déterminer l'influence des analogues de L-Arg sur la force de la liaison entre le fer et son ligand proximal, sur les modes de vibrations caractéristiques de la porphyrine et sur le potentiel électrochimique de l'hème.

3.1. Les conformations de l'hème

3.1.1. Différentes conformations, rôle dans la catalyse

Le macrocycle porphyrinique joue un rôle central dans les réactions catalysées par les hémoprotéines. En tant que ligand équatorial du fer, la porphyrine contrôle en effet de

nombreux paramètres déterminants pour la catalyse comme l'énergie des orbitales d du fer, l'affinité pour les ligands axiaux ou le potentiel d'oxydoréduction du fer.

Les nombreuses études de structures d'hémoprotéines obtenues par diffraction des rayons X ont révélé que l'hème adopte rarement une conformation complètement plane. Au contraire, les interactions de la porphyrine avec différents résidus de la protéine forcent le cycle à adopter une conformation déformée [129, 212, 247-250]. Par ces modifications de conformation, la protéine est capable de modifier les énergies du système π de la porphyrine et donc de moduler les propriétés électroniques de l'hème. Il a également été proposé que la position précise des propionates l'un par rapport à l'autre et par rapport au plan moyen de l'hème constitue un paramètre important dans la modulation du potentiel d'oxydoréduction de l'hème [212, 251].

Dans le cas des NOS, la forme de la cavité du site actif force l'hème à adopter une conformation où les deux principaux modes de vibration hors du plan sont issus de la symétrie en « selle » et de la symétrie en « dôme » [252]. Différentes études ont montré que l'addition de substrat L-Arg ou de cofacteur H₄B entraîne une légère modification des modes de vibration hors du plan [129, 212]. Il a été proposé que cette distorsion de l'hème favorise la libération de NO à partir du complexe Fe^{III}-NO à la fin du cycle catalytique, alors qu'une conformation plus plane de l'hème favoriserait la réduction rapide du complexe en Fe^{II}-NO. Les distorsions de l'hème font donc partie intégrante des paramètres qui déterminent la spécificité catalytique de chaque hémoprotéine.

Dans l'hypothèse où les différents analogues d'arginine seraient capables de modifier la conformation de l'hème dans le site actif de iNOS, ces changements de conformation pourraient entraîner des modifications des différentes propriétés électroniques de l'hème comme l'énergie des orbitales π , son potentiel d'oxydoréduction ou la force du lien proximal, ce qui pourrait expliquer les différences de réactivité observées entre les analogues d'arginine. Nous avons donc étudié les modes de vibration de l'hème chez iNOS_{ox} en présence de plusieurs analogues d'arginine.

3.1.2. Étude par spectroscopie Raman de résonance

La spectroscopie Raman de résonance (RR) est un outil de choix pour étudier les modes de vibration de l'hème chez les hémoprotéines. L'excitation de la bande d'absorption de Soret

permet en effet d'exalter et d'observer sélectivement les modes de vibrations de l'hème, contrairement aux techniques d'absorption infrarouge classiques où les modes de vibration de l'hème seraient complètement masqués sous les très nombreux modes de vibration du squelette de la protéine (Annexe 2).

La région des hautes fréquences du spectre (1000 à 1700 cm^{-1}) est très sensible à l'état d'oxydation et de coordination de l'hème [208, 253]. En particulier, le mode de vibration ν_4 , généralement observé entre 1340 et 1380 cm^{-1} , est très sensible à la densité électronique sur le macrocycle et constitue un bon indicateur de l'état d'oxydation du fer. Le mode de vibration ν_3 , généralement observé entre 1475 et 1520 cm^{-1} , est sensible à la fois à l'état de coordination et à l'état de spin de l'hème, alors que le mode de vibration ν_2 , observé entre 1560 et 1590 cm^{-1} , reflète surtout l'état de spin.

La région des basses fréquences du spectre (200 à 800 cm^{-1}) comporte les vibrations spécifiques de l'élongation et de la déformation angulaire de la liaison entre le fer et ses ligands axiaux, ce qui permet d'identifier la nature et la conformation de ces ligands [208, 253]. Lorsque l'hème présente des déformations hors du plan, la région des basses fréquences du spectre comporte également de nombreux modes de vibration associés à ces distorsions.

Les fréquences et les intensités associées aux différents modes de vibration de l'hème dépendent étroitement à la fois des propriétés intrinsèques de l'hème et de l'environnement de l'hème à l'intérieur de la protéine. L'étude des spectres Raman de résonance de iNOS_{ox} en présence de différents analogues de L-Arg pourra donc fournir de nombreux renseignements sur les effets de ces guanidines sur la structure et la conformation du site actif de la protéine.

3.1.2.1. Vibrations de l'hème à l'état Fe^{III}

Afin d'étudier l'effet des analogues d'arginine sur les conformations de l'hème chez iNOS_{ox}, nous avons tout d'abord réalisé les spectres Raman de résonance de iNOS_{ox} à l'état Fe^{III} en présence de H₄B (400 μM) et des différents analogues d'arginine (20 mM) dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.2.. La concentration finale en iNOS_{ox} est d'environ 150 μM . La fixation des analogues d'arginine au site actif de iNOS_{ox} est confirmée par le spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon qui présente une bande d'absorption de Soret vers 395 nm caractéristique d'un complexe hème-Fe^{III} HS. La longueur d'onde d'excitation utilisée est de 363,8 nm. Cette fréquence est spécifique de l'excitation du mode de vibration de la liaison Fe-S (voir IV.3.2.2.) mais elle permet également d'avoir accès à

des informations sur les modes de vibration de l'hème à l'état Fe^{III} . Les spectres présentés figure IV.3 sont le résultat de l'accumulation de 10 à 20 spectres représentant chacun 30 à 60 minutes d'exposition.

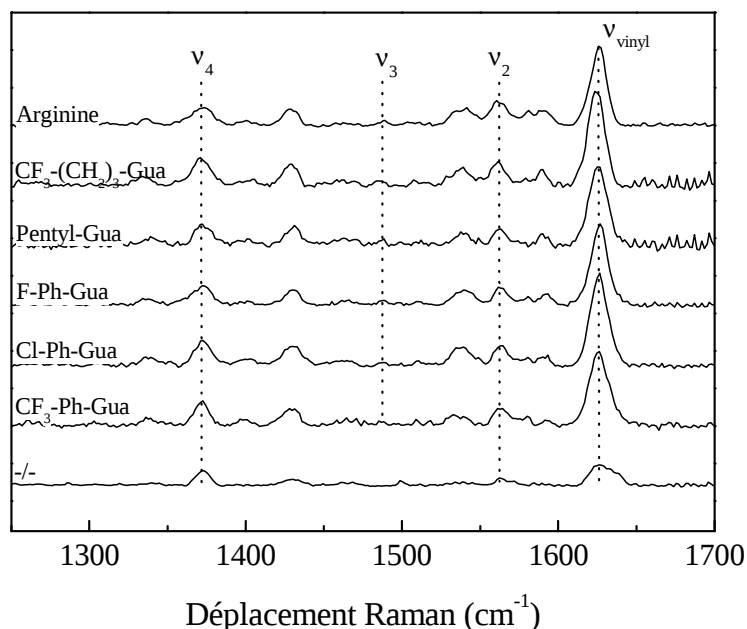


Figure IV.3 : Effet d'analogues de L-Arg sur la région des hautes fréquences du spectre Raman de résonance de iNOS_{ox} à l'état Fe^{III} (excitation à 363,8 nm). Les spectres ont été enregistrés en présence de H_4B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

Les différentes bandes des spectres RR ont été attribuées par analogie avec les données connues sur iNOS et sur les autres isoformes de NOS [91, 97, 112, 215, 253, 254].

La région des hautes fréquences du spectre (figure IV.3) présente un profil caractéristique d'hémoprotéine. En présence de H_4B et de L-Arg, les modes de vibration de la porphyrine ν_4 , ν_3 et ν_2 sont observés à 1372 cm^{-1} , 1489 cm^{-1} et 1562 cm^{-1} respectivement, ce qui indique que iNOS_{ox} est à l'état d'oxydation Fe^{III} sous la forme 5-coordinée HS. On observe également un mode de vibration des groupes vinyliques à 1625 cm^{-1} ce qui confirme que l'hème est sous la forme Fe^{III} HS.

Dans la région des basses fréquences du spectre obtenu en présence de H_4B et de L-Arg, on observe les modes de vibration de la porphyrine ν_7 et ν_{16} à 675 cm^{-1} et 753 cm^{-1} respectivement, ainsi que le mode de vibration hors du plan de la porphyrine γ_{12} à 495 cm^{-1} . On observe également des modes de vibration de la porphyrine à 375 cm^{-1} , 405 cm^{-1} et 600 cm^{-1} , ainsi que le mode de vibration de la liaison Fe-S à 338 cm^{-1} (voir IV.3.2.2). Ces résultats sont en bon accord avec les valeurs décrites pour les différentes isoformes de NOS et d'autres hémoprotéines à l'état Fe^{III} HS (table IV.4).

Les spectres obtenus en présence de H₄B et des analogues d'arginine ne présentent aucune variation significative par rapport au spectre obtenu en présence d'arginine, ni dans la région des hautes fréquences ni dans la région des basses fréquences (figure IV.3 et table IV.4), ce qui suggère que les analogues d'arginine testés ne perturbent pas les conformations de l'hème au sein du site actif de iNOS_{ox} à l'état Fe^{III}.

Protéine		γ_{12}	ν_7	ν_{16}	ν_4	ν_3	ν_2	ν_{vinyl}	Référence
iNOS _{ox}	+ L-Arg	498	675	753	1372	1489	1562	1625	
	+ CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua	498	674	753	1371	1486	1562	1624	
	+ Pentyl-Gua	499	675	753	1372	1487	1562	1625	
	+ F-Ph-Gua	498	675	754	1372	1488	1562	1627	
	+ Cl-Ph-Gua	498	675	751	1371	1486	1560	1625	
	+ CF ₃ -Ph-Gua	495	675	752	1372	1487	1563	1626	
	-/-	496	676	751	1373	nd	1562	1626	
iNOS _{ox}	+ L-Arg	495	676	754					[97]
nNOS _{ox}	+ L-Arg *				1371	1488	1563	1625	[112, 254]
eNOS	+ L-Arg		678		1370	1489	1563	1625	[215]
bsNOS	+ L-Arg	498	676	754					[97]
saNOS	+ L-Arg *				1373	1488	1563	1624	[91]
P450	+ camphre		677	756	1368	1488	1570	1623	[253]
CPO	-	491	676	753	1369	1490	1567	1627	[255]

Table IV.4 : Fréquences (en cm⁻¹) des principaux modes de vibration de la porphyrine à l'état Fe^{III} HS pour iNOS_{ox} et pour d'autres protéines à hème-cystéinate (cytochrome P450 et chloroperoxydase). La longueur d'onde d'excitation est de 363,8 nm, sauf les spectres marqués * qui sont enregistrés avec une excitation à 406 nm ou à 413,1 nm. Les spectres de NOS ont été enregistrés en présence de H₄B sauf le spectre -/- (Fe^{III} BS) qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

3.1.2.2. Vibrations de l'hème dans le complexe Fe^{II}-CO

Contrairement à l'hème Fe^{II} qui a tendance à s'oxyder spontanément en solution en présence de traces de dioxygène, le complexe Fe^{II}-CO est stable en solution ($k_{\text{off}} = 0,3 \text{ s}^{-1}$ [256]) même en présence de dioxygène. C'est pourquoi nous avons utilisé ce complexe pour étudier les conformations de l'hème au degré d'oxydation II chez iNOS_{ox}.

Nous avons réalisé les spectres Raman de résonance de iNOS_{ox} à l'état Fe^{II}-CO en présence de H₄B (400 μM) et des différents analogues d'arginine (20 mM) dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.2.. La concentration finale en iNOS_{ox} est d'environ 150 μM . La fixation des analogues d'arginine au site actif de iNOS_{ox} est confirmée par le

spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon à l'état Fe^{III} qui présente une bande d'absorption de Soret vers 395 nm. Le déplacement de la bande de Soret jusqu'à 445 nm après addition de dithionite de sodium et de CO permet de vérifier que la réduction de l'hème et la fixation de CO ont bien eu lieu. La longueur d'onde d'excitation utilisée est de 441,6 nm, ce qui correspond pratiquement au maximum d'absorption UV-visible de la bande de Soret du complexe Fe^{II} -CO. Les spectres présentés figure IV.4 sont le résultat de l'accumulation de 5 à 10 spectres représentant chacun 20 à 40 minutes d'exposition.

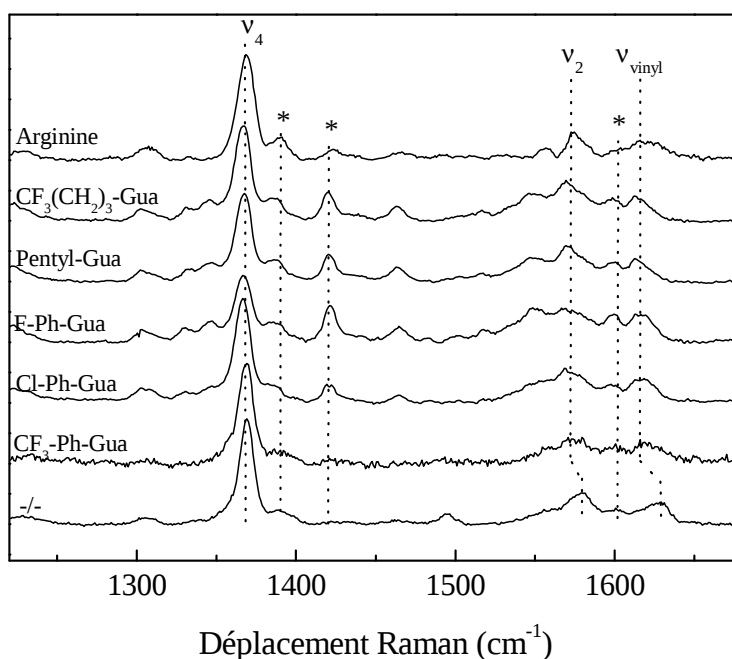


Figure IV.4 : Effet d'analogues de L-Arg sur la région des hautes fréquences du spectre Raman de résonance du complexe Fe^{II} -CO de iNOS_{ox} (excitation à 441,6 nm). Les spectres ont été enregistrés en présence de H_4B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur. Les bandes marquées d'une étoile sont dues à une photodissociation partielle du complexe Fe^{II} -CO sous l'effet de l'excitation laser.

Les spectres obtenus sont très similaires aux spectres décrits pour le complexe Fe^{II} -CO des différentes isoformes de NOS [91, 97, 211, 214, 216] et d'autres hémoprotéines [217, 253, 257]. Les différentes bandes des spectres RR ont été attribuées par analogie avec ces données.

Dans la région des hautes fréquences du spectre, les modes de vibration de la porphyrine ν_4 , ν_3 et ν_2 sont observés à 1369 cm^{-1} , 1492 cm^{-1} et 1576 cm^{-1} respectivement en présence de H_4B et de L-Arg, ce qui indique que iNOS_{ox} est sous la forme 6-coordinée BS. On observe également un mode de vibration des groupes vinyloxy à 1620 cm^{-1} ce qui confirme que l'hème est sous la forme BS. Les spectres obtenus lorsqu'on remplace l'arginine par un de ses analogues présentent exactement le même profil qu'en présence d'arginine (figure IV.4 et

table IV.5), ce qui montre qu'aucun des analogues d'arginine testés ne perturbe les conformations de l'hème du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de iNOS_{ox}.

Ces résultats sont confirmés dans la région des basses fréquences du spectre : en présence d'un des analogues d'arginine comme en présence d'arginine, on observe les modes de vibration de la porphyrine ν_{16} , ν_7 , et ν_8 à 748 cm^{-1} , 674 cm^{-1} et 344 cm^{-1} respectivement (table IV.5). La région des basses fréquences du spectre comporte également les modes d'élongation et de déformation angulaire de la liaison Fe–CO vers 500 cm^{-1} et 565 cm^{-1} (voir IV.4.3.).

Les bandes de faible intensité observées à 689 , 1390 , 1424 et 1601 cm^{-1} correspondent au signal de iNOS_{ox} Fe^{II} généré par photodissociation partielle du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ sous l'effet de l'excitation laser. On peut remarquer que la position de ces bandes n'est pas non plus affectée par le remplacement de l'arginine par un de ses analogues.

Protéine		ν_8	ν_7	ν_{16}	ν_4	ν_3	ν_2	ν_{vinyl}	Référence
iNOS _{ox}	+ L-Arg	344	674	748	1369	1492	1576	1620	
	+ $\text{CF}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-Gua}$	340	678	750	1367	nd	1571	1616	
	+ Pentyl-Gua	340	678	750	1367	nd	1571	1616	
	+ cyclopropyl-Gua	nd	675	748	1367	1492	1573	1617	
	+ F-Ph-Gua	340	678	750	1367	nd	1571	1618	
	+ Cl-Ph-Gua	340	678	750	1367	nd	1571	1618	
	+ $\text{CF}_3\text{-Ph-Gua}$	343	676	750	1368	1492	1575	1622	
	+ $\text{CH}_3\text{O-Ph-Gua}$	346	675	748	1367	nd	1575	1617	
	+ $\text{NO}_2\text{-Ph-Gua}$	345	676	749	1368	nd	1576	1619	
	+ NOHA	344	676	750	1369	1491	1575	1622	
	-/-	345	675	751	1369	1495	1579	1628	
iNOS	+ L-Arg	346	676	751	1369	1493	1574	1614	[211, 212]
	-/-	346	676	751					[212]
nNOS	+ L-Arg	345	676	752	1369	1493	1572	1618	[216]
	+ NOHA	345	676	751	1369	1493	1572	1618	[216]
	-/-	343	676	751	1369	1493	1572	1618	[216]
eNOS	+ L-Arg	346	676	751					[211]
saNOS	+ L-Arg	344	676	751	1370	1495	1573	1622	[91]
	-/-	344	676	751	1370	1489	1573	1626	[91]
P450	+ camphre	352	676	749	1371	1497	1588	nd	[253]
	-	348	677	754	1372	1498	1583	1626	[253]

Table IV.5 : Fréquences (en cm^{-1}) des principaux modes de vibration du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ pour iNOS_{ox} et pour d'autres protéines à hème-cystéinate (excitation à $441,6\text{ nm}$). Les spectres de NOS ont été enregistrés en présence de H_4B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

Ces résultats montrent que la fixation des différents analogues d'arginine au sein du site actif de iNOS_{ox} n'induit aucune variation significative de la géométrie de l'hème par comparaison avec la fixation d'arginine, que l'hème soit à l'état d'oxydation Fe^{III} ou Fe^{II}. Ces résultats indiquent également que les interactions entre l'hème et le site actif de iNOS_{ox} sont similaires en présence d'arginine ou des analogues d'arginine testés, ce qui suggère que les propriétés électroniques de l'hème sont les mêmes quel que soit le substrat fixé.

Ces résultats indiquent donc que les différences de réactivité observées entre les analogues d'arginine ne sont manifestement pas reliées à des modifications de la conformation de l'hème.

3.2. La liaison fer-cystéine

3.2.1. Importance du ligand proximal chez les hémoprotéines

Les NOS, comme les cytochromes P450, possèdent un thiolate issu d'un résidu cystéine comme ligand proximal. La nature de ce ligand proximal joue un rôle majeur dans les propriétés catalytiques des hémoprotéines.

Le ligand proximal, en tant que ligand « trans », influence fortement les propriétés des complexes fer-oxygène produits au cours du cycle catalytique. En effet, le ligand proximal et le ligand distal sont en compétition pour établir une liaison σ avec le fer par l'intermédiaire de son orbitale vide d_{z^2} : plus le caractère donneur σ du ligand proximal est grand, plus l'interaction du ligand proximal avec l'orbitale d_{z^2} du fer et avec les orbitales π de la porphyrine est forte et plus la liaison σ entre le fer et le ligand distal est faible. La force de la liaison entre le fer et le ligand proximal est donc considérée comme un bon indicateur à la fois de la densité électronique sur l'hème et de la force de la liaison entre le fer et le ligand distal.

Dans le cas des cytochromes P450, des études ont montré que la force de la liaison fer-cystéine peut être modulée en réponse à la présence de différents substrats au niveau du site actif [258, 259]. De même chez les NOS, il a été proposé que la fixation de L-Arg et de NOHA au niveau du site actif provoque de légères variations dans la force de la liaison fer-cystéine, ce qui pourrait expliquer les légères différences observées dans les caractéristiques spectroscopiques du complexe Fe^{II}-O₂ en présence de L-Arg et en présence de NOHA [105, 112, 113, 214].

Il est donc possible que les différences de réactivité observées entre les analogues d'arginine soient dues à une modification de la force du lien proximal induite par la fixation au site actif de ces analogues d'arginine. Afin d'évaluer la pertinence de cette hypothèse chez iNOS, nous avons étudié la force de la liaison fer-cystéine chez iNOS_{ox} en présence de différents analogues d'arginine.

3.2.2. Étude de la liaison Fe-S par spectroscopie Raman de résonance

Les modes de vibration de la liaison Fe-S chez les hémoprotéines peuvent être étudiés par spectroscopie Raman de résonance (RR) par exaltation de la bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe^{III}$. La longueur d'onde d'excitation utilisée est de 363,8 nm, ce qui correspond approximativement à la position de la bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe^{III}$ masquée dans les spectres d'absorption UV-visible par la bande intense d'absorption de Soret [257, 259]. Dans le cas des NOS, différentes études ont montré que le mode de vibration associé à la liaison Fe-S est exalté lorsque le Fe^{III} est à l'état HS mais qu'il ne l'est pas lorsque le Fe^{III} est à l'état BS : cette différence relative d'exaltation permet de déterminer la position du mode de vibration associé à la liaison Fe-S [97, 215].

Nous avons donc enregistré d'une part le spectre RR de iNOS_{ox} (environ 150 μ M) à l'état Fe^{III} HS obtenu en présence du substrat L-Arg (5 mM) et du cofacteur H₄B (400 μ M) en conditions saturantes, et d'autre part le spectre RR de iNOS_{ox} à l'état Fe^{III} BS obtenu en absence de substrat et de cofacteur (noté -/-) dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.2.. Les spectres présentés figure IV.5 sont le résultat de l'accumulation de 10 à 20 spectres représentant chacun 30 à 60 minutes d'exposition.

L'analyse des spectres obtenus dans la région située entre 300 et 430 cm^{-1} (figure IV.5) montre deux bandes situées à 375 et 405 cm^{-1} qui correspondent à des modes de vibrations de la porphyrine et une bande située autour de 338 cm^{-1} présente dans le spectre de iNOS_{ox} HS et complètement absente du spectre de iNOS_{ox} BS, ce qui permet d'attribuer cette bande au mode de vibration de la liaison Fe-S.

Les spectres obtenus en présence de cofacteur H₄B et des différents analogues d'arginine montrent que la fréquence de vibration de la liaison Fe-S ne varie pas lorsqu'on remplace l'arginine par un de ses analogues (figure IV.5).

Les valeurs obtenues pour les fréquences de vibration de la liaison Fe-S en présence d'arginine ou des analogues d'arginine sont similaires aux valeurs décrites pour d'autres

hémoprotéines dont le ligand proximal est un cystéinate (table IV.6), comme les autres isoformes de NOS, les cytochromes P450 et les chloroperoxydases (CPO).

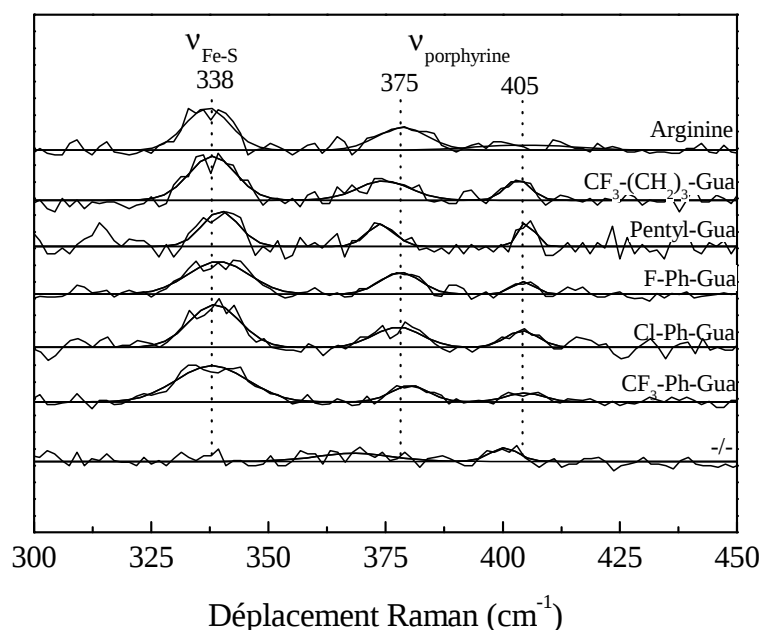


Figure IV.5 : Effet d'analogues de L-Arg sur la région des basses fréquences du spectre Raman de résonance de iNOS_{ox} à l'état Fe^{III} (excitation à 363,8 nm). Les spectres ont été enregistrés en présence de H₄B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

Protéine		État de spin	$\nu_{\text{Fe-S}}$ (cm ⁻¹)	Référence
iNOS _{ox}	+ L-Arg	HS	337	
	+ CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua	HS	337	
	+ pentyl-Gua	HS	339	
	+ F-Ph-Gua	HS	339	
	+ Cl-Ph-Gua	HS	339	
	+ CF ₃ -Ph-Gua	HS	338	
	-/-	BS	nd	
eNOS	+ L-Arg	HS	338	[215]
bsNOS	+ L-Arg	HS	342	[97]
P450 _{cam}	+ camphre	HS	351	[259]
CPO	-	HS	346	[257]

Table IV.6 : Fréquences de vibration de la liaison Fe-S pour iNOS_{ox} à l'état Fe^{III} et pour plusieurs autres hémoprotéines dont le ligand proximal est un cystéinate. Les spectres de NOS ont été enregistrés en présence de H₄B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

Les résultats obtenus en mesurant la force de la liaison Fe-S en présence d'arginine ou des analogues d'arginine par spectroscopie Raman de résonance montrent que le caractère donneur σ du ligand proximal de iNOS_{ox} est le même quel que soit le substrat fixé, ce qui

suggère que la fixation des guanidines au niveau du site actif n'induit pas de perturbation structurale et électronique du ligand proximal par rapport à la fixation de L-Arg.

Ces résultats indiquent donc que les différences de réactivité observées entre les analogues d'arginine ne sont manifestement pas reliées à une variation de la force de la liaison fer-cystéine chez iNOS_{ox} ni à des perturbations de l'environnement proximal de l'hème.

3.3. Le potentiel d'oxydoréduction de l'hème

3.3.1. Importance du potentiel d'oxydoréduction dans la catalyse

Les différentes étapes de transfert d'électron sont d'une importance cruciale pour le bon déroulement du cycle catalytique des NOS. En particulier, le contrôle précis de la réduction de l'hème Fe^{III} en hème Fe^{II} constitue un élément essentiel dans la régulation de l'activité NO-synthase, cette étape étant à la fois la première étape et l'étape cinétiquement déterminante du cycle catalytique qui mène à l'activation du dioxygène et à l'oxydation de l'arginine en NO (voir I.3.4.). La mesure du potentiel d'oxydoréduction de l'hème permet d'avoir accès aux paramètres thermodynamiques qui interviennent dans cette première étape de transfert d'électrons.

Différentes études ont montré que la consommation d'électrons des NOS peut être modulée par la présence d'inhibiteurs, de substrats ou d'analogues de substrats au niveau du site actif de l'enzyme [62, 192, 242, 246]. Dans le cas de l'inhibiteur L-NAME (ester méthylique de N^o-nitro-L-arginine), il a été montré que la diminution du flux d'électrons observée en présence de cet inhibiteur est directement corrélée à une forte baisse du potentiel d'oxydoréduction par rapport au potentiel mesuré en présence de L-Arg. En revanche, dans le cas de l'inhibiteur amino-guanidine, qui induit également une diminution du flux d'électrons chez les NOS, aucun changement majeur dans le potentiel d'oxydoréduction de l'hème n'a été mesuré [111].

Il est donc intéressant de réaliser une étude du potentiel d'oxydoréduction de l'hème chez iNOS_{ox} en présence des différents analogues d'arginine précédemment étudiés afin de vérifier si les différences de réactivité, les variations dans la consommation d'électrons et surtout les différences de stabilité et de réactivité du complexe Fe^{II}-O₂ observées en présence de ces guanidines sont ou non reliées à des modifications dans le potentiel d'oxydoréduction de l'hème.

3.3.2. Mesure du potentiel d'oxydoréduction par spectro-électrochimie

Nous avons mesuré le potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOS_{ox} en présence du cofacteur H₄B et de différents analogues d'arginine par spectro-électrochimie en utilisant la phénosafranine comme médiateur dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.4..

L'utilisation d'un seul médiateur a pour inconvénient de ne permettre la mesure des potentiels que dans une gamme réduite. En effet, pour qu'un médiateur soit utilisable, il faut que son propre potentiel d'oxydoréduction soit proche de celui que l'on cherche à mesurer, de manière à ce que les formes oxydées et réduites du médiateur soient présentes en quantité suffisante pour pouvoir assurer efficacement le transport des électrons entre la protéine et les électrodes au moment où la protéine passe du domaine de prédominance de la forme oxydée à celui de la forme réduite. La phénosafranine étant un médiateur à deux électrons, les potentiels accessibles se situent dans un intervalle de ± 50 mV autour de son propre potentiel d'oxydoréduction ($E^{\circ'} = -255$ mV à pH=7,4), soit entre -305 mV et -205 mV.

Cependant, l'utilisation d'un seul médiateur présente le net avantage de permettre de mieux apprécier les variations du spectre d'absorption UV-visible de la solution au cours de la mesure et ainsi d'obtenir une estimation précise du potentiel recherché.

Toutes les valeurs de potentiels citées dans ce paragraphe utilisent l'électrode normale à hydrogène (ENH) comme référence.

Effet d'analogues de L-Arg sur le potentiel d'oxydoréduction de l'hème

La figure IV.6 montre les spectres d'absorption UV-visible enregistrés lors du titrage par spectro-électrochimie de iNOS_{ox} en présence de H₄B et de l'analogue d'arginine FPh-Gua. On observe un déplacement net du maximum d'absorption de la bande de Soret de 395 nm vers 410 nm et une disparition complète de la bande d'absorption à 650 nm au cours de la réduction de l'hème Fe^{III} en hème Fe^{II} , suivies d'un retour au spectre initial de la solution au cours de la réoxydation de l'hème Fe^{II} en hème Fe^{III} , ce qui garantit une réduction et une oxydation complètes et réversibles de iNOS_{ox} dans les conditions de l'expérience. Le processus complet et réversible d'oxydoréduction de iNOS_{ox} a été observé avec chacun des analogues d'arginine testés.

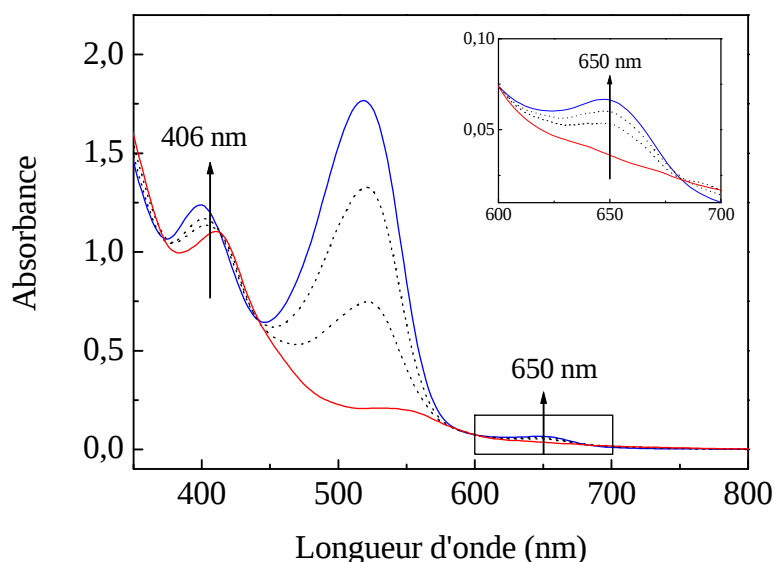


Figure IV.6 : Spectres d'absorption UV-visible enregistrés lors de la vague d'oxydation de iNOS_{ox} en présence de H₄B et de FPh-Gua. Pour un potentiel imposé de - 500 mV, le spectre montre les caractéristiques d'un mélange de iNOS_{ox} Fe^{II} et de phénosafranine réduite (rouge). Pour un potentiel imposé de 0 mV, le spectre montre les caractéristiques d'un mélange de iNOS_{ox} Fe^{III} HS et de phénosafranine oxydée (bleu).

L'évolution du spectre d'absorption UV-visible de iNOS_{ox} est enregistrée à 406 nm, qui est un point isobestique du médiateur et qui permet de suivre les variations de la bande d'absorption de Soret de iNOS_{ox}, et à 650 nm où l'absorbance due au médiateur est nulle ce qui permet de suivre directement les variations de la bande d'absorption de iNOS_{ox}. Le potentiel d'oxydoréduction $E^{\circ'}$ du couple Fe^{II}/Fe^{III} de iNOS_{ox} et le nombre n d'électrons échangés sont ensuite obtenus en corrélant les données expérimentales pour chaque longueur d'onde de mesure avec un modèle de Nernst (voir II.3.4.).

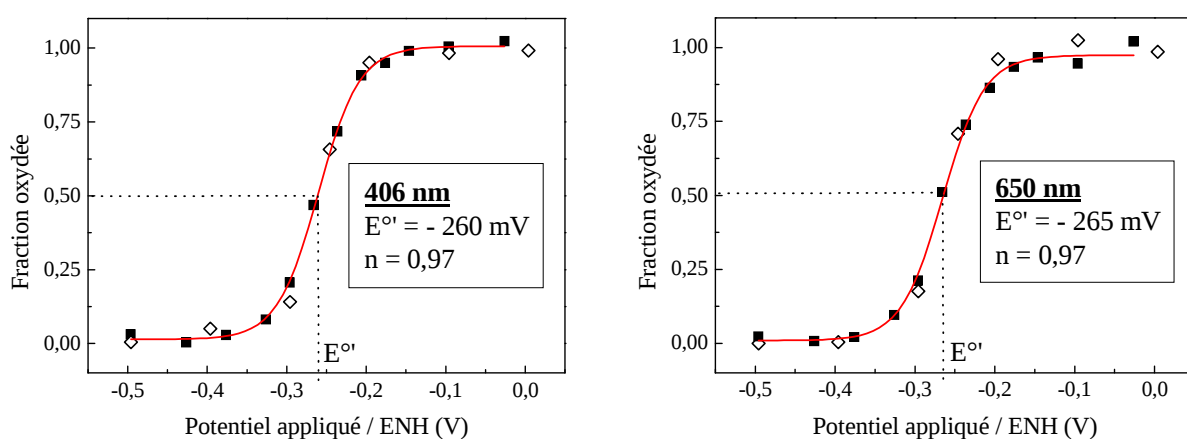


Figure IV.7 : Fraction oxydée de iNOS_{ox} en présence de phénosafranine, de H₄B et de FPh-Gua, mesurée à 406 nm et à 650 nm (◇ vague de réduction, ■ vague d'oxydation), en fonction du potentiel imposé dans la solution (pH=7,4), corrélation avec le modèle de Nernst (rouge).

La valeur finale du potentiel $E^{\circ'}$ est calculée en réalisant la moyenne des valeurs obtenues pour chaque longueur d'onde. L'erreur expérimentale est ainsi estimée à environ ± 5 mV autour de la valeur moyenne calculée pour $E^{\circ'}$. Les résultats que nous avons obtenus sont en bon accord avec les valeurs décrites pour le potentiel de iNOS_{ox} en présence de H₄B et de L-Arg [111], bien que le protocole utilisé ait été légèrement différent.

Les valeurs de potentiel d'oxydoréduction de iNOS_{ox} en présence de H₄B et de différents analogues d'arginine sont obtenues dans un intervalle de 10 mV entre - 272 mV et - 262 mV. Compte tenu de l'erreur expérimentale associée à ces mesures, ces résultats montrent que le potentiel d'oxydoréduction de iNOS_{ox} ne varie pas de manière significative lorsqu'on remplace l'arginine par un de ses analogues (table IV.7).

iNOS _{ox}	$\lambda_{\text{Soret Fe}^{\text{III}}}$ (nm)	406 nm		650 nm		$E^{\circ'}_{\text{moyen}}$ (mV)
		n	$E^{\circ'}$ (mV)	n	$E^{\circ'}$ (mV)	
+ L-Arg	396	0,93	- 270	1,15	- 272	- 271
+ CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua	395	0,81	- 263	0,85	- 267	- 265
+ F-(CH ₂) ₄ -Gua	397	0,94	- 268	0,89	- 266	- 267
+ cyclopropyl-Gua	398	0,85	- 270	1,12	- 275	- 272
+ CH ₃ OPh-Gua	399	0,86	- 271	0,80	- 268	- 269
+ FPh-Gua	398	0,97	- 260	0,97	- 265	- 262

Table IV.7 : Effet d'analogues de L-Arg sur le potentiel d'oxydoréduction $E^{\circ'}$ du couple Fe^{II}/Fe^{III} de iNOS_{ox} en présence de H₄B (pH = 7,4), l'erreur expérimentale est estimée à environ ± 5 mV.

On peut donc conclure de ces résultats que les analogues d'arginine testés ne perturbent pas les paramètres thermodynamiques des étapes de transfert d'électrons du cycle catalytique de iNOS_{ox} et que les différences de réactivité et les variations dans la consommation d'électrons observées en présence de ces guanidines ne sont pas dues à une variation du potentiel d'oxydoréduction de l'hème.

Effet d'inhibiteurs de NOS sur le potentiel d'oxydoréduction de l'hème

Afin de valider nos résultats et de prouver que l'absence de variation observée dans les potentiels d'oxydoréduction de iNOS_{ox} en présence des différents analogues d'arginine n'est pas due à un défaut de conception de l'expérience de spectro-électrochimie, nous avons décidé d'utiliser le même système expérimental pour mesurer le potentiel de l'hème en présence d'inhibiteurs de NOS comme L-NAME ou SEITU (S-éthyl-isothio-urée) qui ont été décrits comme capables de modifier de manière significative le potentiel de l'hème [111].

Lors du titrage de iNOS_{ox} par spectro-électrochimie réalisé en présence de H₄B et d'un inhibiteur de NOS, L-NAME ou SEITU, ni le déplacement de la bande d'absorption de Soret ni la disparition de la bande d'absorption à 650 nm n'ont pu être observés : les spectres d'absorption UV-visible montrent que le médiateur, la phénosafranine, est bien totalement et réversiblement réduit et réoxydé, en revanche les bandes d'absorption caractéristiques de l'hème montrent que la totalité de l'enzyme reste à l'état Fe^{III} quel que soit le potentiel appliqué.

Ces résultats indiquent que le potentiel de iNOS_{ox} en présence de ces deux inhibiteurs est en dehors de la gamme de potentiels mesurables avec la phénosafranine comme médiateur, ce qui montre que le potentiel de iNOS_{ox} en présence de L-NAME et de SEITU est inférieur à - 305 mV. Ces résultats sont en bon accord avec les valeurs décrites pour le potentiel de iNOS_{ox} en présence de H₄B et de SEITU (- 322 mV) ou de L-NAME (estimé inférieur à - 460 mV en raison de l'absence de réduction de l'hème saturé en L-NAME en présence de dithionite de sodium) [111].

On peut donc en conclure que le système expérimental de spectro-électrochimie que nous avons utilisé est bien fonctionnel et que l'absence de variation observée dans les potentiels d'oxydoréduction de iNOS_{ox} en présence des différents analogues d'arginine est réelle et n'est pas due à un artefact expérimental.

Afin de mieux estimer le potentiel de iNOS_{ox} en présence de H₄B et de L-NAME, nous avons réalisé des essais de titrage par spectro-électrochimie en utilisant le complexe de cobalt dicarboxy-cobalticénium comme médiateur ($E^{\circ'} = - 651$ mV par rapport à l'ENH). Les spectres d'absorption UV-visible enregistrés montrent un déplacement direct et total de la bande de Soret de 400 nm à 415 nm et une disparition totale de la bande d'absorption à 650 nm lorsque le potentiel imposé en solution atteint - 500 mV, ce qui indique que le potentiel de iNOS_{ox} en présence de L-NAME est supérieur à cette valeur. La réoxydation de la solution conduit à la réapparition totale du spectre d'absorption UV-visible initial, ce qui montre que la réduction et l'oxydation complètes et réversibles de iNOS_{ox} en présence de L-NAME sont possibles. Ces résultats préliminaires montrent donc que le potentiel de iNOS_{ox} en présence de H₄B et de L-NAME est compris entre - 500 mV et - 460 mV (table IV.8).

Le complexe de cobalt employé comme médiateur présente l'avantage d'être pratiquement incolore, ce qui permet d'observer plus facilement le spectre d'absorption UV-visible des espèces d'intérêt. Il reste cependant à trouver un médiateur dont le potentiel soit légèrement

plus élevé que celui du complexe dicarboxy-cobalticénium pour pouvoir mesurer plus précisément le potentiel d'oxydoréduction de iNOS_{ox} en présence de L-NAME.

iNOS _{ox}	λ_{Soret} Fe ^{III} (nm)	E°' (mV)	Référence
+ SEITU	396	< - 305	[111]
	398	- 322	
+ L-NAME	400	- 500 < E°' < - 305	[111]
	400	< - 460	

Table IV.8 : Effet d'inhibiteurs de NOS sur le potentiel d'oxydoréduction E°' du couple Fe^{II}/Fe^{III} de iNOS_{ox} en présence de H₄B (pH = 7,4).

3.4. Conclusions

Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que le remplacement de l'arginine par un de ses analogues n'induit **aucune modification des conformations de l'hème**, à l'état Fe^{III} ni à l'état Fe^{II}, **aucune modification de l'interaction de l'hème avec son ligand proximal** et de manière cohérente **aucune modification du potentiel d'oxydoréduction de l'hème**.

Nous pouvons en conclure que la nature et le positionnement de la chaîne latérale des guanidines que nous avons testées n'ont **pas d'influence directe sur l'hème** ni sur les interactions de l'hème avec la cavité du site actif de iNOS_{ox}.

Les différences de réactivité entre les analogues d'arginine ne peuvent donc pas être reliées à des modifications directes de l'hème ou des interactions de l'hème avec la partie proximale du site actif : les variations dans la consommation d'électrons observées en présence de ces guanidines ne sont manifestement pas dues à une modification du potentiel d'oxydoréduction de l'hème, les variations dans la stabilité et la réactivité du complexe Fe^{II}-O₂ ne sont pas causées par une perturbation du caractère donneur σ du ligand proximal ni par une modification des énergies du système π de la porphyrine.

Puisque l'environnement proximal du site actif n'est pas affecté lorsqu'on remplace l'arginine par un de ses analogues, il est donc vraisemblable que les différences de réactivité observées proviennent de modifications induites au niveau de la partie distale du site actif.

4. Étude du complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox} en présence d'analogues de L-Arg

Afin de comprendre la nature des modifications que les analogues d'arginine sont capables d'induire au niveau de la partie distale du site actif de iNOS_{ox} et de comprendre comment ces modifications peuvent être responsables des différences de réactivité observées entre ces guanidines, nous avons réalisé l'étude des interactions entre la partie distale du site actif de iNOS_{ox} et les analogues d'arginine en utilisant le complexe Fe^{II}-CO comme sonde de la partie distale du site actif.

L'utilisation d'analogues ayant tous une chaîne latérale hydrophobe, donc qui adoptent un positionnement similaire dans le site actif des NOS, mais avec des pKa couvrant une gamme de 9 à 13 environ nous permettra de comprendre plus précisément les interactions qui s'établissent entre l'extrémité guanidine du substrat et le ligand distal du fer ainsi que le rôle du pKa du guanidinium dans ces interactions. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre le rôle du guanidinium dans les étapes de transfert de protons et dans l'activation de l'oxygène au cours du cycle catalytique des NOS.

4.1. Le monoxyde de carbone : une sonde du site actif des hémoprotéines

Le complexe Fe^{II}-CO est un outil très largement utilisé dans l'étude des hémoprotéines [213]. Sa structure électronique le rend en effet très sensible à la fois à l'intensité de l'effet donneur σ du ligand proximal et aux caractéristiques électrostatiques et polaires de l'environnement distal de l'hème. L'étude des fréquences caractéristiques de la liaison Fe-C et de la liaison C-O par spectroscopie Raman de résonance et par spectroscopie ATR-FTIR permet donc d'obtenir de nombreux renseignements sur les interactions entre l'hème, le ligand distal du fer, les résidus du site actif et le composé éventuellement fixé à proximité du fer.

L'utilisation du complexe Fe^{II}-CO comme sonde du site actif des NOS permet d'apprécier la nature et l'intensité des interactions qui s'établissent entre les différents éléments du site actif et le ligand distal du fer. Bien que les géométries des complexes Fe^{II}-CO et Fe^{II}-O₂ soient différentes (Fe-C-O est relativement linéaire, Fe-O-O est plus coudé) et que les ligands CO et O₂ ne soient pas isoélectroniques, l'étude du complexe Fe^{II}-CO permet donc indirectement de mieux appréhender quelles interactions sont les plus susceptibles d'exister entre l'environnement distal du site actif et le complexe Fe^{II}-O₂, ce qui permet de mieux

comprendre l'effet de l'environnement distal sur la stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et sur les phénomènes de découplage.

Structure électronique du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$

Le monoxyde de carbone est un ligand à la fois donneur σ et accepteur π . Il se lie au fer de l'hème par une interaction de donation des électrons de la paire non-liante n_{CO} du carbone vers l'orbitale vide d_{z^2} du fer (liaison σ) et par une interaction de rétrodonation des électrons des orbitales d_{xz} et d_{yz} du fer vers les orbitales vides π^*_x et π^*_y anti-liantes de CO (liaison π). L'addition de ces deux effets entraîne une diminution de l'énergie électronique du bloc d du fer, ce qui contribue à la forte stabilité du complexe.

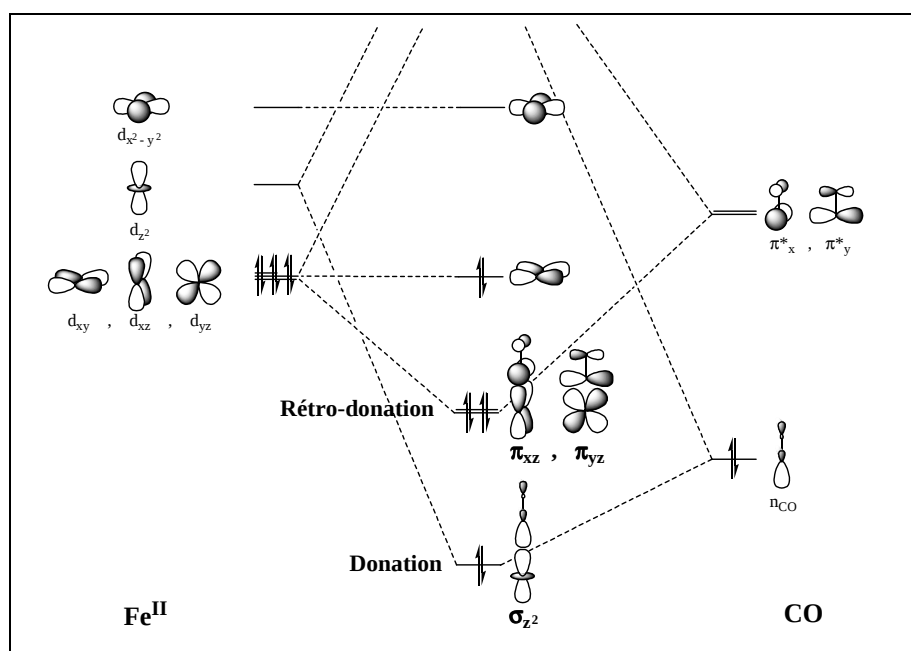


Figure IV.8 : Représentation schématique des interactions orbitales stabilisantes entre l'hème Fe^{II} plan carré et le ligand CO.

Interaction du complexe avec l'environnement distal

Pour des raisons de proximité géométrique, l'interaction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ avec l'environnement distal de l'hème s'établit principalement par l'intermédiaire de l'atome d'oxygène du ligand CO. Un environnement distal présentant un caractère électrostatique positif ou l'établissement d'interactions électro-attractrices, comme les liaisons hydrogène, avec le complexe favorisent l'apparition d'une charge partielle négative sur l'atome d'oxygène (figure IV.9). Cette charge partielle négative correspond à une augmentation de densité électronique au niveau des orbitales π^* de CO.

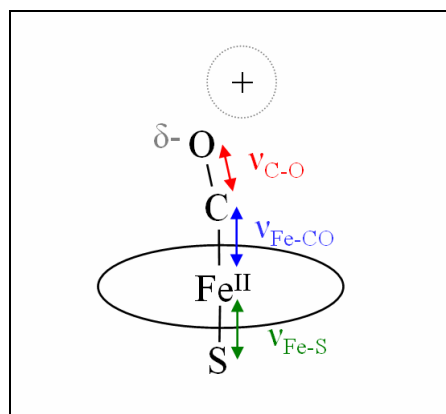


Figure IV.9 : Représentation schématique des interactions entre le complexe Fe^{II}-CO et l'environnement distal de l'hème.

En raison de l'interaction de rétrodonation entre les orbitales d du fer et les orbitales π^* de CO, l'augmentation de densité électronique des orbitales π^* de CO entraîne une augmentation de la rétrodonation, c'est-à-dire une augmentation de la densité électronique au niveau des orbitales π_{xz} et π_{yz} du complexe qui sont à la fois liantes pour Fe-C et anti-liantes pour C-O (figure IV.8). L'apparition d'une charge partielle négative sur l'oxygène due à un environnement distal positif entraîne donc un renforcement la liaison Fe-C (augmentation de $\nu_{\text{Fe-CO}}$) et un affaiblissement concomitant de la liaison C-O (diminution de ν_{CO}).

Ce phénomène est à l'origine de la corrélation inverse entre les fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et ν_{CO} qui a été observée et largement étudiée pour de nombreuses hémoprotéines (figure IV.10) [213, 218-220, 222, 260]. Par exemple, pour le cytochrome P450_{cam}, la droite de corrélation représentée figure IV.10 a pour équation : $\nu_{\text{Fe-CO}} = -0,638 (\pm 0,124) \cdot \nu_{\text{CO}} + 1718 (\pm 242)$ [218, 219]. La mesure de ces paramètres spectroscopiques permet de quantifier l'intensité du caractère électropositif à proximité immédiate de l'atome d'oxygène, ce qui fournit de précieux renseignements quant à la conformation et la polarité de l'environnement distal de l'hème. Dans un environnement fortement polaire, la rétrodonation est accentuée, $\nu_{\text{Fe-CO}}$ augmente pendant que ν_{CO} diminue, ce qui correspond à un point sur la gauche de la courbe de corrélation. Au contraire dans un environnement faiblement polaire, la rétrodonation n'est pas favorisée ce qui correspond à un point sur la droite de la courbe de corrélation.

Différentes études ont par ailleurs montré que l'intensité de l'interaction de rétrodonation du complexe Fe^{II}-CO est très peu affectée par les contraintes stériques ou par la modification de l'alignement des trois atomes Fe, C et O par rapport à la normale au plan de la porphyrine [213]. Ces paramètres sont donc peu susceptibles d'intervenir dans la modulation des fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et ν_{CO} .

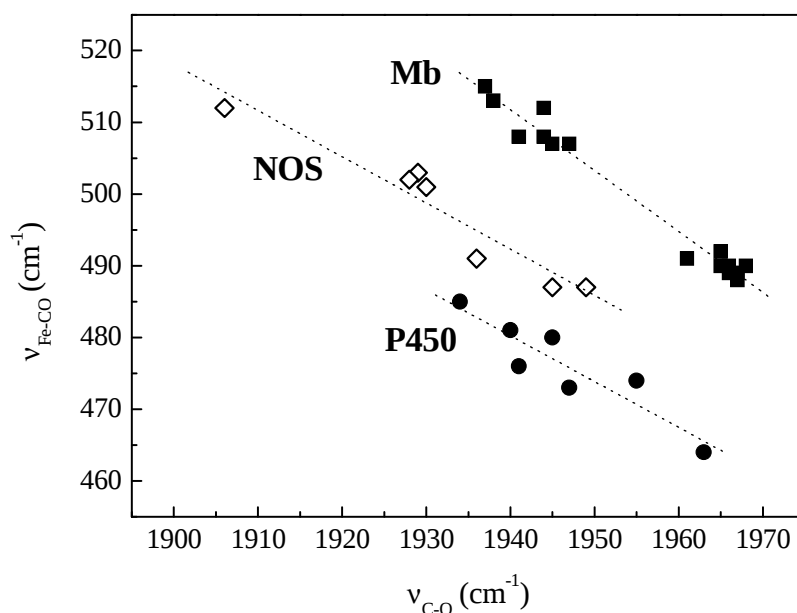


Figure IV.10 : Corrélation inverse entre les fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et ν_{CO} observée pour différentes hémoprotéines [213, 260].

Effet du ligand proximal

L'étude des fréquences associées aux modes de vibration des liaisons Fe-CO et C-O permet également d'obtenir des informations sur la nature du ligand proximal et la force de son caractère donneur σ . En effet, le ligand proximal et le ligand distal sont en compétition pour établir une liaison σ avec le fer par l'intermédiaire de son orbitale vide d_{z^2} : plus le ligand proximal est un bon donneur σ , plus la liaison σ entre le fer et le ligand distal CO est faible. En revanche, puisque l'interaction entre le fer et le ligand proximal n'affecte pas le système π de la liaison Fe-C, la rétrodonation reste inchangée et la force de la liaison C-O n'est pas modifiée.

Ce phénomène est clairement visible sur la courbe de corrélation entre les fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et ν_{CO} (figure IV.10). Les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ d'hémoprotéines qui possèdent le même ligand proximal, comme la famille des myoglobines dont le ligand proximal est une histidine, sont situés sur la même droite de corrélation. Le remplacement du ligand histidine par un ligand meilleur donneur σ , comme dans la famille des cytochromes P450 dont le ligand proximal est une cystéine, entraîne une diminution très importante de la force de la liaison Fe-C sans que la force de la liaison C-O soit affectée, ce qui se traduit par un décalage vers le bas de la courbe de corrélation.

On peut remarquer que les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de la famille des NOS se situent sur une droite de corrélation distincte de celle de la famille des cytochromes P450 bien que ces deux

familles d'hémoprotéines possèdent une cystéine comme ligand proximal. En effet, l'environnement proximal de l'hème est impliqué dans la modulation fine de la force du caractère donneur σ du ligand proximal. En particulier, l'établissement de liaisons hydrogène entre des résidus du côté proximal de l'hème et le ligand proximal du fer peut conduire à l'affaiblissement du caractère donneur σ du ligand proximal. Par exemple dans le cas des NOS, la cystéine proximale établit une liaison hydrogène forte avec un résidu tryptophane voisin ce qui explique que le caractère donneur σ de la cystéine soit plus faible chez les NOS que chez les cytochromes P450 où ce résidu tryptophane n'existe pas. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus par mesure directe de la force de la liaison Fe-S (voir IV.3.2.) qui montrent que la liaison Fe-S chez les NOS ($\nu_{\text{Fe-S}} = 338 \text{ cm}^{-1}$) est plus faible que la liaison Fe-S chez les cytochromes P450 ($\nu_{\text{Fe-S}} = 351 \text{ cm}^{-1}$).

L'étude des fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et ν_{CO} du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ permet donc d'obtenir des renseignements sur **la polarité de l'environnement distal de l'hème** et sur **la force de la liaison entre le fer et son ligand distal**, qui sont **deux paramètres essentiels au contrôle de la réactivité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$** au cours du cycle catalytique des NOS.

Existence de plusieurs conformations

Le signal associé au mode de vibration de la liaison Fe-CO est observé dans la région des basses fréquences du spectre Raman entre 470 et 520 cm^{-1} . L'analyse de ce signal est rendue difficile d'une part par la présence de contributions mineures associées à des modes de déformation de la porphyrine exaltés par leur proximité avec le mode de vibration de la liaison Fe-CO, et d'autre part par la largeur très importante du signal. Chez la plupart des hémoprotéines, le signal Raman associé à la fréquence de vibration $\nu_{\text{Fe-CO}}$ présente en effet une largeur de 20 à 50 cm^{-1} à mi-hauteur, ce qui a été attribué à une inhomogénéité structurale du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$. Le signal associé au mode de vibration de la liaison C-O qui est observé entre 1900 et 1970 cm^{-1} est également élargi, ce qui confirme l'existence probable de plusieurs conformations du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ au sein de la cavité du site actif [219, 261].

Dans le cas des NOS en absence de substrat et de cofacteur, il a été proposé que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ existe sous deux conformations distinctes [112, 210, 211, 216] : une conformation « ouverte » où la structure de la protéine serait relâchée avec un environnement distal de l'hème faiblement électropositif qui correspond à une fréquence de vibration Fe-CO basse et

une fréquence de vibration C–O élevée, et une conformation « fermée » où la structure de la protéine serait plus resserrée ce qui entraînerait une augmentation de la polarité de l'environnement distal de l'hème et qui correspond à une fréquence de vibration Fe–CO élevée et une fréquence de vibration C–O basse.

La fixation du substrat L-Arg au niveau du site actif introduit une charge positive à proximité de l'hème, ce qui induit un renforcement important de la polarité de l'environnement immédiat du ligand CO : on observe la suppression de la conformation « ouverte » au profit de la conformation « fermée » accompagnée d'une augmentation de la fréquence $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et d'une diminution de la fréquence ν_{CO} associées à la conformation « fermée ». Cet effet est très nettement observé chez iNOS [180, 212] où la fréquence $\nu_{\text{Fe-CO}}$ associée à la conformation « fermée » augmente de 499 cm^{-1} à 512 cm^{-1} lors de la fixation de L-Arg pendant que la fréquence ν_{CO} correspondante diminue d'environ 1940 cm^{-1} à 1905 cm^{-1} . On observe également le même phénomène chez les autres isoformes de NOS, mais avec une amplitude plus faible chez nNOS [91, 97, 216].

4.2. Étude du complexe Fe^{II} -CO par spectroscopie ATR-FTIR

Les spectres ATR-FTIR de iNOS_{ox} ont été enregistrés dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.3. en présence de cofacteur H₄B et d'arginine ou d'analogues d'arginine en concentrations saturantes.

La fréquence associée au mode d'élongation de la liaison C–O des complexes Fe^{II} -CO des hémoprotéines peut être observée par spectroscopie ATR-FTIR entre 1900 et 1970 cm^{-1} environ. Cette région du spectre ne comporte pratiquement aucun autre signal de vibration, ce qui facilite grandement l'observation et l'attribution du signal.

Le spectre du complexe Fe^{II} -CO de iNOS_{ox} enregistré en l'absence de substrat et de cofacteur présente un signal très large autour de 1960 cm^{-1} qui peut être déconvolué en deux bandes d'absorption à 1949 et 1963 cm^{-1} . L'addition de substrat L-Arg et de cofacteur H₄B provoque la disparition de cette bande large et l'apparition d'une seule bande fine à 1903 cm^{-1} (figure IV.11, table IV.9). Ces résultats sont en bon accord avec les valeurs décrites pour iNOS [212]. De manière très intéressante, l'addition d'analogues de L-Arg provoque la disparition de la bande large observée en l'absence de substrat et l'apparition d'une seule bande fine comme lors de l'addition de L-Arg, mais la position de cette bande fine varie de 1905 cm^{-1} à

1921 cm⁻¹ en fonction de l'analogue d'arginine ajouté (figure IV.11, table IV.9). Dans le cas de l'analogue cyclopropyl-guanidine, on observe également une bande d'intensité faible à 1896 cm⁻¹ qui apparaît comme un épaulement dans la bande principale.

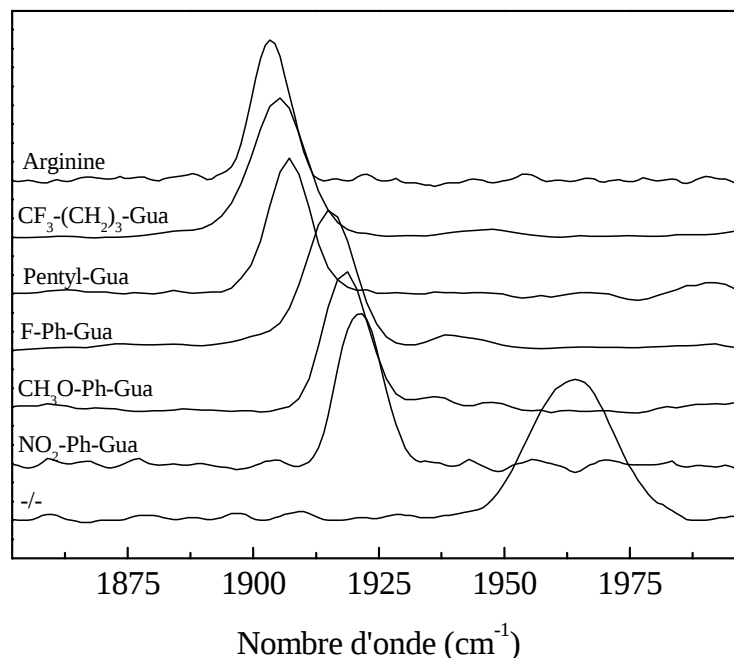


Figure IV.11 : Effet d'analogues de L-Arg sur le spectre ATR-FTIR de iNOS_{ox} Fe^{II}-CO. Les spectres ont été enregistrés en présence de H₄B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

Ces résultats indiquent clairement que les différents analogues d'arginine testés sont tous capables d'établir des interactions spécifiques avec l'environnement distal de l'hème, ce qui se traduit par l'observation d'une bande ν_{CO} étroite présentant une fréquence de valeur nettement inférieure à celle de la bande observée en l'absence de substrat (figure IV.11). Ces résultats montrent donc que, comme dans le cas de l'arginine, la fixation de ces analogues au niveau du site actif de iNOS_{ox} induit une augmentation de la polarité de l'environnement immédiat du ligand CO, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle l'extrémité guanidinium positivement chargée de ces analogues se place à proximité du fer de la même manière que l'extrémité guanidinium du substrat naturel L-Arg (voir IV.2.1.).

Nous avons vu au cours du chapitre précédent que la partie proximale du site actif de iNOS_{ox} ne subit pas de modification lorsqu'on remplace L-Arg par un de ses analogues et qu'il est donc vraisemblable que les différences de réactivité observées entre les analogues proviennent de modifications induites au niveau de la partie distale du site actif. Les résultats que nous avons obtenus par spectroscopie ATR-FTIR confirment cette hypothèse et montrent

que les différents analogues d'arginine précédemment testés induisent des modifications significatives de l'environnement distal à proximité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$. Ces modifications dépendent de l'analogue considéré et sont différentes des modifications induites par la fixation de l'arginine, ce qui se traduit par des variations du signal associé au mode de vibration de la liaison C–O de 1905 à 1921 cm^{-1} .

De manière intéressante, on peut remarquer que l'intensité des interactions entre le ligand CO et son environnement immédiat, qui est reflétée par la position de la bande d'absorption IR, est directement corrélée au pKa de l'analogue fixé au niveau du site actif (figure IV.12). Les analogues de type alkyl-guanidines dont le pKa est assez proche de celui de l'arginine induisent une augmentation de la polarité de l'environnement du ligand distal similaire à celle observée en présence d'arginine, caractérisée par une fréquence ν_{CO} comprise entre 1905 et 1911 cm^{-1} , alors que les analogues de type aryl-guanidines dont le pKa est sensiblement plus bas que celui de l'arginine induisent une augmentation de la polarité de l'environnement du ligand distal moins prononcée qui se traduit par une fréquence ν_{CO} plus élevée comprise entre 1915 et 1921 cm^{-1} (table IV.9).

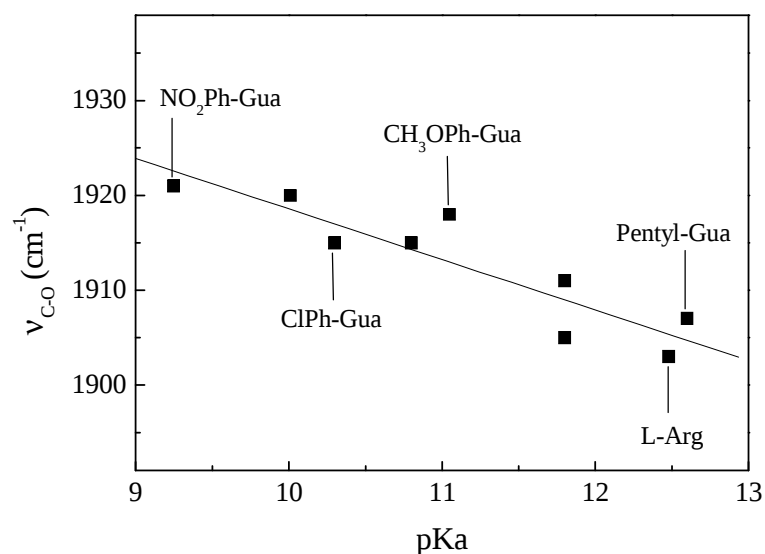


Figure IV.12 : Corrélation entre les fréquences ν_{CO} du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de iNOS_{ox} observées en présence de différents analogues de L-Arg et le pKa de ces analogues de L-Arg.

La droite de corrélation représentée figure IV.12 traduit une tendance nette de la force de la liaison C–O à diminuer lorsque le pKa du guanidinium augmente (elle ne signifie pas qu'il existe une loi linéaire entre le pKa du guanidinium et ν_{CO}). Ces résultats indiquent que plus le pKa du guanidinium fixé au niveau du site actif de iNOS_{ox} est élevé, plus le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ ressent une influence électropositive forte de son environnement distal.

Ces résultats mettent pour la première fois en évidence l'importance du rôle joué par le pKa de l'extrémité guanidinium dans l'interaction entre la guanidine fixée au niveau du site actif de iNOS_{ox} et le ligand distal du fer.

4.3. Étude du complexe Fe^{II}-CO par spectroscopie Raman de résonance

En raison de l'interaction de rétrodonation entre les orbitales d du fer et les orbitales π^* de CO à l'origine de la corrélation inverse entre les fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et ν_{CO} (voir IV.4.1.), l'effet du pKa du guanidinium que nous avons observé sur la force de la liaison C-O devrait logiquement être observé de manière inverse sur la force de la liaison Fe-C du complexe Fe^{II}-CO chez iNOS_{ox}.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé les spectres Raman de résonance de iNOS_{ox} (environ 150 μM) à l'état Fe^{II}-CO en présence de H₄B (400 μM) et des différents analogues d'arginine (20 mM) dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.2.. La longueur d'onde d'excitation, qui est de 441,6 nm, correspond au maximum d'absorption UV-visible de la bande de Soret du complexe Fe^{II}-CO, ce qui permet d'exalter spécifiquement les modes de vibrations du complexe héminique.

Les spectres présentés figure IV.13 sont le résultat de l'accumulation de 5 à 10 spectres représentant chacun 20 à 40 minutes d'exposition.

Les spectres obtenus sont très similaires aux spectres décrits pour le complexe Fe^{II}-CO des différentes isoformes de NOS [91, 97, 211, 214, 216] et d'autres hémoprotéines [217, 253, 257]. Les différentes bandes des spectres RR ont été attribuées par analogie avec ces données. Les spectres RR du complexe Fe^{II}-CO permettent à fois d'observer les fréquences caractéristiques des modes de vibration de la porphyrine (figure IV.4, chapitre IV.3.1.2.2.) et les fréquences associées aux modes d'élongation et de déformation de la liaison entre le fer et le ligand distal CO (figure IV.13).

4.3.1. Mode de déformation $\delta_{\text{Fe-CO}}$

Le spectre Raman de résonance de iNOS_{ox} en absence de substrat et de cofacteur présente une bande de faible intensité à 559 cm^{-1} attribuée au mode de déformation $\delta_{\text{Fe-CO}}$. Ce mode de vibration n'est actif en spectroscopie RR que lorsque la géométrie de l'hème est nettement

distordue par rapport à une symétrie plane, ce qui explique que le signal associé ne soit pas visible dans les spectres RR de nombreuses hémoprotéines [260]. Différentes études ont montré que le mode déformation $\delta_{\text{Fe-CO}}$ est corrélé au mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ mais que l'amplitude de variation est en général assez faible [213].

L'addition de substrat L-Arg provoque le déplacement de la bande $\delta_{\text{Fe-CO}}$ jusqu'à 566 cm^{-1} , ce qui est en bon accord avec les valeurs décrites pour iNOS [212]. L'addition d'analogues d'arginine provoque également le déplacement de la bande $\delta_{\text{Fe-CO}}$ par rapport à l'enzyme en absence de substrat, mais l'amplitude du déplacement dépend de la nature de l'analogue (figure IV.14). En présence d'alkyl-guanidines, le déplacement est pratiquement le même que pour L-Arg : $\delta_{\text{Fe-CO}}$ est observé entre 565 et 567 cm^{-1} . En revanche, en présence d'aryl-guanidines, le déplacement est de moins grande amplitude, avec des valeurs de $\delta_{\text{Fe-CO}}$ comprises entre 561 et 565 cm^{-1} .

4.3.2. Mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$

L'influence de l'analogue d'arginine fixé au niveau du site actif de iNOS_{ox} sur le ligand distal est clairement confirmée par l'étude du mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$. Le signal observé entre 450 et 530 cm^{-1} dans la région des basses fréquences du spectre Raman de résonance montre en effet des différences très marquées en fonction de l'analogue d'arginine (figure IV.13).

En absence de substrat et de cofacteur, le mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ apparaît comme une bande très large (environ 50 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur) centrée autour de 490 cm^{-1} , ce qui a été attribué à l'existence de deux conformations distinctes de la protéine : une conformation « ouverte » et une conformation « fermée » (voir IV.4.1.). L'addition de L-Arg et de H₄B est supposée induire des contraintes supplémentaires sur la structure du site actif et favoriser la conformation « fermée » ce qui provoque le déplacement et l'affinement du signal qui se présente comme une bande étroite (15 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur) centrée à 512 cm^{-1} . Nous avons également réalisé le spectre Raman de résonance du complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox} en présence de NOHA et de H₄B. On observe également un affinement et un déplacement vers les hautes fréquences du signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ mais dans une moindre mesure qu'en présence de L-Arg, puisque le signal est cette fois observée autour de 500 cm^{-1} avec une largeur à mi-hauteur de l'ordre de 30 cm^{-1} . Ces résultats correspondent aux valeurs décrites pour iNOS et pour les autres isoformes de NOS [214, 216] et montrent que **les deux substrats naturels L-Arg et NOHA ont des effets spécifiques et distincts sur le ligand distal du fer.**

Les expériences que nous avons réalisées en présence des analogues d'arginine ont montré que la fixation des alkyl-guanidines au niveau du site actif de iNOSox induit un effet similaire à celui de la fixation de l'arginine : on observe un affinement et un déplacement du signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ vers 505 à 510 cm^{-1} (figure IV.13). Au contraire, en présence d'aryl-guanidine, le signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ reste large et centré autour de 490 à 500 cm^{-1} (figure IV.13). Ces résultats montrent que **les différents analogues ont des effets distincts sur l'environnement immédiat du ligand distal du fer** (table IV.9).

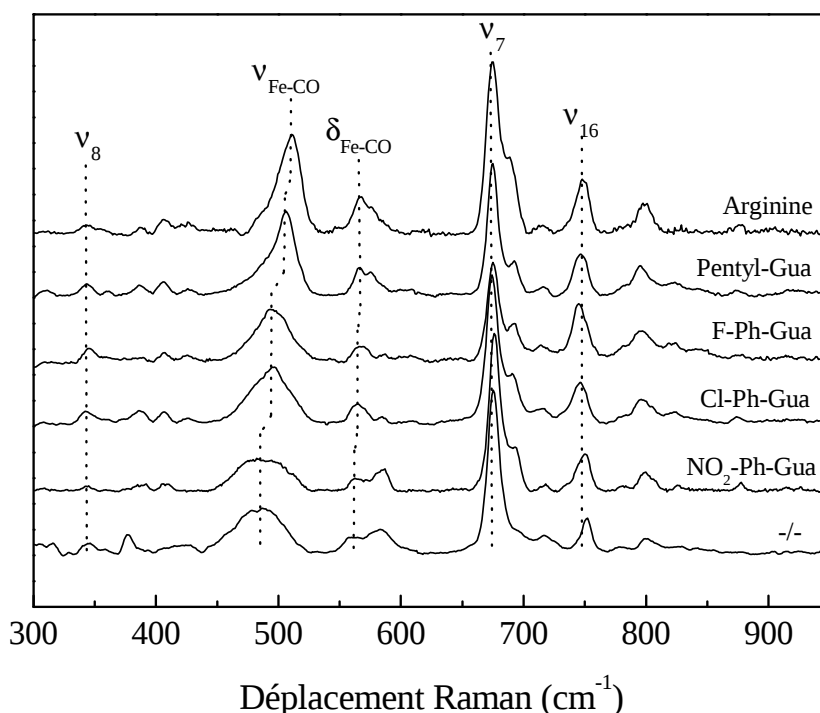


Figure IV.13 : Effet d'analogues de L-Arg sur la région des basses fréquences du spectre Raman de résonance de iNOS_{ox} Fe^{II}-CO (excitation à 441,6 nm). Les spectres ont été enregistrés en présence de H₄B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

L'étude par ATR-FTIR du complexe Fe^{II}-CO chez iNOS_{ox} (voir IV.4.2.) a montré que la position du signal associé au mode de vibration ν_{CO} est directement corrélée au pKa de l'analogue d'arginine fixé au niveau du site actif de iNOS_{ox}. De manière cohérente, le signal associé au mode de vibration $\nu_{\text{Fe-CO}}$ est également directement relié au pKa de l'analogue d'arginine mais de manière inversée par rapport au mode de vibration ν_{CO} (figure IV.14). Les modes de vibration ν_{CO} et $\nu_{\text{Fe-CO}}$ sont donc bien inversement corrélés et dépendent tous les deux directement du pKa de l'analogue d'arginine fixé au niveau du site actif de iNOS_{ox}.

De même que précédemment, la droite de corrélation représentée figure IV.14 ne signifie pas qu'il existe une loi linéaire entre le pKa du guanidinium et $\nu_{\text{Fe-CO}}$ mais elle souligne une tendance nette de la force de la liaison Fe-C à augmenter lorsque le pKa du guanidinium augmente.

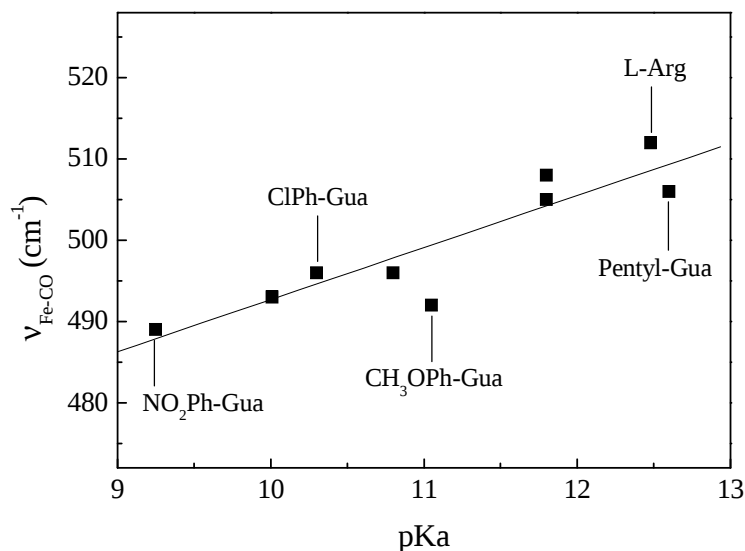


Figure IV.14 : Corrélation entre les fréquences $\nu_{\text{Fe-CO}}$ du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de iNOS_{ox} observées en présence de différents analogues de L-Arg et le pKa de ces analogues de L-Arg.

Protéine		pKa	$\nu_{\text{Fe-CO}}$	$\delta_{\text{Fe-CO}}$	ν_{CO}	Référence
iNOS _{ox}	+ L-Arg	12,48	512	566	1903	
	+ Pentyl-Gua	12,6	506	567	1907	
	+ $\text{CF}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-Gua}$	11,8	505	566	1905	
	+ cyclopropyl-Gua	11,8	508	565	1911	
	+ $\text{CH}_3\text{O-Ph-Gua}$	11,0	492	562	1918	
	+ F-Ph-Gua	10,8	496	563	1915	
	+ Cl-Ph-Gua	10,3	496	565	1915	
	+ $\text{CF}_3\text{-Ph-Gua}$	10,0	493	561		
	+ $\text{NO}_2\text{-Ph-Gua}$	9,3	489	563	1921	
	+ NOHA	8,5	498	563	nd	
nNOS	-/-	-	488	559	1960	
	+ L-Arg	12,48	503	565	1929	[216]
	+ NOHA	8,5	502	563	1928	[216]
saNOS	-/-	-	491	562	1936	[216]
	+ L-Arg	12,48	504	567	1917	[91]
	-/-	-	490	560	1940	[91]

Table IV.9 : Fréquences (en cm^{-1}) des principaux modes de vibration du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ chez différentes NOS (excitation à 441,6 nm). Les spectres ont été enregistrés en présence de H_4B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

Les résultats obtenus par spectroscopie RR confirment donc très clairement les premiers résultats que nous avons obtenus par spectroscopie ATR-FTIR : plus le pKa du guanidinium fixé au niveau du site actif de iNOS_{ox} est élevé, plus le complexe Fe^{II}-CO ressent une influence électropositive forte de son environnement distal.

4.3.3. Déconvolution du signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$

Il est possible que la variabilité du signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ observé en présence des différents analogues d'arginine reflète la tendance de chacun de ces analogues à favoriser l'une des conformations de la cavité du site actif « ouverte » ou « fermée ». Cependant, l'analyse du spectre révèle que le signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ peut en réalité être déconvolué en trois ou quatre pics gaussiens selon l'analogue d'arginine considéré (table IV.10), ce qui indique qu'il existe probablement plus de deux conformations distinctes pour le complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox}.

La déconvolution en une somme de plusieurs fonctions gaussiennes des composantes spectrales superposées dans le signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ est réalisée de la manière décrite au chapitre II.3.2..

En absence de substrat et de cofacteur, le signal très large $\nu_{\text{Fe-CO}}$ peut être déconvolué en deux contributions majoritaires à 477 et 494 cm⁻¹ et deux contributions minoritaires à 460 et 509 cm⁻¹. En présence de L-Arg ou de NOHA, le mode observé à 460 cm⁻¹ est absent, ce qui indique qu'il correspond probablement au signal d'un mode de vibration de la porphyrine exalté uniquement lorsque le mode $\nu_{\text{Fe-CO}}$ présente une fréquence suffisamment basse. Les trois autres contributions observées dans le signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ en absence de substrat et de cofacteur sont également observées en présence de L-Arg ou de NOHA mais dans des proportions différentes (table IV.10). En présence de L-Arg et de cofacteur H₄B, la contribution à 513 cm⁻¹ est largement majoritaire devant deux contributions mineures à 485 et 501 cm⁻¹, ce qui donne au signal son allure fine et centrée autour de 512 cm⁻¹. En présence de NOHA et de cofacteur H₄B, c'est la contribution à 499 cm⁻¹ qui est majoritaire devant deux contributions mineures à 485 et 514 cm⁻¹, ce qui donne au signal son allure plus large centrée autour de 498 cm⁻¹. Ces résultats sont en bon accord avec les précédentes études réalisées sur iNOS_{ox} [214].

La déconvolution du signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ observé en présence des analogues d'arginine révèle que les trois contributions observées en présence d'arginine ou de NOHA existent également en

présence des analogues d'arginine, mais dans des proportions qui varient en fonction de l'analogue considéré (table IV.10).

Ces trois contributions majoritaires correspondent manifestement à **trois conformations différentes qui ont des effets distincts sur la polarité du site actif au voisinage du ligand distal du fer**. La conformation qui induit l'interaction polaire la plus forte comporte un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ à fréquence élevée entre 507 et 514 cm^{-1} , la conformation intermédiaire qui induit un effet électropositif moyen présente un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ entre 494 et 503 cm^{-1} , et le signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ de la conformation qui induit l'interaction polaire la plus faible apparaît de 477 à 490 cm^{-1} .

Protéine	$\nu_{\text{Fe-CO}}$ apparent	$\nu_{\text{Fe-CO}}$ (largeur en cm^{-1} - intensité relative en %)				Référence	
iNOS _{oxy}	+ L-Arg	512		485 (8 - 5)	501 (15 - 39)	513 (13 - 56)	
	+ Pentyl-Gua	506		477 (16 - 14)	494 (16 - 24)	507 (15 - 61)	
	+ CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua	505		477 (16 - 15)	494 (16 - 26)	507 (15 - 59)	
	+ Cyclopropyl-Gua	508		490 (15 - 15)	503 (12 - 38)	512 (11 - 47)	
	+ NOHA	498		485 (16 - 20)	499 (16 - 65)	514 (10 - 15)	
	+ F-Ph-Gua	496		477 (16 - 21)	496 (18 - 63)	512 (16 - 16)	
	+ Cl-Ph-Gua	496		477 (18 - 30)	496 (18 - 58)	514 (12 - 12)	
	+ CF ₃ -Ph-Gua	493		479 (12 - 26)	495 (18 - 53)	512 (14 - 21)	
	-/-	488	460 (16 - 16)	477 (17 - 39)	494 (16 - 37)	509 (12 - 8)	
	+ CH ₃ O-Ph-Gua	492	465 (12 - 15)	479 (15 - 35)	495 (13 - 29)	508 (15 - 20)	
	+ NO ₂ -Ph-Gua	489	464 (16 - 16)	479 (17 - 36)	498 (18 - 41)	514 (10 - 5)	
nNOS _{oxy}	+ L-Arg	503		489 (26 - 52)	502 (12 - 28)	514 (12 - 20)	[214]
	+ NOHA	502		490 (26 - 56)	501 (12 - 30)	514 (12 - 14)	[214]
	-/-	491		489 (26 - 80)	501 (12 - 14)	514 (12 - 6)	[214]

Table IV.10 : Fréquences (en cm^{-1}) obtenues par déconvolution en pics gaussiens du mode $\nu_{\text{Fe-CO}}$ du complexe Fe^{II}-CO chez différentes NOS (excitation à 441,6 nm). Les spectres ont été enregistrés en présence de H₄B sauf le spectre -/- qui a été enregistré en absence de substrat et de cofacteur.

De manière intéressante, il est possible de dégager trois schémas majeurs dans l'analyse du signal et de classer chaque analogue d'arginine dans une de ces trois catégories.

Famille 1

La première famille d'analogues présente un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ similaire à celui observé en présence d'arginine avec la contribution majoritaire d'une bande étroite entre 507 et 513 cm^{-1} correspondant à la conformation qui induit l'interaction la plus forte avec le ligand distal CO,

et la contribution minoritaire de deux bandes qui correspondent aux deux autres conformations (figure IV.15). Les alkyl-guanidines que nous avons testées, c'est-à-dire pentyl-Gua, CF₃-(CH₂)₃-Gua et cyclopropyl-Gua, appartiennent toutes à cette première famille d'analogues. Ces résultats indiquent que, comme l'arginine, les alkyl-guanidines interagissent fortement avec le ligand CO *via* une augmentation importante du caractère électrostatique positif apparent de l'environnement distal de l'hème.

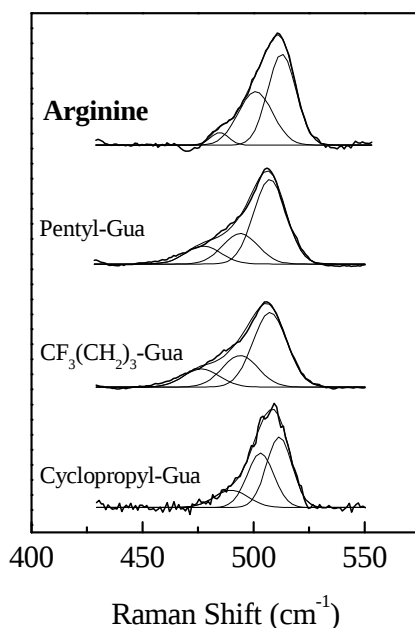


Figure IV.15 : Signal associé au mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ du complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox} dans la région des basses fréquences du spectre Raman de résonance (excitation à 441,6 nm) en présence de H₄B et de L-Arg ou des analogues de L-Arg de la famille 1.

Famille 2

La deuxième famille d'analogues présente un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ similaire à celui observé en présence de NOHA avec la contribution majoritaire d'une bande entre 496 et 499 cm⁻¹ qui correspond à la conformation qui induit une interaction d'intensité moyenne avec le ligand distal CO, et la contribution minoritaire de deux bandes qui correspondent aux deux autres conformations (figure IV.16). Les aryl-guanidines F-Ph-Gua, Cl-Ph-Gua et CF₃-Ph-Gua appartiennent à cette deuxième famille d'analogues. Ces résultats indiquent que, de la même manière que la NOHA, ces aryl-guanidines interagissent de manière spécifique avec le ligand CO mais que l'augmentation du caractère électrostatique positif apparent de l'environnement distal de l'hème est moins forte que celle observée en présence des analogues de la première famille.

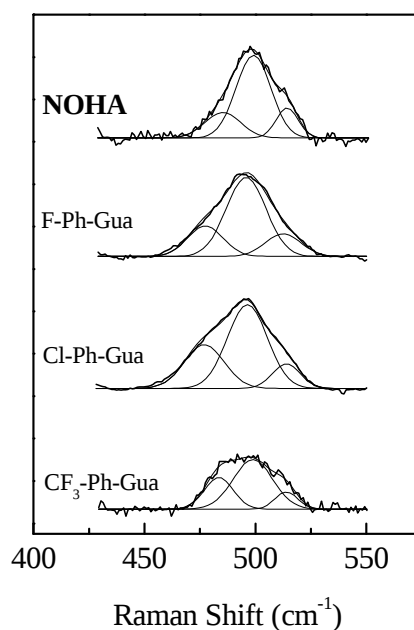


Figure IV.16 : Signal associé au mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de iNOS_{ox} dans la région des basses fréquences du spectre Raman de résonance (excitation à 441,6 nm) en présence de H_4B et de NOHA ou des analogues de L-Arg de la famille 2.

Famille 3

La troisième famille d'analogues présente un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ similaire à celui observé en absence de substrat et de cofacteur avec la contribution majoritaire de deux bandes autour de 480 cm^{-1} et 495 cm^{-1} correspondant respectivement à la conformation qui induit les interactions les plus faibles et à celle qui induit des interactions d'intensité moyenne avec le ligand distal CO, et la contribution minoritaire d'une bande autour de 510 cm^{-1} qui correspond à la dernière conformation (figure IV.17). On observe également une bande de faible intensité vers 465 cm^{-1} qui correspond probablement à un mode de vibration de la porphyrine exalté par la vibration aux fréquences assez basses du mode $\nu_{\text{Fe-CO}}$ observées pour cette famille d'analogues. Les aryl-guanidines $\text{CH}_3\text{O-Ph-Gua}$ et $\text{NO}_2\text{-Ph-Gua}$ appartiennent à cette troisième famille d'analogues.

L'hypothèse selon laquelle ces analogues ne se seraient pas fixés au site actif n'a pas été retenue. En effet, les analogues ont été ajoutés à des concentrations au moins 10 fois supérieures aux constantes de dissociation de iNOS_{ox} en présence de ces guanidines et le spectre d'absorption UV-visible de la solution de iNOS_{ox} en présence de ces analogues présente le pic d'absorption de Soret vers 395 nm attendu pour un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{HS}$. Les données obtenues par spectroscopie ATR-FTIR montrent également un effet de ces analogues sur le signal $\nu_{\text{C-O}}$ nettement différent de celui observé en absence de substrat (voir IV.4.2.).

Les analogues de la troisième famille sont donc bien fixés au niveau du site actif de iNOS_{ox}, mais les résultats obtenus montrent que la fixation de ces analogues ne permet pas l'établissement d'interactions fortes ou spécifiques avec le ligand distal.

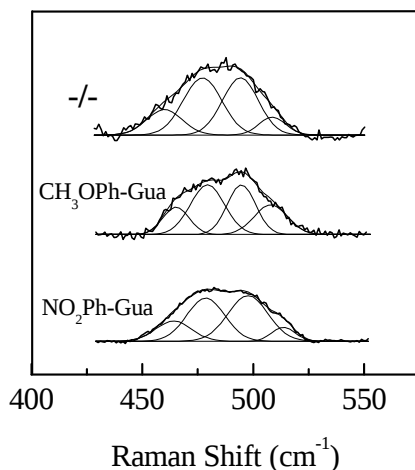


Figure IV.17 : Signal associé au mode d'élongation $\nu_{\text{Fe-CO}}$ du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de iNOS_{ox} dans la région des basses fréquences du spectre Raman de résonance (excitation à 441,6 nm) en absence de substrat et de cofacteur ou en présence de H₄B et des analogues de L-Arg de la famille 3.

4.4. Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les deux substrats naturels L-Arg et NOHA ont des effets nettement différents sur l'environnement distal de l'hème. La fixation de l'arginine dans le site actif de iNOS_{ox} induit une interaction apparemment très forte avec le ligand distal du fer caractérisée par un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ dominé par une contribution majoritaire à de 513 cm⁻¹, alors que la NOHA induit une interaction apparemment moins intense avec une contribution majoritaire à 499 cm⁻¹.

Les résultats obtenus par spectroscopie ATR-FTIR et par spectroscopie Raman de résonance montrent clairement que les différents analogues d'arginine ont également des effets distincts et spécifiques sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ ce qui traduit des effets distincts et spécifiques sur l'environnement du ligand distal du fer. De manière intéressante, les effets des analogues d'arginine sur l'environnement distal de l'hème sont d'une part directement corrélés au pKa des analogues et peuvent d'autre part être regroupés en trois familles qui induisent respectivement des effets similaires à ceux de L-Arg, de NOHA et ceux observés en l'absence de substrat et de cofacteur.

Ces résultats suggèrent fortement que **les différences de chemin réactionnel entre L-Arg et NOHA au cours du cycle catalytique des NOS**, de même que **les différences de réactivité observées entre les analogues d'arginine**, seraient dues aux **différentes interactions que ces substrats et analogues de substrats induisent entre leur extrémité (hydroxy)guanidinium et le ligand distal du fer**.

L'ensemble de nos résultats montre que **ces interactions dépendent directement du pKa du substrat** et suggère **que les paramètres de stabilité et de réactivité du ligand distal du fer sont directement reliés au caractère plus ou moins acide de la guanidine ou de l'hydroxyguanidine** fixée au niveau du site actif de iNOS_{ox}.

5. Importance de l'état de solvation du site actif

5.1. Données structurales

Positionnement des analogues d'arginine dans le site actif

Nous avons vu au chapitre IV.2.1. que les études structurales de différentes isoformes de NOS en présence de L-Arg, de NOHA et d'analogues de NOHA suggèrent que les analogues d'arginine adoptent très probablement un positionnement au niveau du site actif qui conserve la conformation de l'extrémité guanidine bien que la conformation de la chaîne latérale soit susceptible de varier.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail confirment largement cette hypothèse. En effet, l'absence de variation dans la force de liaison Fe-S, la conformation de l'hème ou le potentiel d'oxydoréduction de l'hème lorsqu'on remplace L-Arg par un de ses analogues, ainsi que les grandes similitudes observées dans les spectres ATR-FTIR et Raman de résonance du complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox} en présence des analogues et en présence de L-Arg montrent clairement que la position précise de l'extrémité guanidine des analogues d'arginine est similaire à celle de l'extrémité guanidine de L-Arg.

État de protonation du guanidinium

On peut remarquer que les analogues que nous avons testés ont tous un pKa supérieur à 9, ce qui signifie que dans les conditions expérimentales utilisées (pH = 7,4) l'extrémité guanidinium de chacun de ces analogues se présente sous la forme protonée en solution.

Le pH au cœur du site actif de l'enzyme est susceptible d'être différent du pH en solution. Cependant dans le cas des NOS, la poche du site actif est située relativement près de la surface de l'enzyme et communique facilement avec le milieu extérieur, ce qui suggère que la différence de pH entre l'intérieur du site actif et l'extérieur de l'enzyme ne doit pas être très grande. De plus, nos études spectroscopiques du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de iNOS_{ox} montrent d'une part que chacun des analogues d'arginine induit un champ électrostatique positif à proximité du ligand distal du fer et d'autre part que l'effet des différents analogues d'arginine sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ varie régulièrement en fonction du pKa du guanidinium.

Ces résultats indiquent clairement qu'il n'y a pas de changement d'état de protonation entre les différents analogues d'arginine lorsqu'ils sont fixés au niveau du site actif de l'enzyme et qu'ils sont tous protonés.

Réseau de liaisons hydrogène

Les études structurales des différentes isoformes de NOS ont montré que les interactions entre L-Arg et les résidus du site actif fixent l'extrémité guanidine de L-Arg à une distance très courte de l'hème, ce qui a conduit plusieurs groupes de recherche à supposer l'existence d'une liaison hydrogène directe entre un proton du guanidinium de L-Arg et le ligand distal du fer [52, 55, 125].

Cependant, des études structurales plus récentes du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ chez bsNOS [122] et nNOS [131] et du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ chez eNOS et nNOS [131] en présence de L-Arg ont révélé que les caractéristiques géométriques angulaires d'une liaison hydrogène ne permettent pas à L-Arg d'établir une liaison hydrogène directe avec le ligand distal du fer. La géométrie optimale pour une liaison hydrogène est en effet obtenue lorsque les trois atomes $\text{X-H}\cdots\text{Y}$ impliqués sont alignés, ce qui n'est pas du tout le cas entre les atomes N-H de L-Arg et l'atome O du ligand distal qui forment un angle d'environ 110°.

Les études structurales du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ chez eNOS et nNOS en présence de L-Arg et de NOHA [131] ont également révélé l'existence d'une molécule d'eau très conservée dans les structures à proximité immédiate à la fois du ligand distal du fer et de l'extrémité (hydroxy)guanidinium du substrat.

En présence de L-Arg, les critères géométriques angulaires et de distance permettent à cette molécule d'eau de former une liaison hydrogène d'une part entre un de ses protons et le ligand distal du fer et d'autre part entre son atome d'oxygène et le proton de l'extrémité guanidinium de L-Arg, constituant ainsi un pont de liaisons hydrogène entre le substrat et le

ligand du fer (figure IV.18). Il est donc très probable que cette molécule d'eau intervienne directement dans les étapes de transfert de protons en présence de L-Arg.

Au contraire, en présence de NOHA, l'extrémité hydroxy-guanidinium est très légèrement décalée par rapport à la position du guanidinium de L-Arg ce qui place le proton porté par le N^o de NOHA à une distance et dans une géométrie acceptables pour engager une liaison hydrogène directe avec l'atome du ligand distal le plus proche du fer et dans une moindre mesure une liaison hydrogène avec l'atome du ligand distal le plus éloigné du fer. On observe toujours la présence de la molécule d'eau très conservée, mais elle est maintenant hors de portée de liaison hydrogène pour le ligand distal du fer. L'intervention de cette molécule d'eau dans les étapes de transfert de protons en présence de NOHA est donc beaucoup moins probable.

Enfin, en absence de substrat, plusieurs molécules d'eau ont été observées dans la cavité du site actif, mais leur position est déterminée avec beaucoup moins de précision, ce qui indique une grande variabilité dans les interactions qu'elles établissent avec les résidus du site actif et avec le ligand distal du fer.

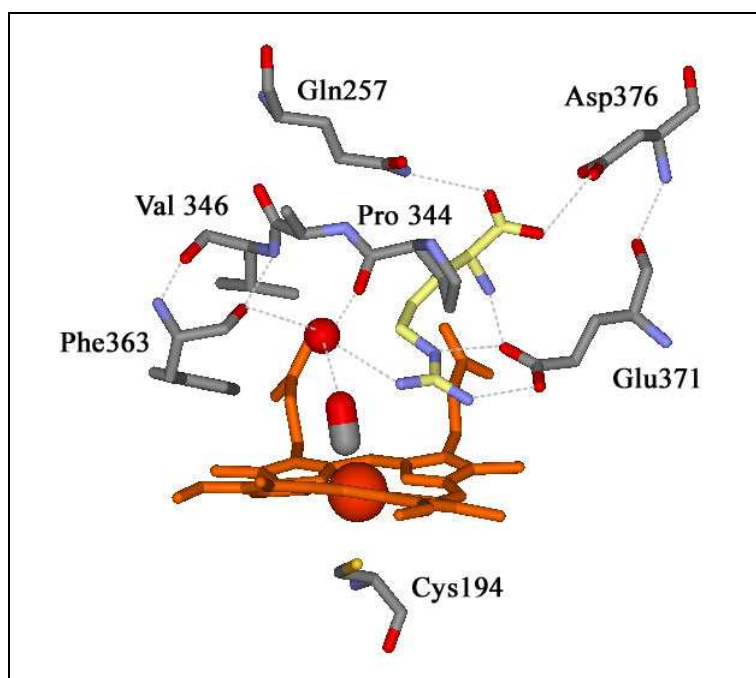


Figure IV.18 : Positionnement de L-Arg à proximité du complexe Fe^{II}-CO dans le site actif des NOS (numérotation iNOS) et représentation des principales liaisons hydrogène. Une molécule d'eau très conservée (en rouge) joue un rôle fondamental dans le réseau de liaisons hydrogène entre le guanidinium et le ligand CO du fer [131].

Les études structurales du complexe Fe^{II}-NO chez bsNOS [122], eNOS [129] et nNOS [131] et du complexe Fe^{II}-CN chez iNOS [262] en présence de L-Arg et de NOHA confirment les

données obtenues avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$: en présence de L-Arg, une molécule d'eau constitue un pont de liaisons hydrogène entre le proton du guanidinium et le ligand distal du fer, alors qu'en présence de NOHA, la liaison hydrogène est directe entre le proton porté par le N^{O} de l'hydroxy-guanidinium et l'atome proximal du ligand distal du fer.

Les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN}$ présentent une structure courbée qui les rend géométriquement assez proches du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$. Au contraire, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ des NOS présente une géométrie relativement linéaire. Cependant, les similitudes entre ces données montrent que les résultats obtenus avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ constituent de bons éléments pour mieux comprendre la structure du site actif autour du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$.

5.2. Rôle du pKa du guanidinium dans le réseau de liaisons hydrogène

L'ensemble de ces données nous a conduit à proposer un modèle structural sur la base des résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude du site actif de iNOS_{ox} en présence de différents analogues d'arginine.

Modèle structural : famille 1

Les analogues de la première famille sont ceux qui ont le pKa le plus élevé et le plus proche du pKa de l'arginine. Ces guanidines sont donc peu acides, ce qui signifie que la liaison $\text{N}^{\text{O}}\text{-H}$ du guanidinium est forte et peu polarisée et que le proton est peu labile.

Le proton du guanidinium n'est pas assez acide pour établir une liaison hydrogène directe avec le ligand distal du fer. En revanche, ce proton est tout de même assez acide pour établir une liaison hydrogène avec la molécule d'eau qui se trouve à proximité immédiate. L'établissement de cette liaison hydrogène entre le proton du guanidinium et l'oxygène de la molécule d'eau entraîne une baisse de la densité électronique sur l'ensemble de la molécule d'eau, ce qui affaiblit les liaisons covalentes O-H de la molécule d'eau et la rend susceptible de former une liaison hydrogène entre un de ses protons et le ligand distal du fer (figure IV.19).

La principale interaction engagée avec le ligand distal du fer est une liaison hydrogène entre la molécule d'eau et l'atome du ligand le plus éloigné du fer, ce qui crée un champ électropositif fort uniquement à proximité de cet atome du ligand. Donc en présence des analogues de la première famille, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ présente les caractéristiques spectroscopiques d'un champ électrostatique positif très fort à proximité.

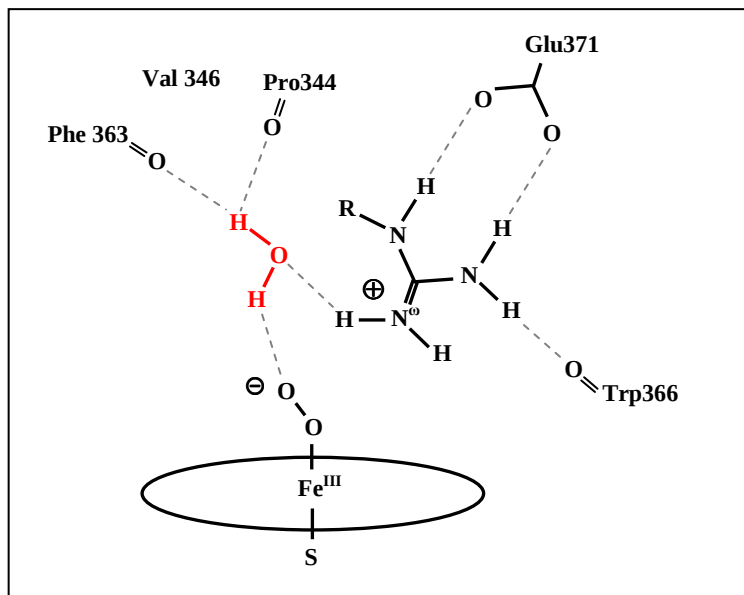


Figure IV.19 : Représentation schématique du réseau de liaisons hydrogène autour du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ de iNOS_{ox} en présence d'arginine ou d'un des analogues d'arginine de la première famille.

Modèle structural : famille 2

Les analogues de la deuxième famille et la NOHA ont un pKa plus bas que les analogues de la première famille. Ces guanidines sont donc un peu plus acides, ce qui signifie que la liaison $N^{\oplus}-H$ du guanidinium est moins forte et plus polarisée et que le proton est plus labile. Contrairement aux analogues de la première famille, le proton des analogues de la deuxième famille est suffisamment acide pour établir une liaison hydrogène directe avec le ligand distal du fer. L'extrémité guanidinium occupe alors une position très légèrement décalée par rapport à la position du guanidinium des analogues de la famille 1 qui permet d'établir une liaison hydrogène forte entre le proton du guanidinium et l'atome du ligand distal le plus proche du fer. Le proton du guanidinium peut également former une liaison hydrogène d'intensité plus faible avec l'atome du ligand distal le plus éloigné du fer (figure IV.20).

En raison de l'acidité du guanidinium, l'établissement d'une liaison hydrogène entre le guanidinium et la molécule d'eau est favorisé. La liaison hydrogène est forte ce qui rapproche géométriquement la molécule d'eau du guanidinium et l'éloigne du ligand distal du fer. Par conséquent, la molécule d'eau ne peut pas établir de liaison hydrogène avec le ligand distal du fer (figure IV.20).

Le ligand distal du fer reçoit une liaison hydrogène du guanidinium sur chacun de ses atomes : cette interaction crée un champ électropositif très intense au voisinage du ligand distal mais réparti sur les deux atomes du ligand, ce qui conduit à un champ électrostatique

apparent inférieur au champ électrostatique créé par un analogue de la première famille. En présence des analogues de la deuxième famille, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ présente donc les caractéristiques spectroscopiques d'un champ électrostatique d'intensité apparente moyenne.

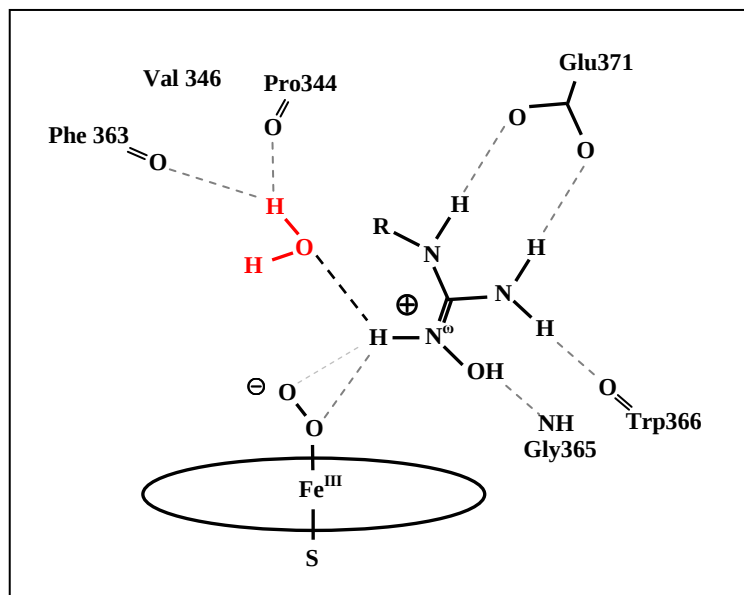


Figure IV.20 : Représentation schématique du réseau de liaisons hydrogène autour du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ de iNOS_{ox} en présence de NOHA ou d'un des analogues d'arginine de la deuxième famille.

Modèle structural : famille 3

Les analogues de la troisième famille ont un pKa assez bas. Ces guanidines sont donc relativement acides, ce qui signifie que la liaison N-H du guanidinium est assez faible et très polarisée et que le proton est assez labile.

Ces analogues sont suffisamment acides pour établir des liaisons hydrogène avec de nombreux partenaires comme les résidus du site actif, les molécules d'eau ou le ligand distal du fer, de sorte que les interactions que ces analogues établiraient au sein du site actif de iNOS_{ox} ne sont pas spécifiques, ce qui entraînerait une faible structuration du réseau de liaisons hydrogène et la création d'un champ électrostatique positif assez faible autour du ligand distal du fer (figure IV.21). En présence des analogues de la troisième famille, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ présente donc les caractéristiques spectroscopiques d'un champ électrostatique d'intensité faible. L'existence d'interactions peu spécifiques et d'un réseau de liaisons hydrogène faiblement structuré donnent au complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ des caractéristiques proches de celles observées en l'absence de substrat.

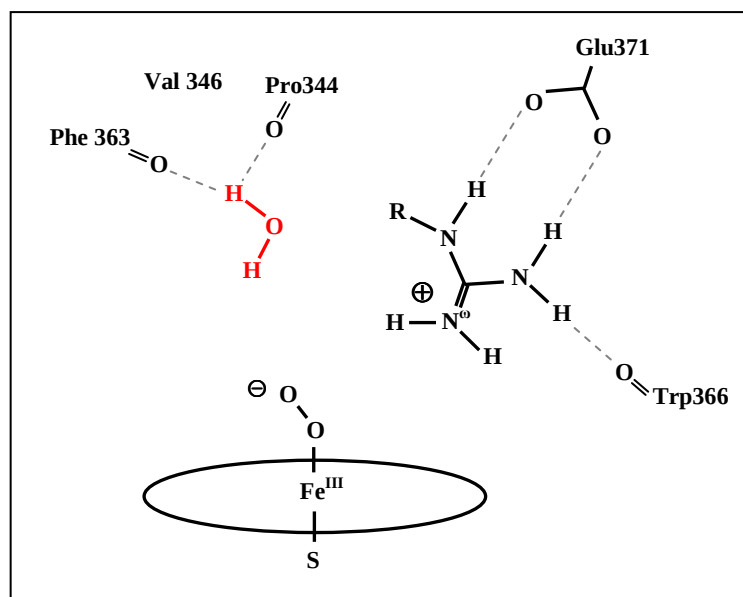


Figure IV.21 : Représentation schématique du réseau de liaisons hydrogène autour du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ de iNOS_{ox} en présence d'un des analogues d'arginine de la troisième famille.

Ce modèle structural établi sur la base des données spectroscopiques que nous avons obtenues par l'étude du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ est tout à fait cohérent avec les études de spectroscopie Raman de résonance réalisées sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ de iNOS_{ox}, qui montrent que le mode de vibration d'élongation de la liaison O-O est bien plus sensible à la fixation de L-Arg qu'à la fixation de NOHA dans le site actif [214]. La fixation de L-Arg provoque donc un champ électropositif apparent plus fort que la fixation de NOHA dans le cas du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ comme dans le cas du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$, ce qui renforce la validité de notre modèle structural dans l'étude du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ chez iNOS.

Les études réalisées sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de nNOS_{ox} montrent au contraire que la fixation de L-Arg n'induit qu'une faible augmentation de la fréquence du signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ par rapport à la fixation de NOHA au niveau du site actif [216]. Ces résultats sont cohérents avec la quasi-absence de différence observée pour le mode de vibration d'élongation de la liaison O-O du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ de nNOS_{ox} en présence de L-Arg ou de NOHA [112].

Le modèle structural que nous avons proposé pour iNOS n'est donc pas directement adapté à toutes les isoformes de NOS. L'étude des interactions entre différents analogues d'arginine présentant une large gamme de pKa et les sites actifs de nNOS et eNOS constituerait un excellent outil pour une meilleure compréhension des spécificités fonctionnelles et biologiques des isoformes de NOS.

5.3. Implications dans la compréhension du mécanisme des NOS

5.3.1. Un cycle catalytique : deux étapes différentes

Le cycle catalytique des NOS se déroule en deux étapes successives d'oxydation de L-Arg en NOHA puis de NOHA en citrulline et NO (voir I.3.4.). Chacune de ces deux étapes débute par la réduction de l'hème Fe^{III} en hème Fe^{II} immédiatement suivie de la fixation du dioxygène pour former le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$. Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ étant le dernier intermédiaire du cycle catalytique facilement observable, les étapes suivantes du mécanisme restent largement méconnues et sujettes à discussion.

Pour la première étape d'oxydation de L-Arg en NOHA, il est généralement accepté que le cofacteur H_4B transfère ensuite rapidement un électron au complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ pour former le complexe peroxy $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}^\cdot$. Ce complexe peroxy serait doublement protoné sur l'atome d'oxygène le plus éloigné du fer, ce qui lui permettrait de subir une rupture hétérolytique de la liaison O-O pour former le complexe perferryl hème(π^+)- $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$. Le complexe perferryl est ensuite supposé réaliser l'hydroxylation de L-Arg suivant un mécanisme radicalaire de type « oxygen rebound » comme chez les cytochromes P450 pour former NOHA (voir I.3.4.1.).

Au contraire, la deuxième étape d'oxydation de la NOHA en citrulline et NO est spécifique des NOS. Il est généralement accepté que le complexe peroxy ou le complexe hydroperoxy soient suffisamment réactifs pour constituer l'espèce oxydante de cette deuxième étape. Par conséquent, l'oxydation de la NOHA ne nécessiterait pas la formation du complexe perferryl (voir I.3.4.2.).

La stœchiométrie de la première étape d'oxydation de L-Arg en NOHA demande l'apport extérieur de deux électrons et de deux protons au cours du cycle catalytique. Au contraire, la deuxième étape d'oxydation de NOHA en NO ne demande l'apport extérieur que d'un seul électron et d'aucun proton.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I.3.4., d'autres mécanismes d'oxydation ont été proposés afin d'expliquer des observations expérimentales parfois contradictoires. Ainsi, l'oxydation de L-Arg pourrait ne pas faire intervenir le complexe perferryle mais utiliserait directement le complexe peroxy ou hydroperoxy comme espèce oxydante. Inversement, des

mécanismes d'oxydation de NOHA utilisant le complexe perferryl comme espèce oxydante ont également été proposés [128, 137, 143].

Cependant, 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 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**, en particulier de la nature des espèces oxydantes impliquées dans chacune des deux étapes.

5.3.2. Rôle du réseau de liaisons H dans la stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$

De manière très intéressante, les résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude du site actif de iNOS_{ox} en présence d'analogues d'arginine montrent une corrélation relativement bonne avec les résultats obtenus au cours d'études préliminaires concernant la stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et le taux de découplage en présence de différents analogues d'arginine [242].

Famille 1

En présence des analogues que nous avons classés dans la première famille, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ est environ 100 fois plus stable qu'en l'absence de substrat. En effet, la formation d'un réseau de liaisons hydrogène très structuré entre le proton faiblement acide du guanidinium, une molécule d'eau et le ligand distal du fer dans le site actif de iNOS permet l'établissement d'une liaison hydrogène spécifiquement entre un proton de la molécule d'eau et l'atome du ligand distal le plus éloigné du fer, ce qui stabilise fortement le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$.

On peut cependant remarquer que les analogues d'arginine de la famille 1 stabilisent un peu moins bien le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ qui se décompose environ 10 fois plus vite qu'en présence de L-Arg. Il est possible que cette différence soit due à une spécificité de l'interaction un peu plus faible en présence des analogues qu'en présence de L-Arg. L'autoxydation et l'activation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ étant en compétition directe au cours du cycle catalytique, la

stabilisation un peu moins importante du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ explique le taux de découplage en présence de ces analogues plus important qu'en présence de L-Arg [180, 242].

Famille 2

En présence des analogues de la deuxième famille, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ se décompose environ 40 fois plus vite qu'en présence de L-Arg. En effet, la présence d'un analogue de la deuxième famille dans le site actif de iNOS induit la formation d'un réseau de liaisons hydrogène impliquant le proton du guanidinium et le ligand distal du fer, mais sans liaison directe entre la molécule d'eau et le ligand du fer. L'absence de liaison hydrogène spécifique entre le proton de la molécule d'eau et le ligand distal du fer est probablement responsable de la moins bonne stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et donc de la consommation d'électrons accrue observée en présence de ces guanidines.

Cependant, l'établissement de deux liaisons hydrogène directes entre le proton du guanidinium et chacun des atomes du ligand du fer stabilise la liaison O-O, ce qui explique que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ est tout de même un peu plus stable en présence des analogues de la deuxième famille qu'en l'absence de substrat.

Famille 3

En présence des analogues de la troisième famille, la vitesse de décomposition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ peut être jusqu'à 100 fois plus grande qu'en présence de L-Arg. En effet, les analogues de la troisième famille sont ceux qui induisent la structuration la plus faible du réseau de liaisons hydrogène du site actif de iNOS. L'absence de stabilisation des complexes oxydés du fer conduit logiquement à des taux d'autoxydation et à des vitesses de décomposition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ très élevés.

De manière assez surprenante, les analogues de la troisième famille (comme en absence de substrat) conduisent à un taux de consommation d'électrons relativement faible. Ces observations apparemment contradictoires peuvent être expliqués à la lumière d'études récentes de simulations moléculaires dynamiques qui ont montré que la disponibilité des protons était un prérequis nécessaire au déroulement du cycle catalytique au-delà du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et que le cofacteur H_4B ne transfère un électron à l'hème qu'une fois que le site actif comporte les protons nécessaires à la poursuite de la réaction [125]. En présence des analogues de la troisième famille comme en l'absence de substrat, le réseau de liaisons hydrogène faiblement structuré n'est pas capable de fournir de proton au complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$,

ce qui empêcherait le cofacteur H₄B de transférer un électron à l'hème et qui expliquerait la faible consommation d'électron.

5.3.3. Rôle du réseau de liaisons H dans les étapes de la catalyse

Les résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude du site actif de iNOS_{ox} en présence d'analogues d'arginine montrent également une corrélation assez bonne avec les résultats concernant la formation de NO en présence des analogues d'arginine et en présence des hydroxy-guanidines correspondantes. Ainsi, la plupart des analogues que nous avons classés dans la première famille sont capables d'être transformés en NO par iNOS alors qu'aucun analogue classé dans la deuxième famille ni la troisième famille ne s'est montré capable d'être oxydé en NO par iNOS [178, 242].

Considérant le déroulement des étapes du cycle catalytique des NOS, les hydroxy-guanidines dérivées des guanidines de la famille 1 se sont montrées logiquement capables d'être oxydées en NO par iNOS. Cependant, la plupart des hydroxy-guanidines dérivées des analogues d'arginine de la famille 2 se sont révélés capables d'être oxydés en NO par iNOS alors qu'aucune des hydroxy-guanidines dérivées des analogues de la famille 3 n'est substrat de iNOS [178].

L'ensemble de ces données nous a conduit à proposer un modèle fonctionnel pour le cycle catalytique de iNOS.

5.3.3.1. Modèle fonctionnel pour la première étape

Famille 1

Les guanidines de la famille 1 sont les seuls analogues d'arginine à pouvoir être oxydés en NO par iNOS. Ces analogues sont également les seuls à induire au sein du site actif un réseau de liaisons hydrogène où une molécule d'eau sert de pont entre le proton du guanidinium et le ligand distal du fer. Cela prouve que la liaison hydrogène spécifique établie entre le proton de la molécule d'eau et l'atome du ligand distal le plus éloigné du fer sert de donneur de proton au cours de la première étape du cycle catalytique. L'existence de cette liaison hydrogène permet au proton d'être transféré spécifiquement sur l'atome d'oxygène le plus éloigné du

fer, ce qui conduit à la rupture hétérolytique de la liaison O–O et à la formation du complexe perferryl. Le complexe perferryl est donc capable d'hydroxyler la fonction guanidine.

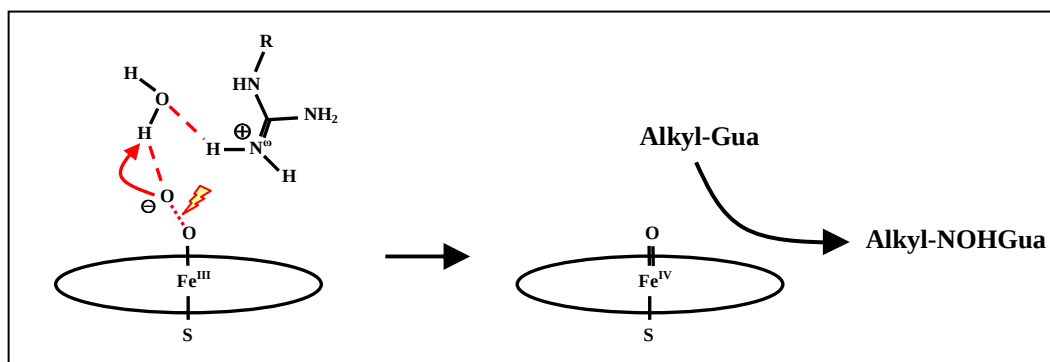


Figure IV.22 : Modèle fonctionnel pour la première étape du cycle catalytique des NOS en présence de L-Arg ou d'un analogue de la première famille.

Famille 2

Au contraire, aucune guanidine de la famille 2 n'est substrat de iNOS. En présence des analogues de la deuxième famille, la molécule d'eau n'interagit pas directement avec le ligand distal du fer. En l'absence de donneur de proton capable d'interagir spécifiquement avec l'atome d'oxygène le plus éloigné du fer, le transfert d'un proton ne peut pas avoir lieu, donc la liaison O–O ne peut pas subir de rupture hétérolytique et ne peut pas conduire à la formation du complexe perferryl, ce qui montre que le complexe perferryl est absolument nécessaire à l'hydroxylation de la fonction guanidine.

Au contraire, l'absence de liaison hydrogène entre le proton de la molécule d'eau et le ligand distal du fer ainsi que l'établissement de deux liaisons hydrogène directes entre le proton du guanidinium et chacun des atomes du ligand du fer augmente grandement la stabilité de la liaison O–O en la protégeant de la rupture, ce qui favorise la formation d'un complexe peroxo ou hydroperoxo au cours du déroulement du cycle catalytique.

La recherche des métabolites éventuellement produits en présence de iNOS et de FPh-Gua (classé dans la deuxième famille d'analogues d'arginine) n'a montré aucune formation de l'hydroxy-guanidine correspondante [242], ce qui prouve que le complexe (hydro)peroxo n'est pas capable d'hydroxyler directement la fonction guanidine. Les guanidines de la famille 2 ne peuvent pas être hydroxylées et donc ne peuvent pas être transformées en NO.

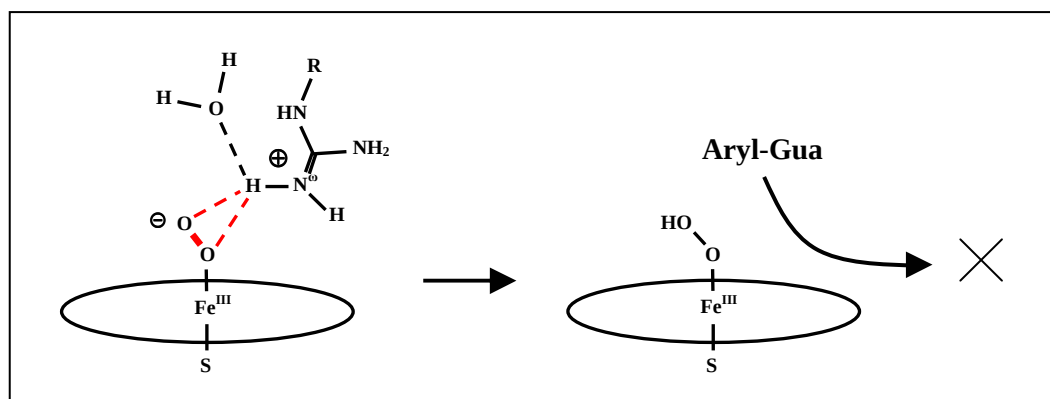


Figure IV.23 : Modèle fonctionnel pour la première étape du cycle catalytique des NOS en présence d'un analogue de la deuxième famille.

Famille 3

Les analogues de la troisième famille sont ceux qui induisent la structuration la plus faible du réseau de liaisons hydrogène du site actif de iNOS. De manière cohérente, l'absence d'interaction spécifique avec le ligand distal du fer ne permet pas de conduire à la formation du complexe perferryl et aucune guanidine de cette famille ne peut être transformée en NO.

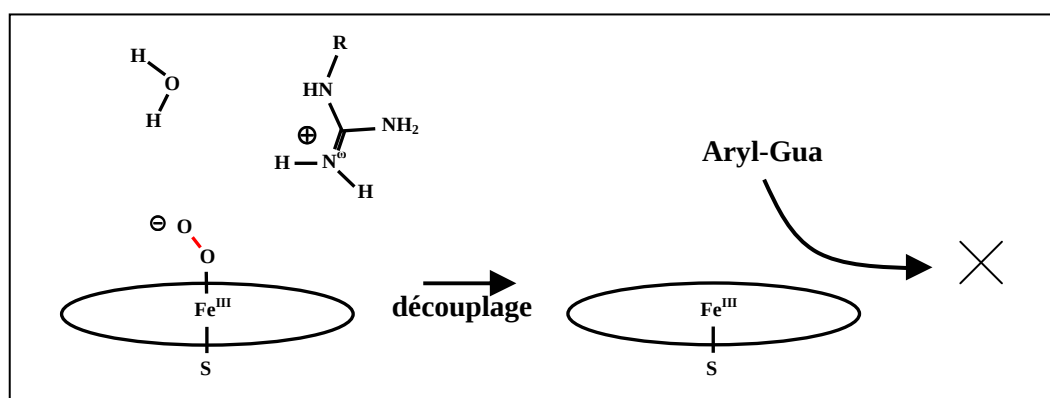


Figure IV.24 : Modèle fonctionnel pour la première étape du cycle catalytique des NOS en présence d'un analogue de la troisième famille.

5.3.3.2. Modèle fonctionnel pour la deuxième étape

Famille 1

L'hydroxylation de la fonction guanidine des analogues de la famille 1 provoque une diminution du pKa du proton porté par le N^ω d'environ 4 unités. Le proton porté par le N^ω serait maintenant suffisamment acide pour établir une liaison hydrogène directe avec le

ligand distal du fer comme les guanidines de la famille 2. Cette configuration du réseau de liaisons hydrogène empêche la rupture hétérolytique de la liaison O–O et favorise la formation d'un complexe (hydro)peroxo.

Le fait que les hydroxy-guanidines dérivées des guanidines de la famille 1 puissent être transformées en NO par iNOS montre que le complexe (hydro)peroxo est capable d'oxyder la fonction hydroxy-guanidine en NO.

Famille 2

Il est intéressant de constater que la plupart des hydroxy-guanidines analogues de NOHA dérivées des guanidines de la famille 2 sont capables d'être oxydés en NO par iNOS alors qu'aucune guanidine de cette famille n'est substrat de iNOS. On en déduit que ces hydroxy-guanidines sont très probablement capables d'induire une structuration du réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif de iNOS similaire à celle induite par les guanidines correspondantes, c'est-à-dire qu'elles établissent une liaison hydrogène directe entre le proton porté par le N^ω de l'hydroxy-guanidinium et le ligand distal du fer, ce qui favorise la formation du complexe (hydro)peroxo et l'oxydation de la fonction hydroxy-guanidine en NO.

Famille 3

Dans le cas des analogues de NOHA dérivés des guanidines de la troisième famille, l'absence d'interaction spécifique avec le ligand distal du fer ne permet pas de stabiliser le complexe (hydro)peroxo. Aucune hydroxy-guanidine issue de la famille 3 n'est substrat de iNOS, ce qui prouve que le complexe (hydro)peroxo est l'espèce oxydante de la deuxième étape du cycle catalytique nécessaire pour oxyder la fonction hydroxy-guanidine en NO.

5.3.3.3. Conclusion

Nos résultats sont en faveur de la formation d'un complexe perferryl au cours de la première étape du cycle catalytique des NOS, ce qui confirme que le nombre de protons extérieurs qui doivent être apportés au cours de l'hydroxylation de la fonction guanidine est bien de deux. Ces résultats montrent également que le complexe perferryl est absolument nécessaire à l'hydroxylation de la fonction guanidine et que, contrairement au complexe perferryl, le complexe (hydro)peroxo n'est pas capable d'oxyder directement la fonction guanidine.

En revanche, nos résultats montrent que le complexe (hydro)peroxo est l'espèce oxydante de la deuxième étape du cycle catalytique capable d'oxyder la fonction hydroxy-guanidine en NO. Nos résultats prouvent également que le proton impliqué dans l'oxydation de NOHA n'est pas le proton porté par la fonction hydroxyle contrairement à ce que certaines équipes ont proposé [128, 137] puisque les guanidines de la famille 2 (qui ne possèdent donc pas de fonction hydroxyle) sont capables de mener à la formation du complexe (hydro)peroxo.

En supposant que l'hydroxylation de la fonction guanidine induit une baisse de pKa du même ordre de grandeur pour les différentes guanidines que nous avons testées, les données des différentes familles d'analogues montrent que la fenêtre de pKa qui permet la formation du complexe (hydro)peroxo et la formation de NO à partir d'une hydroxyguanidine est beaucoup plus large que la fenêtre de pKa qui permet la formation du complexe perferryl et l'hydroxylation de la fonction guanidine. Ce résultat est cohérent avec le fait que la recherche de nouveaux substrats des NOS a conduit à trouver de nombreuses hydroxy-guanidines mais peu de guanidines capables d'être transformées en NO.

Une étude récente de iNOS en présence d'analogues d'arginine méthylés en position C5 a abouti aux mêmes conclusions que nous au sujet des étapes de transfert de protons au cours du cycle catalytique des NOS [263]. L'addition d'un groupe méthyle en position C5 pro R sur L-Arg et sur NOHA empêcherait la bonne fixation du dioxygène au fer, ce qui expliquerait qu'aucun de ces analogues ne conduise à la formation de NO. En revanche, l'addition d'un groupe méthyle en position C5 pro S forme une guanidine qui n'est pas substrat de iNOS, alors que l'hydroxy-guanidine correspondante est capable d'être transformées en NO. Il a été proposé que le groupe méthyle en position C5 pro S entraîne des contraintes stériques qui empêcheraient la fixation de la molécule d'eau à proximité du ligand distal de l'hème, ce qui confirme notre modèle fonctionnel où la perturbation de la molécule d'eau conservée du site actif de iNOS interfère avec la première étape du cycle catalytique mais pas avec la deuxième.

L'ensemble de nos résultats montre donc très clairement que la structuration du réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif de iNOS est décisif à la fois pour la stabilité et l'évolution catalytique du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$.

6. Développement d'un outil prédictif

Les caractéristiques spectroscopiques de iNOS_{ox} en présence d'un analogue d'arginine se sont révélées être un bon outil prédictif pour déterminer si cet analogue est susceptible d'être substrat de iNOS ou pas : si l'analogue peut être classé dans la famille 1, il y a de bonnes chances pour qu'il puisse être transformé en NO comme la plupart des analogues de type alkyl-guanidine, dans le cas contraire, il est très probable que l'analogue ne puisse pas être transformé en NO comme les analogues de type aryl-guanidine. Cet outil permet également d'extrapoler le comportement de l'analogue en termes d'inhibition spécifique de la première ou de la deuxième étape du mécanisme ainsi qu'en terme de découplage.

L'agmatine (ou décarboxy-arginine) et la désamino-arginine (figure IV.25) sont deux analogues d'arginine modifiés uniquement au niveau de la partie α -amino-acide. Ces deux analogues possèdent une structure très proche de celle de l'arginine, pourtant aucune des deux guanidines ni des deux hydroxy-guanidines correspondantes n'est capable d'être oxydée en NO par iNOS. Nous avons donc réalisé l'étude des caractéristiques spectroscopiques de iNOS_{ox} en présence des deux analogues de L-Arg afin de mieux comprendre comment elles interagissent avec le site actif de iNOS.

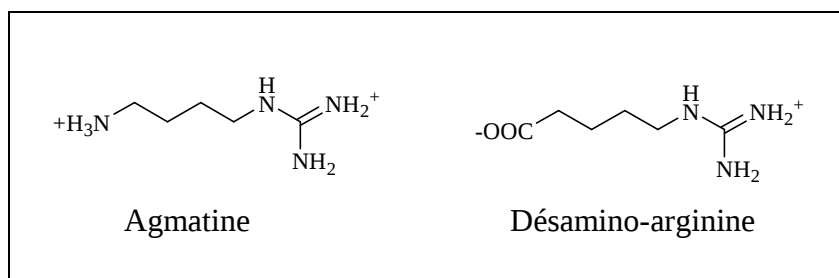


Figure IV.25 : Structure de l'agmatine (décarboxy-arginine) et de la désamino-arginine.

6.1. L'agmatine (décarboxy-arginine)

Interactions avec l'hème et la partie proximale du site actif

Nous avons tout d'abord vérifié si l'agmatine est capable d'induire des déformations de la porphyrine ou une variation du potentiel d'oxydoréduction de l'hème.

Nous avons mesuré par spectro-électrochimie le potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOS_{ox} en présence du cofacteur H_4B et d'agmatine dans les conditions

expérimentales décrites au chapitre II.3.4. et nous avons obtenu une valeur de - 267 mV. Les valeurs de potentiel d'oxydoréduction de iNOS_{ox} en présence de H₄B et des autres analogues d'arginine que nous avons testés sont contenues dans un intervalle de 10 mV entre - 272 mV et - 262 mV (table IV.7). Nous pouvons en déduire que l'agmatine ne perturbe pas les propriétés d'oxydoréduction de l'hème chez iNOS_{ox}.

Nous avons également réalisé les spectres Raman de résonance de iNOS_{ox} à l'état Fe^{II}-CO en présence de cofacteur H₄B et d'agmatine dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.2. afin de déterminer les fréquences caractéristiques des modes de vibration de la porphyrine. Comme dans le cas des autres analogues d'arginine testés, les fréquences caractéristiques de la géométrie de la porphyrine en présence d'agmatine n'ont montré aucune différence significative en comparaison des données obtenues en présence de L-Arg (figure IV.26).

Interactions avec la partie distale du site actif

L'étude de la région des basses fréquences du complexe Fe^{II}-CO a montré que l'agmatine peut être classée dans la famille 3 des analogues d'arginine bien que l'agmatine ne soit pas une aryl-guanidine (figure IV.26) : le spectre Raman de résonance du complexe Fe^{II}-CO présente en effet un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ large avec deux contributions majoritaires à 482 cm⁻¹ (46 %) et 500 cm⁻¹ (43 %) et une contribution minoritaire à 513 cm⁻¹ (11 %). Le signal $\delta_{\text{Fe-CO}}$ en présence d'agmatine présente également un léger décalage vers les basses fréquences à 561 cm⁻¹ comparativement au signal observé en présence de L-Arg à 566 cm⁻¹, ce qui est également caractéristique des guanidines classées dans la famille 3.

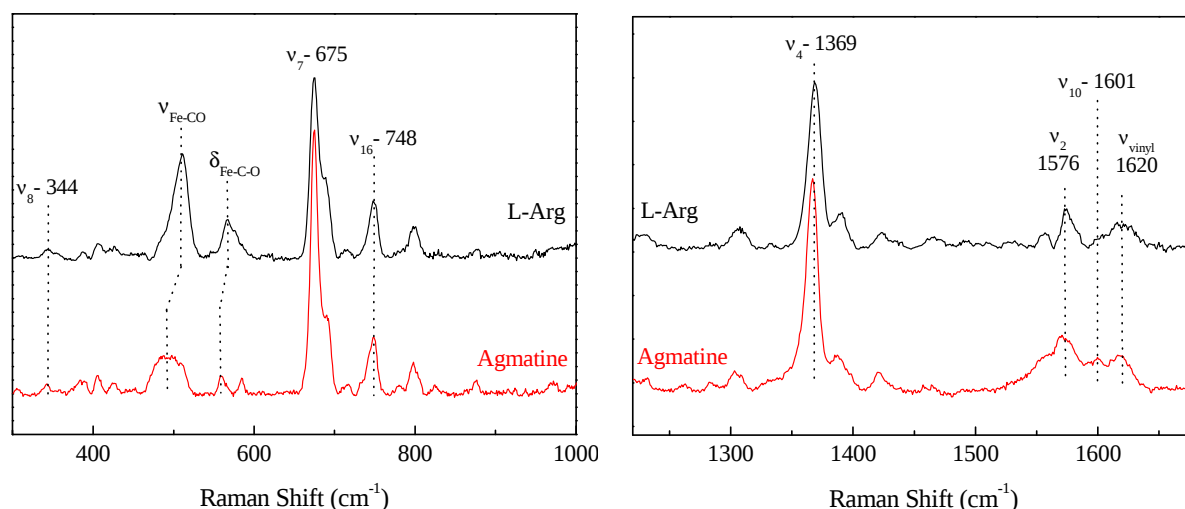


Figure IV.26 : Effet de l'agmatine sur les régions des basses et des hautes fréquences du spectre Raman de résonance du complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox} (excitation à 441,6 nm).

Comme tous les analogues de la famille 3, ni l'agmatine ni l'hydroxy-agmatine ne sont substrat de iNOS, ce qui montre que les caractéristiques spectroscopiques du complexe Fe^{II}-CO de iNOS_{ox} sont un excellent outil prédictif pour déterminer si une guanidine et son hydroxy-guanidine correspondante ont de bonnes chances ou non d'être transformées en NO par iNOS.

Il peut sembler surprenant que l'agmatine, dont le pKa est très proche de celui de L-Arg, appartienne à la troisième famille d'analogues. Il faut cependant considérer que la chaîne latérale de l'agmatine n'est pas hydrophobe comme l'est la chaîne latérale des autres analogues d'arginine que nous avons testés. Au contraire, la chaîne latérale de l'agmatine est susceptible d'établir des liaisons hydrogène entre son groupe α-amine et les résidus polaires du site actif. Il est donc probable que ces interactions empêchent l'agmatine de construire un réseau de liaisons hydrogène structuré et compétent pour la formation du complexe perferryl, ce qui expliquerait son incapacité à être transformée en NO.

6.2. La désamino-arginine

Interactions avec l'hème et la partie proximale du site actif

Dans le cas de la désamino-arginine, l'étude du potentiel d'oxydoréduction du couple Fe^{II}/Fe^{III} de iNOS_{ox} dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.3.4. a directement montré la cause de l'absence de réactivité de cet analogue : le potentiel mesuré en présence de cofacteur H₄B et de désamino-arginine est inférieur à - 305 mV ce qui rend impossible le transfert d'électron du domaine réductase vers le domaine oxygénase.

Des études sur différentes hémoprotéines ont montré que la position précise des propionates et les interactions qu'ils établissent avec leur environnement est susceptible de modifier fortement le potentiel d'oxydoréduction de l'hème [212, 251]. Dans le cas de la désamino-arginine, il est possible qu'il s'établisse une interaction directe entre les propionates de l'hème de iNOS et l'extrémité α-carboxylate de cet analogue d'arginine, ce qui expliquerait le potentiel d'oxydoréduction exceptionnellement bas observé en présence de cette guanidine.

Interactions avec la partie distale du site actif

L'étude de la région des basses fréquences du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ confirme ce résultat : la désamino-arginine peut être classée dans la famille 3 des analogues d'arginine (figure IV.27). Le spectre Raman de résonance du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ présente en effet un signal $\nu_{\text{Fe-CO}}$ large avec deux contributions majoritaires à 482 cm^{-1} (34 %) et 502 cm^{-1} (54 %) et une contribution minoritaire à 515 cm^{-1} (12 %). Le signal $\delta_{\text{Fe-CO}}$ présente également le léger décalage vers les basses fréquences à 562 cm^{-1} caractéristique des guanidines classées dans la famille 3.

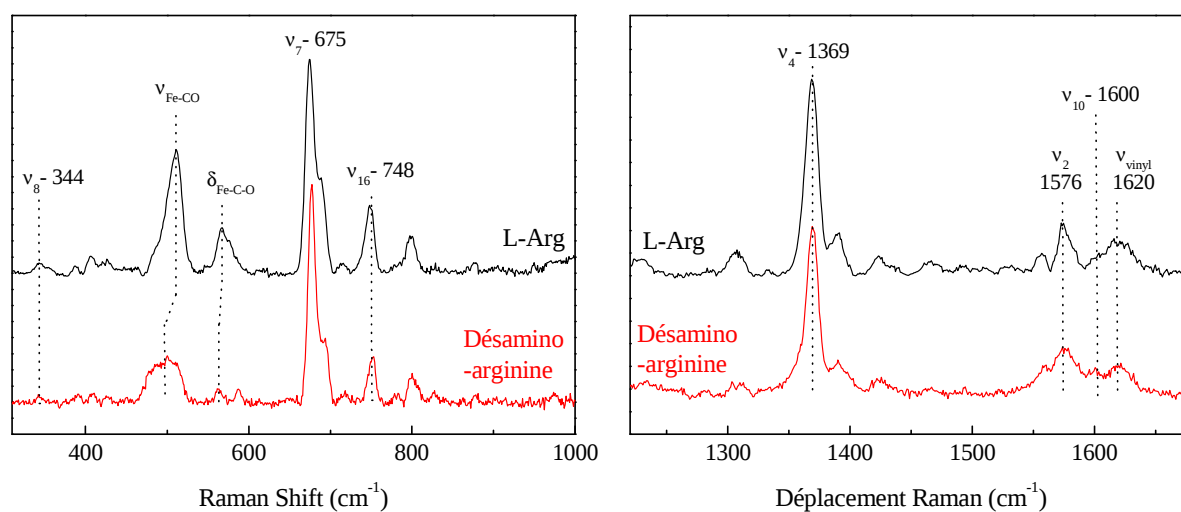


Figure IV.27 : Effet de la désamino-arginine sur les régions des basses et des hautes fréquences du spectre Raman de résonance du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ de iNOS_{ox} (excitation à $441,6\text{ nm}$).

De manière cohérente avec le classement dans la famille 3, ni la désamino-arginine ni l'hydroxyguanidine correspondante ne sont substrat de iNOS.

Le développement d'un outil prédictif permettant de déterminer si un analogue d'arginine a de bonnes chances d'être substrat de iNOS uniquement en examinant l'allure du spectre Raman du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ constitue un outil simple et efficace. Il serait intéressant de généraliser cet outil à différents types d'analogues d'arginine et éventuellement à d'autres isoformes de NOS.

7. Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que le pKa du guanidinium ou de l'hydroxyguanidinium fixé à proximité de l'hème joue un rôle déterminant dans la structuration fine du réseau de liaisons hydrogène entre le ligand distal du fer, l'(hydroxy)guanidinium et une molécule d'eau au niveau du site actif de iNOS.

Nos résultats apportent également les preuves du fait 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. En effet, l'établissement d'une liaison forte entre une molécule d'eau très conservée et le ligand distal du fer qui est favorisée par la présence d'une guanidine à haut pKa semble nécessaire à la rupture de la liaison O-O au cours de la première étape du cycle catalytique pour former le complexe perferryl nécessaire à l'hydroxylation de la fonction guanidine. Au contraire, l'absence de liaison entre cette molécule d'eau et le ligand distal du fer qui est favorisée par la présence d'une (hydroxy)guanidine de pKa plus bas capable d'établir une liaison directe entre l'(hydroxy)guanidinium et le ligand distal du fer induit une conformation qui semble nécessaire à la protection de la liaison O-O et à la formation du complexe réactif (hydro)peroxo au cours de la deuxième étape du cycle catalytique.

La structuration fine du réseau de liaisons hydrogène joue également un rôle prépondérant dans les phénomènes de découplage en favorisant ou non les étapes spécifiques de protonation, ce qui détermine le devenir du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ vers la formation d'une espèce oxydée de l'hème compétente pour la catalyse ou vers la formation d'espèce activées de l'oxygène.

Chapitre V

Conclusions générales

Au cours de ce travail, nous avons apporté des éléments de réponse à ces deux questions cruciales dans l'étude des NO-synthases que sont la recherche de substrats des NOS et la compréhension du mécanisme d'oxydation de L-Arg en NO.

La compréhension fondamentale du mécanisme de formation de NO et des espèces activées de l'oxygène par les NOS constitue un sujet de recherche très actif. En effet, le déroulement précis du mécanisme d'oxydation de L-Arg en NO par les NOS présente encore de nombreuses zones d'incertitude. En particulier, la nature des espèces oxydantes mises en jeu dans l'oxydation de L-Arg en NOHA et dans l'oxydation de NOHA en NO ainsi que la manière dont ces espèces oxydantes se forment dans le site actif des NOS sont largement méconnues. La connaissance précise des processus de transfert de protons constitue manifestement la clé de la compréhension du mécanisme des NOS et en particulier de la distinction entre les deux étapes du cycle catalytique. 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 cherché à comprendre pourquoi les NOS présentent une telle spécificité de substrat afin d'avancer dans la conception de nouveaux substrats efficaces des NOS.

L'observation directe des espèces oxydantes formées au cours du cycle catalytique des NOS n'étant pas possible dans l'état actuel de nos moyens technologiques, il est nécessaire de concevoir des outils qui permettent d'étudier précisément les interactions qui se forment au sein du site actif de l'enzyme, afin d'obtenir des données permettant de mieux comprendre le déroulement des étapes de transfert de protons qui mènent à la formation des espèces oxydantes.

Ainsi, l'étude des interactions entre des analogues de L-Arg et de NOHA, substrats et non substrats, et le site actif des NOS constitue l'outil idéal pour mieux comprendre à la fois les

différences de réactivité observées entre ces analogues et le rôle du substrat dans le mécanisme d'oxydation.

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 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 (figure V.2). Nous avons donc réalisé l'étude de deux mutants de nNOS, Tyr588Phe et Tyr588His, en présence d'analogues de L-Arg et de NOHA (chapitre III).

Les résultats que nous avons obtenus montrent que la mutation Y588H perturbe fortement la structure globale de la protéine ainsi que la conformation générale du site actif : ce mutant est peu stable, il reconnaît mal les substrats naturels des NOS et la plupart des analogues testés, et il ne présente aucune trace d'activité de formation de NO.

Au contraire, la mutation Y588F n'a pas d'effet sensible sur la structure globale de nNOS. Les caractéristiques spectroscopiques du mutant Y588F montrent cependant que la délétion du groupe hydroxyle du résidu 588 perturbe fortement le réseau de molécules d'eau au sein du site actif de nNOS en l'absence de substrat. La fixation d'un substrat rétablit partiellement la structuration du site actif de nNOS, ce qui permet au mutant Y588F d'être actif et de transformer en NO exactement les mêmes substrats que l'enzyme sauvage, guanidines comme hydroxy-guanidines. Cependant, les taux de transformation en NO mesurés pour le mutant Y588F sont nettement inférieurs à ceux de l'enzyme sauvage.

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 (figure V.2). 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.

Il serait intéressant d'étendre ce type d'étude à d'autres résidus du site actif des NOS, en particulier les résidus polaires engagés dans des liaisons hydrogène avec la chaîne latérale du substrat ou avec le cofacteur H₄B, afin de déterminer avec plus de précision le trajet emprunté par les protons et les échanges impliqués au cours des étapes de transfert de protons.

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. De même, il a été proposé que les différences de réactivité observées entre les différents analogues d'arginine soient en partie dues à leur différence de pKa. 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 (chapitre IV).

Nous avons choisi d'utiliser comme outil une série de guanidines analogues de L-Arg dont certaines peuvent être transformées en NO par iNOS alors que les autres ne sont pas substrat de iNOS. Ces guanidines présentent toutes une chaîne latérale hydrophobe et se positionnent

d'une manière similaire dans le site actif, ce qui permet de supposer que la perturbation des résidus polaires du site actif est faible et semblable pour les différents analogues testés.

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 $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ 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 $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, 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 $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$** 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 joue un rôle fondamental dans le réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif en servant de pont entre le proton du guanidinium et le ligand distal du fer (figure V.1.1). Cette configuration stabilise le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et favorise sa protonation sur l'oxygène distal ce qui semble indispensable à la rupture de la liaison O-O au cours de la première étape du cycle catalytique. 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 et que le complexe perferryl est l'espèce oxydante nécessaire à l'hydroxylation de la fonction guanidine.

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, il n'y a pas d'interaction directe entre la molécule d'eau et le ligand distal du fer, ce qui protège la liaison O-O de la rupture et empêche la formation du complexe perferryl (figure V.1.2). Au contraire, l'établissement d'une interaction directe entre le proton du guanidinium et les deux atomes du ligand distal du fer contribue à la protection de la liaison O-O et favorise la formation du complexe (hydro)peroxo.

En présence des analogues de la troisième famille, le réseau de liaisons hydrogène est peu structuré (figure V.1.3), ce qui provoque la faible stabilité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et son incapacité à conduire spécifiquement à un complexe perferryl ou (hydro)peroxo, ce qui explique que ni les guanidines de la famille 3 ni les hydroxy-guanidines correspondantes ne soient substrats de iNOS.

Le modèle structural et fonctionnel que nous avons élaboré pourrait s'avérer très utile dans la recherche de nouveaux substrats des NOS en constituant un outil prédictif. Lorsqu'une guanidine a un pKa proche de celui de L-Arg et que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ en présence de cet analogue présente des caractéristiques spectroscopiques similaires à celles observées en présence de L-Arg, il est alors très probable que cette guanidine puisse être substrat de iNOS. Les analogues classés dans les familles 2 et 3 peuvent également se révéler utiles en tant qu'inhibiteurs spécifiques d'une des deux étapes du cycle catalytique.

Il serait intéressant d'étendre ce type d'étude aux autres isoformes de NOS. L'étude des caractéristiques spectroscopiques du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ en présence de différents analogues des substrats naturels permettrait d'établir ou non l'existence d'une corrélation avec d'une part le pKa des analogues et d'autre part la stabilité et la réactivité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$.

Ces différents éléments permettraient de mieux connaître le déroulement du mécanisme des NOS et de mieux comprendre l'origine des spécificités des différentes isoformes.

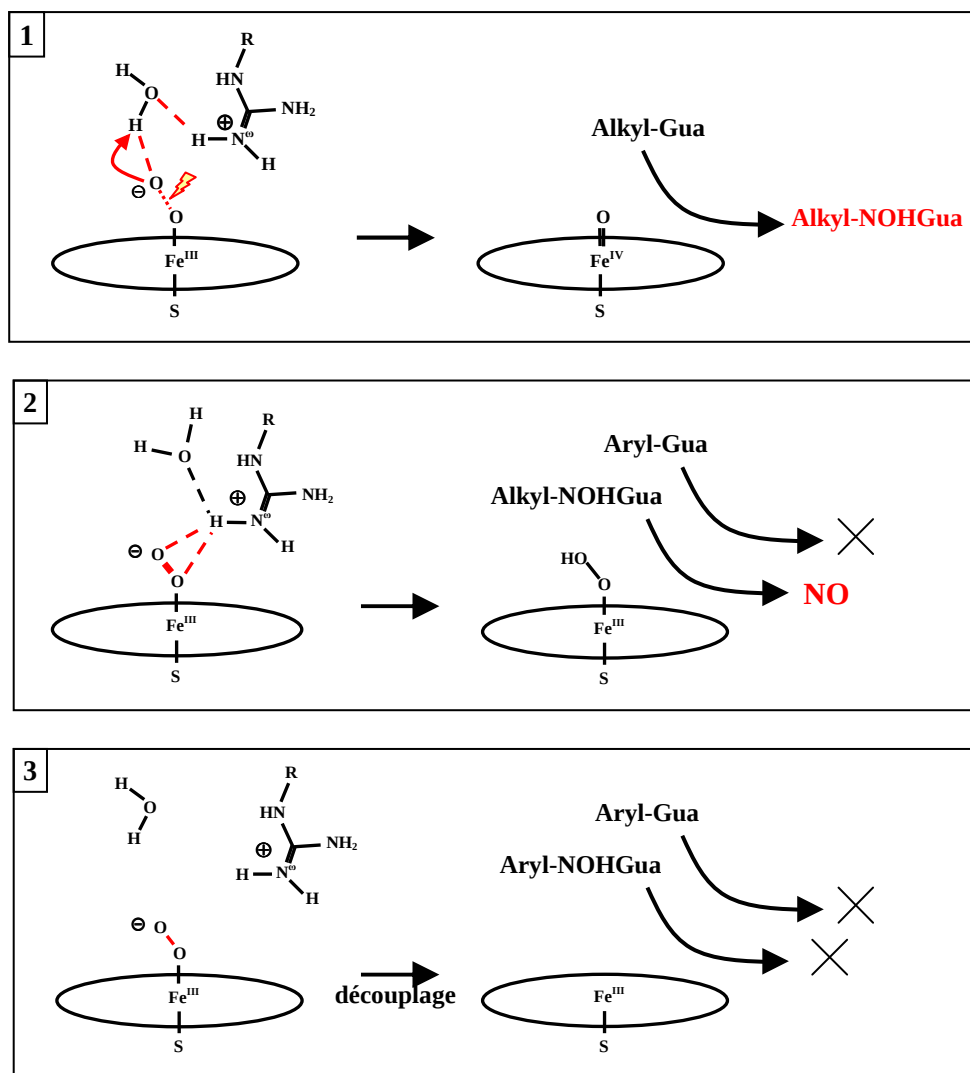


Figure V.1 : Modèle structural et fonctionnel élaboré sur la base de nos résultats et mettant en évidence l'importance du réseau de liaisons hydrogène entre le substrat et le ligand du fer dans la métabolisation du substrat par iNOS.

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 (figure V.2). 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.

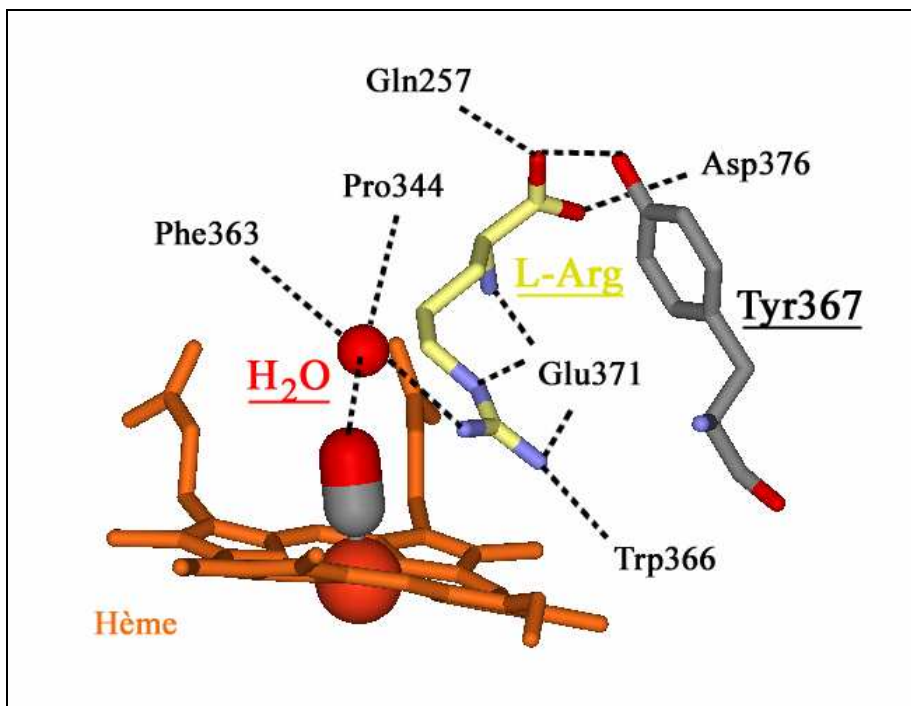


Figure V.2 : Représentation schématique du réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif de iNOS (PDB : 2G6M) mettant en évidence le rôle de la molécule d’eau (rouge), du substrat L-Arg (jaune), du résidu Tyr367 (Tyr588 en numérotation de nNOS de rat) et des autres résidus du site actif.

L’ensemble des résultats de ce travail apporte de nouveaux éléments pour la compréhension du cycle catalytique des NOS et constitue une démonstration du rôle fondamental du substrat et en particulier du pKa du guanidinium dans la distinction entre les deux étapes du mécanisme.

Annexe 1

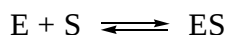
Le modèle de Michaelis-Menten

1. Le modèle de Michaelis-Menten en cinétique enzymatique

Le modèle de Michaelis-Menten est un formalisme simplifié qui permet de décrire la cinétique d'une réaction enzymatique en considérant une enzyme E qui agit sur un substrat S unique au niveau d'un seul site de catalyse (le site actif de l'enzyme) pour donner un produit P unique. L'équation obtenue relie la vitesse initiale de la réaction à la concentration en substrat et à des paramètres caractéristiques de l'enzyme. Ce modèle permet de décrire le comportement de nombreuses enzymes, cependant il est incapable de rendre compte de phénomènes plus complexes comme la multiplicité des substrats ou l'existence de plusieurs sites de reconnaissance susceptibles de présenter des comportements coopératifs ou anticoopératifs.

Le complexe enzyme-substrat

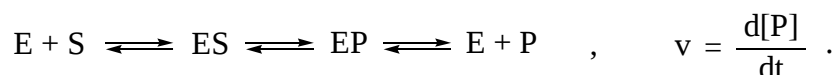
Le modèle de Michaelis-Menten repose sur l'établissement d'un complexe enzyme-substrat ES nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme. On suppose que chaque molécule d'enzyme est capable de fixer une seule molécule de substrat.



L'existence de ce complexe a été postulée à partir de faits expérimentaux : en effet, pour une concentration en enzyme donnée, la vitesse initiale de la réaction augmente lorsqu'on augmente la concentration en substrat mais atteint une valeur plateau V_{max} qu'elle ne peut pas dépasser même lorsqu'on continue d'augmenter la concentration en substrat. La concentration en substrat nécessaire pour atteindre ce plateau est appelée concentration saturante en substrat. On considère que pour une telle concentration en substrat, la totalité de l'enzyme en solution est présente sous la forme du complexe enzyme-substrat.

Hypothèses utilisées et calcul de l'équation de Michaelis-Menten

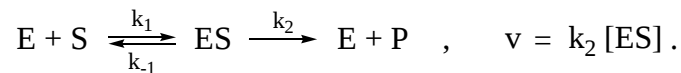
Le modèle cinétique utilisé fait intervenir l'équilibre de formation du complexe enzyme-substrat, la réaction chimique de transformation du substrat en produit et l'équilibre de libération du produit. La vitesse de la réaction est égale à la vitesse de formation du produit.



La première hypothèse consiste à supposer que l'équilibre de libération du produit à partir du complexe enzyme-produit s'établit très rapidement et qu'il est totalement déplacé dans le

Annexe 1. Le modèle de Michaelis-Menten

sens de la libération du produit, ce qui permet de simplifier le modèle cinétique et l'expression de la vitesse de la réaction :



La deuxième hypothèse consiste à se placer dans des conditions où le substrat est en grand excès par rapport à l'enzyme. La concentration maximale en complexe enzyme-substrat est alors égale à la concentration initiale en enzyme. Donc la vitesse maximale de la réaction enzymatique vaut :

$$V_{max} = k_2 [ES]_{max} = k_2 [E]_0.$$

De plus, lorsque le substrat est en grand excès par rapport à l'enzyme, la concentration en complexe enzyme-substrat est négligeable devant la concentration en substrat. On suppose également qu'à l'instant initial et durant toute la durée de la mesure de la vitesse initiale, la concentration en produit est négligeable devant la concentration en substrat. L'équation de conservation de la matière pour le substrat peut alors être simplifiée :

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \approx [S]$$

L'équation de conservation de la matière pour l'enzyme ne peut pas être simplifiée :

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

La troisième hypothèse consiste à considérer que l'étape cinétiquement limitante de la catalyse est la transformation chimique du substrat en produit. Dans ces conditions, le complexe enzyme-substrat atteint très rapidement un état stationnaire.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E].[S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0$$

La combinaison de ces différentes équations permet d'exprimer [ES] et donc d'exprimer la vitesse de la réaction en fonction des autres paramètres du système :

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]_0} \quad \text{donc} \quad v = k_2 \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]_0}.$$

Conclusion

En présence d'un grand excès de substrat par rapport à l'enzyme, en supposant que l'enzyme ne peut fixer qu'une seule molécule de substrat, que la libération du produit à partir du complexe enzyme-produit est très rapide et totale et que l'étape cinétiquement limitante de la réaction est la transformation du substrat en produit, alors la vitesse initiale de la réaction s'écrit :

$$V_i = V_{max} \cdot \frac{[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad \text{avec} \quad V_{max} = k_2 \cdot [E]_0 \quad \text{et} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}.$$

Signification des paramètres K_m et V_{max}

Chaque couple (K_m, V_{max}) est caractéristique d'un système enzyme-substrat. Le paramètre V_{max} représente la vitesse initiale maximale, c'est-à-dire celle qui est mesurée pour une concentration saturante en substrat. La constante de Michaelis K_m représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale. La constante K_m correspond également à la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat, c'est-à-dire à l'inverse de la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat : plus K_m est petit, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est grande.

Représentation de Lineweaver et Burk

En pratique, en l'absence de logiciel informatique capable de modéliser une branche d'hyperbole, on détermine souvent les constantes K_m et V_{max} par la représentation en double inverse qui est une droite dont l'équation est :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

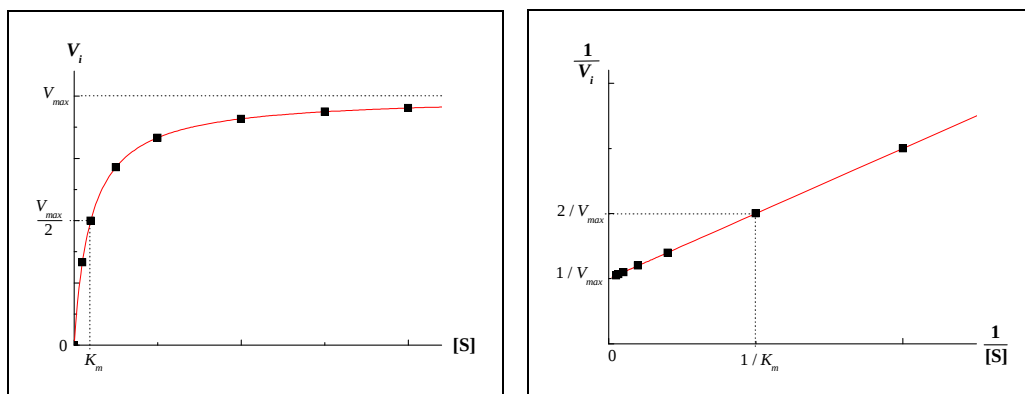


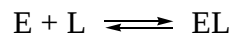
Figure A1.1 : Représentation de Michaelis-Menten directe (A) et en double inverse (B) mettant en évidence les paramètres K_m et V_{max} .

Si plusieurs mesures successives réalisées sur un couple enzyme-substrat permettent de déterminer des constantes K_m et V_{max} avec une variabilité assez faible, on dit alors que ce couple suit une loi cinétique michaelienne.

2. Extension du modèle de Michaelis-Menten

Le complexe enzyme-ligand

Indépendamment de toute réaction chimique catalysée par l'enzyme, il peut se former un complexe enzyme-ligand lorsque l'enzyme est en présence de certains composés. On suppose que chaque molécule d'enzyme est capable de fixer une seule molécule de ligand.



Comme pour le complexe enzyme-substrat, l'existence du complexe enzyme-ligand est déduite de faits expérimentaux : en effet, pour une concentration en enzyme donnée, les paramètres physico-chimiques de l'enzyme comme l'absorbance UV-visible varient lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de ligand puis atteignent une valeur plateau pour une concentration égale ou supérieure à la concentration saturante en ligand.

Hypothèses utilisées et calcul de l'équation de Michaelis-Menten

On se place dans des conditions où le ligand est en grand excès par rapport à l'enzyme. La concentration maximale en complexe enzyme-ligand est donc égale à la concentration initiale en enzyme.

$$[EL]_{\max} = [E]_0 = [E] + [EL]$$

De plus dans ces conditions, la concentration en complexe enzyme-ligand est négligeable devant la concentration en ligand.

$$[L]_0 = [L] + [EL] \approx [L]$$

On appelle K_S la constante d'affinité de l'enzyme pour le ligand. C'est également l'inverse de la constante de dissociation du complexe enzyme-ligand.

$$K_S = \frac{[E] \cdot [L]}{[EL]}$$

La combinaison de ces différentes équations permet d'exprimer $[EL]$ en fonction des autres paramètres du système :

$$[EL] = [EL]_{\max} \cdot \frac{[L]_0}{K_S + [L]_0}$$

La mesure de la concentration en complexe enzyme-ligand en fonction de la concentration ajoutée en ligand permet donc de déterminer la constante d'affinité de l'enzyme pour le ligand.

Compétition sur un site d'occupation unique

Indépendamment de toute réaction chimique catalysée par l'enzyme, on considère maintenant que deux ligand différents L_1 et L_2 peuvent se lier à l'enzyme au niveau du même site de liaison, c'est-à-dire que l'enzyme peut former un complexe soit avec le ligand L_1 soit avec le ligand L_2 mais pas avec les deux en même temps.

On se place dans des conditions où les deux ligands sont en grand excès par rapport à l'enzyme. La concentration maximale en complexe enzyme-ligand 1 et la concentration maximale en complexe enzyme-ligand 2 sont donc égales à la concentration initiale en enzyme.

$$[E]_0 = [E] + [EL_1] + [EL_2] \quad \text{et} \quad [EL_1]_{\max} = [EL_2]_{\max} = [E]_0$$

De plus dans ces conditions, la concentration en complexe enzyme-ligand est négligeable devant la concentration en ligand.

$$[L_1]_0 = [L_1] + [EL_1] \approx [L_1] \quad \text{et} \quad [L_2]_0 = [L_2] + [EL_2] \approx [L_2]$$

On appelle K_{S1} la constante d'affinité de l'enzyme pour le ligand 1 et K_{S2} la constante d'affinité de l'enzyme pour le ligand 2.

$$K_{S1} = \frac{[E] \cdot [L_1]}{[EL_1]} \quad \text{et} \quad K_{S2} = \frac{[E] \cdot [L_2]}{[EL_2]}$$

La combinaison de ces différentes équations permet d'exprimer $[EL_2]$ en fonction des autres paramètres du système :

$$[EL_2] = [EL_2]_{\max} \cdot \frac{[L_2]_0}{K_{Sapp} + [L_2]_0} \quad \text{avec} \quad K_{Sapp} = K_{S2} \cdot \left(1 + \frac{[L_1]_0}{K_{S1}}\right)$$

Pour une concentration en ligand L_1 connue de constante d'affinité K_{S1} connue, la mesure de la concentration en complexe EL_2 en fonction de la concentration ajoutée en ligand 2 permet donc de déterminer la constante d'affinité de l'enzyme pour le ligand 2.

Affinité de NOS pour différents ligands

Dans le cas des hémoprotéines, pour une transition entre deux états hème- Fe^{III} (par exemple $HS \rightarrow BS$), on peut considérer que le coefficient d'extinction molaire du pic d'absorption de Soret ne varie pas, bien que la position de ce pic varie. La mesure de la disparition du pic de Soret à une certaine longueur d'onde et de son apparition à une autre longueur d'onde permet donc de mesurer la quantité d'hème qui a subi la transition.

Annexe 1. Le modèle de Michaelis-Menten

Si la transition est clairement observable à partir d'une solution d'enzyme native, on peut déterminer directement la constante d'affinité du ligand, comme dans le cas de la détermination de la constante d'affinité de NOS pour l'imidazole.

$$\Delta\text{Abs} = \Delta\text{Abs}_{\text{max}} \cdot \frac{[\text{ImH}]_0}{K_{\text{SImH}} + [\text{ImH}]_0}$$

En revanche, si la transition n'est observable qu'à partir de NOS déjà saturée avec une concentration connue en imidazole, on détermine une constante apparente qui permet ensuite de calculer la véritable constante d'affinité de NOS pour le ligand.

$$\Delta\text{Abs} = \Delta\text{Abs}_{\text{max}} \cdot \frac{[\text{L}]_0}{K_{\text{Sapp}} + [\text{L}]_0} \quad \text{avec} \quad K_{\text{Sapp}} = K_{\text{S}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{ImH}]_0}{K_{\text{SImH}}} \right)$$

Annexe 2

Techniques spectroscopiques

Le principe d'une technique de spectroscopie consiste à faire interagir un échantillon avec un champ électromagnétique, la lumière incidente pouvant être absorbée, réfléchie, transmise, diffusée par l'échantillon ou conduire à des phénomènes d'émission.

L'énergie d'une molécule est quantifiée et ne peut occuper que des états déterminés. Cette molécule peut passer d'un état à un autre lorsqu'elle reçoit ou perd, sous la forme d'un photon, une quantité d'énergie correspondant exactement à l'écart énergétique entre ces deux états : il s'agit du phénomène de résonance. En fonction de l'écart énergétique entre les deux états, la transition peut affecter les mouvements dans l'espace des atomes constituant la molécule (translations, rotations et vibrations), le système électronique de valence, le système électronique de cœur ou le système nucléaire des atomes qui composent la molécule.

L'observation directe ou indirecte des fréquences de résonance permet d'obtenir des informations sur la nature précise de la molécule.

La plupart des études de spectroscopie s'inscrivent dans le cadre de l'approximation de Born-Oppenheimer, ce qui permet de simplifier le formalisme utilisé.

Approximation de Born-Oppenheimer

La masse du nuage électronique d'une molécule peut souvent être considérée comme négligeable devant la masse des noyaux. Dans le cadre de cette approximation, le centre de masse de la molécule se situe au centre de masse des noyaux de la molécule. On peut en déduire que les variations du nuage électronique sont beaucoup plus rapides et plus énergétiques ($\sim 10^{15}$ Hz / UV-visible) que les variations dans la position des noyaux de la molécule (de 10^{11} à 10^{14} Hz / infrarouge).

Dans le cadre de l'approximation de Born-Oppenheimer, on peut donc d'une part étudier le comportement du nuage électronique au sein d'un édifice moléculaire fixe, et d'autre part étudier le mouvement des noyaux en ne tenant compte que de l'effet moyen produit par le nuage électronique. Cette approximation revient à négliger le couplage entre les niveaux électroniques et les niveaux vibrationnels d'une molécule.

1. Spectroscopie vibrationnelle

1.1. Principe des techniques de spectroscopie vibrationnelle

1.1.1. Modes normaux de vibration

Le formalisme des modes normaux de vibration se place dans le cadre de l'approximation de Born-Oppenheimer.

Un atome isolé possède 3 degrés de liberté dans l'espace à 3 dimensions. Une molécule de N atomes possède donc $3N$ degrés de liberté dans l'espace. Ces $3N$ degrés de liberté peuvent être regroupés en 3 degrés de translation globale de la molécule (une translation selon chaque direction x , y et z), 3 degrés de rotation globale de la molécule si la molécule n'est pas linéaire (une rotation autour de chaque axe x , y et z) et $3N-6$ degrés de vibration, appelés modes normaux de vibration, dans lesquels les atomes ou des groupes d'atomes se déplacent simultanément sans modifier la position du centre de masse de l'ensemble de la molécule.

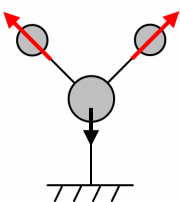
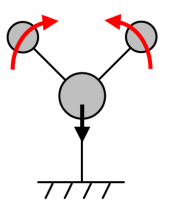
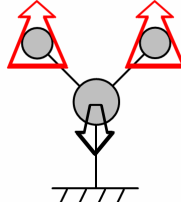
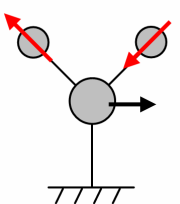
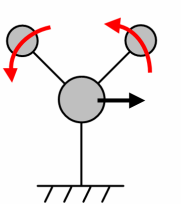
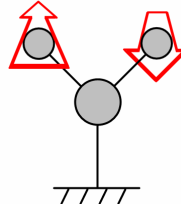
	Dans le plan		Hors du plan
Symétrique	 Élongation symétrique	 Déformation symétrique	 Balancement
Anti-symétrique	 Élongation anti-symétrique	 Déformation anti-symétrique	 Torsion

Figure A2.1 : Représentation schématique des mouvements associés aux modes normaux de vibration d'un groupe de 3 atomes appartenant à une molécule.

Par exemple pour un groupe de 3 atomes non-alignés appartenant à une molécule, il existe 4 modes de vibration dans le plan et 2 modes de vibration hors du plan (figure A2.1).

Lorsque le groupe de 3 atomes non-alignés est indépendant, c'est-à-dire dans le cas d'une molécule de 3 atomes non-alignés, il n'existe que $3N-6 = 3$ modes normaux de vibration : élongation symétrique, élongation antisymétrique et déformation symétrique. On peut cependant remarquer que les modes de balancement, déformation antisymétrique et torsion sont dans ce cas simplement des rotations globales de la molécule.

1.1.2. Modèle de l'oscillateur harmonique

Chacun des modes de vibration d'une molécule possède une infinité d'états dont l'énergie est quantifiée. En première approximation, on peut décrire chaque mode normal de vibration comme un oscillateur harmonique de masse réduite μ et de constante de force k . L'énergie des états du mode de vibration est alors donnée par :

$$E_n = h \nu \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad \text{avec } n \in \mathbb{N} \quad \text{et} \quad \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}.$$

On constate que l'énergie E_0 de l'état fondamental n'est pas nulle et que les états sont séparés les uns des autres par une énergie $E = h \nu$ qui est constante. La grandeur ν est la fréquence de vibration correspondant au mode normal considéré : elle est fonction à la fois de la constante de force de l'oscillateur et de sa masse réduite, ce qui permet d'utiliser cette grandeur pour estimer des forces de liaisons (plus la liaison est forte, plus la fréquence est élevée) et pour mesurer des effets isotopiques.

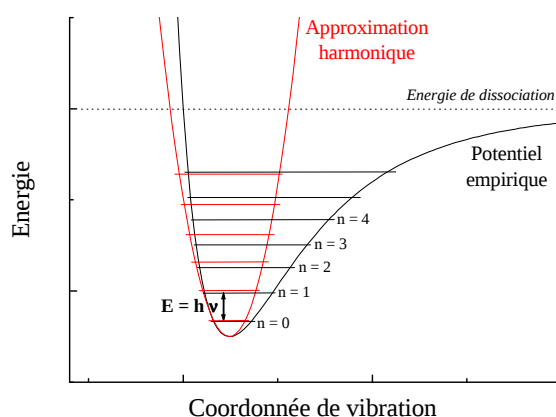


Figure A2.2 : Potentiel et états d'énergie associés à un mode normal de vibration, comparaison avec l'approximation harmonique.

En réalité, les modes de vibrations ne sont pas strictement harmoniques. Les conséquences principales de l'anharmonicité sont qu'une liaison est capable de se casser si le mode de vibration reçoit une quantité d'énergie supérieure à son énergie de dissociation, et que

l'énergie qu'il faut fournir pour passer d'un état à un autre n'est pas constante mais diminue de plus en plus lorsqu'on se rapproche de l'énergie de dissociation.

1.1.3. Population des états

Dans le cas de la spectroscopie vibrationnelle, l'énergie de transition entre deux états d'un mode de vibration correspond à l'énergie d'un rayonnement électromagnétique dans l'infrarouge. Les transferts dits « thermiques » (en particulier les chocs avec d'autres molécules ou avec le solvant) permettent aussi d'exciter les modes de vibration.

Pour un ensemble de molécules, la fraction occupant un état vibrationnel donné suit une distribution de Boltzmann en fonction de la température. On peut en déduire qu'à température ambiante, la quasi-totalité de la population occupe les états fondamentaux des modes de vibration. Donc lorsqu'un champ électromagnétique interagit avec les modes de vibration d'une molécule, les transitions qui peuvent avoir lieu sont celles qui font passer la molécule de l'état fondamental à un des états excités.

1.1.4. Règles de sélection

L'interaction entre une molécule et un rayonnement électromagnétique est la somme des interactions entre d'une part le moment dipolaire ou les charges de la molécule et le champ électrique, et d'autre part les composantes de spin de la molécule et le champ magnétique. Dans le cadre des spectroscopies vibrationnelles, on peut négliger l'interaction spin-champ magnétique devant l'interaction charge-champ électrique.

Spectroscopie d'absorption ou d'émission

Dans le cas des spectroscopies d'absorption ou d'émission, l'interaction a lieu entre le moment dipolaire permanent ou instantané de la molécule et le champ électrique. La transition entre deux états d'un mode de vibration a alors une bonne probabilité de se produire uniquement si ce mode de vibration induit un changement dans le moment dipolaire de la molécule.

Spectroscopie de diffusion

Dans ce cas, l'interaction a lieu entre le champ électrique et le moment dipolaire induit de la molécule. La transition entre deux états d'un mode de vibration a alors une bonne probabilité

de se produire uniquement si ce mode de vibration induit un changement dans la polarisabilité de la molécule, c'est-à-dire une déformation de son nuage électronique.

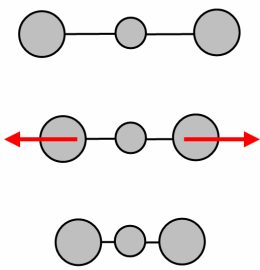
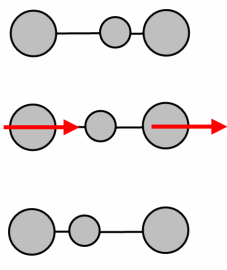
Mode de vibration	IR (absorption)	Raman (diffusion)
Élongation symétrique 	Pas de modification du moment dipolaire : inactif en IR	Modification de la polarisabilité : actif en Raman
Élongation anti-symétrique 	Modification du moment dipolaire : actif en IR	Pas de modification de la polarisabilité : inactif en Raman

Figure A2.3 : Modes de vibrations d'élongation de CO₂ et activités de ces modes en spectroscopie infrarouge.

Les spectroscopies infrarouge d'absorption et de diffusion (spectroscopie Raman) sont donc des techniques complémentaires : certains modes de vibration qui ne sont pas observés par une de ces techniques peuvent souvent être observés par l'autre.

1.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge

1.2.1. Principe de la spectroscopie d'absorption infrarouge

La spectroscopie d'absorption infrarouge permet une observation directe des fréquences caractéristiques des modes de vibration d'une molécule. L'échantillon est placé sur le trajet optique d'un faisceau lumineux infrarouge, et l'examen de la lumière transmise permet de déterminer quelles fréquences ont été absorbées par l'échantillon : ce sont les fréquences de résonance de l'échantillon.

En pratique, à cause de la très faible population naturelle des états excités, les seules transitions observées sont celles qui ont lieu depuis l'état fondamental jusqu'au premier état excité des différents modes de vibration.

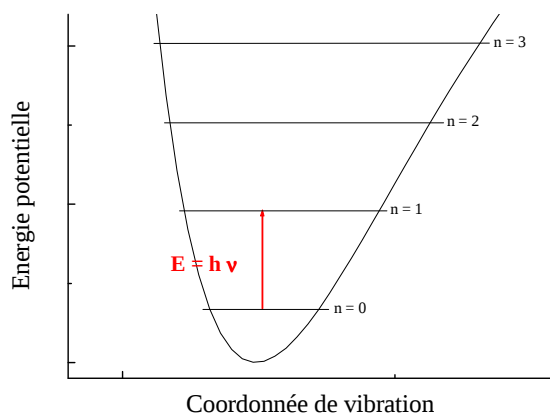


Figure A2.4 : Représentation schématique de l'absorption d'un rayonnement infrarouge par un mode de vibration d'une molécule.

La première méthode pour déterminer les fréquences de résonance consiste à utiliser un monochromateur pour filtrer le faisceau infrarouge incident, et à mesurer le rapport entre l'intensité de la lumière transmise et celle de la lumière incidente pour chaque pas du monochromateur, c'est-à-dire pour chaque fréquence incidente. Il s'agit de spectroscopie infrarouge à dispersion.

La deuxième méthode consiste à envoyer sur l'échantillon une lumière infrarouge incidente au travers d'un interféromètre. La transformée de Fourier du signal obtenu en transmission donne directement le spectre total de l'échantillon. Il s'agit de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). La méthode de spectroscopie FTIR a plusieurs avantages sur celle de spectroscopie infrarouge à dispersion, en particulier le faible coût d'un interféromètre par rapport à celui d'un monochromateur, et le temps d'acquisition plus faible pour obtenir un spectre complet ce qui permet de réaliser un plus grand nombre de mesures et d'augmenter la sensibilité de la détection des fréquences de résonance.

1.2.2. Principe de la spectroscopie ATR-FTIR

La technique d'ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflection – Fourier Transformed InfraRed*) permet de réaliser des spectres d'absorption infrarouge d'échantillons trop fins ou au contraire qui absorbent trop pour être analysés par transmission. Cette technique est en

particulier utilisée pour l'analyse de surfaces de matériaux et pour l'étude d'échantillons disponibles en très petite quantité.

Le rayon infrarouge incident est dirigé au travers d'un cristal possédant un indice de réfraction très élevé comme ZnSe ($n = 1,24$), ce qui oblige le rayon infrarouge à être réfléchi de nombreuses fois sur les bords du cristal avant de ressortir. Lorsqu'une onde électromagnétique qui traverse un milieu conducteur (ici le cristal ZnSe) est réfléchi sur une paroi non conductrice (le bord du cristal), il se forme une onde stationnaire de l'autre côté de la paroi et orthogonale à l'interface, appelée onde évanescente, dont l'intensité décroît très rapidement en s'éloignant de la paroi. Dans la technique d'ATR-FTIR, l'échantillon est déposé à la surface du cristal ZnSe, donc lorsque le rayon infrarouge est réfléchi à l'intérieur du cristal, les ondes évanescentes formées se développent au niveau de l'échantillon et une partie de l'onde évanescente est absorbée. Le rayon infrarouge transmis dans le cristal est donc atténué à chaque réflexion sur le bord et sa composition spectrale donne un négatif du spectre d'absorption de l'échantillon. Le traitement du signal est ensuite réalisé par la méthode FTIR.

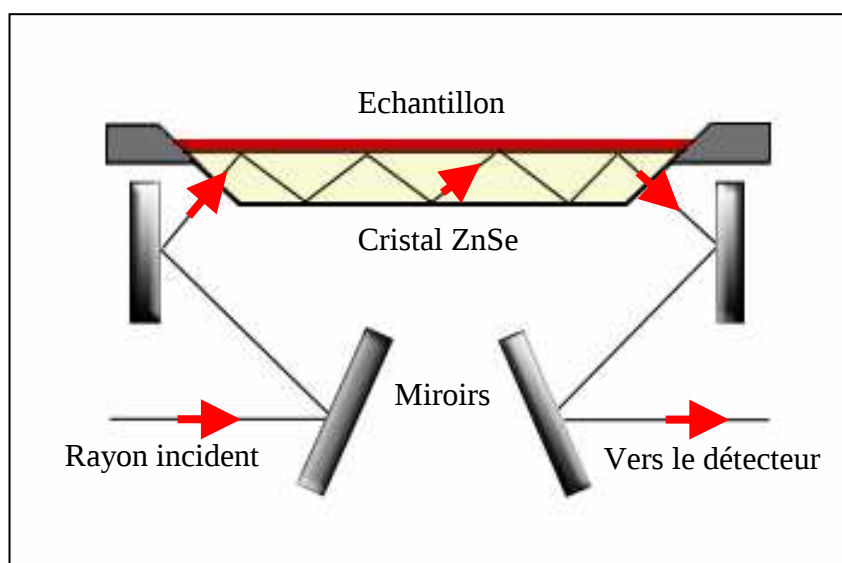


Figure A2.5 : Représentation schématique de la cellule d'un spectroscope à ATR-FTIR.

1.2.3. Application à l'étude des hémoprotéines

La spectroscopie ATR-FTIR est particulièrement adaptée à l'étude du complexe Fe^{II} -CO des hémoprotéines dont les échantillons possèdent une absorbance très élevée et qui sont souvent disponibles en faibles quantités. Cette technique est ainsi très utilisée dans l'étude des cytochromes P450 [217-219] ou des NOS [220-222].

En effet, le mode de vibration d'élongation de la liaison C–O est un mode actif en spectroscopie d'absorption (voir 1.1.4.). De plus le signal associé à ce mode de vibration est observé entre 1900 et 1970 cm^{-1} environ, c'est-à-dire dans une région du spectre qui ne comporte pratiquement aucun autre signal, ce qui rend le signal d'intérêt facile à observer et à attribuer.

1.3. Spectroscopie de diffusion Raman

1.3.1. Principe de la spectroscopie Raman

L'effet Raman est un processus de diffusion inélastique de la lumière découvert en 1928 par le physicien indien C. V. Raman. Lorsqu'un faisceau de lumière incidente traverse un échantillon, la diffusion se fait en très grande majorité de manière élastique, c'est-à-dire avec une longueur d'onde ν_{diff} du photon diffusé égale à la longueur d'onde ν_0 du photon incident : c'est le phénomène de diffusion Rayleigh ($\nu_{\text{diff}} = \nu_0$). Cependant, une faible fraction de la lumière (environ 1 photon sur 10^6 photons incidents) est diffusée de manière inélastique [206, 207] : c'est le phénomène de diffusion Raman ($\nu_{\text{diff}} \neq \nu_0$).

Contrairement aux phénomènes d'absorption ou d'émission de la lumière qui sont des processus séquentiels à un seul photon, la diffusion de la lumière est un processus à deux photons. Le photon incident n'est pas absorbé par la molécule, il constitue avec la molécule un nouveau système « molécule+photon » qui occupe un état d'énergie dit virtuel noté # figure A2.6. Un deuxième photon est quasi-immédiatement diffusé à partir de cet état d'énergie vers l'état fondamental de la molécule dans un temps caractéristique inférieur à celui d'une vibration du système. La longueur d'onde du photon diffusé contient alors les informations caractéristiques de l'énergie des sous-niveaux énergétiques de la molécule (figure A2.6).

La technique de spectroscopie Raman la plus utilisée consiste à éclairer l'échantillon avec une lumière monochromatique intense (faisceau laser) dans la région UV-visible du spectre électromagnétique. Le spectre de diffusion Raman permet alors d'observer les fréquences caractéristiques des modes propres de vibration des molécules présentes dans l'échantillon grâce aux bandes Raman Stokes ($\nu_{\text{diff}} = \nu_0 - \nu_{\text{vib}}$) et anti-Stokes ($\nu_{\text{diff}} = \nu_0 + \nu_{\text{vib}}$) de part et d'autre de la bande Rayleigh (figure A2.6). Expérimentalement, en raison de la très faible population naturelle des états vibrationnels excités à température ambiante, la bande Stokes

est beaucoup plus intense que la bande anti-Stokes. Seule la partie Stokes du spectre de diffusion est donc en général présentée.

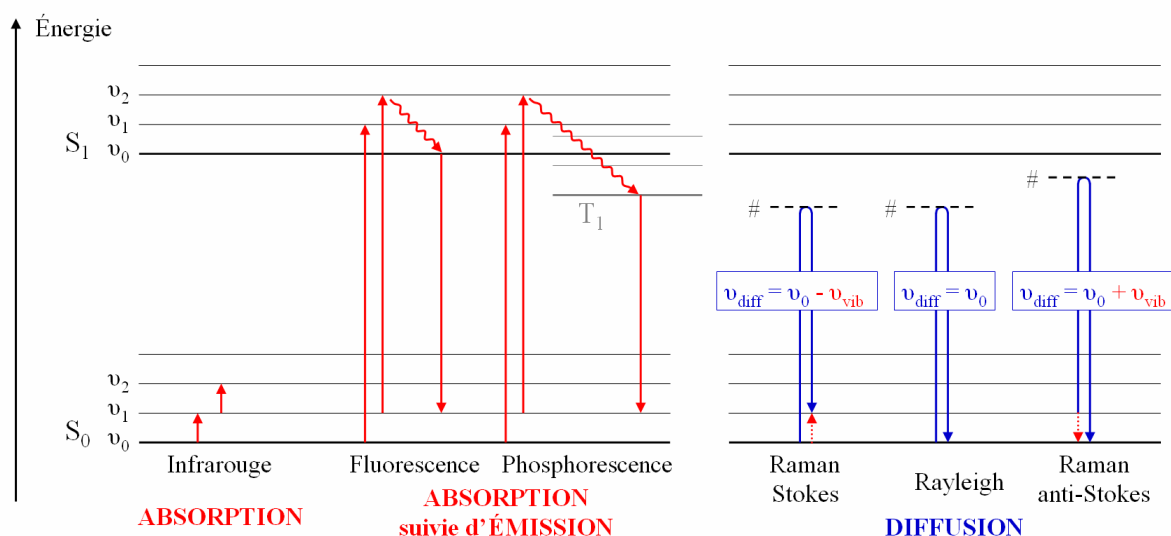


Figure A2.6 : Diagramme de Perrin-Jablonski mettant en évidence les différents modes d'interaction d'une molécule avec la lumière. L'état électronique fondamental est noté S_0 (singulet), les états électroniques excités sont notés S_1 (singulet) et T_1 (triplet). Les états virtuels sont notés #.

1.3.2. Principe de la spectroscopie Raman de résonance

Lorsque l'énergie de l'état virtuel du système « molécule+photon » (noté # figure A2.6) est égale à l'énergie d'un état propre de la molécule seule, c'est-à-dire lorsque la longueur d'onde du photon incident correspond à une transition électronique permise de la molécule, alors l'effet Raman est très fortement amplifié : c'est l'effet Raman de résonance.

Les transitions électroniques permises de la molécule peuvent être visualisées au moyen du spectre d'absorption UV-visible de la molécule. Expérimentalement, la longueur d'onde d'excitation est donc choisie de manière à correspondre à un maximum d'absorption UV-visible de la molécule à étudier. Seuls les modes de vibration associés à la transition électronique excitée sont ainsi exaltés.

Les intensités relatives des bandes Raman reflètent le changement de la polarisabilité moléculaire associé à chaque vibration (voir 1.1.4.). Les bandes qui présentent le plus fort degré d'exaltation sont celles qui correspondent aux modes de vibration de l'état électronique fondamental qui miment la distorsion de l'état électronique excité avec lequel il y a résonance.

1.3.3. Application à l'étude des hémoprotéines

La spectroscopie Raman de résonance est particulièrement adaptée à l'étude de molécules comportant un chromophore. Les modes de vibrations associés aux transitions électroniques du chromophore sont spécifiquement exaltés, ce qui permet de les distinguer des autres modes de vibration.

Ainsi, dans le cas des hémoprotéines où les transitions électroniques sont bien caractérisées, la longueur d'onde d'excitation choisie correspond le plus souvent au maximum d'absorption UV-visible du pic de Soret. De cette manière, les modes de vibrations exaltés sont uniquement les modes associés à la porphyrine et aux ligands directs du fer tandis que les modes associés au reste de la protéine ou au solvant ne sont pas observés. Il est ainsi possible d'observer spécifiquement le comportement vibrationnel de l'hème, ce qui ne serait pas réalisable par spectroscopie d'absorption infrarouge où les modes de vibration d'intérêt seraient masqués par les contributions du reste de l'échantillon [206-208].

2. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

La spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique qui permet la détection des molécules ou atomes dans un état de spin paramagnétique, c'est-à-dire qui comptent un ou plusieurs électrons célibataires [264]. Cette méthode peut donc s'appliquer à l'étude des radicaux libres et des ions métalliques des métalloprotéines.

2.1. Principe de la RPE

Un électron célibataire possède un moment cinétique de spin (m_s) qui peut prendre deux valeurs, $m_s = +1/2$ ou $-1/2$. En l'absence de champ magnétique extérieur, les niveaux énergétiques correspondant à ces deux états de spin sont dégénérés (figure A2.7).

Lorsqu'on applique un champ magnétique extérieur H , on observe une levée de dégénérescence des deux états de spin : c'est l'effet Zeeman (figure A2.7). La différence d'énergie ΔE entre les deux états de spin est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique appliqué et vérifie la relation :

$$\Delta E = g.\beta.H$$

où H est la valeur du champ magnétique, β est le magnéton de Bohr électronique ($9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$), et g est le facteur de Lande caractéristique de l'espèce paramagnétique étudiée (2,0023 pour l'électron libre). Le principe de la spectroscopie RPE consiste à mesurer la différence d'énergie ΔE de manière à déterminer le facteur g associé à l'espèce étudiée.

L'échantillon reçoit une onde électromagnétique incidente de fréquence ν fixe correspondant à la région micro-onde du spectre électromagnétique (9,4 GHz en bande X), on fait ensuite varier le champ magnétique H jusqu'à observer l'absorption de l'onde micro-onde qui indique la transition des spins des états de faible énergie vers les états de haute énergie. L'observation du phénomène de résonance signifie que le champ H appliqué vérifie la relation :

$$\Delta E = g \cdot \beta \cdot H_{\text{res}} = h \cdot \nu$$

Expérimentalement, le champ H appliqué est modulé. Le signal observé correspond donc approximativement à la dérivée du signal d'absorption (figure A2.7).

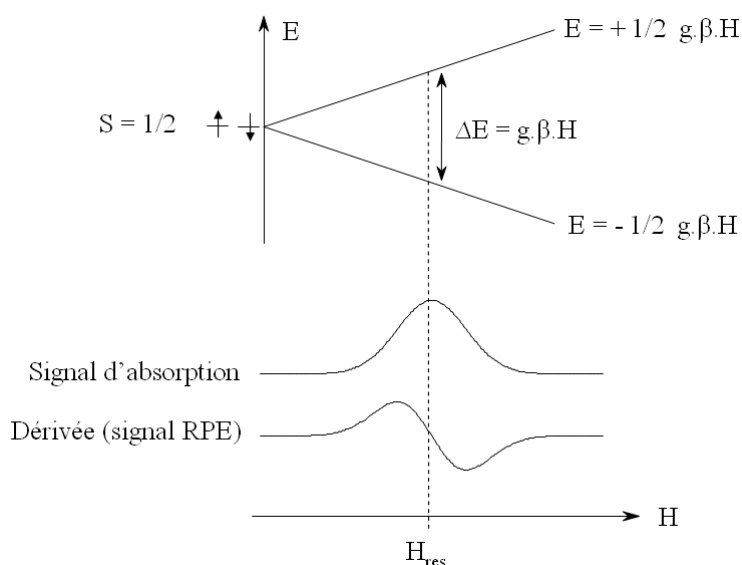


Figure A2.7 : Représentation schématique de l'effet Zeeman et du signal RPE associé pour un système de spin $S = 1/2$.

De manière plus générale, une molécule paramagnétique est une molécule qui possède un spin électronique S non nul égal à la somme des spins électroniques individuels des électrons de valence. Selon la géométrie de la molécule, il peut se produire une levée de dégénérescence des différents états de spin en l'absence de champ magnétique extérieur appelée ZFS (*Zero Field Splitting*). Cependant, pour tout système de nombre de spin demi-

entier ($S = \pm x/2$), une dégénérescence au moins double subsiste en l'absence de champ magnétique, ces états doublement dégénérés sont appelés doublets de Kramer.

Lorsqu'on applique un champ magnétique extérieur H , l'effet Zeeman provoque une levée de dégénérescence de ces différents états de spin comme décrit ci-dessus, ce qui permet de déterminer le facteur g associé à l'espèce étudiée par spectroscopie RPE.

En réalité, le facteur g est un tenseur dont les 3 paramètres diagonaux g_x , g_y et g_z peuvent être mesurés par spectroscopie RPE. Lorsque le système étudié est isotrope, les valeurs de ces 3 paramètres sont confondues et on n'observe qu'un seul signal RPE. En revanche, lorsque le système est anisotrope, on peut observer 3 signaux distincts et les attribuer aux 3 paramètres diagonaux.

2.2. Application à l'étude des hémoprotéines

2.2.1. Théorie du champ de ligands

La théorie du champ de ligands est une approximation très utilisée pour décrire les propriétés électroniques et magnétiques des complexes des métaux de transition en fonction de leur état d'oxydation et de la nature de leurs ligands. Ce modèle décrit en particulier l'interaction des orbitales d du métal avec les ligands considérés comme des charges négatives réparties autour du métal.

Dans le cas d'un champ de ligands à symétrie octaédrique, il se produit une levée de dégénérescence des 5 orbitales d du métal en deux groupes : les orbitales $d_{x^2-y^2}$ et d_{z^2} (groupe e_g) sont orientées géométriquement en direction des ligands ce qui les déstabilise, au contraire les orbitales d_{xy} , d_{xz} et d_{yz} (groupe t_{2g}) ne subissent pas directement l'influence des ligands et sont moins déstabilisées. Ces deux groupes sont séparés par une énergie Δ (figure A2.8).

Les configurations électroniques à l'état fondamental des complexes métalliques octaédriques sont obtenues en répartissant les électrons de valence dans les orbitales e_g et t_{2g} (figure A2.8).

Si le champ de ligands est fort, c'est-à-dire si l'énergie Δ est supérieure à l'énergie d'appariement des électrons, ceux-ci se répartissent préférentiellement dans les orbitales de symétrie t_{2g} qui sont de plus basse énergie. Le complexe est alors dit à spin faible ou bas spin.

Si le champ de ligands est faible, c'est-à-dire si l'énergie Δ est inférieure à l'énergie d'appariement des électrons, les électrons se répartissent de manière à satisfaire la règle de multiplicité de spin de Hund. Le complexe est dit à spin fort ou haut spin (figure A2.8).

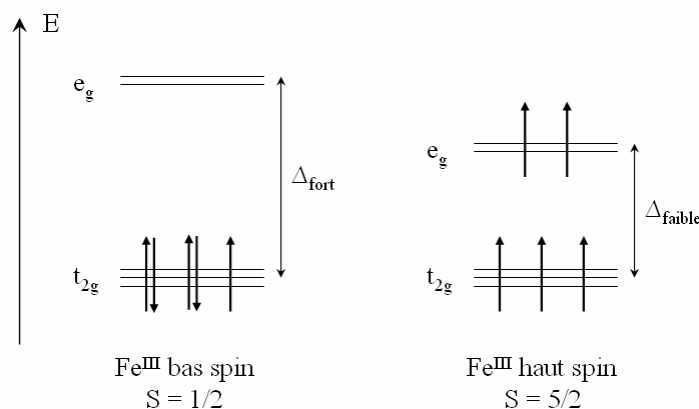


Figure A2.8 : Configuration électronique des orbitales 3d du fer au degré d'oxydation III en fonction de l'intensité du champ de ligand dans le cadre de la théorie du champ de ligands octaédrique.

2.2.2. Configuration Fe^{III} bas spin ($S = 1/2$)

Une hémoprotéine Fe^{III} bas spin peut être décrite comme un complexe hème- Fe^{III} hexacoordiné dans le cadre d'une géométrie octaédrique. Cette configuration électronique entraîne la formation de trois doublets de Kramer. Cependant, la différence d'énergie en champ nul (ZFS) entre les doublets de Kramer est suffisamment grande (environ 1000 cm^{-1}) pour que seul le doublet de plus faible énergie soit peuplé en dessous de 77 K [265]. Seule la transition à l'intérieur du doublet de Kramer $m_s = \pm 1/2$ le plus bas en énergie peut donc être observée par spectroscopie RPE.

Comme le complexe ne présente pas une géométrie parfaitement octaédrique autour du fer, l'interaction du spin électronique avec le champ magnétique extérieur H permet de mesurer trois valeurs de g : g_x , g_y et g_z . La séparation des valeurs de g peut être décrite par des valeurs de champ de ligand : un champ tétragonal Δ (lié à la force du champ de ligand selon l'axe z) et un champ rhombique V (lié à la force du champ de ligand selon le plan (x,y) de l'hème). Le champ tétragonal Δ dépend essentiellement de la répartition de la charge sur le fer : plus les ligands axiaux sont donneurs, plus Δ est grand. La rhombicité de l'environnement du fer, évaluée par le rapport V/Δ , est fonction de l'arrangement spatial des ligands.

Pour calculer les valeurs des champs V et Δ , nous avons utilisé les formules suivantes, en utilisant la convention de Taylor pour la dénomination des composantes du tenseur g [266].

Convention de Taylor : $g_z > g_y > g_x > 0$

Champ rhombique $V = g_z/(g_y - g_x) - g_y/(g_z - g_x)$

Champ tétragonal $\Delta = g_y/(g_x - g_z) - g_x/(g_y + g_z) - V/2$

Peisach et Blumberg ont rassemblé les paramètres V et Δ pour de nombreuses hémoprotéines bas spin dans un diagramme qui permet de relier la nature des ligands axiaux avec la géométrie de l'environnement du fer [267] (figure A2.9).

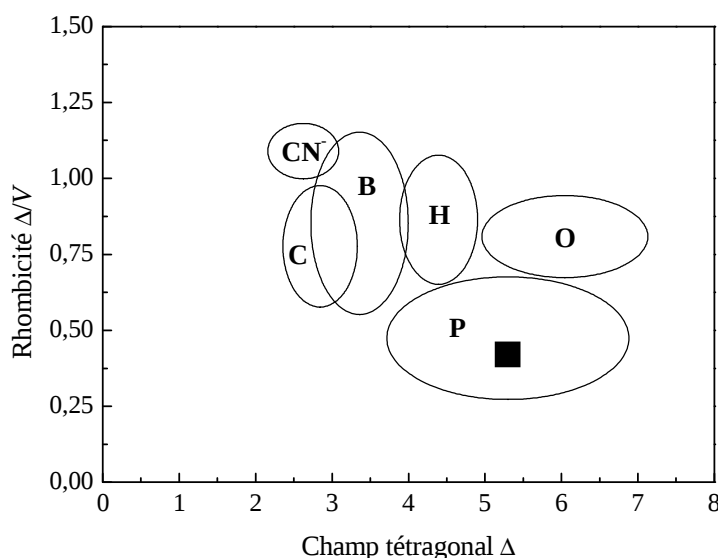


Figure A2.9 : Diagramme de Peisach et Blumberg pour les hémoprotéines Fe^{III} bas spin. Les domaines B, C, H, O, CN^- et P rassemblent respectivement les hémoprotéines dont les ligands axiaux sont deux imidazole (cytochromes b), imidazole et méthionine (cytochromes c), imidazole et imidazolate (hémoglobines), imidazole et phénolate (hémoglobines), imidazole et cyanure, un thiolate (cytochromes P450). Les valeurs observées pour les NOS (■) se situent bien dans le domaine des hémoprotéines à hème-thiolate.

2.2.3. Configuration Fe^{III} haut spin ($S = 5/2$)

Dans la plupart des cas, une hémoprotéine Fe^{III} haut spin peut être décrite comme un complexe hème- Fe^{III} pentacoordiné dans le cadre d'une géométrie octaédrique. Cette configuration électronique entraîne également la formation de trois doublets de Kramer, mais contrairement à la configuration bas spin, la différence d'énergie en champ nul (ZFS) entre les doublets de Kramer de la configuration haut spin est très faible (environ 10 cm^{-1}). L'écart

entre les populations des différents doublets n'est donc significatif qu'à très basse température : pour mesurer le spectre RPE d'une hémoprotéine haut spin, il faut se placer à 10 K de manière à ce que seul le doublet le plus bas en énergie soit peuplé (doublet 1, figure A2.10). C'est également pour cette raison qu'à la température de 35 K, seul le signal des espèces bas spin est mesurable [238, 265].

Le spectre RPE des hémoprotéines Fe^{III} haut spin traduit les transitions du doublet de Kramer le plus bas en énergie (doublet 1). La séparation des valeurs de g est décrite par deux paramètres énergétiques E et D qui traduisent respectivement les déformations rhombiques et axiales de l'environnement du fer en champ nul. En première approximation, l'effet Zeeman est négligeable devant la séparation des valeurs de g en champ nul (ZFS), les paramètres E et D contrôlent donc pratiquement l'allure du spectre RPE.

Pour un système parfaitement axial, $E/D = 0$: le spectre RPE présente alors deux valeurs de g à 6 et 2 (figure A2.10). Lorsque le système devient rhombique, le signal à $g = 6$ se dédouble pour donner un spectre avec $g_x \neq g_y$ [268]. Au maximum, le rapport E/D peut atteindre $1/3$. Dans le cas des NOS, on observe des valeurs de g proches de 7,6, 4 et 1,8, c'est-à-dire une valeur de E/D d'environ 0,75 [269, 270] (trait gris, figure A2.10).

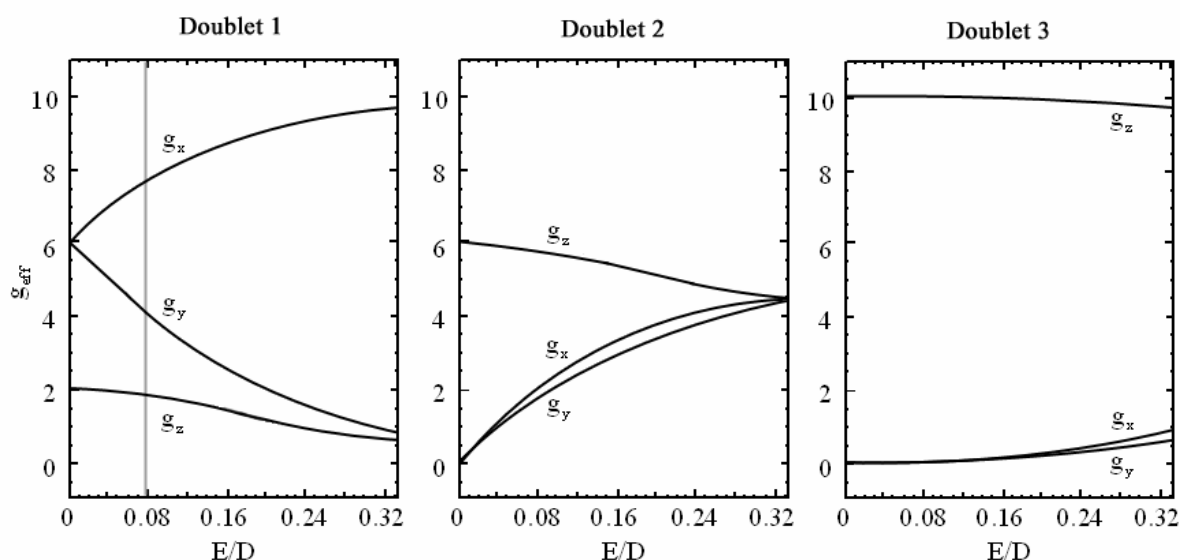


Figure A2.10 : Séparations des valeurs de g des trois doublets de Kramer pour un complexe octaédrique Fe^{III} haut spin. Les valeurs de g observées dans le cas des NOS sont indiquées par un trait gris.

Annexe 2. Techniques spectroscopiques

Par convention dans le cas des hémoprotéines, les deux valeurs de g qui correspondent au plan de l'hème sont appelées g_x et g_y . La valeur qui correspond à la direction axiale de l'hème est appelée g_z .

Tant que l'effet Zeeman reste négligeable, la position de g_x et g_y est essentiellement déterminée par la valeur du rapport E/D . Pour un rapport E/D inférieur à 0,1 environ, on peut alors estimer sa valeur grâce à la formule suivante [195, 265].

$$g_x - g_y \approx 48 \cdot E/D$$

Le signal assez intense souvent observé à $g = 4,3$ dans les spectres RPE d'hémoprotéines correspond vraisemblablement à du fer haut spin libre en solution dont on observe la transition du doublet 2 en géométrie complètement rhombique [238]. Ce signal recouvre partiellement la contribution du complexe Fe^{III} haut spin vers 4,0 ce qui peut rendre la simulation des spectres difficile.

Annexe 3

Role of Arginine Guanidinium Moiety in Nitric Oxide Synthase Mechanism of Oxygen Activation

Claire Giroud*, Magali Moreau*, Tony A. Mattioli[†], Véronique Balland^Φ, Jean-Luc Boucher*,
Dennis Stuehr[&], and Jérôme Santolini^{†§}

[†] iBiTec-S; LSOD, C. E. A. Saclay; 91191 Gif-sur-Yvette Cedex; France

* UMR 8601 CNRS, University Paris Descartes, 45 rue des Saints Peres, 75270 Paris, France

[&] Lerner Research Fundation, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA

^Φ Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, UMR 7591, University Paris 7, 2 place jussieu, 75251
Paris, France

[§] To whom correspondance should be addressed. Email: jerome.santolini@cea.fr

Abstract

The sole source of Nitric Oxide (NO) in mammals consists of a family of hemo-proteins called Nitric Oxide Synthases (NOSs). NOSs catalyze two highly selective oxidative reactions that sequentially convert L-Arginine (L-Arg) to the N^ω-hydroxy-L-Arg (NOHA) and then to L-citrulline and NO. Despite extensive structural and functional investigations, the detailed molecular mechanism of NOS remains mostly elusive. Both catalytic steps seem to involve the build-up of a ferric-hydroperoxo complex but they are believed to rely on distinct oxidative species: a ferric-hydroperoxo complex for NOHA oxidation, an oxoferryl species for L-Arg hydroxylation. However, this paradigm is based, by default, on analogies with the mechanism of oxygen activation proposed for other hemo-thiolate proteins such as the cytochrome P450 family. Lately, new reports have put in doubt the existing models for NOS mechanism and proposed alternative chemistry to account for both L-Arg and NOHA oxidation. The major reason for the discrepancies in the proposed mechanisms resides in the uncertainty concerning the number and sources of proton transfer events. Indeed, whereas protonation is the key-feature in determining the specificity and efficiency of both catalytic steps, little is known about the role and properties of the substrate and cofactor protons and of the distal H-bond network. In this context, we investigated the role of the proton of Arg guanidinium on the stability and reactivity of the Fe^{II}O₂ complex by exploiting a series of L-Arg analogues that display a wide range of guanidinium pKa values. Using a combination of spectroelectrochemistry and vibrational spectroscopies, we analyzed the effects of these analogues on the proximal ligand characteristics, on the porphyrin conformation, on the heme redox potential and on the electrostatic properties of heme distal environment. Our results strongly suggest that the pKa of the substrate guanidinium controls the H-bond network surrounding the distal ligand. We proposed a structural model based on three major conformations of the Fe^{II}O₂ complex that accounts for the differences in the mechanism of oxidation of NOHA and L-Arg. The properties of the guanidinium moiety finely control the proton transfer event, tune NOS oxidative chemistry and determine the nature of NOS production.

Abbreviations

L-Arg, L-arginine; FAD, flavin adenine dinucleotide; FMN, flavin adenine mononucleotide; $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, ferrous heme-nitric oxide complex; $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, ferric heme-nitric oxide complex; $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$, ferrous heme-oxy complex; $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$, ferric heme-nitric oxide complex; $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$, ferrous heme-carbon monoxide complex; FTIR, Fourier-Transformed Infra-Red spectroscopy; HS and LS, High Spin and Low Spin; H_4B , tetrahydrobiopterin, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin; iNOS_{oxy}, inducible NOS oxidative domain; KPi, inorganic phosphate buffer; Mb, myoglobin; NADPH, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form; NO, nitric oxide; NOHA, N^{G} -hydroxy-L-Arg; NOS, nitric oxide synthase; NOHA, N^{G} -hydroxy-L-arginine, NOS_{oxy}, oxygenase domain of NOS; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; bsNOS, NOS-like protein isolated from *Bacillus subtilis*; P450_{BM3} , cytochrome P450 CYP120 isolated from *Bacillus megaterium*; ROS, Reactive Oxygen Species; RNS, Reactive Nitrogen Species; RR, resonance Raman spectroscopy;

Introduction

Nitrogen monoxide (NO) is a ubiquitous physiological mediator involved in a great number of signalling processes ranging from neural communication to vascular tone regulation [32, 83, 271]. NO is exclusively synthesized in mammals by a family of enzymes called NO-Synthases (NOS). In the last decade, NOSs have been increasingly associated to oxidative stress phenomena and to the development of a series of pathological conditions such as cardiovascular or neurodegenerative diseases [272-275]. For this reason the elucidation of NOSs mechanism has urgently become a major challenge for the biomedical research community. Indeed, since their discovery in the early-90s [50, 276-278] these enzymes have been the focus of numerous functional and structural investigations that rapidly provided valuable information on NOS functioning [106, 279, 280]: NOSs consist of homodimeric hemoproteins, whose monomers contain a NH_2 -terminal oxygenase domain (NOS_{oxy}) and a COOH -terminal reductase domain [281]. The oxygenase domain, that houses the catalytic active site, binds a heme prosthetic group, the substrate L-Arginine (L-Arg) and the crucial cofactor (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (H_4B) [104]. The function of the reductase domain is to provide electrons from substrate NADPH towards the heme through two intermediate flavins, FAD and FMN [48, 84, 282]. The oxygenase and reductase domains are linked together by a calmodulin binding protein subunit that eventually will trigger the electron flow based on a local increase of Ca^{2+} concentration [60, 283]. Like other hemo-thiolate proteins [121, 132, 284, 285], NOSs catalyze the activation of dioxygen to carry out oxidative chemistry, which enables NOS to convert L-Arginine

ultimately to L-Citrulline and NO via two oxidation/hydroxylation steps, with formation of N^ω-Hydroxy-L-Arginine (NOHA) as an intermediate (Scheme 1, [42]). Despite a great number of Structure-Function studies[58], the molecular mechanism of NOS remains mostly unknown [104]. It has been proposed that the first Step of NOS mechanism (*i.e.* L-Arg hydroxylation to NOHA) would be similar to a cytochrome P450 mechanism (Scheme 2, [86]): the resting ferric heme (Fe^{III}) is first reduced to a ferrous state (Fe^{II}) by one electron provided by the reductase domain. Oxygen binding to the ferrous heme leads then to a ferrous-dioxygen complex Fe^{II}O₂ that is isoelectronic with the ferric-superoxo complex, Fe^{III}O₂^{•-} (Scheme 2). In order to avoid the autoxidation of the Fe^{II}O₂ species and the uncoupling of electron transfer from the reductase domain, the cofactor H₄B must quickly provide a kinetically efficient electron, which will eventually lead to the buildup of ferric-hydroperoxo complex (Fe^{III}OOH) [58, 107]. Further protonation of the Fe^{III}OOH intermediate followed by heterolytic cleavage of the O-O bond would give rise to the oxoferryl species (Fe^{IV}O) [86] that is believed to be responsible for the hydroxylation of the guanidine moiety of L-arginine into NOHA and ferric heme [58, 86, 107]. The second catalytic step (NOHA oxidation) is believed to follow the same pathway up to the formation of the ferric-peroxo complex [140, 286]. At this point the catalytic sequence is specific to NOS and involves a direct nucleophilic attack of the peroxo group upon the guanidinium carbon[58]. The rearrangement of the resulting tetrahedral complex will ultimately lead to the release of NO and ferric heme [107]. Although this model has been considered as the working paradigm, it has been lately put in question and other alternative models have been brought up as serious alternatives [128, 137]. The main discrepancy between all putative models resides in the nature and properties of electron and proton transfer events [128, 143]. Indeed the number and the rates of electron and proton transfers will determine NOS oxidative chemistry and control the specificity and efficiency of each catalytic step. Thus, the difference observed in the pKa of the guanidinium (N^ω)H of NOHA and L-Arg is believed to modify the number of proton transfers, which should in turn account for the catalytic differences between the first and second steps. However, despite the crucial role of proton transfer in NOS catalysis, little is known about the role of the guanidinium moiety of NOS substrate and about the H-bond network surrounding the dioxygen ligand.

Lately we have been studying NOS catalytic mechanism for a large series of substrate analogues [178-180]. Our results have shown that NOS can catalyze the formation of NO by oxidation of specific L-Arg analogues, mostly non-aminoacid guanidines [178]. However, the actual catalytic mechanism seemed to vary as a function of the substrate. Indeed, the stability and reactivity of the Fe^{II}O₂ complex appeared to depend on the nature of the L-Arg analogues bound to the heme [180, 242]. Besides, the NADPH/NO stoichiometry was shown to dramatically increase in the presence of these guanidines analogues, which suggests sensible changes in the uncoupling ratio [242]. Finally, the NOS catalytic products were extremely diverse ranging from the efficient NO release to the production of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide and superoxide anion

[242]. Consequently, the changes in the physico-chemical properties of the guanidines appeared to significantly alter the NOS catalytic mechanism[180, 242]. Accordingly, our first results on alkyl- and aryl-guanidines have highlighted the relationship between the guanidinium moiety and the characteristics of NOS oxidative reactions[180].

In this context, we are elucidating the specific role of the guanidinium proton of the substrate in the regulation of the distal H-bond network and in the control of NOS oxidative chemistry. More precisely we wish to analyze the role of the interaction between the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex and its distal environment in determining the specific chemistry of the first and second catalytic steps. For this purpose we chose a series of L-Arg analogues that exhibit guanidinium moieties with different pKa values. Using a combination of vibrational spectroscopies and spectroelectrochemistry, we have firstly examined the effect of these analogues on the structural properties of the porphyrin ring, on the heme redox properties and on the electronic properties of the proximal ligand. We focused on the interaction between the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex and its distal environment using the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex that is a stable $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ mimic and is extremely sensitive to the electrostatic and polar properties of the heme distal pocket [213, 260]. We used a combination of resonance Raman (RR) and FTIR spectroscopies to analyze the effects of the different guanidines on the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ vibrational modes. Our results led us to propose a new model for the interaction between the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex and its distal environment and to assess the role of the surrounding H-bond network in the control of NOS oxidative chemistry.

Results

pKa Variations of L-Arg guanidine analogues - We investigated the precise role of the N(H) guanidinium proton on NOS oxidative chemistry using a series of Alkyl- and Aryl-guanidines (Figure 1). The structural and functional characterizations of these analogues have been previously reported. We confirmed that all analogues bind to iNOSoxy^1 (data not shown) with K_d values ranging between 1 and 100 μM [242]. pKa values of each L-Arginine analogue were measured using two distinct approaches. The pKa determination of substituted guanidines in water has been already described for phenyl-substituted tetramethylguanidines[287] and monosubstituted guanidines, such as Ph-Gua[201] and $\text{NO}_2\text{Ph-Gua}$ [202]. Accordingly, the pKa values of our set of aryl-guanidines were measured in water by sodium hydroxide titration *via* the simultaneous monitoring of the pH and the electric conductivity of the guanidinium salt solution (see Experimental Section). Since such a measurement is not possible for pKa values expected above 11 (see Experimental Section), pKa values of alkyl-guanidines were extrapolated from the correlation equation proposed by Taylor[202]

¹ The binding of L-Arg analogues was confirmed by the 420→395 Soret shift characteristic of a Low-Spin → High Spin transition

using the Hammett σ_I values[204] (see Experimental Section). We found that arylguanidines display pK_a values ranging from 9.3 to 10.8 (Figure 1, Table 1). These values match the ones reported in the literature for similar compounds such as Ph-Gua (10.8 vs 10.77[201]) or NO₂Ph-Gua (9.3 vs 9.13[202]). As expected, the values obtained for alkylguanidines were found between 11.8 and 12.6, which is close to the pK_a of L-Arg (12.48; Table 1). The wide pK_a range that we measured suggests that the L-Arg analogues present proton donating strengths that could favor different H-bonding interactions at NOS active site.

Effects on heme redox properties - We have examined the possible electrostatic effects on the heme of our series of L-Arg analogues by monitoring any changes in the redox potential of native iNOSoxy heme. We measured iNOSoxy heme midpoint potential in the presence of H₄B and L-Arg or L-Arg analogues. The spectroelectrochemical titration of the heme iron of iNOSoxy was performed with phenosafranin as single 2-electron-mediator ($E^{0'}$ = -255 mV). The use of a single mediator restricts the range of investigation (between -205 and -305 mV in our experiments) but it allows a better characterization of the UV-visible absorption spectra of the protein during the titration and a more precise and reliable determination of apparent midpoint potentials (see Experimental Section).

Figures 2A and 2C display the UV-visible absorption spectra monitored during the spectro-electrochemical titration of iNOSoxy in the presence of CF₃-(CH₂)₃-Gua **1** and FPh-Gua **6**. iNOSoxy reduction was confirmed by a shift of the Soret peak from 395 to 410 nm and the disappearance of the absorption band at 650 nm. The reoxidation titration yielded to the initial Fe^{III} spectrum. This complete and reversible reduction-oxidation process of iNOSoxy was observed in the presence of all tested guanidines (data not shown). The heme iron $E^{0'}$ midpoint potential and the n values were obtained by fitting the experimental Nernst plot (Figures 2B and 2D, Table 2; see Experimental Section). The value of $E^{0'}$ measured in the presence of L-Arg matched the value reported by Presta *et al.*[111]. In the presence of all the tested guanidines, iNOSoxy heme midpoint potentials were found between -262 and -270 $\pm$ 5 mV, which is close to the $E^{0'}$ measured in the presence of L-Arg (Table 2). Guanidine analogues do not significantly change the heme midpoint potential of iNOSoxy heme, which suggests that these L-Arg analogues do not alter the electrostatic features of iNOS heme. We then used resonance Raman to check if these analogues could influence or perturb NOS heme structure.

Effects on heme proximal environment –We first investigated the effect of L-Arg analogues on the proximal side of iNOS_{oxy} heme by analyzing iNOSoxy Fe-S vibration modes. This elongation mode can be examined by resonance Raman spectroscopy by exploiting the S $\rightarrow$ Fe^{III} charge transfer band of iNOSoxy Fe^{III} High Spin species that is preferentially enhanced upon excitation at 363.8 nm but is absent in the Low Spin Fe^{III} state[215, 288]. The RR spectrum of iNOSoxy Fe^{III} HS complex was recorded in the presence of H₄B and Arg using an excitation wavelength at 363.8 nm (Figure 3A).

Annexe 3. Role of Arginine Guanidinium Moiety in NO Synthase Mechanism of Oxygen Activation

The band-fitting analysis of the 300-440 cm^{-1} spectral region showed two heme porphyrin modes at 375 and 405 cm^{-1} and a potential $\nu_{\text{Fe-S}}$ mode at 337 cm^{-1} , in agreement with the value reported previously [97]. This latter band completely disappeared from the RR spectrum of iNOSoxy Fe^{III} LS species recorded in the absence of both H_4B and Arg, which confirms that the 337 cm^{-1} frequency corresponds to the $\nu_{\text{Fe-S}}$ mode. iNOSoxy Fe^{III} HS RR spectra were also recorded in the presence of our series of L-Arg analogues. As can be seen in Figure 3A, the $\nu_{\text{Fe-S}}$ bands were observed for all analogues around 338 cm^{-1} , which indicates that the binding of these L-Arg analogues does not induce any sizeable modification of the Fe-S bond strength (Table 3). These results suggest that, compared to L-Arg binding, the binding of L-Arg analogues to iNOSoxy heme does not perturb the proximal side of the heme pocket.

Effects on heme structure - In parallel, we investigated the effects of these guanidine analogues on the physical and chemical properties of the heme and on the structural properties of the porphyrin ring. Using resonance Raman spectroscopy, we have examined the conformation of the iNOSoxy porphyrin ring in the resting ferric state and in the presence of saturating concentrations of BH_4 and L-Arg analogues. The RR spectra of L-Arg- or analogues-bound Fe^{III} iNOSoxy were recorded in anaerobic conditions with a laser excitation at 363.8 nm (see Experimental Section), which also yields information concerning the porphyrin skeletal modes [97]. The high-frequency region (1300-1700 cm^{-1} , Figure 3B) exhibited core-size sensitive porphyrin modes that reflect the oxidation, spin, and coordination states of the heme. In the presence of L-Arg and H_4B , these heme porphyrin modes were observed at 1372 cm^{-1} (ν_4), 1489 cm^{-1} (ν_3), 1562 cm^{-1} (ν_2) and 1625 cm^{-1} (ν_{vinyl}). In the low frequency region (data not shown, Table 2), the ν_7 , ν_{16} (in-plane porphyrin deformations), and ν_{12} (pyrrole swivel) mode frequencies were observed at 675, 753, and 495 cm^{-1} , respectively. This resonance Raman spectrum is characteristic of a sole population of iNOSoxy in the Fe^{III} 5c HS state and is similar to that observed for eNOS [289], nNOS [290], bsNOS [97], saNOS [91] and various cytochromes P450 [253, 291, 292] in their ferric HS states (Table 2). RR spectra of iNOSoxy in the presence of L-Arg analogues were recorded in the same conditions and show no noteworthy changes (Figure 3). Frequencies values for the major porphyrin modes remain similar in the presence of L-Arg and L-Arg analogues (Table 3).

We have performed the same RR study for the iNOSoxy $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex. Samples were prepared as previously described by anaerobic reduction of native ferric NOS in the presence of saturating amounts of H_4B and of L-Arg- or L-Arg analogues, followed by an extensive CO flush (see Experimental Section). Resonance Raman spectra were obtained by using an excitation wavelength at 441.6 nm. All RR spectra were very similar to those previously obtained for $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complexes of other NOS [91, 97, 211, 212, 216, 289] and cytochromes P450 [253, 292, 293] (Figure 4 and Table 4). In the high-frequency region the ν_4 , ν_3 , and ν_2 frequencies were found around 1370, 1492, and 1570 cm^{-1} , respectively, in the presence of all tested compounds while in the low frequency region,

ν_{16} , ν_7 , and ν_8 frequencies remained unchanged around 750, 675, and 344 cm^{-1} respectively. Minor bands at 689, 1390, 1424, and 1601 cm^{-1} were assigned to ferrous heme species resulting from partial photodissociation of CO [211, 253] (Figure 4 and Table 4). These results suggest that L-Arg and L-Arg analogues exhibit similar and negligible interactions with iNOS heme. With the information above, we can say that L-Arg analogues do not significantly perturb the heme nor its pocket.

Effects on heme distal environment - We used the same resonance Raman spectra of iNOSoxy $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex (Figure 4) to precisely analyze the effects of L-Arg analogues on CO coordination. As mentioned above, the stability of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex, the heme redox potential and its general vibrational structure are not affected when L-Arg is substituted with our series of L-Arg analogues (Figure 4, Table 4), which allows the analysis of the direct effect of guanidinium pKa changes on $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination. We first focused on the low-frequency region of the RR spectra (Figure 3A). Based on previous reports [211, 214, 216] the RR bands at 490-510 and 565 cm^{-1} were attributable to the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ stretching and $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ bending modes, respectively. In the absence of both substrate and cofactor, NOS $\nu_{\text{Fe-CO}}$ RR bands appear broad ($\sim 50 \text{ cm}^{-1}$ FWHM) centred around 490 cm^{-1} (Figure 5). This reflects the contributions of several distinct $\nu_{\text{Fe-CO}}$ modes attributed to different heme distal pocket protein conformations. L-Arg binding and NOHA binding are believed to constrain the heme pocket to one of these conformations [216]: indeed, upon L-Arg or NOHA binding, the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ RR band narrowed (*ca.* 18 cm^{-1} FWHM for L-Arg) and shifted to 510 and 500 cm^{-1} , respectively (Figure 4A). The narrow bandwidth indicates a homogeneous population of conformations. Our RR spectra showed clear differences as a function of the L-Arg analogue bound to the active site (Figure 4A). Alkyl-guanidines binding, such as Pentyl-Gua (3), induced changes similar to those observed in the presence of L-Arg binding, *i.e.* a narrowing of the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ band and a shift of the maximum frequency towards 510 cm^{-1} . Upon binding of some aryl-guanidines, such as ClPh-Gua (7), the effect was similar to the one observed upon NOHA addition with a narrower $\nu_{\text{Fe-CO}}$ band centred at 500 cm^{-1} . Lastly, the binding of some other aryl-guanidines, like $\text{CH}_3\text{OPh-Gua}$ (5), did not modify iNOSoxy native RR spectrum and results in a broad peak centred on 495 cm^{-1} (Figure 4A).

We fitted the 425-550 cm^{-1} spectral regions of all RR spectra to a multi-Gaussian function (see Experimental Section). All $\nu_{\text{Fe-CO}}$ bands could be simulated by three to four bands centered around 465, 485, 500 and 510 cm^{-1} (Figure 5). All guanidines could be classified into three families of compounds (Figure 5, Table 5). The first family (Figure 5A) comprises the alkylguanidines that all exhibit $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ RR spectra similar to that of L-Arg, with a prominent component at 510 cm^{-1} and smaller contributions at 485 and 500 cm^{-1} . The second family includes some aryl-guanidines, such as F-Ph-Gua (6), Cl-Ph-Gua (7) and $\text{CF}_3\text{-Ph-Gua}$ (8), whose $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ RR spectra are similar to that obtained in the presence of NOHA, with a main contribution at 495 cm^{-1} and minor contributions at 485 and 510 cm^{-1} (Figure 5B). The third family (Figure 5C) includes other aryl-guanidines ($\text{CH}_3\text{O-Ph-}$

Gua (**5**) and NO₂-Ph-Gua (**9**)) that led to spectra similar to that obtained in the absence of both substrate and H₄B, with 2 main contributions at the 475 and 495 cm⁻¹ and minor contributions at 510 and 465 cm⁻¹. In addition, the $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ bending mode can be analyzed to monitor the effect of substrate binding on Fe^{II}CO complexes geometry [260]. We indeed observed significant changes in $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ bending modes between alkyl- and aryl-guanidines that reflect $\nu_{\text{Fe-CO}}$ variations (Table 5): in the presence of L-Arg analogues from the third family (**5**, **9**), the Fe^{II}CO complex displayed a weak band at 562-563 cm⁻¹ (Figure 3A). The addition of analogues from the first family (**1**, **3**, **4**), induced a shift of the $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ frequency to 565-567 cm⁻¹, also observed upon L-Arg binding. In the presence of the analogues from the second family, (**6**, **7**, **8**), the $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ frequency was observed at an intermediate value (561-565 cm⁻¹) similar to the frequency observed upon NOHA binding.

We complemented this resonance Raman study by an ATR-FTIR characterization of iNOSoxy Fe^{II}CO complexes for the same combination of H₄B, L-Arg and L-Arg analogues (see Experimental Section). While two ν_{CO} mode bands were observed at 1949 and 1963 cm⁻¹ in the absence of substrate and H₄B, the addition of H₄B and L-Arg led to a simplified IR-spectrum with a single narrow ν_{CO} band at 1903 cm⁻¹ (Figure 6 and Table 5). As previously reported [91, 211, 212, 216, 220], the addition of substrate and cofactor induces a transition from a multi-conformation state to a state where a single (“closed”) conformation predominates. Addition of L-Arg analogues is characterized by the same effect: IR-spectra of iNOSoxy Fe^{II}CO complex in the presence of L-Arg analogues exhibit a single narrow ν_{CO} band whose frequency vary between 1905 to 1921 cm⁻¹ as a function of the analogue (Figure 6). Once again, these results show three classes of behaviours: Binding of alkyl-guanidines (Family 1) leads to a single conformation with a ν_{CO} frequency between 1903 and 1911 cm⁻¹, which is similar to the effect observed upon L-Arg binding (Figure 6-1). Binding of the aryl-guanidines from the second family induces a “NOHA-like” conversion with a ν_{CO} frequency around 1915 cm⁻¹ (Figure 6-2). Lastly the IR-spectra obtained in the presence of aryl-guanidines from the third family, characterized by a ν_{CO} frequency between 1918 and 1921 cm⁻¹, display a closer similarity with the IR-spectra obtained in the absence of L-Arg (Figure 6-3, [242]).

The RR and ATR-FTIR results are consistent and lead to the same conclusions. They all support the existence of three types of interaction between iNOSoxy distal ligand and guanidines: *i*) all the tested alkylguanidines exhibit effects on the distal heme pocket similar to those observed for L-Arg. The effects of arylguanidines can be classified into two distinct types *ii*) the second family is characterized by interactions with the distal ligand reminiscent to the one observed in the presence of NOHA, *iii*) the third family does not fundamentally modify the structure of native iNOS Fe^{II}CO complex observed in the absence of both substrate and H₄B.

Discussion

The difference between the first and second steps of NOS catalytic mechanism is commonly explained by the difference in the guanidinium proton pKa between NOHA and L-Arginine. However, until now, no clear picture of the proton and electron transfer events has emerged to clarify NOS mechanism and the specific chemistry of both the first and second steps. On the other hand, we have shown that the nature of the substrate/guanidine can significantly modify the oxidation mechanism, along with reaction intermediate and products [178, 180]. These considerations led us to address the actual role of the guanidinium proton in the mechanism of L-Arg and NOHA oxidation by studying a series of L-Arg guanidine analogues that would display a significant range of pKa values and by analysing the interaction between their guanidinium moiety and the heme active site.

$\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex has proven to be the best tool to investigate the effects of substrate binding on NOS $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ stability and reactivity, because this complex is a useful mimic of the unstable $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ intermediate and is extremely sensitive to electrostatic environment and heme pocket polarity [213, 260]. Numerous investigations have shown the effects of substrate binding on $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ geometry for NOSs [180, 211, 212, 216] and most of the cytochromes P450 [213, 253, 292, 293]. These structural effects can be explained as follow: the binding of substrate will bring a positive charge in the vicinity of the distal ligand that will promote the build-up of a partial negative charge on the O atom; this interaction will result in the increase of the Fe-C bond order and decrease of the C-O bond order via the electronic back-donation from the Fe $d\pi^*$ orbital to the empty π^* CO orbital. Therefore, changes in the electrostatic distal environment will have direct consequences on the vibrational fingerprint of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex and in particular on the $\nu_{\text{C-O}}$ and $\nu_{\text{Fe-CO}}$ frequencies [213]: a higher $\nu_{\text{Fe-CO}}$ and lower $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies will reflect a greater positive charge at the O-terminal ligand of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ moiety. Therefore the characterization of the effects of guanidinium pKa on $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ structure can be achieved through the analysis of these two vibration modes using a combination of resonance Raman and FTIR spectroscopies.

A new model for $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination - We completed and perfected the investigation of the interaction between guanidine analogues and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex. Until now, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex was described in terms of two distinct conformations, “open” and “closed” and substrate binding was believed to suppress the open conformation and modify the structure of the closed one. However, this explanation proved to be insufficient and is unable to explain the strong differences observed between isoforms ($\nu_{\text{Fe-CO}}$ was found at 512 and 500 cm^{-1} for iNOS and nNOS respectively) and substrate ($\nu_{\text{Fe-CO}}$ was found at 512 and 500 cm^{-1} for L-Arg and NOHA respectively). We have been led to adopt the understanding that $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination obeys to a much more complex picture. Based on our results and on the observations of Li *et al.* [214], we propose here a new model that consists in an

equilibrium between at least three conformations corresponding to three different electrostatic states of the heme distal pocket.

Indeed, for all conditions of substrate and cofactor, we identified three distinct conformations that are characterized by $\nu_{\text{Fe-CO}}$ bands around 485, 500 and 510 cm^{-1} ; the minor component observed at 465 cm^{-1} is probably due to a porphyrin vibration mode enhancement caused by its near degeneracy with the Fe-CO stretching mode. Addition of substrate and cofactor does not lead to the suppression of one conformation or to major modifications of their structure, as previously proposed [216]. The principal effect of substrate and analogues binding is to change the electrostatic state of the heme pocket, which in turns modifies the equilibrium between these three conformations (Figure 5A, Table 5). This analysis leads us to propose a structural model based on the existence of three types of interactions between the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex and its distal environment: i) the strongest electrostatic interaction takes place in the presence of alkyl-guanidines (including L-Arg) and leads to the predominance of *conformation 1* ($\nu_{\text{Fe-CO}}$ at 510 cm^{-1}) ii) a weaker electrostatic interaction takes place in the presence of NOHA and some Aryl-guanidines (Table 5), promoting the build-up of *conformation 2* ($\nu_{\text{Fe-CO}}$ at 500 cm^{-1}). iii) a few Aryl-guanidines were characterized by a negligible interaction with the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex with no change observed in the conformational equilibrium. This model was confirmed by the FTIR-analysis of the $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies that allows characterizing the major conformation for each condition of substrate. The major conformation for the alkyl-guanidines was characterized by a $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies between 1903 and 1911 cm^{-1} , confirming a strong polar interaction between CO and the distal environment. This frequency was respectively found around 1915 and 1920 cm^{-1} for the second and third family, indicating a weaker polar interaction in the presence of aryl-guanidines.

Various causes for the changes in $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination - The changes induced by guanidines binding on the electrostatic properties of the heme pocket could originate from several causes. Changes in the positioning of the guanidinium moiety above the heme could be evoked to explain the differences of interaction between the distal ligand and the L-Arg analogues. However, as previously explained [180], the crystallographic analysis of NOS 3D structures in the presence of guanidines and hydroxyguanidines analogues show no differences in their position that could account for a $\nu_{\text{Fe-CO}}$ frequency shift up to 30 cm^{-1} . This report allows us to also exclude direct effects of the guanidines binding on the structural properties of iNOSoxy heme. Indeed, the resonance Raman spectra of Fe^{III} and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ iNOSoxy complexes did not show significant differences in the frequencies of core-size sensitive porphyrin modes, suggesting a very similar heme conformation and heme-protein interactions.

The differences in the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination could arise from a change in the “Push” effect exerted by the proximal ligand [213]. Following (in)direct H-bonding interactions with the L-Arg

analogues, the proximal cysteine ligand could become a poorer competitor for σ -bond formation with the heme iron so that the net effect could be a stronger σ -bond between the iron and CO, and an increased $\nu_{\text{Fe-CO}}$ frequency. Accordingly, the modulation of Fe-Cys bond strength in response to different substrate binding have been recently shown for cytochromes P450 [258], and the differences in $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ coordination between NOHA and Arg binding have been tentatively related to slight variations in the strength of NOS Fe-Cys bond. However our data do not indicate any modification of the $\nu_{\text{Fe-S}}$ frequency in response to substrate substitution suggesting that the Fe-Cys bond strength remains constant and independent on the nature of the bound guanidines. Therefore the changes in $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination observed between the three conformational families do not seem to arise from modifications of the properties of the proximal cysteine ligand.

A source of variation of the properties of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complexes resides in the variations of heme midpoint potentials. The correlation between heme redox potential and the stability and reactivity of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complexes has been clearly established for cytochrome P450_{BM3} [294], a close relative of NOS. Such a relation has also been observed for nNOS in the case of the W409 mutants [295]. Our iNOSoxy measurements did not reveal any significant variation of the heme midpoint potentials upon the binding of our series of L-Arg analogues. The absence of changes in the porphyrin mode frequencies, in the strength of the Fe-S bond, and in the heme midpoint potentials, confirms that the differences observed in the coordination of iNOSoxy $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex do not arise from a direct interaction of L-Arg analogues with the heme or the proximal side of the active site pocket.

Consequently, the changes in $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination are the result of a conformational equilibrium that only depends on the polar interactions between the distal ligand and heme distal environment. We actually observed a direct correlation between $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ coordination and the pKa of the $\text{N}^{\text{H}}(\text{H})$ guanidinium proton of the L-Arg analogues: *conformation 1*, that displays the highest $\nu_{\text{Fe-CO}}$ frequencies (and lowest $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies) was mostly found in the presence of substrates that exhibit the highest pKa values (L-arg and alkyl-guanidines), whereas low-pKa guanidines (such as arylguanidines) seemed to favor *conformations 2* and *3* that are characterized by lower $\nu_{\text{Fe-CO}}$ frequencies (Figure 7). The conformation of iNOSoxy $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex seems therefore to be directly determined by the pKa of the guanidine moiety. This strongly suggests that the exchangeable protons of the guanidine moiety are directly involved in the strength of the positive polar interaction between the heme distal pocket and the bound CO.

Structural model of Interaction between $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ and NOS substrate - The analysis of the crystal structures of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ [131] and the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ [122, 131] complexes of NOS oxygenase domain helps understanding the way the guanidinium moiety interacts with distal ligands. Both structures exhibit a structural water molecule involved in H-bonding interactions with the ligand (CO or NO) and with L-Arg guanidinium moiety (Figure 8). In contrast, the NOHA hydroxyguanidinium forms a short H-

Annexe 3. Role of Arginine Guanidinium Moiety in NO Synthase Mechanism of Oxygen Activation

bond between the protonated N^o-atom and the proximal atom of the ligand, but the active-site water molecules are out of H-bonding range with both the hydroxyguanidinium and the distal atom from the heme-bound ligand [122, 131]. These structural data led us to propose a model of interaction between guanidines and Fe^{II}CO complex (Scheme 3). In the case of alkyl-guanidines (including L-Arg) the pKa value of the guanidinium proton is sufficiently high to promote the structuration of an H-bonding network that includes the ordered water molecule. This will in turn establish a strong positive polarity around the heme-bound ligand and favour the build-up of the *conformation 1*. In contrast, the pKa value of the aryl-guanidines from the second family is not high enough to completely attract the active site water molecule towards the heme. However these analogues will directly interact with the distal ligand in a fashion close to what has been described for NOHA. In that case, the structure adopted by the Fe^{II}CO complex will be dominated by the *conformation 2*. Lastly, the aryl-guanidines, because of the low pKa value of their guanidinium proton will establish a weak interaction with the heme-bound distal ligand, which leaves the conformation of the Fe^{II}CO complex unchanged.

Implications on NOS mechanism of oxygen activation - Our results showed that the pKa of the exchangeable protons of the guanidine moiety directly influences the active-site H-bond network. The structure-function model that we proposed for guanidine/Fe^{II}CO complex interaction is in line with the recent structural data obtained for iNOSoxy and bacterial NOSs Fe^{II}O₂ complexes in the presence of NOHA and L-Arg [214, 296, 297]. Fe^{II}O₂ complex exhibits a weaker O-O bond in the presence of L-Arg ($\nu_{O-O} = 1323-26 \text{ cm}^{-1}$) than in the presence of NOHA ($\nu_{O-O} = 1132-35 \text{ cm}^{-1}$) [214, 296]. Accordingly, L-Arg, alike high-pKa guanidines, would favour the recruitment of an adjacent water molecule in the vicinity of the Fe^{II}O₂ complex. On the other hand, NOHA would behave like low-pKa guanidines, and directly interact with the Fe^{II}O₂ complex. The properties of the substrate guanidinium will therefore determine the structure and role of the H-bond distal network and thus control the fate of the Fe^{II}O₂ complex. This interaction is crucial at two different levels of NO biosynthesis: the coupling of electron transfer and the molecular mechanism of oxygen activation.

Unlike other hemoproteins, NOS Fe^{II}O₂ complex is extremely unstable and NOS catalytic efficiency mostly relies on the kinetic balance between Fe^{II}O₂ autoxidation and Fe^{II}O₂ activation [107, 108]. The coupling of electron transfer to NO production will therefore primarily depend on the stability of the Fe^{II}O₂ complex. We observed for our series of L-Arg analogues a good correlation between pKa values and Fe^{II}O₂ autoxidation rate (Table 6). The active site H-bond network observed in the presence of Alkyl-guanidines and L-Arg, especially the H-bond between the active site water molecule and the distal oxygen of the heme-bound O₂, strongly stabilizes the Fe^{II}O₂ complex. This interaction will decrease Fe^{II}O₂ autoxidation rate, favor an efficient electron transfer coupling and a productive NO synthesis (Table 6). As the pKa of the guanidine decreases (Families 2 and 3), the rate of autoxidation increases by as much as 100 fold, which will induce a partial or complete uncoupling of electron transfer and the result in a drastic decrease of NO production (% vs NOHA, Table 6). This

analysis is validated by the whole series of results we obtained on numerous aryl-guanidines and aryl-hydroxyguanidines analogues of L-Arg that were shown to decrease NO production in favor of NOS uncoupling and ROS release. Our results strongly suggest that the properties of the substrate guanidinium are essential in stabilizing the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex and coupling electron transfer to NO production.

Additionally, our data confirm that the guanidinium proton of the substrate is directly involved in the mechanism of oxygen activation. The current picture of NOS molecular mechanism remains uncertain and conflicting. It has been experimentally established, for both catalytic steps, that the reductase domain would provide the first required electron [58, 104], while the second electron would be transiently supplied by the pterin cofactor (H_4B) to form a Fe^{III} -peroxo complex. At this stage both steps of NOS catalysis are believed to diverge [86]: *i*) the first step ($\text{Arg} \rightarrow \text{NOHA}$) would follow a typical P450-like monooxygenation reaction based on the double protonation of the peroxo complex, the heterolytic cleavage of the peroxo O-O bond leading to the formation of an oxoferryl complex as oxidative intermediate, followed by a typical P450-like “radical rebound” mechanism, *ii*) the second step ($\text{NOHA} \rightarrow \text{NO}$) is supposed to rely on the direct reaction of the peroxo or hydroperoxo species on NOHA guanidinium moiety, followed by the rearrangement of the resulting tetrahedral complex and ultimately the release of citrulline and NO [107]. This model is supported by structural data including crystallographic structures of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ complexes [122, 131], resonance Raman of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complexes [214, 296] and EPR characterisation of reaction intermediates obtained by Cryo-Reduction [120]. Nevertheless, these models have been lately put in question. Silverman and colleagues contested the second protonation of the Fe^{III} -peroxo intermediate for L-Arg oxidation Step and instead proposed a new mechanism based on the attack of a Fe^{III} -hydroperoxo complex on an L-Arg cation [128]. Alternative mechanisms have been also proposed for the second step that range from a direct reaction of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex with the guanidinium moiety [128, 139] to the formation of an oxoferryl complex [137]. It is noteworthy that the key-point that discriminates all proposed mechanisms is the number and the source of transferred protons. This number controls the nature of the reactive intermediate and the specificity of each catalytic step: two proton transfers leads to an oxoferryl complex whereas zero/one proton transfer leaves the peroxo complex as the reactive species.

Our analysis of the role of the guanidinium pKa lead us to propose a model for the mechanism of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ activation (Scheme 4) that should contribute to the clarification of NOS mechanism. This model highlights the crucial role of the distal H-bond network and of the guanidinium proton of the substrate in the mechanism of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ activation. Substrates that harbour high-pKa guanidinium, such as L-Arg, favour the build-up of a distal H-bond network that includes an ordered water molecule that can engage into an H-bond with the distal oxygen of the Fe^{III} -peroxo complex (Scheme 4A). The absence of guanidinium hydroxylation observed for low-pKa guanidines, such as aryl-guanidines, confirms the absolute requirement of this additional water molecule for oxygen activation during

Annexe 3. Role of Arginine Guanidinium Moiety in NO Synthase Mechanism of Oxygen Activation

NOS first catalytic step. Unlike what was proposed by Zhu *et al.* [128], these results strongly support the involvement of two protonation events to achieve L-Arg hydroxylation and suggests a P450-like mechanism for the first catalytic step: the protonation of the hydroperoxo complex will favour the heterolytic cleavage of the peroxo O-O bond and the subsequent formation of an oxoferryl intermediate as the oxidative species.

In the absence of an additional water molecule, low-pKa substrates, such as NOHA, will directly interact with the Fe^{III} -peroxo complex (Scheme 4B), which will in turn stabilize this intermediate peroxo species and favour its direct reaction on NOHA guanidinium moiety. This model is confirmed by our results on aryl-guanidine analogues. Indeed, whereas aryl-guanidines failed to become hydroxylated in the absence of an additional proton source, the corresponding hydroxyguanidines still led to significant production of NO. Unlike what has been suggested by Gauld and coworkers [137], these results confirm that the peroxo complex might be adequate and sufficient to achieve NOHA oxidation.

Conclusions – Our results stress the importance of the surrounding H-bond network in NOS oxidative mechanism and confirm the recent results obtained by Marletta and colleagues with C5-methylated analogues of L-Arg and NOHA [263]. Additionally, this report constitutes the first direct correlation between the pKa of the substrate guanidinium and the specificity of each step of NOS mechanism. We showed for the first time that the pKa of the guanidinium moiety regulate the distal H-bond network, which will in turn determine the chemistry of the oxidative reaction.

The pKa value of the guanidinium has to be sufficiently high to stabilize $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ complex and to promote a P450-like mechanism in the first catalytic step. However, if the pKa value is too high, the reactive species of the second catalytic step could switch from peroxo to oxoferryl, which may prevent the productive oxidation of NOHA. Besides, if the pKa value is too low, (Family 3) the absence of a distal H-bond network would hinder the reactivity of the peroxo species and thus prevent any oxidative chemistry. This suggests that the mechanism of each reaction catalyzed by NOSs can be finely tuned by the properties of the guanidinium moiety. In that context, it would be highly interesting to analyze the influence of guanidinium pKa on NOS molecular mechanism for all isoforms. Indeed, despite similar 3D structures, NOS isoforms exhibit specific interactions between the heme pocket, the distal ligand and the substrate, as reflected by the differential effects of substrate binding on the coordination of CO, NO and O_2 [91, 211, 212, 214, 254, 288, 289, 298]. This suggests that the functions of the guanidinium and of the H-bond network might vary between NOSs, which could partly account for their biochemical and biological specificities.

Experimental Section

Chemicals - H₄B was obtained from Schircks Laboratory (Jona, Switzerland). Chemicals and reagents of the highest grade commercially available were obtained from Aldrich, Fluka, or Janssen. CO gas was purchased from Messer (Messer France SA, France). The hydrochloride salts of 4,4,4-trifluorobutylguanidine (CF₃-(CH₂)₃-Gua) **1**, 4-fluorobutylguanidine (CH₂F-(CH₂)₃-Gua) **2**, n-pentylguanidine (CH₃-(CH₂)₄-Gua) **3**, cyclopropylguanidine (Cyclopropyl-Gua) **4**, 4-methoxyphenylguanidine (CH₃OPh-Gua) **5**, 4-fluorophenylguanidine (FPh-Gua) **6**, 4-chlorophenylguanidine (ClPh-Gua) **7**, 4-trifluoromethylphenylguanidine (CF₃Ph-Gua) **8** and 4-nitrophenylguanidine (NO₂Ph-Gua) **9** have been synthesized following general procedures from commercially available amines. Their physico-chemical characteristics have been described previously [179, 199]. See Figure 1 for structures.

Enzyme Preparation - Mouse iNOS oxygenase domain (iNOSoxy) containing a six-histidine tag at its C-terminus was expressed in *Escherichia coli* BL21 using the PCWori vector and purified as already described with H₄B but without L-Arg [56, 189]. It displayed all the spectroscopic properties of the full-length iNOS and its His6-tag does not modify its reactivity. Its concentration was determined from the visible absorbance at 444 nm of the heme Fe^{II}-CO complex using an extinction coefficient of 76 mM⁻¹.cm⁻¹.

pK_a determinations - The direct measure of the pK_a in water of a weak acid during its titration by sodium hydroxide is a suitable method to identify pK_a up to 11. Identification of the pK_a of the arylguanidines was thus achieved by simultaneous monitoring pH and electric conductivity of a solution of 10 to 20 mM of the guanidinium salt during its titration by 1M NaOH solution. A small amount of HCl (~ 5 mM final) was added to the initial solution in order to more precisely determine the beginning point of the titration of the guanidium. The equivalent points of the titration were determined at the intersections of the conductivity straight lines. The pK_a of the guanidine was identified as the pH value at the semi-equivalent point of the titration (Figure 1). In the case of the alkyl-guanidines, direct measurement could not be achieved. Indeed, their pK_a were expected to be higher than 11 and beyond this value the glass electrode is not reliable anymore due to the alkaline error. We thus used the Hammett Correlation [299] method that has been already used for different types of guanidines [201, 203]. We fitted the values measured for the arylguanidines [204] and the reference value for L-Arg [205] with the Hammett field parameter σ_f , and we applied the obtained correlation to the alkylguanidines. We thus obtained extrapolated values for the pK_a of the alkylguanidines (Figure 1).

Spectroelectrochemistry - -UV-visible mediated spectroelectrochemistry titration of iNOSoxy was performed in a home-made one-compartment bulk electrolysis cell as described elsewhere[300].

Annexe 3. Role of Arginine Guanidinium Moiety in NO Synthase Mechanism of Oxygen Activation

The working electrode was a gold grid, the auxiliary electrode was a Pt wire and the reference electrode was a DRIFREF-2 Ag/AgCl/KCl 3M (World Precision Instruments, $E^0 = 0.210$ V vs NHE, $T = 20^\circ\text{C}$). All potentials are given vs NHE. The cell was maintained under positive argon pressure during the entire experiment and kept at a constant temperature, 20°C . Samples for the redox titration experiments were prepared in 100 mM KCl / 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) with combinations of L-arginine (5 mM) or substituted guanidines 1-9 (20 mM) and H_4B (400 μM). The concentrations of these species were chosen to ensure complete binding to the enzyme. The protein final concentration was 30 μM . Samples were washed by two successive cycles of dilution/centrifugation in this final buffer using a Millipore © membrane filter (30 kDa cutoff) at 4°C . The titration was performed with phenosafranin (5 mM ; $E^{0'} = -0.245$ V vs NHE) as mediator. Electrolysis was carried out under stirring on a home-made potentiostat. Spectral changes of the electrolysis solution were simultaneously monitored on a 8452A diode array spectrophotometer (Hewlett Packard). After each potential drop, the solution was left to equilibrate until two identical UV-visible spectra were recorded. The absorption spectrum at 0 mV was identical to that of ferric iNOSoxy as isolated, exhibiting a Soret band maximum at 395 nm. A -600 mV potential was applied for 20 min to completely reduce the protein and the mediator, and the anaerobicity of the cell was verified by checking the stability of the reduced enzyme and mediator in the absence of any applied potential over a few minutes. Oxidative titration from -500 mV to 0 mV was then performed before the potential was swept negatively to re-reduce the protein. The potentiometric titration was monitored at 406 nm (phenosafranine isosbestic point), 480 nm (NOS isosbestic point) and 650 nm (no contribution of phenosafranine).

The data were analyzed using the following Nernst equation:

$$\text{Fraction (Fe}^{\text{II}}) = \{\exp[(E^{0'} - E_m) * nF/RT] + 1\}^{-1} \quad \text{Equation 1}$$

where n is the number of electrons, E_m is the applied potential, and $E^{0'}$ is the midpoint potential of interest ($F = 96\,500$ C.mol⁻¹, $R = 8.31$ J.mol⁻¹.K⁻¹). The number of electron (n) was found between 0.8 and 1.3 for NOS and between 1.6 and 2.3 for Phenosafranine. The obtained midpoint potential for Phenosafranine matched the expected value (-245 +/- 5 mV) and the difference in the $E^{0'}$ values obtained for iNOSoxy from the 406 and 650 nm traces was below 10 mV. The reported value for $E^{0'}$ corresponds to the average of 406 nm- and 650 nm $E^{0'}$.

In order to test the reliability of our methods we investigated the midpoint potentials of iNOSoxy in the presence of NOS inhibitors such as L-NAME or SEITU, known to dramatically decrease iNOS redox potential. In the presence of such inhibitors, neither the shift of the Soret maximum nor the disappearance of the 650 nm band could be observed (data not shown). This indicated that the heme iron midpoint potentials were out of the range of phenosafranin-mediated redox chemistry (< -305 mV). In the presence of L-NAME, the spectroelectrochemical titration performed with dicarboxylicacid-cobalticinium as mediator (70 μM , $E^{0'} \sim -650$ mV, no absorption in the visible) induced a direct and total shift of the Soret peak towards 412 nm and disappearance of the

band at 650 nm for potentials poised at -500 mV (data not shown). This indicated that the heme iron midpoint potential was greater than -500 mV. Re-oxidation of the solution with addition of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ as new mediator ($E^{0'}$ = 20 mV, no significant absorption in UV-visible) led to full reappearance of the initial optical spectrum, indicating that full and reversible reduction and oxidation of the protein remained possible in the presence of L-NAME. We concluded that the heme midpoint potential in the presence of L-NAME ranges between -500 mV and -305 mV.

Resonance Raman Spectroscopy - Samples for the resonance Raman (RR) experiments were prepared in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) with different combinations of L-arginine (5 mM) or substituted guanidines **1-9** (20 mM), in the presence of H_4B (400 μM) and DTT (3 mM). Samples were conditioned by two successive cycles of dilution/centrifugation in the final buffer using a Millipore © membrane filter (30 kDa cutoff) at 4°C. The binding of the compounds was confirmed by UV-visible absorption spectroscopy via the spin state changes of the Soret absorption band of the ferric heme from 417 nm (low spin, LS) to 395 nm (high spin, HS). Enzyme concentrations for RR studies ranged between 100 and 200 μM . Forty microliters of the anaerobic Fe^{III} iNOSoxy were prepared directly in quartz tubes sealed with airtight rubber septa by alternating 20 cycles of vacuum and argon refilling. Ferrous samples were obtained by reduction of Fe^{III} iNOSoxy with addition of a small volume (~10 μL) of sodium dithionite solution (final concentration between 5 and 10 mM) directly into the quartz tube using a gastight syringe (Hamilton ©). Ferrous heme-CO samples were obtained by flushing CO inside the quartz tube for 10 min to ensure complete CO saturation of the solution.

The samples were placed into a gastight quartz spinning cell to avoid local heating and to prevent photo-dissociation and degradation of the NOS samples. Excitation at 363.8 nm and 441.6 nm were obtained with an argon ion laser (Coherent Innova 90 ©) and with a He-Cd laser (Kimmon ©) respectively. Resonance Raman spectra were recorded at room temperature using a modified single-stage spectrometer (Jobin-Yvon T64000) equipped with a liquid N_2 -cooled back-thinned CCD detector. Stray scattered light was rejected using a holographic notch filter (Kaiser Optical Systems). Spectra were recorded by the co-addition of 40-240 individual spectra with an exposure time of 10 to 30 seconds each (total accumulation time between 20 and 60 min for each spectral window). Three to six successive sets of such spectra were then averaged. Laser power on the sample was kept below 5 mW to avoid photodissociation and photooxidation. To accurately determine small frequency differences, the monochromator was calibrated using the excitation wavelength, and samples to be directly compared were recorded the same day with the same optical geometry. Spectral precision and accuracy were estimated to be $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$. Baseline corrections were performed using GRAMS 32 software (Galactic Industries ©). The iNOSoxy RR bands were assigned following previous publications on iNOS and other NOSs [51, 91, 211-213, 290].

ATR-FTIR Spectroscopy - iNOSoxy Fe^{II}CO complexes were prepared as described for the RR experiments, except that protein samples were concentrated up to around 600 μ M. Oxygen removal was achieved in a sealed cuvette by 20 cycles of alternate vacuum and argon refilling. Small volumes of sodium dithionite solution were added to reach a final dithionite concentration around 10 mM. Fe^{II}CO complexes were then obtained by 5 min of CO flushing inside the cuvette. Room temperature FTIR spectra were recorded using Bruker IFS 66/S Fourier transform infrared spectrometer coupled to a single reflection micro ATR unit from Pike technologies. Ten microliters of an iNOSoxy Fe^{II}CO sample was placed on the ZnSe crystal surface of the ATR unit. The device was sealed with a gastight in-house-built chamber and maintained under a flush of CO for 15 min until the sample was sufficiently dry. Twenty to thirty co-added interferograms were averaged for each spectrum. In some cases, a water vapor spectrum was used for background correction. Baseline correction was achieved using the GRAMS 32 software package. Each curve corresponded to the average of 2 to 6 individual experiments.

Data Analysis - Identification of spectral components in unresolved Raman and/or FTIR bands was achieved by the combination of Fourier self-deconvolution and second-order derivative analyses of the averaged spectra: valid peaks were identified when both methods resulted in the same frequency values. In the ν_3 , ν_2 , ν_{vinyl} , and ν_{12} regions, overlapping peaks were resolved by fitting (Origin 6.0, OriginLab Corporation), the spectral region to Gaussian functions for which frequencies were determined by the above Fourier self-deconvolution and second derivative analyses (GRAMS 32). The determination of the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ frequencies by RR spectroscopy was made difficult by the existence of several Fe^{II}-CO species and contributions of other porphyrin modes in the 460-570 cm^{-1} region. Fourier deconvolution and second-order derivative analyses were used to determine the frequencies of spectral components in each complex Fe-CO bands. Using these frequencies a band-fitting routine was used to construct the band components, assuming *ca.* 10 cm^{-1} FWHM bandwidth. Using this method we found recurring band components centered around 465, 485, 500 and 510 cm^{-1} for the RR bands we analyzed. The 1900-2000 cm^{-1} spectral region is uncongested and does not contain contributions from the heme porphyrin, protein amide, or C-H or N-H stretching modes[221]. Thus, the determination of ν_{CO} mode frequencies in this spectral region is much easier and gives straightforward information about the number and nature of heme pocket conformations. The inverse correlation that exists between the ν_{CO} and $\nu_{\text{Fe-CO}}$ mode frequencies was used to refine the analysis of the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ modes in the RR spectra [260].

Figures and Schemes

Figure 1: Structure and pKas of all studied L-Arg analogues.

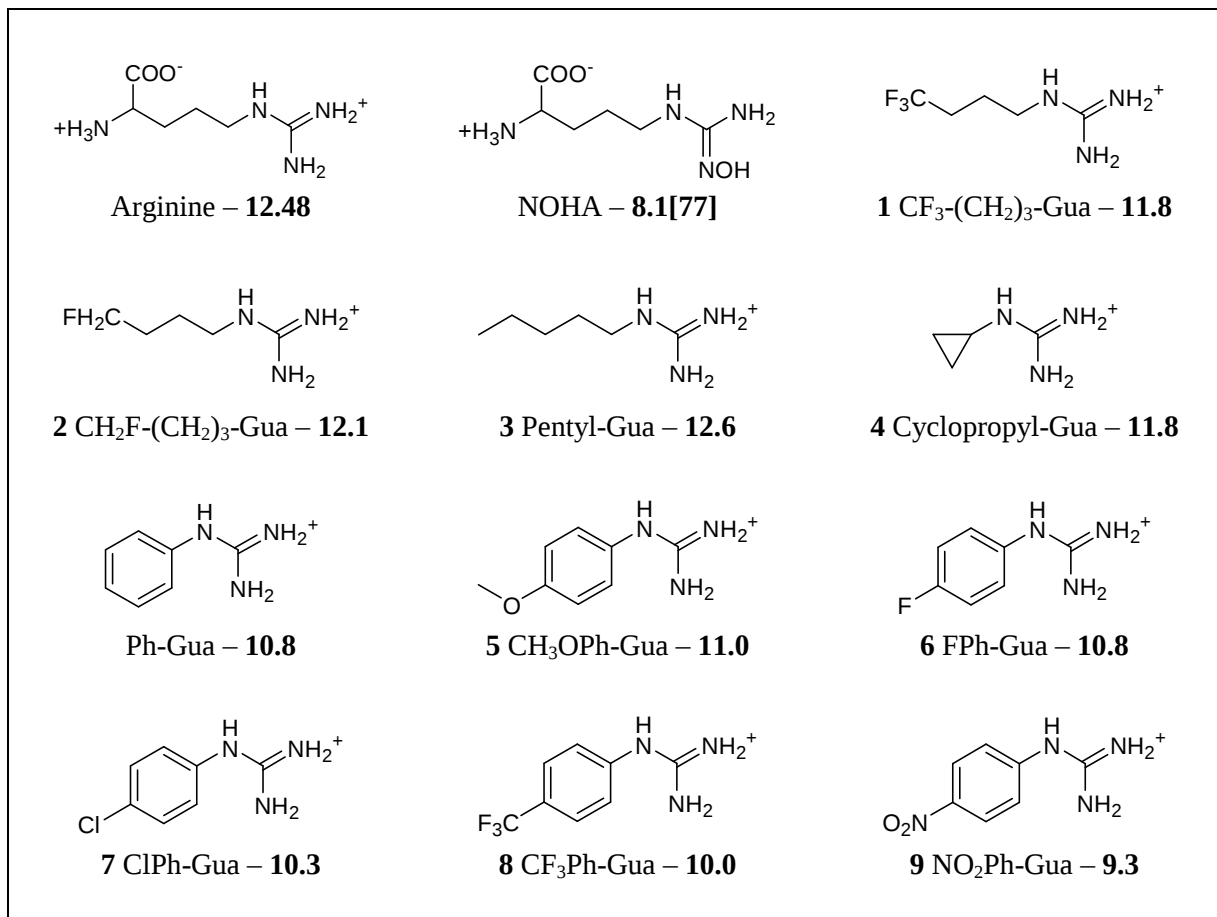


Figure 2: Determination of the heme midpoint potentials of Fe^{III}/Fe^{II} iNOSoxy in the presence of alkyl- and aryl-guanidines. Oxidative titration of iNOSoxy in the presence of the alkyl-guanidine CF₃-(CH₂)₃-Gua **1** (A) or the aryl-guanidine FPh-Gua **6** (C) with phenosafranin as redox mediator. Protocol is described under the Experimental Section. The titration of iNOSoxy was monitored at 406 nm (isobestic point of phenosafranin) and 650 nm (no absorption of phenosafranin). The evolution of the mediator was checked at 480 nm (isobestic point of iNOSoxy). The proportions of enzyme oxidized versus the applied potential were monitored at 406 nm (■) and 650 nm (◇) in the presence of CF₃-(CH₂)₃-Gua **1** (B) or FPh-Gua **6** (D). The solid lines display the theoretical one-electron Nernst plots obtained by simulating each titration.

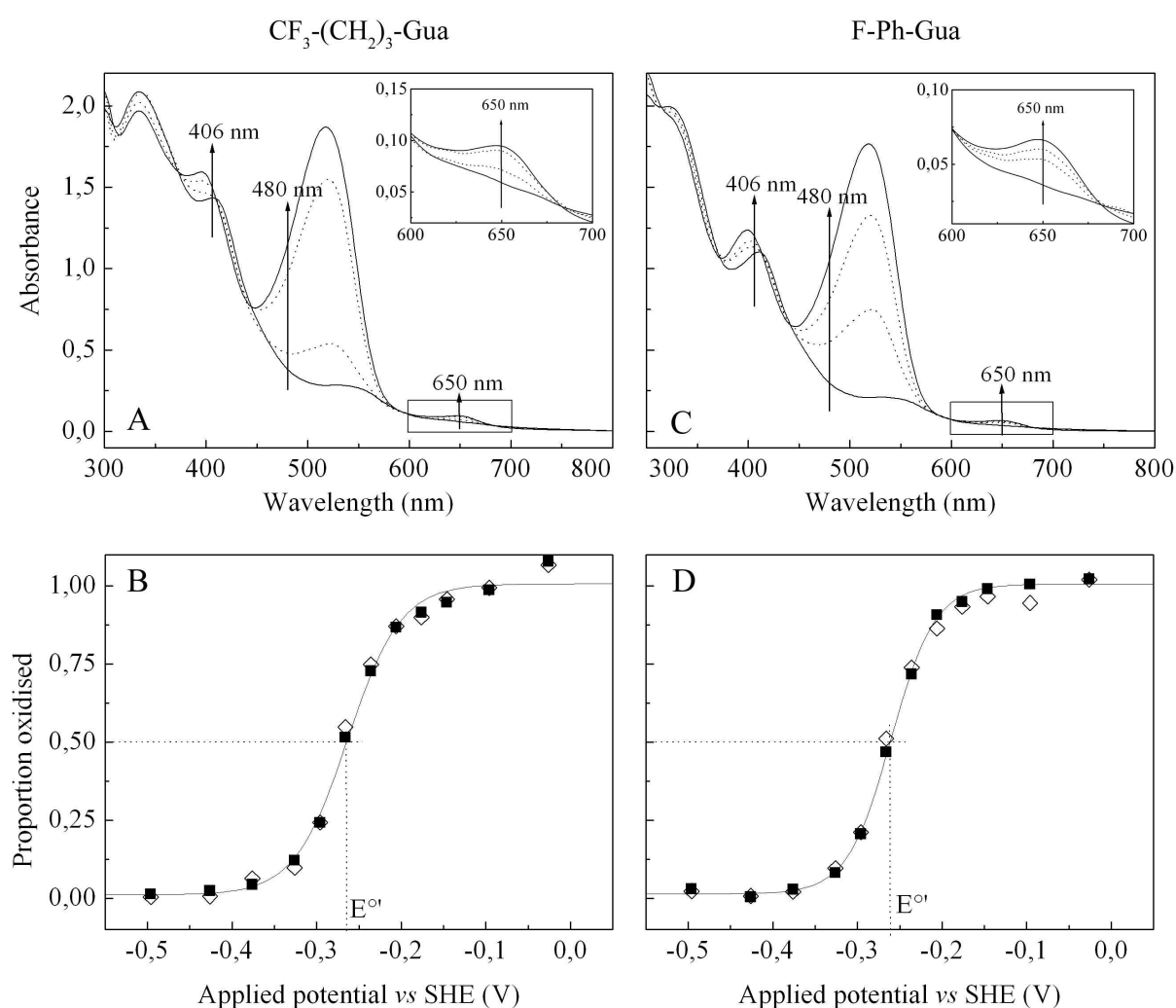


Figure 3: Effect of L-Arg analogues binding on Fe^{III} iNOSoxy resonance Raman spectra. Panels A and B display the low- and high-frequency regions of RR spectra, respectively. Excitation wavelength was 363.8 nm (protocol described under Experimental Section). In panel A, curves were fitted to Gaussian functions. Experiments were achieved in the presence of H₄B, except for the (-/-) experiment that was achieved in the absence of both substrate and H₄B.

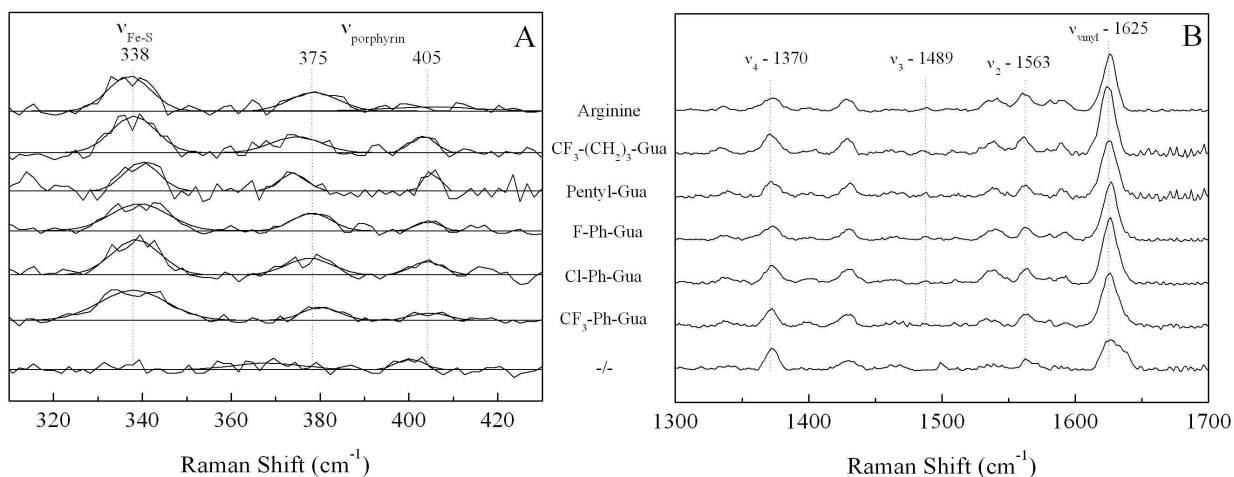


Figure 4: Effect of L-Arg analogues binding on iNOSoxy Fe^{II}CO resonance Raman spectra. Panels A and B display the low- and high-frequency regions of resonance Raman spectra, respectively. Excitation wavelength was 441.6 nm (protocol described under Experimental Section). Experiments were achieved in the presence of H₄B, except for the (-/-) experiment that was achieved in the absence of both substrate and H₄B. Stars denote peaks associated with photo-dissociation.

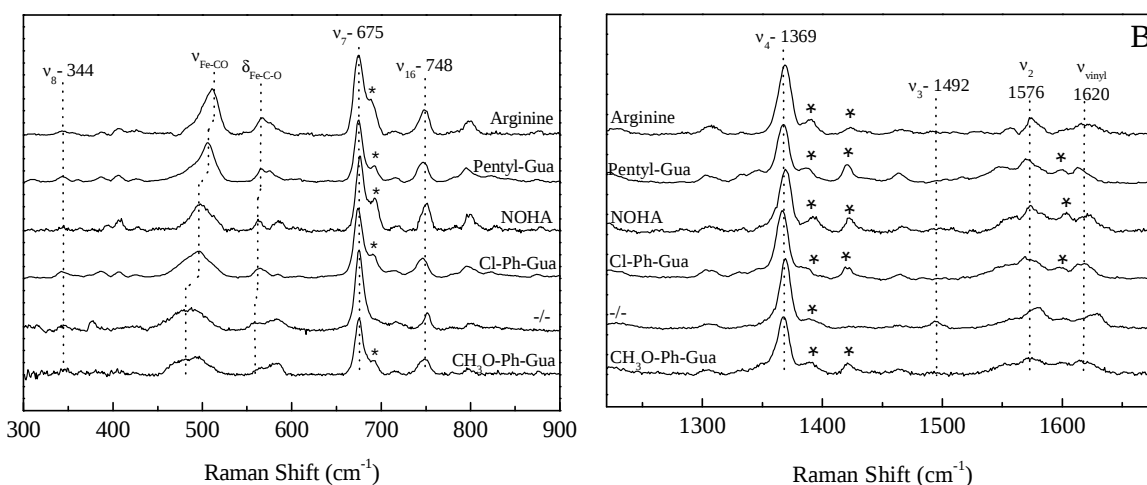


Figure 5: Analysis of the $\nu_{\text{Fe-CO}}$ modes of iNOSoxy $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complex in the presence of L-Arg analogues. The 425-550 cm^{-1} spectral regions were obtained from the resonance Raman spectra displayed in Figure 3A. All curves were fitted to multi-Gaussian function as described under the Experimental Section.

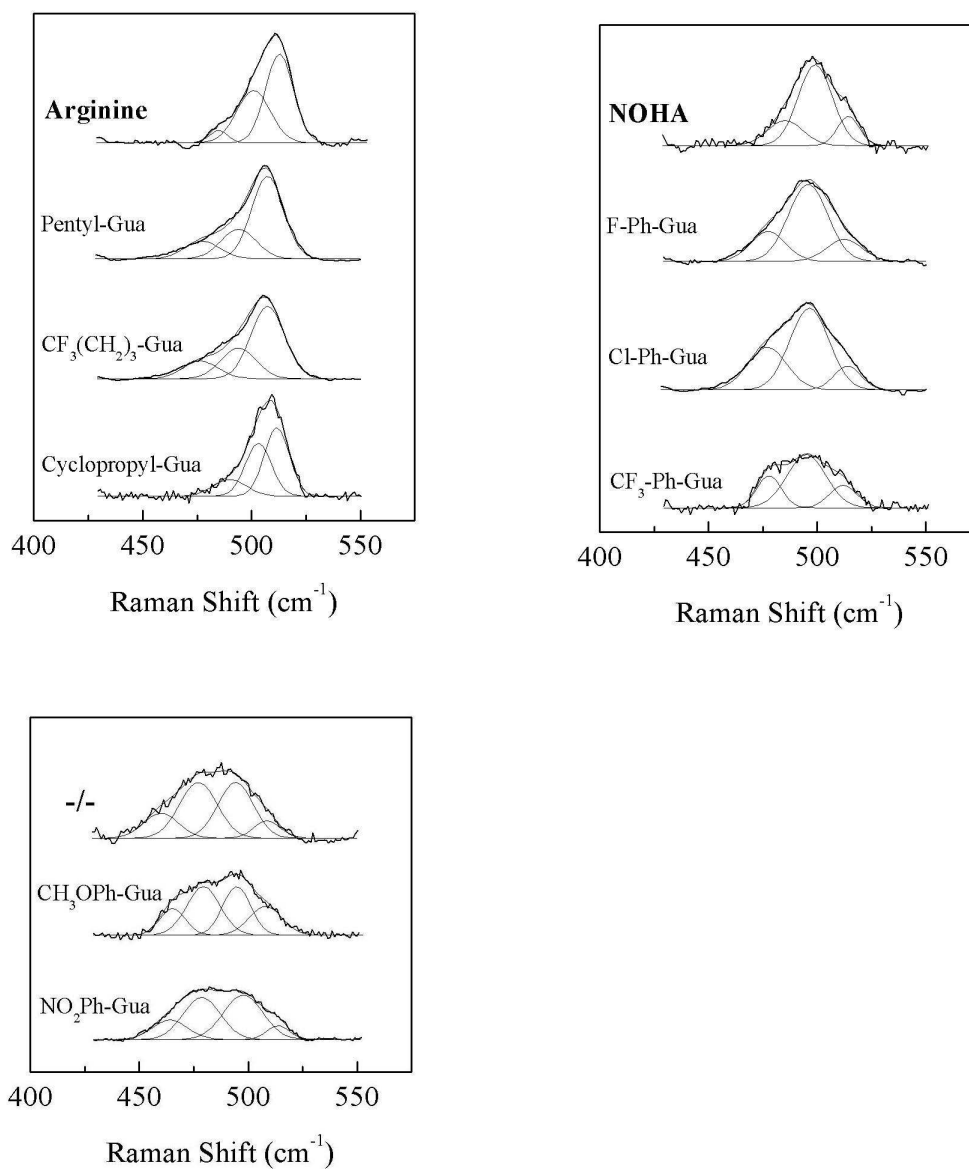


Figure 6: Effects of L-Arg analogues binding on the $\nu_{\text{C-O}}$ stretching frequencies of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}$ complexes of iNOSoxy as measured by ATR-FTIR. All the experiments were achieved in the presence of H_4B (Protocol described under Experimental Section). The $1880\text{--}1960\text{ cm}^{-1}$ FTIR curves were fitted to multi-Gaussian functions.

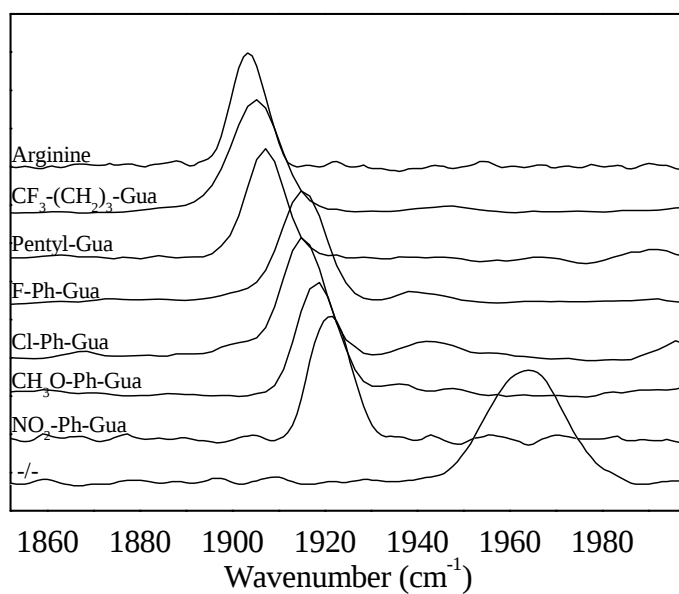


Figure 7: Correlation between the $\nu_{\text{C-O}}$ (upper figure) and $\nu_{\text{Fe-CO}}$ (lower figure) stretching frequencies of the Fe^{II} -CO complexes of iNOSoxy and the pKa of the guanidines bound at the active site.

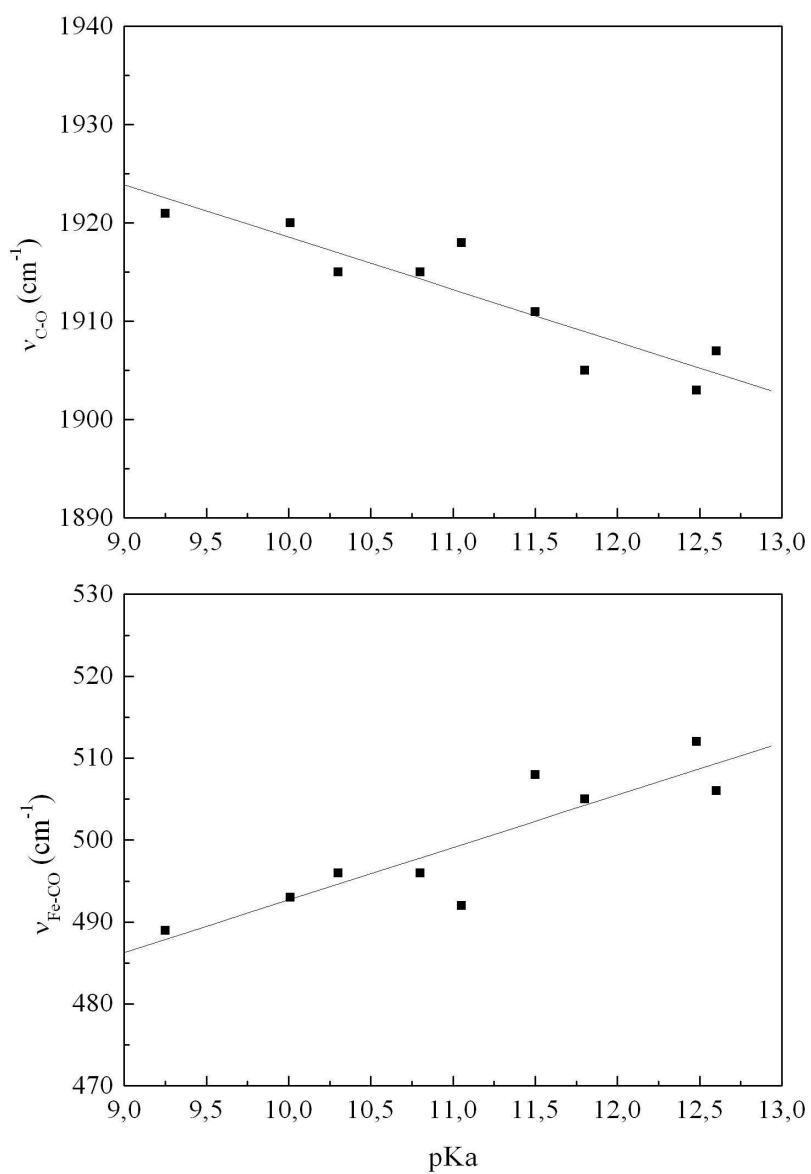
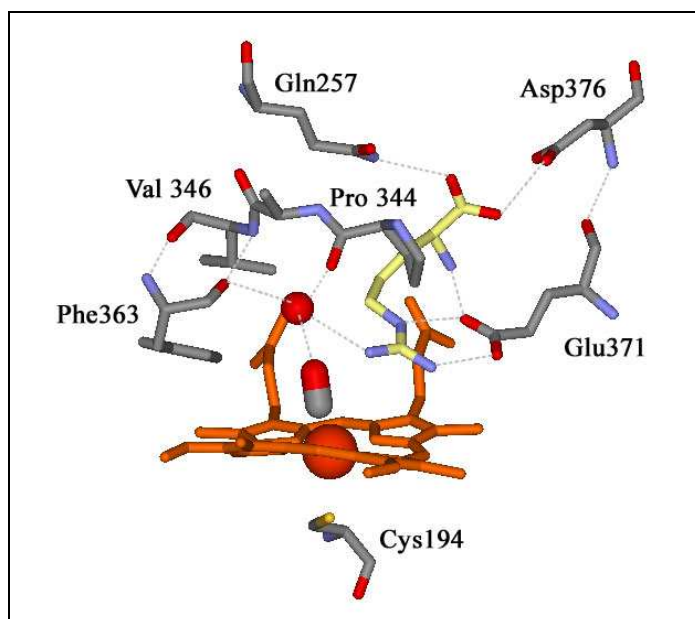
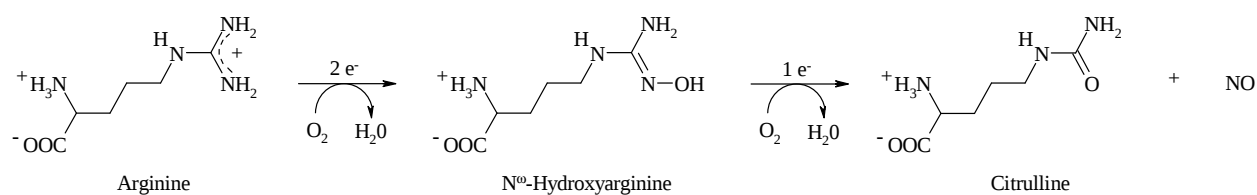


Figure 8: Crystallographic structure of the active site of iNOSoxy highlighting the H-bonds network in the iNOS Fe^{II}-CO complex. Crystallographic structure of the active site of NOSoxy highlighting the H-bonds network in the NOS Fe^{II}-CO complex (PDB: 2G6M [131], numbering iNOSoxy). This structure was obtained in the presence of L-Arg (yellow) and H₄B (not shown). Important H-bonds are shown with dashed grey lines. A conserved water molecule (in red) plays a key role in the H-bond network between the guanidinium of L-Arg and the heme-bound CO.

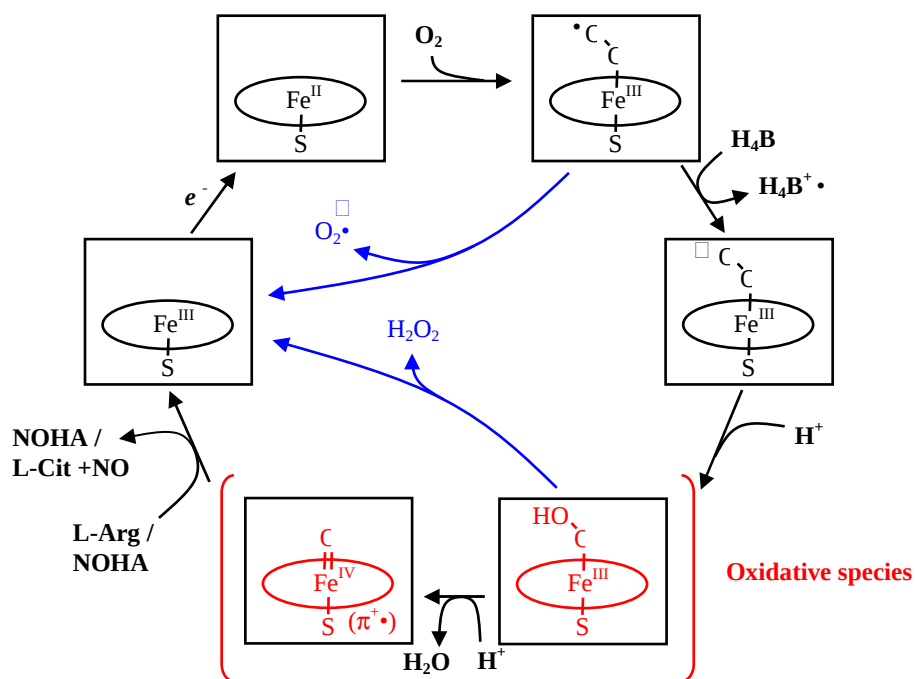


Annexe 3. Role of Arginine Guanidinium Moiety in NO Synthase Mechanism of Oxygen Activation

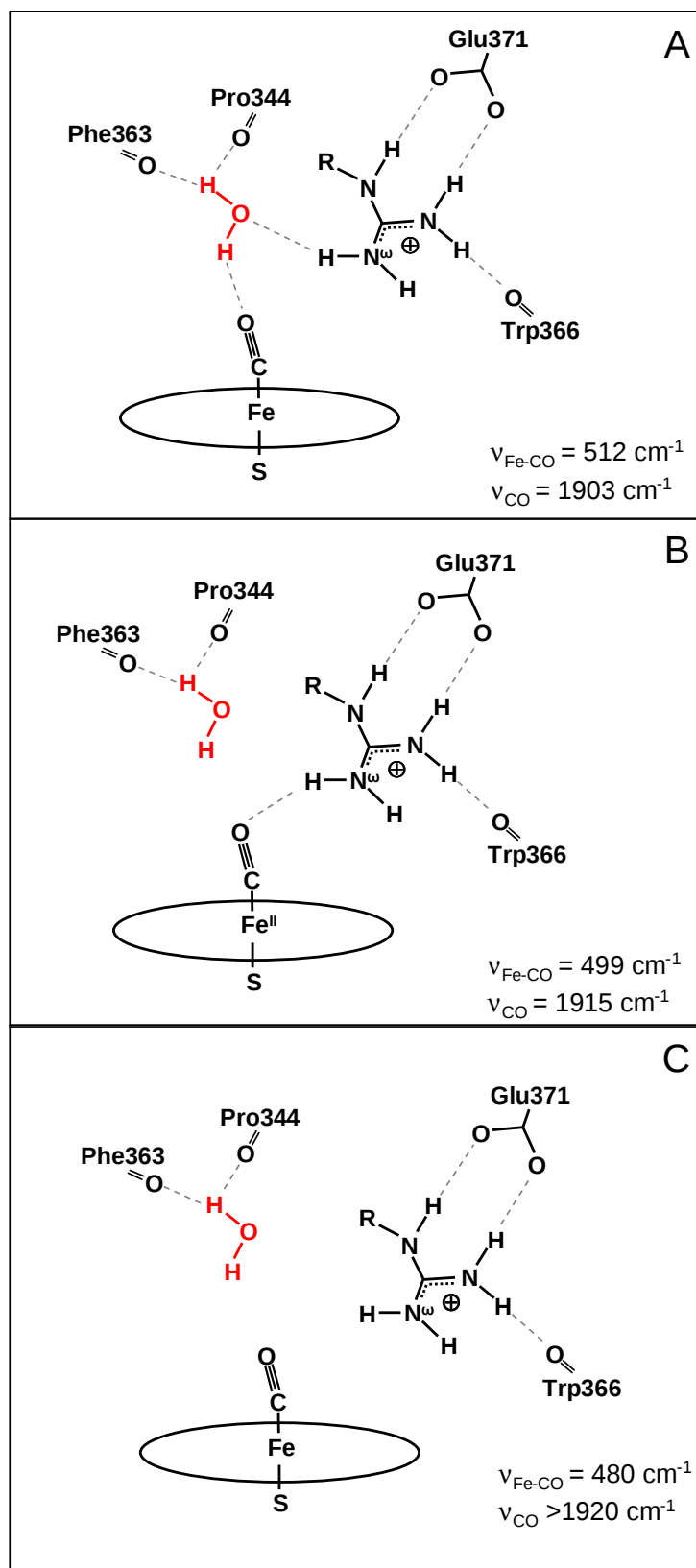
Scheme 1: Oxidation of L-Arg to NO and citrulline catalysed by NOS.



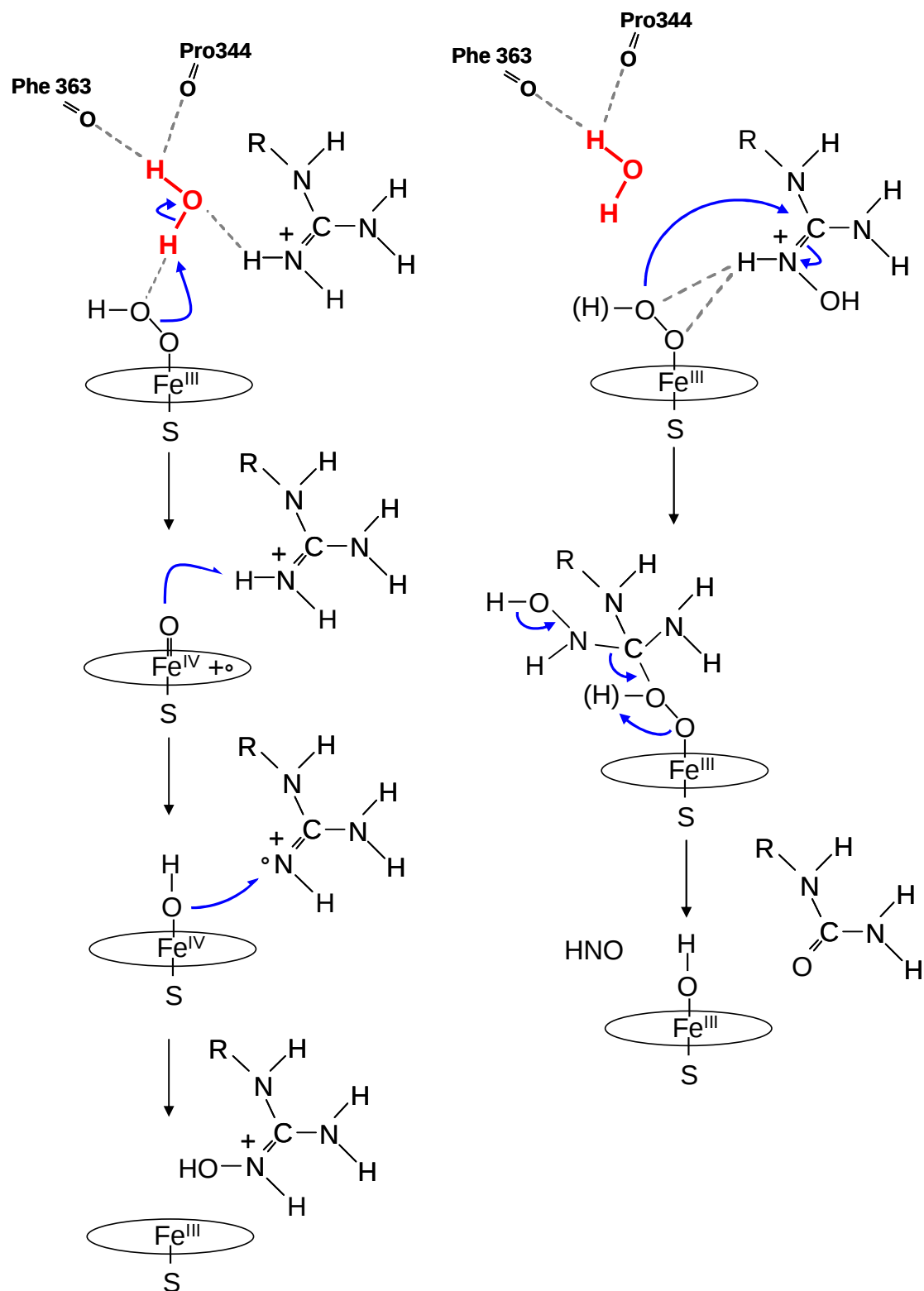
Scheme 2: Proposed mechanism for the first step of the oxidation of L-Arg by NOS and formation of reactive species.



Scheme 3: Schematic view of the active-site H-bond networks in the iNOS Fe^{II}CO complexes in the presence of L-Arg analogue from the Family 1 (A), from the Family 2 (B), or from the Family 3 (C). In this last case, the water molecule can also be absent.



Scheme 4: Hypothetical molecular mechanism for both steps of NOS catalysis.



Tables

Table 1: pK_a values of L-arg and various guanidines measured in water at 25°C. Detailed Protocol described under Experimental Section. (a) : this work

Compound	field parameter σ_I	pK _a measured	pK _a estimated	Ref
L-Arg	0.03	12.48		[205]
Pentyl-Gua 3	0.01	-	12,6	(a)
CH ₂ F-(CH ₂) ₃ -Gua 2	0.05	-	12,1	(a)
CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua 1	0.07	-	11,8	(a)
Cyclopropyl-Gua 4	0.07	-	11,8	(a)
Ph-Gua	0.12	10.8		(a)
Ph-Gua		10.77		[201]
CH ₃ OPh-Gua 5	0.13	11.0		(a)
FPh-Gua 6	0.17	10.8		(a)
ClPh-Gua 7	0.18	10.3		(a)
CF ₃ Ph-Gua 8	0.19	10.0		(a)
NO ₂ Ph-Gua 9	0.26	9.3		(a)
NO ₂ Ph-Gua 9		9.13		[202]

Table 2: Heme midpoint potentials of iNOSox in the presence of various guanidines.

All experiments were achieved in the presence of H₄B (Protocol described under Experimental Section). (a) : this work.

Compound	λ_{Soret} (nm)	E ⁰ , (mV) vs NHE	Ref
L-Arg	397	- 270 ± 5	(a)
L-Arg	396	- 263	[111]
CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua 1	395	- 265 ± 5	(a)
F-(CH ₂) ₄ -Gua 2	397	- 267 ± 5	(a)
Cyclopropyl-Gua 4	398	- 269 ± 5	(a)
CH ₃ OPh-Gua 5	399	- 269 ± 5	(a)
FPh-Gua 6	398	- 262 ± 5	(a)
SEITU	396	< - 305	(a)
SEITU	398	- 322	[111]
L-NAME	400	- 500 < E ^o < - 305	(a)
L-NAME	400	< - 460	[111]

Table 3: Porphyrin and Fe-S vibration modes of ferric iNOSoxy in the presence of various L-Arg guanidines analogues. NOS experiments were achieved in the presence of H₄B, except for the (-/-) experiment which was achieved in the absence of both substrate and H₄B. Data were obtained with a laser excitation at 363.8 nm (Protocol described under Experimental Section). Frequencies are reported in cm⁻¹. (a) : this work.

Protein	Substrate analog	$\nu_{\text{Fe-S}}$	γ_{12}	ν_7	ν_{16}	ν_4	ν_3	ν_2	ν_{vinyl}	Ref
iNOSoxy	L-Arg	337	498	676	754					[288]
	L-Arg	337	495	675	753	1372	1489	1562	1625	(a)
	CF ₃ -(CH ₂) ₃ -Gua 1	337	498	674	753	1371	1486	1562	1624	(a)
	Pentyl-Gua 3	339	499	675	753	1372	1487	1562	1625	(a)
	F-Ph-Gua 6	339	498	675	754	1372	1488	1562	1627	(a)
	Cl-Ph-Gua 7	339	498	675	751	1371	1486	1560	1625	(a)
	CF ₃ -Ph-Gua 8	338	495	675	752	1372	1487	1563	1626	(a)
	-/-	nd	496	676	751	1373	-	1562	1626	(a)
eNOS	L-Arg	338		678		1370	1489	1563	1625	[215]
bsNOS	L-Arg	342	498	676	754					[288]
P450	Camphor	351		677	756	1368	1488	1570	1623	[253]

Table 4: Porphyrin vibration modes for iNOSoxy Fe^{II}-CO complexes in the presence of L-Arg analogues. Detailed protocol is described under the Experimental Section. All experiments were achieved in the presence of H₄B, except for the (-/-) experiment that is achieved in the absence of both substrate and H₄B. Data were obtained with a laser excitation at 441.6 nm. Frequencies are given in cm⁻¹. (a) : this work.

Protein	Substrate analog	ν_8	ν_7	ν_{16}	ν_4	ν_3	ν_2	ν_{10}	ν_{vinyl}	Ref
iNOSoxy	L-Arg	344	674	748	1369	1492	1576	1601	1620	(a)
	3	340	678	750	1367	1463	1569	1600	nd	[180]
	1	340	678	750	1367	1463	1569	1600	nd	[180]
	4	nd	675	748	1367	1492	1573	1597	1617	(a)
	NOHA	344	676	750	1369	1491	1575	1603	1622	(a)
	6	340	678	750	1367	1463	1569	1600	nd	[180]
	7	340	678	750	1367	1463	1569	1600	nd	[180]
	8	343	676	750	1368	1492	1575	1600	1622	(a)
	-/-	345	675	751	1369	1495	1579	1601	1628	(a)
	5	346	675	748	1367	nd	1575	1598	1617	(a)
	9	345	676	749	1368	nd	1576	1599	1619	(a)
nNOS	L-Arg	345	676	752	1369	1493	1572	1602	1618	[216]
	NOHA	345	676	751	1369	1493	1572	1602	1618	[216]
	-/-	343	676	751	1369	1493	1572	1602	1618	[216]
saNOS	L-Arg	344	676	751	1370	1495	1573	1603	1622	[91]
	-/-	344	676	751	1370	1489	1573	1600	1626	[91]
P450	Camphor	352	676	749	1371	1497	1588	nd	nd	[253]
	-	348	677	754	1372	1498	1583	nd	1626	[253]

Table 5: Analysis of $\nu_{\text{Fe-CO}}$, $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ and $\nu_{\text{Fe-CO}}$ vibration modes of iNOSoxy Fe^{II}CO complex based on a resonance Raman and ATR-FTIR spectra of Figure 5 and 6. Multi-Gaussian simulation of RR and FTIR spectra was achieved as described under Experimental Section. Frequencies are expressed in cm⁻¹. (a) this work. Bold values correspond to the predominant conformation.

Protein	Ligand	$\nu_{\text{Fe-CO}}$			$\delta_{\text{Fe-C-O}}$	$\nu_{\text{C-O}}$	Ref	
		Spectral deconvolution (width, % intensity)						
iNOS _{oxy}	L-Arg	485 (8, 5)	501 (15, 39)	513 (13, 56)	566	1903	(a)	
	3	480 (18, 17)	494 (14, 22)	507 (14, 61)	567	1907	(a)	
	1	478 (18, 20)	497 (16, 35)	509 (13, 45)	566	1905	(a)	
	4	490 (15, 14)	503 (12, 35)	511 (12, 50)	565	1911	(a)	
	NOHA	485 (17, 20)	499 (16, 66)	514 (10, 14)	563		(a)	
	6	483 (22, 38)	497 (16, 43)	511 (17, 19)	563	1915	(a)	
	7	479 (17, 36)	497 (15, 50)	513 (12, 15)	565	1915	(a)	
	8	479 (12, 27)	495 (17, 50)	511 (14, 24)	561		(a)	
	-/-	460 (16, 13)	475 (16, 34)	492 (17, 40)	507 (14, 13)	559	1949 - 1963	(a)
	+/-							[180]
	5	465 (12, 15)	479 (15, 33)	495 (14, 36)	510 (14, 15)	562	1918	(a)
	9	465 (17, 20)	480 (17, 39)	499 (17, 40)	514 (10, 7)	563	1921	(a)
nNOS _{oxy}	L-Arg	489 (26, 52)	502 (12, 28)	514 (12, 20)	565	1929	[214, 216]	
	NOHA	490 (26, 56)	501 (12, 30)	514 (12, 14)	563	1928	[214, 216]	
	-/-	489 (26, 80)	501 (12, 14)	514 (12, 6)	562	1936	[214, 216]	
saNOS	L-Arg				567	1917	[91]	
	-/-				560	1930 - 1949	[91]	
P450	Camphor				560		[253]	
	-				558		[253]	

Table 6: Relationship between the pKa of the guanidine, the autoxidation process, the uncoupling and the iNOSoxy-catalyzed production of NO from these guanidines and the corresponding N-hydroxyguanidines.

(a) : production of NO by oxidation of the guanidines [180]

(b) same as a but using the corresponding hydroxyguanidines as substrates; values are relative to the NO production observed in the presence of NOHA as substrate [178]

Guanidine	pKa	Autoxidation rate (s ⁻¹)	Production of NO (% L-Arg) ^(a)	NO / NADPH	Production of NO (% NOHA) ^(b)
L-Arg	12.48	0.2 ± 0.04	100	1.09	100
3	12.6	1.9 ± 0.4	11 ± 2	0.08	32 ± 5
1	11.8	1.6 ± 0.5	35 ± 2	0.18	95 ± 8
4	11.8	-	< 0.5	0	10 ± 3
6	10.8	12 ± 3	< 0.5	0	41 ± 6
7	10.3	7.3 ± 1.1	< 0.5	0	13 ± 3
8	10.0	-	< 0.5	0	0.5 ± 0.2
-/-	-	-	< 0.5	0	-
5	11.0	19 ± 5	< 0.5	0	6 ± 2
9	9.3	-	< 0.5	0	2 ± 1

Références bibliographiques

- [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] Wolak M. and van Eldik R. (2002) To be or not to be NO in coordination chemistry? A mechanistic approach. *Coordination Chemistry Reviews* 230(1-2), 263-282.
- [3] Moncada S. and Higgs E. A. (1995) Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies Related to Nitric-Oxide. *Faseb Journal* 9(13), 1319-1330.
- [4] Fontecave M. and Pierre J. L. (1994) The Basic Chemistry of Nitric-Oxide and Its Possible Biological Reactions. *Bulletin De La Societe Chimique De France* 131(6), 620-631.
- [5] 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.
- [6] Lancaster J. R., Jr. (2006) Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chemical research in toxicology* 19(9), 1160-1174.
- [7] Wink D. A. and Mitchell J. B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free radical biology & medicine* 25(4-5), 434-456.
- [8] Cassina A. M., Hodara R., Souza J. M., Thomson L., Castro L., Ischiropoulos H., Freeman B. A. and Radi R. (2000) Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *Journal of Biological Chemistry* 275(28), 21409-21415.
- [9] Radi R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(12), 4003-4008.
- [10] Ischiropoulos H. and Gow A. (2005) Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. *Toxicology* 208(2), 299-303.
- [11] Pacher P., Beckman J. S. and Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 87(1), 315-424.
- [12] Fukuto J. M., Bartberger M. D., Dutton A. S., Paolocci N., Wink D. A. and Houk K. N. (2005) The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): The neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide. *Chemical research in toxicology* 18(5), 790-801.
- [13] Miranda K. M., Nims R. W., Thomas D. D., Espey M. G., Citrin D., Bartberger M. D., Paolocci N., Fukuto J. M., Feelisch M. and Wink D. A. (2003) Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins - A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. *Journal of Inorganic Biochemistry* 93(1-2), 52-60.
- [14] Stamler J. S., Singel D. J. and Loscalzo J. (1992) Biochemistry of Nitric-Oxide and Its Redox-Activated Forms. *Science* 258(5090), 1898-1902.
- [15] MacMicking J., Xie Q. W. and Nathan C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15, 323-350.
- [16] Miersch S. and Mutus B. (2005) Protein S-nitrosation: Biochemistry and characterization of protein thiol-NO interactions as cellular signals. *Clinical Biochemistry* 38(9), 777-791.
- [17] Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A. and Freeman B. A. (1990) Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial Injury from Nitric-Oxide and Superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(4), 1620-1624.
- [18] Gryglewski R. J., Palmer R. M. and Moncada S. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320(6061), 454-456.

- [19] Pryor W. A. and Squadrito G. L. (1995) The Chemistry of Peroxynitrite - a Product from the Reaction of Nitric-Oxide with Superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 12(5), L699-L722.
- [20] Radi R., Peluffo G., Alvarez M. N., Naviliat M. and Cayota A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* 30(5), 463-488.
- [21] Szabo C., Ischiropoulos H. and Radi R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(8), 662-680.
- [22] Ignarro L. J. (1999) Nitric oxide: A unique endogenous signaling molecule in vascular biology (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* 38(13-14), 1882-1892.
- [23] 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.
- [24] Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E. and Chaudhuri G. (1987) Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric-Oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(24), 9265-9269.
- [25] Ignarro L. J., Wood K. S. and Wolin M. S. (1982) Activation of Purified Soluble Guanylate-Cyclase by Protoporphyrin-IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 79(9), 2870-2873.
- [26] Palmer R. M. J., Ferrige A. G. and Moncada S. (1987) Nitric-Oxide Release Accounts for the Biological-Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* 327(6122), 524-526.
- [27] Zhao Y., Brandish P. E., Ballou D. P. and Marletta M. A. (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(26), 14753-14758.
- [28] Radomski M. W., Palmer R. M. J. and Moncada S. (1987) The Role of Nitric-Oxide and Cgmp in Platelet-Adhesion to Vascular Endothelium. *Biochemical and biophysical research communications* 148(3), 1482-1489.
- [29] Radomski M. W., Palmer R. M. J. and Moncada S. (1987) The Anti-Aggregating Properties of Vascular Endothelium - Interactions between Prostacyclin and Nitric-Oxide. *British journal of pharmacology* 92(3), 639-646.
- [30] Duncan A. J. and Heales S. J. (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol. Aspects Med.* 26(1-2), 67-96.
- [31] Holscher C. (1997) Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 20(7), 298-303.
- [32] Mungrue I. N. and Bredt D. S. (2004) nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *Journal of Cell Science* 117(13), 2627-2629.
- [33] Vallance P. (2003) Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 17(1), 1-10.
- [34] Lowenstein C. J. and Padalko E. (2004) iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of Cell Science* 117(14), 2865-2867.
- [35] Borisov V. B., Forte E., Sarti P., Brunori M., Konstantinov A. A. and Giuffre A. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the Cu-B-lacking cytochrome bd terminal oxidase. *Febs Letters* 580(20), 4823-4826.
- [36] Brunori M., Forte E., Arese M., Mastronicola D., Giuffre A. and Sarti P. (2006) Nitric oxide and the respiratory enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1757(9-10), 1144-1154.
- [37] Fang F. C. (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 99(12), 2818-2825.

- [38] Taylor B. S. and Geller D. A. (2000) Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* 13(6), 413-424.
- [39] Vila-Del Sol V., Diaz-Munoz M. D. and Fresno M. (2007) Requirement of tumor necrosis factor α and nuclear factor- κ B in the induction by IFN- γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 81(1), 272-283.
- [40] Saura M., Zaragoza C., McMillan A., Quick R. A., Hohenadl C., Lowenstein J. M. and Lowenstein C. J. (1999) An antiviral mechanism of nitric oxide: Inhibition of a viral protease. *Immunity* 10(1), 21-28.
- [41] Hibbs J. B., Taintor R. R. and Vavrin Z. (1987) Macrophage Cytotoxicity - Role for L-Arginine Deiminase and Imino-Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science* 235(4787), 473-476.
- [42] Stuehr D. J., Kwon N. S., Nathan C. F., Griffith O. W., Feldman P. L. and Wiseman J. (1991) N-Omega-Hydroxy-L-Arginine Is an Intermediate in the Biosynthesis of Nitric-Oxide from L-Arginine. *Journal of Biological Chemistry* 266(10), 6259-6263.
- [43] Bredt D. S., Hwang P. M. and Snyder S. H. (1990) Localization of Nitric-Oxide Synthase Indicating a Neural Role for Nitric-Oxide. *Nature* 347(6295), 768-770.
- [44] Bredt D. S. and Snyder S. H. (1990) Isolation of Nitric-Oxide Synthetase, a Calmodulin-Requiring Enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(2), 682-685.
- [45] Stuehr D. J., Cho H. J., Kwon N. S., Weise M. F. and Nathan C. F. (1991) Purification and Characterization of the Cytokine-Induced Macrophage Nitric-Oxide Synthase - an FAD-Containing and Fmn-Containing Flavoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(17), 7773-7777.
- [46] Marsden P. A., Schappert K. T., Chen H. S., Flowers M., Sundell C. L., Wilcox J. N., Lamas S. and Michel T. (1992) Molecular-Cloning and Characterization of Human Endothelial Nitric-Oxide Synthase. *Febs Letters* 307(3), 287-293.
- [47] Crane B. R., Arvai A. S., Gachhui R., Wu C. Q., Ghosh D. K., Getzoff E. D., Stuehr D. J. and Tainer J. A. (1997) The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 278(5337), 425-431.
- [48] Garcin E. D., Bruns C. M., Lloyd S. J., Hosfield D. J., Tiso M., Gachhui R., Stuehr D. J., Tainer J. A. and Getzoff E. D. (2004) Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 279(36), 37918-37927.
- [49] Adak S., Ghosh S., Abu-Soud H. M. and Stuehr D. J. (1999) Role of reductase domain cluster 1 acidic residues in neuronal nitric-oxide synthase - characterization of the FMN-free enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 274(32), 22313-22320.
- [50] Bredt D. S., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R. and Snyder S. H. (1991) Cloned and Expressed Nitric-Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome-P-450 Reductase. *Nature* 351(6329), 714-718.
- [51] Wang M., Roberts D. L., Paschke R., Shea T. M., Masters B. S. S. and Kim J. J. P. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(16), 8411-8416.
- [52] Crane B. R., Arvai A. S., Ghosh D. K., Wu C. Q., Getzoff E. D., Stuehr D. J. and Tainer J. A. (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279(5359), 2121-2126.
- [53] Fischmann T. O., Hruza A., Niu X. D., Fossetta J. D., Lunn C. A., Dolphin E., Prongay A. J., Reichert P., Lundell D. J., Narula S. K. and Weber P. C. (1999) Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature structural biology* 6(3), 233-242.
- [54] Li H. Y., Raman C. S., Glaser C. B., Blasko E., Young T. A., Parkinson J. F., Whitlow M. and Poulos T. L. (1999) Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain

of human inducible nitric-oxide synthase - Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274(30), 21276-21284.

[55] Raman C. S., Li H. Y., Martasek P., Kral V., Masters B. S. S. and Poulos T. L. (1998) Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 95(7), 939-950.

[56] Stuehr D. J. and Ikedaisaito M. (1992) Spectral Characterization of Brain and Macrophage Nitric-Oxide Synthases - Cytochrome-P-450-Like Hemeproteins That Contain a Flavín Semiquinone Radical. *Journal of Biological Chemistry* 267(29), 20547-20550.

[57] White K. A. and Marletta M. A. (1992) Nitric-Oxide Synthase Is a Cytochrome-P-450 Type Hemoprotein. *Biochemistry* 31(29), 6627-6631.

[58] Li H. Y. and Poulos T. L. (2005) Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(1), 293-305.

[59] Abu-Soud H. M., Ichimori K., Presta A. and Stuehr D. J. (2000) Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 275(23), 17349-17357.

[60] Abu-Soud H. M. and Stuehr D. J. (1993) Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(22), 10769-10772.

[61] Abu-Soud H. M., Yoho L. L. and Stuehr D. J. (1994) Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *The Journal of biological chemistry* 269(51), 32047-32050.

[62] Nishida C. R. and de Montellano P. R. O. (1998) Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases - Chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 273(10), 5566-5571.

[63] Narayanasami R., Nishimura J. S., McMillan K., Roman L. J., Shea T. M., Robida A. M., Horowitz P. M. and Masters B. S. S. (1997) The influence of chaotropic reagents on neuronal nitric oxide synthase and its flavoprotein module. Urea and guanidine hydrochloride stimulate NADPH-cytochrome c reductase activity of both proteins. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 1(1), 39-49.

[64] Noble M. A., Munro A. W., Rivers S. L., Robledo L., Daff S. N., Yellowlees L. J., Shimizu T., Sagami I., Guillemette J. G. and Chapman S. K. (1999) Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* 38(50), 16413-16418.

[65] Salerno J. C., Harris D. E., Irizarry K., Patel B., Morales A. J., Smith S. M. E., Martasek P., Roman L. J., Masters B. S. S., Jones C. L., Weissman B. A., Lane P., Liu Q. and Gross S. S. (1997) An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 272(47), 29769-29777.

[66] Baek K. J., Thiel B. A., Lucas S. and Stuehr D. J. (1993) Macrophage Nitric-Oxide Synthase Subunits - Purification, Characterization, and Role of Prosthetic Groups and Substrate in Regulating Their Association into a Dimeric Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 268(28), 21120-21129.

[67] Ghosh D. K., AbuSoud H. M. and Stuehr D. J. (1996) Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry* 35(5), 1444-1449.

[68] Crane B. R., Rosenfeld R. J., Arvai A. S., Ghosh D. K., Ghosh S., Tainer J. A., Stuehr D. J. and Getzoff E. D. (1999) N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *Embo Journal* 18(22), 6271-6281.

[69] Hemmens B., Goessler W., Schmidt K. and Mayer B. (2000) Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 275(46), 35786-35791.

- [70] Hemmens B., Gorren A. C. F., Schmidt K., Werner E. R. and Mayer B. (1998) Haem insertion, dimerization and reactivation of haem-free rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 332, 337-342.
- [71] Klatt P., Pfeiffer S., List B. M., Lehner D., Glatter O., Bachinger H. P., Werner E. R., Schmidt K. and Mayer B. (1996) Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *Journal of Biological Chemistry* 271(13), 7336-7342.
- [72] Klatt P., Schmidt K., Lehner D., Glatter O., Bachinger H. P. and Mayer B. (1995) Structural-Analysis of Porcine Brain Nitric-Oxide Synthase Reveals a Role for Tetrahydrobiopterin and L-Arginine in the Formation of an Sds-Resistant Dimer. *Embo Journal* 14(15), 3687-3695.
- [73] Panda K., Rosenfeld R. J., Ghosh S., Meade A. L., Getzoff E. D. and Stuehr D. J. (2002) Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *Journal of Biological Chemistry* 277(34), 31020-31030.
- [74] Rodriguez-Crespo I., Gerber N. C. and deMontellano P. R. O. (1996) Endothelial nitric-oxide synthase - Expression in Escherichia coli, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *Journal of Biological Chemistry* 271(19), 11462-11467.
- [75] Venema R. C., Ju H., Zou R., Ryan J. W. and Venema V. J. (1997) Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase - Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 272(2), 1276-1282.
- [76] Siddhanta U., Presta A., Fan B. C., Wolan D., Rousseau D. L. and Stuehr D. J. (1998) Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase - Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *Journal of Biological Chemistry* 273(30), 18950-18958.
- [77] Crane B. R., Arvai A. S., Ghosh S., Getzoff E. D., Stuehr D. J. and Tainer J. A. (2000) Structures of the N-omega-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins. *Biochemistry* 39(16), 4608-4621.
- [78] Li H., Shimizu H., Flinspach M., Jamal J., Yang W., Xian M., Cai T., Wen E. Z., Jia Q., Wang P. G. and Poulos T. L. (2002) The novel binding mode of N-alkyl-N'-hydroxyguanidine to neuronal nitric oxide synthase provides mechanistic insights into NO biosynthesis. *Biochemistry* 41(47), 13868-13875.
- [79] Adak S., Santolini J., Tikunova S., Wang Q., Johnson J. D. and Stuehr D. J. (2001) Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 -> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 276(2), 1244-1252.
- [80] Santolini J., Adak S., Curran C. M. L. and Stuehr D. J. (2001) A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 276(2), 1233-1243.
- [81] Santolini J., Meade A. L. and Stuehr D. J. (2001) Differences in three kinetic parameters underpin the unique catalytic profiles of nitric-oxide synthases I, II, and III. *Journal of Biological Chemistry* 276(52), 48887-48898.
- [82] Moali C., Boucher J. L., Sari M. A., Stuehr D. J. and Mansuy D. (1998) Substrate specificity of NO synthases: Detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N-omega-hydroxy derivatives, and N-omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry* 37(29), 10453-10460.
- [83] Sessa W. C. (2004) eNOS at a glance. *Journal of Cell Science* 117(12), 2427-2429.
- [84] Roman L. P., Martasek P. and Masters B. S. (2002) Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem. Rev.* 102(4), 1179-1190.

- [85] Cho H. J., Xie Q. W., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D. and Nathan C. (1992) Calmodulin Is a Subunit of Nitric-Oxide Synthase from Macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 176(2), 599-604.
- [86] 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.
- [87] Torreilles J. (2001) Nitric oxide: one of the more conserved and widespread signaling molecules. *Front Biosci* 6, D1161-1172.
- [88] Adak S., Aulak K. S. and Stuehr D. J. (2002) Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 277(18), 16167-16171.
- [89] Adak S., Bilwes A. M., Panda K., Hosfield D., Aulak K. S., McDonald J. F., Tainer J. A., Getzoff E. D., Crane B. R. and Stuehr D. J. (2002) Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(1), 107-112.
- [90] Bird L. E., Ren J., Zhang J., Foxwell N., Hawkins A. R., Charles I. G. and Stammers D. K. (2002) Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. *Structure* 10(12), 1687-1696.
- [91] Chartier F. J. and Couture M. (2004) Stability of the heme environment of the nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus* in the absence of pterin cofactor. *Biophys J* 87(3), 1939-1950.
- [92] Kers J. A., Wach M. J., Krasnoff S. B., Widom J., Cameron K. D., Bukhalid R. A., Gibson D. M., Crane B. R. and Loria R. (2004) Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* 429(6987), 79-82.
- [93] Midha S., Mishra R., Aziz M. A., Sharma M., Mishra A., Khandelwal P. and Bhatnagar R. (2005) Cloning, expression, and characterization of recombinant nitric oxide synthase-like protein from *Bacillus anthracis*. *Biochemical and biophysical research communications* 336(1), 346-356.
- [94] Pant K., Bilwes A. M., Adak S., Stuehr D. J. and Crane B. R. (2002) Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 41(37), 11071-11079.
- [95] Wang Z. Q., Wei C. C., Sharma M., Pant K., Crane B. R. and Stuehr D. J. (2004) A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. *Journal of Biological Chemistry* 279(18), 19018-19025.
- [96] Sudhamsu J. and Crane B. R. (2006) Structure and reactivity of a thermostable prokaryotic nitric-oxide synthase that forms a long-lived oxy-heme complex. *The Journal of biological chemistry* 281(14), 9623-9632.
- [97] Santolini J., Roman M., Stuehr D. J. and Mattioli T. A. (2006) Resonance Raman study of *Bacillus subtilis* NO synthase-like protein: similarities and differences with mammalian NO synthases. *Biochemistry* 45(5), 1480-1489.
- [98] Wang Z. Q., Lawson R. J., Buddha M. R., Wei C. C., Crane B. R., Munro A. W. and Stuehr D. J. (2007) Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 282(4), 2196-2202.
- [99] Zemojtel T., Wade R. C. and Dandekar T. (2003) In search of the prototype of nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 554(1-2), 1-5.
- [100] Buddha M. R., Keery K. M. and Crane B. R. (2004) An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(45), 15881-15886.
- [101] Buddha M. R., Tao T., Parry R. J. and Crane B. R. (2004) Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 279(48), 49567-49570.

- [102] Gusarov I. and Nudler E. (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(39), 13855-13860.
- [103] Shatalin K., Gusarov I., Avetissova E., Shatalina Y., McQuade L. E., Lippard S. J. and Nudler E. (2008) Bacillus anthracis-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(3), 1009-1013.
- [104] Alderton W. K., Cooper C. E. and Knowles R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357, 593-615.
- [105] Poulos T. L., Li H. and Raman C. S. (1999) Heme-mediated oxygen activation in biology: cytochrome c oxidase and nitric oxide synthase. *Current opinion in chemical biology* 3(2), 131-137.
- [106] Stuehr D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et biophysica acta* 1411(2-3), 217-230.
- [107] 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.
- [108] Wei C. C., Wang Z. Q., Meade A. L., McDonald J. F. and Stuehr D. J. (2002) Why do nitric oxide synthases use tetrahydrobiopterin? *Journal of Inorganic Biochemistry* 91(4), 618-624.
- [109] Mayer B., Wu C., Gorren A. C., Pfeiffer S., Schmidt K., Clark P., Stuehr D. J. and Werner E. R. (1997) Tetrahydrobiopterin binding to macrophage inducible nitric oxide synthase: heme spin shift and dimer stabilization by the potent pterin antagonist 4-amino-tetrahydrobiopterin. *Biochemistry* 36(27), 8422-8427.
- [110] McMillan K. and Masters B. S. (1993) Optical difference spectrophotometry as a probe of rat brain nitric oxide synthase heme-substrate interaction. *Biochemistry* 32(38), 9875-9880.
- [111] Presta A., Weber-Main A. M., Stankovich M. T. and Stuehr D. J. (1998) Comparative effects of substrates and pterin cofactor on the heme midpoint potential in inducible and neuronal nitric oxide synthases. *Journal of the American Chemical Society* 120(37), 9460-9465.
- [112] Couture M., Stuehr D. J. and Rousseau D. L. (2000) The ferrous dioxygen complex of the oxygenase domain of neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 275(5), 3201-3205.
- [113] Abu-Soud H. M., Gachhui R., Raushel F. M. and Stuehr D. J. (1997) The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. *The Journal of biological chemistry* 272(28), 17349-17353.
- [114] Bec N., Gorren A. C., Voelker C., Mayer B. and Lange R. (1998) Reaction of neuronal nitric-oxide synthase with oxygen at low temperature. Evidence for reductive activation of the oxy-ferrous complex by tetrahydrobiopterin. *The Journal of biological chemistry* 273(22), 13502-13508.
- [115] Ledbetter A. P., McMillan K., Roman L. J., Masters B. S., Dawson J. H. and Sono M. (1999) Low-temperature stabilization and spectroscopic characterization of the dioxygen complex of the ferrous neuronal nitric oxide synthase oxygenase domain. *Biochemistry* 38(25), 8014-8021.
- [116] Gorren A. C., Bec N., Schrammel A., Werner E. R., Lange R. and Mayer B. (2000) Low-temperature optical absorption spectra suggest a redox role for tetrahydrobiopterin in both steps of nitric oxide synthase catalysis. *Biochemistry* 39(38), 11763-11770.
- [117] Schmidt P. P., Lange R., Gorren A. C. F., Werner E. R., Mayer B. and Andersson K. K. (2001) Formation of a protonated trihydrobiopterin radical cation in the first reaction cycle

- of neuronal and endothelial nitric oxide synthase detected by electron paramagnetic: Resonance spectroscopy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 6(2), 151-158.
- [118] Wei C. C., Wang Z. Q., Wang Q., Meade A. L., Hemann C., Hille R. and Stuehr D. J. (2001) Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 276(1), 315-319.
- [119] Hurshman A. R. and Marletta M. A. (2002) Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: Evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer. *Biochemistry* 41(10), 3439-3456.
- [120] Davydov R., Ledbetter-Rogers A., Martasek P., Larukhin M., Sono M., Dawson J. H., Masters B. S. S. and Hoffman B. M. (2002) EPR and ENDOR characterization of intermediates in the cryoreduced oxy-nitric oxide synthase heme domain with bound L-arginine or N-G-hydroxyarginine. *Biochemistry* 41(33), 10375-10381.
- [121] Meunier B., de Visser S. P. and Shaik S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews* 104(9), 3947-3980.
- [122] Pant K. and Crane B. R. (2006) Nitrosyl-heme structures of *Bacillus subtilis* nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation. *Biochemistry* 45(8), 2537-2544.
- [123] Bec N., Gorren A. F. C., Mayer B., Schmidt P. P., Andersson K. K. and Lange R. (2000) The role of tetrahydrobiopterin in the activation of oxygen by nitric-oxide synthase. *J Inorg Biochem* 81(3), 207-211.
- [124] Boggs S., Huang L. and Stuehr D. J. (2000) Formation and reactions of the heme-dioxygen intermediate in the first and second steps of nitric oxide synthesis as studied by stopped-flow spectroscopy under single-turnover conditions. *Biochemistry* 39(9), 2332-2339.
- [125] Cho K. B., Derat E. and Shaik S. (2007) Compound I of nitric oxide synthase: the active site protonation state. *J Am Chem Soc* 129(11), 3182-3188.
- [126] Pufahl R. A., Wishnok J. S. and Marletta M. A. (1995) Hydrogen Peroxide-Supported Oxidation of N-G-Hydroxy-L-Arginine by Nitric-Oxide Synthase. *Biochemistry* 34(6), 1930-1941.
- [127] Clague M. J., Wishnok J. S. and Marletta M. A. (1997) Formation of N delta-cyanoornithine from NG-hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: implications for mechanism. *Biochemistry* 36(47), 14465-14473.
- [128] Zhu Y. and Silverman R. B. (2008) Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), Heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s). *Biochemistry* 47(8), 2231-2243.
- [129] Li H. Y., Raman C. S., Martasek P., Masters B. S. S. and Poulos T. L. (2001) Crystallographic studies on endothelial nitric oxide synthase complexed with nitric oxide and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 40(18), 5399-5406.
- [130] Sorlie M., Gorren A. C. F., Marchal S., Shimizu T., Lange R., Andersson K. K. and Mayer B. (2003) Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin - Proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor. *Journal of Biological Chemistry* 278(49), 48602-48610.
- [131] Li H., Igarashi J., Jamal J., Yang W. and Poulos T. L. (2006) Structural studies of constitutive nitric oxide synthases with diatomic ligands bound. *J Biol Inorg Chem* 11(6), 753-768.
- [132] Denisov I. G., Makris T. M., Sligar S. G. and Schlichting I. (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* 105(6), 2253-2277.
- [133] Shaik S., Kumar D., de Visser S. P., Altun A. and Thiel W. (2005) Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev* 105(6), 2279-2328.

- [134] Haines D. C., Tomchick D. R., Machius M. and Peterson J. A. (2001) Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry* 40(45), 13456-13465.
- [135] Hurshman A. R., Krebs C., Edmondson D. E. and Marletta M. A. (2003) Ability of tetrahydrobiopterin analogues to support catalysis by inducible nitric oxide synthase: Formation of a pterin radical is required for enzyme activity. *Biochemistry* 42(45), 13287-13303.
- [136] Wei C. C., Crane B. R. and Stuehr D. J. (2003) Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chemical Reviews* 103(6), 2365-2383.
- [137] Robinet J. J., Cho K. B. and Gault J. W. (2008) A density functional theory investigation on the mechanism of the second half-reaction of nitric oxide synthase. *Journal of the American Chemical Society* 130(11), 3328-3334.
- [138] Tierney D. L., Huang H., Martasek P., Masters B. S., Silverman R. B. and Hoffman B. M. (1999) ENDOR spectroscopic evidence for the position and structure of NG-hydroxy-L-arginine bound to holo-neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* 38(12), 3704-3710.
- [139] Huang H., Hah J. M. and Silverman R. B. (2001) Mechanism of nitric oxide synthase. Evidence that direct hydrogen atom abstraction from the O-H bond of NG-hydroxyarginine is not relevant to the mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 123(11), 2674-2676.
- [140] Wei C. C., Wang Z. Q., Hemann C., Hille R. and Stuehr D. J. (2003) A tetrahydrobiopterin radical forms and then becomes reduced during N-omega-hydroxyarginine oxidation by nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 278(47), 46668-46673.
- [141] Negrier M., Berka V., Vos M. H., Liebl U., Lambry J. C., Tsai A. L. and Martin J. L. (1999) Geminate recombination of nitric oxide to endothelial nitric-oxide synthase and mechanistic implications. *Journal of Biological Chemistry* 274(35), 24694-24702.
- [142] Cho K. B. and Gault J. W. (2004) Quantum chemical calculations of the NHA bound nitric oxide synthase active site: O₂ binding and implications for the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc* 126(33), 10267-10270.
- [143] Cho K. B. and Gault J. W. (2005) Second half-reaction of nitric oxide synthase: computational insights into the initial step and key proposed intermediate. *The journal of physical chemistry* 109(49), 23706-23714.
- [144] Marechal A., Mattioli T. A., Stuehr D. J. and Santolini J. (2007) Activation of peroxynitrite by inducible nitric-oxide synthase - A direct source of nitrative stress. *Journal of Biological Chemistry* 282(19), 14101-14112.
- [145] Feron O., Belhassen L., Kobzik L., Smith T. W., Kelly R. A. and Michel T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae - Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 271(37), 22810-22814.
- [146] Garcia-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino G., Papapetropoulos A. and Sessa W. C. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392(6678), 821-824.
- [147] GarciaCardena G., Martasek P., Masters B. S. S., Skidd P. M., Couet J., Li S. W., Lisanti M. P. and Sessa W. C. (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin - Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272(41), 25437-25440.
- [148] Ratovitski E. A., Alam M. R., Quick R. K., McMillan A., Bao C., Kozlovsky C., Hand T. A., Johnson R. C., Mains R. E., Eipper B. A. and Lowenstein C. J. (1999) Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274(2), 993-999.

- [149] Sato Y., Sagami I. and Shimizu T. (2004) Identification of caveolin-1-interacting sites in neuronal nitric-oxide synthase - Molecular mechanism for inhibition of NO formation. *Journal of Biological Chemistry* 279(10), 8827-8836.
- [150] Fulton D., Gratton J. P., McCabe T. J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T. F., Papapetropoulos A. and Sessa W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399(6736), 597-601.
- [151] McCabe T. J., Fulton D., Roman L. J. and Sessa W. C. (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 275(9), 6123-6128.
- [152] Abu-Soud H. M., Ichimori K., Nakazawa H. and Stuehr D. J. (2001) Regulation of inducible nitric oxide synthase by self-generated NO. *Biochemistry* 40(23), 6876-6881.
- [153] Hurshman A. R. and Marletta M. A. (1995) Nitric-Oxide Complexes of Inducible Nitric-Oxide Synthase - Spectral Characterization and Effect on Catalytic Activity. *Biochemistry* 34(16), 5627-5634.
- [154] Abu-Soud H. M., Wang J., Rousseau D. L., Fukuto J. M., Ignarro L. J. and Stuehr D. J. (1995) Neuronal Nitric Oxide Synthase Self-inactivates by Forming a Ferrous-Nitrosyl Complex during Aerobic Catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 270(39), 22997-23006.
- [155] Adak S., Crooks C., Wang Q., Crane B. R., Tainer J. A., Getzoff E. D. and Stuehr D. J. (1999) Tryptophan 409 controls the activity of neuronal nitric-oxide synthase by regulating nitric oxide feedback inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 274(38), 26907-26911.
- [156] Scheele J. S., Bruner E., Kharitonov V. G., Martasek P., Roman L. J., Masters B. S. S., Sharma V. S. and Magde D. (1999) Kinetics of NO ligation with nitric-oxide synthase by flash photolysis and stopped-flow spectrophotometry. *Journal of Biological Chemistry* 274(19), 13105-13110.
- [157] Kroncke K. D., Fehsel K. and Kolb-Bachofen V. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and experimental immunology* 113(2), 147-156.
- [158] Hobbs A. J., Higgs A. and Moncada S. (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 191-220.
- [159] Louin G., Marchand-Verrecchia C., Palmier B., Plotkine M. and Jafarian-Tehrani M. (2006) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 50(2), 182-190.
- [160] Jafarian-Tehrani M., Louin G., Royo N. C., Besson V. C., Bohme G. A., Plotkine M. and Marchand-Verrecchia C. (2005) 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats. *Nitric Oxide* 12(2), 61-69.
- [161] Patman J., Bhardwaj N., Ramnauth J., Annedi S. C., Renton P., Maddaford S. P., Rakhit S. and Andrews J. S. (2007) Novel 2-aminobenzothiazoles as selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17(9), 2540-2544.
- [162] Seo J., Igarashi J., Li H., Martasek P., Roman L. J., Poulos T. L. and Silverman R. B. (2007) Structure-based design and synthesis of N(omega)-nitro-L-arginine-containing peptidomimetics as selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. Displacement of the heme structural water. *Journal of medicinal chemistry* 50(9), 2089-2099.
- [163] Liu F. Z., Fang H., Zhu H. W., Wang Q., Yang Y. and Xu W. F. (2008) Design, synthesis, and preliminary evaluation of 4-(6-(3-nitroguanidino)hexanamido)pyrrolidine derivatives as potential iNOS inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16(1), 578-585.
- [164] Boulouard M., Schumann-Bard P., Butt-Gueulle S., Lohou E., Stiebing S., Collot V. and Rault S. (2007) 4-substituted indazoles as new inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17(11), 3177-3180.
- [165] Whitlow M., Adler M., Davey D., Huang Q., Koovakkat S., Parkinson J. F., Pham E., Polokoff M., Xu W., Yuan S. and Phillips G. (2007) The rational design of inhibitors of nitric

- oxide formation by inducible nitric oxide synthase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17(9), 2505-2508.
- [166] Wang P. G., Xian M., Tang X., Wu X., Wen Z., Cai T. and Janczuk A. J. (2002) Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev* 102(4), 1091-1134.
- [167] Herman A. G. and Moncada S. (2005) Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. *European heart journal* 26(19), 1945-1955.
- [168] Scatena R., Bottoni P., Martorana G. E. and Giardina B. (2005) Nitric oxide donor drugs: an update on pathophysiology and therapeutic potential. *Expert opinion on investigational drugs* 14(7), 835-846.
- [169] Mason R. P. and Cockcroft J. R. (2006) Targeting nitric oxide with drug therapy. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn* 8(12 Suppl 4), 40-52.
- [170] Munzel T., Daiber A. and Mulsch A. (2005) Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circulation research* 97(7), 618-628.
- [171] Al-Sa'doni H. and Ferro A. (2000) S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci (Lond)* 98(5), 507-520.
- [172] Al-Sa'doni H. H. and Ferro A. (2005) Current status and future possibilities of nitric oxide-donor drugs: focus on S-nitrosothiols. *Mini reviews in medicinal chemistry* 5(3), 247-254.
- [173] Daiber A., Wenzel P., Oelze M. and Munzel T. (2008) New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin Res Cardiol* 97(1), 12-20.
- [174] Heinzl B., John M., Klatt P., Bohme E. and Mayer B. (1992) Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Formation of Hydrogen-Peroxide by Brain Nitric-Oxide Synthase. *Biochemical Journal* 281(Pt3), 627-630.
- [175] Vasquez-Vivar J. and Kalyanaraman B. (2000) Generation of superoxide from nitric oxide synthase. *Febs Letters* 481(3), 305-306.
- [176] Miller R. T., Martasek P., Roman L. J., Nishimura J. S. and Masters B. S. S. (1997) Involvement of the reductase domain of neuronal nitric oxide synthase in superoxide anion production. *Biochemistry* 36(49), 15277-15284.
- [177] Raju S. V., Barouch L. A. and Hare J. M. (2005) Nitric oxide and oxidative stress in cardiovascular aging. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005(21), re4.
- [178] Mansuy D. and Boucher J. L. (2004) Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free radical biology & medicine* 37(8), 1105-1121.
- [179] 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.
- [180] 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.
- [181] Renodon-Corniere A., Boucher J. L., Dijols S., Stuehr D. J. and Mansuy D. (1999) Efficient formation of nitric oxide from selective oxidation of N-aryl N'-hydroxyguanidines by inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* 38(15), 4663-4668.
- [182] Moali C., Boucher J. L., Renodon-Corniere A., Stuehr D. J. and Mansuy D. (2001) Oxidations of N(omega)-hydroxyarginine analogues and various N-hydroxyguanidines by NO synthase II: key role of tetrahydrobiopterin in the reaction mechanism and substrate selectivity. *Chemical research in toxicology* 14(2), 202-210.
- [183] Renodon-Corniere A., Dijols S., Perollier C., Lefevre-Groboillot D., Boucher J. L., Attias R., Sari M. A., Stuehr D. and Mansuy D. (2002) N-Aryl N'-hydroxyguanidines, a new class of NO-donors after selective oxidation by nitric oxide synthases: structure-activity relationship. *Journal of medicinal chemistry* 45(4), 944-954.

- [184] Dijols S., Perollier C., Lefevre-Groboillot D., Pethe S., Attias R., Boucher J. L., Stuehr D. J. and Mansuy D. (2001) Oxidation of N(omega)-hydroxyarginine analogues by NO-synthase: the simple, non amino acid N-butyl N'-hydroxyguanidine is almost as efficient an NO precursor as N(omega)-hydroxyarginine. *Journal of medicinal chemistry* 44(20), 3199-3202.
- [185] Fukuto J. M., Wallace G. C., Hszieh R. and Chaudhuri G. (1992) Chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds. Release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation. *Biochemical pharmacology* 43(3), 607-613.
- [186] Fukuto J. M., Stuehr D. J., Feldman P. L., Bova M. P. and Wong P. (1993) Peracid oxidation of an N-hydroxyguanidine compound: a chemical model for the oxidation of N omega-hydroxyl-L-arginine by nitric oxide synthase. *Journal of medicinal chemistry* 36(18), 2666-2670.
- [187] Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- [188] Ghosh D. K., Wu C., Pitters E., Moloney M., Werner E. R., Mayer B. and Stuehr D. J. (1997) Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *Biochemistry* 36(35), 10609-10619.
- [189] Ghosh D. K., Crane B. R., Ghosh S., Wolan D., Gachhui R., Crooks C., Presta A., Tainer J. A., Getzoff E. D. and Stuehr D. J. (1999) Inducible nitric oxide synthase: role of the N-terminal beta-hairpin hook and pterin-binding segment in dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *The EMBO journal* 18(22), 6260-6270.
- [190] Murphy M. E. and Noack E. (1994) Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods in enzymology* 233, 240-250.
- [191] Mulsch A., Vanin A., Mordvintcev P., Hauschildt S. and Busse R. (1992) NO accounts completely for the oxygenated nitrogen species generated by enzymic L-arginine oxygenation. *The Biochemical journal* 288 (Pt 2), 597-603.
- [192] Sennequier N. and Stuehr D. J. (1996) Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry* 35(18), 5883-5892.
- [193] Galli C., MacArthur R., Abu-Soud H. M., Clark P., Steuhr D. J. and Brudvig G. W. (1996) EPR spectroscopic characterization of neuronal NO synthase. *Biochemistry* 35(8), 2804-2810.
- [194] Salerno J. C., McMillan K. and Masters B. S. (1996) Binding of intermediate, product, and substrate analogs to neuronal nitric oxide synthase: ferriheme is sensitive to ligand-specific effects in the L-arginine binding site. *Biochemistry* 35(36), 11839-11845.
- [195] Salerno J. C., Frey C., McMillan K., Williams R. F., Masters B. S. and Griffith O. W. (1995) Characterization by electron paramagnetic resonance of the interactions of L-arginine and L-thiocitrulline with the heme cofactor region of nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 270(46), 27423-27428.
- [196] Salerno J. C., Martasek P., Roman L. J. and Masters B. S. (1996) Electron paramagnetic resonance spectroscopy of the heme domain of inducible nitric oxide synthase: binding of ligands at the arginine site induces changes in the heme ligation geometry. *Biochemistry* 35(24), 7626-7630.
- [197] Salerno J. C., Martasek P., Williams R. F. and Masters B. S. (1997) Substrate and substrate analog binding to endothelial nitric oxide synthase: electron paramagnetic resonance as an isoform-specific probe of the binding mode of substrate analogs. *Biochemistry* 36(39), 11821-11827.

- [198] Bernatowicz M. S., Wu Y. and Matsueda G. R. (1992) ^1H -Pyrazole-1-carboxamidine hydrochloride : An attractive reagent for guanylation of amines and its application to peptide synthesis. *Journal of Organic Chemistry* 57(8), 2497-2502.
- [199] Bernatowicz M. S., Wu Y. and Matsueda G. R. (1993) Urethane protected derivatives of 1-guanylpurazole for the mild and efficient preparation of guanidines. *Tetrahedron Letters* 34(21), 3389-3392.
- [200] Southan G. J., Gauld D., Lubeskie A., Zingarelli B., Cuzzocrea S., Salzman A. L., Szabo C. and Wolff D. J. (1997) Inhibition of nitric oxide synthase with pyrazole-1-carboxamidine and related compounds. *Biochemical pharmacology* 54(3), 409-417.
- [201] Charton M. (1965) The Application of the Hammett Equation to Amidines. *Journal of Organic Chemistry* 30, 969-973.
- [202] Taylor P. J. and Wait A. R. (1986) Sigma1 Values for Heterocycles. *Journal of Chemical Society Perkin Trans. 2*, 1765-1770.
- [203] Yamamoto Y. and Kojima S. (1991) *The Chemistry of Amidines and Imidates*, Patai S. and Rappoport Z., John Wiley & Sons, New York.
- [204] Hansch C., Leo A. and W. T. R. (1991) A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. *Chem. Rev.* 91, 165-195.
- [205] Perrin D. D. (1972) *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, Butterworths, London.
- [206] Carey P. R. (1982) *Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopies*, Academic Press, New York.
- [207] Spiro T. G. (1988) Iron Sulfur Proteins and Analog Complexes, in *Biological application of Raman Spectroscopy Vol. III*, p 523-553.
- [208] Spiro T. G. and Czernuszewicz R. S. (1995) Resonance Raman Spectroscopy of Metalloproteins, in *Methods in enzymology Vol. 246*, p 416-460, Academic Press.
- [209] Rousseau D. L., Li D., Couture M. and Yeh S. R. (2005) Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase. *J Inorg Biochem* 99(1), 306-323.
- [210] Wang J., Stuehr D. J., Ikeda-Saito M. and Rousseau D. L. (1993) Heme coordination and structure of the catalytic site in nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 268(30), 22255-22258.
- [211] Fan B., Wang J., Stuehr D. J. and Rousseau D. L. (1997) NO synthase isozymes have distinct substrate binding sites. *Biochemistry* 36(42), 12660-12665.
- [212] Li D., Stuehr D. J., Yeh S. R. and Rousseau D. L. (2004) Heme distortion modulated by ligand-protein interactions in inducible nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 279(25), 26489-26499.
- [213] Spiro T. G. and Wasbotten I. H. (2005) CO as a vibrational probe of heme protein active sites. *J Inorg Biochem* 99(1), 34-44.
- [214] Li D., Kabir M., Stuehr D. J., Rousseau D. L. and Yeh S. R. (2007) Substrate- and isoform-specific dioxygen complexes of nitric oxide synthase. *J Am Chem Soc* 129(21), 6943-6951.
- [215] Schelvis J. P., Berka V., Babcock G. T. and Tsai A. L. (2002) Resonance Raman detection of the Fe-S bond in endothelial nitric oxide synthase. *Biochemistry* 41(18), 5695-5701.
- [216] Wang J., Stuehr D. J. and Rousseau D. L. (1997) Interactions between substrate analogues and heme ligands in nitric oxide synthase. *Biochemistry* 36(15), 4595-4606.
- [217] O'Keefe D. H., Ebel R. E., Peterson J. A., Maxwell J. C. and Caughey W. S. (1978) An infrared spectroscopic study of carbon monoxide bonding to ferrous cytochrome P-450. *Biochemistry* 17(26), 5845-5852.
- [218] Jung C., Hoa G. H., Schroder K. L., Simon M. and Doucet J. P. (1992) Substrate analogue induced changes of the CO-stretching mode in the cytochrome P450cam-carbon monoxide complex. *Biochemistry* 31(51), 12855-12862.

- [219] Jung C., Schulze H. and Deprez E. (1996) Role of the polarity of the heme environment for the CO stretch modes in cytochrome P-450cam-CO. *Biochemistry* 35(47), 15088-15094.
- [220] Jung C., Stuehr D. J. and Ghosh D. K. (2000) FT-Infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch mode of iNOS oxygenase domain: effect of arginine and tetrahydrobiopterin. *Biochemistry* 39(33), 10163-10171.
- [221] Ingledew W. J., Smith S. M., Salerno J. C. and Rich P. R. (2002) Neuronal nitric oxide synthase ligand and protein vibrations at the substrate binding site. A study by FTIR. *Biochemistry* 41(26), 8377-8384.
- [222] Ingledew W. J., Smith S. M., Gao Y. T., Jones R. J., Salerno J. C. and Rich P. R. (2005) Ligand, cofactor, and residue vibrations in the catalytic site of endothelial nitric oxide synthase. *Biochemistry* 44(11), 4238-4246.
- [223] Gao Y. T., Smith S. M., Weinberg J. B., Montgomery H. J., Newman E., Guillemette J. G., Ghosh D. K., Roman L. J., Martasek P. and Salerno J. C. (2004) Thermodynamics of oxidation-reduction reactions in mammalian nitric-oxide synthase isoforms. *The Journal of biological chemistry* 279(18), 18759-18766.
- [224] Ost T. W. B. and Daff S. (2005) Thermodynamic and kinetic analysis of the nitrosyl, carbonyl, and dioxy heme complexes of neuronal nitric-oxide synthase - The roles of substrate and tetrahydrobiopterin in oxygen activation. *Journal of Biological Chemistry* 280(2), 965-973.
- [225] Li H., Flinspach M. L., Igarashi J., Jamal J., Yang W., Gomez-Vidal J. A., Litzinger E. A., Huang H., Erdal E. P., Silverman R. B. and Poulos T. L. (2005) Exploring the binding conformations of bulkier dipeptide amide inhibitors in constitutive nitric oxide synthases. *Biochemistry* 44(46), 15222-15229.
- [226] Flinspach M. L., Li H., Jamal J., Yang W., Huang H., Hah J. M., Gomez-Vidal J. A., Litzinger E. A., Silverman R. B. and Poulos T. L. (2004) Structural basis for dipeptide amide isoform-selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Nature structural & molecular biology* 11(1), 54-59.
- [227] Chen P. F., Tsai A. L., Berka V. and Wu K. K. (1997) Mutation of Glu-361 in human endothelial nitric-oxide synthase selectively abolishes L-arginine binding without perturbing the behavior of heme and other redox centers. *The Journal of biological chemistry* 272(10), 6114-6118.
- [228] Gachhui R., Ghosh D. K., Wu C., Parkinson J., Crane B. R. and Stuehr D. J. (1997) Mutagenesis of acidic residues in the oxygenase domain of inducible nitric-oxide synthase identifies a glutamate involved in arginine binding. *Biochemistry* 36(17), 5097-5103.
- [229] Bengea S., Sagami I. and Shimizu T. (2003) CO binding to the isolated oxygenase domain of neuronal nitric oxide synthase: effects of inhibitors and mutations at the substrate-binding site. *J Inorg Biochem* 94(4), 343-347.
- [230] 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.
- [231] Moreau M., Takahashi H., Sari M. A., Boucher J. L., Sagami I., Shimizu T. and Mansuy D. (2004) Importance of valine 567 in substrate recognition and oxidation by neuronal nitric oxide synthase. *J Inorg Biochem* 98(7), 1200-1209.
- [232] Wang Z. Q., Wei C. C., Sharma M., Pant K., Crane B. R. and Stuehr D. J. (2004) A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. *The Journal of biological chemistry* 279(18), 19018-19025.
- [233] Chen P. F., Berka V. and Wu K. K. (2003) Differential effects of mutations in human endothelial nitric oxide synthase at residues Tyr-357 and Arg-365 on L-arginine

hydroxylation and GN-hydroxy-L-arginine oxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 411(1), 83-92.

[234] Beaumont E., Lambry J. C., Wang Z. Q., Stuehr D. J., Martin J. L. and Slama-Schwok A. (2007) Distal Val346Ile mutation in inducible NO synthase promotes substrate-dependent NO confinement. *Biochemistry* 46(47), 13533-13540.

[235] Raman C. S., Li H., Martasek P., Southan G., Masters B. S. and Poulos T. L. (2001) Crystal structure of nitric oxide synthase bound to nitro indazole reveals a novel inactivation mechanism. *Biochemistry* 40(45), 13448-13455.

[236] Tsai A. L., Berka V., Chen P. F. and Palmer G. (1996) Characterization of endothelial nitric-oxide synthase and its reaction with ligand by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* 271(51), 32563-32571.

[237] Eisenberger P. and Pershan P. S. (1966) Electron spin resonance of met-myoglobin: field dependence of g. *The Journal of chemical physics* 45(8), 2832-2835.

[238] Peisach J. and Blumberg W. E. (1970) Electron paramagnetic resonance study of the high- and low-spin forms of cytochrome P-450 in liver and in liver microsomes from a methylcholanthrene-treated rabbit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67(1), 172-179.

[239] Peisach J., Blumberg W. E. and Adler A. (1973) Electron paramagnetic resonance studies of iron porphyrin and chlorin systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 206, 310-327.

[240] Gautier C., Mikula I., Nioche P., Martasek P., Raman C. S. and Slama-Schwok A. (2006) Dynamics of NO rebinding to the heme domain of NO synthase-like proteins from bacterial pathogens. *Nitric Oxide* 15(4), 312-327.

[241] Grant S. K., Green B. G., Stiffey-Wilusz J., Durette P. L., Shah S. K. and Kozarich J. W. (1998) Structural requirements for human inducible nitric oxide synthase substrates and substrate analogue inhibitors. *Biochemistry* 37(12), 4174-4180.

[242] Moreau M. *Etude du mécanisme d'oxydation des guanidines par les NO-Synthases, Recherche de nouveaux précurseurs de NO*, Thèse de Chimie, Université Paris 5 - René Descartes (2005).

[243] Pou S., Pou W. S., Bredt D. S., Snyder S. H. and Rosen G. M. (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 267(34), 24173-24176.

[244] Rosen G. M., Tsai P. and Pou S. (2002) Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. *Chem Rev* 102(4), 1191-1200.

[245] Rosen G. M., Tsai P., Weaver J., Porasuphatana S., Roman L. J., Starkov A. A., Fiskum G. and Pou S. (2002) The role of tetrahydrobiopterin in the regulation of neuronal nitric-oxide synthase-generated superoxide. *The Journal of biological chemistry* 277(43), 40275-40280.

[246] Presta A., Siddhanta U., Wu C., Sennequier N., Huang L., Abu-Soud H. M., Erzurum S. and Stuehr D. J. (1998) Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* 37(1), 298-310.

[247] Yeh S. R., Takahashi S., Fan B. and Rousseau D. L. (1997) Ligand exchange during cytochrome c folding. *Nature structural biology* 4(1), 51-56.

[248] Jordan T., Eads J. C. and Spiro T. G. (1995) Secondary and tertiary structure of the A-state of cytochrome c from resonance Raman spectroscopy. *Protein Sci* 4(4), 716-728.

[249] Raman C. S., Martasek P. and Masters B. S. (2000) *The Porphyrin Handbook* Vol. 4, Academic Press, New York.

[250] Makris T. M., von Koenig K., Schlichting I. and Sligar S. G. (2007) Alteration of P450 distal pocket solvent leads to impaired proton delivery and changes in heme geometry. *Biochemistry* 46(49), 14129-14140.

- [251] Chen Z., Ost T. W. and Schelvis J. P. (2004) Phe393 mutants of cytochrome P450 BM3 with modified heme redox potentials have altered heme vinyl and propionate conformations. *Biochemistry* 43(7), 1798-1808.
- [252] Shelnutt J. A. (2000) *The Porphyrin Handbook* Vol. 7, Academic Press, New York.
- [253] Wells A. V., Li P., Champion P. M., Martinis S. A. and Sligar S. G. (1992) Resonance Raman investigations of Escherichia coli-expressed Pseudomonas putida cytochrome P450 and P420. *Biochemistry* 31(18), 4384-4393.
- [254] Couture M., Adak S., Stuehr D. J. and Rousseau D. L. (2001) Regulation of the properties of the heme-NO complexes in nitric-oxide synthase by hydrogen bonding to the proximal cysteine. *J Biol Chem* 276(41), 38280-38288.
- [255] Remba R. D., Champion P. M., Fitchen D. B., Chiang R. and Hager L. P. (1979) Resonance Raman investigations of chloroperoxidase, horseradish peroxidase, and cytochrome c using Soret band laser excitation. *Biochemistry* 18(11), 2280-2290.
- [256] Scheele J. S., Bruner E., Zemojtel T., Martasek P., Roman L. J., Masters B. S., Sharma V. S. and Magde D. (2001) Kinetics of CO and NO ligation with the Cys(331)-->Ala mutant of neuronal nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 276(7), 4733-4736.
- [257] Bangcharoenpaurpong O., Champion P. M., Hall K. S. and Hager L. P. (1986) Resonance Raman studies of isotopically labeled chloroperoxidase. *Biochemistry* 25(9), 2374-2378.
- [258] Tosha T., Kagawa N., Ohta T., Yoshioka S., Waterman M. R. and Kitagawa T. (2006) Raman evidence for specific substrate-induced structural changes in the heme pocket of human cytochrome P450 aromatase during the three consecutive oxygen activation steps. *Biochemistry* 45(17), 5631-5640.
- [259] Champion P. M., Stallard B. R., Wagner G. C. and Gunsalus I. C. (1982) Resonance Raman Detection of an Fe-S Bond in Cytochrome P450_{Cam}. *Journal of the American Chemical Society* 104(20), 5469-5472.
- [260] Ray G. B., Li X. Y., Ibers J. A., Sessler J. L. and Spiro T. G. (1994) How far can proteins bend the FeCO unit? Distal polar and steric effects in heme proteins and models. *J Am Chem Soc* 116, 162-176.
- [261] McLean M. A., Yeom H. and Sligar S. G. (1996) Carbon monoxide binding to cytochrome P450BM-3: evidence for a substrate-dependent conformational change. *Biochimie* 78(8-9), 700-705.
- [262] Fedorov R., Ghosh D. K. and Schlichting I. (2003) Crystal structures of cyanide complexes of P450cam and the oxygenase domain of inducible nitric oxide synthase-structural models of the short-lived oxygen complexes. *Archives of biochemistry and biophysics* 409(1), 25-31.
- [263] Martin N. I., Woodward J. J., Winter M. B., Beeson W. T. and Marletta M. A. (2007) Design and synthesis of C5 methylated L-arginine analogues as active site probes for nitric oxide synthase. *J Am Chem Soc* 129(41), 12563-12570.
- [264] Palmer G. (2000) Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins, in *Spectroscopy and Magnetism Vol.*, p 121-185, Sausalito (Ca).
- [265] Peisach J., Blumberg W. E., Ogawa S., Rachmilewitz E. A. and Oltzik R. (1971) The effects of protein conformation on the heme symmetry in high spin ferric heme proteins as studied by electron paramagnetic resonance. *The Journal of biological chemistry* 246(10), 3342-3355.
- [266] Taylor C. P. (1977) The EPR of low spin heme complexes. Relation of the t_{2g} hole model to the directional properties of the g tensor, and a new method for calculating the ligand field parameters. *Biochimica et biophysica acta* 491(1), 137-148.
- [267] Peisach J. (1998) *EPR of metalloproteins; truth tables revisited*, Foundation of modern EPR, Singapore, World Scientific.

- [268] Peisach J., Blumberg W. E., Ogawa S., Rachmile.Ea and Oltzik R. (1971) Effects of Protein Conformation on Heme Symmetry in High Spin Ferric Heme Proteins as Studied by Electron Paramagnetic Resonance. *J. Biol. Chem.* 246(10), 3342-3355.
- [269] Salerno J. C., Martasek P., Roman L. J. and Masters B. S. S. (1996) Electron paramagnetic resonance spectroscopy of the heme domain of inducible nitric oxide synthase: Binding of ligands at the arginine site induces changes in the heme ligation geometry. *Biochemistry* 35(24), 7626-7630.
- [270] Galli C., MacArthur R., AbuSoud H. M., Clark P., Stuehr D. J. and Brudvig G. W. (1996) EPR spectroscopic characterization of neuronal NO synthase. *Biochemistry* 35(8), 2804-2810.
- [271] Bredt D. S. (2003) Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem. *J Cell Sci* 116(Pt 1), 9-15.
- [272] Zhang L., Dawson V. L. and Dawson T. M. (2006) Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacology & therapeutics* 109(1-2), 33-41.
- [273] Pacher P., Beckman J. S. and Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87(1), 315-424.
- [274] Malinski T. (2007) Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 11(2), 207-218.
- [275] Forstermann U. and Munzel T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113(13), 1708-1714.
- [276] Stuehr D. J., Cho H. J., Kwon N. S., Weise M. F. and Nathan C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17), 7773-7777.
- [277] Xie Q. W., Cho H. J., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D., Ding A., Troso T. and Nathan C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science (New York, N.Y)* 256(5054), 225-228.
- [278] McMillan K., Bredt D. S., Hirsch D. J., Snyder S. H., Clark J. E. and Masters B. S. (1992) Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23), 11141-11145.
- [279] Marletta M. A., Hurshman A. R. and Rusche K. M. (1998) Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 2(5), 656-663.
- [280] Knowles R. G. and Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal* 298 (Pt 2), 249-258.
- [281] Ghosh D. K. and Salerno J. C. (2003) Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci* 8, d193-209.
- [282] Panda K., Haque M. M., Garcin-Hosfield E. D., Durra D., Getzoff E. D. and Stuehr D. J. (2006) Surface charge interactions of the FMN module govern catalysis by nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 281(48), 36819-36827.
- [283] Stuehr D. J., Abu-Soud H. M., Rousseau D. L., Feldman P. L. and Wang J. (1995) Control of electron transfer in neuronal nitric oxide synthase by calmodulin, substrate, substrate analogs, and nitric oxide. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif* 34, 207-213.
- [284] Poulos T. L. (2005) Structural biology of heme monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1), 337-345.
- [285] Sono M., Roach M. P., Coulter E. D. and Dawson J. H. (1996) Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev* 96(7), 2841-2888.
- [286] Wei C. C., Wang Z. Q., Tejero J., Yang Y. P., Hemann C., Hille R. and Stuehr D. J. (2008) Catalytic reduction of a tetrahydrobiopterin radical within nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 283(17), 11734-11742.

- [287] Leffek K. T., Pruszyński P. and Thanapaalasingham K. (1989) Basicity of Substituted 2-Phenyl-1,1,3,3-Tetramethylguanidines and Other Bases in Acetonitrile Solvent. *Can J Chem* 67(4), 590-595.
- [288] Santolini M., Roman M., Stuehr D. J. and Mattioli T. A. (2006) Resonance Raman study of *Bacillus subtilis* NO synthase-like protein: Similarities and differences with mammalian NO synthases. *Biochemistry* 45(5), 1480-1489.
- [289] Rodriguez-Crespo I., Moenne-Loccoz P., Loehr T. M. and Ortiz de Montellano P. R. (1997) Endothelial nitric oxide synthase: modulations of the distal heme site produced by progressive N-terminal deletions. *Biochemistry* 36(28), 8530-8538.
- [290] Wang J., Stuehr D. J. and Rousseau D. L. (1995) Tetrahydrobiopterin-deficient nitric oxide synthase has a modified heme environment and forms a cytochrome P-420 analogue. *Biochemistry* 34(21), 7080-7087.
- [291] Tsubaki M., Hiwatashi A. and Ichikawa Y. (1987) Effects of cholesterol analogues and inhibitors on the heme moiety of cytochrome P-450_{scc}: a resonance Raman study. *Biochemistry* 26(14), 4535-4540.
- [292] Deng T. J., Proniewicz L. M., Kincaid J. R., Yeom H., Macdonald I. D. and Sligar S. G. (1999) Resonance Raman studies of cytochrome P450BM3 and its complexes with exogenous ligands. *Biochemistry* 38(41), 13699-13706.
- [293] Tsubaki M., Hiwatashi A. and Ichikawa Y. (1986) Effects of cholesterol and adrenodoxin binding on the heme moiety of cytochrome P-450_{scc}: a resonance Raman study. *Biochemistry* 25(12), 3563-3569.
- [294] Ost T. W., Miles C. S., Munro A. W., Murdoch J., Reid G. A. and Chapman S. K. (2001) Phenylalanine 393 exerts thermodynamic control over the heme of flavocytochrome P450 BM3. *Biochemistry* 40(45), 13421-13429.
- [295] Adak S., Wang Q. and Stuehr D. J. (2000) Molecular basis for hyperactivity in tryptophan 409 mutants of neuronal NO synthase. *J Biol Chem* 275(23), 17434-17439.
- [296] Chartier F. J. and Couture M. (2007) Substrate-specific interactions with the heme-bound oxygen molecule of nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 282(29), 20877-20886.
- [297] Chartier F. J., Blais S. P. and Couture M. (2006) A weak Fe-O bond in the oxygenated complex of the nitric-oxide synthase of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 281(15), 9953-9962.
- [298] Chartier F. J. and Couture M. (2007) Interactions between substrates and the haem-bound nitric oxide of ferric and ferrous bacterial nitric oxide synthases. *The Biochemical journal* 401(1), 235-245.
- [299] Hammett L. P. (1937) The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 59(1), 96-103.
- [300] Balland V., Hureau, C., Cusano, A.-M., Liu, Y., Tron, T. and Limoges, B. (2008) *Chemistry Eur. J.*, under press.

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

Résumé

Les NO-synthases sont des protéines à hème-thiolate qui catalysent l'oxydation de la L-arginine en NO. Malgré les similitudes avec le mécanisme d'autres protéines comme les cytochromes P450, le déroulement exact des étapes du mécanisme des NOS reste mal connu.

Nous avons étudié le rôle du proton du guanidinium de L-Arg dans la stabilité et la réactivité du complexe FeII-O₂ grâce à une série d'analogues de L-Arg possédant une large gamme de valeurs de pKa. Par des expériences de spectroélectrochimie, de spectroscopie infrarouge et Raman de résonance, nous avons analysé l'effet de ces guanidines sur les paramètres physico-chimiques de l'hème et du ligand proximal de l'hème ainsi que sur les propriétés de l'environnement distal de l'hème.

Cette étude indique que le pKa du guanidinium du substrat contrôle le réseau de liaisons H autour du ligand distal : il contrôle ainsi les processus de transfert de protons et régule la stabilité et la réactivité des intermédiaires du cycle catalytique.

Mots Clés

Analogues d'arginine

Analyse de spectres

Complexe fer-oxygène

Cycle catalytique

Guanidinium

Hème

Liaison hydrogène

Mécanisme moléculaire

Métabolisme de l'oxygène

Monoxyde d'azote

Monoxyde de carbone

Mutagénèse dirigée

NO-Synthase

Oxydoréduction

Protéines à hème-thiolate

Spectroscopie FTIR

Spectroscopie Raman

Spectroscopie RPE

Transfert de protons