



HAL
open science

Purification et caractérisation spectroscopique de cytochrome c oxydases.

Eric Pilet

► **To cite this version:**

Eric Pilet. Purification et caractérisation spectroscopique de cytochrome c oxydases.. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Polytechnique X, 2004. Français. NNT: . pastel-00002298

HAL Id: pastel-00002298

<https://pastel.hal.science/pastel-00002298>

Submitted on 29 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de doctorat de l'Ecole Polytechnique

Spécialité :

Biochimie

Par

Eric Pilet

pour obtenir le titre de Docteur de l'Ecole Polytechnique

Sujet :

**Purification et caractérisation
spectroscopique de cytochrome *c* oxydases.**

Soutenue le 20 Octobre 2004 devant le jury composé de

M. Wolfgang Nitschke	Président
M. Michael Marden	Rapporteur
M. Charles Tellier	Rapporteur
M. Marten Vos	Directeur de Thèse
M. Bernd Ludwig	
Mme Ursula Liebl	

**Laboratoire d'Optique et Biosciences,
INSERM U451, UMR 7645, Ecole Polytechnique, ENSTA.**

Thèse de doctorat de l'Ecole Polytechnique

Spécialité :

Biochimie

Par

Eric Pilet

pour obtenir le titre de Docteur de l'Ecole Polytechnique

Sujet :

**Purification et caractérisation
spectroscopique de
cytochrome *c* oxydases.**

Soutenue le 20 Octobre 2004 devant le jury composé de

M. Wolfgang Nitschke	Président
M. Michael Marden	Rapporteur
M. Charles Tellier	Rapporteur
M. Marten Vos	Directeur de Thèse
M. Bernd Ludwig	
Mme Ursula Liebl	

**Laboratoire d'Optique et Biosciences,
INSERM U451, UMR 7645, Ecole Polytechnique, ENSTA.**

Remerciements

Je remercie Jean-Louis MARTIN de m'avoir accueilli au Laboratoire d'Optique et Biosciences et de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans un environnement dynamique, interdisciplinaire et convivial.

Merci à Ursula LIEBL, Bernd LUDWIG, Wolfgang NITSCHKE, Michael MARDEN et Charles TELLIER d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Marten VOS pour la qualité de son encadrement scientifique, bien sur, mais aussi humain. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton humour et ton soutien; ta persévérance lors des périodes où rien ne semblait vouloir fonctionner, et ta rigueur dans l'interprétation des résultats ont permis à ce travail d'être ce qu'il est. Durant ces 4 années à travailler à tes côtés, j'ai beaucoup appris sur la spectroscopie des protéines, la modélisation, les lasers mais aussi la précision et le travail en équipe..

Merci à Ursula, pour tes nombreux conseils en biochimie, biologie cellulaire et ta lecture critique du manuscrit; à Anny pour tes remarques sur le manuscrit et pour nos longues discussions sur le NO, entre autres. Merci aussi Michel pour ton expertise pour l'utilisation de l'HPLC et ta disponibilité, merci à Gérard son aide pour les premières purifications de l'oxydase, à Jean-Christophe pour ses conseils et sa participation active aux modélisations. Les résultats sur le transfert d'électrons doivent beaucoup aux compétences d'Audrius, merci à lui.

Merci à Bernd et à tous les membres du labo de biologie moléculaire du Biozentrum de l'université de Francfort de m'avoir accueilli si chaleureusement pendant ces 6 semaines. Merci également à Fabrice et à Wolfgang pour leur accueil lors de nos collaborations, ce travail ne serait pas ce qu'il est sans leurs contributions.

Ces trois années auraient été bien triste sans le sourire et les conseils de Latifa, merci pour tout : tu es la clé de voûte du labo de Bio. Merci aussi à Clément, Thomas, Thierry, Thibault pour ces longues discussions scientifiques ou non.

Merci à tout l'équipe technique Claude, Marcel, André, Jean-Marc et Xavier, et au secrétariat, Laure, Françoise, Noëlle et plus récemment Christelle pour votre aide et votre bonne humeur.

Je pense également à l'équipe enseignante du département de Biologie de l'université de Versailles : Françoise, Marc, Delphine, Michèle, Arnaud, Marie-Pierre, Christine, Claire; merci à vous pour votre accueil et vos conseils scientifiques, pédagogiques et autres.

J'ai une pensée pour celle qui m'a supporté et soutenue tout au long de ces trois années. Nos longues discussions et ta volonté de comprendre mes résultats m'ont amené à mieux les comprendre

Enfin merci à tous les membres du laboratoire qui ont fait de ces trois années de travail à vos côtés un souvenir très agréable. Merci à Antigoni pour son dynamisme et son rire communicatif, à Adeline, Marie-Claire, Isabelle, Martin-Pierre, Manuel, François, Guilhem, Emmanuel, Jean-Louis, qui m'ont écouté, conseillé, aidé ou encouragé.

Merci à tous les thésards, aux post docs et stagiaires passés et présents : Adeline, Ana-Maria, Anne, Cathie, Delphine, Johanne, Nadia, Simona, Wafa, Emmanuel, Gérard, Thomas, Thierry, Clément, Thibault, Sebastien, Didier, Anthony, Antoine, Willy, Jean-Baptiste, Jennifer, Andreea, Jie, Audrius, Kevin, James, Serguei et aux autres, je garderai en mémoire les soirées, pic-nics et autres bon moments passés ensemble.

1 Introduction générale.	9
2 Fonction et régulation de la cytochrome <i>c</i> oxydase.	11
2.1 Les chaînes respiratoires.	11
2.1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale.	12
2.1.1.1 Le complexe I.	14
2.1.1.2 Le complexe II.	14
2.1.1.3 Le pool quinone.	14
2.1.1.4 Le complexe III.	14
2.1.1.5 Le cytochrome <i>c</i> .	15
2.1.1.6 Le complexe IV.	15
2.1.1.7 L'ATP synthase.	15
2.1.1.8 Les supercomplexes.	16
2.1.2 Les chaînes respiratoires de <i>Paracoccus denitrificans</i> .	16
2.2 La Cytochrome <i>c</i> Oxydase.	18
2.2.1 Structure de l'oxydase <i>aa₃</i> de <i>Paracoccus denitrificans</i> .	18
2.2.1.1 La sous-unité I et le site actif.	19
2.2.1.2 La sous-unité II.	20
2.2.1.3 La sous-unité III.	21
2.2.1.4 La sous-unité IV.	21
2.2.1.5 Autres métaux (hors transfert d'électrons).	21
2.2.2 Structure de l'oxydase mitochondriale.	22
2.2.3 Mécanisme fonctionnel.	24
2.2.3.1 Transfert d'électrons.	24
2.2.3.2 Cycle catalytique.	25
2.2.3.3 Transfert de protons.	27
2.3 Le Monoxyde d'azote (NO).	29
2.3.1 Généralités.	29
2.3.2 Le NO chez les mammifères.	29
2.3.2.1 Production in vivo.	29
2.3.2.2 Rôles physiologiques.	30
2.4 Cytochrome <i>c</i> oxydase et monoxyde d'azote.	32
2.4.1 Le NO inhibe la cytochrome <i>c</i> oxydase.	32
2.4.2 Réactions de NO avec l'oxydase.	33
2.4.3 Implications physiologiques.	34
3 Matériel et Méthodes.	37
3.1 Microbiologie.	37
3.1.1 <i>Paracoccus denitrificans</i> .	37
3.1.2 <i>Escherichia coli</i> .	38

3.1.3 Conjugaison.....	39
3.2 Biologie moléculaire.....	39
3.2.1 Mutagenèse dirigée.....	39
3.2.2 Amplification et purification des plasmides.....	41
3.3 Biochimie.....	44
3.3.1 Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	44
3.3.2 Coloration des hèmes <i>c</i>	44
3.3.3 Test NADI.....	44
3.3.4 Dosage des protéines.....	45
3.3.5 Purification de l'oxydase <i>aa</i> ₃ de <i>Paracoccus denitrificans</i>	46
3.3.5.1 Isolement des membranes.....	46
3.3.5.2 Solubilisation.....	46
3.3.5.3 Chromatographie échangeuse d'ions de l'oxydase <i>aa</i> ₃	46
3.3.6 Purification de la cytochrome <i>c</i> oxydase de cœur de bœuf.....	47
3.3.6.1 Isolement des mitochondries.....	47
3.3.6.2 Purification de la cytochrome <i>c</i> oxydase.....	48
3.3.7 Préparation des échantillons : oxydases et ligands gazeux.....	49
3.4 Spectroscopie.....	50
3.4.1 Spectroscopie à l'équilibre.....	50
3.4.2 Spectroscopie femtoseconde.....	51
3.4.2.1 Principe de fonctionnement.....	51
3.4.2.2 Description de l'expérience d'absorption femtoseconde.....	51
3.4.3 Spectroscopie d'absorption nanoseconde.....	53
3.4.4 La résonance paramagnétique électronique (RPE).....	53
3.5 Modélisation.....	54
4 Résultats et Discussion.....	57
4.1 Purification des protéines.....	57
4.1.1 Oxydase <i>aa</i> ₃ de <i>Paracoccus denitrificans</i>	57
4.1.1.1 Mise au point des conditions de culture.....	57
4.1.1.2 Solubilisation.....	59
4.1.1.3 Chromatographie de l'oxydase <i>aa</i> ₃	60
4.1.1.4 Rendement et pureté de l'échantillon.....	64
4.1.2 - Oxydase mitochondriale.....	65
4.1.2.1 Isolement des mitochondries.....	65
4.1.2.2 Purification de l'oxydase.....	66
4.2 Interactions entre la cytochrome <i>c</i> oxydase <i>aa</i> ₃ bactérienne et le monoxyde d'azote.....	68
4.2.1 Spectroscopie à l'équilibre.....	68
4.2.2 Spectroscopie ultrarapide.....	71
4.2.3 Spectroscopie nanoseconde.....	75

4.2.4 Spectroscopie RPE.	79
4.2.5 Discussion.	80
4.2.5.1 Cinétiques de recombinaison : CcO <i>aa</i> ₃	81
4.2.5.2 L'oxydase <i>ba</i> ₃	83
4.2.5.3 Résultats RPE.	83
4.2.5.4 Modélisations moléculaires.	85
4.2.6 Conclusion.	87
4.3 Transfert d'électrons dans la cytochrome c oxydase mitochondriale.	89
4.3.1 Spectroscopie à l'équilibre.	90
4.3.1.1 Spectre UV/visible de l'oxydase.	90
4.3.1.2 Formation de l'état "mixed valence" (MV).	91
4.3.1.3 Caractéristiques spectrales de l'état MV.	91
4.3.2 Spectroscopie résolue dans le temps.	92
4.3.2.1 Spectres de photodissociation.	92
4.3.2.2 Evolution spectrale et transfert d'électrons.	94
4.3.2.3 Discussion.	96
4.3.2.4 Perspectives.	99
4.4 Mutagenèse de l'oxydase <i>aa</i> ₃ de <i>P. denitrificans</i>	101
4.4.1 Modélisation moléculaire.	101
4.4.2 Création des mutants.	104
4.4.3 Tests biochimiques.	107
4.4.4 Perspectives.	107
5 Conclusion et Perspectives.	109
6 Annexes, Index et Références.	113
6.1 Abréviations.	113
6.2 Références bibliographiques.	114
6.3 Articles.	125

1 Introduction générale.

La cytochrome *c* oxydase (CcO) est un complexe protéique commun à tous les organismes aérobiques. Elle catalyse la réduction de l'oxygène en eau au niveau d'un site catalytique qui contient un atome de fer hémique et un atome de cuivre. La famille de ces oxydases est ainsi appelée super famille des oxydases à "hème-cuivre". Cette famille a une grande homologie avec celle des NO-réductases, qui catalysent la réduction de deux molécules de monoxyde d'azote (NO) en N₂O. Cette homologie proviendrait de l'origine commune de ces deux familles (Pereira *et coll.* 2001), comme le suggère l'activité O₂-réductase de quelques membres de la famille des NO-réductases (Fujiwara 1996) et l'activité NO-réductase de certaines cytochrome *c* oxydases (Giuffrè *et coll.* 1999; Forte *et coll.* 2001). Si les oxydases des eucaryotes supérieurs ont perdu cette fonction "ancestrale" de réduction du NO, les interactions CcO-NO jouent un rôle important dans la régulation de la respiration chez les mammifères (Giuffrè *et coll.* 2000; Moncada & Erusalimsky 2002). En effet, en présence de NO, l'affinité apparente de la CcO mitochondriale pour O₂ diminue (Cooper 2002). Par ailleurs, des études menées sur l'oxydase de cœur de bœuf (Brudvig *et coll.* 1980; Seelig *et coll.* 1981) et d'une bactérie, *P. denitrificans* (Vos *et coll.* 2001), semblent indiquer que deux molécules de NO peuvent être présentes simultanément dans le site actif. Ce phénomène, outre son analogie avec le mécanisme de réduction du NO, permettrait d'envisager les interactions CcO-NO, non plus sous le seul angle d'une inhibition compétitive, mais également comme une possible interaction à plusieurs partenaires. La présence potentielle de plusieurs molécules de NO dans le site actif des cytochrome *c* oxydases *aa*₃ de *P. denitrificans* et *ba*₃ de *T. thermophilus* et la nature des interactions entre ces ligands ont été étudiés durant mon travail de thèse.

Si le NO régule l'activité catalytique en inhibant la fixation de l'oxygène, la disponibilité des électrons nécessaires à la réduction de O₂ influe aussi l'activité de la cytochrome *c* oxydase. En effet la fixation du dioxygène, et sa réduction, n'est possible que si le site actif est réduit *i.e.*, si au moins deux électrons sont présents au niveau de la CcO. La compréhension des processus de transfert des électrons au sein de la cytochrome *c* oxydase, autre sujet étudié dans cette thèse, est donc un point clé de l'élucidation du mécanisme de réduction de l'oxygène par la CcO.

2 Fonction et régulation de la cytochrome *c* oxydase.

La théorie endosymbiotique propose que l'acquisition de la capacité à réduire l'oxygène par les Eucaryotes est liée à l'entrée en symbiose d'une eubactérie aérobie ancêtre de la mitochondrie, avec un Eucaryote primitif anaérobie (Margulis 1970; Margulis & Bermudes 1985; Gray *et coll.* 1999; Gray *et coll.* 2001) ou avec un *Archeon* comme le suggèrent des études récentes (Emelyanov 2003). La présence d'une double membrane mitochondriale, l'existence d'un génome et d'un appareil de transcription montrant une grande similitude avec certaines bactéries (par exemple *Rickettsia prowazekii*), ainsi que l'absence d'épissage sont considérés comme des faits supportant cette théorie (Andersson *et coll.* 1998). Selon cette hypothèse, l'eubactérie qui vit en symbiose serait un représentant des bactéries pourpres (sous groupe *Rhodobacter*) (Yang *et coll.* 1985; Woese 1987). La mitochondrie possède son propre génome codant pour de nombreuses protéines essentielles, notamment celles impliquées dans le cycle de Krebs et dans la respiration.

2.1 Les chaînes respiratoires.

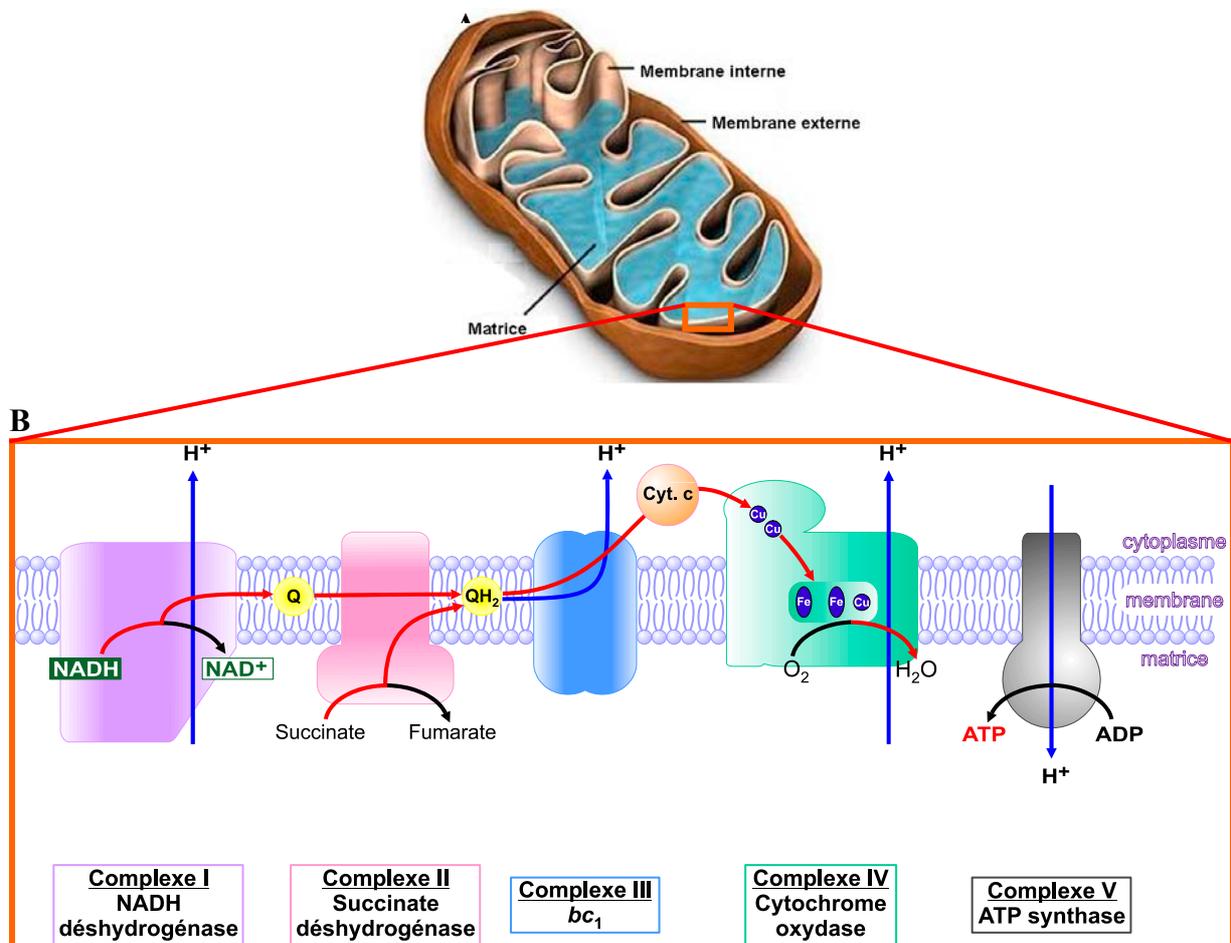
L'une des principales fonctions des mitochondries est la production de composés chimiques hautement énergétiques. Cette énergie de stockage est obtenue par oxydation de molécules hautement réduites, les nutriments, permettant, dans un premier temps, la formation de dinucléotides réduits : Nicotinamide Adénosine Dinucléotide (NADH) et Flavine Adénosine Dinucléotide (FADH). Ces dinucléotides réduits, de potentiel redox négatif, délivrent des électrons à une série de protéines membranaires qui constituent la *chaîne respiratoire*. Elles utilisent l'énergie libre (ΔG) associée à des réactions d'oxydoréduction pour créer un gradient de protons. Ce gradient permet ensuite la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) effectuée par l'ATP synthase. L'ensemble de ces processus est appelé phosphorylation oxydative.

Ce processus, expliqué par la théorie chimiosmotique {Mitchell, 1961 #92}, est localisé uniquement au niveau de structures membranaires mitochondriales. Selon ce concept, qui a valu à Mitchell le prix Nobel en 1978, il n'existe pas d'intermédiaire chimique entre les réactions d'oxydoréduction et la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP), mais une différence de potentiel et de pH est constituée au niveau d'une membrane, désignée par le terme "force proton-motrice". L'énergie libérée par l'entrée des protons au niveau de l'ATP synthase permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). La théorie chimiosmotique, dont la validité a été démontrée dans un premier temps au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, a été par la suite généralisée à de nombreux phénomènes : la photosynthèse, le

déplacement flagellaire des bactéries,

2.1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale.

Les mitochondries sont des organelles ovoïdes, formées de deux membranes, une externe et une interne, qui délimitent l'espace intermembranaire et l'intérieur de la mitochondrie nommée matrice (fig 2.1A). La membrane interne forme de nombreuses invaginations, les crêtes mitochondriales, qui augmente la surface d'échange entre la matrice et l'espace intermembranaire. Le nombre et la taille des mitochondries varient avec l'activité cellulaire et les tissus.



2.1 : A : Représentation schématique d'une mitochondrie animale.

B : représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les flèches bleues représentent les pompages de protons les flèches rouges montrent les transferts d'électrons (Tirée de la thèse de G. Lipowski 2003).

La chaîne respiratoire mitochondriale se situe au niveau de la membrane interne des mitochondries (Racker 1977) (fig 2.1 B). Elle est formée principalement de cinq complexes. Chaque complexe contient des cofacteurs possédant une fonction d'oxydoréduction et catalyse le transport des électrons, provenant initialement soit du NADH soit du succinate. Le passage des

électrons à travers la chaîne respiratoire s'accompagne d'une diminution graduelle de l'énergie libre stockée, ce qui correspond à une augmentation du potentiel redox E° (figure 2.2). Les complexes sont fonctionnellement reliés par des transporteurs d'électrons mobiles : soit quinol soit cytochrome *c* soluble.

Si le passage des électrons dans un complexe s'accompagne d'une diminution de E° suffisante, l'énergie ainsi libérée permet le transfert de protons à travers la membrane interne. Les complexes I, III et IV pompent ainsi des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe V fonctionne en créant un pore qui utilise l'énergie contenue dans la différence de concentration de H^+ (~2 unités de pH) et de charge (~80 mV) pour synthétiser une molécule riche en énergie, l'ATP, en grande quantité.

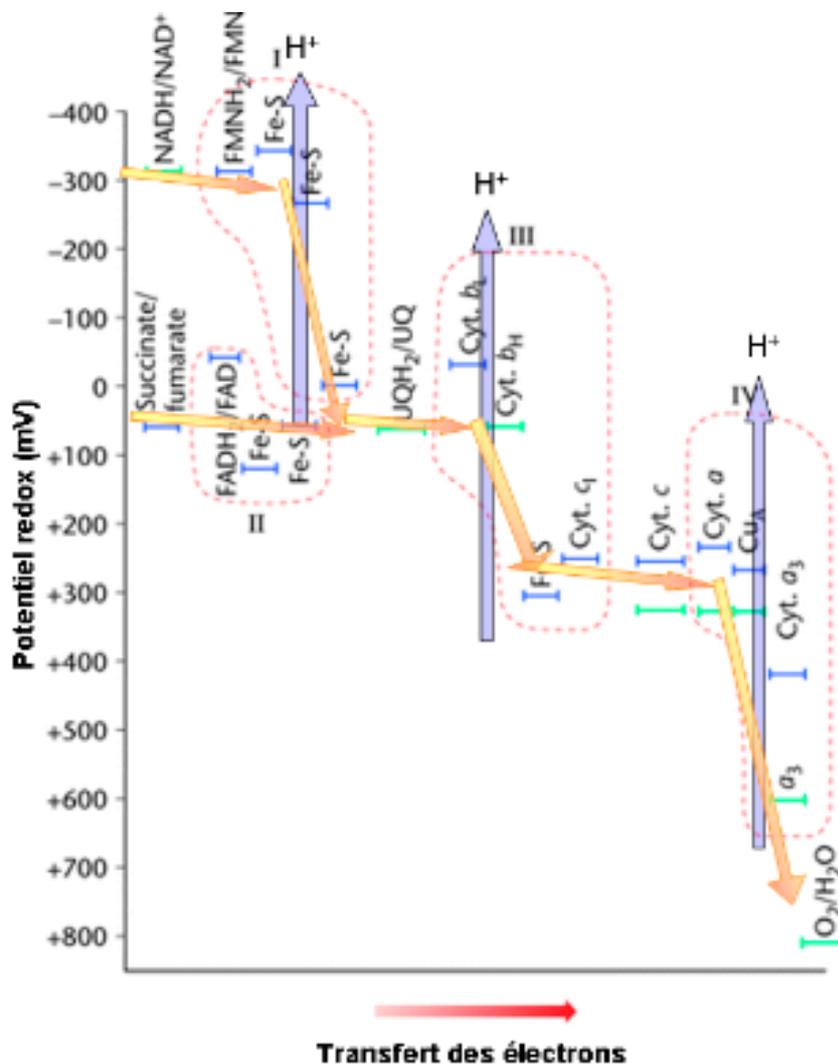


Figure 2.2 : Schéma indiquant le potentiel redox des cofacteurs des différents complexes de la chaîne respiratoire. Les traits bleus horizontaux représentent les potentiels mesurés et les traits verts, les potentiels dont la valeur varie avec l'environnement. Les flèches bleues indiquent l'existence d'un transfert de protons associé au passage des électrons, les flèches jaunes matérialisent les voies de transfert des électrons.

D'après Hansford, Nature Encyclopedia of Life Science 2000 (Hansford 2000)

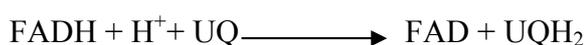
2.1.1.1 Le complexe I.

Le NADH:ubiquinone oxydoréductase, ou complexe I, a une double fonction catalytique : la réduction de l'ubiquinone (UQ) par le NADH, et le transfert de protons. Des modèles de la structure tridimensionnelle du complexe I mitochondrial montrent un complexe de 48 sous-unités (SU), dont 14 sont codées par le génome mitochondrial (Friedrich & Bottcher 2004), et contenant de nombreux cofacteurs : une flavine mononucléotide (FMN), et 7 centres Fer Soufre (Fe-S). Les 7 SU mitochondriales cytosoliques situées coté matrice contiennent l'ensemble des cofacteurs de ce complexe. Ces protéines fixent le NADH et catalysent le transfert des électrons et des protons vers les ubiquinones. Ce transfert est associé au passage de quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (Vinogradov & Grivennikova 2001) : $\text{NADH} + \text{UQ} + 5\text{H}^+_{\text{mat}} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{UQH}_2 + 4\text{H}^+_{\text{inter}}$

2.1.1.2 Le complexe II.

La succinate:ubiquinone oxydoréductase, ou complexe II, catalyse la transformation du succinate en fumarate. Cette réaction, appartenant au cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs), réduit également une molécule de flavine adénosine dinucléotide (FAD). Ce cofacteur, lié de façon covalente à la protéine, transfère alors ses électrons et son proton à l'ubiquinone via trois centres Fe-S (Cecchini *et coll.* 2003).

Le complexe II peut être considéré comme résultant de la fusion de deux enzymes : une succinate déshydrogénase et une ubiquinone réductase. L'association de ces deux fonctions permet d'optimiser l'utilisation du FAD :



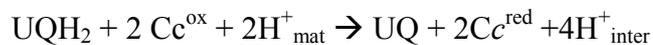
2.1.1.3 Le pool quinone.

L'ubiquinol (UQH₂) est formé par les complexes I et II à partir d'ubiquinone (UQ). Sa solubilité dans les membranes permet le transport de 2 électrons et de 2 protons vers le complexe III (Turunen *et coll.* 2004). On nomme "pool quinone" l'ensemble de ces molécules qu'elles soient réduites ou oxydées.

2.1.1.4 Le complexe III.

L'ubiquinol:cytochrome *c* oxydoréductase est aussi appelé complexe *bc* ou complexe III (Berry *et coll.* 2000). Il utilise le pouvoir réducteur du quinol pour transférer des protons vers l'espace intermembranaire ; les électrons étant alors cédés au cytochrome *c* (Cc). Ce complexe

constitue un dimère de 11 SU, portant chacun trois types de cofacteurs impliqués dans le transfert des électrons et des protons : 2 hème de type *b*, un hème de type *c*, et une protéine contenant un centre 2Fe-2S aussi appelé protéine Rieske (Rieske *et coll.* 1964; Tzagoloff *et coll.* 1965; Lancaster 2003). Ces cofacteurs sont portés par les trois sous-unités codées par le génome mitochondriale. Le complexe *bc* catalyse la réaction suivante :



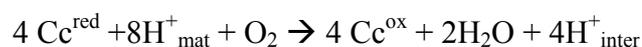
2.1.1.5 Le cytochrome *c*.

Le cytochrome *c* mitochondrial est une protéine soluble de 12,5 kDa contenant un hème de type *c* lié de façon covalente à la chaîne peptidique par deux cystéines. Il transporte les électrons depuis le complexe *bc* jusqu'à la cytochrome *c* oxydase (CcO) (Banci & Assfalg 2001).

2.1.1.6 Le complexe IV.

La cytochrome *c*:oxygène oxydoréductase, aussi appelé complexe IV, ou cytochrome *c* oxydase *aa*₃ (CcO), est un homodimère de 13 SU comprenant de nombreux cofacteurs, notamment deux hèmes *a* et *a*₃ qui ont donné son nom à l'oxydase, et deux centres cuivre. La CcO catalyse la réduction de l'oxygène en eau à partir des électrons fournis par le cytochrome *c*. L'énergie de cette réaction permet de transférer quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire par molécule d'oxygène réduite (Iwata *et coll.* 1995). Cette protéine est l'accepteur terminal d'électrons de la chaîne respiratoire. La grande différence de potentiel redox entre le cytochrome *c* et l'oxygène autorise le transfert de quatre protons par molécule de dioxygène réduit. En plus des protons pompés, quatre autres protons sont consommés, augmentant la force proton-motrice entre la matrice et l'espace intermembranaire.

La réaction peut être résumée ainsi :



Mon travail de thèse a consisté en l'étude du transfert interne des électrons dans ce complexe ainsi que l'interaction de son équivalent bactérien avec le monoxyde d'azote (NO).

2.1.1.7 L'ATP synthase.

Le transfert de protons au niveau des complexes I, II et IV crée une force proton-motrice qui permet la synthèse d'ATP au niveau du complexe V ou ATP synthase. Ce complexe protéique est formé de deux parties : F₀ et F₁. F₀ est membranaire et forme un pore, alors que F₁ comprend une partie soluble située côté matrice catalysant la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). F₁ est constituée d'une partie mobile (ou rotor) et d'une partie fixe

(ou stator) (Abrahams *et coll.* 1994). Ce mouvement de rotation résultant du passage des protons par le pore, fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP (Sabbert *et coll.* 1996; Boyer 1999).

2.1.1.8 Les supercomplexes.

Il a été montré récemment que des interactions fortes existent entre les complexes de la chaîne respiratoire (Schagger 2002). Les termes de "supercomplexe" et de "respirasome" sont utilisés pour décrire ces associations macromoléculaires (>2 000 kDa). Les études menées *in vivo* et *in vitro* sur ces complexes solubilisés indiquent qu'une molécule de complexe I est associée avec un dimère de complexe III ainsi qu'au complexe IV (une à quatre copies). Par ailleurs, le complexe V est un dimère (Schagger & Pfeiffer 2000).

Ces interactions amélioreraient l'efficacité de la chaîne respiratoire en s'affranchissant des phénomènes de diffusion. De plus, ces interactions limiteraient les risques de réactions secondaires pouvant aboutir à la formation de molécules toxiques. Par exemple, l'association entre le complexe I et le dimère du complexe III, conduirait à la séquestration de la semiquinone, dont l'interaction avec l'oxygène produit le radical superoxyde toxique (Kotlyar & Vinogradov 1990; Schagger 2002). Par ailleurs, il a été montré que certaines pathologies mitochondriales résultent d'un défaut d'assemblage du "supercomplexe" (Schagger, 2002).

2.1.2 Les chaînes respiratoires de *Paracoccus denitrificans*.

Comme introduit précédemment, la théorie endosymbiotique considère que les mitochondries sont issues de bactéries entrées en symbiose avec les Eucaryotes primitifs (ou des *Archea*). En effet, la chaîne respiratoire mitochondriale est très similaire à celle rencontrée chez les bactéries vivant en condition aérobie. Ceci s'applique aux bactéries de la sous famille des protéobactéries de laquelle serait issue la mitochondrie et notamment *Paracoccus denitrificans* et *Rhodobacter sphaeroides*. Cette origine commune a été confirmée par l'obtention des structures tridimensionnelles du complexe IV chez l'oxydase mitochondriale (Tsukihara *et coll.* 1995), de *P. denitrificans* (Iwata *et coll.* 1995) et de *R. sphaeroides* (Svensson-Ek *et coll.* 2002).

Différentes bactéries modèles ont été étudiées afin de comprendre le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces systèmes modèles bactériens sont attractifs de par la constitution plus simple de chaque complexe, l'absence des sous-unités codées par le génome nucléaire et l'existence d'outils de biologie moléculaire. En effet, comme une mitochondrie possède plusieurs copies de son génome, il est difficile de modifier l'ensemble des molécules d'ADN mitochondrial. De plus, la nécessité absolue de la respiration aérobie chez les mammifères, limite, *a priori*, la mutagenèse à des mutations non létales.

Nous nous sommes intéressés à la cytochrome *c* oxydase *aa₃* de *P. denitrificans*. La

chaîne respiratoire aérobie de *P. denitrificans* est formée de cinq complexes et son fonctionnement est très similaire à celui de la chaîne respiratoire mitochondriale.

A côté de la cytochrome *c* oxydase *aa*₃, homologue de l'oxydase mitochondriale (Ludwig & Schatz 1980; Haltia *et coll.* 1988), *P. denitrificans* possède deux autres oxydases terminales (De Gier *et coll.* 1992) : la quinol oxydase *ba*₃ (Richter *et coll.* 1994) et la cytochrome *c* oxydase *cbb*₃ (De Gier *et coll.* 1992). L'oxydase *cbb*₃ est adaptée à la microaérobie ([O₂] : 3 à 22 nM), comme l'indique son affinité élevée pour l'oxygène (K_m= 7 nM) (Preisig *et coll.* 1993). Ces trois oxydases, *aa*₃, *ba*₃ et *cbb*₃, appartiennent à la super famille des oxydases terminales dites à "hème-cuivre" (Saraste *et coll.* 1991; Saraste 1994). Celle-ci est caractérisée par une catalyse de la réduction de l'oxygène en eau réalisée au niveau d'un site catalytique binucléaire hème-cuivre, ainsi que par la présence d'un hème de bas spin véhiculant les électrons jusqu'à ce site actif.

L'utilisation des chaînes respiratoires décrites précédemment n'est possible qu'en présence d'oxygène. Dans des conditions anaérobiques, *P. denitrificans* peut utiliser différents composés azotés (nitrate et nitrite par exemple) comme accepteur terminal d'électrons (Haddock & Jones 1977; Van Verseveld *et coll.* 1977; Boogerd *et coll.* 1980; Stouthamer *et coll.* 1982). Ces conditions métaboliques sont appelées dénitrification (Zumft 1997). Quatre étapes sont nécessaires pour réduire le nitrite en azote moléculaire (figure 2.3).

Lors de la dénitrification, les NO réductases catalysent la réduction du monoxyde d'azote (NO) en oxyde nitreux (N₂O). Ces enzymes sont particulièrement intéressantes car elles possèdent une très forte homologie de séquence avec les oxydases (Richter & Ludwig 2003). Ce sont des protéines membranaires dont la sous-unité catalytique contient deux hèmes quasi-orthogonaux, orientés perpendiculairement à la membrane. Le site actif est formé par l'un des hèmes et un atome de fer, remplaçant le cuivre présent chez les cytochrome *c* oxydases. La réduction n'est possible que lorsque deux molécules de NO sont présentes dans le site actif, probablement l'une fixée à l'hème et l'autre sur le fer non hémique. Ce processus s'accompagne du pompage de protons et participe ainsi à la création du gradient de protons (Hendriks *et coll.* 2000).

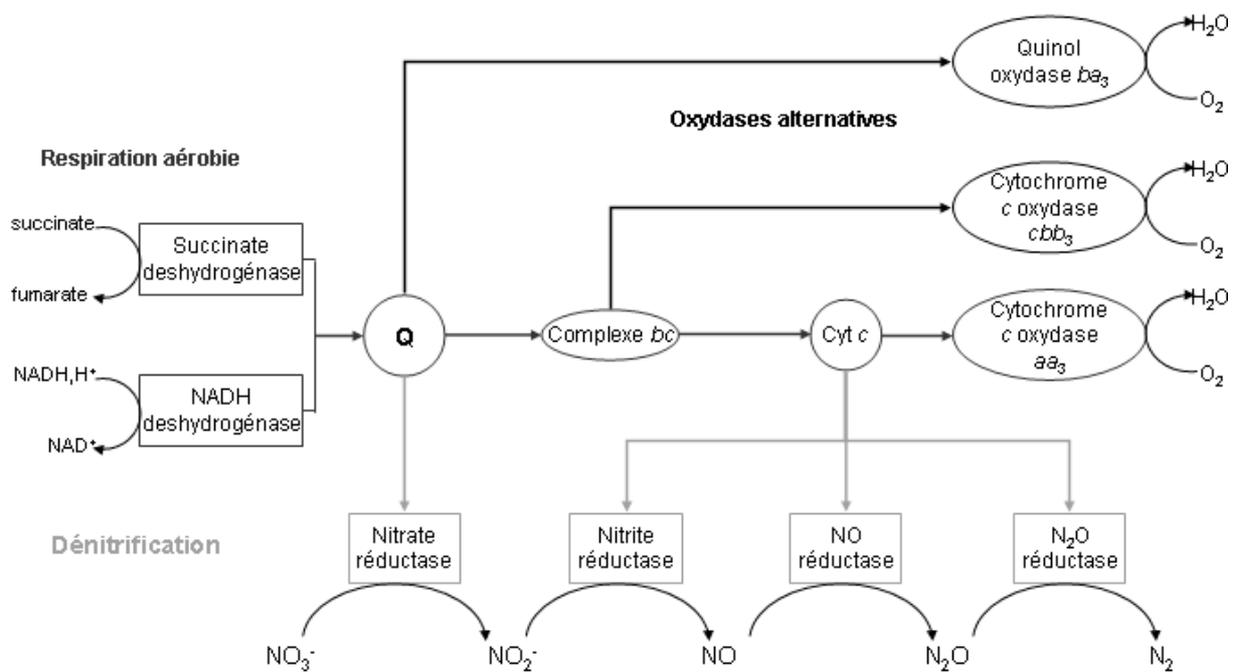


Figure 2.3 : Schéma synthétisant les différentes chaînes de respiration aérobie et de dénitrification de *Paracoccus denitrificans*.

2.2 La Cytochrome c Oxydase.

La cytochrome *c* oxydase (ou ferrocyclochrome *c*:oxygène oxydoréductase; EC 1.9.3.1) appartient à la super-famille des oxydases terminales à hème-cuivre. Les membres de cette famille présentent une séquence en acides aminés de la sous-unité I très conservée, et un site catalytique bimétallique constitué d'un hème et d'un atome du cuivre (Garcia-Horsman *et coll.* 1994).

Les oxydases à hème cuivre sont ubiquitaires chez les organismes aérobiques, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères et aux plantes supérieures. L'obtention des structures de CcO à partir de mitochondries de mammifères (cœur de bœuf) (Yoshikawa *et coll.* 1998) et de bactéries : *Paracoccus denitrificans* (Ostermeier *et coll.* 1997), *Rhodobacter sphaeroides* (Svensson-Ek *et coll.* 2002) et *Thermus thermophilus* (Soulimane *et coll.* 2000) a permis de mieux comprendre leur fonctionnement.

2.2.1 Structure de l'oxydase *aa₃* de *Paracoccus denitrificans*.

La CcO *aa₃* a été originellement isolée sous forme d'un complexe de deux sous-unités (Ludwig & Schatz 1980). Par la suite, l'utilisation de détergents plus "doux" a permis l'identification de deux nouvelles sous-unités (Haltia *et coll.* 1988). Les trois plus grosses sous-unités présentent une forte homologie avec les sous-unités codées par le génome mitochondrial de l'oxydase eucaryote. L'existence de la quatrième sous-unité, spécifique des bactéries, n'a été confirmée que par les résultats cristallographiques (Iwata *et coll.* 1995).

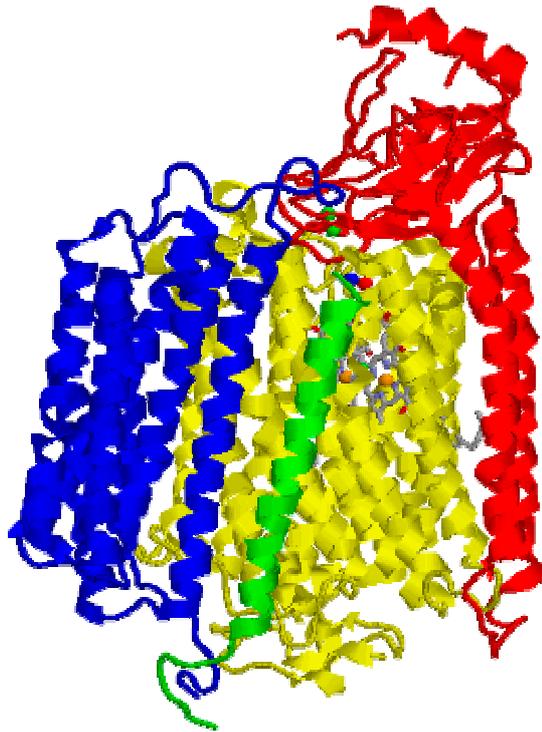


Figure 2.4 : Structure 3D de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* (code 1QLE, (Iwata *et coll.* 1995)); représentation en mode "cartoon". La sous-unité I est colorée en jaune, la SU II en rouge, la SU III en bleu et la SU IV en vert. Les cofacteurs métalliques sont indiqués par des sphères dont le code couleur est le suivant : atomes de fer sont dorés et hèmes en gris, les atomes de cuivre sont vert, de calcium rouge et le site magnésium / manganèse en bleu

2.2.1.1 La sous-unité I et le site actif.

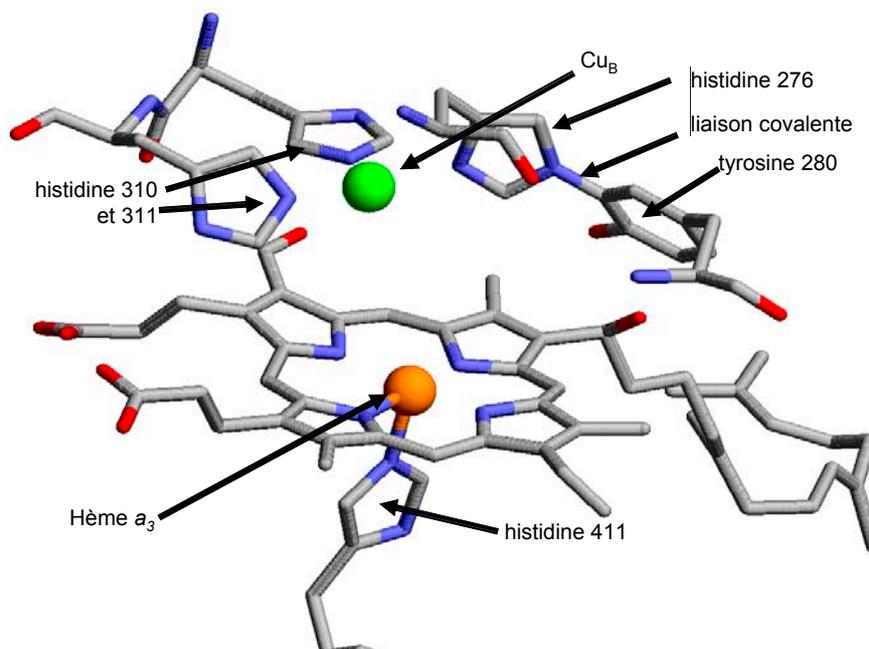


Figure 2.5 : Site actif de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*. Les acides aminés liants les atome de fer (doré) et de cuivre (vert) ainsi que la tyrosine covalamment liée à une des histidines liées au Cu_B sont montrés

La structure 3D, résolue à la précision de 2,8 Å (Fig 2.4), a permis de découvrir l'organisation générale de l'oxydase (Iwata *et coll.* 1995) (code PDB 1QLE): 4 SU transmembranaires et les cofacteurs : deux hèmes de type *a*, trois atomes de cuivre répartis en deux centres, un atome de calcium et un atome de manganèse ou de magnésium. Les SU I et II, qui contiennent l'ensemble des cofacteurs redox, ont été par la suite cristallisées à la résolution de 2,4 Å (Ostermeier *et coll.* 1997) (code PDB 1AR1) décrivant ainsi avec plus de précision le site actif.

La sous-unité I est fortement ancrée dans la membrane avec 12 hélices disposées en 3 groupes de quatre, formant une hélice à trois bras. Les extrémités N et C terminales des 558 acides aminés (aa) sont exposées côté cytoplasmique. Trois centres redox : deux hèmes de type *a* et un cuivre B (Cu_B), sont liés à cette sous-unité et situés au tiers de la profondeur de la membrane à partir du périplasma. L'hème *a*, de bas spin, est relié au polypeptide par deux ligands axiaux, His 94 et His 413, alors que l'hème *a*₃, de haut spin, est lié par un seul ligand axial, His 411. L'autre face de l'hème *a*₃ est libre et permet la fixation de l'oxygène ou d'autres ligands diatomiques. Les hèmes, tous deux perpendiculaires à la membrane, forment un angle de 108°, ils sont distants de 7 Å de bord à bord et 13,2 Å séparent les atomes de fer.

L'hème *a*₃ couplé avec le cuivre (Cu_B) situé à proximité, forment le centre binucléaire (Fig. 2.5) où l'oxygène se fixe, puis est réduit en eau. Cu_B est lié par trois histidines qu'il soit à l'état réduit ou oxydé (Harrenga & Michel 1999). Il est distant du fer de l'hème *a*₃ de 5,2 Å (dans la structure à 4 sous-unités). L'une des histidines (H276) est liée de façon covalente à une tyrosine (Y280). Cette liaison très inhabituelle, entre l'azote Nε2 de l'histidine et le carbone Cε2 de la tyrosine, paraît caractéristique de la famille des oxydases à "hème cuivre". Différents rôles fonctionnels de cette liaison ont été proposés (Ostermeier *et coll.* 1997; Buse *et coll.* 1999; Lambry *et coll.* 1999; Pinakoulaki *et coll.* 2002).

L'oxygène se fixe au site actif réduit, tout d'abord au Cu_B puis au Fea_3 (Wikstrom *et coll.* 1998). La réduction de l'oxygène en eau est alors rapide (~200 μs (Proshlyakov *et coll.* 1998)). La présence de ces deux sites de fixation au sein même du site actif a également été observé pour le monoxyde de carbone (CO) qui se lie tout d'abord au Cu_B puis à l'hème *a*₃ (Einarsdottir 1995). Il a également été montré que deux molécules de NO étaient susceptibles de se fixer simultanément au site actif, une sur le fer et l'autre sur le Cu_B (Brudvig *et coll.* 1980; Zhao *et coll.* 1994). Cette dernière propriété renforce la ressemblance avec la NO réductase.

2.2.1.2 La sous-unité II.

La sous-unité II a une structure bipartite : sa partie N terminale est formée de deux hélices transmembranaires, et du côté périplasmique se trouve un domaine hydrophile, replié en

tonneau β de dix feuillets, contenant le centre cuivre A (Cu_A). Ce centre est constitué de deux atomes de cuivre, distant de 2,6 Å, dans un état de valence mixte ($\text{Cu}^I - \text{Cu}^{II}$) lorsqu'il est oxydé. Les électrons provenant du cytochrome *c* arrivent à cette sous-unité au niveau du centre Cu_A .

2.2.1.3 La sous-unité III.

La sous-unité III, entièrement membranaire, est repliée en 7 hélices réparties en deux groupes de deux et cinq hélices, dans un arrangement en "V", avec l'extrémité N terminale située à l'intérieur. Pour *R. sphaeroides*, il a été démontré que la sous-unité III stabilisait le centre binucléaire (Bratton *et coll.* 1999). Ce n'est pas le cas chez *P. dentirificans* (Haltia *et coll.* 1999), où l'absence de la SU III ne modifie que la vitesse de la réaction, pas la fonction de l'enzyme.

2.2.1.4 La sous-unité IV.

La sous-unité IV des enzymes bactériennes (*P. dentirificans* et *R. sphaeroides*) se résume à une simple hélice transmembranaire en contact avec les SU I et III. Sa séquence n'a pas d'analogie avec des sous-unités nucléaires de l'oxydase mitochondriale mais un grand degré d'homologie existe entre les SU IV de *P. dentirificans* et de *R. sphaeroides* (Svensson-Ek *et coll.* 2002). La délétion du gène codant pour cette sous-unité donne un complexe à trois sous-unités ne révélant aucune modification structurale ou fonctionnelle de l'enzyme.

2.2.1.5 Autres métaux (hors transfert d'électrons).

Des sites de liaison pour des ions métalliques sans fonction oxydoréductrice connue ont été découverts à la fois chez les oxydases bactériennes et mitochondriales. Un site de fixation du magnésium a été découvert à l'intersection des SU I et II chez les oxydases bactériennes (Iwata *et coll.* 1995; Soulimane *et coll.* 1995; Svensson-Ek *et coll.* 2002) et mitochondriales (Tsukihara *et coll.* 1995). Dans l'enzyme isolée à partir de *P. denitrificans* cultivée en milieu standard contenant des ions manganèse, ce site est occupé par un atome de manganèse qui donne un signal RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) caractéristique. Cet ion Mn peut être remplacé par un ion Mg sans que cela n'affecte la fonction enzymatique (Seelig *et coll.* 1981). La fonction de ce site n'est pas clairement établie, un rôle structural de cohésion entre les SU I et II a été suggéré. Il pourrait également être impliqué dans le transfert de protons ou d'eau vers l'extérieur de la protéine (Schmidt *et coll.* 2003).

Un site de fixation du calcium a été mis en évidence au niveau de l'hélice I de la sous-unité I. Un atome de calcium y est toujours fortement fixé dans les oxydases bactériennes (Pfitzner *et coll.* 1999), par contre l'occupation de ce site est partielle pour l'enzyme mitochondriale isolée (Yoshikawa *et coll.* 1998). Le rôle de ce site n'est pas déterminé.

2.2.2 Structure de l'oxydase mitochondriale.

La structure à l'état oxydé obtenue à la résolution de 2,8 Å (Tsukihara *et coll.* 1996), a été par la suite raffinée à 2,3 Å (Fig. 2.6) dans différents états redox et de ligation (Yoshikawa *et coll.* 1998). Les structures des sous-unités de la cytochrome *c* oxydase de cœur de bœuf codées par le génome mitochondrial présentent une grande similarité avec leurs équivalents bactériennes (Tsukihara *et coll.* 1995; 1996; Yoshikawa *et coll.* 1998). Elles sont considérées comme le "cœur fonctionnel" de l'oxydase. Treize sous-unités sont distinguées, dont trois présentent une forte homologie avec les sous-unités I, II et III de l'oxydase bactérienne. L'environnement des métaux oxydoréducteurs de ces sous-unités est quasiment identique à celui décrit pour *P. denitrificans* (Richter & Ludwig 2003).

Les dix sous-unités codées par le noyau entourent le "cœur bactérien". Deux monomères d'oxydase, de 13 sous-unités chacun, forment un dimère fonctionnel de plus de 400 kDa. Les sous-unités IV, VIa, VIc, VIIb, VIIc et VIII traversent chacune la membrane par une hélice, alors que les sous-unités Va et Vb, qui possèdent un site de fixation du Zn, se trouvent du côté matrice, et VIb est dans l'espace intermembranaire.

Ces sous-unités sont impliquées dans la régulation de l'activité de l'oxydase. Ainsi le rapport ATP/ADP, présent dans la mitochondrie, est susceptible de modifier le fonctionnement de l'enzyme. Il a été montré que la sous-unité IV, via la fixation d'ATP, participe à cet effet (Kadenbach & Arnold 1999). Cette fixation régule allostériquement l'oxydase, la fixation d'ATP sur ce site réduit le nombre de protons pompés par électrons de 1 à 0,5. Mais la régulation de l'activité de CcO par les nucléotides ne se résume pas à cette seule interaction : dix sites de fixation ont été recensés (Napiwotzki *et coll.* 1997; Napiwotzki & Kadenbach 1998). De plus, la régulation de l'activité de l'oxydase par l'ATP varie selon le tissu d'où l'oxydase est extraite. Ceci s'explique par la présence d'isoformes "tissus-spécifiques" des sous-unités VIa, VIIa et VIII (Ludwig *et coll.* 2001). Une telle dépendance de l'activité enzymatique en fonction du rapport ADP/ATP n'est pas observée chez les oxydases bactériennes (Ludwig *et coll.* 2001).

D'autres molécules influent sur l'activité de la cytochrome *c* oxydase, par exemple la cardiolipine (ou diphosphatidyl glycérol). Lorsque cette molécule est oxydée une diminution de l'activité oxydase est observée, associée à l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Milatovic *et coll.* 2001). Il a été montré que le monoxyde d'azote (NO) régule le fonctionnement de l'oxydase par des mécanismes assez complexes (Brown & Cooper 1994; Cleeter *et coll.* 1994; Schweizer & Richter 1994) qui seront décrits plus loin (chapitre 2.4)

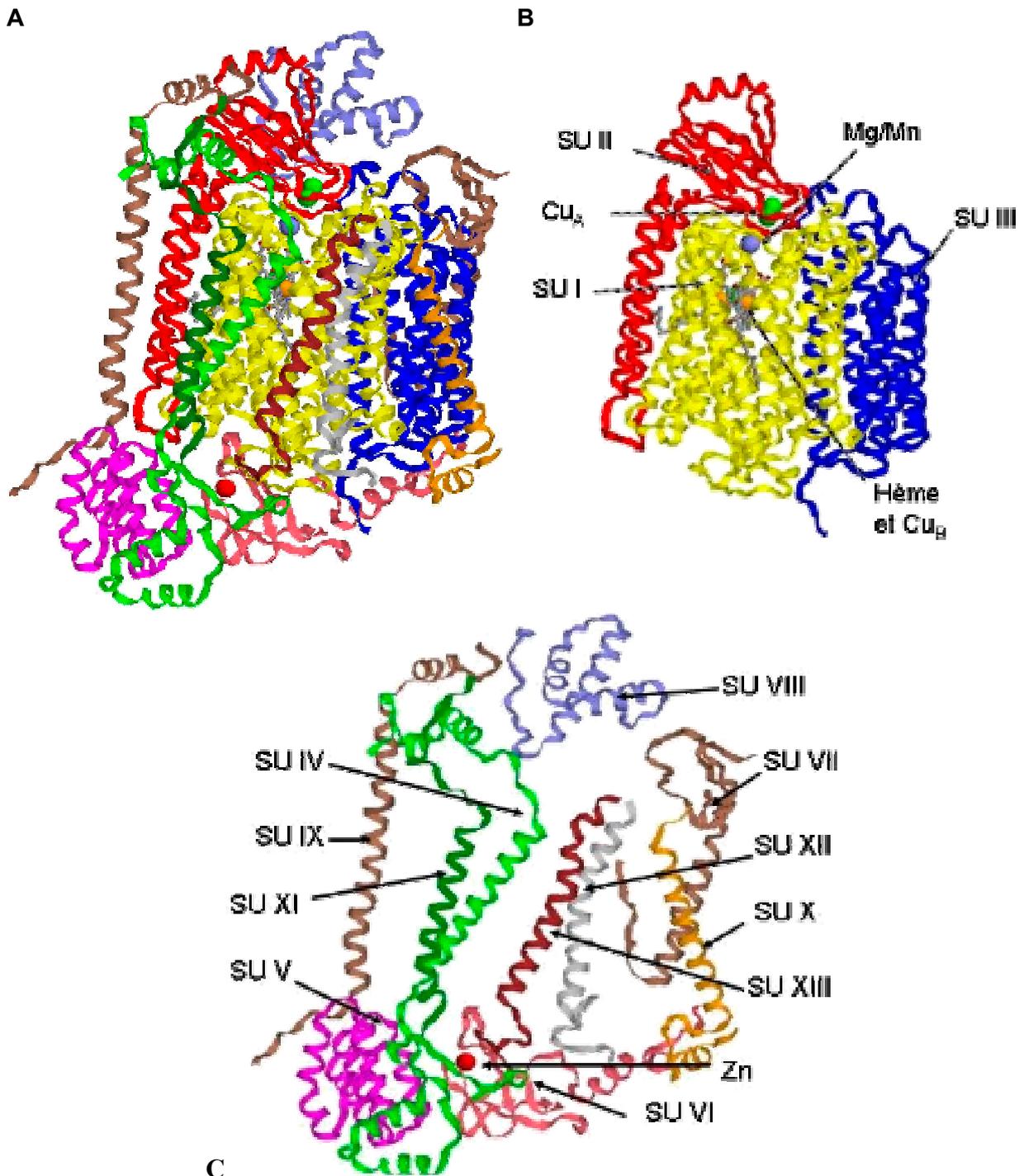


Figure 2.6 : Structure 3D de la cytochrome c oxydase mitochondriale (code PDB 2OCC, (Yoshikawa *et coll.* 1998)) A) les 13 sous-unités sont représentées selon le code suivant: I jaune, II rouge, III bleu, IV vert, V violet, VI rose, VII beige, VIII lavande, IX marron, X or, XI vert foncé, XII gris, XIII brun. Les atomes métalliques sont indiqués par des sphères de couleur le fer : or, le cuivre : vert, le magnésium : bleu et le zinc : rouge
A) Structure complète, **B)** Les sous-unités mitochondriales, **C)** Les sous-unités nucléaires

Une mutation de l'oxydase peut modifier le fonctionnement de la chaîne respiratoire et provoquer des pathologies graves (Richter & Ludwig 2003). Par exemple, certaines myopathies sont dues à l'apparition d'un codon stop dans le gène codant pour la sous-unité I (Karadimas *et*

coll. 2000). De plus, l'ADN mitochondrial ayant un taux de mutation élevé, le risque de générer des protéines non fonctionnelles est fort. Néanmoins, la présence de plusieurs copies de l'ADN génomique par mitochondrie compense ce risque. Il y a un effet de seuil : pour qu'une mutation d'un gène affecte le phénotype, il faut qu'il ne reste plus de copie du gène non muté. Une mutation des SU codées par le génome nucléaire peut également perturber l'activité catalytique de l'oxydase (Richter & Ludwig 2003).

2.2.3 Mécanisme fonctionnel.

L'oxydase a une double fonction, la réduction du dioxygène en eau et le transfert de protons. La réduction de O_2 nécessite $4 e^-$ fournis par le cytochrome *c* et $4 H^+$ provenant de la matrice. La compréhension du mécanisme de fonctionnement de l'enzyme fait l'objet de nombreuses études, sur les oxydases mitochondriales et bactériennes. La fixation de ligands et le transfert interne d'électrons ont fait l'objet de mon travail de thèse.

2.2.3.1 Transfert d'électrons.

Le site actif ne peut fixer l'oxygène et le réduire en eau que s'il est réduit. De nombreuses études sont menées afin de déterminer le cheminement des électrons et leur vitesse de transfert d'un cofacteur à l'autre. Il est maintenant admis que le transfert d'électrons dans la cytochrome *c* oxydase a lieu depuis le cytochrome *c* vers le Cu_A , l'hème *a* et le site actif (hème a_3 et Cu_B) (Michel 1998; Einarsdottir & Szundi 2004) comme indiqué sur le schéma 2.7.

La figure 2.7 synthétise les différentes constantes de temps mesurées pour le transfert d'électrons entre les centres redox de la cytochrome *c* oxydase. La constante de temps déterminée pour le transfert entre le cytochrome *c* et le Cu_A est de $16 \mu s$ lors d'une mesure effectuée lorsque les protéines sont déjà liées (Szundi *et coll.* 2001). Les distances indiquées correspondent à l'éloignement entre les atomes métalliques (Page *et coll.* 2003) et à la distance entre les extrémités des noyaux pyroles des hèmes. Le transfert vers l'hème *a* s'effectue en $80 \mu s$, en bon accord avec les estimations de Regan (Regan *et coll.* 1998). Le temps mesuré pour l'équilibration des électrons entre l'hème a_3 et l'hème *a* est d'environ $3 \mu s$. L'établissement de l'équilibre entre l'hème a_3 et le Cu_B doit être rapide, bien que non mesuré, puisque la distance $Fe_{a_3}-Cu_B$ est de $\sim 5 \text{ \AA}$. Cette distance permet de calculer, une constante de temps k , qui, d'après la règle de Dutton (Page *et coll.* 2003), vaut $k \sim 10^{12} s^{-1}$.

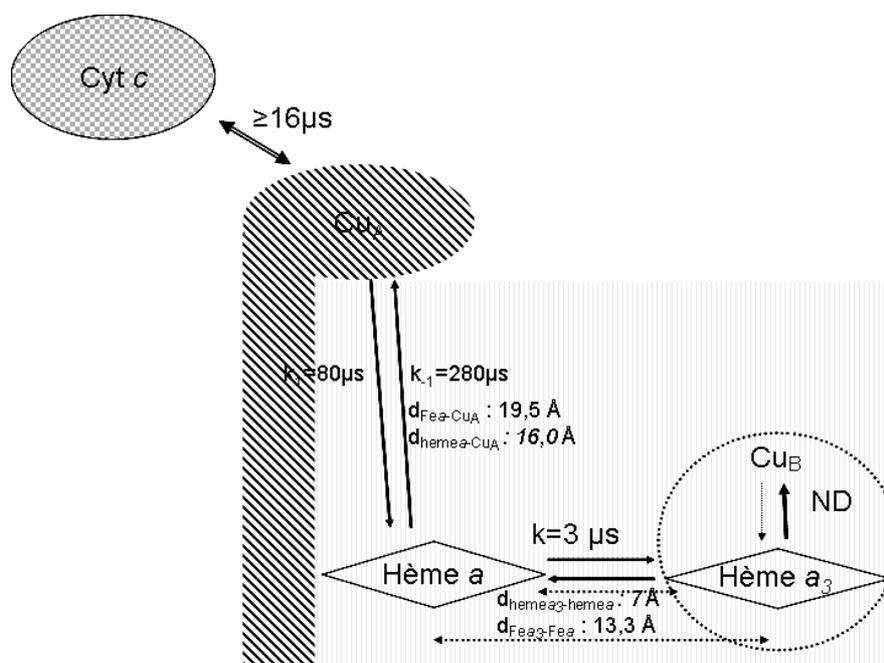


Figure 2.7 : Schéma du cheminement des électrons dans la Cytochrome c oxydase depuis le cytochrome c vers le site actif (Hème a_3 - Cu_B) via le Cu_A et l'hème a .
ND : non déterminé

La mesure de ces temps de transfert a nécessité deux types de méthodes. Premièrement celles étudiant le transfert d'électrons dans le sens physiologique, basées sur l'injection d'électrons au niveau du Cu_A soit par mélange rapide (stopped flow), soit en induisant la production d'électrons, soit par radiolyse, soit par photoinduction. Ces méthodes permettent d'obtenir des informations sur le transfert des électrons du *cyt c* vers le Cu_A et du Cu_A vers l'hème a . Le second type de méthode étudie le transfert d'électrons dans le sens inverse par rapport au sens physiologique (depuis l'hème a_3 vers Cu_A). Elle est basée sur la photodissociation du CO de l'espèce dite "mixed-valence" (MV). Dans cet état redox particulier, l'hème a et le Cu_A sont oxydés (Fea^{3+} , Cu_A^{2+}), et l'hème a_3 et le Cu_B réduit, une molécule de CO étant fixée sur Fea_3 (Fea_3^{2+} -CO, Cu_B^+). Un flash lumineux rompt la liaison entre le Fea_3 et le CO, les électrons localisés sur le Fea_3 sont alors libérés et redistribués vers l'hème a puis vers le Cu_A .

Les constantes de temps trouvées pour le transfert des électrons entre les hèmes sont très inférieures à celles calculées en utilisant la règle de Dutton ($3 \mu s$ mesurée contre $\sim 1,5 ns$ calculée). L'hypothèse d'une phase de transfert plus rapide, suscitant une polémique (Namslauer, 2002; Verkhovsky, 2001), a été étudié durant mon travail de thèse.

2.2.3.2 Cycle catalytique.

Quand le centre binucléaire est réduit par deux électrons, l'oxygène peut se fixer et sa réduction libère deux molécules d'eau. L'accès de l'oxygène au site actif est facilité par sa grande solubilité dans la phase membranaire hydrophobe. Il semble qu'il existe, de plus, des

canaux dans les SU I et III (Riistama *et coll.* 1996). La réduction de l'oxygène est couplée au transfert de protons, mais la chronologie des différentes étapes de la réaction et de ce pompage reste controversée (Michel 1998; Wikstrom *et coll.* 1998; Einarsdottir & Szundi 2004). Néanmoins, la séquence catalytique suivante (Figure 2.8) semble être admise :

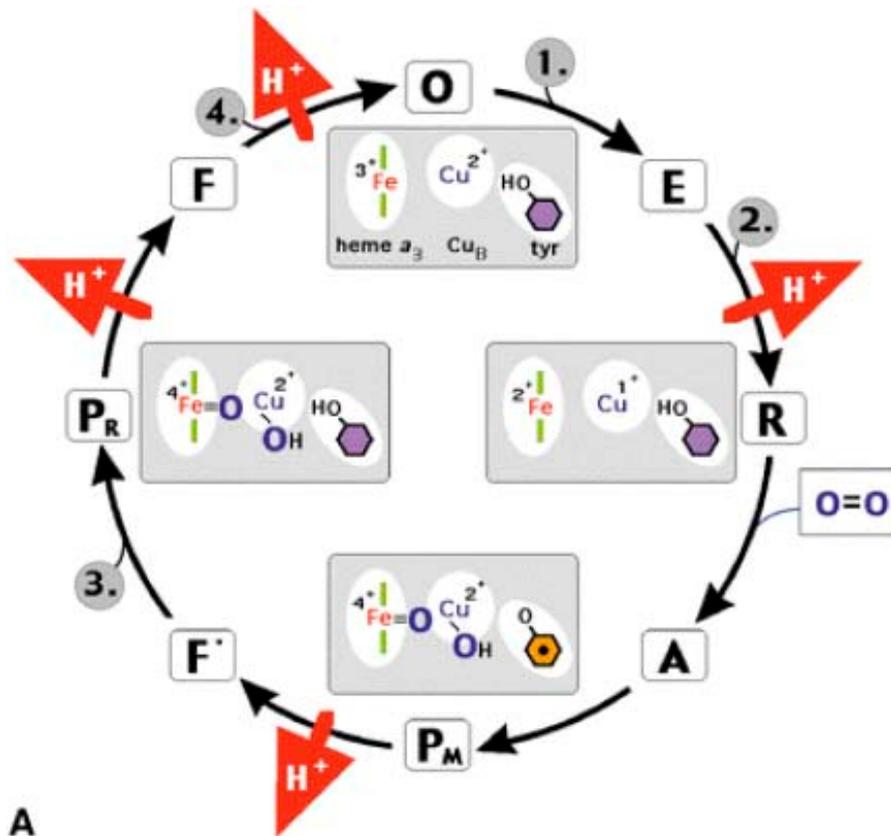


Figure 2.8 : Schéma du cycle de réduction du dioxygène par la cytochrome c oxydase. Les formes intermédiaires sont nommées par les lettres en majuscules ; les cadres gris présentent une vue schématique du site actif avec le fer de l'hème, le Cu_B et la tyrosine 280 (Y244 pour la mitochondriale). L'intermédiaire O représente l'état oxydé, E un état partiellement réduit, R : l'état réduit du site actif, A : l'intermédiaire suivant la fixation du dioxygène, P : désigne historiquement l'intermédiaire « peroxy » (Proshlyakov *et coll.* 1998), F' : état ferryl, P_R « peroxy » réduit et F ferrique. (Provient de Richter 2003).

Il a été montré récemment que l'état P_M, initialement désigné comme un intermédiaire peroxy, correspond en fait au Fea₃ sous la forme oxoferryl (O=Fe⁴⁺) (Proshlyakov, 1998, 2000). La liaison entre les atomes d'oxygène est donc rompue en moins de 200 μs et les deux oxygènes ont le degré d'oxydation de l'eau. Une des questions essentielles posées par ce mécanisme est la provenance des quatre électrons nécessaires à cette réaction. Deux e⁻ proviennent de l'oxydation de Fe²⁺ en Fe⁴⁺, un du Cu_B (Cu⁺ → Cu²⁺), mais l'origine du quatrième électron est moins évidente. Les structures 3D des oxydases de *P. denitrificans* et de mitochondrie montrent que l'une des histidines liées au Cu_B (H276 Pd) forme une liaison covalente avec une tyrosine (Y280

Pd). De plus, des études RPE ont montrées que cette tyrosine émettait alors un signal caractéristique d'un radical (Rich *et coll.* 2002). La tyrosine passerait d'une forme OH à une forme O• libérant ainsi un électron et un proton. L'électron ainsi libéré permettrait la réduction de l'oxygène en une étape, évitant ainsi la formation d'intermédiaires radicalaires toxiques (Proshlyakov 2004). En effet, lors la réduction du dioxygène en eau, des espèces radicalaires très toxiques telle que l'ion superoxyde (O₂⁻), sont susceptibles d'être formées. Par ailleurs l'étude du mutant Tyr→ His en cette position chez *P. denitrificans* (Pinakoulaki *et coll.* 2002) a montré l'importance de cette liaison dans le maintien de la distance entre les deux métaux.

Les étapes suivantes entre P_M et O nécessitent l'entrée de deux électrons pour réduire le radical tyrosine (F) et le fer ferryl de l'hème de haut spin. Trois protons semblent être transférés durant ces étapes mais la chronologie de ce pompage n'est pas clairement définie (Michel 1998; Wikstrom *et coll.* 1998). De plus des cycles réactionnels ramifiés ont été proposés par Wikstrom (Wikstrom 2000; Wikstrom & Verkhovsky 2002) et Einarsdottir (Einarsdottir & Szundi 2004).

2.2.3.3 Transfert de protons.

Lors de la réduction du dioxygène, huit protons sont prélevés du cytoplasme (ou de la matrice pour les mitochondries). La moitié sert à la formation d'H₂O, les protons "chimiques", et les quatre autres, les protons "pompés", sont rejetés de l'autre côté de la membrane (Fig. 2.9). Deux canaux ont été identifiés, chacun dédié à un type de protons (Capaldi 1990; Thomas *et coll.* 1993). La caractérisation des aa décrivant ces canaux, a fait l'objet de très nombreuses études. En particulier, l'aspartate 91 (D91) a été défini comme la porte d'entrée du canal des protons "pompés" et la lysine 242 appartient au canal des protons "chimiques". Cependant, cette hypothèse fait l'objet de controverses (Wikstrom & Verkhovsky 2002). Par contre, aucun canal de sortie des protons n'a, pour l'instant, été défini (Pfitzner *et coll.* 2000; Florens *et coll.* 2001).

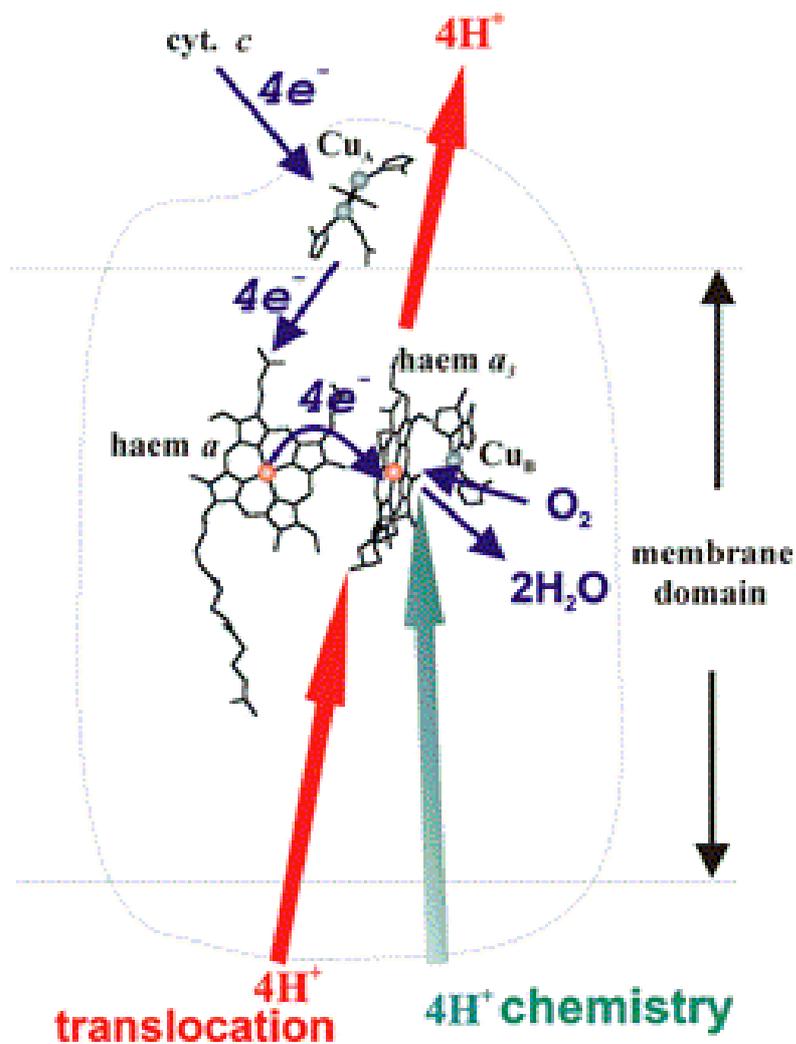


Figure 2.9 : Schéma du cheminement des électrons couplé au transfert de protons à deux canaux, un pour les protons chimiques, l'autre pour les protons pompés.
 Provient de (Wikstrom 2004).

2.3 Le Monoxyde d'azote (NO).

2.3.1 Généralités.

Le monoxyde d'azote ($\bullet\text{NO}$) est une molécule dont les deux atomes sont liés par une liaison σ et une liaison π . L'atome d'oxygène possède par ailleurs deux autres paires d'électrons (e^-) qui forment deux doublets électroniques. L'atome d'azote porte 5 e^- sur sa couche périphérique. Deux sont impliqués dans la liaison avec l'oxygène, deux autres forment un doublet électronique et leur dernier est célibataire. Cet électron radicalaire confère au NO sa grande réactivité.

Le monoxyde d'azote est connu depuis longtemps comme un intermédiaire des processus de dénitrification (Najjar & Allen 1954), notamment chez certaines bactéries (Zumft 1997) et comme un polluant provenant de la combustion des carburants fossiles et de la chimie du nylon, impliqué dans la contamination des eaux et l'effet de serre (Conrad 1996). Récemment, la contribution du NO dans de nombreux processus physiologiques chez l'homme tels que l'immunité, l'apoptose, la régulation de la respiration et de la vasodilatation a été montrée, révélant un rôle ubiquitaire jusqu'alors inconnu.

2.3.2 Le NO chez les mammifères.

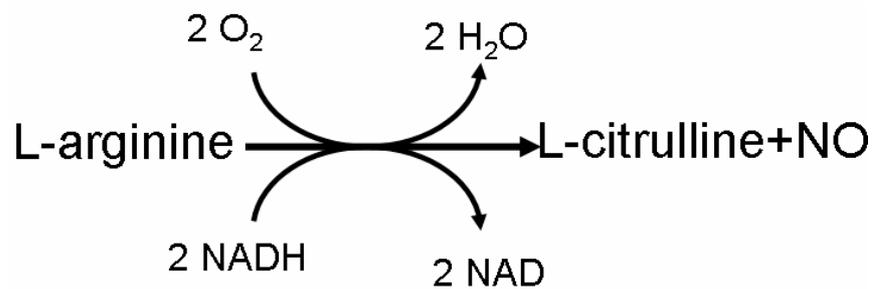
L'utilisation du NO comme médicament est ancienne. En effet, durant de nombreuses années la nitroglycérine a été le médicament de choix pour le traitement des angines de poitrine et dans la prévention des crises cardiaques, mais sans que son mécanisme d'action ne soit connu. Ce n'est qu'en 1977 que l'équipe de F. Murad a montré que la nitroglycérine libérait du monoxyde d'azote ce qui provoquait le relâchement des muscles lisse entourant les coronaires cardiaques (Katsuki *et coll.* 1977). En 1990, la découverte de la production de NO *in vivo* par des enzymes humaines (les NO synthases) a ouvert la porte à de nombreuses perspectives médicales (Bredt & Snyder 1990). L'ensemble de ces découvertes a, d'ailleurs, valu à Furchgott, Murad et Ignarro le prix Nobel de médecine en 1998.

Dans la décennie qui a suivi la découverte de son implication dans la vasodilatation, de nombreux autres rôles du NO ont été mis en évidence : cytotoxicité (Hibbs *et coll.* 1987; Marletta *et coll.* 1988), neuromédiateur, et implication dans la régulation de la respiration, désignant le NO comme une molécule ubiquitaire.

2.3.2.1 Production in vivo.

Le NO est synthétisé dans les cellules par une NO-synthase (NOS). Cette hémoprotéine catalyse la transformation de la L-arginine en NO et L-citrulline. Cette réaction, présentée ci-

dessous, nécessite deux molécules de dioxygène et quatre équivalents réducteurs fournis par deux molécules de NADPH.



Il existe trois isoformes de cette enzyme. On distingue la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS), toutes deux constitutives, et la NOS inducible (iNOS). Suite à la mise en évidence d'une activité NOS dans les mitochondries, l'existence d'une quatrième isoforme a été proposée. Cette hypothèse a été invalidée par la disparition de cette activité chez les souris dont le gène codant pour la nNOS avait été supprimé (Kanai *et coll.* 2004).

Les trois isoformes ont une grande homologie de séquence et de structure (Raman *et coll.* 1998). Chaque isoforme a une activité propre, en adéquation avec sa fonction. Par exemple la NOS inducible, impliquée dans les phénomènes cytotoxiques : apoptose et immunité innée, produit ponctuellement des grandes quantités de NO, suite à son activation (Marletta 1994). Par contre la NOS endothéliale, impliquée dans la vasodilatation, notamment des artères, produit de petites quantités de NO et son activité est régulée par la calmoduline, une protéine fixant le calcium (Vasquez-Vivar *et coll.* 2003) (Figure 2.10)

2.3.2.2 Rôles physiologiques.

La régulation de la pression artérielle passe par une vasodilatation induite par le NO. La eNOS est activée par différentes voies (voir figure 2.10), et le NO produit se fixe alors sur la guanylate cyclase. Cette hémoprotéine, possédant une grande affinité pour le NO (20 nM), alors activée, libère du cGMP, provoquant ainsi une cascade de réactions aboutissant au relâchement des muscles lisses entourant les artères (Moncada & Higgs 2001).

Le rôle du monoxyde d'azote au niveau neuronal est plus celui d'un coordinateur neuronal que d'un simple neurotransmetteur (Moncada & Higgs 2001). Il serait impliqué dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, comme l'indique les expériences sur des souris dont le gène codant pour la nNOS a été supprimé (Susswein *et coll.* 2004).

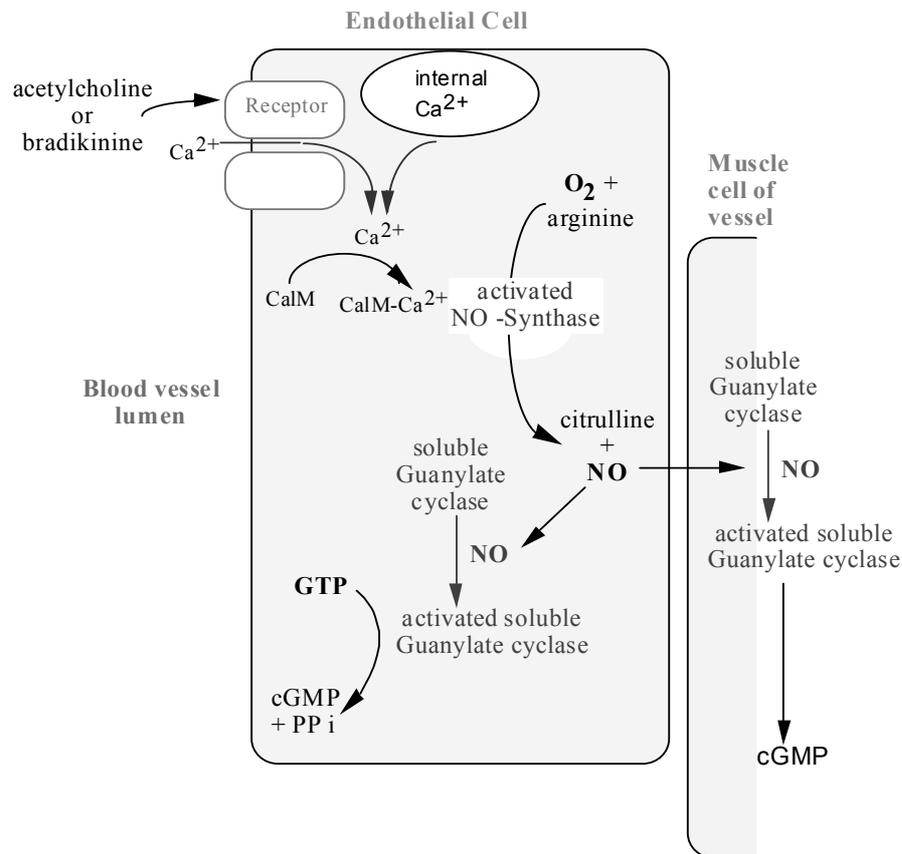


Figure 2.10 : Schéma représentant la voie métabolique impliquant le NO et la guanylate cyclase, aboutissant à la vasodilatation des vaisseaux.

Dans tous ces processus, le NO agit comme une molécule de transduction qui, larguée localement, suite à un signal agit sur des cibles discrètes. Sa facilité à traverser les membranes et sa courte durée de vie lié à sa grande réactivité sont des propriétés physico-chimiques clé du "succès" de cette molécule.

La production de NO par l'iNOS joue un rôle important dans l'immunité innée (ou non spécifique), du fait de son effet cytotoxique-cytostatique. Le NO est ainsi impliqué dans l'apoptose et dans l'inactivation de certains organismes pathogènes (bactéries, protozoaires, ...). Dans l'un et l'autre cas, le NO produit en grande quantité par la iNOS, agissant sur de nombreuses cibles, aboutit à la mort de la cellule. Les mécanismes impliqués dans cette action ne sont pas tous connus, mais certaines protéines cibles ont néanmoins été identifiées : le NO inhibe la cytochrome *c* oxydase, selon un mécanisme qui sera décrit plus loin, se fixe sur le complexe I de la chaîne respiratoire et sur le cytochrome *c*. Ces interactions inhibent la chaîne respiratoire et donc la production d'ATP, rendant la survie cellulaire impossible. Par ailleurs, du cytochrome *c* nitrosylé est relargué dans le cytosol (Schonhoff *et coll.* 2003) où il induit d'autres réactions aboutissant à la mort cellulaire par apoptose (Orrenius 2004). De plus, le NO possède, de part sa nature chimique, une grande affinité pour les fonctions thiols et hydroxyls des protéines. Ces modifications post traductionnelles participent au processus de mort cellulaire.

2.4 Cytochrome c oxydase et monoxyde d'azote.

La fixation de NO sur la cytochrome *c* oxydase est étudiée depuis près de 50 ans (Wainio 1955). Cependant les implications biologiques de cette interaction ne sont étudiées que depuis une dizaine d'années. En effet, avant la découverte de son importance physiologique, le NO était essentiellement considéré comme analogue non réactif du dioxygène, à l'instar du CO ou du CN, utile pour étudier le site actif des protéines impliquées dans la fixation (hémoglobine, myoglobine) ou dans la consommation de O₂ (cytochrome oxydase). Le NO, de par son radical libre, donne un signal important en spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (RPE). Cette technique, très sensible aux électrons non appariés, a permis l'étude de nombreuses hémoprotéines par la fixation de NO sur l'hème. Des informations étaient alors obtenues sur la nature électronique du site de fixation du ligand ainsi que son environnement. Par ailleurs, le NO est une molécule de choix pour sonder la dynamique ultrarapide des hémoprotéines du fait de sa grande affinité pour la molécule d'hème. En effet, la cinétique de recombinaison "gémée" (la molécule photodissociée se relie sur l'hème, ≠ recombinaison bimoléculaire : une molécule de ligand, autre que celle photodissociée vient se fixer sur l'hème) du NO sur un hème, suite à sa photodissociation, avec un rendement quantique proche de 1, est très sensible à l'environnement de l'hème (Martin & Vos 1994).

Depuis 1994, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'effet du NO sur la consommation d'oxygène au niveau cellulaire et en particulier son effet sur la cytochrome *c* oxydase (Brown & Cooper 1994; Cleeter *et coll.* 1994; Schweizer & Richter 1994). Le NO s'est avéré inhiber efficacement et réversiblement la CcO, et réduire son affinité apparente pour l'O₂. De plus le NO se lie et se dissocie rapidement de l'oxydase. Ces deux propriétés montrent le NO comme un régulateur potentiel de la respiration (Moncada & Erusalimsky 2002).

2.4.1 Le NO inhibe la cytochrome c oxydase.

Le NO se fixe sur la CcO réduite au niveau de l'hème *a*₃, et, par conséquence, empêche la fixation de l'oxygène sur le site actif. Cette inhibition de la CcO dépend de la concentration d'O₂. A une concentration d'O₂ de 145 μM, soit la concentration dans les artères, la concentration d'inhibiteur (NO) diminuant l'activité de l'enzyme d'un facteur 2 (l'IC₅₀ ou K_i) est de 270 nM. A 30 μM d'oxygène, soit la concentration mesurée au niveau des tissus, l'IC₅₀ tombe à 60 nM (Brown & Cooper 1994). Pour les faibles concentrations d'oxygène (10 μM) l'IC₅₀ calculé est de 20 nM soit le K_m de la guanylate cyclase, le senseur du NO au niveau des endothéliums. Les concentrations de NO mesurées *in vivo* entre 10 et 450 nM, sont donc dans la plage où la régulation de la cytochrome oxydase par le monoxyde d'azote est possible (Moncada & Erusalimsky 2002).

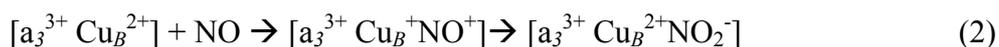
Des études sur la consommation d'oxygène par des cellules en culture ont montré un ralentissement de la respiration par induction de la production de NO. Une telle variation n'est pas observée lorsque les NOS sont génétiquement inactivées. La consommation d'oxygène de mutants était alors plus forte que celle observée au niveau d'organes entiers non modifiés, ce qui prouve que le NO est susceptible d'inhiber constitutivement la respiration. De plus, ces expériences étant réalisées à l'atmosphère ambiante, la concentration de O₂ dans le milieu (200 µM) est plus élevée que celle des tissus, induisant une hyperoxie (Clementi *et coll.* 1999). Or, l'effet de cette hyperoxie n'est observé que sur les cellules NOS⁻. Le NO inhiberait donc la respiration de manière constitutive au niveau cellulaire. Ces résultats *in vivo* permettent d'expliquer les variations de K_m (concentration de substrat, ici O₂, pour laquelle la vitesse d'apparition du produit est la moitié de la vitesse maximale, V_M) de l'oxydase entre les études à partir de protéines purifiées et à partir de cellules ou d'organes. Le K_m mesuré sur la protéine purifiée étant plus faible que celui mesuré *in vivo* dans des organes entiers du fait de la régulation permanente de la CcO par le NO.

2.4.2 Réactions de NO avec l'oxydase.

La liaison du NO sur l'oxydase réduite, décrite pour la première fois en 1955 (Wainio 1955), est bien caractérisée :



Le NO semble être un inhibiteur compétitif de l'oxygène. Les études sur les interactions de la cytochrome *c* oxydase réduite avec le NO ont permis de mesurer une constante de liaison bimoléculaire entre 0,4 et 1.10⁸ M⁻¹.s⁻¹ à 20°C (Atherton *et coll.* 1963; Gibson & Greenwood 1963). Néanmoins les affinités relatives de l'oxydase réduite pour ces deux molécules, NO et O₂, ne permettent pas d'expliquer les constantes d'inhibition mesurées *in vivo*. Or il a été montré que le NO était également capable d'interagir avec l'oxydase oxydée (Cooper *et coll.* 1997). Cette liaison du NO avec la CcO dans un état redox autre que la forme réduite expliquerait les valeurs d'inhibition observées (Cooper 2002). Cette réaction participerait à la dégradation du NO en un composé non toxique : le nitrite.



En 1997, Cooper et collaborateurs, travaillant avec la forme dite pulsée de la CcO (ayant son site actif vide) ont montré qu'elle interagissait avec le NO par le Cu_B et non par l'hème a₃ (Cooper *et coll.* 1997). La protéine oxyde ensuite le NO en nitrite, qui reste fixé à l'enzyme jusqu'à ce que des électrons soient disponibles; le nitrite est alors relâché dans le milieu (Giuffrè *et coll.* 1996; Torres *et coll.* 2000). Le NO interagirait de la même manière avec les

intermédiaires réactionnels du cycle ayant le Cu_B oxydé avec une affinité inférieure à celle de la forme oxydée (Giuffrè *et coll.* 2000) (Fig. 2.11).

De plus, des études RPE (Brudvig *et coll.* 1980) et infrarouge (Zhao *et coll.* 1994) ont montré que le NO, à très haute concentration, était susceptible de se lier à la fois au fer de l'hème a_3 et au Cu_B sur l'oxydase réduite de cœur de bœuf. Si une telle fixation est possible à des concentrations plus faibles ($<1 \mu\text{M}$), cela pourrait avoir des implications physiologiques importantes. En effet, il serait envisageable que l'inhibition par le NO, de l'oxydase réduite passe également par sa fixation sur le Cu_B . Ce point, soumis à controverse (Stubauer *et coll.* 1998; Cooper 2002), a été étudié durant mon travail de thèse, sur l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* (Vos *et coll.* 2001; Pilet *et coll.* 2004).

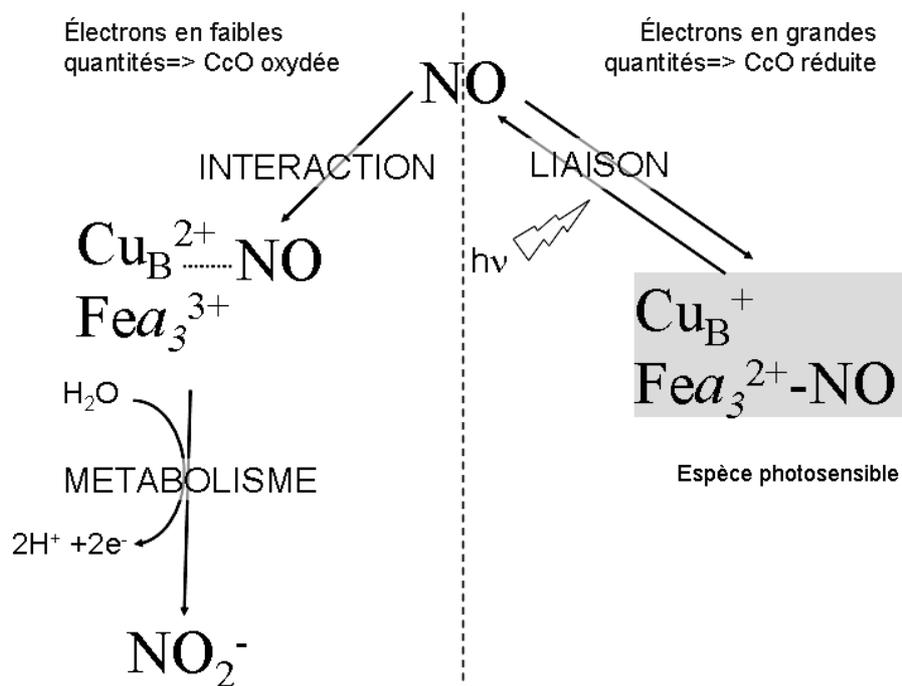


Figure 2.11 : Liaisons de NO au niveau du site actif de la cytochrome c oxydase sur le fer a_3 réduit ou interaction avec Cu_B si Fea_3 oxydé.

D'après Cooper 2002

2.4.3 Implications physiologiques.

L'activité NO oxydase de la cytochrome c oxydase permettrait de transformer le NO toxique en nitrite inoffensif. L'inhibition de l'activité O_2 réductase permettrait de moduler la consommation d'oxygène localement. Cette propriété permettrait d'éviter une trop forte consommation à proximité des vaisseaux, de sorte que l'oxygène puisse diffuser plus profondément. De même, la variation de la concentration de NO et donc de l'affinité de la CcO pour l'oxygène, permettrait d'utiliser la cytochrome oxydase comme senseur d'oxygène (Wilson *et coll.* 1994; Moncada & Erusalimsky 2002).

Par ailleurs, durant l'apoptose, de très grandes quantités de NO sont produites, inhibant la CcO comme décrit ci-dessus mais aussi en nitrosylant les fonctions hydroxyls et thiols de la protéine. Il en résulte une perte d'activité irréversible de l'oxydase. Il ne s'agit pas alors d'un processus de régulation mais de mort cellulaire.

3 Matériel et Méthodes.

3.1 Microbiologie.

3.1.1 *Paracoccus denitrificans*.

La souche sauvage de *P. denitrificans* provient de la « Collection des Bactéries de l'Institut Pasteur » (CIP, n°71.11). La souche AOI (Hendler *et coll.* 1991; Drosou *et coll.* 2002) permet l'introduction des plasmides par conjugaison et est utilisée pour l'expression des oxydases dont la sous-unité I (SUI) a été mutée (tableau 3.1). Cette souche est déplétée pour les gènes *ctaDI* et *ctaDII*, codant pour deux isoformes de la sous unité I. Le gène *ctaDI* est remplacé le gène de résistance à la kanamycine, pour *ctaDII* une cassette transférant la résistance à la tétracycline a été introduit. De plus, le gène *ccoN*, codant pour la sous-unité I de l'oxydase *cbb₃*, est remplacé par le gène de résistance à la gentamycine empêchant l'assemblage de l'enzyme.

SOUCHE	GÉNOTYPE
AOI souche de délétion	$\Delta ctaDI::Km^r$, $\Delta ctaDII::Tet^r$; $\Delta ccoN::Gm^r$, Rif^r
71.11	Type sauvage

Tableau 3.1 : Les souches de *P. denitrificans* utilisées.

La souche sauvage est cultivée dans un premier temps sur milieu succinate agar (voir ci-dessous) à partir de stock conservé à -80°C dans du glycérol 15%. Une colonie est prélevée et suspendue dans 5mL de milieu liquide. Après 24 H à 33°C, cette préculture est transférée dans 750 mL de milieu et placée à 28°C sous forte agitation. Après 30 H, les cultures sont centrifugées 10min à 8000G. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Pour les souches mutées, 2mL de milieu succinate sontensemencés, à partir d'une culture sur boite, puis après 24 H à 32°C, les cultures sont transférées dans un erlen contenant 25 mL de milieu puis après 18H à 32°C dans 1,5 L de milieu. 25 µg/mL de gentamycine et 50 µg/mL de streptomycine sont ajoutés à chaque étape afin de maintenir les plasmides. Une fois la densité optique entre 2 et 3, les cultures sont centrifugées et les cellules sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Milieu succinate :

Produits chimiques	Formule	Concentration finale
Dihydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	50mM
Chlorure d'ammonium	NH_4Cl	75 mM
Sulfate de sodium	Na_2SO_4	11.5 mM
Acide citrique	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	1 mM
Biotine	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	4 μM
Chlorure de magnésium	MgCl_2	1.25 mM
Stock de sel	Cf ci-dessous	1mL/L
Acide succinique	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	85 mM

Le pH est ajusté à 6.2 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH)

Stock de sels :

Produits	Formule	Concentration finale
Chlorure de calcium (II)	CaCl_2	100 mM
Chlorure de fer (III)	FeCl_3	90 mM
Chlorure de manganèse (II)	MnCl_2	50 mM
Chlorure de zinc (II)	ZnCl_2	25 mM
Chlorure de Cobalt (II)	CoCl_2	10 mM
Chlorure de cuivre (II)	CuCl_2	5 mM
Acide borique	H_3BO_3	5 mM
Molybdate de sodium	Na_2MoO_4	10 mM

Les produits sont dissous dans du HCl 6 M puis filtrés.

1,5% d'agar est ajouté pour la préparation des boîtes de Petri.

3.1.2 *Escherichia coli*.

Trois souches de *E. coli* ont été utilisées (Tableau 3.2). Les souches BL21 et TOP10 (Studier *et coll.* 1990) ont été utilisées pour les étapes de transformation et d'amplification de plasmides, la souche MM294 (Hendler *et coll.* 1991; Drosou *et coll.* 2002) contient les gènes nécessaires à la conjugaison. Toutes les souches d'*E. coli* ont été cultivées dans du milieu LB à 37°C sous agitation (~250 rpm).

SOUCHE	GÉNOTYPE
TOP 10	$\text{F}^- \text{mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 } \text{recA1 } \text{deoR } \text{araD139 } \text{D-ara-lau}7697 \text{ galU } \text{galK } \text{rpsL } (\text{Str}^{\text{R}}) \text{ endA1 } \text{nupG}$
BL21 [(DE3)] ²	$\text{F}^- \text{ompT } \text{hsdS}(\text{r}_\text{B}^- \text{m}_\text{B}^-) \text{ dcm}^+ \text{ Tet}^r \text{ gal}\lambda(\text{DE3}).\text{endA } \text{Hte } [\text{argU } \text{proL } \text{Cam}^r]$
MM294	$\text{F}^+ \text{endA1 } \text{hsdR17 } (\text{r}_\text{K}^- \text{m}_\text{K}^+) \text{ glnV44 } \text{thi-1 } \text{relA1 } \text{rfbD1 } \text{spoT1}$

Tableau 3.2: Les souches de *E. coli* et leurs génotypes.

Milieu LB : 1% tryptone

0.5% extrait de levure

1% NaCl

Le pH est ajusté à 7 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH).

Pour la préparation de boîtes de Petri, 1,5% d'agar a été ajouté. L'ampicilline a été utilisée à 100 µg/mL, la streptomycine à 50 µg/mL, la rifampicine à 60 µg/mL.

3.1.3 Conjugaison.

La conjugaison est un processus naturel des bactéries, leur permettant d'échanger du matériel génétique. Ce transfert se fait grâce à des pili dont la synthèse est permise par des facteurs de fertilité (F).

Dans le cas présent, ni la souche réceptrice de *P. denitrificans* (AOI) ni celle de *E. coli*, (BL21 ou TOP10) contenant le plasmide codant pour la sous-unité I, ne portent les gènes nécessaires à la conjugaison. Une troisième souche dite "helper" : la souche MM294 contenant les gènes nécessaires à la formation du "pilus", permet de faire passer les plasmides de la souche BL21 ou TOP10 vers AOI.

Expérimentalement, les trois souches, BL21 ou TOP10, MM294, AOI sont tout d'abord cultivées séparément, lavées afin d'éliminer les antibiotiques, avant d'être cocultivées 24H sur un milieu LB/agar sans antibiotique. Le tapis bactérien ainsi obtenu est ensuite réétalé sur un milieu sélectif contenant de la streptomycine, permettant de sélectionner les bactéries AOI contenant le plasmide, et de la rifampicine et de la gentamycine pour lesquels la souche AOI est résistante.

3.2 Biologie moléculaire.

Les protocoles exposés dans ce chapitre proviennent du laboratoire du Pr B. Ludwig, Francfort.

3.2.1 Mutagenèse dirigée.

Les vecteurs utilisés (pKD1 et pKD3) avaient été préalablement construits par K. Dürr du laboratoire de biologie moléculaire de l'Université de Francfort. Le vecteur pKD1 correspond au vecteur pSL1180 (Brosius 1989) dans lequel un fragment du gène *ctaDII* (1142 pb) codant pour la partie N-terminale de la sous-unité I de l'oxydase a été insérée. pKD3 contient le fragment du gène *ctaDII* entier (codant pour la SU I) plus une séquence codant pour six histidines (1795 pb). Ces plasmides contiennent le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de répllication M13 et un promoteur α -lacZ. (Voir figure 3.1)

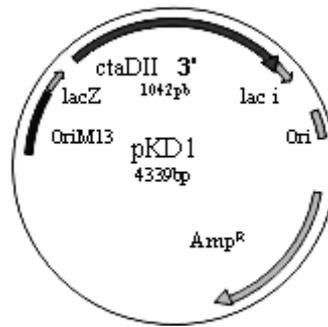


Figure 3.1 : Schéma des plasmides pKD1 et pKD3.

La mutagenèse a été effectuée grâce au kit Quik-change® (Stratagene®) basé sur le principe de la PCR, en utilisant des oligonucléotides modifiés. Le choix des amorces a été fait de sorte qu'un nouveau site de restriction soit créé (Tableau 3.3). Au moins quinze bases ont été ajoutées de part et d'autre de la mutation pour que les trois dernières paires de bases soient du type GC afin de stabiliser l'interaction oligonucléotide-matrice. Enfin, il a été vérifié que l'amorce ne se fixait que sur un seul site du vecteur.

Mutant	Site de restriction crée	Séquence de l'amorce 5'→3'
V279L	<i>SacI</i>	cttcggccatcccgag <u>ct</u> tatatcatcatcctgc
V279N	<i>BspEI</i>	gttcttcggccatcc <u>ggaga</u> aactatatcatcatcctgc
V279T	<i>BsaI</i>	cttcggccatcccgag <u>ac</u> tatatcatcatcctgc

Tableau 3.3 : Séquence des amorces et sites de restriction créés. Les bases mutées sont en gras et soulignées.

L'opération de mutagenèse a été faite en trois étapes et nécessite la phosphorylation préalable des amorces :

1) Phosphorylation des amorces:

- 2 µL d'oligonucléotides (100pmol/µL),
- 2 µL de tampon 10X
- 2 µL ATP 10mM
- 1 µL DE T4 Kinase Polynucléotide 10U/µL) (MBI)
- 13 µL H₂O

Après 30' d'incubation à 37°C la kinase est inactivée par 10 minutes d'incubation à 70°C.

2) l'amplification des brins mutés par des cycles thermiques

PCR :

- 200 ng d'ADN

10 μ L de tampon
2 μ L d'amorces phosphorylées
10 μ L de dNTP (2mM)
1 μ L NAD (100mM)
2 μ L du mélange d'enzyme (*Pfu*-polymerase + ligase)
qsp 100 μ L H₂O

Programme PCR

3 min à 95°C (1 cycle)
1 min à 95°C (30 cycles)
1 min à 55°C
8 min à 65°C

3) Elimination de l'ADN matrice

La matrice parentale est ensuite éliminée par 2 heures d'incubation à 37°C avec l'enzyme *DpnI* (ajout de 1 μ L) qui digère spécifiquement l'ADN parental méthylé non muté.

3.2.2 Amplification et purification des plasmides.

Transformation des plasmides.

Les vecteurs pKD1 ou pKD3, contenant les mutations désirés, sont ensuite transformés par choc thermique dans des cellules BL21 qui sont alors étalées sur milieu LB/agar contenant 100 mg.L⁻¹ d'ampicilline.

Purification des plasmides.

Les colonies, obtenues après la transformation, sont mises en culture liquide de 2 mL en présence d'ampicilline. Après 18 heures de culture à 37°C sous agitation, les plasmides sont purifiés par le kit de miniprep de Qiagen[®]. Ce système de purification est basé sur une lyse alcaline suivi par la liaison de l'ADN à une résine échangeuse d'ions.

La lyse alcaline est réalisée par la resuspension du culot bactérien par 300 μ L d'un tampon Tris/HCl pH8 50 mM, EDTA 10 mM et RNase A 100 μ g/mL. Puis les cellules sont lysées par 300 μ L de tampon NaOH 200 mM, SDS 1%. Après 5 minutes d'agitation modérée, la solution est neutralisée par 350 μ L de tampon acétate pH5 3,3 M. La solution est alors placée sur glace afin d'accélérer la précipitation du SDS. L'ADN génomique et les protéines sont précipités par une centrifugation 10 minutes, 14 krpm, à 4°C. Le surnageant est déposé sur la colonne et lavé à deux reprises avec 750 μ L de NaCl 1 M, MOPS pH7 50 mM et isopropanol 15%. Puis le plasmide est élué avec 50 μ L de H₂O à 65°C.

Restriction enzymatique.

Les plasmides issus de cette purification sont ensuite digérés par des enzymes de restriction, afin de vérifier la présence de la mutation selon le protocole suivant :

5 µL de plasmide,

2 µL de tampon NEB adapté

0.5 µL de chaque enzyme : *XbaI* + enzyme spécifique du mutant (tableau 3.3).

12 µL H₂O

Après 1 à 2 heures d'incubation la réaction est arrêtée par l'ajout de 5 µL de tampon de charge : bleu de bromophénol, SDS, glycérol suivie d'une incubation de 5 minutes à 65°C.

Sélection des clones positifs.

Le profil de restriction d'un plasmide contenant la mutation est différent du vecteur contenant le gène non muté (cf figure 4.33 Résultats et Discussion).

Les clones ayant le bon profil de digestion sont regroupés puis digérés selon le même protocole par *BstXI* et *HindIII*. Après migration sur gel le fragment d'intérêt est extrait et purifié correspondant au vecteur pSL1180 + la partie 3' du gène *ctaDII* (cf Fig 4.34 Résultats et Discussion). Afin de reconstruire le gène entier, une ligation avec la partie 5' du gène, provenant du plasmide pKD3 digéré par le même couple d'enzymes est effectuée.

Ligation.

Pour fusionner les deux fragments de *ctaDII*, une ligation est effectuée. Le plus grand des fragments ΔpKD1, qui porte l'origine de réplication et le gène de résistance à un antibiotique (Tableau 3.4), a été obtenu par digestion de pKD1 par *HindIII* et *BstXI*; il est lié à ΔpKD3, provenant de la digestion de pKD3 par les mêmes enzymes. La réaction de ligation nécessite :

40 -50 ng de ΔpKD1,

une quantité équimolaire de ΔpKD3,

1 µL de ligase T4,

1 µL de tampon de ligation 10X

H₂O qsp 10 µL

Après une heure à température ambiante, la réaction est arrêtée par 10 minutes d'incubation à 65°C.

Par la suite une nouvelle ligation est effectuée afin d'entrer *ctaDII* dans un vecteur d'expression dans *P. denitrificans*. Le vecteur, obtenu par la précédente ligation et sélection, est digéré par *HindIII* et *XbaI* puis lié au vecteur pUP39 préalablement digéré par le même couple

d'enzymes (Figure 4.34 C).

Electrophorèse des acides nucléiques.

Les fragments de plasmides, produits par la restriction, sont séparés par migration sur gel d'agarose 0,7% dans le tampon TAE (Tris/acétate pH 8,3 50 mM, EDTA 1 mM). Un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthyldium, fluorescent après une excitation à 253 nm, est ajouté directement dans le gel à la concentration finale de 0.33 µg/mL. Un courant de 100 V (80 mA) est appliqué sur le gel pendant 60 minutes puis d'ADN est visualisé sous une lampe UV.

Vecteur	Caractéristiques	Description
pKD1	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, Δ <i>ctaDII</i>	pSL1180 +insert de 1042 pb partie 3' de <i>ctaDII</i> .
pEP10	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, Δ <i>ctaDII</i> V279L	pSL1180 +insert de 1042 pb partie 3' de <i>ctaDII</i> . Mutée V279L
pEP11	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, Δ <i>ctaDII</i> V279N	pSL1180 +insert de 1042 pb partie 3' de <i>ctaDII</i> . Mutée V279N
pEP12	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, Δ <i>ctaDII</i> V279	pSL1180 +insert de 1042 pb partie 3' de <i>ctaDII</i> . Mutée V279T
pDK3	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his	pSL1180 +insert de 1790 pb : <i>ctaDII</i> + 6 his
pEP WT1	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his	pSL1180 +insert de 1790 pb : <i>ctaDII</i> + 6 his
pEP 13	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his V279L	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his V279L
pEP 14	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his V279N	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his V279N
pEP 15	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his V279T	Amp ^r , Promoteur lacZ, lac I, Ori <i>E. Coli</i> , Ori M13, <i>ctaDII</i> + 6his V279T
pUP39	Sm ^r , Cm ^r , Ori <i>E. Coli</i> , Ori <i>P.denitrificans</i> Promoteur <i>ctaDII</i> , Gène <i>mob</i>	pBBR1MCS + Smr, Promoteur <i>cta</i>
pEPWT2	Sm ^r , Cm ^r , Ori <i>E. Coli</i> , Ori <i>P.denitrificans</i> Promoteur <i>ctaDII</i> , Gène <i>mob</i> , <i>ctaDII</i> +6His	pBBR1MCS + Smr, Promoteur <i>cta</i> , <i>ctaDII</i> + 6 his
pEP16	Sm ^r , Cm ^r , Ori <i>E. Coli</i> , Ori <i>P.denitrificans</i> , Promoteur <i>ctaDII</i> , Gène <i>mob</i> , <i>ctaDII</i> +6His V279L	pBBR1MCS + Smr, Promoteur <i>cta</i> , <i>ctaDII</i> + 6 his V279L
pEP17	Sm ^r , Cm ^r , Ori <i>E. Coli</i> , Ori <i>P.denitrificans</i> , Promoteur <i>ctaDII</i> , Gène <i>mob</i> , <i>ctaDII</i> +6His V279N	pBBR1MCS + Smr, Promoteur <i>cta</i> , <i>ctaDII</i> + 6 his V279N
pEP18	Sm ^r , Cm ^r , Ori <i>E. Coli</i> , Ori <i>P.denitrificans</i> , Promoteur <i>ctaDII</i> , Gène <i>mob</i> , <i>ctaDII</i> +6His V279T	pBBR1MCS + Smr, Promoteur <i>cta</i> , <i>ctaDII</i> + 6 his V279T

Tableau 3.4: Liste des vecteurs utilisés lors de la mutagenèse et leurs caractéristiques.

3.3 Biochimie.

3.3.1 Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Après chaque purification, un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Laemmli 1970) a été fait à l'aide du système mini-ProteanII[®] de Biorad[®], suivant le protocole suivant :

Gel séparatif	Volume		Gel Stacking	Volume
	10%	15%		
Acrylamide,bisacryl 30% (37.5:1)	3,3 mL	5 mL	Acrylamide,bisacryl 30% (37.5:1)	0,67 mL
Tris/HCl pH 8.8 1M	3,6 mL		Tris/HCl pH 6.8 0,5M	1,25 mL
SDS 10%	100 µL		SDS 10%	50 µL
APS	100 µL		APS	50 µL
TEMED	8 µL		TEMED	5 µL
H ₂ O	2,9 mL	1,2 mL	H ₂ O	3 mL

Les échantillons sont placés à 65°C pendant 5 minutes en présence du tampon de Laemmli (contenant notamment du SDS, du β-mercaptoéthanol, du glycérol et du bleu de bromophénol). Pendant cette étape, les structures secondaires des protéines sont détruites et les ponts disulfure réduits. Le SDS, en se fixant sur les protéines, leur confère une charge négative et leur migration, dans les mailles formées par le polyacrylamide, ne dépend plus que de leur taille ou de leur poids moléculaire. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie qui se fixe sur le SDS.

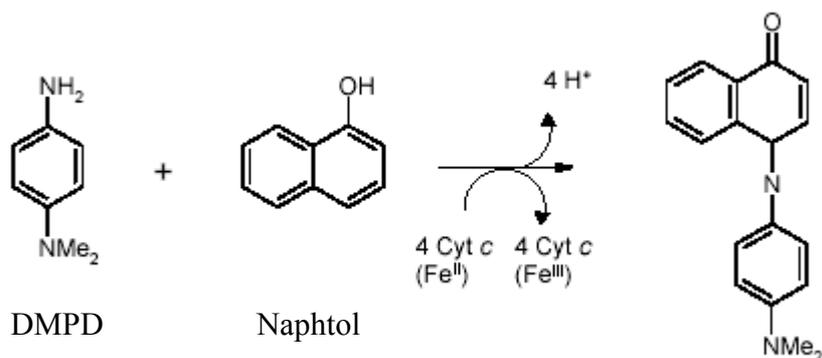
3.3.2 Coloration des hèmes c.

Afin de révéler la présence d'hème de type c, du TMBZ (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) est ajouté sur le gel. La coloration des hèmes provient de l'activité peroxydasique des hèmes qui, en oxydant le TMBZ fixé, lui font prendre une teinte turquoise (Thomas *et coll.* 1976).

Le gel est incubé une heure dans une solution contenant 30% TMBZ 6,3 mM dans du méthanol, et 70% d'acétate de sodium 0,25 M pH. La révélation est faite par ajout de peroxyde d'hydrogène à une concentration finale de 30 mM. Toutes ces étapes doivent être réalisées à l'obscurité afin d'éviter la photooxydation de TMBZ.

3.3.3 Test NADI.

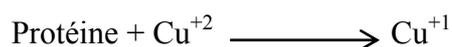
Afin de vérifier si les clones obtenus expriment une oxydase active, un test biochimique est réalisé: le test NADI (Jones & Poole 1985), qui est basé sur la réaction suivante :



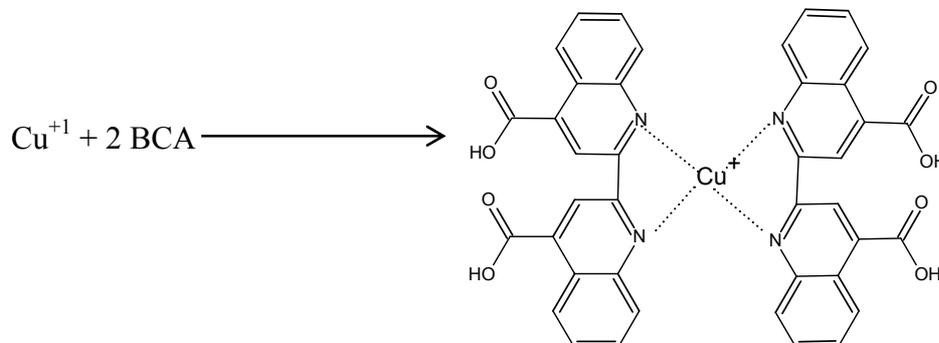
Le naphthol, le N,N-diméthyl-p-phénylène diamine (DMPD) et un tampon phosphate pH8 sont ajoutés directement sur une boîte de Pétri ; si une colonie prend rapidement une couleur bleue, le clone a une activité oxydase.

3.3.4 Dosage des protéines.

Afin de déterminer la concentration de protéines, le test BCA, mise au point par Pierce[®], est utilisé. Il est basé sur le principe du dosage de Folin : l'affinité des ions cuivriques pour les liaisons peptidiques en milieu basique suivant la réaction suivante :



L'ion cuivreux formé réagit alors avec l'acide bicinchoninique (BCA) pour former un chélat de couleur violette :



Le test est réalisé sur une plaque 96 puits où une solution d'albumine sérique bovine (BSA) sert de référence:

Puits (μL) A, B et C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BSA 1 g/L	0	0	0	3	10	30	0	0	0	0	0	0
BSA 0.1 g/L	0	3	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Echantillon dilué 1/10	0	0	0	0	0	0	1	3	10	0	0	0
Echantillon dilué 1/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	10
H ₂ O	30	27	20	27	20	0	29	27	20	29	27	20
NaOH 0.3 M	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Le test est révélé par ajout de 200 μL par puits du mélange BCA. L'intensité de la coloration violette est lue sur un lecteur de plaques Biorad[®] à 570 nm.

3.3.5 Purification de l'oxydase aa_3 de *Paracoccus denitrificans*.

La purification à partir de cellules bactériennes se fait en trois étapes (Ludwig, 1987):

- Isolement des membranes,
- Solubilisation des protéines membranaires,
- Séparation des protéines par chromatographie.

3.3.5.1 Isolement des membranes.

L'isolement des membranes est fait dans des conditions non dénaturantes : toutes les opérations se font sur glace, les solutions sont tamponnées et un inhibiteur de sérine protéases, le Pefabloc[®], est ajouté afin de limiter la dégradation de l'oxydase.

Dans une première étape, les bactéries sont concentrées par centrifugation. Les culots sont suspendus à 100 g/L dans un milieu hypertonique (saccharose 500 mM, Tris/HCl pH 8 50 mM, EDTA 10 mM) et homogénéisées à l'aide d'un potter. La paroi bactérienne est alors dégradée sous l'action du lysozyme (250 mg/mL), coupant des polysaccharides, pendant 2 H à température ambiante (TA) ou 18H à 4°C. Une centrifugation de 15 minutes à 20000 g permet de recueillir les sphéroplastes.

Les sphéroplastes sont resuspendus dans un milieu hypotonique (KPi pH 7,5 10 mM, EDTA 2mM). La différence de pression osmotique provoque la rupture de la membrane plasmique, ce qui se traduit par une augmentation importante de la viscosité due à la libération des acides nucléiques. Afin d'obtenir un rendement élevé pour la lyse, les culots sont passés au potter fin à 4 reprises et une digestion 2 heures à 4°C par DNase I et RNase A est réalisée. Après centrifugation (30 min, 30 krpm), les membranes sont lavées dans le tampon 1 (NaCl 130 mM, Tris/HCl pH 8 50 mM, EDTA 3 mM), et utilisées pour la suite de la purification.

3.3.5.2 Solubilisation.

Les membranes sont alors repris dans le tampon 1 à la concentration finale de 10 g de protéines par litre. Une fois la concentration en protéine ajustée, le n-dodecyl- β -D-maltoside (β -DM); est ajouté sur glace, goutte à goutte à partir d'une solution stock à 10% (100 mg/mL) jusqu'à la concentration finale de 1% (10 mg/mL). Après 30 minutes d'agitation sur glace, les protéines solubilisées sont séparées par centrifugation à 50000 g pendant 30 minutes.

3.3.5.3 Chromatographie échangeuse d'ions de l'oxydase aa_3 .

Toutes les étapes de chromatographie sont effectuées sur un système FPLC Acta (Pharmacia Biosciences) qui mesure en continu le pH, la conductivité et l'absorbance à trois longueurs d'onde (280, 552 et 605 nm). L'absorption à 280 nm est caractéristique des acides

aminés aromatiques et permet de suivre la quantité de protéines en sortie de colonne. Les absorptions à 552nm et 605 nm correspondent aux maxima d'absorption dans le visible des cytochromes *c*, et de la cytochrome *c* oxydase *aa₃*, respectivement.

La chromatographie est effectuée grâce à deux résines échangeuse d'anions : tout d'abord DEAE Sépharose CL-6B, puis Source 30Q. Avant utilisation, les colonnes sont lavées par 1 volume de NaCl 1 M et 2 volumes de Tris/HCl pH 8 0,6 M, puis équilibrées avec 3 volumes de tampon 1 et 1 volume de tampon 1 contenant 0,03 % de β -DM.

Après filtration sous vide sur un Stericup[®], le surnageant, de couleur rouge, est déposé sur la colonne contenant 350 mL de DEAE Sépharose CL-6B. La colonne est alors lavée par 3 volumes de tampon 1 + β -DM 0,03 %, afin d'éliminer les protéines n'ayant pas d'affinité pour la résine. Ensuite les protéines sont éluées par un gradient de NaCl. Deux types de gradients ont été utilisés : 130-340 mM en 3 volumes de colonne et 200-340 mM en 3 volumes de colonne suivi par un lavage à 340 mM de NaCl permettant l'éluion des protéines résiduelles. Après sélection par la mesure du spectre de différence réduit moins oxydé, les fractions, de 5 mL, contenant l'oxydase sont concentrées à l'aide d'un microconcentrateur Vivaspin[®] 50k, lavées avec du tampon 1 + β -DM avant de ramener la concentration en NaCl à 130 mM.

Ces fractions sont alors regroupées et déposées sur 40 mL de résine Source 30Q. Comme précédemment, l'éluion commence par un lavage avec du tampon 1 + β -DM 0,03% et est suivie par un gradient de NaCl cette fois-ci sur 10 volumes de colonne. Enfin, les protéines résiduelles sont éluées par un lavage à 340 mM NaCl. De la même manière les fractions les plus pures sont sélectionnées par leur spectres et concentrées avant d'être congelées à \sim 40 μ M par aliquots de 100 μ L.

3.3.6 Purification de la cytochrome *c* oxydase de cœur de bœuf.

La purification s'effectue en deux étapes principales : tout d'abord l'isolement des mitochondries à partir de l'organe frais ; la fraîcheur du cœur est primordiale pour la qualité des mitochondries et de l'oxydase obtenue. Puis, dans un deuxième temps, par la purification de l'oxydase proprement dit à partir des mitochondries isolées.

3.3.6.1 Isolement des mitochondries.

Les cœurs sont obtenus auprès de l'abattoir de l'INRA (Theix/Clermont-Ferrand). Tout de suite après le prélèvement sur l'animal, le cœur est transporté sur glace dans un tampon approprié (saccharose 0.3 M, Mops pH 7.4 5 mM, KH₂PO₄ 5 mM, BSA 0.1% m/m en présence d'antiprotéase : le PMSF à 1 mM). Le péricarde et le tissu adipeux sont enlevés, puis le tissu est découpé et haché grâce à un hachoir électrique et resuspendu dans le tampon saccharose 0.3 M,

Mops pH7.4 5 mM, KH_2PO_4 5 mM, BSA 0.1%, CaCl_2 1 mM, plus un cocktail d'anti-protéases (PMSF 1 mM, Leupeptine et Pepstatin A à $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Les cellules sont ensuite séparées les unes des autres par action de la collagénase (à $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) qui lyse la matrice extracellulaire. La réaction est arrêtée par ajout d'EGTA qui chélate le calcium indispensable à l'activité de la collagénase.

L'étape suivante consiste en la destruction douce des cellules cardiaques afin d'obtenir les mitochondries entières. Cette opération est réalisée en passant une suspension diluée de cellules dans un Potter Elvehjem (le piston en téflon et le mortier en verre). Une première centrifugation à 1500 g pendant 10 minutes permet d'éliminer les cellules non lysées et les débris tissulaires. Le surnageant est à nouveau centrifugé soit 10 minutes à 10 000 g soit 40 minutes à 3000 g. Le culot, majoritairement composé de mitochondries entières et de membranes mitochondriales, est congelé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C .

3.3.6.2 Purification de la cytochrome *c* oxydase.

En 1941, Yakushiji et Okunuki (Yakushiji 1941) ont, pour la première fois, isolé la CcO à partir de cœur bovin. Depuis lors, de nombreuses équipes ont contribué à l'amélioration de la technique. La méthode qui a été choisie ici a été développée par Van Buuren du groupe d'Amsterdam dans la fin les années 70 (Van Buuren 251) et décrite par Rickwood et al. en 1987. La purification de la cytochrome *c* oxydase y est basée sur deux facteurs : la différence de solubilité entre les protéines membranaires d'une part et d'autre part la précipitation sélective au sulfate d'ammonium. Des spectres d'absorption sont pris entre 350 et 700 nm afin de suivre la qualité de la purification.

La cytochrome *c* oxydase se situe dans la membrane interne des mitochondries dont la composition en lipide est différente de celle de la membrane externe. L'étape de précipitation sélective utilise cette observation. Après avoir ajusté la concentration en protéine totale à 23 g/mL (déterminée par un test BCA), du déoxycholate (acide $3\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanique) est ajouté à 0.8 % de concentration finale. Après centrifugation, un surnageant rouge est séparé d'un culot marron vert contenant l'oxydase. L'ajout de chlorure de potassium (KCl) permet de mieux séparer le culot du surnageant. Durant cette étape, aussi appelé "red/green split", un grand nombre de protéines de la membrane externe sont solubilisées ainsi que celles faiblement ancrées dans la membrane interne. De plus la membrane externe devient perméable ; par conséquent les protéines intermembranaires, dont le cytochrome *c*, se retrouvent également dans le surnageant.

La cytochrome *c* oxydase est ensuite solubilisée par 3% de cholate (acide $3\alpha,7\alpha,13\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanique), puis les membranes restantes et certaines protéines sont précipitées

par 25% d'une solution saturante de sulfate d'ammonium. Après centrifugation, le surnageant vert est récupéré. La suite de la purification est basée sur la différence de concentration de sulfate d'ammonium à laquelle précipite le cytochrome *b* (28%), l'oxydase (<40%) et le cytochrome *c₁* (>45%). Afin d'augmenter la pureté de l'échantillon, 2 à 3 cycles 35% de saturation, centrifugation; 45% de saturation, centrifugation, sont effectués.

Pour changer de détergent, le dernier culot est repris dans un tampon Tris/HCl pH 7,6 50 mM, β -DM 0.1% puis dialysé contre ce même tampon. En effet, le cholate inhibe la CcO en se fixant sur un site de l'ATP alors que le β -DM ne modifie pas l'activité de l'enzyme (Shoji *et coll.* 2000). Après dialyse l'oxydase est aliquotée soit à 30 μ M soit à 150 μ M en fractions de 100 μ L. La concentration est déterminée grâce au coefficient d'absorption molaire ($\Delta\epsilon_{605}=23400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) du spectre de différence réduit moins oxydé.

3.3.7 Préparation des échantillons : oxydases et ligands gazeux.

Les échantillons sont décongelés et sont ensuite placés dans une cuve en quartz (QS) Hellma[®] (117.007 QS) de chemin optique de 1mm préalablement rincée à 6 reprises avec de l'eau, de l'éthanol 70%, de l'eau milliQ et de l'éthanol 100% avant d'être séchée puis une nouvelle fois rincée avec le tampon. La concentration est, si besoin, ajustée par ajout de tampon. La cuve est alors fermée de manière étanche à l'aide d'un bouchon en caoutchouc. Afin d'éliminer l'oxygène, l'échantillon est dégazé dans une ligne de vide par une dizaine de cycles, 3 minutes de vide, 1 minute sous 1 atm d'argon. Tous les réactifs ajoutés par la suite à l'échantillon sont dégazés préalablement.

Dans le cas des expériences CcO NO, l'échantillon est réduit par l'ajout d'ascorbate à la concentration finale de 10 mM à partir d'une solution mère 0,5 M (~80 mg/mL) dégazé. Afin d'accélérer la réaction, deux médiateurs ont été utilisés, le paraphénylène diamine (pPD) à 5 mM (Brudvig *et coll.* 1980) et le ruthénium hexamine ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6$) à 200 μ M (Giuffrè *et coll.* 1999). Ce catalyseur est très efficace et ne dénature pas l'oxydase. Il est également possible de réduire l'oxydase à l'aide d'hydrosulfite de sodium (voir plus tard) mais son interaction avec le NO (Brudvig *et coll.* 1980) ne permet pas son utilisation avec le NO, surtout à faible concentration.

Pour la CcO de *P. denitrificans* lors des expériences femtosecondes, la concentration est de 45 μ M et le volume de 100 μ L, il y a donc dans la cuve 4,5 nanomoles de CcO. Le NO est ajouté sous forme gazeuse pour ne pas modifier la concentration en protéine. A la température du laboratoire 1 mole de gaz occupe 22,4 L donc 4,5 nmoles occupent 100 nL. Comme il n'est pas possible d'ajouter d'aussi petit volume avec précision, 10 μ L de NO 1% sont injectés dans la phase gazeuse de la cuve ; 10 μ L correspondent alors à une quantité stœchiométrique. Pour le ratio 130:1, la phase gazeuse de la cuve est remplie avec du NO 1%.

Pour les interactions CcO –CO, le CO est ajouté directement depuis la ligne de gaz, un grand excès de CO est ainsi ajouté. Lors de la préparation de l'oxydase de cœur de bœuf dans l'état de valence mixte (MV), l'échantillon est décongelé et dégazé comme décrit au dessus avant d'être saturé par du CO 100%. Pour former l'échantillon réduit (FR) soit de l'hydrosulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 20 mM soit de l'ascorbate (20 mM) et du ruthénium hexamine (10 μM) sont ajoutés. Dès que l'échantillon est réduit, le CO est ajouté comme pour MV. Lors des expériences où la bande Soret (400-500 nm) est sondée, la concentration de l'échantillon était de 45 μM , et de 150 μM lors des mesures sur la bande α (500-620 nm).

Pour les expériences à temps longs avec une résolution nanoseconde, l'échantillon d'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*, est placé dans le même type de cuve et préparé comme précédemment. La concentration étant de 15 μM et le volume de 150 μL , pour obtenir une stoechiométrie de 1 NO par oxydase, il a fallu ajouter 5 μL de NO 1% gazeux.

Lors des expériences RPE, les échantillons sont préparés selon le même protocole puis 200 μL à 45 μM sont injectés anaérobiquement dans des tubes RPE de 2mm de diamètre scellés et préalablement dégazés et remplis d'argon. Le NO est ajouté à l'aide d'une seringue (20 μL de NO 1% pour un ratio de 1:1) et un spectre de contrôle est pris avant congélation. Pour mesurer le spectre dans la cuve, une sphère intégrante avait été mise en place sur le spectrophotomètre de type Kontron Uvitron 922.

3.4 Spectroscopie.

3.4.1 Spectroscopie à l'équilibre.

L'état d'oxydoréduction et de ligation des hèmes des oxydases est suivi par spectroscopie d'absorption UV/vis à l'équilibre. Les spectres sont pris entre 250 et 700 nm sur un spectrophotomètre Shimadzu 1601PC par pas de 1 nm avec une vitesse de balayage de 100 nm par minute.

La différence entre le spectre réduit et le spectre oxydé est mesurée. L'oxydase oxydée est obtenue en ajoutant une très faible quantité de ferricyanure ($\text{KFe}(\text{CN})_6$) et la réduite par ajout d'hydrosulfite. Une cuve contenant l'échantillon oxydé est placée dans le faisceau de référence et l'échantillon réduit dans le faisceau de mesure. Le spectre obtenu est le spectre de différence. La concentration est estimée en utilisant le coefficient d'absorption molaire à 605 nm $\Delta\epsilon_{605}=24.3 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour l'oxydase mitochondriale et $23.4 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour celle de *P. denitrificans* (Nicholls 2001).

3.4.2 Spectroscopie femtoseconde.

3.4.2.1 Principe de fonctionnement.

La technique est basée sur la rupture de la liaison entre le fer d'une hémoprotéine et son ligand (CO, O₂, NO mais pas CN) induite par l'absorption d'un photon (Martin *et coll.* 1983; Martin & Vos 1994). Ce phénomène, considéré comme non physiologique, permet de synchroniser la dissociation d'une population de protéines et donc de suivre la dynamique du système.

La variation de l'état de ligation et/ou d'oxydoréduction induit des changements dans le spectre d'absorption des hèmes. Ces modifications sont suivies à l'aide d'autres impulsions de faible puissance. Ces impulsions sont appelées impulsions sonde par opposition aux impulsions dites pompe qui rompent la liaison. Cette technique est ainsi appelée spectroscopie pompe-sonde (figure 3.2).

En faisant varier le délai entre la pompe et la sonde, il est possible de tracer la cinétique du changement d'état d'oxydoréduction et/ou de ligation. Dans les techniques ultrarapides, ce délai est réalisé en faisant varier la différence de chemin optique parcouru par la pompe et par la sonde.

3.4.2.2 Description de l'expérience d'absorption femtoseconde.

Le montage expérimental qui a servi aux expériences peut être séparé en quatre parties :

1. création et amplification de l'impulsion.

La source lumineuse est un laser à colorant qui émet des impulsions de 50 fs centrées à 620 nm à un taux de répétition de 100 MHz, avec une énergie par impulsion de 0,1 nJ. Une fraction des ces impulsions est amplifiée par un laser Nd:YAG doublé (Néodymium : Yttrium-Aluminium-Garnet) (émettant à 532 nm un faisceau de 340 mJ par impulsion de 7 ns à 30 Hz) au niveau d'une chaîne de quatre amplificateurs à colorants. L'inversion de population est induite par le passage de l'impulsion amplificatrice, et l'émission stimulée est synchronisée par le passage de l'impulsion femtoseconde. Après cette étape une impulsion de 50 fs est obtenue avec une énergie de 0.5 mJ à 620 nm avec un taux de répétition de 30 Hz. Le faisceau est alors divisé en deux. Une partie va servir à créer l'impulsion de pompe et l'autre l'impulsion sonde.

2. Amplification du faisceau pompe.

La longueur d'onde de l'impulsion pompe est modifiée de sorte qu'elle puisse exciter spécifiquement l'échantillon. Cette modification s'effectue en deux étapes. Tout d'abord le faisceau est rendu polychromatique par la création d'un continuum dans une cuve d'eau. Puis il

est réamplifié dans une région spectrale déterminé par le choix du colorant, qui est excité à 532 nm par le YAG. Dans le cas de l'oxydase, le maximum de l'impulsion sonde est choisi à 595 nm, cette longueur d'onde est la plus favorable pour exciter préférentiellement les hèmes de type *a* liés (figure 4.1). Le faisceau pompe est ensuite envoyé sur un miroir "coin cube " monté sur un moteur pas à pas. Cette partie du montage est appelée ligne de retard car c'est ici que le délai entre la pompe et la sonde est généré.

3. Création de la sonde.

Parallèlement, un second continuum est créé par la focalisation du faisceau dans une cuve d'eau. Ce faisceau de faible énergie est utilisé comme sonde.

4. Analyse de l'échantillon.

Les faisceaux pompe et sonde sont alors focalisés et superposés dans l'échantillon sur une surface d'environ $10^4 \mu\text{m}^2$. Le faisceau sonde transmis par l'échantillon, passe par un polychromateur et son spectre est enregistré par une camera CCD. Le fichier obtenu est une matrice donnant le changement d'absorption en fonction de la longueur d'onde et du délai pompe sonde. Dans les conditions utilisées; l'énergie de pompe est adaptée à l'excitation de ~20% des molécules présentes dans le volume illuminé (Vos & Martin 1999).

Les échantillons à analyser (cf § 3.3.7) sont placés sur un porte-cuve mobile. Ce déplacement évite que deux impulsions successives ne viennent exciter la même zone de l'échantillon. Des spectres à l'équilibre sont pris avant et après chaque expérience.

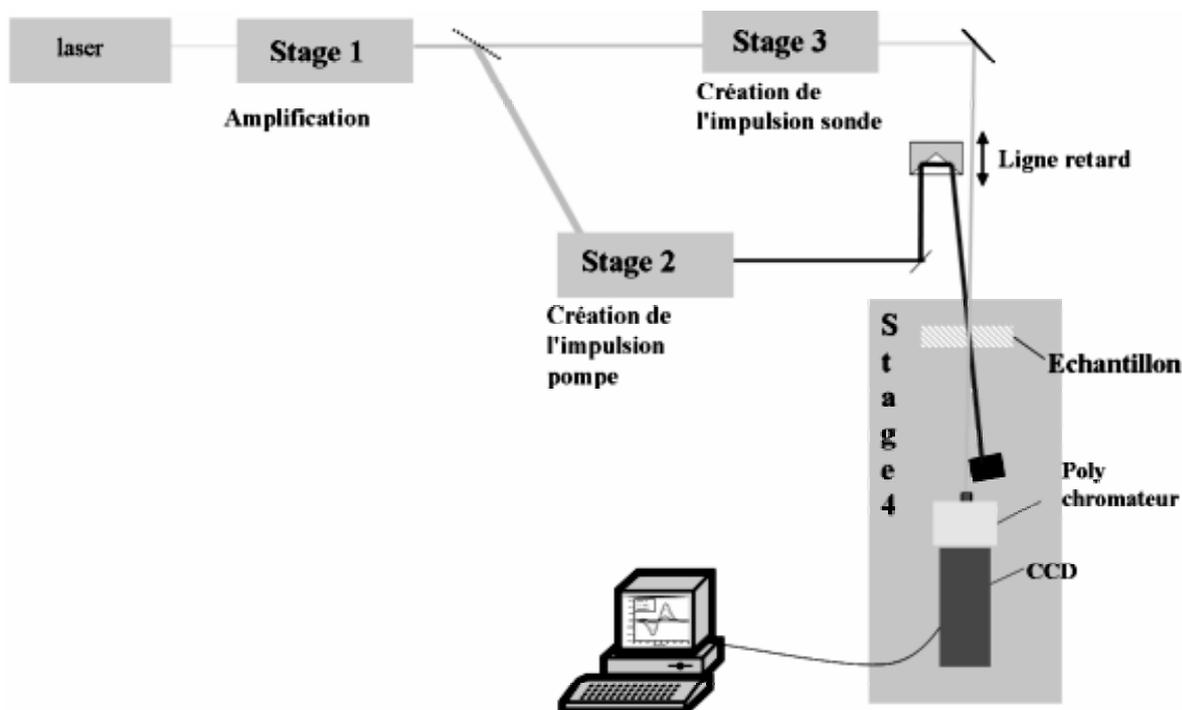


Figure 3.2 : Schéma de l'expérience femtoseconde.

5. Analyse des résultats.

Deux types de procédures ont été utilisés :

Soit les cinétiques sont analysées à quelques longueurs d'onde et dans ce cas, les cinétiques sont ajustées sous Origin[®]. Soit, si la variation du spectre en fonction du temps donne des informations plus pertinentes alors une analyse globale est utilisée et les spectres associés aux déclins exponentiels sont déterminés.

3.4.3 Spectroscopie d'absorption nanoseconde.

Il s'agit également d'une technique pompe sonde, mais ici la sonde est quasi monochromatique et le délai est réglé électroniquement. La résolution temporelle est déterminée par la durée des impulsions (5 ns) et la fenêtre temporelle s'étend au delà de la seconde. L'échantillon est ici aussi excité à 595 nm. Les expériences ont été effectuées au laboratoire de physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste CNRS UPR 1261 dépendant de l'institut de biologie et de physico-chimie (IBPC, FRC 550, CNRS) à Paris en collaboration avec le Dr Fabrice Rappaport. Ici tout l'échantillon est excité à chaque impulsion et le taux de répétition était de 0,2 Hz. Les spectres de transition et les cinétiques sont construits point par point. Des spectres à l'équilibre sont mesurés avant et après les expériences sur un spectrophotomètre à barrettes Hewlet Packard.

3.4.4 La résonance paramagnétique électronique (RPE).

La RPE est une spectroscopie d'absorption micro-onde qui permet l'étude des espèces paramagnétiques caractérisées par la présence d'électrons célibataires. Dans les systèmes biologiques, les radicaux libres (monoxyde d'azote, peroxyde) et les ions des métaux de transition donnent un signal RPE. Le remplissage incomplet des couches électroniques périphérique du fer, du cuivre, du manganèse, du molybdène et du cobalt, pour ne citer que les plus fréquents dans les protéines, permet leur observation par spectroscopie RPE.

Le principe de la RPE.

Selon les lois de la mécanique quantique, pour un électron ($S=1/2$), les deux niveaux d'énergie sont dégénérés. En présence d'un champ magnétique ces deux états ne sont plus de même énergie :

$$E = \pm \frac{1}{2} g \beta B$$

Où E est l'énergie de Zeeman, g le facteur caractéristique du système étudié, β le magnéton de Bohr électronique et B le champ magnétique. Un photon de radiation micro-onde peut induire une transition entre ces deux états. La condition de résonance n'est réalisée que

lorsque l'écart d'énergie entre ces deux niveaux équivaut exactement l'énergie des photons de la radiation électromagnétique :

$$\Delta E = h\nu = g\beta B$$

Avec h la constante de Planck et ν la fréquence de la radiation électromagnétique.

Une source de micro-onde produit une radiation dont la fréquence est fixée par le spectrophotomètre (dans notre cas 9 GHz, bande X) et les conditions de résonance sont déterminées en faisant varier le champ magnétique. L'absorption de l'onde en fonction du champ B est mesurée puis sa dérivée est calculée. Cela permet d'améliorer la sensibilité. Les absorptions sont identifiées par le rapport $g = h\nu/\beta B$

Le facteur g est caractéristique de la molécule dans laquelle sont localisés les électrons célibataires. Il dépend de la nature du centre paramagnétique et de l'environnement moléculaire de l'électron. Pour les radicaux, de spin $1/2$ le facteur g est proche de 2.

Les expériences RPE ont été réalisées au laboratoire de Bioénergétique et d'ingénierie des Protéines (BIP, UPR9036 – CNRS) à Marseille en collaboration avec le Dr Wolfgang Nitschke. Les spectres ont été enregistrés à 15 et 50 K sur un spectromètre Bruker® ESP 300E.

3.5 Modélisation.

Les modélisations moléculaires ont été effectuées en utilisant la version 27 de CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) (Brooks *et coll.* 1983) sur une station de travail avec l'assistance de Jean-Christophe Lambry. Des minimisations d'énergie ont été effectuées sur la cytochrome *c* oxydase de *Paracoccus denitrificans* après ajout de ligands et, pour les mutants, après des changements d'acides aminés.

Les coordonnées de la protéine proviennent du fichier pdb 1AR1 (Ostermeier *et al.*, 1997), seuls ont été pris en compte les 531 résidus de la sous unité I (SU I), les 256 de la SU II, les cofacteurs (2 hèmes et métaux) ainsi que 44 molécules d'eau présentes dans la structure. L'environnement de la protéine a été simulé par 14 molécules de phosphatidylcholine et 1161 autres molécules d'eau.

Des simulations préalables avaient pris en compte les modifications associées à la réduction de l'enzyme (Fe^{2+} , Cu^+) (Lambry *et coll.* 1999). Les coordonnées (distances et angles) des liaisons Fe-N, Cu-N ont été prises à partir de modèle fer-porphyrine-NO (Scheidt & Ellison 1999) et de complexes Cu-NO (Ruggiero *et coll.* 1993). Les champs de forces ainsi qu'une partie des fichiers utilisés ont été créés par Jean-Christophe Lambry lors d'études précédentes (Lambry *et coll.* 1999; Vos *et coll.* 2001). Pour les minimisations avec un ou deux NO, les fichiers de coordonnées de la protéine avaient déjà été créés par J.-C. Lambry. Mon travail a consisté à

calculer les minimisations à 300 K et 20 K ainsi que les transitions de 0 à 300 K et de 300 à 20 K. Pour tous les cas, 50 000 pas de 1 fs ont été utilisés pour le changement de température en utilisant les algorithmes NPRINT et NSAVC puis 2000 pas de minimisation ont été effectués une fois à la température voulue. Les structures obtenues sont analysées avec le programme Rasmol (Sayle & Milner-White 1995).

Pour les simulations des mutations, après le remplacement de l'acide aminé, une minimisation est effectuée par 20 cycles avec l'algorithme SD et 2000 avec ABNR. Ces minimisations ont été faites avec un et deux NO et sans ligands. De la même manière les structures obtenues sont analysées avec Rasmol.

4 Résultats et Discussion.

4.1 Purification des protéines.

4.1.1 Oxydase aa_3 de *Paracoccus denitrificans*.

L'étape cruciale de la purification de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* consiste en la séparation des protéines membranaires, préalablement solubilisées par chromatographie. L'une des difficultés de cette purification est la séparation des complexes de la chaîne respiratoire, qui interagissent fortement (Stroh *et coll.* 2004), sans déstabiliser la structure quaternaire de l'oxydase. À cela s'ajoute la présence de deux autres oxydases terminales dans le génome de *P. denitrificans* : la quinol oxydase ba_3 et la cytochrome *c* oxydase cbb_3 . L'expression de ces oxydases est fonction de la concentration d'oxygène, de la température, du type de milieu utilisé et de d'autres facteurs non encore élucidés (Otten *et coll.* 2001). Il s'est donc avéré nécessaire de mettre au point les conditions de culture et la purification de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*.

4.1.1.1 Mise au point des conditions de culture.

Dans un milieu succinate et sous forte aération, seules les oxydases aa_3 et cbb_3 sont susceptibles d'être exprimées (Baker *et coll.* 1998). L'expression de l'oxydase aa_3 est maximale en condition aérobie, sans pour cela que les autres oxydases ne soient pas présentes (Otten *et coll.* 2001). Afin de maximiser la concentration d'O₂ dans le milieu succinate liquide, deux facteurs ont été variés : le rapport en volume entre le contenu (milieu de culture) et le contenant (l'erlen), et la température de culture. Quels que soient les paramètres choisis, l'agitation était toujours forte afin de favoriser les échanges entre le milieu et l'air. Le tableau 4.1 représente les spectres obtenus en fonction des conditions de culture. La quantité relative d'oxydase aa_3 présente est estimée par le spectre des protéines solubilisées réduites. Le pic à 605 nm est caractéristique des hèmes *a* de l'oxydase aa_3 , alors que l'oxydase cbb_3 possède un double pic à 552, 558 nm du à la présence des hèmes *c* et *b* respectivement (voir figure 4.1).

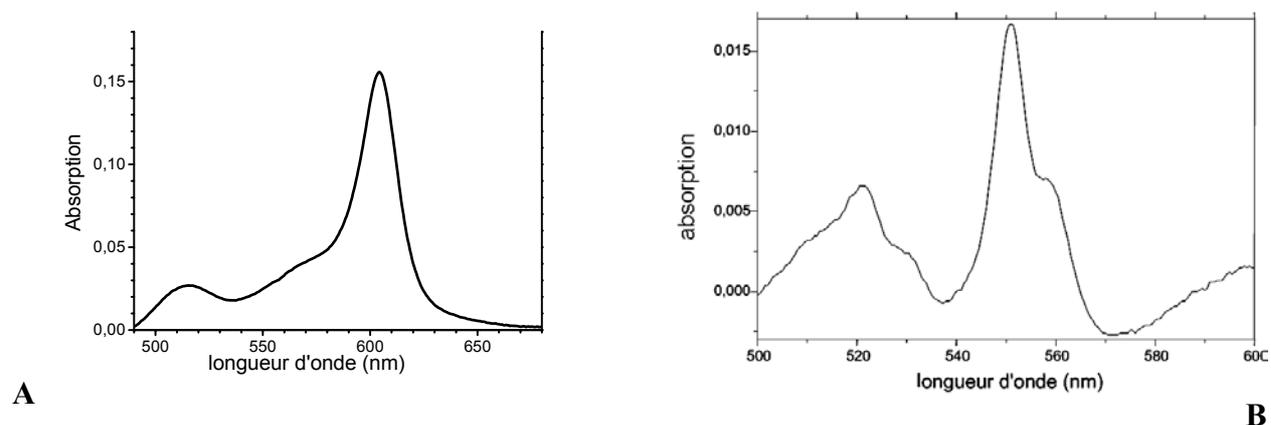


Figure 4.1 : Spectres de différence (Red- Ox) des cytochrome *c* oxydases aa_3 (A) et cbb_3 (B).

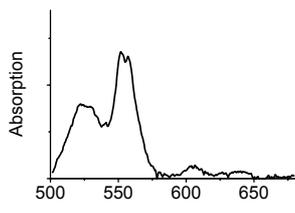
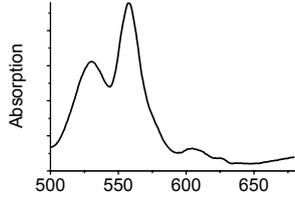
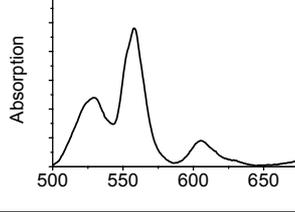
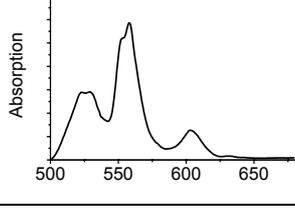
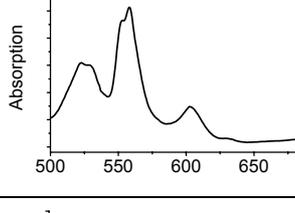
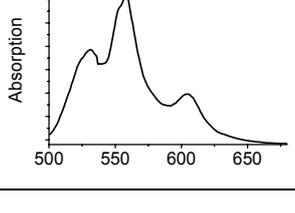
Conditions de culture			Rapport des pics 605/552,558	Spectre des protéines solubilisées entre 500 et 680 nm
Température en °C	Rapport contenu/ contenant	Durée de la culture		
34°C	1,5L dans 5L	20H	<10%	
32°C	1L dans 5L	20H	13%	
32°C	0,75L dans 5L	20H	20%	
32°C	0,5L dans 5L	20H	21%	
28°C	0,75L dans 5L	32H	29%	
24°C	0,75L dans 5L	48H	31%	

Tableau 4.1 : Tableau synthétisant les résultats des différentes conditions de culture testées pour la production de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*.

Lors d'une culture à 34°C avec un rapport contenu/contenant élevée, très peu de CcO aa_3 est exprimée. Cette quantité relative augmente quand le volume de milieu dans l'erlen diminue. Cependant, en amenant ce rapport à 1/10, le gain obtenu est faible. Une augmentation est également observée lors de culture à températures plus faibles. Le tableau 4.1 montre les spectres

de différences (réduit moins oxydé) des protéines solubilisées suivant les conditions de culture. Ces spectres rendent compte de la présence de l'ensemble des hémoprotéines membranaires de *P. denitrificans* dont : le complexe II, le complexe bc, les cytochromes c, les cytochrome c oxydases *aa₃*, *cbb₃* et la quinol oxydase *ba₃*.

Les résultats présentés dans le tableau 4.1 montre une influence de la température et de la quantité de milieu, sur la production de l'oxydase *aa₃*. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la concentration en oxygène dans le milieu. En effet en diminuant le rapport de volume entre le contenu et la contenant, on facilite l'aération du milieu. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par l'équipe d'Amsterdam (Otten *et coll.* 2001). Un effet similaire est observé en diminuant la température, et là même, la vitesse de croissance bactérienne, la [O₂] dans la culture reste élevée dans la mesure où des échanges peuvent avoir lieu. Le gain obtenu est cependant moins important que celui espéré : le rapport des pics est de 45 % pour des cultures en fermenteur (Haltia *et coll.* 1988).

En observant les spectres obtenus, il semble qu'une diminution du pic à 605 nm soit associée à une augmentation du pic à 559 nm et inversement. Or le spectre de l'oxydase *cbb₃* a une forte absorption à cette longueur d'onde (le complexe III possède également deux hèmes de type *b* qui participent aussi à l'absorption à cette longueur d'onde). Ce résultat va dans le sens d'une expression alternative de l'une ou l'autre des cytochrome *c* oxydases mais pas de la quinol oxydase dans les présentes conditions. Pour la suite des expériences, une culture à 28°C avec 750 mL de milieu a été choisie comme étant le meilleur compromis entre le temps de culture et la quantité relative de CcO *aa₃*.

4.1.1.2 Solubilisation.

La purification de la cytochrome *c* oxydase *aa₃* se fait en deux parties : l'isolement des membranes et, après solubilisation des protéines, séparation par chromatographie échangeuse d'ions.

Afin d'optimiser l'étape de solubilisation, deux paramètres ont été variés : la concentration de détergent et la température. La qualité de la solubilisation est déterminée par l'analyse du spectre de différence (réduit moins oxydé) des protéines solubilisées. Les résultats présentés dans le tableau ci-dessous, montrent un effet important de la concentration de détergent.

Concentration en détergent	0,9%		1%		1,1%		1,2 %	
	4°C	24°C	4°C	24°C	4°C	24°C	4°C	24°C
Pic à 558 nm (en mDO)	25,2	12,6	24,6	14,1	23,9	13,3	28,5	12,5
Pic à 605 nm (en mDO)	5,9	3,6	6,7	4,1	5,7	3,3	6,6	3,0
Rapport 605/552	23,4 ±3.1	28,6 ±4.5	27,2 ±2.9	29,1 ±3.9	23,8 ±3.0	24,8 ±4.3	23,2 ±2.8	24,0 ±4.8

Tableau 4.2 : Détermination des conditions optimales pour la solubilisation de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*.

Quelque soit la température, la concentration de détergent la plus favorable à l'extraction sélective est 1,0 % comme l'avait démontrée des études précédentes . (Haltia *et coll.* 1988; Liebl *et coll.* 1999). L'effet de la température est plus ambigu : la proportion d'oxydase solubilisée est plus importante à 24 qu'à 4°C mais la quantité est moindre comme l'indique les plus faibles valeurs d'absorbance (les quantités de départ étant les mêmes quelles que soient les conditions). Lors de la centrifugation permettant la séparation des protéines solubilisées des membranes, le culot est toujours en deux parties : la partie inférieure de couleur beige correspondant aux membranes, et une partie supérieure colorée (rouge-brun) contenant les protéines dégradées lors de la solubilisation. Lors des expériences à température ambiante la seconde phase colorée du culot était plus importante, révélant une forte dégradation à cette température.

Pour la suite, une solubilisation à la concentration finale de β -DM à $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ à 4°C est effectuée.

4.1.1.3 Chromatographie de l'oxydase aa_3 .

La purification des protéines a été effectuée par chromatographie échangeuse d'anions à l'aide d'un système FPLC qui permet une bonne reproductibilité des expériences et un suivi aisé. Les propriétés optiques de l'oxydase ont été utilisées pour suivre l'élution de la protéine et de ses contaminants. Trois longueurs d'onde sont mesurées en continu. L'absorption à 280 nm est caractéristique des noyaux aromatiques et permet de caractériser l'ensemble des protéines. Comme les deux principaux contaminants, le complexe à cytochrome *bc* et le cytochrome c_{552} , contiennent un hème de type *c* et l'oxydase deux hèmes de type *a*, les longueurs d'onde 552 et 605 nm ont été choisies car elles représentent le maximum du spectre d'absorption des hèmes *c* et *a*, respectivement.

Deux résines échangeuses d'anions sont utilisées, une DEAE-sépharose[®] CL6B puis une

Source 30Q[®]. La première étape permet de séparer l'oxydase *aa₃* de la majorité des autres protéines membranaires. La séparation, basée sur la différence de charge globale entre l'oxydase et les autres protéines, est effectuée en augmentant, lors de l'élution, la force ionique du tampon. Ces variations de force ionique ont également pour but de déstabiliser les super complexes, majoritairement formés de l'association entre le complexe *bc*, cytochrome *c* membranaire et la cytochrome *c* oxydase. La variation de force ionique est effectuée en augmentant la concentration de NaCl. Des études précédentes, par exemple (Ludwig & Schatz 1980; Liebl *et coll.* 1999; Otten *et coll.* 2001) ont montrés que l'oxydase *aa₃* de *P. denitrificans* est éluée pour une concentration de NaCl ~240 mM, le complexe *bc*, ~340 mM et le cytochrome *c₅₅₂* vers 160 mM avec de nombreuses autres protéines. L'élution commence par un lavage à 130 mM de NaCl qui élimine les protéines n'ayant pas d'affinité pour la résine, puis un gradient de NaCl est appliqué pour "décrocher" successivement les différentes protéines enfin un nouveau lavage à 340 mM est effectué qui détache toutes les protéines. Afin d'obtenir un bon isolement de l'oxydase *aa₃*, trois types de gradient ont été testés :

1- La figure 4.2 présente le chromatogramme obtenu par l'application d'un gradient 130-350 mM sur les protéines membranaires solubilisées de *P. denitrificans*. Lors de l'élution, trois pics principaux sont observés à ~160 mM, ~240 mM et ~340 mM. Les spectres de différence associés à ces pics sont présentés figure 4.2 droite. Ils indiquent clairement que l'oxydase *aa₃* se trouve majoritairement dans le pic 2. Alors que les pics 1 et 3 contiennent respectivement le cytochrome *c₅₅₂* et le complexe *bc*.

2- Si la séparation des pics était satisfaisante dans les conditions précédentes, les fractions du pic 2, où l'oxydase *aa₃* est majoritaire, contenaient d'autres hémoprotéines (voir spectre). Afin de déstabiliser les interactions entre l'oxydase et le complexe III et surtout le cytochrome *c₅₅₂*, une augmentation brutale de concentration en NaCl est appliquée. Ce procédé permet d'obtenir une oxydase pure (Liebl *et coll.* 1999). La figure 4.3 montre le chromatogramme obtenu par un gradient 200-350 mM NaCl suivie d'un second lavage à 340 mM NaCl. Contrairement aux résultats précédents, le pic 2 apparaît comme un épaulement du pic 1. Les spectres de différence mesurés pour les fractions correspondant aux pics 1 et 3 sont similaires à ceux présentés figure 4.2. L'allure des spectres des fractions du pic 2 varie (voir insert de la figure 4.3), la séparation de l'oxydase *aa₃* des contaminants est meilleure à la fin du pic (spectre rose). La CcO *aa₃* obtenue par cette méthode est plus pure que celle purifiée précédemment. Par contre le rendement est plus faible, puisque l'oxydase purifiée n'est contenue que dans quelques fractions.

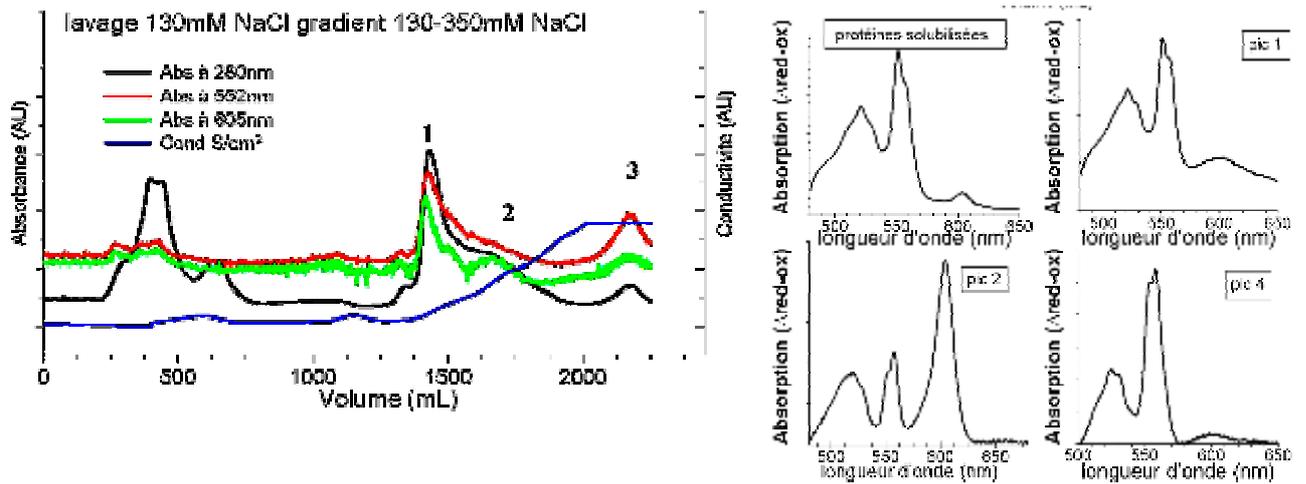


Figure 4.2 : À gauche le chromatogramme des protéines membranaires solubilisées de *P. denitrificans* sur une résine DEAE sépharose CL6B éluées par un gradient 130-350 mM NaCl. Les spectres de différence (réduit moins oxydé) des protéines solubilisées et des pics 1,2 et 3 sont présentés à droite. La courbe noire représente l'absorption à 280 nm, la rouge celle à 552 nm, la verte celle à 605 nm et la courbe bleue représente la conductivité.

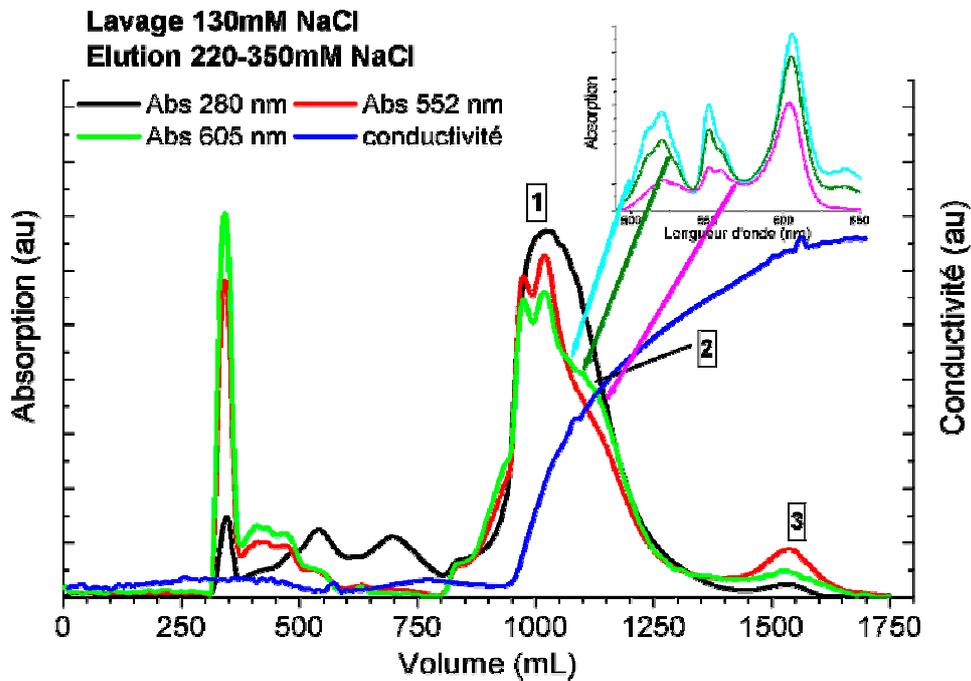


Figure 4.3 : Chromatogramme des protéines membranaires solubilisées de *P. denitrificans* sur une résine DEAE sépharose CL6B éluées par un gradient 200-350 mM NaCl. Les spectres de différence du pic 2 sont présentés en insert. La courbe noire représente l'absorption à 280 nm, la rouge celle à 552 nm, la verte celle à 605 nm et la courbe bleue représente la conductivité.

3- Un troisième type de gradient est testé afin de tenter de combiner pureté de l'échantillon et rendement. Comme le changement brutale de concentration de NaCl a un effet bénéfique sur la séparation de l'oxydase *aa₃*, le lavage à 130 mM est suivie par un 2nd à 200 mM NaCl, l'oxydase est ensuite éluée par un gradient 200-350 mM NaCl. L'utilisation de ce gradient permet de bien séparer les pics 1 et 2 comme l'indique le chromatogramme présenté figure 4.4.

Les spectres des fractions des pics 1 et 3 sont similaires à ceux présentés figure 4.2. De plus l'analyse du spectre de différence des fractions du pic 2 (figure 4.4 insert) montre un échantillon relativement pur.

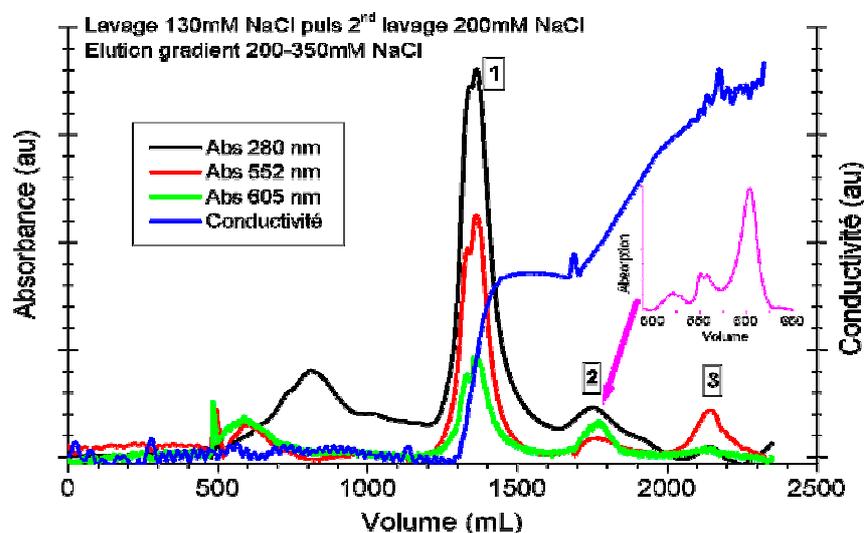


Figure 4.4 : Chromatogramme des protéines membranaires solubilisées de *P. denitrificans* sur une résine DEAE sépharose CL6B éluées par un gradient 200-350 mM NaCl. Le spectre de différence (réduit moins oxydé) du pic 2 est présenté en insert
La courbe noire représente l'absorption à 280 nm, la rouge celle à 552 nm, la verte celle à 605 nm et la courbe bleue représente la conductivité.

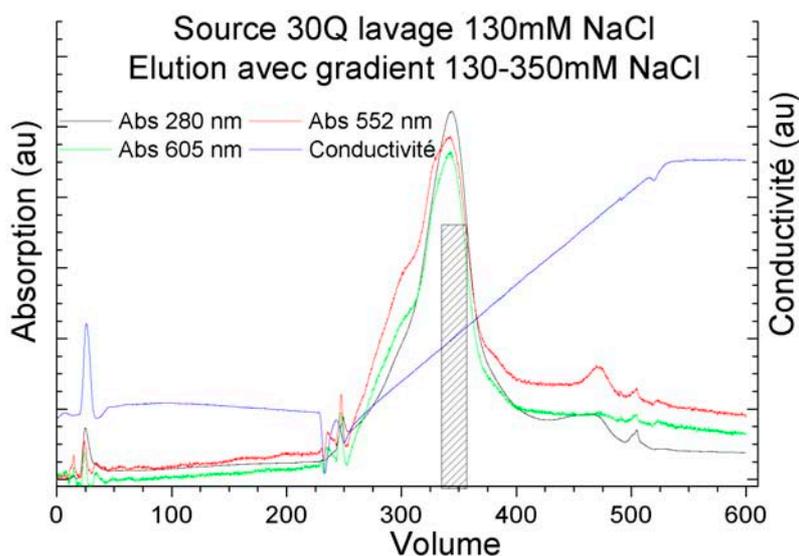


Figure 4.5 : Chromatogramme de l'élué de l'oxydase aa_3 sur la résine Source 30Q. la zone hachurée correspond aux fractions sélectionnées.
La courbe noire représente l'absorption à 280 nm, la rouge celle à 552 nm, la verte celle à 605 nm et la courbe bleue représente la conductivité

L'utilisation de ce double lavage a bien eu l'effet escompté : une bonne séparation des contaminants de l'oxydase aa_3 et une résolution suffisante qui permet d'avoir un rendement correct (voir tableau 4.3). Ces conditions d'élué sont donc celles qui ont été choisies.

Les fractions du pic 2 présentant le meilleurs rapport 605/552 nm sont regroupées, concentrées puis lavées à l'aide de microconcentrateurs afin de ramener la concentration de NaCl à 130 mM. Cet échantillon est alors déposé sur la seconde colonne contenant une résine Source 30Q® et l'oxydase *aa₃* est éluée par un gradient 130-350 mM NaCl. Le chromatogramme obtenu, voir figure 4.5, montre deux pics principaux, le premier contenant l'oxydase *aa₃* ([NaCl] entre 160-260 mM) et le second majoritairement le complexe *bc* ([NaCl] ~330 mM)].

Le pic principal, entre 280 et 380 mL d'élution, est en fait la superposition de plusieurs pics. Afin de déterminer les fractions contenant l'oxydase la plus pure, les spectres de différence des différentes fractions qui composent ce pic ont été mesurés. Le spectre de l'épaulement vers 280 mL d'élution, a une allure similaire à celui du pic 1 obtenue lors de la première colonne, l'absorbance à 605, caractéristique de l'oxydase *aa₃* est faible. Au maximum du pic, le rapport 605/552 nm augmente après le sommet. L'épaulement à droite du pic est riche en complexe oxydase *aa₃*:cytochrome *c₅₅₂*. Seules les fractions les plus pures sont retenues, correspondant à la zone hachurée de la figure 4.5, puis regroupées et concentrées. La protéine est alors aliquotée par 100 µL à 30 ou 50 µM, congelée rapidement dans N₂ liquide, et conservée à -80°C.

4.1.1.4 Rendement et pureté de l'échantillon.

La concentration d'oxydase est estimée par l'absorption à 605 nm en utilisant le coefficient d'absorption molaire ($\Delta\epsilon_{605}=23.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) du spectre de différence réduit moins oxydé. Le tableau 4.3 présente les rendements obtenus lors de la purification de l'oxydase *aa₃*. Ces valeurs sont calculées à partir de l'absorption à 605 nm des spectres de différence. La référence est l'absorption à 605 du spectre des protéines solubilisées.

	après solubilisation	après 1 ^{ère} colonne			finale
		Conditions 1	Conditions 2	Conditions 3	
rendement	100%	20 %	8 %	15 %	10 %

Tableau 4.3 : Estimation du rendement d'une purification de l'oxydase *aa₃* de *P. denitrificans*.

Le spectre d'absorption donne des informations sur la quantité d'oxydase *aa₃* présente et sur la pureté de l'échantillon en trois zones : la bande α , l'intensité des pics à 552 et 559 nm indiquent la quantité d'hème *c* et *b* respectivement, présentes dans l'échantillon. De même dans la bande de Soret, l'absence d'épaulement ($\lambda < 420$ pour l'échantillon oxydé), ou d'autres pics, indique la non présence d'autres hémoprotéines. La troisième zone, donnant des informations sur la pureté de l'échantillon, est aux alentours de 280 nm. Cette longueur d'onde permet d'estimer la quantité de protéines. Si l'échantillon ne contient que de l'oxydase *aa₃*, la hauteur du pic à 280 nm doit être proche de celui à 420 nm pour la protéine dans son état oxydé (Ludwig 1986).

L'échantillon purifié est également analysé sur gel de polyacrylamide à 15 % en

conditions réductrices dénaturantes SDS-PAGE. Les protéines ainsi séparées sont colorées par du bleu de Coomassie. En plus, les gels ont été révélés par une coloration basée sur l'activité peroxydase des hèmes de type *c* qui oxydent le TMBZ en un composé de couleur verte, le "heme staining" (Thomas *et coll.* 1976). Cette réaction permet de tester la présence des cytochromes *c* dans l'échantillon. Du cytochrome *c* commercial de cœur de bœuf est utilisé comme témoin positif de la réaction.

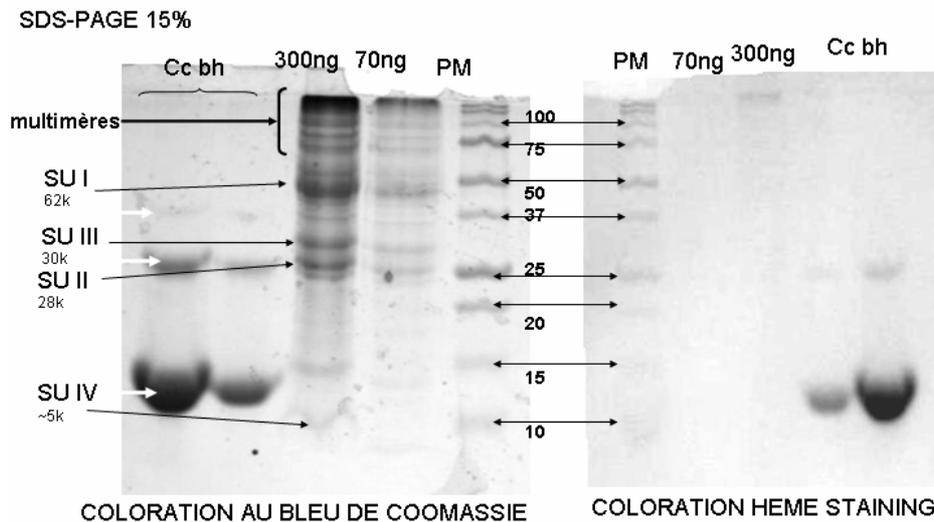


Figure 4.6 : SDS PAGE à 15% coloré par du bleu de Coomassie (à gauche) Coloration des hèmes de type *c* (à droite). Les flèches noires indiquent des SU de l'oxydase, les blanches le cytochrome *c* sous forme mono-, di- et trimérique.

La coloration au bleu de Coomassie révèle les bandes protéiques (indiquées par des flèches vertes) caractéristiques des SU de l'oxydase *aa₃* de *P. denitrificans* à 62, 30, 28 et 10 kDa. Cependant d'autres bandes sont visibles en particulier pour les hauts poids moléculaires, elles correspondent à des agrégations de protéines ayant lieu lors de la préparation des échantillons pendant l'incubation à 65°C. Cette multimérisation est aussi observé pour le cytochrome *c* où des bandes correspondant au dimère et au trimère sont observées (indiquées par les flèches blanches dans la figure 4.6). Deux faibles bandes protéiques contaminantes ne correspondant à aucune sous unité de l'oxydase sont également observées dans l'échantillon purifié. Aucune bande n'est observée par la coloration au TMBZ, indiquant l'absence d'hème *c*. En résumé, l'échantillon d'oxydase ainsi purifiée est d'une pureté suffisante pour nos expériences.

4.1.2 - Oxydase mitochondriale.

La purification de l'oxydase mitochondriale est faite à partir de cœur de bœuf frais. Dans un premier temps, les mitochondries sont isolées puis la purification proprement dite est réalisée.

4.1.2.1 Isolement des mitochondries.

Après la hachage du muscle cardiaque, les cellules sont séparées les unes des autres par

l'action d'une collagénase. L'étape suivante est la destruction des cardiocytes afin de récupérer les mitochondries. Le mode de dégradation de la membrane plasmique ne doit pas être trop agressif pour préserver l'intégrité des mitochondries. Nous avons donc choisi un potter verre-téflon. Cette étape peut être précédée par un mixage, il en résulte un gain de temps important mais de nombreuses mitochondries sont également endommagées. Par centrifugation, les mitochondries et les fragments de membranes mitochondriales, sont récupérés.

4.1.2.2 Purification de l'oxydase.

De nombreuses méthodes mises au point pour purifier la cytochrome *c* oxydase mitochondriale, sont basées sur la solubilisation sélective de l'oxydase. Nous avons choisi de "présolubiliser" une partie des protéines des membranes externes et internes mitochondriales par du déoxycholate à 0,8 %. Cette étape, appelée "red/green split" permet de séparer efficacement l'oxydase aa_3 des autres hémoprotéines de la chaîne respiratoire. La figure 4.7 montre les spectres réduits moins oxydé de la suspension avant centrifugation et les spectres du surnageant et du culot. On voit qu'après cette étape, l'oxydase se trouve majoritairement dans le culot et les cytochromes *b* et *c* dans le surnageant. Le cytochrome *c* soluble, présent dans l'espace intermembranaire est également libéré à cette étape : le déoxycholate augmente la porosité de la membrane externe.

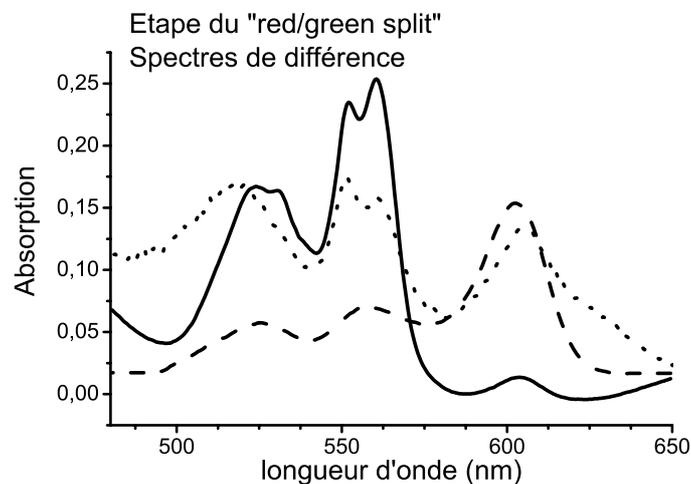


Figure 4.7 : Spectres de différence réduit moins oxydé avant (.....)et après la première étape de séparation, surnageant (____) et culot (- - - - -).

L'oxydase, solubilisée par du cholate à 3 %, est ensuite purifiée par précipitation sélective au sulfate d'ammonium : les cytochromes *b* précipitent à 28 % de saturation, l'oxydase aa_3 à ~40 % et les cytochromes *c* >45 %. Plusieurs cycles 35 %, 42 % de saturation sont effectués pour l'obtention d'une oxydase optiquement pure. La figure 4.8 montre les spectres de différence des culots (42 % de saturation) normalisés. La diminution de l'intensité relative des pics à 552;

559 et 520 nm reflète l'amélioration de la pureté de l'échantillon. Des cycles supplémentaires peuvent être réalisés, l'oxydase est alors plus pure mais le rendement diminue. Dans notre cas, après trois cycles une pureté suffisante a été obtenue.

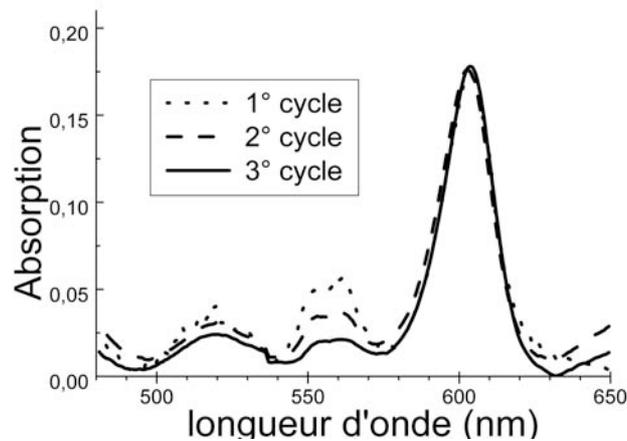


Figure 4.8 : Spectres de différence (réduit moins oxydé) des culots à 42 % de saturation obtenus après 1 (.....), 2 (---) et 3 cycles (____). Résultats normalisés à 604 nm.

Le cholate a été montré inhiber l'oxydase (Kadenbach *et coll.* 2000), ce détergent est donc remplacé par le β -DM à 0.1 % par dialyse.

Afin de vérifier la pureté de l'échantillon un SDS-PAGE à 15% est réalisée. Le gel présenté figure 4.9 présente des bandes correspondant aux 13 SU de l'oxydase mitochondriale. D'autres bandes de plus faible intensité indiquent la présence de contaminants en faible quantité.

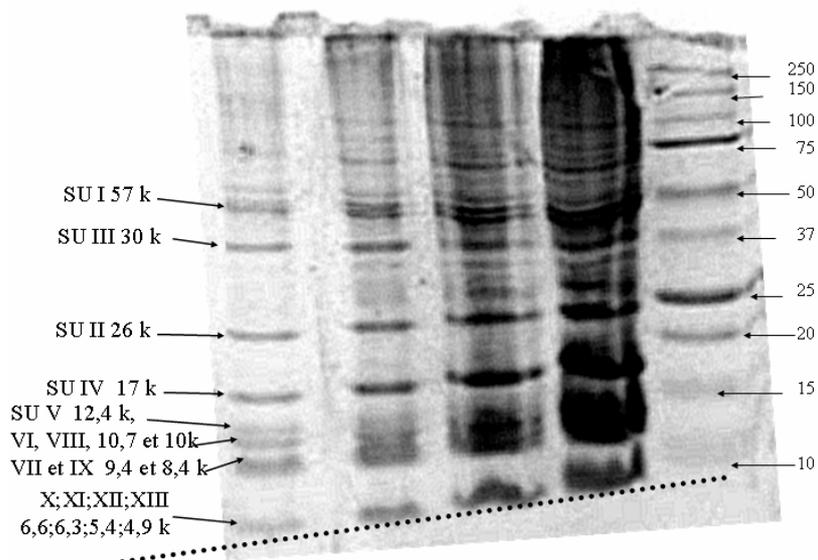


Figure 4.9 : SDS PAGE à 15%. Le puits à droite contient le marqueur de poids moléculaire et les 4 autres puits contiennent des quantités croissantes de CcO purifiée. La ligne pointillée représente le front de migration.

4.2 Interactions entre la cytochrome c oxydase aa_3 bactérienne et le monoxyde d'azote.

Le but des expériences décrites dans ce chapitre est de déterminer la nature des interactions du monoxyde d'azote (NO) au niveau du site actif de la cytochrome *c* oxydase. Des études précédentes de photodissociation du NO lié à l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*, sur une échelle de temps de 300 ps, avaient montré que la cinétique de recombinaison dépendait de la concentration de NO (Vos *et coll.* 2001). Ces résultats pouvaient être expliqués par la présence de plusieurs molécules de NO (deux très probablement) dans ou à proximité du site actif dès les concentrations basses. A partir d'études RPE menées à très fortes concentrations de NO, il a été proposé que plusieurs ligands étaient susceptibles d'être présents simultanément dans le site actif (Brudvig *et coll.* 1980; Boelens *et coll.* 1982; Hunter *et coll.* 1998; Pearce *et coll.* 2003). Les implications physiologiques de ces présences concomitantes seront discutées au regard des résultats obtenus durant cette étude.

L'objectif premier de ces expériences était de déterminer les raisons de la dépendance de la concentration de NO sur la cinétique de recombinaison. Pour ce faire, les mesures de photodissociation ont été étendues à des échelles de temps plus longues (jusqu'à milliseconde). Afin de caractériser la nature du second site de fixation, les échantillons ont été analysés par spectroscopie RPE. Les expériences sont également réalisées sur une autre cytochrome *c* oxydase : l'oxydase ba_3 de *T. thermophilus*.

Cette oxydase, dont la structure est proche de celle de l'oxydase de *P. denitrificans* (Soulimane *et coll.* 2000), possède un hème de type *b* à la place de l'hème *a* des oxydases aa_3 . Par contre, le site actif, formé d'un hème a_3 et d'un atome de Cu_B , est structurellement très similaire à celui des CcO "classiques". On sait que cette oxydase possède une forte affinité pour l'oxygène et une activité NO-réductase (Giuffrè *et coll.* 1999). Cette activité conduit à la formation de N_2O à partir de deux molécules de NO fixées dans le site actif ce qui exclut la présence à l'équilibre de deux molécules de NO. L'oxydase ba_3 sert ainsi de témoin d'une oxydase avec un seul NO dans le site actif. L'enzyme utilisée lors des expériences a été purifiée par T. Soulimane (Soulimane *et coll.* 1995; Soulimane *et coll.* 2000).

4.2.1 Spectroscopie à l'équilibre.

Le NO se fixe sur la cytochrome *c* oxydase de *P. denitrificans* au niveau du Fea_3 du site actif réduit. Cette fixation se manifeste par des modifications spectrales suivies par spectrométrie d'absorption entre 700 et 250 nm. La réduction de l'oxydase, par l'ascorbate, est caractérisée par un déplacement du maximum d'absorption et un affinement du pic dans la bande de Soret (ou

bande γ) de 422 (forme oxydée) à 444 nm (forme réduite) et par une forte augmentation de l'absorption à 605 nm dans la bande α (voir figure 4.10). La fixation de NO sur la CcO réduite, s'accompagne d'un décalage d'une partie de la bande à 445 nm vers 428 nm ainsi que d'un déplacement du maximum de l'absorption dans la bande α de 605 à 602 nm. La bande a_3 -NO se détache alors de la bande a et un spectre avec un pic double est observée dans le Soret. Cette modification du spectre est caractéristique de la liaison du NO à l'hème a_3 de l'oxydase aa_3 (Wainio 1955; Vos *et coll.* 2001). L'intensité maximale de ces modifications est atteinte pour un rapport de concentrations de 10 molécules de NO pour une d'oxydase. Une fixation partielle est observée pour les stœchiométries plus faibles, indiquant une faible affinité de l'hème a_3 pour le NO et/ou la présence d'un second site d'affinité légèrement supérieure.

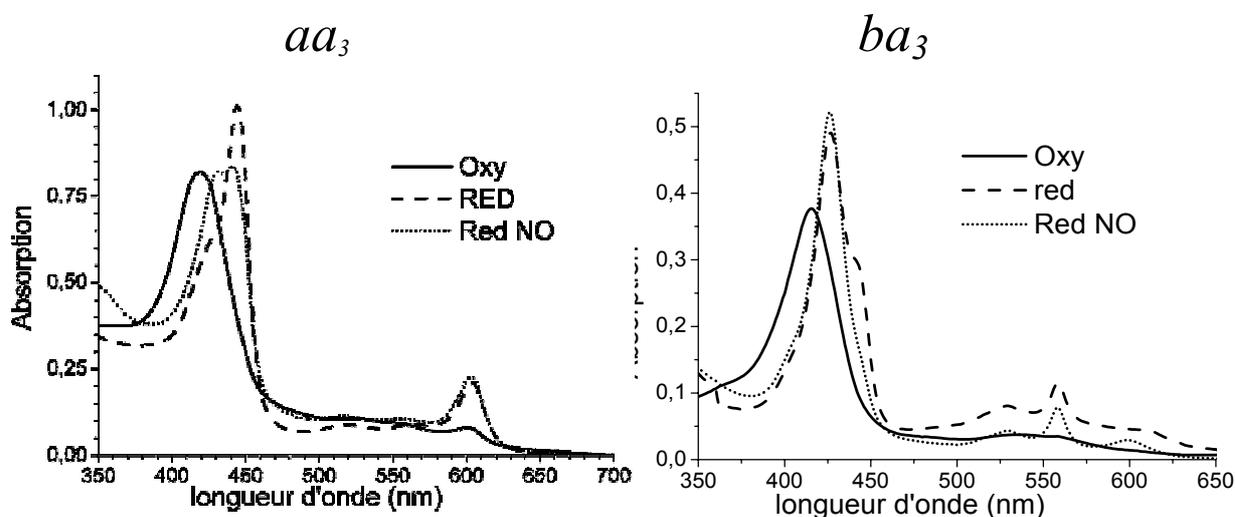


Figure 4.10 : Spectres d'absorption des oxydases aa_3 de *P. denitrificans* (à gauche) et ba_3 de *T. thermophilus* (à droite). La courbe en trait plein représente l'enzyme à l'état oxydé, le trait en tiret l'état réduit et le pointillé, l'état réduit fixant le NO.

La fixation du NO sur l'oxydase ba_3 de *T. thermophilus* induit la disparition de l'épaule à 445 nm associé à une augmentation du pic à 428 nm, et par un déplacement du pic dans la bande α de 605 à 600 nm, ce qui traduit la fixation du NO sur l'hème a_3 . Ces changements sont très similaires à ceux de aa_3 . L'effet dans la bande α est néanmoins plus visible du fait qu'il n'y ait pas de recouvrement avec l'absorption de l'hème a . Contrairement à ce qui est observé avec l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*, une fixation totale du NO sur la cytochrome c oxydase ba_3 de *T. thermophilus* est atteinte dès les faibles concentrations (rapport 1:1). Cette saturation rapide de la liaison du NO révèle une affinité importante de l'hème a_3 de l'oxydase ba_3 pour le NO. Ce résultat diffère de celui obtenu avec le CO : même à concentrations élevées, le CO ne se fixe qu'à 70 % sur l'hème a_3 (Goldbeck *et coll.* 1992), les 30 % restant se fixant sur le Cu_B (Koutsoupakis *et coll.* 2002). Afin d'estimer précisément la proportion de NO

fixée sur l'hème a_3 , la dérivée seconde des spectres de l'oxydase réduits et réduit-NO sont calculés (figure 4.11). Cette méthode est utilisée pour quantifier les contributions relative de bandes spectrales qui se superposent partiellement. L'épaule à 444 nm, formé par l'espèce réduite sans NO correspond à un pic négatif dans la dérivée seconde. Un tel minimum n'est pas observé dans la dérivée seconde du spectre lié où l'épaule est décalé vers le bleu, comme en aa_3 . Une analyse quantitative indique que dès l'ajout de quantités stœchiométriques au moins 97 % de la population d'oxydase a fixée du NO sur l'hème a_3 (figure 4.11).

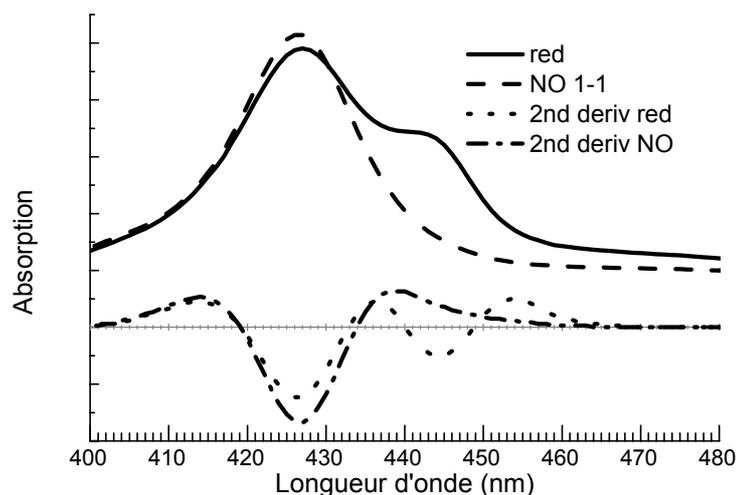


Figure 4.11 : Spectres de l'oxydase ba_3 de *Thermus thermophilus* à l'état réduit et réduit-NO ainsi que leur dérivée 2nd. La courbe continue représente le spectre réduit, la tiret, le spectre réduit NO, la pointillée la dérivée 2nd du spectre réduit et la tiret-pointillée celle du spectre réduit-NO.

Ceci implique, que contrairement au CO, l'affinité de l'hème a_3 pour NO est beaucoup plus grande que celle du Cu_B . Il n'y a pas, dans les conditions actuelles (NO:enzyme 1:1), de consommation de NO et donc une seule molécule de NO par site actif.

Par ailleurs, la superposition des spectres de différence, réduit lié au NO (Figure 4.10 courbes (.)) moins réduit (Figure 4.10 courbes - - - -), présentée figure 4.12, montre des dissimilitudes significatives entre les spectres des deux oxydases, lors qu'il s'agit, dans les deux cas, du spectre de dissociation du NO de l'hème a_3 . Au niveau de la bande α , il n'y a pas de différence, par contre dans la bande de Soret, un décalage de 2-3 nm est observé. Ces variations ont probablement leurs origines dans des différences d'environnement des deux hèmes a_3 . La structure 3D montre en effet que la distance entre le Fea_3 et le $N\epsilon_2$ de l'histidine lié à l'hème mesure 3,3 Å pour ba_3 comparée à 2,2 Å pour aa_3 à l'état oxydé. De plus, la nature du second hème pourrait influencer le spectre de l'hème a_3 . Il a ainsi été montré que l'état redox de l'hème a affecte le spectre de dissociation du CO lié à l'hème a_3 (Einarsdottir 1995, voir aussi chapitre 4.3). Alternativement, la présence d'une seconde molécule de NO dans le site actif, modifierait le

spectre d'absorption. Les faibles différences spectrales observées à hautes et basses concentrations de NO pour l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*, ne sont pas consistantes avec cette hypothèse (figure 4.12). De telles différences entre aa_3 et ba_3 n'ont pu être établies pour la liaison de CO, du fait de la fixation partielle pour ba_3 de ce ligand sur l'hème a_3 .

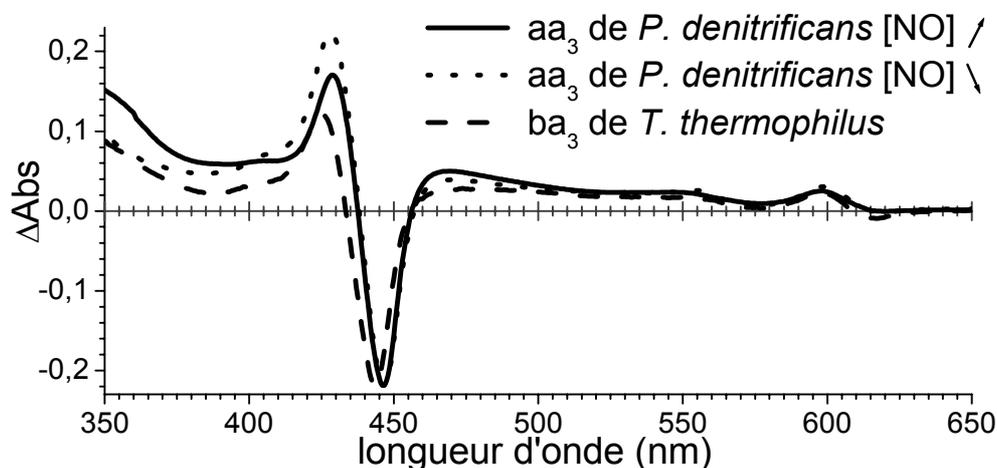


Figure 4.12 : Spectres de différence RedNO-Red des CcO aa_3 de *P. denitrificans* à hautes (—) et basses concentrations de NO (.....) et ba_3 de *T. thermophilus* (-----). Les spectres sont normalisés au minimum

	Maxima	Minimum	Point isosbest
aa_3	429, 598 nm	446 nm	437 nm
ba_3	425, 598 nm	443 nm	434 nm

Tableau 4.4 : Caractéristiques des spectres (Red NO) - (Red) des oxydases aa_3 de *P. denitrificans* et ba_3 de *T. thermophilus*

4.2.2 Spectroscopie ultrarapide.

Des études de spectroscopie pompe-sonde, réalisées avec une résolution temporelle de ~ 100 fs, sont menées sur les oxydases aa_3 et ba_3 . Ces expériences testent l'influence de la présence d'une seconde molécule de NO sur les cinétiques de recombinaison du NO sur l'hème a_3 . Des expériences précédentes sur l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* avaient, par ailleurs, montré une influence de la concentration de NO sur sa réassociation sur l'hème a_3 . Ces études, menées sur une fenêtre de 300 ps, n'ont pas permis de trancher formellement entre deux hypothèses émises précédemment. L'une interprète l'accélération de la recombinaison géminée du NO sur l'hème par la présence d'une seconde molécule de NO liée à proximité, probablement sur le Cu_B , bloquant ainsi la voie de sortie du NO vers l'extérieur de la protéine (voie **B** sur la figure 4.13).

L'augmentation de la phase rapide de recombinaison serait alors due à un effet stérique du second NO. Cette hypothèse implique que l'augmentation de la concentration de NO élève la probabilité que les deux sites de fixation du NO soient occupés simultanément. Ceci se traduit par une l'amplitude plus grande de la phase rapide de recombinaison. La seconde hypothèse repose sur une compétition entre une molécule de NO présente dans le site actif et le NO dissocié. Dans ce cas, plus la concentration de NO est élevée plus la recombinaison est rapide (voie C sur la figure 4.13). Dans les deux cas, une fraction du NO peut également sortir du site actif. Dans le cas où une seule molécule de NO est présente, aucune recombinaison n'est observée. Par analogie avec les résultats obtenus avec le CO, on peut supposer qu'après une liaison sur le Cu_B, le NO sorte de la protéine (figure 4.13 A).

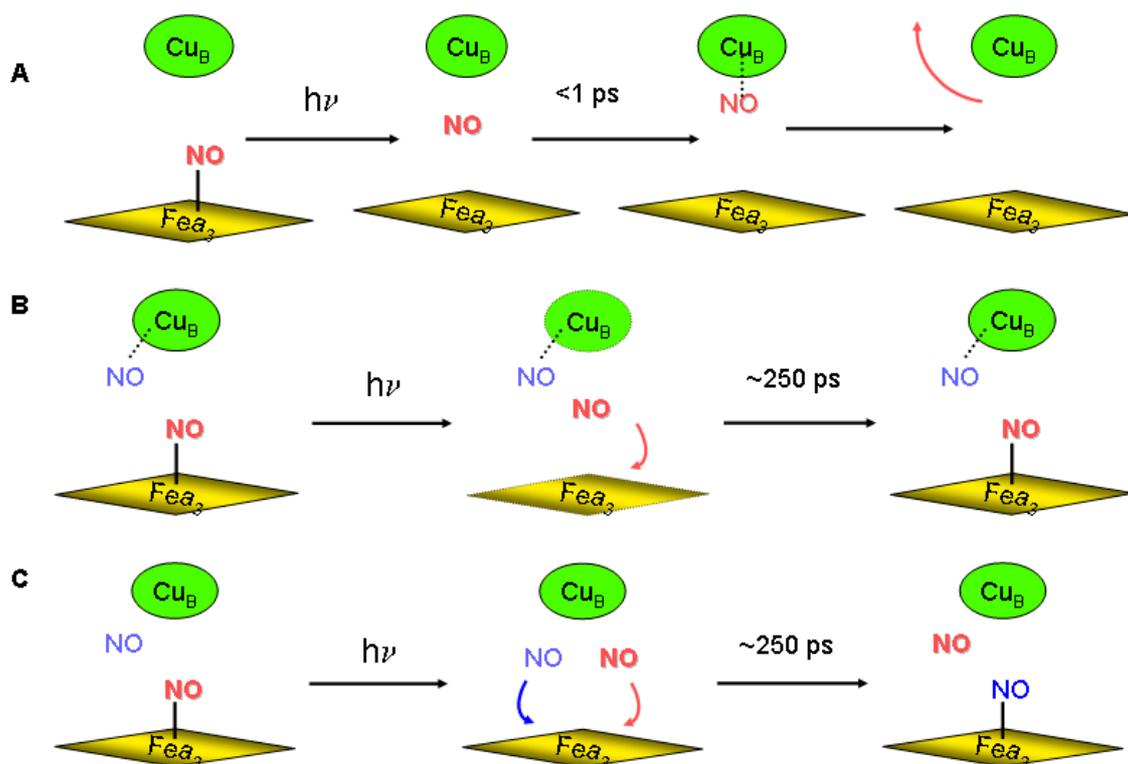


Figure 4.13 : Schéma des hypothèses émises par Vos *et al.* pour expliquer l'influence de la concentration de NO sur la vitesse de recombinaison après photodissociation. (Vos *et coll.* 2001)

A : modèle avec une molécule de NO dans le site actif.

B et C : modèles avec deux molécules de NO dans le site actif, voir texte pour description

Les cinétiques, présentés figure 4.14 A, représentent la vitesse de recombinaison du NO sur l'hème en fonction de la concentration de NO. L'impulsion lumineuse provoque la rupture de la liaison Fea₃-NO, entraînant un décalage du spectre vers le rouge (Figure 4.14 B), caractérisé par une diminution de l'absorption à 427 nm (longueur d'onde de l'hème a₃ lié au NO) et une augmentation à 446 nm (hème non lié). Les valeurs en ordonnées de la Figure 4.14 A

correspondent à la différence d'absorption entre 444 et 428 nm. La variation de cette différence est suivie sur une fenêtre temporelle de 2 ns. Afin de faciliter la lecture des résultats, les données sont normalisées à 30 ps car à ce temps les changements de spectres associés aux états excités, qui sont formés par l'impulsion lumineuse, ont disparu (Petrich *et coll.* 1988; Stoutland *et coll.* 1991). Les cinétiques ne reflètent ainsi que la dynamique de re liaison du NO.

Pour une concentration de 1 NO par enzyme, ~7 % de recombinaison est observé à 200 ps alors que ~50 % du NO est réassocié lorsque des concentrations fortes sont utilisées (>10:1). L'oxydase réduite en absence de NO ne donne aucun signal sur l'échelle de temps utilisée [30 ps-2 ns]. Quelle que soit la concentration de NO, toutes les cinétiques peuvent être décrites par une fonction de décroissance monoexponentielle, avec une constante de temps de 200ps, et une valeur asymptotique sur cette échelle de temps. La concentration de NO fait varier l'intensité relative de la valeur asymptotique sans modification de la constante de temps. La concentration de NO élevée favorise donc un phénomène de recombinaison rapide et n'induit pas son accélération, écartant ainsi l'hypothèse C (voir figure 4.13). Quelle que soit la concentration et le temps de mesure suivant la photodissociation, les spectres transitoires sont homothétiques, indiquant le même phénomène de réassociation. Ceci indique que l'effet de la concentration est bien un effet stérique. La présence de la phase de 200 ps, indiquant la présence d'un second site de fixation du NO dont l'occupation induit une modification stérique du site actif. L'occupation de ce 2nd site dès la stœchiométrie 1 NO pour 1 CcO indique une affinité proche des deux sites de fixation du NO de l'oxydase *aa*₃ (Fea₃ et Cu_B ?).

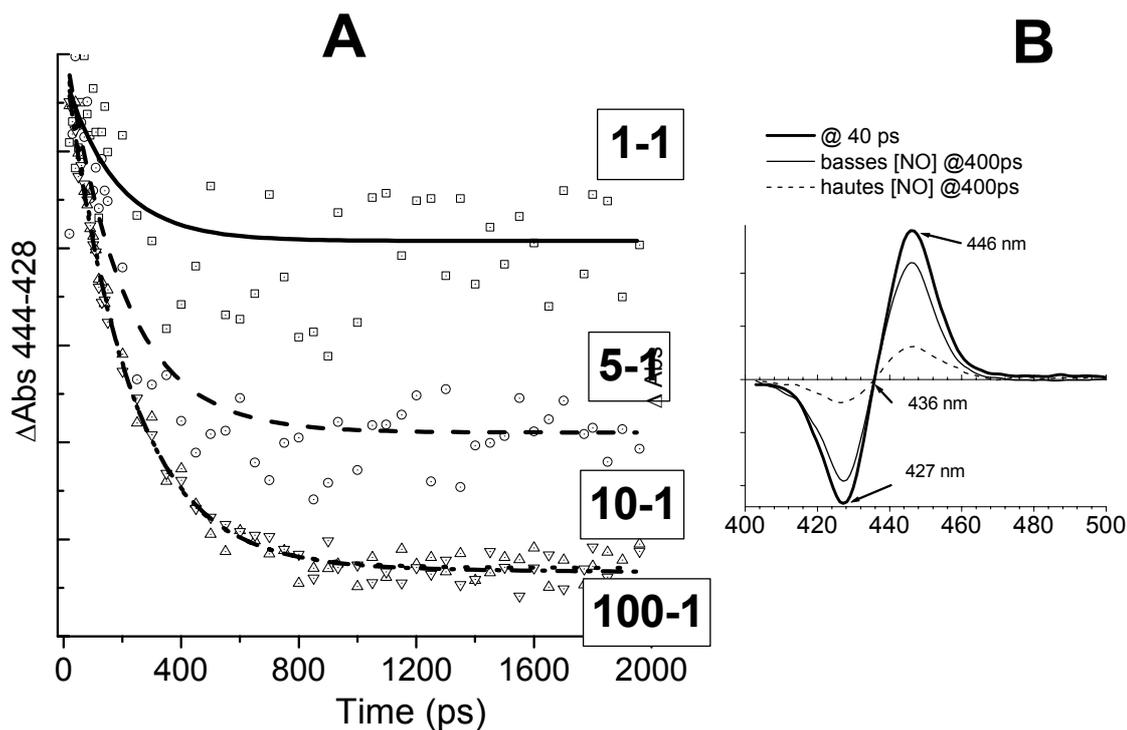


Figure 4.14 : A) Cinétique de recombinaison du NO sur la CcO de *P. denitrificans*. Les carrés représentent une stoechiométrie de 1 pour 1, les cercles 5:1, les triangles vers le haut 10:1, les triangles vers le bas 100:1. Les lignes sont des ajustements avec une fonction monoexponentielle avec une constante de temps de 200ps et un facteur asymptotique.

B) Spectres transitoires à $t=400$ ps pour les stoechiométries 130:1 (ligne pointillée) et 1:1 (ligne continue).

Les résultats sont normalisés à 30 ps.

L'effet de la concentration du NO a été également étudié sur l'oxydase *ba₃*. Les cinétiques, présentées figure 4.15 A, décroissent faiblement sur 2 ns. Aucun effet de la concentration de NO n'est observée sur le taux de réassociation. Il y a bien une phase de recombinaison, mais la constante de temps (>2 ns) ne peut être déterminée précisément sur une échelle de 2 ns. L'absence d'effet de la [NO] indique fortement qu'il n'y a qu'une molécule de NO par site actif. L'allure des spectres transitoires, présentés figure 4.15 B, ne change pas durant la cinétique, indiquant qu'il s'agit, comme pour la CcO *aa₃*, d'un seul processus sur cette échelle de temps.

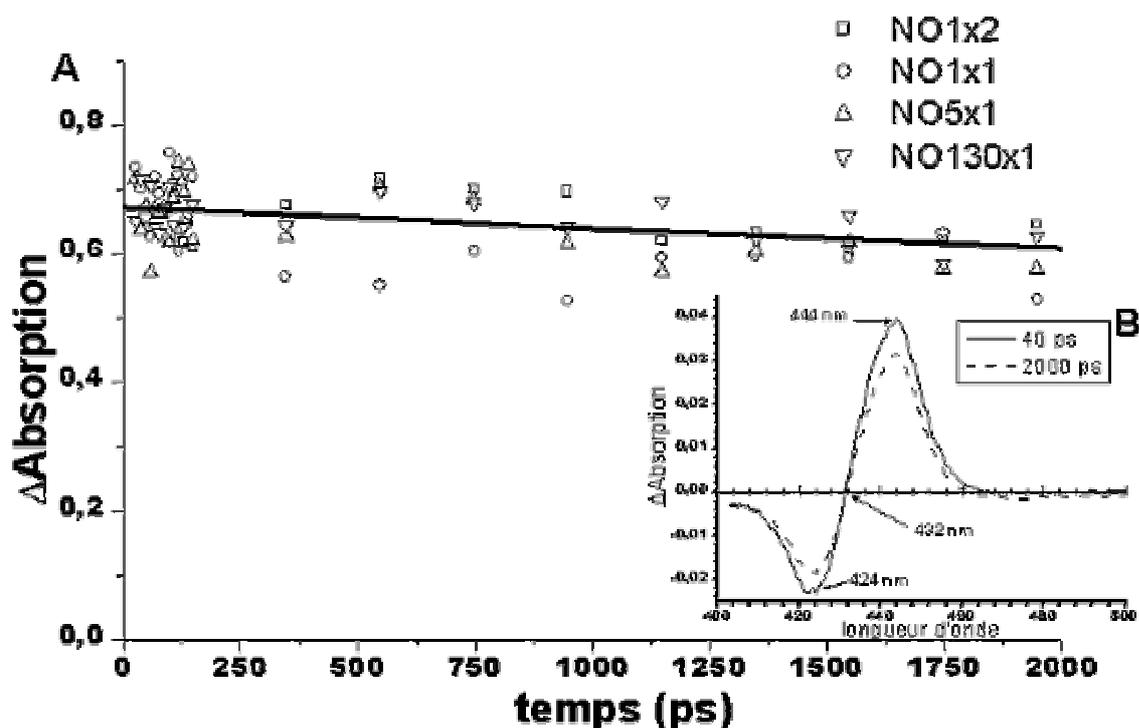


Figure 4.15 A : Cinétiques de recombinaison du NO sur la CcO de *T. thermophilus*. Les carrés représentent une stoechiométrie de 1 pour 1, les cercles 5:1, les triangles vers le haut 10:1, les triangles vers le bas 100:1. La courbe est un ajustement des données par une monoexponentielle de constante de temps >10 ns sans valeur asymptotique. Les cinétiques sont normalisées à 30 ps.
B : Spectres transitoires à 40 ps et 2 ns.

4.2.3 Spectroscopie nanoseconde.

Les résultats obtenus sur une échelle pico à nanoseconde, indiquent clairement qu'une fraction importante de la recombinaison gémée du NO sur l'hème a_3 a lieu sur une échelle supérieure à 2 ns, et dépend de la concentration du NO. Par ailleurs, des expériences sur la recombinaison du NO sur l'oxydase mitochondriale à très hautes concentration de NO, ont montré une cinétique de recombinaison multiphasique (Blackmore *et coll.* 1991). Nous avons réalisé des expériences pompe-sonde sur une échelle de temps allant de 5 ns jusqu'à la milliseconde sur les oxydases aa_3 de *P. denitrificans* et ba_3 de *T. thermophilus*.

La recombinaison du NO sur l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*, présentée figure 4.16, varie selon la concentration de NO. Les courbes sont normalisées à 100 ns afin de faciliter la comparaison de l'influence de la concentration de NO (contrairement aux normalisations faites figure 4.14). Quelle que soit la concentration de NO, les cinétiques de recombinaison peuvent être décrites par une phase de décroissance rapide non résolue, qui suit la fonction de l'instrument, une fonction de décroissance monoexponentielle avec une constante de temps de 20 ns, et une valeur asymptotique. Cependant, lors des expériences à faibles concentrations de NO (<5:1), l'amplitude des phases de décroissance est fortement diminuée. Pour la phase non

résolue, ce résultat corrobore l'amplitude réduite de la phase de 200 ps observée lors des expériences picosecondes. La phase de 20 ns dépend donc également de la concentration de NO, indiquant que ces deux phases décrivent un même phénomène multiphasique. Aucune décroissance importante n'est observée jusqu'à l'échelle milliseconde. Sur des temps plus long (>1 ms), la recombinaison devient à nouveau dépendante de la concentration de NO. Ces résultats, sont similaires à ceux obtenus avec l'oxydase mitochondriale (Blackmore *et coll.* 1991), et reflèteraient une recombinaison bimoléculaire à l'échelle milliseconde.

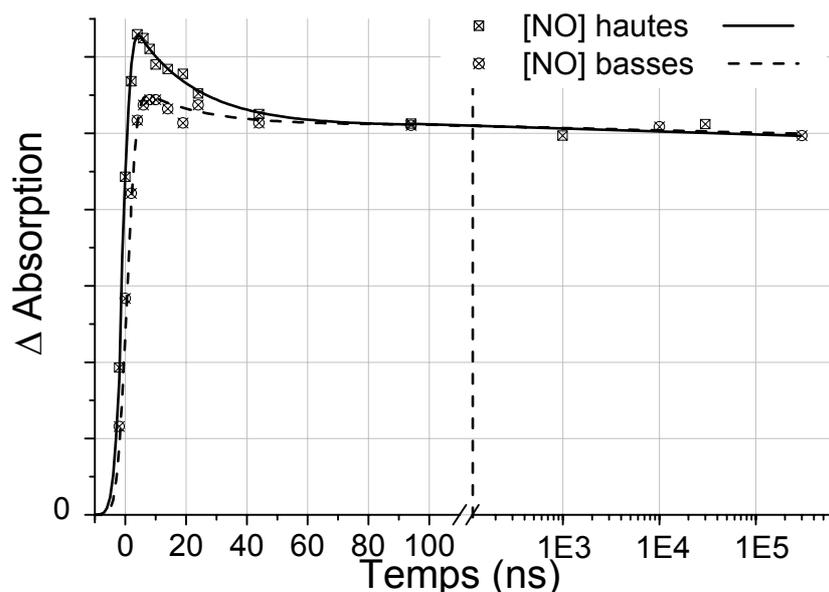


Figure 4.16 : Cinétiques de recombinaison du NO sur l'oxydase aa_3 sur une échelle nanoseconde.

Les cercles représentent les résultats obtenus avec de faibles concentrations de NO et les carrés, les hautes concentrations.

Les courbes sont normalisées à 100 ns.

L'existence d'une phase de recombinaison plus rapide que l'impulsion dans les expériences nanoseconde suggère que pendant l'impulsion de 5 ns, le NO serait susceptible d'être dissocié, de se recombinaison puis d'être à nouveau dissocié, potentiellement à plusieurs reprises. Afin de tester cette hypothèse, la dépendance de l'intensité du flash de dissociation sur le rendement de photodissociation a été mesurée. Les courbes de saturation, présentées figure 4.17, sont normalisées à 20 % de l'intensité maximale du flash. Pour les faibles concentrations de NO, la courbe montre une saturation rapide, proche de celle du CO. Par contre, à hautes concentrations de NO, la saturation est beaucoup plus lente et s'effectue à des intensités de flash très supérieures. Ces résultats sont en adéquation avec la variation de l'intensité de la phase de 200 ps avec la concentration de NO lors des expériences picoseconde (figure 4.14 A). Le CO sert de référence, une seule molécule de CO pouvant être présente dans le site actif de l'oxydase et il

n'y a pas de recombinaison à l'échelle nanoseconde (Dyer *et coll.* 1991; Georgiadis *et coll.* 1994). Il y a donc plusieurs cycles de photodissociation et de recombinaison durant la durée de l'impulsion pour les hautes concentrations de NO.

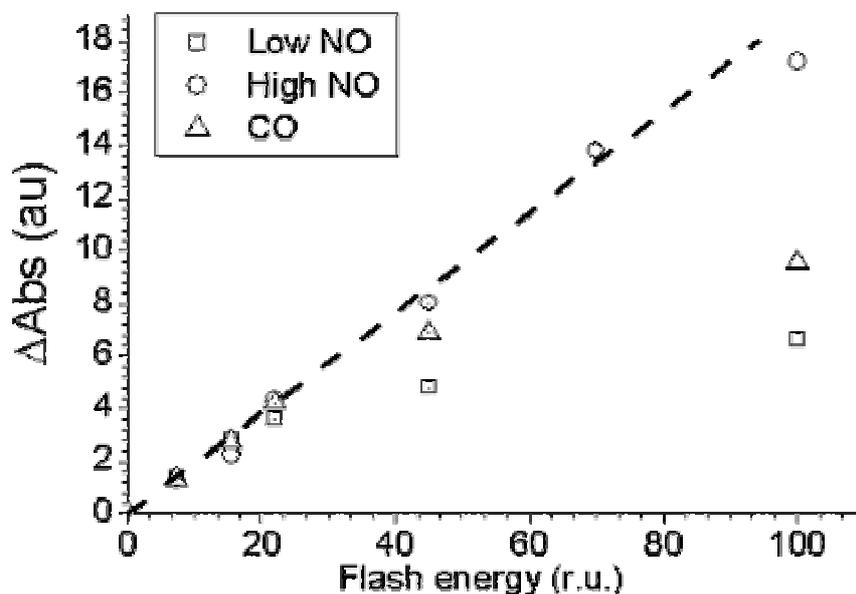


Figure 4.17 : Courbes de saturation de l'intensité du signal de recombinaison mesuré 6 ns après le flash en fonction de l'énergie excitatrice pour la CcO de *P. denitrificans*. La ligne pointillée sert de guide.

Les cinétiques de recombinaison sur l'échelle nanoseconde de l'oxydase *ba₃*, présentées Figure 4.18, montrent une phase de recombinaison majoritaire, décrite par une constante de temps de ~ 15 ns indépendante de [NO], en accord avec la légère décroissance observée à 2 ns. Une seconde phase de recombinaison a lieu dans l'échelle de temps de 50 μ s, pouvant correspondre à une recombinaison bimoléculaire. La vitesse de cette seconde phase n'est que faiblement dépendante de la concentration, contrairement à ce qui est attendu pour une recombinaison bimoléculaire. Ceci peut s'expliquer par l'activité NO réductase de la protéine. Une partie de l'excès de NO est consommé, la quantité de NO présente est alors inférieure à celle ajoutée.

Néanmoins, si on admet que cette phase correspond effectivement à une recombinaison bimoléculaire, il est possible d'estimer une limite inférieure pour le k_{on} . La concentration de NO ajoutée la plus élevée étant de 10 μ M, la valeur inférieure ainsi obtenue, $20 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, est plus élevée que celle mesurée par Blackmore *et coll.* pour l'oxydase mitochondriale ($0,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Blackmore *et coll.* 1991). Ce résultat est en accord général avec une grande affinité pour le NO, proposé chez *T. thermophilus* (Giuffrè *et coll.* 1999).

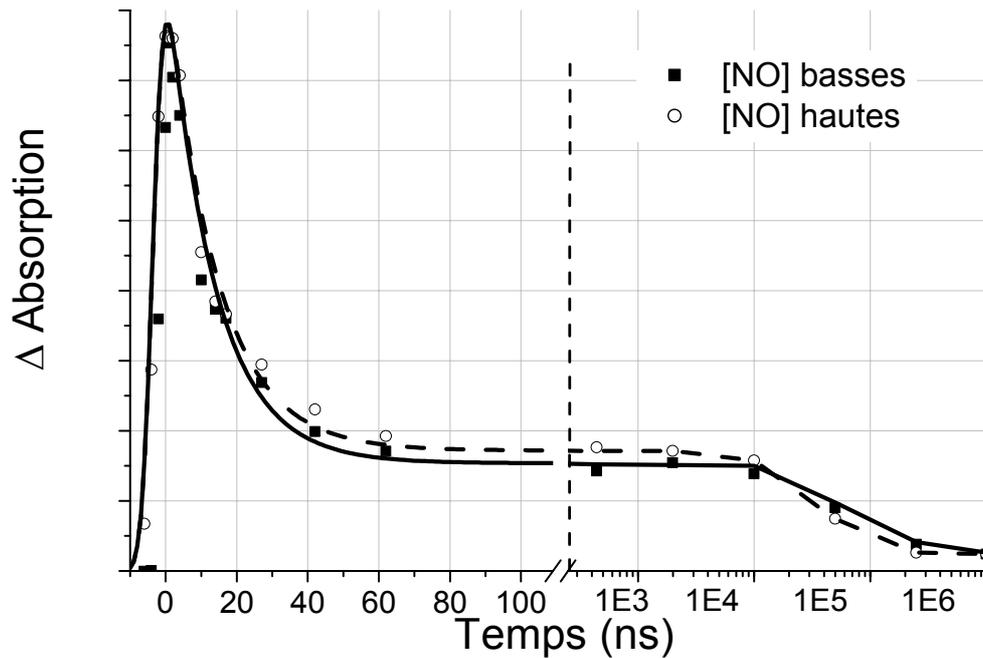


Figure 4.18 : Cinétiques nanoseconde de recombinaison du NO sur l'oxydase ba_3
 Les cercles vides représentent les résultats obtenus avec de faibles concentrations de NO et
 les carrés, les hautes concentrations.
 Les courbes sont normalisées au maximum du signal (à 5 ns).

La figure 4.19 synthétise la recombinaison du NO observée pour l'oxydase aa_3 à basses et hautes concentrations de NO, et pour ba_3 . Pour l'oxydase de *P. denitrificans*, à basses concentrations (trait fin) le taux de recombinaison gémée est faible (<20 %) et correspond probablement à la fraction d'oxydase qui, dès les stœchiométries les plus faibles, fixent deux molécules de NO. A hautes concentrations (trait épais), la recombinaison rapide concerne plus de 90 % de la population. Elle est décrite par deux phases de 200 ps et 20 ns, la phase la plus rapide étant largement majoritaire. L'ensemble de ces résultats indique que la présence d'un second NO dans le site actif favorise une recombinaison gémée, probablement par l'encombrement stérique du 2nd NO. La recombinaison bimoléculaire a lieu sur une échelle milliseconde non étudiée précisément lors de cette étude. Cependant, nos résultats préliminaires montrent une dépendance de la concentration de NO. Pour ba_3 de *T. thermophilus*, 80 % de la recombinaison est gémée puisqu'elle a lieu en 15 ns. Une refixation de 95 % se fait avec une constante de temps variant entre 50 et 100 μ s selon la concentration de NO présente dans le milieu, en suivant un processus bimoléculaire.

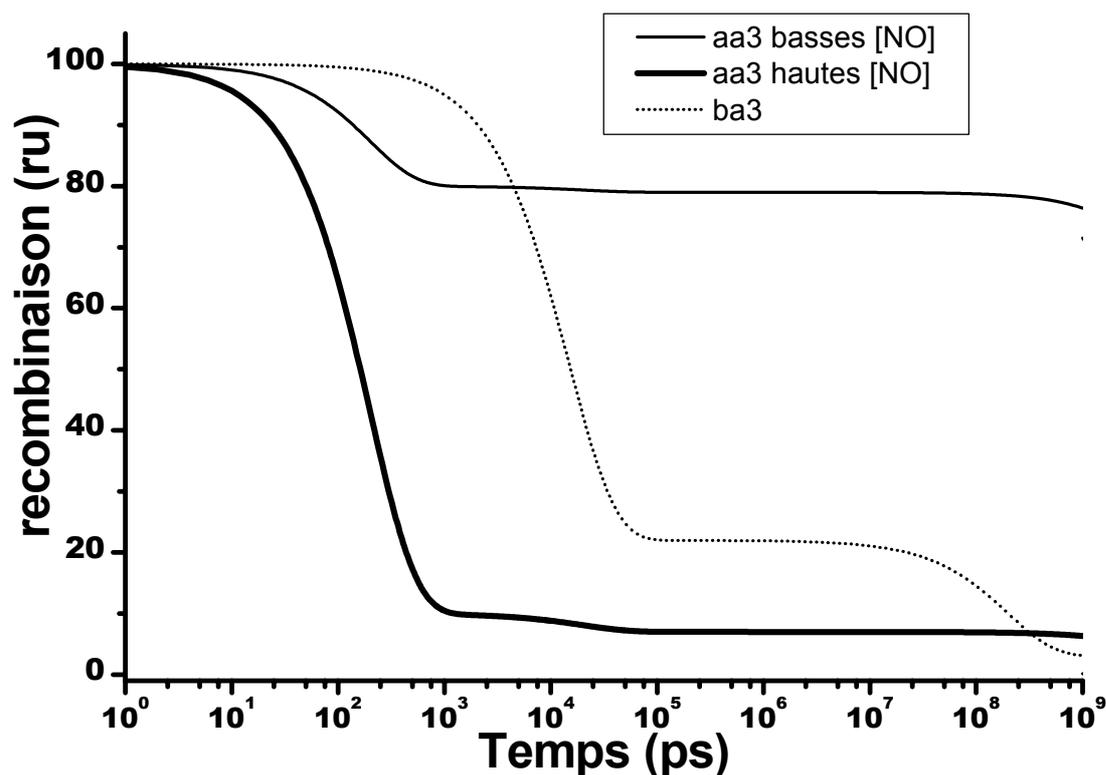


Figure 4.19 : Recombinaison relative du NO mesurée après photodissociation. La recombinaison sur l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* à faible concentration de NO est représentée par un trait fin, et NO élevée par un trait épais, l'oxydase ba_3 de *T. thermophilus* par un trait pointillé.

4.2.4 Spectroscopie RPE.

Les études d'absorption transitoire indiquent que deux molécules de NO peuvent être présentes simultanément dans le site actif de l'oxydase aa_3 . Le second site de fixation du NO le plus probable est le Cu_B , comme l'indique des études RPE à hautes concentrations de NO sur l'oxydase mitochondriale (Stevens *et coll.* 1979; Brudvig *et coll.* 1980). Ces résultats sont cependant controversés (Seelig *et coll.* 1981; Boelens *et coll.* 1982; Pearce *et coll.* 2003).

Des expériences de spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (RPE) ont été effectuées sur les oxydases aa_3 de *P. denitrificans* et ba_3 de *T. thermophilus*, dans le but de déterminer la nature du second site de fixation pour le NO dans l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*. Les échantillons, préparés dans des conditions similaires à celles des expériences de photodissociation, sont étudiés à différentes concentrations de NO. Juste avant la congélation, les spectres UV-visible des échantillons sont pris directement dans les tubes RPE. Pour ce faire nous avons utilisé une sphère intégrante, ce qui permet de palier les phénomènes de diffusion.

A des rapports substoechiométriques de NO, les spectres RPE obtenus pour aa_3 et pour ba_3 (figure 4.20 A) sont similaires. Ils mettent en évidence une molécule de NO lié à un hème

comme 6^{ème} ligand, le 5^{ème} étant un noyau d'imidazole. L'allure de ces spectres est similaires à ceux obtenus avec la nitrosylmyo- et hémoglobine (Chien 1969; Dickinson & Chien 1971; Hori *et coll.* 1981) ainsi qu'avec des molécules chimiques modèles (Kon & Kataoba 1969). Les interactions entre l'électron non apparié du NO et l'atome d'azote sont caractérisées par une structure à trois pics, dans la zone $g=2$, provenant du couplage hyperfin (A_{HF}). Une structure supplémentaire, dite "super hyperfine", rendant compte de l'influence du noyau imidazole sur le Fea_3 (A_{SHF}), est observée pour les oxydases bactériennes (figure 4.20 A) et mitochondriales (Brudvig *et coll.* 1980). Ces spectres ont été enregistrés à 50 K.

Pour l'oxydase ba_3 , des concentrations de NO plus élevées entraînent une augmentation de l'intensité du spectre mais son allure reste identique (figure 4.20 bas). Par contre, pour aa_3 une modification du spectre est observée lors des expériences à plus hautes concentration de NO. Pour une stoechiométrie de 5:1, la structure hyperfine, provenant de l'azote du NO, est considérablement modifiée (changement de force de couplage) et la structure super-hyperfine disparaît. Pour les concentrations stoechiométriques de NO, une superposition des deux spectres est observée. La disparition de certaines lignes caractéristiques du spectre à basses concentrations de NO, avec l'augmentation de [NO], dénote la transformation du signal plutôt qu'une superposition de deux signaux. Cette modification du signal pourrait être due à une rotation du plan Fea_3 -N-O par rapport au plan de l'histidine lié à l'hème (H411) (voir discussion).

La grande similarité entre les spectres RPE de ba_3 et ceux de l'oxydase aa_3 à basses concentrations étaye l'hypothèse de deux sites de fixation pour le NO dans le site actif de aa_3 de *P. denitrificans*. En effet, l'activité NO réductase de la CcO ba_3 de *T. thermophilus* exclut la présence de deux molécules de NO à l'équilibre.

Les spectres de l'oxydase aa_3 enregistrés à 15 K (figure 4.20 B) montrent l'apparition d'une nouvelle espèce paramagnétique non identifiée précédemment autour de $g=4$ lorsque la concentration de NO augmente. De plus, ce spectre n'est pas observé lors de nos expériences sur l'oxydase ba_3 indépendamment de la concentration de NO utilisée.

4.2.5 Discussion.

L'ensemble des expériences de spectroscopie pompe-sonde menées sur l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*, ont permis d'identifier un second site de fixation pour le NO, occupé dès les concentrations de NO physiologiques ($<1 \mu M$). Ces expériences ont été associées à des études RPE ainsi qu'à une approche comparative avec l'oxydase ba_3 de *T. thermophilus*. Nos résultats établissent clairement l'occupation de ce second site dès les faibles concentrations de NO et permettent de proposer les caractéristiques structurales de cette interaction.

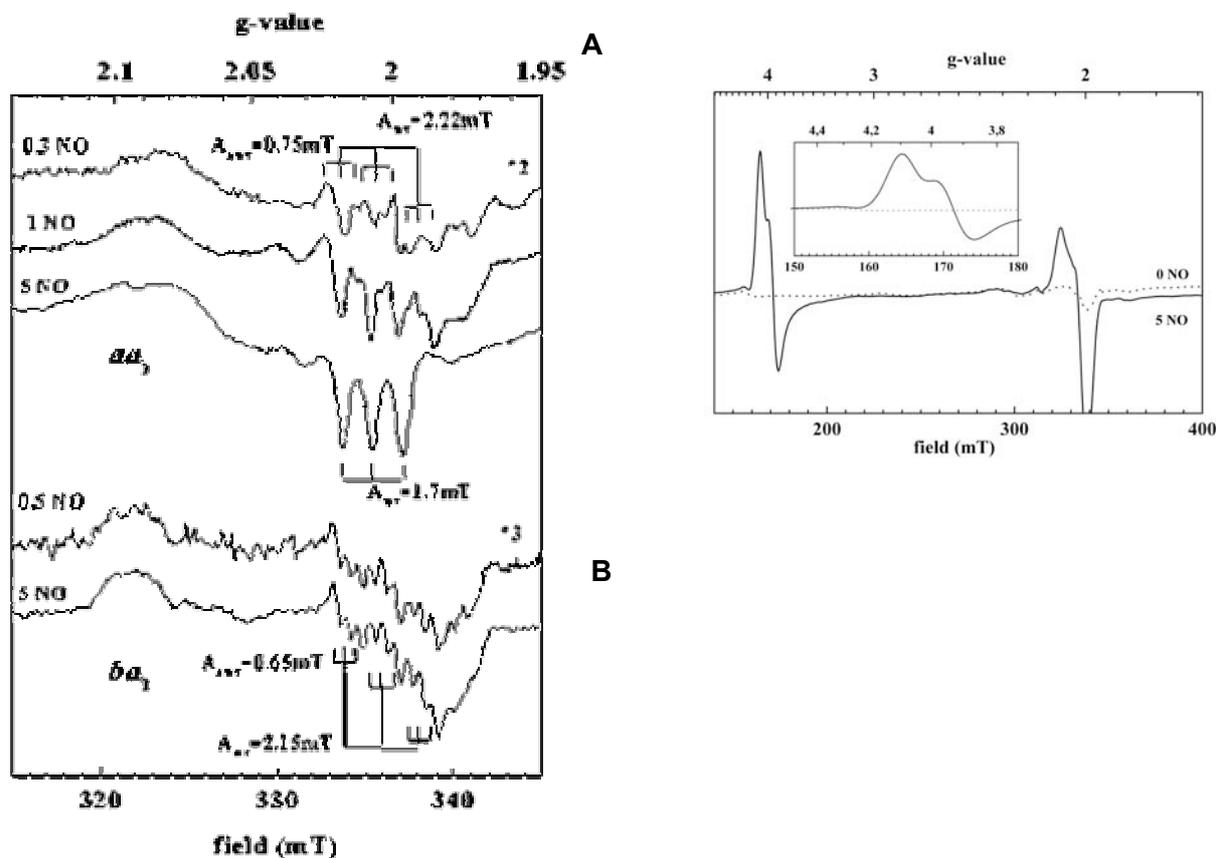


Figure 4.20 : A / Spectres RPE de CcO aa_3 réduite de *P. denitrificans* (en haut) et CcO ba_3 de *T. thermophilus* (en bas) en présence de quantités croissantes de NO. Les spectres sont mesurés à 50 K.

B/ Spectres RPE de CcO aa_3 réduite de *P. denitrificans* en absence (ligne pointillée) ou en présence de NO en excès (ligne continue). les spectres sont mesurés à 15 K.

4.2.5.1 Cinétiques de recombinaison : CcO aa_3 .

Les cinétiques de recombinaison mesurées à l'échelle nanoseconde (≤ 2 ns) (Figure 4.14 A) montrent une phase rapide avec une constante de temps de 200 ps. L'amplitude de cette phase augmente avec la concentration de NO. Ces résultats, complétant ceux obtenus précédemment sur une échelle limitée à 300 ps (Vos *et coll.* 2001), permettent d'exclure que l'influence de la concentration puisse être due à la présence de deux molécules de NO en compétition pour se fixer sur l'hème (voie 2 figure 4.13). Cette phase rapide est attribuée à une seule molécule de NO, dont la recombinaison est influencée par la fixation d'une seconde molécule de NO dans ou en dehors du site actif, créant un encombrement stérique gênant la sortie du site actif. Les courbes de saturation de l'intensité de l'impulsion excitatrice (figure 4.17) confirment notre hypothèse basée sur les données cinétiques. La dépendance de la concentration de NO ne peut être expliquée que par des dissociations multiples d'une même molécule de NO pendant la durée du flash (5 ns).

La présence d'une phase de 20 ns, elle aussi dépendante de la concentration de NO,

indique le caractère multiphasique de la recombinaison géminée (la molécule photodissociée revient sur son site de départ). Si on estime qu'à hautes concentrations de NO, 90% de ce ligand recombine selon une phase de 200 ps, et ~8 % ne se réassocie pas sur une échelle submilliseconde, cela implique que ~2 % des molécules de NO se réassocient à l'hème a_3 avec une constante de temps de 20 ns. Dans le modèle le plus simple, la constante microscopique de recombinaison est alors ~100 ns (figure 4.21). Cette phase peut être attribuée à la réassociation de la molécule de NO photodissociée. Les échelles de temps très différentes pour les deux phases indiquent deux mécanismes distincts de recombinaison. La phase de 200 ps refléterait une réassociation du NO encore présent dans le site actif et celle de 20 ns la recombinaison d'une molécule située hors de la poche catalytique (voir figure 4.21B).

Les cinétiques suivies de la nanoseconde à la milliseconde sont en accord global avec celles publiées par Blackmore (Blackmore *et coll.* 1991). Ces auteurs ont trouvé une cinétique biphasique de la recombinaison du NO sur l'oxydase mitochondriale en présence de concentrations importantes de NO en utilisant une détection nanoseconde.

Une recombinaison très faible est observée pour les basses concentrations de NO, sur les échelles de temps pico- à microseconde. Si on attribue cette recombinaison à une population qui, dès les faibles concentrations, lie deux molécules de NO, ceci implique que lorsqu'une seule molécule de NO est présente dans le site actif, il n'y a pas de recombinaison géminée sur l'hème a_3 . Nous proposons, par analogie avec le CO, qu'après photodissociation, le NO se lie au Cu_B , site à partir duquel il sort de la protéine. Cette hypothèse est supportée par le temps de transfert du NO depuis le Cu_B vers le Fea_3 qui peut être estimé $<10 \mu s$ à partir des données obtenues pour l'oxydase mitochondriale par Blackmore (Blackmore *et coll.* 1991) si on suppose que le NO se fixe sur le Cu_B avant de se fixer sur l'hème a_3 . Cette valeur est beaucoup plus rapide que le temps que nous avons mesuré pour la recombinaison bimoléculaire de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* ($>1 ms$). Ce comportement, établi expérimentalement, est très similaire à celui du CO, et suggère le rôle ubiquitaire du Cu_B servant de porte de sortie (et d'entrée ?) pour les ligands diatomiques y compris le NO. Ce n'est pas l'hypothèse communément admise pour le NO.

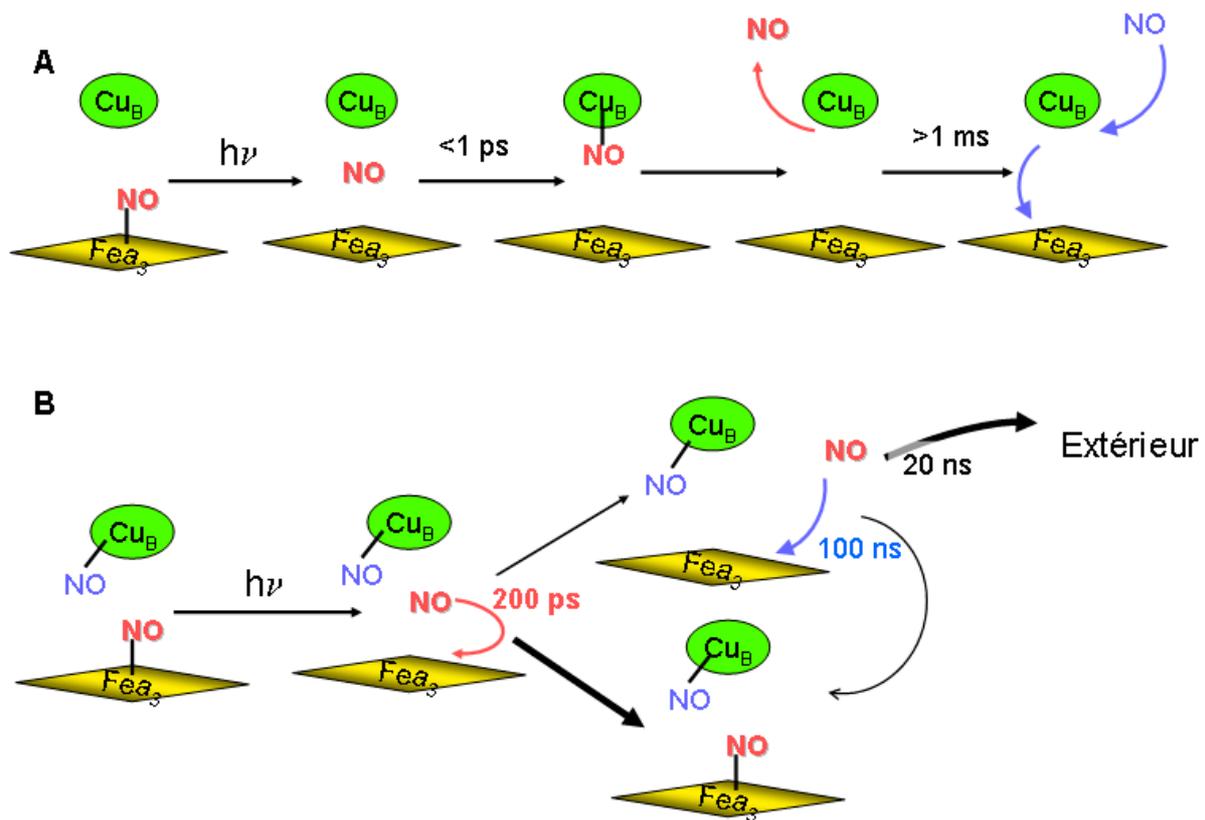


Figure 4.21 : Modèles décrivant la dynamique du NO après photodissociation lorsque 1 NO (A) et 2 NO (B) sont présents dans le site actif.

4.2.5.2 L'oxydase *ba*₃.

Une phase de 15 ns est observée pour la recombinaison du NO sur l'oxydase *ba*₃. Si on suppose qu'après la photodissociation, le NO se lie au Cu_B avant de revenir sur l'hème, la vitesse de transfert de ligand du Cu_B au Fea₃ est beaucoup plus rapide que celle observée pour *aa*₃, reflétant une affinité de l'hème pour le NO plus importante de l'oxydase *ba*₃ de *T. thermophilus* que celle de *aa*₃ de *P. denitrificans*. Des études de spectroscopie infrarouge résolues dans le temps seraient nécessaires pour caractériser l'intermédiaire Cu_B-NO. Il est, à première vue, surprenant de constater que malgré sa forte activité NO réductase, l'oxydase *ba*₃ forme une liaison très stable avec le NO. Ceci indique une grande différence d'affinité entre les deux sites de fixation : Fea₃ et, très probablement, Cu_B. Une telle différence n'est pas observée chez l'oxydase *aa*₃ puisque dès les concentrations stoechiométriques de NO, il existe une population ayant deux NO fixés. Ce comportement est réminiscent de la grande affinité de *ba*₃ pour l'oxygène par rapport à celle de *aa*₃.

4.2.5.3 Résultats RPE.

Des études RPE ont été effectuées dans le but de caractériser la nature du second site de fixation. Comme attendu un signal correspondant à la liaison d'une molécule de NO à un hème

possédant un noyau imidazole comme 5^{ème} ligand est observé à de faibles stoechiométries de NO pour aa_3 et pour ba_3 . Pour aa_3 , l'augmentation de la concentration de NO modifie considérablement le spectre. Les structures superhyperfines disparaissent. Elles sont attribuées aux interactions "trans" du NO avec l'histidine liée à l'hème. Une interprétation de ce comportement serait la rupture de la liaison His411- Fea_3 . Un signal similaire, obtenu récemment après l'ajout d'un très fort excès de NO par rapport à l'oxydase aa_3 mammifère réduite, a, en effet, été interprété comme la rupture de la liaison histidine-hème (Pearce *et coll.* 2003).

Il a été montré que le NO était susceptible de provoquer une telle rupture en particulier sur l'hémoglobine nitrosylée (Hb-NO). Cependant, si la liaison entre l'histidine et l'hème était rompue, le spectre d'absorption de l'oxydase devrait être profondément modifié. Or ce n'est pas le cas. Les spectres, mesurés à hautes concentrations de NO avant les expériences RPE, sont similaires à ceux présentés Figure 4.10. Ce résultat constitue un argument contre cette hypothèse.

Les structures cristallographiques des complexes hémoglobine-NO et myoglobine-NO (code pdb : 1PRS, 1NPF et 1HJT) montrent que la distance Fe-His est de 2,1 et 2,3 Å respectivement dans le cas d'un hème hexacoordonné. Dans la structure de l'état pentacoordonné, cette distance passe à 4,1 Å. Pour les structures 3D des oxydases aa_3 à l'état oxydé (Fea_3^{3+}, Cu_B^{2+}), la distance Fea_3 -His est de 2,1 et 1,9 Å pour la CcO de *P. denitrificans* (Iwata *et coll.* 1995) et de mammifère (Tsukihara *et coll.* 1995), respectivement. La structure 3D CcO-NO n'est pas disponible, mais les informations données par les structures dans différents états de réduction et de ligation (CcO-N₃ et CcO-CO) indiquent que la position du Cu_B est modifiée, mais que la distance Fea_3 -Nε2 (His 376) n'est pas sensiblement affectée. Les résultats obtenus lors de simulations des structures de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* avec deux molécules de NO fixés dans le site actif, montrent également une grande stabilité de la distance Fea_3 -His411 (Vos *et coll.* 2001) et ci-dessous). De plus, dans l'oxydase ba_3 , la distance fer-histidine est sensiblement plus grande (3,3 Å) (Soulimane *et coll.* 1995) et le signal observé est celui d'un hème hexacoordonné. Ces indications, notamment en spectroscopie visible, sont en contradiction avec l'interprétation de Pearce *et coll.* (Pearce *et coll.* 2003) qui concluent à la rupture de la liaison fer-histidine. Notre interprétation de ce signal, aux vues des résultats obtenus avec ba_3 , est différente (Pilet *et coll.* 2004).

Les structures Hb-NO et Mb-NO montrent que lorsque l'hème est hexacoordonné, le plan Fe-N-O et le plan de l'histidine sont quasi parallèles (<15°) permettant ainsi un bon recouvrement des orbitales π du NO et de l'histidine. Par contre, lorsque la liaison Fe-His est distendue, cet angle augmente (>25°) (Chan *et coll.* 2004). Ces constatations suggèrent que l'apparition d'un signal d'un hème "pentacoordonné" à hautes concentrations de NO serait due à

la rotation du NO lié à l'hème, due à la présence de NO dans le 2nd site de fixation. Dans ce cas, il n'y aurait plus recouvrement des orbitales π et le signal superhyperfine disparaîtrait.

Par ailleurs, le signal dans la zone $g=4$, présenté figure 4.20 B, ne correspond à aucun signal connu pour l'oxydase aa_3 . Les interactions entre les métaux de transition et le NO sont susceptibles de donner un signal dans cette zone spectrale. Or le seul métal, autre que le fer hémique, présent à proximité de l'hème a_3 est le Cu_B . Ce signal pourrait refléter la fixation du NO sur le Cu_B (Pilet *et coll.* 2004).

4.2.5.4 Modélisations moléculaires.

Des modélisations par minimisation de l'énergie de la structure de l'oxydase liant le NO ont été effectuées afin d'étudier la possibilité d'une rotation, telle qu'envisagée ci-dessus. Lors d'études précédentes, des minimisations indiquaient que la présence d'une molécule de NO sur le Cu_B , influençait l'angle entre le plan Fe-N-O et celui de l'histidine. Cependant, les valeurs alors obtenues ne permettaient pas d'expliquer les résultats RPE. Afin d'éviter de piéger la structure dans un minimum local, des modélisations supplémentaires ont été effectuées sur des structures avec un seul NO, fixé sur l'hème a_3 et avec deux NO, un sur l'hème et un sur le Cu_B , en associant un chauffage à 300 K et des simulations de la dynamique moléculaire selon la figure 4.22.

Les structures issues des modélisations présentées figure 4.23, montrent l'effet de la fixation du NO sur le Cu_B . La distance entre Cu_B et His 276 (figure 4.23 C) augmente (de 1,7 Å à 3,7 Å). Par contre, comme précédemment décrit (Vos *et coll.* 2001), la distance Fe-His376, et Cu_B -Fe a_3 ne sont pas affectées. De plus, lorsque une molécule de NO est présente dans le site actif le plan Fe-N-O est presque parallèle au plan de l'histidine 411 ($\sim 14^\circ$) (figure 4.23 A) alors que la présence d'une seconde molécule fixée sur le Cu_B provoque une rotation, l'angle devenant presque droit (77°) (figure 4.23 B). La présence d'une seconde molécule de NO, fixée sur le Cu_B , provoque donc la rotation du NO fixé sur le Fe a_3 . Ce mouvement permet d'expliquer la disparition du couplage His-NO à hautes concentrations de NO observée lors des expériences RPE.

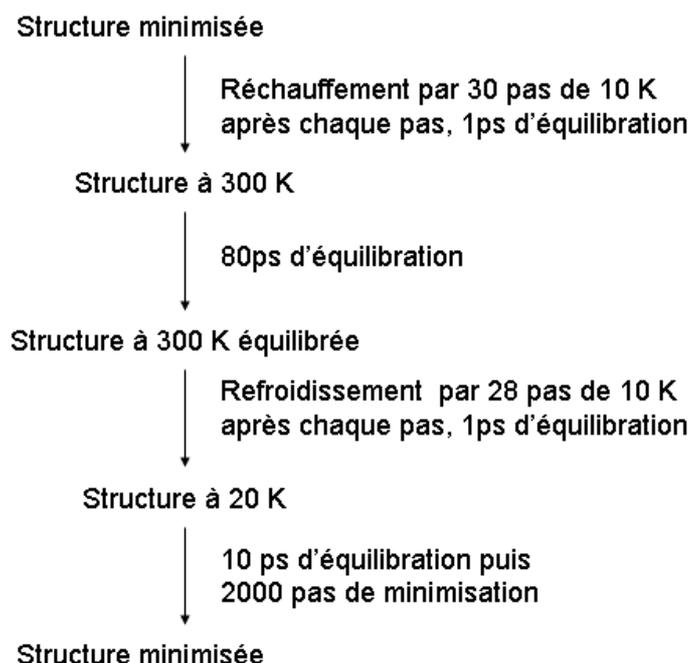


Figure 4.22 : Schéma des différentes étapes de la modélisation des interactions CcO aa_3 de *P. denitrificans* avec le NO.

L'hypothèse de la rotation du NO induite par la présence d'une seconde molécule sur le Cu_B , permet de concilier les résultats spectroscopiques et RPE. Pour confirmer cette supposition, il serait nécessaire de cristalliser l'oxydase en présence de concentrations variables de NO. Les structures ainsi obtenues permettraient de vérifier la validité de notre modèle.

Les études RPE précédentes sur les interactions CcO-NO donnent des informations contradictoires. Si un signal "hexacoordonné" est toujours observé à faibles concentrations de NO (Brudvig *et coll.* 1980), les résultats à hautes concentrations sont différents selon les auteurs. En 1979, Stevens et collaborateurs notent l'absence de signal attribué à l'interférence entre un NO fixé sur le Fea_3 et un sur le Cu_B (Stevens *et coll.* 1979), Blokzijl et Stevens, en 1981, observent un signal "hexacoordonné" (Blokzijl-Homan & Van Gelder 1971; Stevens & Chan 1981) Pearce et collaborateurs obtiennent un signal "pentacoordonné" (Pearce *et coll.* 2003). Nos résultats, présentés figure 4.19 au centre, montrent un signal de type "pentacoordonnée" (Pilet *et coll.* 2004). Ces résultats divergents peuvent être expliqués, notamment, par la source de l'oxydase et par son état.

Nos expériences ont été réalisées sur l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* alors que les autres études ont été faites sur l'oxydase mitochondriale. De plus, lors des études les plus anciennes, l'hydrosulfite est utilisé comme réducteur de l'oxydase, or ce produit chimique est également susceptible de réduire le NO en N_2O . Le signal obtenu par Pearce *et coll.* est similaire au nôtre, mais il a été obtenu dans des conditions différentes : le NO, à concentrations élevées, était utilisé comme compétiteur du cyanure. Afin de nous affranchir de ces variables, nous avons pris deux précautions : l'utilisation d'ascorbate comme réducteur plutôt que l'hydrosulfite (Brudvig *et coll.*

1980). De plus nous avons enregistré le spectre d'absorption UV-visible avant les expériences RPE, afin de connaître précisément l'état redox et l'état de liaison de notre protéine.

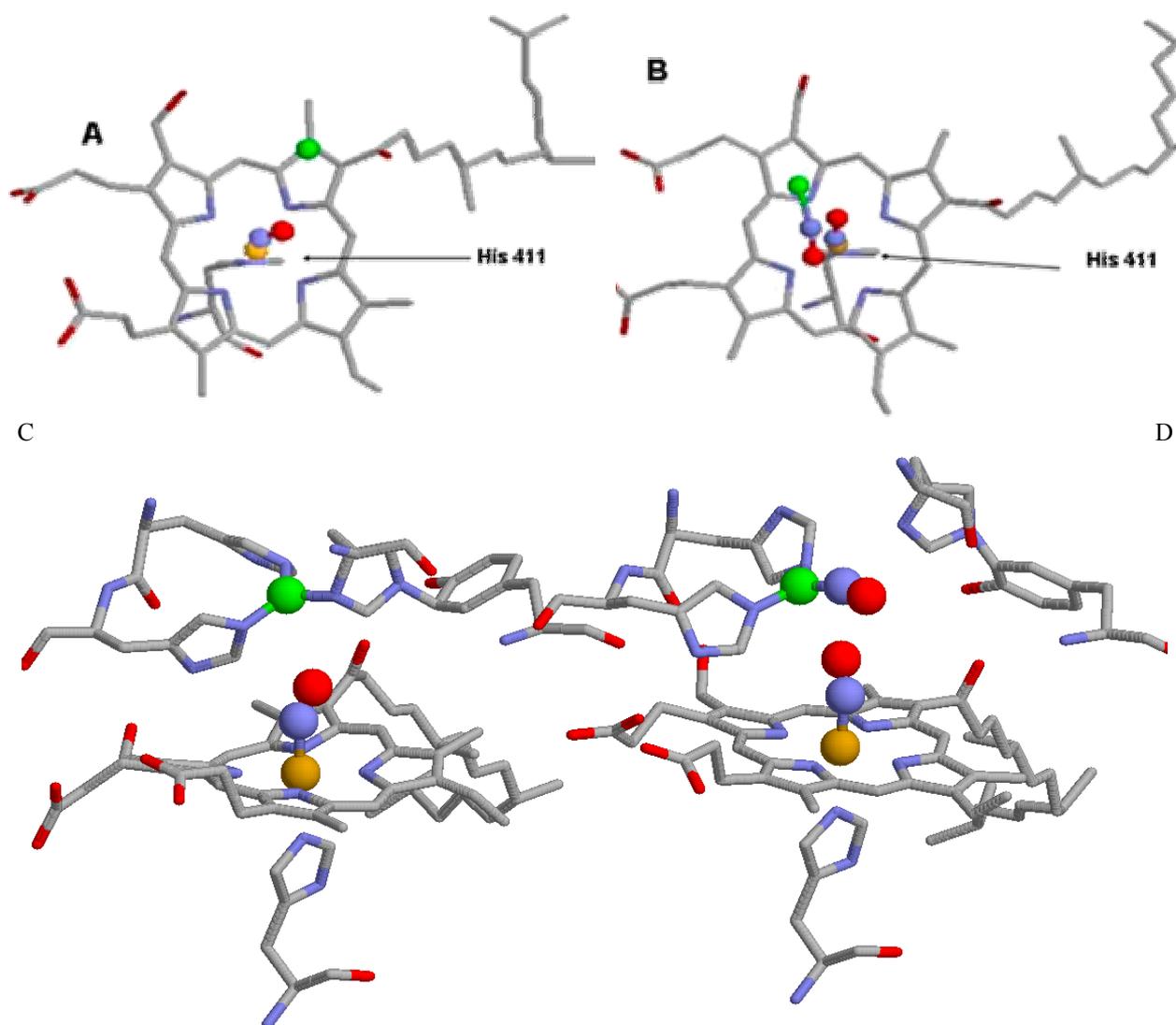


Figure 4.23 : Structure modélisée du site actif de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* avec une molécule de NO liée à l'hème a_3 (A) et avec deux NO liés à l'hème a_3 et au Cu_B (B). Le plan de l'histidine 411 est perpendiculaire à celui de la feuille. Les figures C et D montrent le déplacement des résidus du site actif avec 1 et 2 NO respectivement. (Figures préparées avec Rasmol[®])

4.2.6 Conclusion.

Nous avons montré la présence d'un second site de fixation du monoxyde d'azote sur l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*. L'effet de la concentration du NO étant visible dès les faibles stoechiométries, l'affinité des deux sites doit être proche. Des études sur l'oxydase mitochondriale avaient suggéré le Cu_B comme second site de fixation du NO. Cette hypothèse est supportée par la forte homologie entre les cytochrome *c* oxydases et les NO-réductases, où

deux molécules de NO sont présentes simultanément dans le site actif. La cytochrome *c* oxydase *ba*₃ de *T. thermophilus*, dont l'activité NO-réductase (Giuffrè *et coll.* 1999) n'autorise pas la coprésence de deux molécules de NO dans le site actif à l'équilibre, a également été étudiée. Les cinétiques de recombinaison à temps courts (<50 ns), où la recombinaison bimoléculaire est exclue, ne révèlent aucune influence de la concentration de NO en accord avec les conclusions tirées des études avec *aa*₃.

Les expériences RPE, réalisées avec des concentrations de NO physiologiques (<0,5 μM), ont également montré une forte influence de la concentration de NO. Le spectre obtenu sur l'oxydase *aa*₃ à basse concentration est similaire à celui obtenu avec *ba*₃, ce qui indique la liaison du NO sur un fer hémique, et la présence d'une histidine en trans. Le spectre obtenu aux plus fortes concentrations est caractéristique d'une liaison NO-hème, mais l'interaction avec l'histidine proximale n'est plus détectable. Nous proposons la rotation du NO, induite par la présence d'une seconde molécule de NO dans le site actif. Il n'y a alors plus recouvrement des orbitales π du NO et de l'histidine, en accord avec nos simulations. Les expériences RPE n'ont pas permis d'attribuer définitivement le Cu_B comme le second site de fixation. Cependant, l'apparition, avec l'augmentation de la concentration de NO, d'un signal, jusqu'alors jamais décrit, indique que le NO se fixe sur un métal. Le Cu_B est donc le candidat le plus probable pour ce second site.

En conclusion, la liaison d'une seconde molécule de NO sur le Cu_B, induirait une contrainte stérique gênant la sortie du NO photodissocié du site actif, qui contraindrait le NO lié à l'hème à une rotation de ~90°, au moins à basse température.

4.3 Transfert d'électrons dans la cytochrome *c* oxydase mitochondriale.

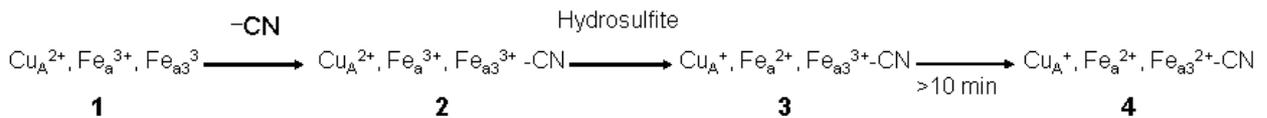
La réduction de l'oxygène par la cytochrome *c* oxydase nécessite quatre électrons fournis par le Cc. De nombreuses études ont permis d'établir que les électrons entrent dans la CcO au niveau du Cu_A, puis sont transférés via l'hème *a* au site actif (hème *a*₃ et Cu_B). La vitesse du transfert Cu_A-hème *a*, a été déterminé à 300 μs (voir chap 2.23), en bon accord avec les modèles théoriques. Par contre, des divergences persistent pour le transfert *intrinsèque* d'électrons (ET) entre l'hème *a* et l'hème *a*₃. En effet, comme indiqué lors du chapitre 2, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de technique permettant de mesurer le transfert d'électrons entre les hèmes dans le sens physiologique : de l'hème *a* vers hème *a*₃. La formation de l'état "mixed valence" (MV) permet l'étude de ce transfert dans le sens inverse du physiologique, de l'hème *a*₃ vers l'hème *a*. On parle d'expérience de "back-flow". Sous la forme MV, l'hème *a* de la CcO est oxydé, l'hème *a*₃ réduit et lié à une molécule de monoxyde de carbone (CO), le Cu_A oxydé et le Cu_B réduit (Cu_A²⁺, Fe_a³⁺, Fe_a²⁺-CO, Cu_B⁺). La fixation du CO sur le site actif piège les électrons sur l'hème *a*₃. L'excitation lumineuse de l'oxydase dissocie le CO et les électrons sont alors redistribués dans la protéine, et en premier lieu entre l'hème *a*₃ et l'hème *a*. Il est alors possible de suivre ce déplacement en mesurant les variations spectrales.

Par des expériences de type "back-flow", une phase de 3 μs, attribuée au transfert des électrons depuis l'hème *a*₃ vers l'hème *a*, a été découverte par Oliveberg (Oliveberg & Malmstrom 1991) en 1991. Ces résultats ont été confirmés par Verkhovsky et Einarsdottir (Verkhovsky *et coll.* 1992; Einarsdottir *et coll.* 1995). Or cette vitesse est inférieure à celle calculée dans certains modèles (Page *et coll.* 1999; Tan *et coll.* 2004). En 2001, Verkhovsky et collaborateurs ont postulé l'existence d'une phase plus rapide sur la base des spectres de photodissociation des espèces MV-CO et FR-CO à 100 ns. Cette proposition est remise en cause par les expériences de Namslauer et collaborateurs, avec une précision de 10 ns. Ces auteurs attribuent cette différence à des interactions entre hèmes (Namslauer *et coll.* 2002). Les résultats décrits dans ce chapitre, obtenus par des expériences de back-flow étudiées de 40 ps à 4 ns avec une résolution de ~100 fs, prouvent l'existence d'une phase rapide de transfert des électrons entre les hèmes.

4.3.1 Spectroscopie à l'équilibre.

4.3.1.1 Spectre UV/visible de l'oxydase

Le spectre d'absorption visible de la CcO est constitué essentiellement des contributions des hèmes a et a_3 . Afin de distinguer la contribution de chacun des deux hèmes dans ce spectre, différentes décompositions ont été effectuées (Yonetani 1960; Vanneste 1966; Liao & Palmer 1996). Pour ce faire ces auteurs ont utilisé le cyanure (CN⁻) qui se fixe sur l'hème a_3 oxydé. L'ajout de réducteur, hydrosulfite par exemple, provoque la réduction rapide de l'hème a , l'hème a_3 restant oxydé. L'hème a_3 est réduit ultérieurement en une phase lente.



En soustrayant les spectres des espèces $3 - 2$, le spectre de l'hème a réduit moins oxydé est ainsi obtenu. Parallèlement, le spectre de différence réduit moins oxydé de la protéine non liée, est mesuré, il correspond à : $a^{2+}, a_3^{2+} - a^{3+}, a_3^{3+}$. Le spectre réduit moins oxydé de l'hème a_3 est donc obtenu en soustrayant le spectre de différence de l'oxydase à celui de l'hème a . La Figure 4.24 montre les spectres de différence des hèmes a et a_3 . Les variations existantes entre les différentes décompositions publiées sont, au moins partiellement, attribuables à la difficulté d'obtenir, dans les premières expériences, un spectre à l'équilibre de l'état 3 . Ce problème a été résolu par Liao et Palmer en utilisant un spectrophotomètre rapide (Liao & Palmer 1996).

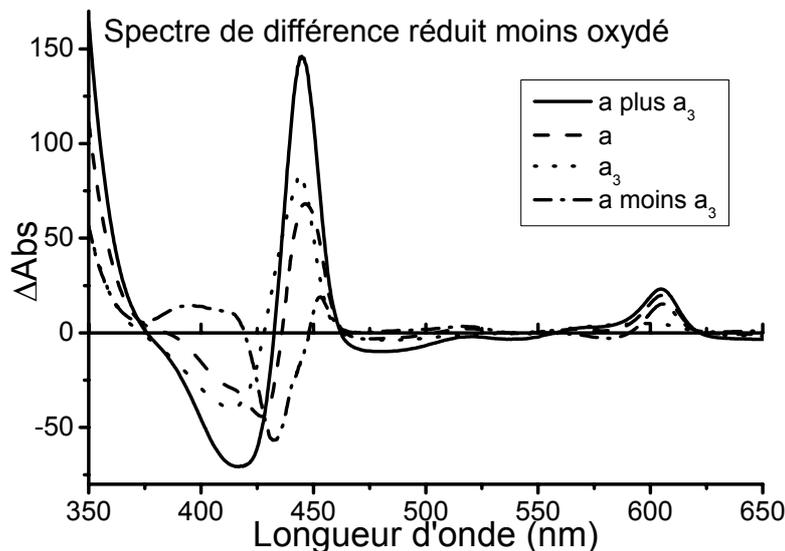


Figure 4.24 : Spectres de différence réduit moins oxydé de l'oxydase aa_3 (ligne pleine), de l'hème a (tirets) de l'hème a_3 (pointillés) et la différence entre les hèmes a et a_3 . D'après (Liao & Palmer 1996).

4.3.1.2 Formation de l'état "mixed valence" (MV).

L'état MV est obtenu en incubant l'oxydase non réduite avec du CO. Le CO ne peut se fixer que sur l'hème a_3 réduit. L'activité CO oxydase de la cytochrome c oxydase, selon la réaction ci-dessous, libère les électrons nécessaires à la réduction du site actif (Bickar *et coll.* 1984; Brzezinski & Malmstrom 1985).



La vitesse de formation de l'espèce MV est variable d'un échantillon à l'autre, par ailleurs, des facteurs tels que la température, le pH (Brzezinski & Malmstrom 1985) ou l'illumination semblent influencer la cinétique de formation de MV. Une forte proportion de MV est obtenue assurément en ajoutant le CO sur l'oxydase dégazée et en laissant l'échantillon équilibrer la nuit à 4°C.

4.3.1.3 **Caractéristiques spectrales de l'état MV.**

L'obtention de la forme MV, à partir de la CcO oxydée, se traduit par un déplacement caractéristique du pic dans la bande Soret de 420 à 430 nm ainsi que l'apparition d'un pic à 590 nm (figure 4.25). Ces modifications spectrales traduisent la réduction de l'hème a_3 et la liaison du CO. L'intensité de ces variations permet d'estimer la fraction d'oxydase sous forme MV (entre 90% et 100%). La réduction complète de l'enzyme par l'hydrosulfite induit un déplacement du maximum de l'absorption dans la bande Soret de 420 à 443 nm, accompagné d'un affinement du pic. Dans la bande α , on observe une forte augmentation de l'absorption à 605 nm. L'ajout de CO sur l'oxydase réduite provoque une diminution de l'absorption à 443 nm concomitant à l'apparition d'un pic à 430 nm. De même, au niveau de la bande α , la diminution à 605 nm est associée à l'accroissement de l'absorption à 590 nm. Ces phénomènes révèlent la fixation du CO sur l'hème a_3 .

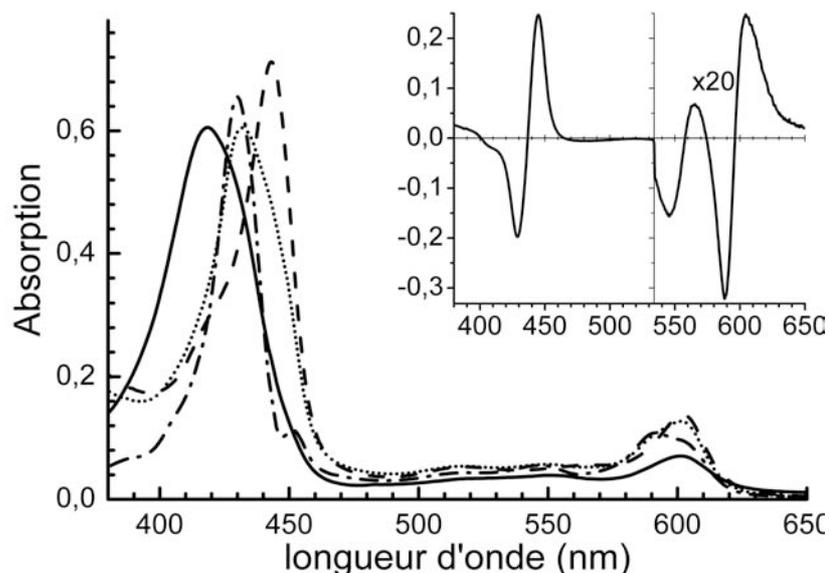


Figure 4.25 : Spectres d'absorption de l'oxydase aa_3 mitochondriale dans l'état oxydé (____), réduit (-----), réduit liant CO (.....), mixed valence (MV) (- · - · - ·). L'insert représente le spectre de différence RedCO moins Red. Les valeurs sont multipliées par 20 pour les longueurs d'onde > 435 nm

4.3.2 Spectroscopie résolue dans le temps.

Le but de nos expériences était de tester l'hypothèse d'un transfert d'électron très rapide (<10 ns) entre les hèmes de la cytochrome *c* oxydase. Les modifications spectrales provoquées par la photodissociation du CO des espèces MV-CO et FR-CO, sont suivies sur une échelle de 4 ns avec une résolution de 100 fs. Cette zone temporelle n'avait alors jamais été investiguée. Namslauer et collaborateurs ont étudié ces modifications entre 0 et 600 ps et après 10 ns (Namslauer *et coll.* 2002).

4.3.2.1 Spectres de photodissociation.

Les modifications spectrales induites par la photodissociation du CO de l'oxydase dans l'état réduit et l'état mixed valence sont suivies de 400-580 nm et de 540-615 nm, afin d'obtenir des informations sur les bandes de Soret et α respectivement. La différence d'intensité des pics dans ces deux régions nécessite l'utilisation d'échantillons de concentrations différentes pour les expériences dans la bande α (150 μ M) et Soret (45 μ M). Nous utilisons un faisceau de la pompe polarisé perpendiculairement à celui de la sonde afin de minimiser les phénomènes de diffusion du faisceau pompe.

Les spectres de l'oxydase à l'état FR-CO, sont enregistrés 40 ps, 1 ns et 4 ns après photodissociation (figure 4.26 A). Une augmentation de l'absorption à 444, 570 et 606 nm accompagné d'une diminution à 428, 545 et 589 nm sont observées. Ces effets sont caractéristiques de la rupture de la liaison Fe-CO et de l'apparition d'hème non lié. Précisons que

ce spectre de photodissociation du CO n'est pas identique à celui calculé à partir des spectres mesurés à l'équilibre, puisqu'un léger décalage de ~ 1 nm est observé (Figure 4.26 C). Or, des études précédentes ont montré qu'après dissociation du Fea_3 , le CO se fixait sur le Cu_B en ~ 1 ps (Dyer *et coll.* 1991), probablement de manière balistique (Liebl *et coll.* 1999), et que les hèmes excités relaxaient en moins de 30 ps (Stoutland *et coll.* 1991; Liebl *et coll.* 1999). A 40 ps, les états excités étant relaxés, la différence entre le spectre de dissociation du CO à l'équilibre et à temps court (submicroseconde) peut être attribuée à la présence du CO sur le Cu_B (Einarsdottir 1995).

Le spectre de photodissociation de l'oxydase à l'état MV ressemble à celui décrit ci-dessus : maxima à 442, 569 et 605 nm, minima à 428, 545 et 590 nm. Cependant, contrairement à l'échantillon FR-CO, une évolution spectrale est observée sur l'échelle de 4 ns, comme indiqué par les flèches sur la figure 4.26 B.

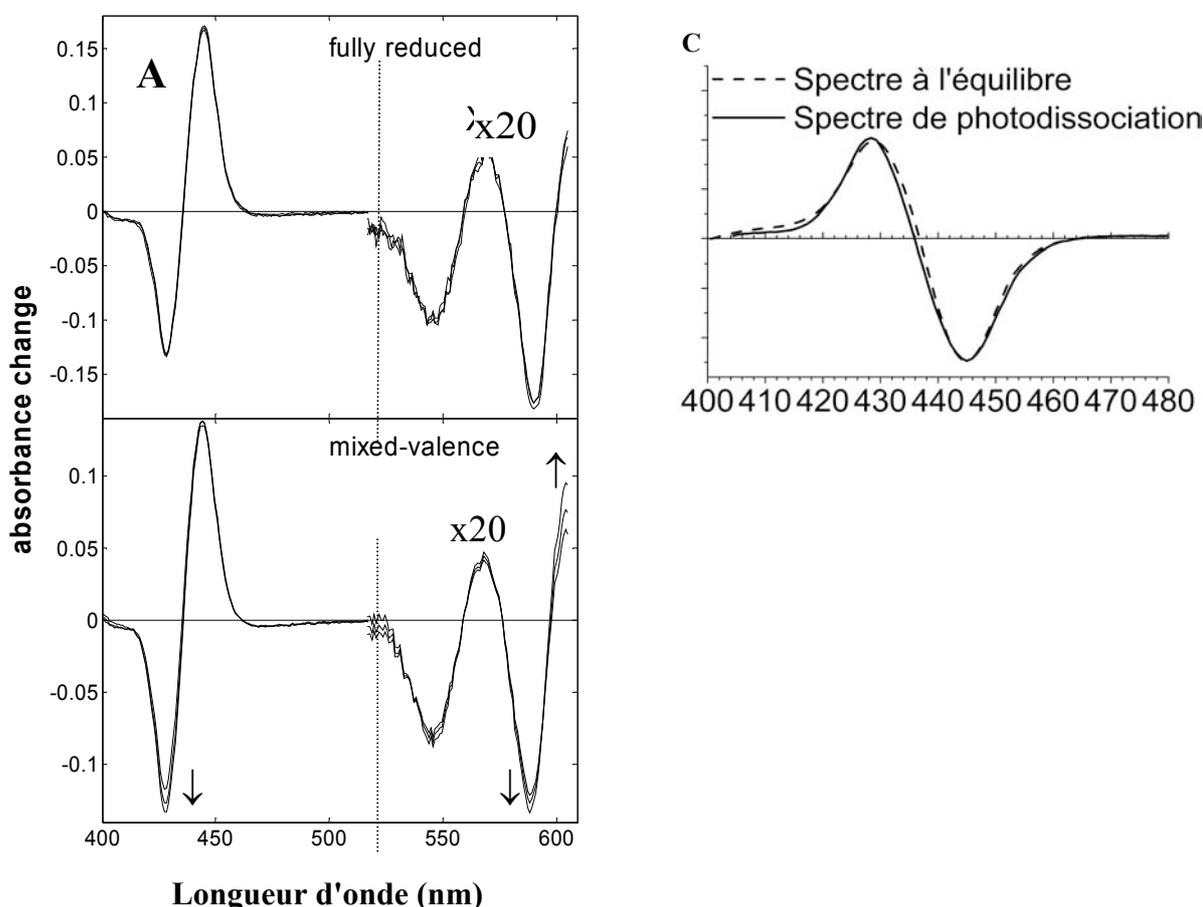


Figure 4.26 : Evolution spectrale après la photodissociation du CO de la CcO réduite (A) et mixed valence (B). Les spectres ont été enregistrés 40 ps, 1 ns et 4 ns après la dissociation. Les flèches indiquent l'évolution des spectres. La concentration des échantillons était de $45 \mu\text{M}$ pour les mesures dans la bande Soret et $150 \mu\text{M}$ pour la bande α .

La figure C montre la superposition du négatif du spectre de photodissociation à 40 ps de FR et du spectre FR-CO moins FR.

La Figure 4.27, représentant la superposition des spectres de dissociation de FR et MV normalisés à 428 nm, indique clairement leur différence, quelque soit le facteur de normalisation utilisé pour compenser la formation partielle de MV. Cette différence peut être attribuée, soit à une influence de l'état redox de l'hème *a* sur le spectre de l'hème *a*₃, soit à un transfert d'électron ultrarapide (<40 ps). L'allure du spectre de différence (Figure 4.27 bas) est très différente de celui attendu pour un transfert d'électron (Figure 4.27 à droite). Nous attribuons donc cette différence à l'interaction entre les hèmes *a* et *a*₃, en effet, l'état redox de l'hème *a* est susceptible de modifier les transitions électroniques de l'hème *a*₃. Une telle interaction a déjà été proposée pour expliquer les variations spectrales observées pour d'autres états du site actif (Blair *et coll.* 1982; Einarsdottir 1995).

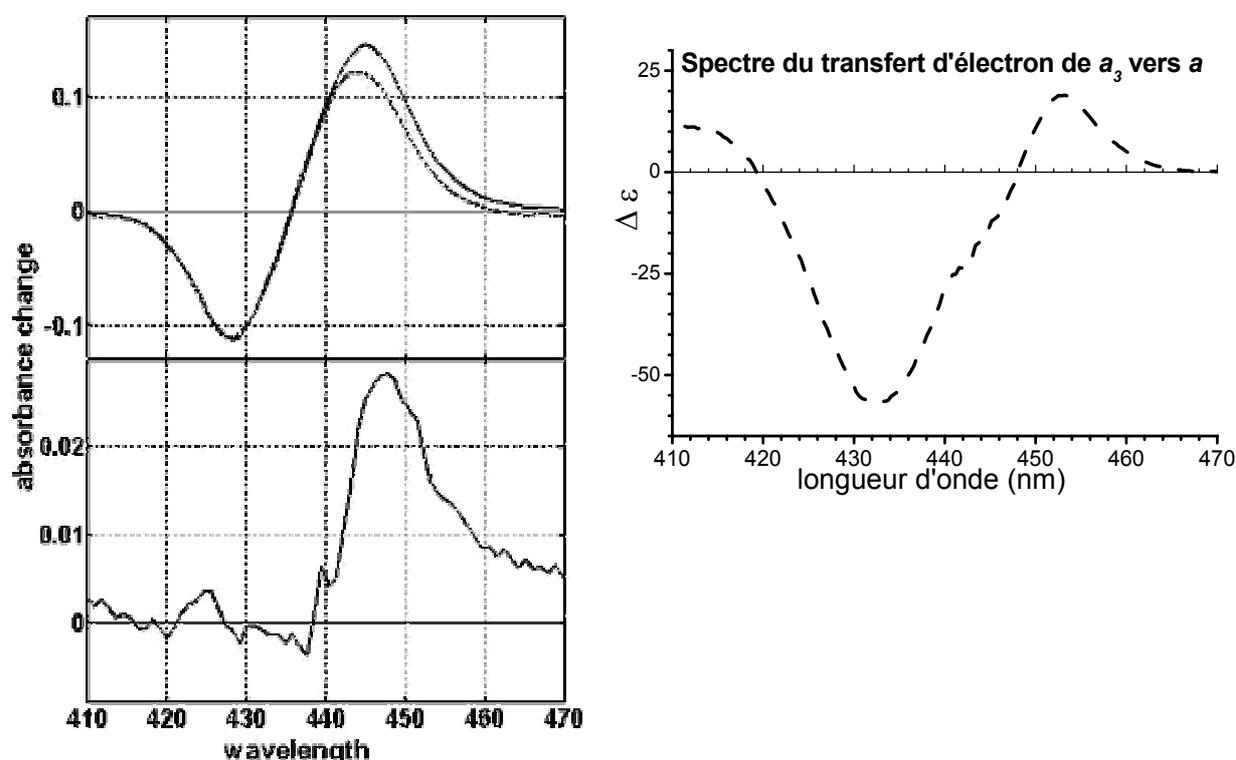


Figure 4.27 : Spectres mesurés 40 ps après photodissociation du CO de la cytochrome *c* oxydase réduite (FR-CO trait continu) et mixed valence (MV-CO trait pointillé) normalisés à 428 nm. La partie basse montre le spectre de différence FR moins MV.

La figure de droite montre le spectre théorique d'un transfert d'électron de l'hème *a*₃ vers l'hème *a* (Liao & Palmer 1996).

4.3.2.2 Evolution spectrale et transfert d'électrons.

Les cinétiques présentées figure 4.28, montrent la variation de l'absorption à 430 et 605 nm après photodissociation du CO de FR-CO (cercles pleins) et de MV-CO (cercles vides). La rupture de la liaison Fe*a*₃-CO se traduit, tout particulièrement, par une diminution de l'absorption à 430 et une augmentation à 605 nm. Lorsque l'oxydase est réduite, aucune évolution majeure n'est détectable sur la fenêtre de 4 ns (voir Figure 4.28 cercles pleins et Figure 4.26A). Par

contre, l'absorption de l'oxydase dans l'état MV, varie à 605 et à 430 nm (Figure 4.28 cercles vides et Figure 4.26B). Les cinétiques mesurées à 605 et 430 nm peuvent être décrites par une fonction monoexponentielle avec une constante de temps de $1,2 \pm 0,1$ ns.

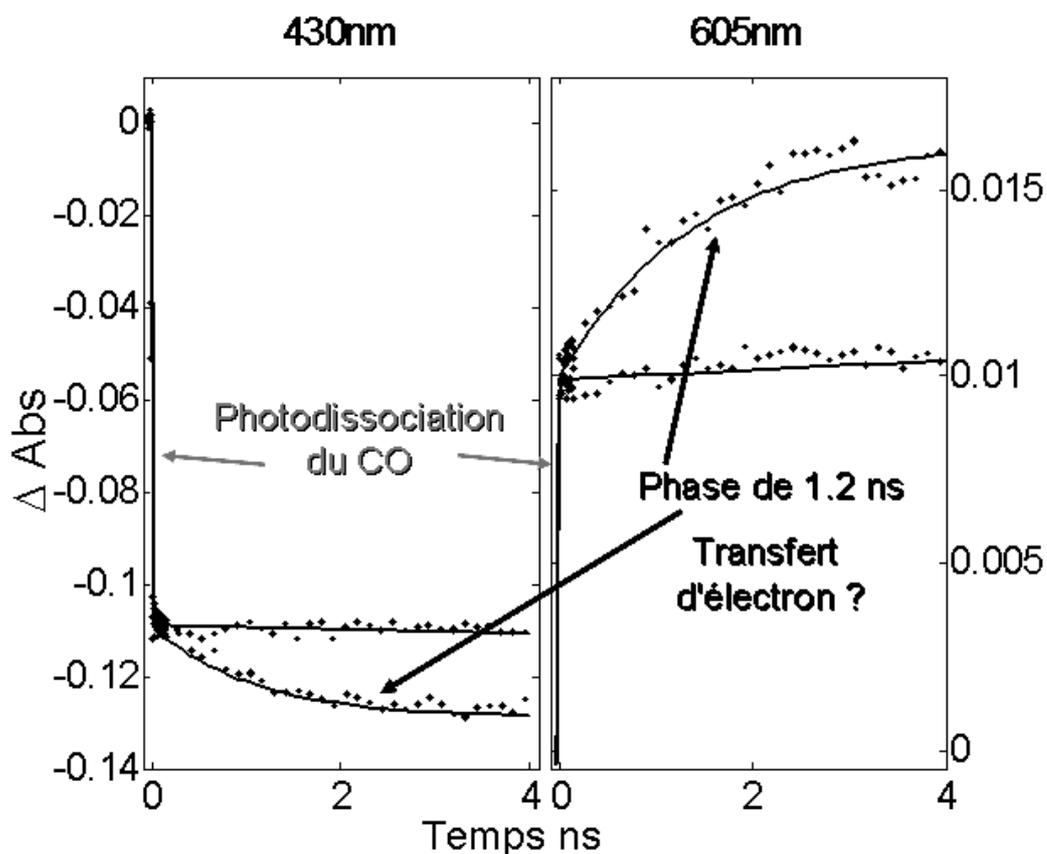


Figure 4.28 : Cinétique de l'absorption à 430 nm (partie gauche) et à 605 nm (partie droite) après photodissociation du CO sur la cytochrome c oxydase réduite (cercles plein) et MV (cercle vide).

Afin de déterminer la nature du phénomène associé à cette évolution spectrale, le spectre associé à la phase de 1,2 ns est calculée (Figure 4.29). Le spectre obtenu est comparé aux valeurs calculées à partir des mesures faites à l'équilibre par Liao et Palmer (Liao & Palmer 1996) (ligne sur la Figure 4.29) en supposant que tous les électrons qui quittent le Fea_3 vont au Fea . Il correspond à la transition : $a_3^{2+}, a^{3+} \rightarrow a_3^{3+}, a^{2+}$. La bonne adéquation des spectres expérimentaux avec celui calculé autorise l'attribution de cette cinétique à un transfert rapide des électrons de l'hème a_3 vers l'hème a .

Connaissant les coefficients d'absorption molaire de chaque hème (Liao & Palmer 1996), et la concentration de l'enzyme, nous avons pu estimer la proportion des électrons se trouvant sur l'hème a après 4 ns en normalisant les spectres de photodissociation par rapport aux spectres de référence. Les facteurs de normalisation choisis, 11 % et 16 % d'électrons transférés par molécule de CO dissociée pour la bande Soret et α respectivement, permettent d'obtenir une

bonne superposition des valeurs mesurées avec celles calculées comme le montre la figure 4.29. Les légères variations peuvent être attribuées, entre autre, aux différences entre les spectres de références mesurés à l'équilibre, et ceux mesurés à temps courts où le CO est lié au Cu_B et les interactions entre les hèmes évoquées ci-dessus.

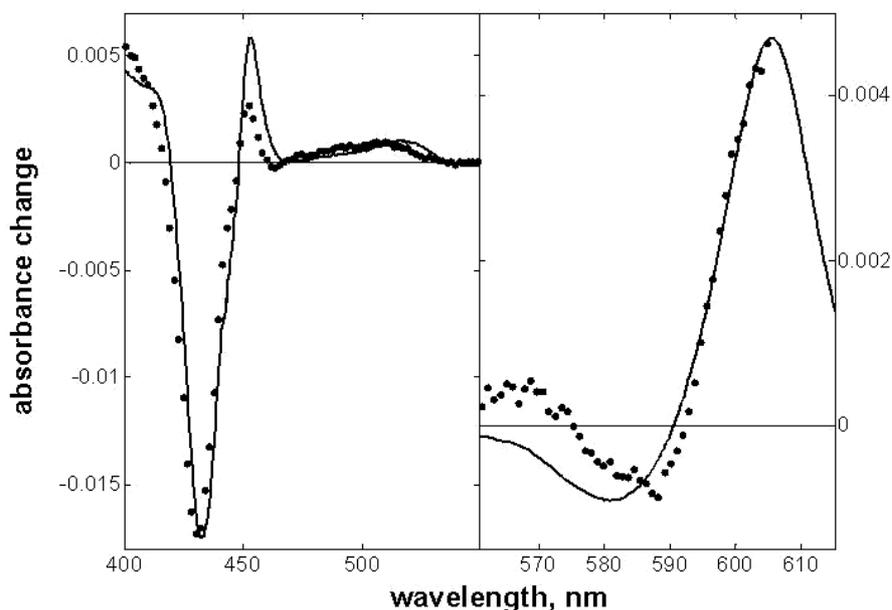


Figure 4.29 : Spectre de la composante de ~1,2 ns. Les cercles représentent les données expérimentales et la courbe, le spectre calculé (Fea_3^{2+} , Fea^{3+} moins Fea_3^{3+} , Fea^{2+}) Le transfert d'électrons d'un hème à l'autre est $\sim 13\% \pm 3$

4.3.2.3 Discussion.

Cette étude montre une phase rapide de transfert d'électron entre les hèmes a_3 et a qui est évaluée à 1,2 ns par spectroscopie d'absorption pompe sonde avec une résolution de 100 fs et sur une échelle de 4 ns. Cette valeur, obtenue lors d'expérience de type "backflow", est probablement le plus rapide établie pour un transfert d'électron physiologique dans un système non photoactivable naturellement. L'existence de cette phase rapide est un sujet de controverse dans la littérature tant au niveau expérimental (Verkhovsky *et coll.* 2001; Namslauer *et coll.* 2002) qu'à celui des calculs théoriques (Regan *et coll.* 1998; Zheng *et coll.* 2003; Tan *et coll.* 2004).

- Expériences "back-flow" antérieures.

En 2001, Verkhovsky *et collaborateurs* observent, dans la bande α , une différence entre les spectres de photodissociation de MV-CO et FR-CO mesurés à 100 ns. Comme cette différence semble caractéristique d'un transfert des électrons du Fea_3 vers Fea , ces auteurs prédisent l'existence d'une phase "ultra-rapide" de transfert d'électron (Verkhovsky *et coll.* 2001). Les études menées par Namslauer *et coll.*, montrent également des différences spectrales dans la bande Soret. Cependant, les auteurs n'observent aucune évolution spectrale et indiquent que les

modifications spectrales observées sur une échelle inférieure à 600 ps, ne peuvent correspondre à un transfert d'électron (Namslauer *et coll.* 2002). Nos expériences, dans une échelle de temps non encore étudiée (40 ps-4 ns), ont permis d'établir une constante de temps de $1,2 \pm 0,1$ ns pour un transfert rapide d'électron. La faible amplitude des changements spectraux associés à cette phase comparée à celle de la photodissociation du CO, pourrait expliquer également la difficulté d'observer ce phénomène auparavant.

La différence a_3^{2+} , a^{3+} moins a_3^{3+} , a^{2+} a été calculée à partir de différentes décompositions du spectre de la cytochrome *c* oxydase pour modéliser le spectre de la composante de 1,2 ns. La meilleure superposition a été obtenue avec la décomposition faite par Liao et Palmer (Liao & Palmer 1996) en estimant que la stoechiométrie de l'oxydation et de la réduction des hèmes était de 1:1. En revanche, la même procédure, testée par Namslauer *et coll.*, ne leur a pas permis d'obtenir un spectre caractéristique d'un transfert d'électron décrivant leurs résultats. Cette non-superposition des spectres peut s'expliquer par des interactions entre les hèmes comme l'indiquent des études précédentes (Blair *et coll.* 1982; Einarsdottir 1995) qui s'ajoute aux changements spectraux du ET. Les spectres de photodissociation de MV-CO et FR-CO, obtenus à 40 ps corroborent cette conclusion.

- Calculs de k_{ET} .

De nombreux groupes cherchent à modéliser le transfert des électrons au sein des protéines. Les différents modèles développés utilisent l'équation de Marcus (Marcus & Sutin 1985).

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} V^2 \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda\kappa_B T}} \exp\left[-\frac{(\lambda + \Delta G^\circ)^2}{4\pi\kappa_B T}\right]$$

où λ est l'énergie de réorganisation, κ_B le facteur de Boltzmann, T la température et V le couplage électronique. Ce dernier paramètre varie avec la distance entre les centres redox. Deux types de modèle sont développés. Dans l'un, les électrons "sautent" d'un cofacteur à l'autre et la protéine est traitée comme une barrière homogène (Page *et coll.* 2003). Alors, c'est uniquement la distance entre les cofacteurs qui détermine la vitesse de transfert des électrons. Par ailleurs, le facteur β qui rend compte de la densité électronique moyenne entre les centres, a été défini pour calculer V dans ce modèle. Dans les protéines ce facteur est estimé à $1,4 \text{ \AA}^{-1}$. Les distances sont ici mesurées bord à bord (Page *et coll.* 2003). Verkhovsky et collaborateurs ont utilisé cette approche pour estimer que la vitesse de ET se situe dans le domaine nanoseconde. L'autre modèle privilégie le transfert des électrons le long de quelques passages définis par la structure de la protéine, ce qui permet un contrôle structural du transfert d'électrons. Cette approche a été appliquée au transfert d'électrons au sein de la CcO par plusieurs groupes (Regan *et coll.* 1998;

Medvedev *et coll.* 2000; Tan *et coll.* 2004). En particulier, Tan *et coll.* ont combiné la recherche des meilleurs chemins et la dynamique moléculaire (Tan *et coll.* 2004). Ainsi, le chemin privilégié est le transfert direct d'un hème à l'autre. Le taux de transfert alors obtenu est $3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (correspond à un temps de $\sim 3 \text{ ns}$) ce qui est en bon accord avec nos résultats (1,2 ns).

- Origine de la phase de 3 μs .

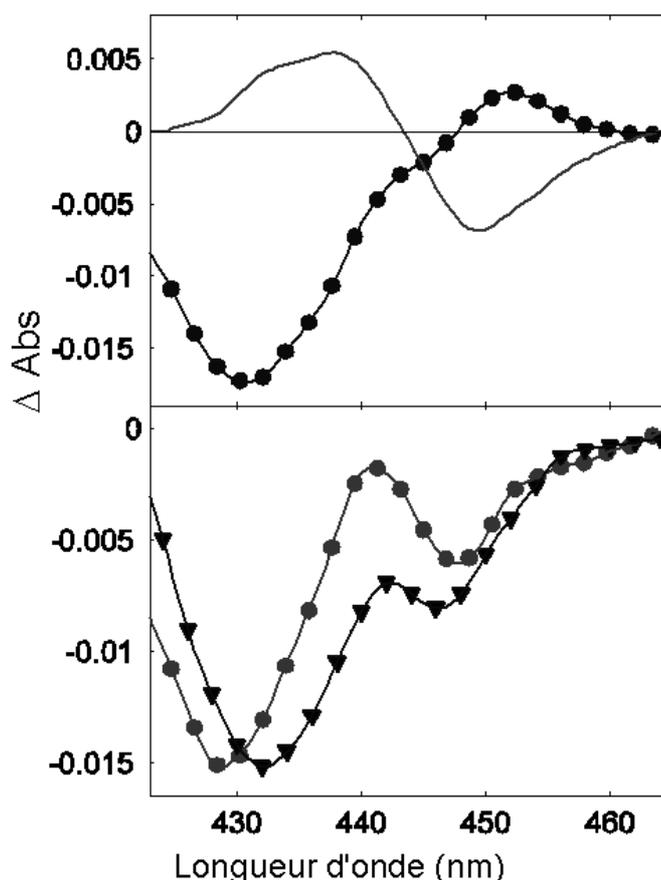


Figure 4.30 : Haut : La ligne pleine correspond à l'inverse du spectre associé à la phase de 2 μs de l'oxydase FR-CO d'après (Georgiadis *et coll.* 1994), La ligne avec les cercles correspond à la phase de 1,2 ns présentée Figure 4.29.

Bas : La superposition de la phase de 3 μs observée par Namslauer (Namslauer *et coll.* 2002)) et la somme des deux spectres du haut en prenant pour rapport des amplitudes des deux phases : 100% pour la phase de 2 μs et 25% pour la phase de 1,2 ns.

Les expériences menées par Einarsdottir et collaborateurs indiquent que, pour l'oxydase FR-CO, le départ du CO du Cu_B , qui a lieu en 2 μs , est associé à une modification spectrale de l'hème a_3 . Si l'on admet que le départ du CO peut également influencer le potentiel redox de l'hème a_3 , il paraît raisonnable de proposer que la phase de 3 μs associé au transfert d'électrons, dans MV-CO, correspondrait au départ du CO du Cu_B , qui induirait une modification du potentiel redox de l'hème a_3 et donc une rééquilibration des électrons entre les hèmes. Ce modèle prédit que le spectre de la phase de 3 μs provient à la fois du départ du CO du Cu_B et du transfert

d'électrons de a_3 vers a . Ceci expliquerait alors pourquoi l'allure du spectre associé à la phase de 3 μ s, attribué à un transfert d'électrons interhème (Oliveberg & Malmstrom 1991; Verkhovsky *et coll.* 1992; Einarsdottir *et coll.* 1995) est sensiblement différent de celui trouvé ici. Afin de tester cette hypothèse, nous avons additionné le spectre du transfert d'électrons de 1,2 ns à celui de la phase de 2 μ s associée au départ du CO du Cu_B . La figure 4.30 montre ce spectre et celui trouvé par Namslauer *et coll.* en 2002. L'allure des deux spectres est proche et la différence observée peut être due au fait que le spectre associé au départ du CO du Cu_B ne peut être mesuré sur la CcO dans l'état FR et non MV.

La figure 4.31 synthétise les résultats obtenus : à $t=0$, le CO est lié à l'hème a_3 , réduit comme le Cu_B . Les autres cofacteurs (Cu_A , hème a) sont oxydés. L'impulsion lumineuse provoque la rupture de la liaison Fe-CO. Le transfert du CO sur le Cu_B s'effectue en moins de 1 ps (Dyer *et coll.* 1991). Le potentiel redox de l'hème a_3 est alors fortement augmenté et les électrons se répartissent alors entre l'hème a_3 et l'hème a avec une constante de temps de 1,2 ns. Nos expériences ont montré que cette phase correspondait à ~13 % d'oxydation de l'hème a_3 . Si l'on considère que cette phase de 1,2 ns atteint un équilibre, alors la constante d'équilibre $K = [a^{3+}, a_3^{2+}, Cu_B^+ - CO] / [a^{2+}, a_3^{3+}, Cu_B^+ - CO] \approx 8$ et donc la différence d'énergie libre ΔG vaut environ 50 meV. La vitesse d'équilibration mesurée $(1,2 \text{ ns})^{-1}$ correspond à la somme $k_{\text{aller}} + k_{\text{retour}}$ des constantes microscopiques du transfert aller $a \rightarrow a_3$ et retour $a_3 \rightarrow a$. Or, $K = k_{\text{aller}} / k_{\text{retour}}$, donc $k_{\text{aller}} = (1,4 \text{ ns})^{-1}$ et $k_{\text{retour}} = (10 \text{ ns})^{-1}$. Donc, la constante de temps intrinsèque de la réduction de l'hème a_3 par l'hème a est de 1,4 ns.

La phase de 3 μ s, décrite précédemment (Oliveberg & Malmstrom 1991; Verkhovsky *et coll.* 1992; Einarsdottir *et coll.* 1995), peut être attribué au départ du CO du Cu_B . Le potentiel redox de l'hème a_3 serait alors, à nouveau diminué, ce qui modifierait l'équilibre entre les deux hèmes, et se traduirait par un transfert d'électron avec une constante de temps de 3 μ s aboutissant à 40 % des électrons sur l'hème a_3 et 60 % sur l'hème a (Einarsdottir 1995; Verkhovsky *et coll.* 2001). Pour confirmer cette hypothèse, des expériences de photodissociation du CO de l'espèce MV-CO suivies dans l'infrarouge seraient nécessaires.

4.3.2.4 Perspectives

La réduction de l'oxygène par la cytochrome c oxydase n'est possible que si le site actif est réduit (Fea_3^{2+} , Cu_B^+). La fixation du dioxygène sur la CcO, se fait tout d'abord sur le Cu_B , puis si le Fea_3 est réduit, O_2 se fixe alors sur l'hème a_3 où il est rapidement réduit (Bailey *et coll.* 1996). Or, dans les conditions physiologiques, la concentration d'oxygène dans les tissus est faible (30 μ M) (Brown & Cooper 1994) et la cytochrome c oxydase se trouve majoritairement dans l'état de réduction à deux électrons. Un électron se trouve sur le Cu_B et l'autre est sur l'un

des deux hèmes, leurs potentiels redox étant très proches (Moncada & Erusalimsky 2002). Si l'hème a_3 est réduit au moment du passage de l'oxygène dans le site actif, celui-ci est capté. Si c'est l'hème a qui est réduit, alors l'efficacité de capture dépend de la vitesse de transfert des électrons vers l'hème a_3 . L'efficacité catalytique importante de la cytochrome c oxydase, même dans des conditions où le potentiel mitochondrial ne permet pas sa réduction totale, peut être attribuée à ce processus de transfert rapide des électrons entre les hèmes.

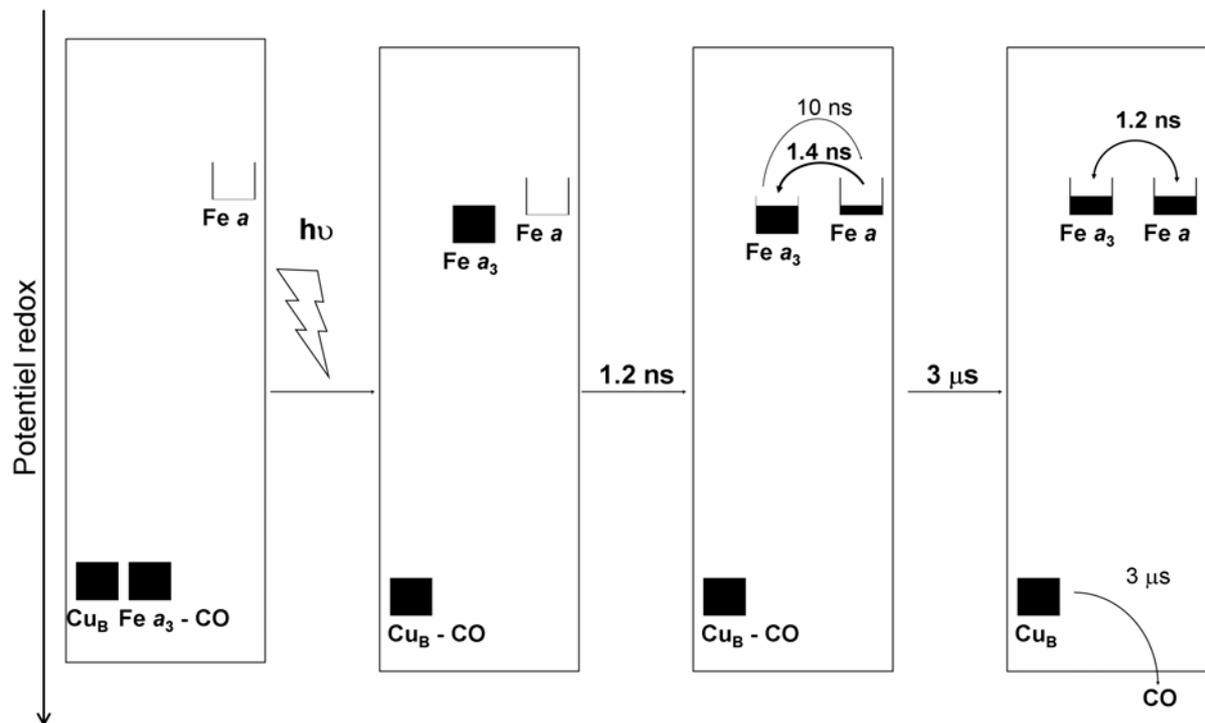


Figure 4.31 : Schéma synthétisant les phases de transfert d'électrons après photodissociation du CO de l'oxydase dans l'état mixed valence.

4.4 Mutagenèse de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*.

L'étude des interactions entre le NO et la cytochrome *c* oxydase aa_3 de *P. denitrificans* a montré un effet de la concentration de NO sur la cinétique de recombinaison. A fortes concentrations, la recombinaison a majoritairement lieu en une phase de 200 ps dont l'amplitude augmente avec la quantité de NO présente. Cette phase est attribuée à une recombinaison géminée rapide due à la présence d'une seconde molécule de NO sur le Cu_B . Ceci crée une gêne stérique favorisant la réassociation du NO photodissocié (>90 %) plutôt que sa sortie de la protéine (<10 %). Afin de tester si une modification de l'environnement du site actif peut induire un changement de comportement similaire, la valine 279 de la SU I de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* a été substituée par d'autres acides aminés plus volumineux et/ou de polarité différente. Ces expériences de mutagenèse dirigée ont été entamées au laboratoire de génétique moléculaire du Pr. B. Ludwig à l'Université de Francfort.

La substitution de la valine 279 par une isoleucine, résidu possédant également une chaîne latérale hydrophobe mais de taille supérieure, a pour conséquence une forte baisse de l'affinité de l'oxydase pour l'oxygène, sans que la fonction catalytique ne soit fortement affectée (Riistama *et coll.* 2000). Cet effet est attribué à une gêne stérique qui bloquerait le canal d'entrée de l'oxygène. La figure 4.32, représentant le site actif de l'oxydase aa_3 , montre la proximité de la valine 279, colorée en vert, avec le Cu_B .

4.4.1 Modélisation moléculaire

Des modélisations *in silico* de ces mutations sont effectuées, afin de nous guider dans le choix des acides aminés pouvant remplacer V279. Nous souhaitons induire une contrainte stérique au niveau du site actif, sans déstabiliser la fixation de l'hème à la protéine. Notre choix s'est porté sur le remplacement de la valine 279 par une leucine (L), une thréonine (T) et une asparagine (N).

Le changement d'une valine par une leucine va augmenter l'encombrement stérique, alors que le remplacement par une thréonine modifie essentiellement la polarité de par la présence d'une fonction hydroxyle sur la chaîne latérale de Thr. La mutation valine-asparagine devrait changer à la fois la polarité, résultant de la présence de la fonction amide hydrophile, et l'encombrement stérique. L'objectif de cette mutagenèse est d'étudier l'influence de ces changements stériques et de polarité sur la fixation de ligand diatomique, notamment le NO, et sur les cinétiques de recombinaison.

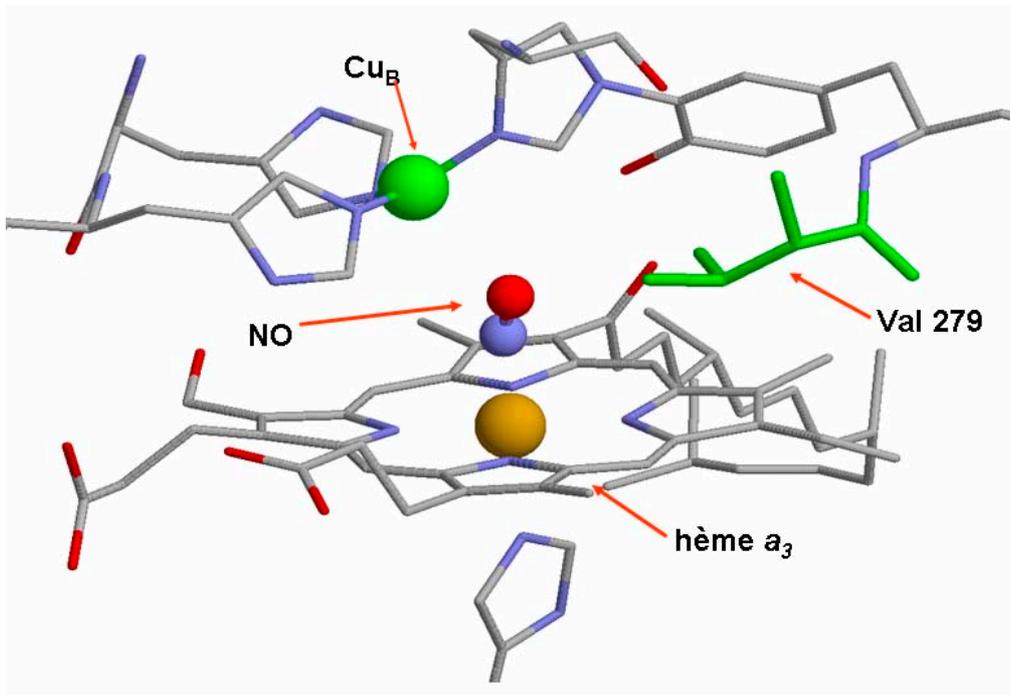


Figure 4.32 : Site actif de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* avec une molécule de NO fixée sur l'hème a_3 . La sphère jaune représente l'atome de fer hémique et la sphère verte le Cu_B . La valine 279 est colorée en vert.

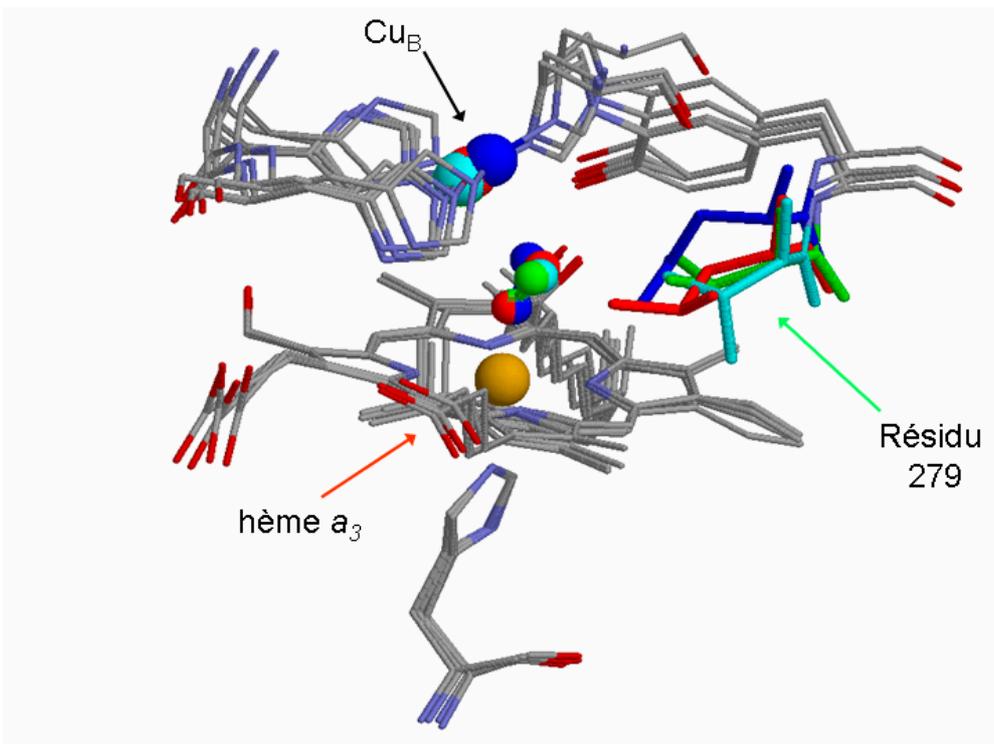


Figure 4.32 : Superposition des structures minimisées des mutants en présence d'une molécule de NO fixée sur le fer de l'hème a_3 . Les structures sont centrées sur le Fea_3 . La valine 279 de la protéine sauvage est colorée en vert, la leucine de V279L en rouge, l'asparagine de V279N en bleu et la thréonine de V279T en turquoise. La molécule de NO suit le même code couleur

A partir de la structure de la cytochrome *c* oxydase aa_3 de *P. denitrificans* préalablement minimisée à l'état réduit (Lambry *et coll.* 1999; Liebl *et coll.* 1999), les coordonnées des atomes de la valine 279 ont été remplacées par celles d'une leucine, d'une asparagine et d'une thréonine. Les nouvelles structures ainsi créées, ont ensuite été minimisées. La figure 4.33, montrant la superposition des trois mutants prospectés et de la protéine sauvage, modélise les effets du changement de l'acide aminé 279 sur la structure minimisée avec un NO lié au Fea_3 .

Le tableau 4.5 synthétise les différences observées entre les mutants et la protéine sauvage. Pour le mutant V279T, la fonction hydroxyle n'est pas orientée vers le NO mais en direction de l'hème (vers le bas sur la figure ci-dessus). Les distances entre le Fea_3 et le Cu_B ne sont pas affectées, de même le carbone terminal de la thréonine se trouve dans une position intermédiaire entre les deux carbones de la valine. Ainsi, la position de la molécule de NO n'est que peu affectée par cette mutation, de même que les autres acides aminés délimitant le site actif. Le changement de la valine (V279) par une asparagine modifie plus profondément la disposition des atomes dans le site actif : la distance Fe- Cu_B est augmentée, le NO effectue une rotation de $\sim 90^\circ$, l'azote et l'oxygène de la fonction amide sont à égale distance du NO. Pour le mutant V279L, l'allongement de la chaîne latérale induit une légère augmentation de la distance Fe- Cu_B mais surtout la fonction isopropyle réduit l'espace à la "gauche" de l'acide aminé, il en résulte une rotation du NO de 60° . Ces résultats indiquent l'importance de l'encombrement stérique sur la position du NO, comme l'avaient déjà montré les modélisations effectuées avec deux molécules de NO présentes dans le site actif. De plus, les modifications de la polarité de la chaîne latérale influent également sur la position de l'acide aminé.

distance en Å	sauvage	V279L	V279T	V279N
Fea_3-Cu_B	4,6	4,7	4,7	5,0
Fea_3-N (NO)	1,7	1,7	1,7	1,7
O(NO)-aa279	3,5 (CG1) et 3,3 (CG2)	3,4 (CD1)	3,0 (CG1)	3,2 (O) et 3,1 (N)
N(NO)-aa279	4,3 (CG1) et 3,8 (CG2)	3,7 (CD1)	3,9 (CG1)	3,2 (O) et 3,6 (N)

Tableau 4.5 : Distance entre les atomes des structures minimisées des mutants de la sous-unité I de l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*.

Certes, les modélisations présentées ci-dessus, ont été obtenues par une simple minimisation et les résultats précédents ont montré que cette procédure ne permettait pas d'éviter les minima locaux. Mais, l'objectif de ce travail était de vérifier si les substitutions de la valine 279 par les acides aminés sélectionnés étaient susceptibles d'influencer l'orientation du NO. Des modélisations supplémentaires, suivant la procédure décrite figure 4.22, vont être calculées.

4.4.2 Création des mutants.

Les mutants V279L, N et T ont été créés en utilisant des oligonucléotides modifiés. Les premières étapes de mutagenèse ont été effectuées dans *E. coli*. La mutation du codon GTC codant pour la valine 279 du gène *ctaDII* (1680pb), qui code pour la sous-unité I de l'oxydase *aa*₃, est effectuée sur la partie 5' du gène inséré dans un vecteur de type pSL1180, formant alors le vecteur pKDI (voir figure 4.34 A)

mutant	codon	vecteur	Séquences des oligonucléotides	site de restriction
V279	GTC	pKDI	∅	∅
V279L	CTC	pEP10	cttcggccatccc <i>gagctc</i> tatatcatcatcctgc	SacI
V279N	AAC	pEP11	gttcttcggccatccc <i>gagaa</i> tatatcatcatcctgc	BspEI
V279T	ACC	pEP12	cttcggccatccc <i>gagac</i> tatatcatcatcctgc	BsaI

Tableau 4.6 : Mutants créés et nom des vecteurs associés, la séquence des oligonucléotides mutants et les sites de restriction créés sont indiqués. Les bases mutées sont en italique, celles correspondant au codon 279 sont en gras et celles reconnues par le site de restriction, soulignées.

Afin de tester l'effectivité de la mutagenèse, des sites de restriction supplémentaires ont été insérés comme décrit sur tableau 4.6. Une simple restriction enzymatique du plasmide muté permet de déterminer si les bases ont effectivement été mutées. La figure 4.33 présente les résultats de la digestion enzymatique des plasmides pEP10, 11 et 12 par *XbaI* (figure 4.34 B) et *SacI*, *BspEI* et *BsaI* respectivement. Les profils, obtenus sont conformes à ceux attendus (figure 3.4) : la double restriction par *XbaI* et *SacI* de pEP10 (V279L) donne 3 bandes de 3287, 898 et 154 bp, cette dernière étant difficile à visualiser. Le plasmide pKDI, contenant le gène non muté, montre une bande à 1052 pb après linéarisation. L'identification des colonies mutées se fait par l'observation de la bande autour de 1000 bp. La mutation V279N se traduit par l'apparition d'un site de restriction pour *BspEI*. La bande de 4339 pb, correspondant au plasmide linéarisé, est coupée en deux bandes de 3449 et 890 bp. Enfin, la présence de la mutation V279T dans le plasmide pEP12, se traduit par l'apparition d'un site de restriction pour *BsaI*. Il y a donc apparition de deux bandes à 2002 et 880 pb.

Après la sélection des plasmides mutés, la partie 3' du gène *ctaDII* et la séquence codant pour six histidines, provenant de pKD3 est insérée dans le vecteur pEP10, 11 et 12 par restriction avec *HindIII* et *BstXI* suivie d'une ligation, formant les plasmides pEP13, 14 et 15 respectivement (voir figure 4.34 B et C). A cette étape, nous contrôlons que les mutations sont toujours présentes par une nouvelle restriction par le même couple d'enzymes. Nous disposons alors du gène entier muté mais le plasmide est intégré dans *E. coli*. La dernière phase consiste donc à introduire le gène entier muté dans un vecteur permettant son intégration dans *P. denitrificans*, pUP39. Ce plasmide possède deux origines de répllication, une pour *E. coli* et une pour *P. denitrificans*, le promoteur du gène *ctaDII*, les gènes de résistance pour la streptomycine

et le chloramphénicol, et une séquence *mob* autorisant le transfert du plasmide par conjugaison. La création des vecteurs pEP16, 17 et 18, se fait par une double restriction des deux plasmides par *HindIII* et *XbaI* suivie d'une ligation. Le gène *ctaDII* est alors inséré juste en aval de son promoteur constitutif (figure 4.34 D). La présence des mutations est une nouvelle fois testée par une digestion enzymatique des plasmides ainsi formés.

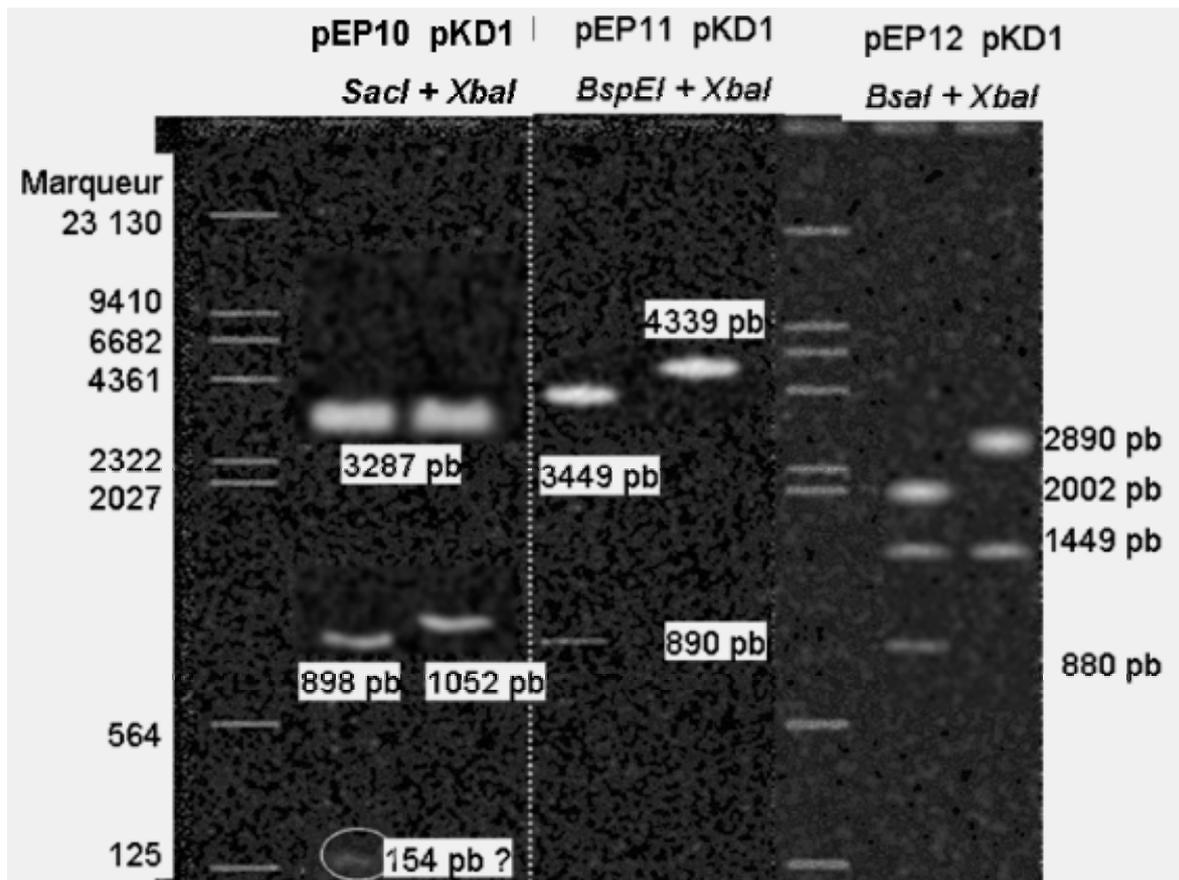


Figure 4.33 : Gel d'agarose à 0,7 % des digestions des plasmides pKD1 (V279), pEP10 (V279L), 11 (V279N) et 12 (V279T).

Afin d'intégrer les plasmides et ainsi d'exprimer l'oxydase ainsi mutée à partir des plasmides pEP16, 17 et 18 dans *P. denitrificans*, on utilise la capacité des bactéries à échanger du matériel génétique lors du phénomène de conjugaison. Lors de ce processus, les bactéries donatrices créent un "canal", le pilus, par lequel transitent les plasmides, portant la séquence *mob*, vers les bactéries acceptrices. Les plasmides doivent donc passer de la souche de *E. coli* TOP 10 vers la souche de *P. denitrificans* AOI, souche délétée des gènes *ctaDII* et *ccoN*, codant pour les sous-unités I des oxydases *aa₃* et *cbb₃* respectivement. Comme ni AOI, ni la souche de *E. coli* ne possèdent la capacité à conjuguer, une troisième souche dite "helper" est ajoutée (souche de *E. coli* MM294) pour transférer les plasmides pEP16, 17 et 18 chez *P. denitrificans*. Après 24 H de coculture, les souches AOI ayant intégré le plasmide sont sélectionnées par trois

antibiotiques la streptomycine, permettant de sélectionner les bactéries contenant le plasmide, et de la rifampicine et de la gentamycine pour lesquels la souche AOI est résistante. Parallèlement, un plasmide contenant le gène *ctaDII* (pWTII) non muté, est transformé chez *P. denitrificans* comme décrit ci-dessus, ce qui sert de contrôle. La présence du plasmide muté est ensuite vérifiée par restriction enzymatique.

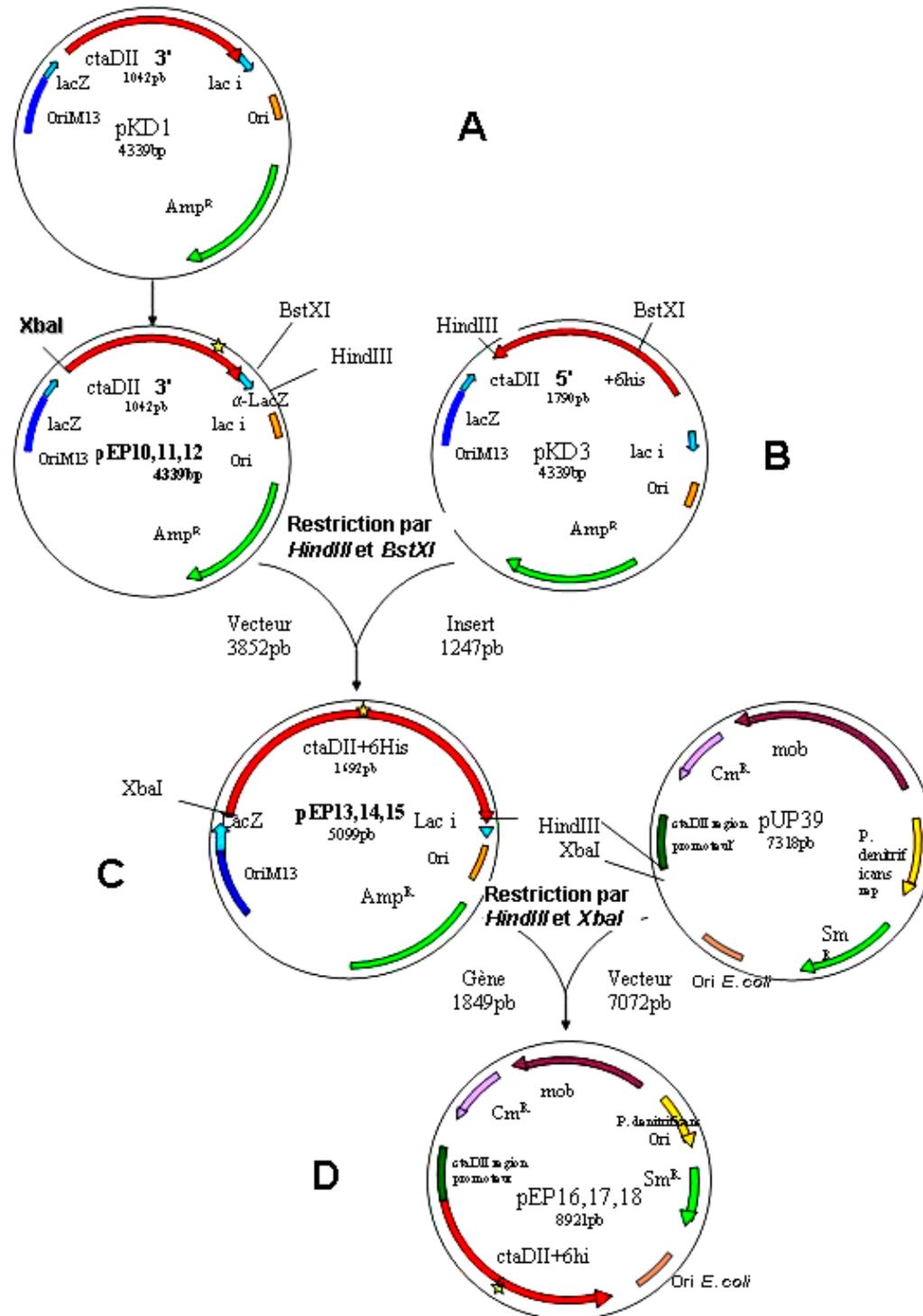


Figure 4.34: Schéma de la construction des plasmides contenant le gène *ctaDII* muté.

4.4.3 Tests biochimiques

Un immuno-transfert, révélé par des anticorps α -6 His, à partir des cellules de mutants V279, V279L, V279N, V279T lysées par le tampon de charge, permet de confirmer l'expression de la sous-unité I de la CcO aa_3 (figure 4.35 A). Afin de tester si les mutations effectuées affectent l'activité oxydase de la protéine, des tests "NADI" sont effectués directement sur les colonies en milieu solide. Ce test colorimétrique est basé sur l'apparition d'une couleur bleue due à la réaction du naphthol avec le N,N-diméthyl-p-phénylène diamine en présence d'une oxydase active (voir § 3.3.3). La figure 4.35 B indique que seul le mutant V279L conserve une activité catalytique plus faible que le type sauvage. Pour les mutants V279N et V279T, aucune activité oxydase n'a pu être détectée.

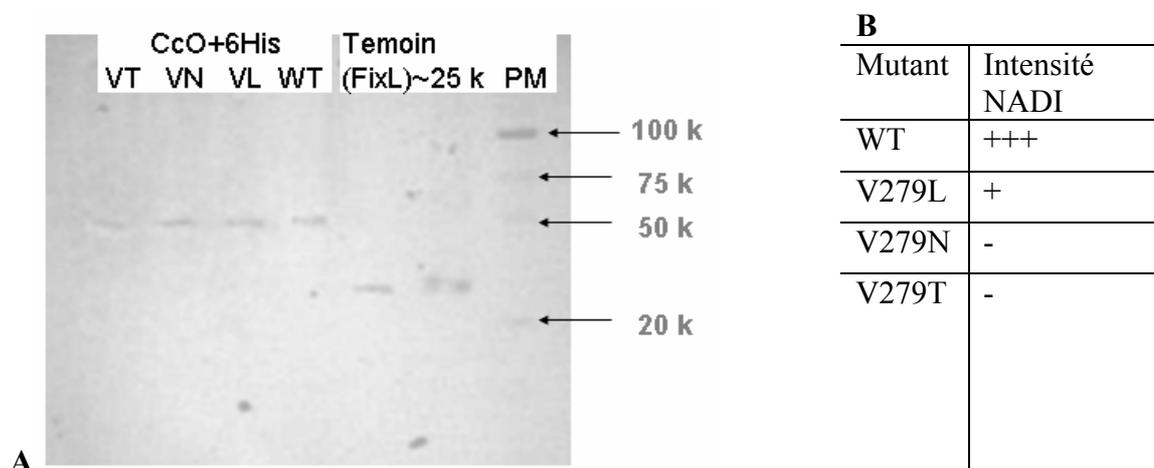


Figure 4.35 : A Immuno-transfert réalisé après un SDS-PAGE à 12%. Les anticorps α -6His révèlent une protéine de masse moléculaire apparente de \sim 60 kDa correspondant à la SU I de la CcO aa_3 de *P. denitrificans*.

B Tableau synthétisant les résultats obtenus avec le test NADI.

4.4.4 Perspectives

Suites aux modélisations préliminaires, il a été décidé de substituer la valine 279 par une leucine, une asparagine et une thréonine. En effet, les minimisations présentées figure 4.32, montrent un effet de ces substitutions sur l'orientation du NO. Les tests préliminaires sur les bactéries en culture indiquent que les SUI mutées sont exprimées et les spectres de différence des membranes montrent un pic à 605 nm (figure 4.36) caractéristique de l'hème a ce qui suggère que ces mutants n'affecte pas l'insertion de l'hème a_3 dans le site actif.

Ces résultats constituent un préalable à une étude plus approfondie. Une fois ces mutants purifiés, il sera intéressant de tester la fixation de ligands biatomiques (NO, CO, CN⁻) et de mesurer les cinétiques de recombinaison. Une collaboration est aussi envisagée afin de tester l'activité O₂ réductase de ces mutants et déterminer quelle partie du cycle catalytique est affectée. En effet, des mutations de la SU I de la CcO peuvent altérer la réduction de l'oxygène comme cela a été montré pour le mutant V279I (Riistama *et coll.* 2000), et/ou le pompage des protons.

5 Conclusion et Perspectives

L'adaptation des chaînes respiratoires à leur environnement est l'une des clés de la survie cellulaire. Si les organismes procaryotes disposent d'une grande flexibilité métabolique, les organismes eucaryotes ont privilégié la régulation de la seule voie aérobie. De nombreux mécanismes permettent de moduler l'activité des chaînes respiratoires, notamment au niveau de la cytochrome *c* oxydase. Ainsi, la fixation du monoxyde d'azote sur la CcO permet de réguler son activité, et la disponibilité des électrons module la vitesse de la réduction de l'oxygène. Des aspects de ces deux mécanismes ont été étudiés dans cette thèse.

Les études présentées ici montrent que deux molécules de NO sont susceptibles d'être présentes simultanément dans le site actif de la cytochrome *c* oxydase aa_3 de *P. denitrificans* dès les faibles concentrations de NO. Par spectroscopie pompe-sonde, trois phases de recombinaison de 200 ps, 20 ns et >1 ms, ont été déterminées. La phase de 200 ps reflète une réassociation directe du NO sur le fer de l'hème a_3 et la phase de 20 ns correspondrait à une recombinaison du NO après un premier éloignement du NO. L'intensité de ces phases de recombinaison géminée (recombinaison sans que le NO ne sorte de la protéine) est fonction de la concentration en NO. Ainsi, plus la concentration de NO est élevée, plus l'intensité des phases de recombinaison de 200 ps et 20 ns est importante. En revanche, à faibles concentrations de NO, la recombinaison est majoritairement bimoléculaire (phase >1 ms). Ces résultats reflètent la présence d'un deuxième site de fixation du NO à proximité ou dans le site actif. Or, des études précédentes sur la CcO mammifère à hautes concentration de NO montrent que le NO peut se lier au Cu_B , outre sa fixation à l'hème a_3 (Brudvig *et coll.* 1980; Zhao *et coll.* 1994). C'est donc un bon candidat pour le second site de fixation du NO dans la CcO de *P. denitrificans*.

Des expériences similaires sur l'oxydase ba_3 de *T. thermophilus* montrent l'absence de phase picoseconde de recombinaison. Or, pour cette CcO, une seule molécule de NO peut être présente à l'équilibre du fait de son activité NO-réductase. Ces résultats confirment donc notre interprétation des phases rapides pour l'oxydase aa_3 . En effet, pour l'oxydase ba_3 , une première phase de 15 ns, indépendante de la concentration de NO, est observée. Cette phase correspond à une recombinaison géminée, une recombinaison bimoléculaire ne pouvant avoir lieu dans un temps aussi court. Par analogie avec les résultats obtenus avec le CO, on peut supposer que le NO se fixe temporairement sur le Cu_B avant de recombiner sur l'hème a_3 , ou de sortir de la protéine. Une seconde phase de 50 μ s, dont l'intensité est dépendante de la concentration de NO, correspondrait à une recombinaison bimoléculaire.

Les expériences de spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (RPE),

réalisées dans le but de déterminer la nature du second site de fixation, ont montré une modification drastique du signal obtenu selon la concentration de NO présente. Ainsi, à basses concentrations, le signal obtenu pour l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans* est similaire à celui mesuré avec la CcO ba_3 de *T. thermophilus*. Il est caractéristique de la liaison du NO à un fer hémique ayant pour 5^{ème} ligand une histidine. Cependant, à des stoechiométries plus importantes, un signal très différent est observé qui semble indiquer la rupture de la liaison Fea_3 -histidine. Or, le spectre visible n'indique pas un tel événement. S'il n'y a pas rupture de la liaison, un changement d'orientation du NO par rapport à l'histidine peut expliquer cette modification du signal. En effet, dans le cas d'une rotation, il n'y a plus recouvrement des orbitales π du NO et du noyau imidazole rompant ainsi le couplage entre l'histidine et le NO via le Fea_3 . La présence d'une seconde molécule de NO dans le site actif peut donc imposer la rotation du NO lié à l'hème a_3 . Les modélisations effectuées vont bien dans ce sens, puisque la présence d'une seconde molécule de NO induit une modification de l'angle de rotation (N-O- Fea_3)-(noyau histidine) de 13° à 77°. L'apparition, à plus fortes concentrations de NO, d'un signal RPE caractéristique d'une interaction entre un métal de transition et une molécule de NO conforte notre hypothèse du Cu_B comme second site de fixation du NO. La construction de mutants de l'oxydase est en cours. Elle a pour objectif d'induire, par mutagenèse, une contrainte stérique au niveau du site actif, susceptible de modifier l'orientation du NO, validant ainsi notre hypothèse.

L'ensemble de ces résultats, obtenus avec l'oxydase aa_3 de *P. denitrificans*, révèle la présence possible de deux molécules de NO dans le site actif, et ouvre des perspectives nouvelles quant aux interactions entre le NO et la CcO. Des expériences similaires sont en cours sur l'oxydase de cœur de bœuf afin d'établir si une telle dépendance de la concentration de NO existe également au niveau de la CcO mitochondriale. En effet, il a été montré que des interactions NO-site actif, même à très basses concentrations de NO, sont impliquées dans la régulation de l'activité de l'oxydase chez les mammifères. Ainsi, la production de NO à la périphérie des tissus, inhibe la consommation locale de O_2 , favorisant sa diffusion en profondeur et permet donc l'oxygénation de l'ensemble des cellules du tissu.

L'étude de la photodissociation du CO sur l'oxydase aa_3 mitochondriale dans l'état redox intermédiaire (réduit par 2 e^- sur 4 au maximum) a permis de mettre en évidence une constante de temps de transfert des électrons entre les hèmes a et a_3 de 1,2 ns. Cette phase correspond à la libération des électrons après transfert photoinduit du CO de l'hème a_3 au Cu_B . Ces résultats remettent en cause l'interprétation des données de la littérature, décrivant le transfert d'électron intrinsèque selon une phase de 3 μs , *i.e.*, trois ordres de grandeur plus lente. Cette dernière phase correspond effectivement à un transfert d'électron inter-hème, mais provoqué par le départ du CO du Cu_B , ce qui modifie l'équilibre des électrons en faveur de la réduction de l'hème a . La

mise en évidence d'un transfert intrinsèque rapide des électrons permet d'envisager le mécanisme de réduction de l'oxygène sous un angle nouveau. *In vivo*, la CcO est majoritairement dans un état redox intermédiaire où seuls deux électrons sont présents : un est situé sur le Cu_B et le second s'équilibre entre les hèmes *a* et *a*₃ de potentiel redox très proche. Or la fixation (et la réduction) de l'oxygène sur le site actif n'est possible que si le Cu_B et l'hème *a*₃ sont tous deux réduits. La vitesse d'équilibration des électrons entre les hèmes limite la durée des intervalles de temps où l'hème *a*₃ est oxydé, et ainsi, optimise la probabilité de piéger l'oxygène lors de son passage dans le site actif. En effet dans les conditions physiologiques de basse concentration de O₂ et de faible flux d'électron, ce processus peut contribuer à augmenter l'efficacité catalytique de la cytochrome *c* oxydase sans production d'espèces toxiques.

6 Annexes, Index et Références

6.1 Abréviations

aa	acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
APS :	Ammonium persulfate
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adénosine TriPhosphate
BSA	Albumine de Sérum de Boeuf
Cc	Cytochrome <i>c</i>
CcO	Cytochrome <i>c</i> Oxydase
CN	cyanure
CO	Monoxyde de carbone
DEAE :	Diéthylaminoéthyl
DMPD	N,N-diméthyl- <i>p</i> -phénylène diamine
DNase	désoxyribonucléase
PCR	Polymerase Chain Reaction
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	acide éthylène glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacétique
ET	transfert d'électron
FAD	Flavine Adénosine Dinucléotide
FeS	centre Fer Soufre
FMN	Flavine MonoNucléotide
fs, ps, ns	femto (10^{-15}), pico (10^{-12}), nano (10^{-9}) seconde
GMPC	Guanidine MonoPhosphate cyclique
N ₂ O	Protoxyde d'azote
NAD(P)	Nicotinamide Adénosine Dinucléotide (Phosphate)
nJ	nanojoule
NO	Monoxyde d'azote
NOS _{I,E,N}	NO synthases inductible, endothéliale, neuronale
O ₂	dioxygène
<i>P. d</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
PDB	Protein Data Bank = banque de données des structure 3D de protéines
Pi	Phosphate inorganique
RNase	ribonucléase
RPE	Résonance paramagnétique électronique
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SU	Sous Unité
SVD	Singular value decomposition = décomposition de valeurs individuelles
TMBZ	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
Tris=TRIZMA [®]	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane hydrochloride
UQ / UQH ₂	Ubiquinone / Ubiquinol
YAG	Yttium-Aluminium-Garnet
β-DM = DM	n-dodecyl-β-D-maltoside
β-ME	β-mercaptoéthanol
qsp	quantité suffisante pour

6.2 Références bibliographiques

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." Nature **370**: 621 - 628.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. and Kurland, C. G. (1998). "The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria." Nature **396**(6707): 133-140.
- Atherton, N. M., Gibson, Q. H. and Greenwood, C. (1963). "Electronspin-resonance changes on oxidation of cytochrome oxidase." Biochem J **86**: 554-555.
- Bailey, J. A., James, C. A. and Woodruff, W. H. (1996). "Flow-Flash Kinetics of O₂ Binding to Cytochrome *c* Oxidase at Elevated [O₂]: Observations Using High-Pressure Stopped-Flow for Gaseous Reactants." Biochemical and Biophysical Research Communications **220**(3): 1055.
- Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O. M. H. and van Spanning, R. J. M. (1998). "Molecular Genetics of the Genus *Paracoccus*: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(4): 1046-1078.
- Banci, L. and Assfalg, M. (2001). "Mitochondrial cytochrome *c*". Handbook of metalloproteins.
- Berry, E. A., Guergova-Kuras, M. Huang, L. and Crofts, A. (2000). "Structure and function of Cytochrome *bc* Complexes." Annual Review of Biochemistry **69**: 1005-1075.
- Bickar, D., Bonaventura, C. and Bonaventura, J. (1984). "Carbon monoxide-driven reduction of ferric heme and heme proteins." J. Biol. Chem. **259**(17): 10777.
- Blackmore, R. S., Greenwood, C. and Gibson, Q. H. (1991). "Studies of the primary oxygen intermediate in the reaction of fully reduced cytochrome oxidase." J. Biol. Chem. **266**(29): 19245-19249.
- Blair, D. F., Bocian, D., Babcock, G. and Chan, S. (1982). "Evidence for modulation of the heme absorptions of cytochrome *c* oxidase by metal-metal interactions." Biochemistry **21**(26): 6928-6935.
- Blokzijl-Homan, M. F. J. V. and Van Gelder, B. F. (1971). "Biochemical and biophysical studies on cytochrome *aa*₃ III. The EPR spectrum of NO-ferrocycytochrome *a*₃." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **234**(3): 493.
- Boelens, R., Rademaker, H., Pel, R. and Wever, R. (1982). "EPR studies of the photodissociation reactions of cytochrome *c* oxidase-nitric oxide complexes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **679**(1): 84.
- Boogerd, F. C., Van Verseveld, H. W. and Stouthamer, A. H. (1980). "Electron transport to nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*." FEBS Lett. **113**(2): 279-284.
- Boyer, P. (1999). "Molecular motors: What makes ATP synthase spin?" Nature **402**(6759): 247-249.
- Bratton, M. R., Pressler, M. A. and Hosler, J. (1999). "Suicide inactivation of cytochrome *c* oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site." Biochemistry **38**(49): 16236-16245.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1990). "Isolation of Nitric Oxide Synthetase, a Calmodulin-Requiring Enzyme." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**(2): 682-685.

- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., Swaminathan, S. and Karplus, M. (1983). "CHARMM: a program for macromolecular energy, minimisation, and dynamics calculations." J. Comput. Chem.(4): 187-212.
- Brosius (1989). "Superpolylinkers in cloning and expression vectors." DNA **8**(10): 759-777.
- Brown, G. C. and Cooper, C. E. (1994). "Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase." FEBS Lett. **356**(2-3): 295-298.
- Brudvig, G. W., Stevens, T. H. and Chan, S. I. (1980). "Reactions of nitric oxide with cytochrome *c* oxidase." Biochemistry **19**: 5275-5285.
- Brzezinski, P. and Malmstrom, B. G. (1985). "The reduction of cytochrome *c* oxidase by carbon monoxide." FEBS Lett. **187**(1): 111.
- Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. and Bluggel, M. (1999). "Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase." Protein Sci **8**(5): 985-990.
- Capaldi, R. (1990). "Structure and assembly of cytochrome *c* oxidase." Arch Biochem Biophys **280**(2): 252-262.
- Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T. M. and Iwata, S. (2003). "Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases." FEBS Lett. **545**(1): 31-38.
- Chan, N.-L., Kavanaugh, J. S., Rogers, P. H. and Arnone, A. (2004). "Crystallographic Analysis of the Interaction of Nitric Oxide with Quaternary-T Human Hemoglobin." Biochemistry **43**(1): 118 - 132.
- Chien, J., C. W. (1969). "Electron Paramagnetic Resonance Study of the Stereochemistry of Nitrosylhemoglobin." J. Chem. Phys. **51**(10): 4220-4227.
- Cleeter, M. W. J., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S. and Schapira, A. H. V. (1994). "Reversible inhibition of cytochrome *c* oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases." FEBS Lett. **345**(1): 50-54.
- Clementi, E., Brown, G. C., Foxwell, N. and Moncada, S. (1999). "On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**(4): 1559-1562.
- Conrad, R. (1996). "Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO)." Microbiol Rev. **60**(4): 609-640.
- Cooper, C. E. (2002). "Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector?" Trends in Biochemical Sciences **27**(1): 33-39.
- Cooper, C. E., Torres, J., Sharpe, M. A. and Wilson, M. T. (1997). "Nitric oxide ejects electrons from the binuclear centre of cytochrome *c* oxidase by reacting with oxidised copper: a general mechanism for the interaction of copper proteins with nitric oxide?" FEBS Lett. **414**(2): 281-284.
- de Gier, J. W., Van Spanning, R. J. M., Oltmann, L. F. and Stouthamer, A. H. (1992). "Oxidation of methylamine by *Paracoccus denitrificans* mutant impaired in the synthesis of the *bc₁* complex and the *aa₃*-type oxidase. Evidence for the existence of an alternative cytochrome *c* oxidase in this bacterium." FEBS Lett. **306**: 23-26.
- Dickinson, L. C. and Chien, J. C. W. (1971). "An Electron Paramagnetic Resonance Study of

- Nitrosylmyoglobin." J. Am. Chem. Soc. **93**(20): 5036-5040.
- Drosou, V., Reincke, B., Schneider, M. and Ludwig, B. (2002). "Specificity of the interaction between the *Paracoccus denitrificans* oxidase and its substrate cytochrome *c*: comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome *c*₅₅₂, and its truncated and site-directed mutants." Biochemistry **41**(34): 10629-10634.
- Dyer, R., Peterson, K., Stoutland, P. and Woodruff, W. (1991). "Ultrafast photoinduced ligand transfer in carbonmonoxy cytochrome *c* oxidase. Observation by picosecond infrared spectroscopy." J. Am. Chem. Soc. **113**: 6276-6277.
- Einarsdottir, O. (1995). "Fast reactions of cytochrome oxidase." J. Am. Chem. Soc. **1229**(2): 129-147.
- Einarsdottir, O., Georgiadis, K. and Sucheta, A. (1995). "Intramolecular electron transfer and conformational changes in cytochrome *c* oxidase." Biochemistry **34**(2): 496-508.
- Einarsdottir, O. and Szundi, I. (2004). "Time-resolved optical absorption studies of cytochrome oxidase dynamics*1." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1655**: 263-273.
- Emelyanov, V. V. (2003). "Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell." Eur J Biochem **270** (8): 1599-1618.
- Florens, L., Schmidt, B., McCracken, J. and Ferguson-Miller, S. (2001). "Fast deuterium access to the buried magnesium/manganese site in cytochrome *c* oxidase." Biochemistry **40**(25): 7491-7497.
- Forte, E., Urbani, A., Saraste, M., Sarti, P., Brunori, M. and Giuffrè, A. (2001). "The cytochrome *cbb*₃ from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity." Eur J Biochem **268**(24): 6486-6491.
- Friedrich, T. and Bottcher, B. (2004). "The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1608**(1): 1-9.
- Fujiwara, F. (1996). "Cytochrome *cb*-type nitric oxide reductase with cytochrome *c* oxidase activity from *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512." J. Bacteriol. **178**: 1866-1871.
- Garcia-Horsman, J., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. and Gennis, R. (1994). "The superfamily of heme-copper respiratory oxidases." J. Bacteriol. **176**(18): 5587-5600.
- Georgiadis, K. E., Jhon, N. I. and Einarsdottir, O. (1994). "Time-resolved optical absorption studies of intramolecular electron transfer in cytochrome *c* oxidase." Biochemistry **33**(31): 9245-9256.
- Gibson, Q. H. and Greenwood, C. (1963). "Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide." Biochem J. **86**: 541-554.
- Giuffrè, A., Barone, M., Mastronicola, D. D'Itri, E., Sarti, P. and Brunori, M. (2000). "Reaction of nitric oxide with the turnover intermediates of cytochrome *c* oxidase: reaction pathway and functional effects." Biochemistry **39**(50): 15446-15453.
- Giuffrè, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T. and Buse, G. (1999). "Kinetic Properties of *ba*₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*: Effect of Temperature." Biochemistry **38**: 1057-1065.
- Giuffrè, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T. and Brunori, M. (1996). "On the Mechanism of Inhibition of Cytochrome *c* Oxidase by Nitric Oxide." J. Biol. Chem. **271**(52): 33404-33408.

- Giuffrè, A., Stubauer, G., Sarti, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G. and Soulimane, T. (1999). "The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: Evolutionary implications." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**(26): 14718-14723.
- Goldbeck, R. A., Einarsdottir, O., Dawes, T. D., O'Connor, D. B., Surerus, K. K., Fee, J. A. and Kliger, D. S. (1992). "Magnetic circular dichroism study of cytochrome *ba*₃ from *Thermus thermophilus*: spectral contributions from cytochromes *b* and *a*₃ and nanosecond spectroscopy of carbon monoxide photodissociation intermediates." Biochemistry **31**: 9376-9387.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. (1999). "Mitochondrial evolution." Science **283**(5407): 1476-1481.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (2001). "The origin and early evolution of mitochondria." Genome Biol **2**(6).
- Haddock, B. A. and Jones, C. W. (1977). "Bacterial respiration." Bacteriol Rev **41**(1): 47-99.
- Haltia, T., Finel, M., Harms, N., Nakari, T., Raitio, M., Wikstrom, M. and Saraste, M. (1999). "Deletion of the gene for subunit III leads to defective assembly of bacterial cytochrome oxidase." EMBO J. **8**(12): 3571-3579.
- Haltia, T., Puustinen, A. and Finel, M. (1988). "The *Paracoccus denitrificans* cytochrome *aa*₃ has a third subunit." Eur J Biochem **172**(3): 543-546.
- Hansford, R. (2000). "Oxidative Phosphorylation". Nature Encyclopedia of Life Sciences. NPG.
- Harrenga, A. and Michel, H. (1999). "The Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans* Does Not Change the Metal Center Ligation upon Reduction." J. Biol. Chem. **274**(47): 33296-33299.
- Hendler, R. W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B. and Ludwig, B. (1991). "Comparison Of Energy-Transducing Capabilities Of The 2-Subunit And 3-Subunit Cytochromes *aa*₃ from *Paracoccus denitrificans* And The 13-Subunit Beef-Heart Enzyme." Biophysical Journal **60**(2): 415-423.
- Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S. and Saraste, M. (2000). "Nitric oxide reductases in bacteria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1459**(2-3): 266-273.
- Hibbs, J. B. J., Vavrin, Z. and Taintor, R. R. (1987). "L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells." J Immunol. **138**(2): 550-565.
- Hori, H., Ikeda-Saito, M. and Yonetani, T. (1981). "Single crystal EPR of myoglobin nitroxide. Freezing-induced reversible changes in the molecular orientation of the ligand." J. Biol. Chem. **256**(15): 7849-7855.
- Hunter, D. J. B., Salerno, J. C. and Ingledew, W. J. (1998). "Angular dependence of electron paramagnetic resonances of an azide-NO complex of cytochrome *c* oxidase: orientation of the haem-copper axis in cytochrome *aa*₃ from ox heart." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1364**(1): 55.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H. (1995). "Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Nature **376**: 660 - 669.
- Jones, C. W. and Poole, R. K. (1985). "Analysis of Cytochromes". Methodes of microbiology.
- Kadenbach, B. and Arnold, S. (1999). "A second mechanism of respiratory control." FEBS Lett.

- 447(2-3): 131-134.
- Kadenbach, B., Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I. and Bender, E. (2000). "Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome *c* oxidase1." Free Radical Biology and Medicine **29**(3-4): 211-221.
- Kanai, A., Epperly, M., Pearce, L., Birder, L., Zeidel, M., Meyers, S., Greenberger, J., de Groat, W., Apodaca, G. and Peterson, J. (2004). "Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(1): H13-21.
- Karadimas, C. L., Greenstein, P., Sue, C. M., Joseph, J. T., Tanji, K., Haller, R. G., Taivassalo, T., Davidson, M. M., Shanske, S., Bonilla, E. and DiMauro, S. (2000). "Recurrent myoglobinuria due to a nonsense mutation in the COX I gene of mitochondrial DNA." Neurology **55**(5): 644-649.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad, F. (1977). "Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine." J Cyclic Nucleotide Res **3**(1): 23-35.
- Kon, H. and Kataoba, N. (1969). "Electron paramagnetic resonance of nitric oxide-protoheme complexes with some nitrogenous base. Model systems of nitric oxide hemoproteins." Biochemistry **8**(12): 4757-4762.
- Kotlyar, A. B. and Vinogradov, A. D. (1990). "Slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1019**(2): 151-158.
- Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T. and Varotsis, C. (2002). "Observation of the Equilibrium Cu_B-CO Complex and Functional Implications of the Transient Heme *a*₃ Propionates in Cytochrome *ba*₃-CO from *Thermus thermophilus*. FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) AND TIME-RESOLVED STEP-SCAN FTIR STUDIES." J. Biol. Chem. **277**(36): 32860-32866.
- Laemmli (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.
- Lambry, J.-C., Vos, M. and Martin, J.-L. (1999). "Molecular dynamics simulations of carbon monoxide dissociation from heme *a*₃ in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*." J. Phys. Chem. B **103**: 10132-10137.
- Lancaster, C. R. D. (2003). "*Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase and its comparison to *E. coli* succinate:quinone reductase." FEBS Lett. **555**(1): 21-28.
- Liao, G.-L. and Palmer, G. (1996). "The reduced minus oxidized difference spectra of cytochromes *a* and *a*₃." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1274**(3): 109-111.
- Liebl, U., Lipowski, G., Negrerie, M., Lambry, J.-C., Martin, J.-L. and Vos, M. (1999). "Coherent reaction dynamics in cytochrome *c* oxidase." Nature **401**(6749): 181-184.
- Lipowski, G. (2003). Etudes fonctionnelles de deux enzymes bactériennes: cytochrome *c* oxydase *cbb*₃ et nouvelle thymidylate synthase ThyX, Ecole Polytechnique.
- Ludwig, B. (1986). "Cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Methodes of Enzymology.
- Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I. and Kadenbach, B. (2001).

- "Cytochrome *c* Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation." Chembiochem **2**(6): 392-403.
- Ludwig, B. and Schatz, G. (1980). "A two-subunit cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa*₃) from *Paracoccus denitrificans*." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**(1): 196-200.
- Marcus, R. A. and Sutin, N. (1985). "Electron transfers in chemistry and biology." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **811**(3): 265.
- Margulis, L. (1970). "Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts?" J. Theor. Biol. **26**(2): 337-342.
- Margulis, L. and Bermudes, D. (1985). "Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory." Symbiosis **1**(101-124).
- Marletta, M. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." Cell **78**(6): 927-930.
- Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D. and Wishnok, J. S. (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate." Biochemistry **27**(24): 8706-8711.
- Martin, J.-L., Migus, A., Poyart, C., Lecarpentier, Y., Astier, R. and Antonetti, A. (1983). "Femtosecond photolysis of CO-ligated protoheme and hemoproteins: Appearance of deoxy species with a 350-fsec time constant." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**: 173-177.
- Martin, J.-L. and Vos, M. (1994). "Femtosecond measurements of geminate recombination in heme proteins." Methodes of Enzymology **232**: 416-430.
- Medvedev, D. M., Daizadeh, I. and Stuchebrukhov, A. A. (2000). "Electron Transfer Tunneling Pathways in Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase." J. Am. Chem. Soc. **122**(28): 6571-6582.
- Michel, H. (1998). "The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* oxidase." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**(22): 12819-12824.
- Milatovic, D., Zivin, M., Gupta, R. C. and Dettbarn, W.-D. (2001). "Alterations in cytochrome *c* oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus." Brain Research **912**(1): 67-78.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.
- Moncada, S. and Erusalimsky, J. D. (2002). "Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?" Nature Rev. Mol. Cell Biol. **3**: 214 -220.
- Moncada, S. and Higgs, A. (2001). "Nitric Oxide: Role in human disease". Nature Encyclopedia of Life Sciences. NPG.
- Najjar, V. A. and Allen, M. B. (1954). "Formation of nitrogen, nitrous oxide, and nitric oxide by extracts of denitrifying bacteria." J. Biol. Chem. **206**(1): 209-214.
- Namslauer, A., Brändén, M. and Brzezinski, P. (2002). "The Rate of Internal Heme-Heme Electron Transfer in Cytochrome *c* Oxidase." Biochemistry **41**: 10369-10374.
- Napiwotzki, J. and Kadenbach, B. (1998). "Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome *c* oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV." Biol. Chem. **379**(3): 335-339.
- Napiwotzki, J., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. and Kadenbach, B. (1997). "ATP and ADP bind to cytochrome *c* oxidase and regulate its activity." Biol Chem **378**(9): 1013-1021.

- Nicholls, P. (2001). The Extinction Coefficients for Cytochrome *aa*₃ and their Consequences., <http://www-bioc.rice.edu/~graham/Nicholls.pdf>.
- Oliveberg, M. and Malmstrom, B. G. (1991). "Internal electron transfer in cytochrome *c* oxidase: evidence for a rapid equilibrium between cytochrome *a* and the bimetallic site." Biochemistry **30**(29): 7053-7057.
- Orrenius, S. (2004). "Mitochondrial regulation of apoptotic cell death." Toxicology Letters **149**(1-3): 19-23.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U. and Michel, H. (1997). "Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody FV fragment." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**(20): 10547-10553.
- Otten, M. F., Stork, D. M., Reijnders, W. N. M., Westerhoff, H. V. and Van Spanning, R. J. M. (2001). "Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*." Eur J Biochem **268**(8): 2486-2497.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. and Dutton, P. L. (1999). "Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction." Nature **402**: 47-52.
- Page, C. C., Moser, C. C. and Dutton, P. L. (2003). "mechanism for electron transfer within and between proteins." Curr Opin Chem Biol **7**(5): 551-556.
- Pearce, L. L., Bominaar, E. L., Hill, B. C. and Peterson, J. (2003). "Reversal of Cyanide Inhibition of Cytochrome *c* Oxidase by the Auxiliary Substrate Nitric Oxide: AN ENDOGENOUS ANTIDOTE TO CYANIDE POISONING?" J. Biol. Chem. **278**(52): 52139-52145.
- Pereira, M. M., Santana, M. and Teixeira, M. (2001). "A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1505**(2-3): 185-208.
- Petrich, J. W., Poyart, C. and Martin, J.-L. (1988). "Photophysics and reactivity of heme proteins: a femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin and protoheme." Biochemistry **27**: 4049-4060.
- Pfzner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O. and Ludwig, B. (2000). "Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Biochemistry **39**(23): 6756-6762.
- Pfzner, U., Kirichenko, A., Konstantinov, A. A., Mertens, M., Wittershagen, A., Kolbesen, B. O., Steffens, G. C. M., Harrenga, A., Michel, H. and Ludwig, B. (1999). "Mutations in the Ca²⁺ binding site of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase." FEBS Lett. **456**(3): 365-369.
- Pilet, E., Nitschke, W., Rappaport, F., Soulimane, T., Lambry, J., Liebl, U. and Vos, M. H. (2004). "NO binding and dynamics in reduced heme-copper oxidases *aa*₃ from *Paracoccus denitrificans* and *ba*₃ from *Thermus thermophilus*." Biochemistry **43**(46): 14118-14127.
- Pinakoulaki, E., Pfzner, U., Ludwig, B. and Varotsis, C. (2002). "The Role of the Cross-link His-Tyr in the Functional Properties of the Binuclear Center in Cytochrome *c* Oxidase." J. Biol. Chem. **277**(16): 13563-13568.
- Preisig, O., Anthamatten, D. and Hennecke, H. (1993). "Genes for a Microaerobically Induced Oxidase Complex in *Bradyrhizobium japonicum* are Essential for a Nitrogen-Fixing Endosymbiosis." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**(8): 3309-3313.

- Proshlyakov, D. A. (2004). "UV optical absorption by protein radicals in cytochrome *c* oxidase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1655**: 282-289.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A. and Babcock, G. T. (1998). "Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**(14): 8020-8025.
- Racker (1977). "Mechanisms of energy transformations." Annual Review of Biochemistry **46**: 1006-1014.
- Raman, C., Li, H., Martasek, P., Kral, V., Masters, B. 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.
- Regan, J. J., Ramirez, B. E., Winkler, J. R., Gray, H. B. and Malmstrom, B. G. (1998). "Pathways for Electron Tunneling in Cytochrome *c* Oxidase." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **30**(1): 35.
- Rich, P., Rigby, S. and Heathcote, P. (2002). "Radicals associated with the catalytic intermediates of bovine cytochrome *c* oxidase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1554**(3): 137-146.
- Richter, O. and Ludwig, B. (2003). "Cytochrome *c* oxidase--structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine." Rev Physiol Biochem Pharmacol **147**: 47.
- Richter, O., Tao, J., Turba, A. and Ludwig, B. (1994). "A cytochrome *ba3* functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison." J. Biol. Chem. **269**(37): 23079-23086.
- Rieske, J. S., MacLennan, D. H. and Coleman, R. (1964). Biochemical and Biophysical Research Communications **15**: 338-344.
- Riistama, S., Puustinen, A., Garcia-Horsman, A., Iwata, S., Michel, H. and Wikstrom, M. (1996). "Channelling of dioxygen into the respiratory enzyme." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1275**(1-2): 1-4.
- Riistama, S., Puustinen, A., Verkhovskiy, M., Morgan, J. and Wikstrom, M. (2000). "Binding of O₂ and its reduction are both retarded by replacement of valine 279 by isoleucine in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Biochemistry **39**(21): 6365-6372.
- Ruggiero, C. E., Carrier, S. M., Antholine, W. E., Whittaker, J. W., Cramer, C. J. and Tolman, W. B. (1993). "Synthesis and Structural and Spectroscopic Characterization of Mononuclear Copper Nitrosyl Complexes: Models for Nitric Oxide Adducts of Copper Proteins and Copper-Exchanged Zeolites." J. Am. Chem. Soc. **115**(24): 11285-11298.
- Sabbert, D., Engelbrecht, S. and Junge, W. (1996). "Intersubunit rotation in active F-ATPase." Nature **381**(6583): 623-625.
- Saraste, M. (1994). "Structure and evolution of cytochrome oxidase." Antonie Van Leeuwenhoek **65**(4): 285-287.
- Saraste, M., Holm, L., Lemieux, L., Lubben, M. and Van der Oost, J. (1991). "The happy family of cytochrome oxidases." Biochem Soc Trans **19**(3): 608-612.
- Sayle, R. A. and Milner-White, E. J. (1995). "RASMOL: biomolecular graphics for all." Trends in Biochemical Sciences **20**(9): 374.
- Schagger, H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1555**(1-3): 154-159.

- Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." EMBO J. **19**(8): 1777-1783.
- Scheidt, W. R. and Ellison, M. K. (1999). "The Synthetic and Structural Chemistry of Heme Derivatives with Nitric Oxide Ligands." Acc. Chem. Res. **32**(4): 350 -359.
- Schmidt, B., McCracken, J. and Ferguson-Miller, S. (2003). "A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome *c* oxidase." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **100**(26): 15539-15542.
- Schonhoff, C. M., Gaston, B. and Mannick, J. B. (2003). "Nitrosylation of Cytochrome *c* during Apoptosis." J. Biol. Chem. **278**(20): 18265-18270.
- Schweizer, M. and Richter, C. (1994). "Nitric Oxide Potently and Reversibly Deenergizes Mitochondria at Low Oxygen Tension." Biochemical and Biophysical Research Communications **204**(1): 169-175.
- Seelig, A., Ludwig, B., Seelig, J. and Schatz, G. (1981). "Copper and manganese electron spin resonance studies of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **636**(2): 162-167.
- Shoji, K., Giuffrè, A., D'Itrib, E., Hagiwaraa, K., Yamanakaa, T., Brunori, M. and Sarti, B. (2000). "The ratio between the fast and slow forms of bovine cytochrome *c* oxidase is changed by cholate or nucleotides bound to the cholate-binding site close to the cytochrome a_3 :Cu_B binuclear centre." Cell. Mol. Life Sci. **57**: 1482-1487.
- Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. and Than, M. E. (2000). "Structure and mechanism of the aberrant ba_3 -cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*." EMBO J. **19**(8): 1766-1776.
- Soulimane, T., Gohlke, U., Huber, R. and Buse, G. (1995). "Three-dimensional crystals of cytochrome-*c* oxidase from *Thermus thermophilus* diffracting to 3.8 Å resolution." FEBS Lett. **368**(1): 132-134.
- Stevens, T. H., Bocian, D. F. and Chan, S. I. (1979). "EPR studies of ¹⁵NO-ferrocyanide a_3 in cytochrome *c* oxidase." FEBS Lett. **97**(2): 314.
- Stevens, T. H. and Chan, S. I. (1981). "Histidine is the axial ligand to cytochrome alpha 3 in cytochrome *c* oxidase." J. Biol. Chem. **256**(3): 1069.
- Stouthamer, A. H., Boogerd, F. C. and Van Verseveld, H. W. (1982). "The bioenergetics of denitrification." Antonie Van Leeuwenhoek **48**(6): 545-553.
- Stoutland, P. O., Lambry, J.-C., Martin, J.-L. and Woodruff, W. H. (1991). "Femtosecond dynamics of reduced cytochrome oxidase and its CO derivative." J. Phys. Chem. **95**(17): 6406 - 6408.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. and Schagger, H. (2004). "Assembly of Respiratory Complexes I, III, and IV into NADH Oxidase Supercomplex Stabilizes Complex I in *Paracoccus denitrificans*." J. Biol. Chem. **279**(6): 5000-5007.
- Stubauer, G., Giuffrè, A., Brunori, M. and Sarti, P. (1998). "Cytochrome *c* Oxidase Does Not Catalyze the Anaerobic Reduction of NO." Biochemical and Biophysical Research Communications **245**(2): 459-465.
- Studier, F., Rosenberg, A., Dunn, J. and Dubendorff, J. W. (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." Methodes of Enzymology **185**: 60-89.
- Susswein, A., Katzoff, A., Miller, N. and Hurwitz, I. (2004). "Nitric oxide and memory." Neuroscientist **10**(2): 153-162.

- Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P. and Iwata, S. (2002). "The X-ray Crystal Structures of Wild-type and EQ(I-286) Mutant Cytochrome *c* Oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*." Journal of Molecular Biology **321**(2): 329-339.
- Szundi, I., Cappuccio, J., Borovok, N., Kotlyar, A. and Einarsdottir, O. (2001). "Photoinduced electron transfer in the cytochrome *c*/cytochrome *c* oxidase complex using thiouredopyrenetrisulfonate-labeled cytochrome *c*. Optical multichannel detection." Biochemistry **40**(7): 2186.
- Tan, M. L., Balabin, I. and Onuchic, J. N. (2004). "Dynamics of electron transfer pathways in cytochrome C oxidase." Biophys J **86**(3): 1813-1819.
- Thomas, J. W., Puustinen, A., Alben, J. O., Gennis, R. B. and Wikstrom, M. (1993). "Substitution of asparagine for aspartate-135 in subunit I of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* eliminates proton-pumping activity." Biochemistry **32**(40): 10923-10928.
- Thomas, P. E., Ryan, D. and Levin, W. (1976). "An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels." Anal Biochem **75**(1): 168-176.
- Torres, J., Sharpe, M., Rosquist, A., Cooper, C. and Wilson, M. (2000). "Cytochrome *c* oxidase rapidly metabolises nitric oxide to nitrite." FEBS Lett. **475**(3): 263-266.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995). "Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å." Science **269**(5227): 1069-1074.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å." Science **272**(5265): 1136-1144.
- Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004). "Metabolism and function of coenzyme Q." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1660**(1-2): 171-199.
- Tzagoloff, A., Yang, P. C., Wharton, D. C. and Rieske, J. S. (1965). "Studies on the electron-transfer system LX. Molecular weights of some components of the electron transfer chain in beef-heart mitochondria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis **96**(1): 1.
- Van Buuren, K. (1972). Binding of cyanide to cytochrome *aa₃*, University of Amsterdam.
- Van Verseveld, H., Meijer, E. and Stouthamer, A. (1977). "Energy conservation during nitrate respiration in *Paracoccus denitrificans*." Arch Microbiol **112**(2): 17-23.
- Vanneste, W. (1966). "The stoichiometry and absorption spectra of components *a* and *a₃* in cytochrome *c* oxidase." Biochemistry **5**(3): 838-848.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. and Martasek, P. (2003). "The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications." Free Radic Res. **37**(12-127).
- Verkhovsky, M., Morgan, J. and Wikstrom, M. (1992). "Intramolecular electron transfer in cytochrome *c* oxidase: a cascade of equilibria." Biochemistry **31**(47): 11860-11863.
- Verkhovsky, M., Tuukkanen, A., Backgren, C., Puustinen, A. and Wikstrom, M. (2001). "Charge translocation coupled to electron injection into oxidized cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Biochemistry **40**(24): 7077-7083.

- Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A. and Wikstrom, M. (2001). "Ultrafast haem-haem electron transfer in cytochrome *c* oxidase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1506**(3): 143-146.
- Vinogradov, A. and Grivennikova, V. (2001). "The mitochondrial complex I: progress in understanding of catalytic properties." IUBMB Life **52**(3-5): 129-134.
- Vos, M. H., Lipowski, G., Lambry, J.-C., Martin, J.-L. and Liebl, U. (2001). "Dynamics of nitric oxide in the active site of reduced cytochrome *c* oxidase *aa₃*." Biochemistry **40**: 7806-7811.
- Vos, M. H. and Martin, J.-L. (1999). "Femtosecond processes in proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1411**(1): 1-20.
- Wainio, W. W. (1955). "Reactions of Cytochrome Oxidase." J. Biol. Chem. **212**(2): 723-734.
- Wikstrom, M. (2000). "Mechanism of proton translocation by cytochrome *c* oxidase: a new four-stroke histidine cycle1." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1458**(1): 188-198.
- Wikstrom, M. (2004). "Cytochrome *c* oxidase: 25 years of the elusive proton pump." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1655**: 241-247.
- Wikstrom, M., Morgan, J. and Verkhovsky, M. (1998). "On the mechanism of proton translocation by respiratory enzyme." J Bioenerg Biomembr. **30**(1): 139-145.
- Wikstrom, M. and Verkhovsky, M. I. (2002). "Proton translocation by cytochrome *c* oxidase in different phases of the catalytic cycle." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1555**(1-3): 128-132.
- Wilson, D. F., Mokashi, A., Chugh, D., Vinogradov, S., Osanai, S. and Lahiri, S. (1994). "The primary oxygen sensor of the cat carotid body is cytochrome *a₃* of the mitochondrial respiratory chain." FEBS Lett. **351**(3): 370.
- Woese, C. (1987). "Bacterial evolution." Microbiol Rev **51**(2): 221.
- Yakushiji, O. (1941). Proc. Imp. Acad. Japan **17**: 38-40.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J. and Woese, C. R. (1985). "Mitochondrial origins." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**(13): 4443.
- Yonetani, T. (1960). "Studies on cytochrome oxidase. I. Absolute and difference absorption spectra." J. Biol. Chem. **235**(3): 845.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. and Tsukihara, T. (1998). "Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase." Science **280**(5370): 1723-1729.
- Zhao, X. J., Sampath, V. and Caughey, W. S. (1994). "Infrared Characterization of Nitric Oxide Bonding to Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase and Myoglobin." Biochemical and Biophysical Research Communications **204**(2): 537-543.
- Zheng, X., Medvedev, D. M., Swanson, J. and Stuchebrukhov, A. A. (2003). "Computer simulation of water in cytochrome *c* oxidase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1557**: 99.
- Zumft, W. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**(4): 533-616.

6.3 Articles

14118

Biochemistry 2004, 43, 14118–14127

NO Binding and Dynamics in Reduced Heme–Copper Oxidases *aa*₃ from *Paracoccus denitrificans* and *ba*₃ from *Thermus thermophilus*[†]

Eric Pilet,[‡] Wolfgang Nitschke,[§] Fabrice Rappaport,^{||} Tewfik Soulimane,[‡] Jean-Christophe Lambry,[‡] Ursula Liebl,[‡] and Marten H. Vos^{*‡}

Laboratory for Optical Biosciences, INSERM U451, CNRS UMR 7645, Ecole Polytechnique-ENSTA, 91128 Palaiseau Cedex, France, Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines UPR 9036, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31, Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, Cedex 20, France, Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS UPR 1261, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France, and Paul Scherrer Institute, Life Sciences, OSRA/008, CH-5232 Villigen PSI, Switzerland

Received June 1, 2004; Revised Manuscript Received July 30, 2004

ABSTRACT: Cytochrome *c* oxidase (CcO) has a high affinity for nitric oxide (NO), a property involved in the regulation of respiration. It has been shown that the recombination kinetics of photolyzed NO with reduced CcO from *Paracoccus denitrificans* on the picosecond time scale depend strongly on the NO/enzyme stoichiometry and inferred that more than one NO can be accommodated by the active site, already at mildly supraprostoichiometric NO concentrations. We have largely extended these studies by monitoring rebinding dynamics from the picosecond to the microsecond time scale, by performing parallel steady-state low-temperature electron paramagnetic resonance (EPR) characterizations on samples prepared similarly as for the optical experiments and comparing them with molecular-modeling results. A comparative study was performed on CcO *ba*₃ from *Thermus thermophilus*, where two NO molecules cannot be copresent in the active site in the steady state because of its NO reductase activity. The kinetic results allow discrimination between different models of NO-dependent recombination and show that the overall NO escape probability out of the protein is high when only one NO is bound to CcO *aa*₃, whereas strong rebinding on the 15-ns time scale was observed for CcO *ba*₃. The EPR characterizations show similar results for *aa*₃ at substoichiometric NO/enzyme ratios and for *ba*₃, indicating formation of a 6-coordinate heme–NO complex. The presence of a second NO molecule in the *aa*₃ active site strongly modifies the heme–NO EPR spectrum and can be rationalized by a rotation of the Fe–N–O plane with respect to the histidine that coordinates the heme iron. This proposal is supported by molecular-modeling studies that indicate a ~63° rotation of heme-bound NO upon binding of a second NO to the close-lying copper center CuB. It is argued that the second NO binds to CuB.

The signaling molecule nitric oxide (NO) is involved in the regulation of numerous biochemical processes, including cellular respiration (1–3). This regulation of respiration takes place by interactions between NO and cytochrome *c* oxidase (CcO).¹ One way in which this occurs is via competitive binding of NO at the oxygen binding and reduction site of fully reduced cytochrome oxidase (1, 4).

The CcO active site comprises two cofactors, heme *a*₃ and a nearby copper atom, CuB. Both are able to bind external ligands; the substrate O₂ of the enzyme presumably intermediately binds to reduced CuB on its way to heme *a*₃ (5), where it remains bound during the four-electron reduction reaction. Other diatomic inhibitor ligands such as cyanide (CN), carbon monoxide (CO), and NO can also bind to heme

*a*₃. For CO, a doorstep role of CuB has been established, where CO resides for microseconds during transfer both in to and out of the active site (6). For NO, such a role for CuB is less certain and at least any intermediately formed CuB⁺–NO is much shorter lived, as inferred from the binding kinetics to heme *a*₃, which do not appear to saturate with the NO concentration, and from the nanosecond geminate recombination observed after dissociation of NO (5). On the other hand, it is possible that two NO molecules are accommodated by the active site (1). This has been reported in steady-state electron paramagnetic resonance (EPR) (7) and Fourier transform infrared (FTIR) studies (8) under high NO concentrations; by contrast, NO uptake experiments at low concentrations indicate stoichiometric uptake of NO on the time scale of ~1 min (9, 10). Generally, the (temporal) copresence of two NO molecules in the reduced active site is required for any NO reductase activity (2NO + 2e⁻ + 2H⁺ → N₂O + H₂O). Such an activity has been observed in a number of heme–copper oxidases, in degrees varying from as much as ~1% of that of heme–iron NO reductases in terminal oxidases from *Thermus thermophilus* (10) to virtually 0% in mitochondrial cytochrome *c* oxidase (7, 11).

[†] This work was supported by the CNRS program “Physique et Chimie du Vivant”.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33-1-69334777. Fax: +33-3-69333017. E-mail: marten.vos@polytechnique.fr.

[‡] Ecole Polytechnique-ENSTA.

[§] Institut de Biologie Structurale et Microbiologie.

^{||} Institut de Biologie Physico-Chimique.

[‡] Paul Scherrer Institute.

¹ Abbreviations: CcO, cytochrome *c* oxidase; EPR, electron paramagnetic resonance; FTIR, Fourier transform infrared.

NO can be photodissociated from reduced hemes in heme proteins with near unity quantum yield (12). Using this property, we have reported a pronounced effect of the NO/enzyme stoichiometry on the picosecond NO-rebinding kinetics after dissociation from reduced CcO aa_3 from *Paracoccus denitrificans* (13), an effect which we ascribed to the presence of two NO molecules in the active site at higher NO concentrations. One NO molecule binds to heme a_3 , but the second NO binding site was not clearly identified. Also the limited time span of these dynamics prohibited until now to discriminate between models of NO-NO interaction during dissociation. With the aim to resolve these issues and to gain insight in the factors determining the reactive behavior of reduced oxidases with NO, we undertook the present study of the NO-rebinding kinetics in this bacterial enzyme, extended from picoseconds to the nanosecond and millisecond time scales, as well as an EPR characterization of the initial states under various NO/enzyme stoichiometries. A comparison is made with CcO ba_3 from *T. thermophilus* (14), where substantial NO-reductase (10) activity precludes the long-lived presence of two NO molecules.

MATERIALS AND METHODS

CcO aa_3 from wild-type *P. denitrificans* was purified as described (15) from cells grown at low manganese concentrations (16). CcO ba_3 from *T. thermophilus* was purified as described by Soulimane et al. (17).

The enzyme concentrations used were ~ 15 and ~ 35 μM for the nanosecond and femtosecond optical experiments, respectively, and ~ 50 μM for the EPR experiments. The samples were extensively degassed in a gastight vial using a home-built stainless steel gas train and reduced using 10 mM sodium ascorbate and 10 μM (aa_3 from *P. denitrificans*) or 100 μM (ba_3 from *T. thermophilus*) ruthenium hexamine. The samples (80–150 μL for the optical experiments and 250 μL for the EPR experiments) were transferred into a degassed gastight optical cell (Hellma, 117.007 QS, optical path length of 1 mm) or EPR tube, sealed with a rubber septum. The indicated stoichiometries refer to the ratios of absolute amounts of NO and enzyme (in nanomoles) present in the sample cell. Additions of defined volumes of 1% NO gas (in argon) were performed using airtight microliter syringes. The samples were equilibrated for 10 min at room temperature prior to measurements. Using this method, because of equilibration between the headspace and the liquid phase of the cell, for CcO aa_3 , only partial NO binding occurs for low NO/protein stoichiometries (13). For relatively low protein concentrations, as used in the experiments with the nanosecond spectrometer (see below), higher NO/protein stoichiometries were needed to obtain complete binding. Therefore, the absolute stoichiometries used in different experimental conditions cannot be directly compared. For CcO ba_3 , these effects are not observed (see the Results).

Steady-state absorption spectra were recorded using a Shimadzu 1601 UV-vis spectrophotometer.

Femtosecond spectroscopy using 55-fs pump pulses centered at 590 nm and white-light continuum probe pulses was performed as described elsewhere (12, 13). Previous measurements were limited to ~ 300 ps. In the present experiments, an additional 1-m delay line was implemented and delays up to several nanoseconds could be recorded.

Absorption changes on the time scale beyond 5 ns were recorded using a home-built nanosecond spectrophotometer described in ref 18. The exciting flash was provided by a dye laser [595 nm, 5-ns full width at half-maximum (fwhm)] pumped by the second harmonic of a Nd/Yag laser. The absorption changes were probed at discrete wavelengths and delay times after the exciting flash by flashes provided by an optical parametric oscillator pumped by the third harmonic of a Nd/Yag laser (5-ns fwhm). All optical experiments were performed at room temperature.

EPR spectra were taken on a Bruker ElexSys X-band spectrometer fitted with an Oxford Instrument liquid helium cryostat and temperature control system. The redox and ligation state of the sample in the EPR tube was monitored spectrophotometrically immediately before freezing by placing the tube at the entrance slit of a Spectralon integrating sphere connected to a Kontron Uvikon 922 UV-vis spectrophotometer. The $g = 4$ spectral species was quantified by comparison to the spectrum induced by nitrosylating 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* (19).

Molecular modeling of the NO-bound structures of the active site of CcO aa_3 from *P. denitrificans* was performed starting from previously generated energy-minimized structures (13). To avoid trapping of these structures in local minima, molecular dynamics simulations with an integration time of 1 fs were performed on these structures and the temperature was raised to 300 K in steps of 10 K, with an equilibration time of 1 ps at each temperature. After at least 30 ps of equilibration at 300 K, the temperature was decreased to 20 K in a similar way, and finally, the model structures were obtained by energy minimization. Minimized structures generated in this way after different equilibration times at 300 K (and thus from different room temperature structures) were virtually identical. The molecular dynamics and energy minimizations were performed using version 27 of CHARMM (20).

RESULTS

Steady-State Spectra. The steady-state spectra of fully reduced and NO-ligated forms of aa_3 and ba_3 are shown in Figure 1. The aa_3 spectra are similar to those previously described; (13) binding of NO to heme a_3 leads to a blue shift of the a_3 absorption bands, for the Soret band clearly out of the ~ 444 -nm region, where it strongly overlaps with the a absorption band. The shape of the NO-binding-induced difference spectrum was independent of the amount of NO added.

For ba_3 , the fully reduced spectrum shows well-separated Soret bands from hemes b (427 nm) and a_3 (444 nm), as reported previously (21, 22). The NO-ligated spectrum shows a single Soret peak at 427 nm. In the Q region, the b band at 558 nm does not change and the a_3 band shifts from ~ 612 to 600 nm. The NO-bound *mimus* unligated difference spectrum is similar for both enzymes.

Although they contain the same cofactors (heme a_3 and CuB), the interaction and reactivity of the active-site constituents have markedly distinct features in the ba_3 oxidase from *T. thermophilus* as compared to mammalian and bacterial aa_3 oxidases (23). In particular, binding of CO to this enzyme leads to formation of only 70% of the heme

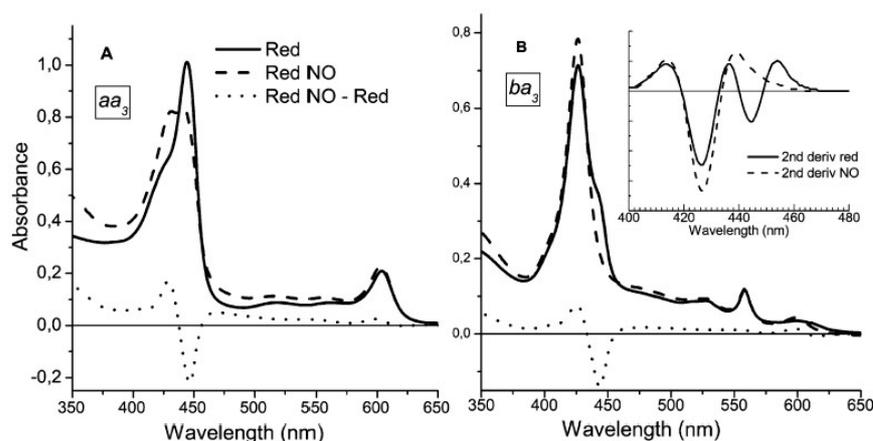


FIGURE 1: Steady-state spectra of fully reduced CcO in the unligated state (—) and after equilibration with excess NO (---). The dotted lines represent the difference between NO ligated and unligated. (A) CcO aa_3 from *P. denitrificans* at 45 μM . (B) CcO ba_3 from *T. thermophilus* at 30 μM . (Inset) Second derivative of the Soret region of the absorption spectra of CcO ba_3 .

a_3 -CO complex (21, 24), with the remaining 30% forming a CuB-CO complex (25). To estimate the extent of NO binding to heme a_3 , the inset of Figure 1B shows the second derivative of the Soret spectra of the unligated and NO-bound forms. In the spectrum of the unligated form, the a_3 shoulder at 444 nm in the absorption band gives rise to a marked second derivative feature. This feature is not observed in the NO-bound form, and, by analysis in comparison with the CO second-derivative spectra (21), we estimate that NO-binding occurs for more than 97%. This finding is consistent with the observation that NO complements ligand binding to heme a_3 in the fraction of CO-equilibrated enzymes that does not form the heme a_3 -CO complex (24).

We observed that upon addition of stoichiometric amounts of NO to reduced ba_3 the a_3 -NO complex is rapidly and stably formed for virtually 100%. This behavior, which contrasts with that of the aa_3 enzyme (see the Materials and Methods and ref 13), is consistent with the proposed high affinity for NO of heme a_3 in CcO ba_3 (10). It also implies that under these conditions NO is not consumed by NO-reductase activity of the enzyme and that all active sites accommodate 1 NO molecule.

Picosecond NO Rebinding to CcO aa_3 from *P. denitrificans*. Previous transient absorption experiments on geminate rebinding of NO with CcO demonstrated a ~ 200 -300-ps decay component, which was more pronounced at higher NO concentrations (13). These experiments were performed with a time window up to 300 ps (corresponding to a variation of 9 cm in the path length between the pump and probe pulse). Therefore, they did not allow accurate determination of the asymptote of the kinetics and discrimination between an effect of NO concentration on the time constant and on the amplitude of this decay phase. We have now performed such experiments with an extended delay line and a time window up to 2 ns (Figure 2A). The shape of the transient spectra between ~ 30 ps and 2 ns does not change and corresponds to the steady-state unligated *minus* NO-ligated spectrum. The shape of the transient spectra is also independent of the NO/enzyme stoichiometry (Figure 2B). The amplitude of the transient spectra decays on the subnanosecond time scale and remains constant beyond 1 ns. The kinetics at all NO/enzyme stoichiometries can be fitted with

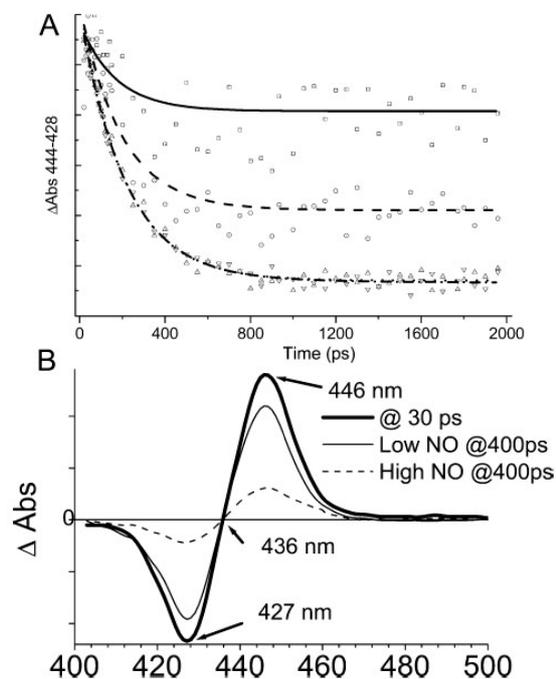


FIGURE 2: (A) Normalized kinetics of geminate recombination of NO and heme a_3 after photodissociation as a function of the NO/CcO ratio in CcO aa_3 from *P. denitrificans*. Open squares stand for the NO/CcO ratio of 1:1; open circles, for 3:1; up triangles, for 10:1; and down triangles, for 130:1. The lines are fits to a 200-ps monoexponential decay and an asymptotic value. (B) Transient spectra of aa_3 -NO at $t = 30$ and 400 ps for NO/CcO ratios of 130:1 (···) and 1:1 (—). The traces are normalized at $t = 30$ ps.

an exponential decay with the same time constant of 200 ps and an asymptotic term. The relative amplitude of the decay component depends on the NO concentration and varies from less than 30% for a NO/protein stoichiometry of 1:1 to 90% for 10:1 or more. Thus, we conclude that the NO concentration influences the relative amplitude rather than the time constant of the decay phase. This indicates that a higher NO/enzyme ratio does not speed up NO recombination (by direct competition between the dissociated NO molecule and

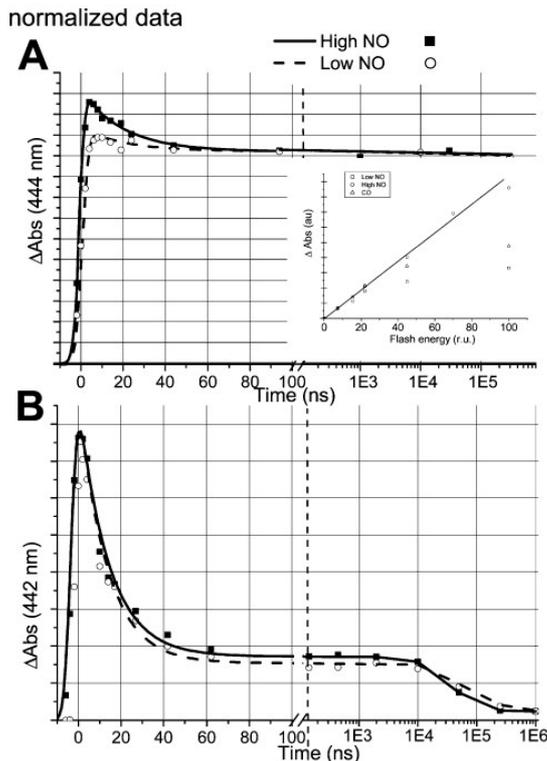


FIGURE 3: Normalized nano- to microsecond kinetics of recombination of NO to heme a_3 after photodissociation as a function of the NO concentration in CcO from *P. denitrificans* (A) and *T. thermophilus* (B). The lines are fits as described in the text. From 0 to 100 ns, the scale is linear; beyond 100 ns, it is logarithmic. (■) High (100:1) and (○) low (5:1) NO/enzyme ratio. (Inset) Saturation curve of the intensity of the signal 6 ns after the pulse as a function of the flash energy for CcO aa_3 from *P. denitrificans*, normalized in the low-energy region. The dotted line is a guide for the eye.

another NO molecule present in the heme pocket) but merely favors picosecond rebinding over longer (>2 ns) rebinding processes. The small 200-ps phase at stoichiometric NO concentrations may reflect a fraction of the enzyme accommodating 2 NO molecules (see the EPR characterization below).

Nanosecond–Millisecond NO Rebinding to CcO aa_3 from *P. denitrificans*. Figure 3A displays the recombination kinetics of NO with heme a_3 in CcO aa_3 from *P. denitrificans* at longer time scales under low and high NO/enzyme stoichiometry. At high NO concentrations, significant decay phases are observed in the nanosecond time range. A fit to the data yields a decay component with a time constant of 20 ns (amplitude \sim 25% of the long-lived component for high NO concentrations) and a faster component, which cannot be resolved with the 5-ns time resolution. The latter component presumably reflects the 200-ps phase observed in the femtosecond experiments, but its apparent amplitude is very low in the nanosecond experiment, because the time resolution is much longer than the 200-ps time constant.

The unresolved and 20-ns phases are strongly suppressed at low NO concentrations. For the unresolved phase, this is consistent with the presence of the 200-ps phase being

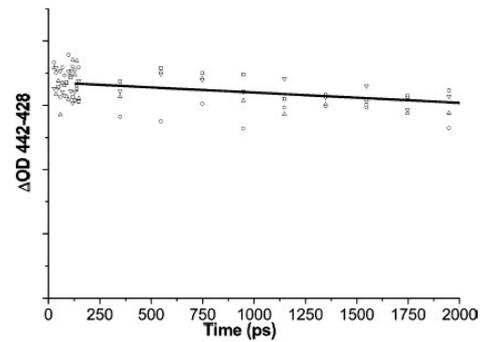


FIGURE 4: Kinetics of geminate recombination of NO and heme a_3 after photodissociation as a function of the NO/CcO ratio in CcO ba_3 from *T. thermophilus*. Open squares stand for NO/CcO ratio of 1:1; open circles, for 3:1; up triangles, for 10:1; and down triangles, for 130:1. The line corresponds to an exponential decay with a time constant of 15 ns (80%) and an asymptotic value (20%), cf. Figure 3B.

correlated with the high NO concentration (Figure 2A). The result that the 20-ns phase also depends on the NO concentration suggests that it is due to the same rebinding process as the 200-ps phase and that this process is thus multiphasic. Virtually no further decay is observed until the millisecond time scale, where the NO concentration-dependent decay occurs, on a time scale roughly consistent with the reported bimolecular binding constant for the mammalian enzyme (5).

The presence of a recombination phase faster than the duration of the 5-ns pump pulse suggests that, within one pulse, recombined heme a_3 -NO pairs can be redissociated several times. This feature is indeed observed in the dependence of the net NO dissociation yield on the intensity of the pump pulse (inset of Figure 3A). At low NO concentrations, when the fast phase is relatively weak, the signal saturates at a much lower pulse energy than at high NO concentrations, where absorption of multiple photons can lead to increased net photodissociation on the nanosecond time scale. Fully consistent with this interpretation, the saturation curve at low NO concentration is similar to that of CO dissociation (inset of Figure 3A), where also no geminate recombination occurs (26).

NO Rebinding to CcO ba_3 from *T. thermophilus*. Figure 4 shows transient absorption kinetics upon NO dissociation from CcO ba_3 on the picosecond and early nanosecond time scale. After \sim 30 ps, when all signals related to heme excited states have decayed, the shape of the transient spectra is very similar to those observed for aa_3 and reflects NO dissociation from heme a_3 (not shown). The signals decay only very little (\sim 10%) on the time scale up to 2 ns, and the decay does not depend on the NO concentration. In particular, we emphasize that no subnanosecond NO-rebinding phase is observed, as it is the case in the aa_3 enzyme.

Extension of these experiments to longer time scales using nanosecond excitation pulses (Figure 3B) shows that the signal decays for \sim 80% with a time constant of \sim 15 ns, in quantitative agreement with the weak decay observed in the ultrafast experiments above. The remaining signal decays in the \sim 50 μ s time range, depending slightly on the NO concentration, and substantially faster than the bimolecular rebinding observed in the aa_3 enzyme. The NO consumption

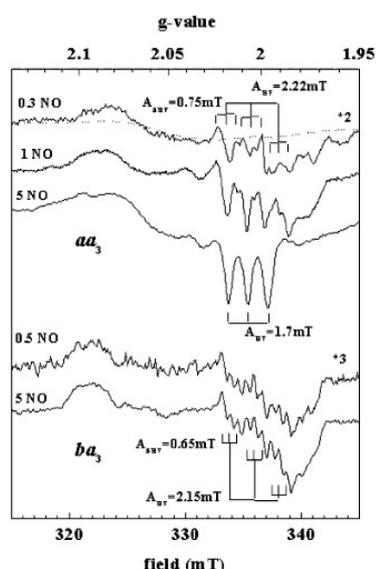


FIGURE 5: EPR spectra recorded on reduced CcO *aa*₃ from *P. denitrificans* (upper) and CcO *ba*₃ from *T. thermophilus* (lower) at various NO/enzyme stoichiometries as indicated for each spectrum. The dotted line superimposed on the upper spectrum corresponds to unligated *aa*₃. Instrument settings: temperature, 50 K; microwave frequency, 9.42 GHz; microwave power, 6.7 mW; and modulation amplitude, 0.1 mT.

precludes the reliable determination of a second-order binding constant in this way, but we note that the NO concentration in solution must be far less than 10 μM for all concentrations studied. Assuming that this phase reflects bimolecular binding, we find a lower limit for the second-order NO association constant of $20 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, much higher than the value of $105 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ reported for the mammalian *aa*₃ enzyme (5). An alternative interpretation of this phase is that it reflects heme *a*₃-NO geminate recombination with NO accommodated at a different site as CuB. Indeed, for photodissociated CO, such a site has recently been proposed on the basis of time-resolved FTIR experiments (27).

EPR Characterization. In an effort to characterize the steady state of the various NO-bound states of the active sites of *aa*₃ and *ba*₃ oxidases, EPR spectra were recorded on samples frozen from similar conditions as the flash photolysis experiments. Substoichiometric NO/enzyme ratios induced the appearance of roughly similar EPR spectral features in the $g = 2$ region in both, the *aa*₃ and the *ba*₃ oxidases (Figure 5). The respective spectra are characteristic of nitric oxide bound to heme at the 6th coordination position with an imidazole ligand occupying the 5th position. Corresponding EPR spectra have been recorded on nitrosylmyoglobin and hemoglobin (28–31), as well as on nitrosylated porphyrin model compounds (32). Isotope exchange experiments and single-crystal EPR studies in these systems have allowed to attribute the dominant 3-line hyperfine structure at the intermediate g value (around $g = 2$) to the interaction of the unpaired electron with the nuclear spin ($I = 1$) of the NO–nitrogen nucleus (30, 32). For the case of the *aa*₃ and *ba*₃ oxidases studied in this work, hyperfine coupling constants (A_{HF}) of 2.22 and 2.15 mT, respectively, are

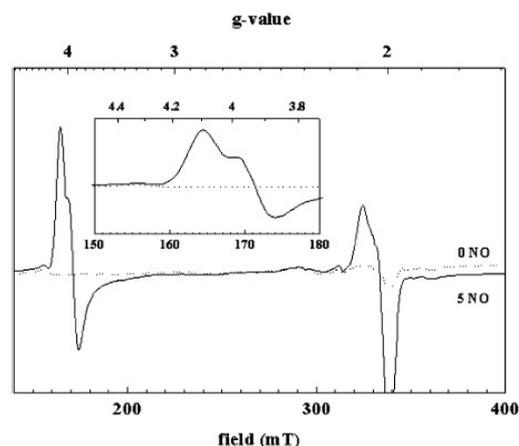


FIGURE 6: EPR spectra recorded on reduced nitrosylated CcO *aa*₃ from *P. denitrificans* in the absence (···) and presence (—) of excess NO. (Inset) Expanded spectrum in the $g = 4$ region. Instrument settings: temperature, 15 K; microwave frequency, 9.42 GHz; microwave power, 6.7 mW; and modulation amplitude, 2.8 mT.

observed (Figure 5). The additional superhyperfine structure was previously shown to arise from the interaction of the electron spin with the ($I = 1$) nucleus of the Fe-ligating nitrogen on the imidazole serving as the 5th ligand (30, 32). The A_{SHF} constants for this interaction were determined at 0.75 and 0.65 mT for the *aa*₃ and the *ba*₃ oxidases, respectively. Corresponding spectra have previously been obtained for NO bound to the mitochondrial cytochrome oxidase *aa*₃ (33–35). The spectra shown in Figure 5 were recorded at 50 K. At lower temperatures, the signal intensity increases but the hyperfine structure becomes substantially less well-resolved.

Whereas for substoichiometric amounts of NO, CcO *aa*₃ and *ba*₃ behaved similarly, increasing the NO levels to stoichiometric and suprastoichiometric amounts induced strongly divergent EPR spectra in both enzymes. While, in CcO *ba*₃, the spectrum only increased in intensity without modification of spectral features, the EPR spectrum of nitrosylated *aa*₃ oxidase from *P. denitrificans* changed drastically. At 5 NO/enzyme, the hyperfine interaction with the NO nitrogen has decreased to $A_{\text{HF}} = 1.6 \text{ mT}$ and the superhyperfine structure has completely disappeared. At stoichiometric amounts of NO/enzyme, a mixed spectrum is observed containing features of both, the low-NO and the high-NO spectral species. The loss of lines in the region above 338 mT upon increasing NO to suprastoichiometric levels demonstrates that the high-NO spectrum results from a transformation of the low-NO species rather than to a superposition of two different spectral forms. This conclusion is corroborated by the observation that the double integral of the spectra remains constant within experimental accuracy above an NO/enzyme ratio of about 1 (data not shown). As will be explained in the Discussion, we propose that the transformation of the spectrum corresponds to a rotation of the Fe–N–O plane with respect to the plane of the histidine coordinating the heme iron.

Spectra taken at 15 K on the *aa*₃ oxidase show the appearance of a new paramagnetic species for NO/enzyme ratios above 1 (Figure 6). This paramagnetic center is characterized by a peak-shaped feature at $g = 4.1$ directly

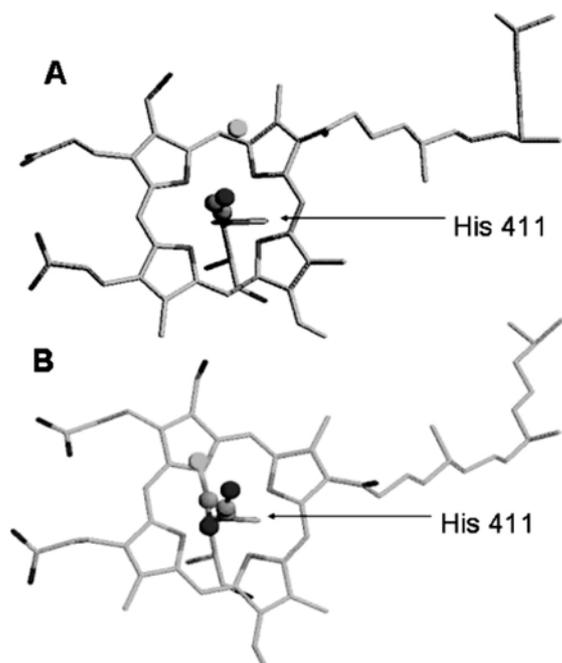


FIGURE 7: Modeled structures of the active site of CcO *aa*₃ from *P. denitrificans* with NO bound to heme *a*₃ (A) and on both heme *a*₃ and Cu_B (B). Cu_B is colored in green, and Fe-*a*₃ is colored in gold. The plane of His 411 is perpendicular to the plane of representation. The figure was prepared using RASMOL (59).

followed by a derivative line at $g = 3.95$. No hyperfine structure is observed on these lines (see the inset of Figure 6).

In stark contrast to these observations on the *aa*₃ enzyme, only a single paramagnetic species, i.e., that shown in the bottom of Figure 5, was observed in the *ba*₃ oxidase at all NO/enzyme ratios examined.

Molecular Modeling. The EPR studies indicate changes in the orientation of the heme-bound NO with respect to the plane of the histidine (His 411) in the presence of a second NO, at least at cryogenic temperatures. Inspection of the model energy-minimized structures generated previously with NO bound to heme *a*₃ only and to both heme *a*₃ and Cu_B (13) appeared in qualitative agreement with this observation. To further validate these models and to avoid trapping in local minima, we have now generated minimized models after warming the structures to 300 K and recooling. Figure 7 shows relevant features of them. As reported in our previous modeling (13), the models show substantial motion of Cu_B upon its binding to NO, with weakening of the Cu_B-His 276 interaction. In addition, the present representation makes clear that the heme-bound NO rotates substantially; the Fe-N-O plane is nearly parallel to that of His 411 (14°) in the 1-NO model but nearly perpendicular (77°) in the 2-NO model.

DISCUSSION

We have carried out a comprehensive study of the binding and dynamics of NO in the active site of the bacterial heme-copper oxidases *aa*₃ and *ba*₃. The earlier observed effects of NO/enzyme stoichiometry on the picosecond heme-NO-

rebinding kinetics in *aa*₃ (13) were now extended to and also observed on longer time scales. Along with the novel EPR characterization and the comparison with *ba*₃, they further confirm the assessment that two NO molecules can be accommodated by the active site at relatively low NO concentrations and allow proposing structural characteristics of the NO accommodation.

Kinetics of Heme *a*₃-NO Rebinding. Previously, we had observed that the kinetics of NO rebinding to heme *a*₃ in CcO *aa*₃ from *P. denitrificans* on the time scale up to 300 ps are NO concentration-dependent (13). Our present results on a far more extended time scale (Figure 2A) demonstrate that the kinetics on the subnanosecond time scale can be described by a single 200-ps decay phase and a virtually nondecaying phase, with the relative amplitude of the 200-ps phase increasing with an increasing NO concentration. They discard the alternative possibility of a NO concentration-dependent time constant as expected for competition for heme binding between the dissociated NO molecule and other (intraprotein) NO molecules. Thus, we can now attribute this phase to recombination of heme *a*₃ to one single NO molecule, with this recombination being induced by the presence of a second NO molecule in/near the heme pocket, an attribution favored but not proven previously (13). The interpretation of the kinetics in terms of geminate rebinding taking place or not on the subnanosecond time scale is further strengthened by the NO concentration dependence of the saturation curve of NO dissociation on the nanosecond time scale (inset of Figure 3A).

In addition, another, 20-ns, NO concentration-dependent phase was detected (amplitude ~2% of the total decay for high NO concentrations). Multiphasic geminate rebinding of NO with heme in proteins is commonly observed (12, 36, 37) and is thought to reflect at least in part relaxation processes of the protein, leading to increasingly high rebinding barriers as a function of time. For the case of the *aa*₃-NO complex at high NO concentrations, the time scale of these phases are well-separated (a dominant 200-ps phase followed by a minor 20-ns phase), suggesting clearly distinct recombination mechanisms. The 20-ns phase presumably reflects rebinding with NO from outside the active site, in competition with NO diffusion out of the protein. Our nanosecond results are in general agreement with those of Blackmore and co-workers (5), who monitored NO recombination with the mammalian *aa*₃ enzyme using 532 nm, 9-ns flashes, and under conditions of high NO concentrations (0.1 atm) and found two decay phases in the 10–100-ns range.

At low NO concentration, virtually no geminate rebinding takes place. Assuming NO intermediately binds to Cu_B and taking into account the lower limit of ~10 μs for the time constant of NO transfer from Cu_B to heme *a*₃ (5), this indicates that NO dissociates from Cu_B on the nanosecond time scale and diffuses out of the protein. This finding implies that under these conditions, once dissociated from heme *a*₃, virtually all NO molecules leave the protein, as is the case with CO as a ligand. This property, in itself very unusual for NO rebinding in heme proteins, possibly indicates a role of Cu_B as a gateway for ligand shuttling, even for NO.

Comparison *ba*₃ and *aa*₃. An important general result is that, in contrast to the *aa*₃ enzyme, NO concentration dependence was not observed in the *ba*₃ enzyme, neither in

the NO-rebinding dynamics nor in the steady-state EPR characterization. For all NO concentrations, the picosecond recombination kinetics (virtually no rebinding) and the EPR characterization are similar to the aa_3 low NO concentration case. Because this enzyme has a considerable NO-reductase activity (two NO molecules are reduced to N_2O and H_2O), the steady-state copresence of two NO molecules in the active site is virtually precluded. Thus, this result strongly supports the idea of multiple NO molecules in/near the active site of aa_3 .

In ba_3 , a major NO-heme a_3 recombination phase with a time constant of ~ 15 ns is observed. Assuming dissociated NO intermediately binds to CuB, this phase reflects the competition between the transfer back to heme a_3 (80%) and diffusion to another docking site (27) or out of the protein (20%). The much higher yield of recombination compared to the aa_3 low NO concentration case indicates a high NO affinity of heme a_3 in ba_3 , possibly because the channel out of the protein from CuB is more blocked, as appears to be the case for CO (27). An intriguing and possibly related observation is that, despite the well-documented NO-reductase activity (10), the ba_3 -NO complex was readily formed and very stable upon stoichiometric addition of NO to the complex. This must indicate that the affinity of the active site for a single NO is high compared to the affinity for a second NO (which would lead to N_2O formation and loss of the ba_3 -NO complex) in this enzyme. A quite different behavior occurs in the aa_3 enzyme: at NO addition in the stoichiometric range, the aa_3 -NO complex is only partially formed and the second site (presumably CuB) is filled at relatively low NO concentrations. One might speculate that this behavior is also related to the higher affinity of ba_3 oxidase for oxygen as compared to aa_3 from *P. denitrificans* (23).

Interpretation of Spectral Species in the $g = 2$ Region. As already detailed in the Results, the EPR spectra obtained on the aa_3 oxidase in the presence of low NO/enzyme stoichiometries and on the ba_3 enzyme both at low- and high-NO levels are readily interpreted as resulting from NO bound to heme a_3 , the second axial ligand of which is a histidine. The spectrum observed in the presence of suprastoichiometric amounts of NO strongly resembles those reported for nitrosyl heme with a ruptured Fe-His bond. Corresponding spectral changes have been observed in nitrosyl hemoglobins upon transition between the R and the T state and are interpreted to reflect the movement of the iron atom into the heme plane in the hemoglobin α chains, entailing breakage of the bond toward the histidine.

A spectrum similar to that shown in Figure 5 for high levels of NO has recently been published for the mitochondrial enzyme (38) and was interpreted in the framework of the hemoglobin literature and by comparison to extracted, nitrosylated heme a as demonstrating the presence of pentacoordinated heme a_3 . For the case of our experiments, this interpretation of the high-NO spectral species would mean that the presence of more than one NO molecule in the catalytic pocket either pulls the Fe-NO moiety toward CuB or pushes the axial histidine away from heme a_3 . Such conformational changes appear highly unlikely to us given the available structural information as detailed in the following.

"Hexacoordinated" EPR spectra are observed in nitrosyl hemoglobin β chains and nitrosyl myoglobin, showing Fe-His bond lengths of 2.1–2.3 Å, respectively (e.g., see PDB entries 1RPS, 1NPF, or 1HJT). These values are almost identical to those observed in deoxyhemoglobin and myoglobin (about 2.2 Å) (1RQ3). The iron in the pentacoordinated heme of α chains in the R state of NO-Hb, however, is at a distance of 4.1 Å from the proximal histidine (1RPS). The corresponding Fe(a_3)-His bond length in the deoxy state of aa_3 oxidase is 2.1 and 1.9 Å for the *P. denitrificans* and the bovine enzymes, respectively, i.e., very similar to those in hexacoordinated hemoglobin and myoglobin. Unfortunately, no X-ray structural data are available for oxidases with nitric oxide ligands. Nonetheless, the 3D structures of the mitochondrial aa_3 oxidase seem to show that, while CuB moves significantly in response to changes in the redox and ligation states of the enzyme (as also observed in our modeling of the bacterial enzyme), the position of the iron in heme a_3 as well as that of the histidine are roughly identical in the different states examined (i.e., oxidized, reduced, and in the presence of carbon monoxide and azide) (39). This argues against the existence of a variable Fe-His distance as it is found in the hemoglobins and thus makes the observation of the "pentacoordinated" spectrum difficult to rationalize. Despite the crystallographic evidence, Pearce et al. (38) have proposed far-going structural flexibility of the histidine-heme a_3 bond based on the observation that the respective bond length is 3.3 Å in the *T. thermophilus* ba_3 oxidase, i.e., significantly larger than what is observed for the two aa_3 oxidases and about halfway between the values of pentacoordinated (4.1 Å) and hexacoordinated (2.2 Å) hemoglobins. However, it is precisely in the ba_3 oxidase with its unusually long bond where a "hexacoordinated" spectrum is observed for all NO levels (bottom of Figure 5).

In summary, the sets of Fe-His bond lengths and the various types of EPR spectra do not yield a consistent picture. We therefore favor a different physical rationalization of the observed spectra. As can be seen from the spectra containing the superhyperfine interaction (Figure 5), the g tensor is rhombic with $g_{\max} = 2.1$, $g_{\text{int}} = 2$, and $g_{\min} = 1.98$. This rhombicity implies that the unpaired electron must reside to a significant level in a molecular π orbital involving the p orbital of the sp^2 -hybridized nitrogen of the NO moiety and the d_{xz} (or d_{yz}) orbital of the iron, in addition to the σ -type molecular orbital formed by the iron d_{z^2} and a nitrogen sp^2 orbital. EPR studies on single crystals of MbNO have demonstrated the validity of this bonding scheme (30). In all X-ray structures of MbNO and HbNO in states where the "hexacoordinated" spectrum is observed, the Fe-N-O plane lies roughly (within 15°) parallel to the plane of the proximal histidine. This implies that the π -molecular orbital mentioned above will extend to the p orbital of the 5th ligand nitrogen of the histidine, rationalizing the comparatively strong (considering the distance between the nitric oxide ligand and the histidine) A_{SHF} value of about 0.7 mT. In this context, it is noteworthy that single-crystal EPR results suggest the superhyperfine coupling to be strongly anisotropic (30, 40), excluding the possibility that it arises merely from Fermi contact interaction through the σ -bonding orbitals of the NO-Fe-His system.

Correspondingly, in β chains of HbNO in the state where the bond to the axial histidine is cleaved (41) and where a "pentacoordinated" EPR spectrum is observed, the NO ligand is substantially turned away from the histidine plane projection onto the heme plane (by $>25^\circ$).

Considering these results, we propose that in the aa_3 oxidase the transition from the low- to high-NO spectral species reflects a rotational movement of the NO ligand with respect to the heme normal rather than the absence of the 5th ligand as observed in model systems. At low NO levels, the EPR results thus predict a binding geometry of NO to heme a_3 placing the Fe-N-O plane roughly coplanar with the histidine ligand plane. At high NO concentrations, the nitrosyl ligand would be turned away from this conformation by at least 20° , thus precluding the formation of the π orbital extending from the nitric oxide through to the histidine ligand. The molecular-modeling studies (Figure 7) indeed predict such rotational movements, by assuming that a second NO binds to CuB.

Origin of the Signal in the $g = 4$ Region Observed in aa_3 at High NO/Enzyme Stoichiometry. In contrast to the spectral species detected in the $g = 2$ region, the signal at about $g = 4$ does not resemble spectra previously reported for heme or copper compounds and its interpretation is therefore far from trivial. Spectra reminiscent of that shown in Figure 6 have been detected in nitrosylated copper pairs (42-46) or in NO-treated cytochrome oxidase in the presence of azide (35, 47, 48). In all of these cases, the $g = 4$ signals have been interpreted (49) as arising from the $\Delta m_S = 2$ transition within a triplet state formed by the spin on NO bound to ferrous heme (in the case of cytochrome oxidase) or to Cu^I and the spin on a Cu^{II} ion (either oxidized CuB or the second copper in the Cu pairs). In all of these mentioned cases, hyperfine lines because of interaction with the $I = 1$ copper nucleus/nuclei are observed. No such hyperfine lines are present in the spectrum shown in the inset of Figure 6, and therefore, this appears an unlikely interpretation of our results. We furthermore did not see any measurable amounts of Cu^{II} in the optical spectra recorded prior to freezing the samples. Alternatively, the spectrum might arise from the $\Delta m_S = 2$ transition within a triplet state formed by two NO ligands, one bound to heme a_3 and the other bound to CuB. This would explain the absence of a copper hyperfine structure and would be in line with the presence of reduced copper. However, if this interpretation was correct, the appearance of the triplet signal should go hand in hand with the loss of the heme a_3 -NO spectrum. This is not observed, and therefore, we also consider this model as unlikely.

Intriguingly, the spectrum shown in Figure 6 is practically identical to spectra reported for nitric oxide bound to mononuclear non-heme iron centers such as, for example, in nitrosylated bacterial dioxygenases (50, 51). The paramagnetic species giving rise to this spectrum has been identified as an $S = 3/2$ spin state formed in the {Fe-NO}⁷ electronic system. NO is considered to formally oxidize Fe^{II} to Fe^{III} resulting in an $S = 1$ state on the NO ligand. The $S = 1$ spin couples antiferromagnetically to the high spin $S = 5/2$ state of Fe^{III}, yielding a resulting spin of $3/2$ for the whole spin system (51). Quantification of this spectrum by comparison to that of a nitrosylated bacterial dioxygenase showed that the signal corresponds to 40-70% (20-35 μ M) of aa_3 oxidase present in the sample. This renders the possibility

that the signal arises from an impurity quite unlikely. In CcO, however, no non-heme iron atom appears to be present. The only conceivable metallic binding site for a second nitric oxide is CuB. Considering the electronegativity of these reaction partners, there is indeed a high chance that NO formally oxidizes Cu^I to Cu^{II} in the {Cu-NO}¹¹ electronic system. To produce an $S = 3/2$ spin state, the resulting $S = 1$ on the NO ligand must then couple ferromagnetically (rather than antiferromagnetically as inferred for the iron case mentioned above) with the $S = 1/2$ spin of Cu^{II}. Because the spin on Cu^{II} resides in an almost filled d shell, whereas the d orbitals in Fe^{III} are only half-filled, an inverse sign for the coupling of the two systems is not excluded.

The interpretation of the observed spectrum as an $S = 3/2$ state formed by NO bound to reduced copper explains both, the EPR spectral parameters of this paramagnetic species and the persistence of the heme a_3 -NO spectrum upon formation of the $g = 4$ species. We therefore favor this model at the time being.

Unfortunately, suitable copper model systems for comparison are presently not available in the literature. The only well-studied model systems are nitrosylated Cu zeolites. The copper core in these model compounds is in a distorted tetrahedral environment with a C_3 symmetry along the Cu-NO bond (52). In cytochrome oxidases, by contrast, the copper and nitrogen atoms of the three-coordinated histidines are almost in plane and the ligand geometry around the copper center is far from being C_3 -symmetric. Crystal structures of CcO aa_3 enzymes in different conditions (39, 53-55) furthermore suggest the possibility of cleavage of the bond between CuB and one of its histidine ligands under certain circumstances, which would imply an even more unconventional ligation pattern at the CuB core. Our modeling of the active site with NO bound to CuB also indicates substantial weakening of the CuB-His 276 interaction upon binding of NO to CuB. In any case, however, the binding conformation of NO-CuB must drastically differ from that observed in the Cu zeolites, rationalizing the absence of paramagnetic species reported for these model compounds (56, 57).

Recently, the 3D structure of the copper-nitrosyl complex in dissimilatory nitrite reductase has been reported (58). The ligation geometry of the copper ion by three histidine residues remotely resembles that found in CcOs. The NO molecule, however, was found to be bound "side-on" to the Cu atom, i.e., with N and O of the N-O moiety equidistant from Cu. As evidenced by the observation of a Cu^{II} EPR spectrum, the nitroxide abstracted an electron from copper upon binding to this enzyme. This particular system, despite some structural similarities to the Cu site in CcO, is thus still not helpful in interpreting our EPR results.

Comparison to Previous EPR Studies. The interactions of NO with heme-copper oxidases, as probed by EPR spectroscopy, are quite complex. The presence of a "hexacoordinated" spectrum at low NO concentrations and an EPR silent state attributed to antiferromagnetic interaction between a_3 - and CuB-bound nitric oxides at high NO levels has been reported (7, 35). By contrast, "hexacoordinated" spectra have been observed also at saturating NO levels (33-35). Recently, Pearce et al. (38) have reported the observation of "pentacoordinated" and mixed (hexa- and pentacoordinated) spectra similar to our aa_3 spectra at stoichiometric

and suprastoichiometric amounts as shown in Figure 5.

In principle, the divergent results might be attributed to the use of differing sources for aa_3 oxidase, i.e., *P. denitrificans* in our case and bovine mitochondria in all other mentioned cases. However, the fact that Pearce et al. (38) observed similar spectra as ours in the bovine enzyme, albeit for different states of samples, renders this possibility unlikely. We therefore tend to believe that the differing results are actually because of differing states of the sample. In our hands, optical verification of the redox and heme-ligation states of samples in the EPR tube prior to freezing proved crucial for obtaining reproducible results. In addition, we note that (a) our results were obtained at very low levels of NO, the saturation effects in aa_3 at ~ 5 NO/enzyme in the EPR experiments correspond to equilibration with less than 0.001 atm of NO, and (b) reduction by dithionite was avoided.

CONCLUDING REMARKS

The ensemble of our results clearly demonstrate that two NO molecules can be accommodated by the active site of CcO aa_3 , one bound to heme a_3 and one presumably at CuB. The CuB-bound NO clearly influences the configuration of the NO-heme bond and de facto stabilizes it by favoring its reformation after dissociation into different configurations (i.e., on the picosecond and nanosecond time scale). Both, the EPR results and molecular modeling indicate that the bent Fe-N-O configuration allows steric flexibility and makes it possible to accommodate the 2 ligand molecules in the active site. The Fe-C-O configuration, by contrast, is intrinsically stretched, and this may explain why 2 CO molecules are not accommodated by the active site (8, 39). Along the same line of reasoning and taking into account the bent Fe-O-O configuration, one might speculate that 2 O₂ molecules or, probably more relevantly, O₂ and NO can be co-present in the active site.

Finally, our results yield a consistent picture of the NO-interaction properties of the reduced ba_3 oxidase in comparison with the aa_3 oxidase. Evidence for only one NO steadily and with high affinity bound to the active site was found, in a configuration similar to that for the aa_3 1-NO case, in agreement with the finding that a second NO would lead to NO reduction (10). In ba_3 , the relative affinity of accommodation of a second NO after formation of the heme a_3 -NO bond is substantially lower than in aa_3 , a property that may be related to the relatively small Fe a_3 -CuB distance (23).

ACKNOWLEDGMENT

We thank Jean-Louis Martin for stimulating discussions and Audrius Jasaitis for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Cooper, C. E. (2002) Nitric oxide and cytochrome oxidase: Substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem. Sci.* 27, 33–39.
- Moncada, S., and Erusalimsky, J. D. (2002) Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 214–220.
- Brunori, M., Giuffrè, A., Forte, E., Mastronicola, D., Barone, M. C., and Sarti, P. (2004) Control of cytochrome *c* oxidase activity by nitric oxide, *Biochim. Biophys. Acta* 1655, 365–371.
- Giuffrè, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T., and Brunori, M. (1996) On the mechanism of inhibition of cytochrome *c* oxidase by nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 271, 33404–33408.
- Blackmore, R. S., Greenwood, C., and Gibson, Q. H. (1991) Studies of the primary oxygen intermediate in the reaction of fully reduced cytochrome oxidase, *J. Biol. Chem.* 266, 19245–19249.
- Einarsdottir, O. (1995) Fast reactions of cytochrome oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 129–147.
- Brudvig, G. W., Stevens, T. H., and Chan, S. I. (1980) Reactions of nitric oxide with cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry* 19, 5275–5285.
- Zhao, X. J., Sampath, V., and Caughey, W. S. (1994) Infrared characterization of nitric oxide bonding to bovine heart cytochrome *c* oxidase and myoglobin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204, 537–543.
- Stubauer, G., Giuffrè, A., Brunori, M., and Sarti, P. (1998) Cytochrome *c* oxidase does not catalyze the anaerobic reduction of NO, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 245, 459–465.
- Giuffrè, A., Stubauer, G., Sarti, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G., and Soulimane, T. (1999) The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: Evolutionary implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14718–14723.
- Sarti, P., Giuffrè, A., Barone, M. C., Forte, E., Mastronicola, D., and Brunori, M. (2003) Nitric oxide and cytochrome oxidase: Reaction mechanisms from the enzyme to the cell, *Free Radical Biol. Med.* 34, 509–520.
- Martin, J.-L., and Vos, M. H. (1994) Femtosecond spectroscopy of ligand rebinding in heme proteins, *Methods Enzymol.* 232, 416–430.
- Vos, M. H., Lipowski, G., Lambry, J.-C., Martin, J.-L., and Liebl, U. (2001) Dynamics of nitric oxide in the active site of reduced cytochrome *c* oxidase aa_3 , *Biochemistry* 40, 7806–7811.
- Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba_3 -cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*, *EMBO J.* 19, 1766–1776.
- Liebl, U., Lipowski, G., Negrier, M., Lambry, J.-C., Martin, J.-L., and Vos, M. H. (1999) Coherent reaction dynamics in cytochrome *c* oxidase, *Nature* 401, 181–184.
- Seelig, A., Ludwig, B., Seelig, J., and Schatz, G. (1981) Copper and manganese electron spin resonance studies of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta* 636, 162–167.
- Soulimane, T., Gohlke, U., Huber, R., and Buse, G. (1995) Three-dimensional crystals of cytochrome-*c* oxidase from *Thermus thermophilus* diffracting to 3.8 Å resolution, *FEBS Lett.* 368, 132–134.
- Béal, D., Rappaport, F., and Joliot, P. (1999) A new high-sensitivity 10-ns time-resolution spectrophotometric technique adapted to in vivo analysis of the photosynthetic apparatus, *Rev. Sci. Instrum.* 70, 202–207.
- Riedel, A., Fetzner, S., Rampp, M., Lingens, F., Liebl, U., Zimmermann, J.-L., and Nitschke, W. (1995) EPR, electron spin-echo envelope modulation, and electron nuclear double resonance studies of the 2Fe2S centers of the 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* 2CBS, *J. Biol. Chem.* 270, 30869–30873.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.* 4, 187–212.
- Goldbeck, R. A., Einarsdottir, O., Dawes, T. D., O'Connor, D. B., Surerus, K. K., Fee, J. A., and Kligler, D. S. (1992) Magnetic circular dichroism study of cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: spectral contributions from cytochromes *b* and a_3 and nanosecond spectroscopy of carbon monoxide photodissociation intermediates, *Biochemistry* 31, 9376–9387.
- Oertling, W. A., Surerus, K. K., Einarsdottir, O., Fee, J. A., Dyer, R. B., and Woodruff, W. H. (1994) Spectroscopic characterization of cytochrome ba_3 , a terminal oxidase from *Thermus thermophilus*: Comparison of the aa_3 /CuB site to that of bovine cytochrome aa_3 , *Biochemistry* 33, 3128–3141.
- Than, M. E., and Soulimane, T. (2001) in *Handbook of Metalloproteins* (Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K., Eds.) pp 363–378, John Wiley, Chichester, U.K.
- Giuffrè, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T., and Buse, G. (1999) Kinetic properties of ba_3

- oxidase from *Thermus thermophilus*: Effect of temperature, *Biochemistry* 38, 1057–1065.
25. Koutsoumpakis, K., Stavarakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C. (2002) Observation of the equilibrium CuB-CO complex and functional implications of the transient heme a_3 propionates in cytochrome ba_3 -CO from *Thermus thermophilus*. Fourier transform infrared (FTIR) and time-resolved step-scan FTIR studies, *J. Biol. Chem.* 277, 32860–32866.
 26. Binarsdottir, O., Dyer, R. B., Lemon, D. D., Killough, P. M., Hubig, S. M., Atherton, S. J., Lopez-Garriga, J. J., Palmer, G., and Woodruff, W. H. (1993) Photodissociation and recombination of carbonmonoxy cytochrome oxidase: Dynamics from picoseconds to kiloseconds, *Biochemistry* 32, 12013–12024.
 27. Koutsoumpakis, C., Soulimane, T., and Varotsis, C. (2003) Ligand binding in a docking site of cytochrome c oxidase: A time-resolved step-scan Fourier transform infrared study, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14728–14732.
 28. Chien, J. C. W. (1969) Electron paramagnetic resonance study of the stereochemistry of nitrosylhemoglobin, *J. Chem. Phys.* 51, 4220–4227.
 29. Dickinson, L. C., and Chien, J. C. W. (1971) Electron paramagnetic resonance study of nitrosylmyoglobin, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 5036–5040.
 30. Hori, H., Ikeda-Saito, M., and Yonetani, T. (1981) Single-crystal EPR of myoglobin nitroxide. Freezing-induced reversible changes in the molecular orientation of the ligand, *J. Biol. Chem.* 256, 7849–7855.
 31. Fago, A., Crumbliss, A. L., Peterson, J., Pearce, L. L., and Bonaventura, C. (2003) The case of the missing NO-hemoglobin: Spectral changes suggestive of heme redox reactions reflect changes in NO-heme geometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12087–12092.
 32. Kon, H., and Kataoba, N. (1969) Electron paramagnetic resonance of nitric oxide-protoheme complexes with some nitrogenous base. Model systems of nitric oxide hemoproteins, *Biochemistry* 8, 4757–4762.
 33. Blokzijl-Homan, M. F. J., and Van Gelder, B. F. (1971) Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa_3 III. The EPR spectrum of NO-ferrocycytochrome a_3 , *Biochim. Biophys. Acta* 234, 493–498.
 34. Stevens, T. H., and Chan, S. I. (1981) Histidine is the axial ligand to cytochrome a_3 in cytochrome c oxidase, *J. Biol. Chem.* 256, 1069–1071.
 35. Stevens, T. H., Bocian, D. F., and Chan, S. I. (1979) EPR studies of ^{15}NO -ferrocycytochrome a_3 in cytochrome c oxidase, *FEBS Lett.* 97, 314–316.
 36. Nègrerie, 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 NO-synthase and mechanistic implications, *J. Biol. Chem.* 274, 24694–24702.
 37. Vos, M. H., and Martin, J.-L. (1999) Femtosecond processes in proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 1–20.
 38. Pearce, L. L., Bominaar, E. L., Hill, B. C., and Peterson, J. (2003) Reversal of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase by the auxiliary substrate nitric oxide: An endogenous antidote to cyanide poisoning? *J. Biol. Chem.* 278, 52139–52145.
 39. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase, *Science* 280, 1723–1729.
 40. Nitschke, W. (1982) Fe-Ligand Interactions in Myoglobin Single Crystals, Diploma Thesis, University of Regensburg, Germany.
 41. Chan, N. L., Kavanaugh, J. S., Rogers, P. H., and Amone, A. (2004) Crystallographic analysis of the interaction of nitric oxide with quaternary-T human hemoglobin, *Biochemistry* 43, 118–132.
 42. Schoot Uiterkamp, A. J. M. (1972) Monomer and magnetic dipole-coupled Cu^{2+} EPR signals in nitrosylhemocyanin, *FEBS Lett.* 20, 93–96.
 43. Schoot Uiterkamp, A. J. M., and Mason, H. S. (1973) Magnetic dipole-dipole coupled Cu(II) pairs in nitric oxide-treated tyrosinase: A structural relationship between the active sites of tyrosinase and hemocyanin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 993–996.
 44. van Leeuwen, F. X. R., Wever, R., and van Gelder, B. F. (1973) EPR study of nitric oxide-treated reduced ceruloplasmin, *Biochim. Biophys. Acta* 315, 200–203.
 45. van Leeuwen, F. X. R., Wever, R., van Gelder, B. F., Avigliano, L., and Mondovi, B. (1975) The interaction of nitric oxide with ascorbate oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 403, 285–291.
 46. van Leeuwen, F. X. R., and van Gelder, B. F. (1978) A spectroscopic study of nitric-oxide-treated ceruloplasmin, *Eur. J. Biochem.* 87, 305–312.
 47. Boelens, R., Rademaker, H., Pel, R., and Wever, R. (1982) EPR studies of the photodissociation reactions of cytochrome c oxidase-nitric oxide complexes, *Biochim. Biophys. Acta* 679, 84–94.
 48. Hunter, D. J. B., Salerno, J. C., and Ingledew, W. J. (1998) Angular dependence of electron paramagnetic resonances of an azide-NO complex of cytochrome c oxidase: Orientation of the haem-copper axis in cytochrome aa_3 from ox heart, *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 55–62.
 49. Boas, J. F., Dunhill, R. H., Pilbrow, J. R., Srivastava, R. C., and Smith, T. D. (1969) Electron spin resonance studies of copper (II) hydroxy-carboxylic acid chelates in aqueous and non-aqueous solutions, *J. Chem. Soc. A* 94, 94–108.
 50. Arciero, D. M., Orville, A. M., and Lipscomb, J. D. (1985) ^{17}O -Water and nitric oxide binding by protocatechuate 4,5-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase. Evidence for binding of exogenous ligands to the active site Fe^{2+} of extradiol dioxygenases, *J. Biol. Chem.* 260, 14035–14044.
 51. Jackson, T. A., Yikilmaz, E., Miller, A. F., and Brunold, T. C. (2003) Spectroscopic and computational study of a non-heme iron $\{\text{Fe}-\text{NO}\}^7$ system: Exploring the geometric and electronic structures of the nitrosyl adduct of iron superoxide dismutase, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8348–8363.
 52. Ruggiero, C. E., Carrier, S. M., Antholine, W. E., Whittaker, J. W., Cramer, C. J., and Tolman, W. B. (1993) Synthesis and structural and spectroscopic characterization of mononuclear copper nitrosyl complexes: Models for nitric oxide adducts of copper proteins and copper-exchanged zeolites, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11285–11298.
 53. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science* 272, 1136–1144.
 54. Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., and Michel, H. (1997) Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10547–10553.
 55. Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tomroth, S., Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002) The X-ray crystal structures of wild-type and BQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Mol. Biol.* 321, 329–339.
 56. Chao, C.-C., and Lunsford, J. H. (1974) Infrared and electron paramagnetic resonance study of some silver-nitric oxide complexes in Y type zeolites, *J. Phys. Chem.* 78, 1174–1177.
 57. Giamello, E., Murphy, D., Magnacca, G., Morterra, C., Anpo, M., Nomura, T., and Shyoya, Y. (1992) The interaction of NO with copper ions in ZSM5. An EPR and IR investigation, *J. Catal.* 136, 510.
 58. Tocheva, E. I., Rosell, F. I., Mauk, A. G., and Murphy, M. E. P. (2004) Side-on copper-nitrosyl coordination by nitrite reductase, *Science* 304, 867–870.
 59. Sayle, R. A., and Milner-White, E. J. (1995) RASMOL: Biomolecular graphics for all, *Trends Biochem. Sci.* 20, 374–376.

BI0488808

Electron transfer between hemes in mammalian cytochrome *c* oxidase

Eric Pilet*, Audrius Jasaitis*, Ursula Liebl, and Marten H. Vos†

Laboratory for Optical Biosciences, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U451, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7645, Ecole Polytechnique, Ecole Nationale Supérieure de Techniques Avancées, 91128 Palaiseau Cedex, France

Edited by Hartmut Michel, Max Planck Institute for Biophysics, Frankfurt, Germany, and approved October 4, 2004 (received for review July 12, 2004)

Fast intraprotein electron transfer reactions associated with enzymatic catalysis are often difficult to synchronize and therefore to monitor directly in non-light-driven systems. However, in the mitochondrial respiratory enzyme cytochrome oxidase aa_3 , the kinetics of the final electron transfer step into the active site can be determined: reverse electron flow between the close-lying and chemically identical hemes a_3 and a can be initiated by flash photolysis of CO from reduced heme a_3 under conditions where heme a is initially oxidized. To follow this reaction, we used transient absorption spectroscopy, with femtosecond time resolution and a time window extending to 4 ns. Comparison of the picosecond heme a_3 -CO photodissociation spectra under different redox states of heme a shows significant spectral interaction between both hemes, a phenomenon complicating the interpretation of spectral studies with low time resolution. Most importantly, we show that the intrinsic electron equilibration, corresponding to a ΔG^0 of 45–55 meV, occurs in 1.2 ± 0.1 ns. This is 3 orders of magnitude faster than the previously established equilibration phase of $\approx 3 \mu\text{s}$, which we suggest to reflect a change in redox equilibrium closely following CO migration out of the active site. Our results allow testing a number of conflicting predictions regarding this reaction between both experimental and theoretical studies. We discuss the potential physiological relevance of fast equilibration associated with this low-driving-force redox reaction.

Electron transfer (ET) reactions in proteins occur on time-scales ranging from subpicosecond to millisecond. Determination of the pathway and dynamics of ET and their regulation is of crucial importance for the understanding of many catalytic reactions. The dynamics of biological ET has been extensively studied in naturally photoactive proteins and in particular in photosynthetic reaction centers, where even the fastest reactions can naturally be synchronized by populating their excited-state precursors using ultrashort light pulses (1, 2). Monitoring intraprotein electron flow in other bioenergetic systems must rely on synchronization of nonnaturally photoactivatable electron sources. In fact, to our knowledge, the direct observation of such ET has been limited to microseconds and slower. Here we set out to determine the intrinsic rate of electron equilibration between the two chemically identical hemes of mitochondrial cytochrome *c* oxidase (CcO), a key step in respiratory oxygen reduction. The kinetics of this ET step are currently a subject of controversy among experimentalists (3, 4), and a broad range of rates has been predicted in theoretical studies (5–7).

CcO is the membranous protein complex that reduces molecular oxygen to two water molecules in mitochondrial respiration. During this process, it accepts electrons from one side of the mitochondrial membrane and protons from the other and thus creates an electrochemical proton gradient across the membrane. In addition, this enzyme is a proton pump, using the energy released during the oxygen chemistry to transfer four additional protons across the membrane. The resulting proton gradient is used by ATP-synthase to synthesize ATP, the pre-eminent energy storage molecule. A number of crystallographic structures of CcO of mammalian (bovine heart) (8) and bacterial (9, 10) origin have been solved at high resolution.

CcO contains four redox-active cofactors, two a -type hemes, and two copper centers, and accommodates four electrons in its fully reduced (FR) form. During catalysis, the enzyme accepts electrons from soluble ferro-cytochrome *c* (Scheme 1). The primary acceptor is the diatomic copper center Cu_A (11), bound to a polar domain of subunit II. In the physiological electron pathway, Cu_A transfers electrons to high-spin heme a located, at a distance of 19.5 Å, in subunit I in the intramembrane moiety. Heme a serves as an electron donor to the so-called binuclear center, where the actual oxygen chemistry takes place, and which is formed by low-spin heme a_3 and the copper atom Cu_B . Cu_B plays a crucial role in the redox chemistry and also serves as a “gate” for ligand transfer to and from heme a_3 . The two hemes approach each other at a minimal edge-to-edge distance of 4.7 Å and make an interplanar angle of $\approx 100^\circ$ (8). The intraprotein ET chain operates at low driving forces: free energy differences for ET between the hemes and Cu_A are in the tens of meV range, and the equilibration constants can be “fine tuned” by the environment of the redox factors.

ET into CcO using external synchronizable electron sources has been studied by using a variety of techniques, including pulse radiolysis (12), ruthenium-containing dyes (13), and modified cytochromes (14, 15). Using these methods, it has been established that, starting from the oxidized enzyme, Cu_A is reduced and reoxidized on the microsecond timescale, as indicated in Scheme 1. However, ET between hemes cannot be studied in this way, because it occurs faster than ET from Cu_A to heme a , presumably due to the great difference in distance between these redox cofactors. Insight into the intrinsic interheme rate of ET is needed, however, to understand the sequence and rate limitation of events during the binding of oxygen and its four-electron reduction. For instance, several models have invoked an important role of ET to heme a_3 in the kinetic trapping of oxygen (16) and gating of proton translocation (17), albeit without explicitly discussing the timescale of these processes.

A different experimental approach makes use of the possibility of reversing electron flow. Here, photodissociation of CO bound to the mixed valence (MV, $a^3+a_3^{2+}$ -CO) enzyme instantly lowers the apparent midpoint potential of heme a_3 , causing a flow of electrons from the binuclear center to heme a and to Cu_A (18–24). In the early 1990s, using this method with microsecond instrumentation, in studies using subsequently single-wavelength kinetics in the heme α and Soret bands (22) and full spectral characterization in the Soret region (23), two phases with time constants of 3–5 and 77 μs were observed and assigned to ET between heme a_3 and heme a and between heme a and Cu_A , respectively. The 3- μs phase was then thought to reflect the fastest ET process in CcO.

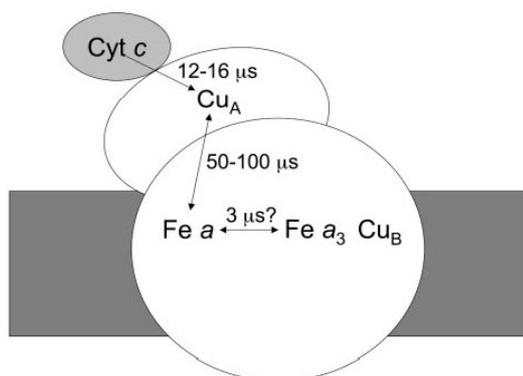
This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: ET, electron transfer; CcO, cytochrome *c* oxidase; MV, mixed valence; FR, fully reduced.

*E.P. and A.J. contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: marten.vos@polytechnique.fr.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA



Scheme 1. Pathway for ET from cytochrome c to the active site of CcO.

More recently, doubt was shed on this assessment by Verkhovskiy *et al.* (3), based on a detailed comparison of the “photolysis” spectra of the FR ($a_2^+a_3^+-\text{CO}$) and MV-CO states measured with submicrosecond time resolution. From the difference of these spectra, the authors (3) proposed that in MV-CO, $\approx 20\%$ oxidation of heme a_3 should happen faster than $3 \mu\text{s}$ and presumably faster than 30 ns , because no additional ET had been observed in Einarsdóttir and coworkers’ (14) work with 30-ns time resolution (24, 25). In this view, the intrinsic inter-heme ET rate should be in the subnanosecond–nanosecond time regime, as also predicted by the semiempirical distance ruler of Dutton and coworkers (26). The slower $3\text{-}\mu\text{s}$ phase would then result from a secondary effect that modifies the redox equilibrium between the two hemes.

This view was subsequently challenged by Brzezinski and coworkers (4). From their failure to observe nanosecond ET-attributable phases with a temporal resolution of 10 ns , and from the spectral properties of the “photolysis” spectra, they concluded that all interheme ET occurs in microseconds. In the present work, we carefully explored the timescale up to 4 ns with femtosecond time resolution in both α and Soret spectral regions upon selective excitation of carbonmonoxy-heme a_3 . We present clear evidence for nanosecond ET upon photolysis from the MV-CO complex. In addition, the influence of steady-state spectral interactions between the two hemes on the CO dissociation spectrum is established, implying that the two hemes cannot be strictly treated as independent entities.

Materials and Methods

Sample Preparation. The protein was purified from beef heart mitochondria by using van Buuren’s method (27) with minor modifications. CcO was solubilized in 0.1% β -dodecyl-maltoside/ 50 mM Tris, pH 7.4, and then stored at -80°C . The sample was thoroughly degassed in a gas-tight vessel, and $\approx 100 \mu\text{l}$ was transferred to a degassed gas-tight optical cell (Hellma, Müllheim, Germany; 117.007 QS, optical path length, 1 mm) sealed with a rubber septum. Two-electron reduced MV CcO was obtained by overnight incubation of the protein in 1 atm ($1 \text{ atm} = 101.3 \text{ kPa}$) CO at 4°C . For the FR CO-bound complex, the sample was thoroughly degassed and 20 mM sodium dithionite (identical spectroscopic results were obtained by using 10 mM sodium ascorbate) was added as reductant and equilibrated with 1 atm CO. The redox state of the proteins was followed by absorption spectroscopy by using a Shimadzu 1601 UV-VIS spectrophotometer. The enzyme concentrations were 45 and $150 \mu\text{M}$ for measurements in the Soret and α band, respectively. After each experiment, it was spectroscopically verified that the redox state was unchanged.

Experimental Procedures. Multicolor transient absorption pump-probe spectroscopy (28) was performed with a 55-fs pump pulse centered at 590 nm and a $<30\text{-fs}$ white light continuum probe pulse, at a repetition rate of 30 Hz . The beams were focused in the sample to $\approx 50 \mu\text{m}$, yielding an excitation volume of $\approx 2 \text{ nl}$ per shot. The sample cell was translated at $\approx 1 \text{ Hz}$ and an amplitude of $\approx 2 \text{ cm}$, in a direction perpendicular to the beam. In this way, the excitation volume of subsequent pulse pairs did not overlap, and full rebinding of CO (occurring on the 10- to 30-ms timescale; ref. 24) between excitation of the same sample volume is assured.

The probe continuum was generated by using the fundamental beam of the laser system, which was centered at $\approx 615 \text{ nm}$. For this reason, the required low noise could not be obtained around 615 nm , and the α band data could be exploited in the spectral region $<606 \text{ nm}$. The probe beam is split into test and reference beams. The polarization of the pump pulse could be rotated with respect to that of the continuum probe pulse with a half-wavelength plate. In the α band experiments, noise due to scattering of the pump pulse was avoided by setting the polarization of the pump beam perpendicular to that of the probe beam and filtering the scattered light with a polarizer. The system was equipped with a delay line allowing temporal delays up to 4 ns (corresponding to an optical path-length difference of 1.2 m). The alignment of the delay line was verified by using CO-myoglobin. Full spectra of the test and reference beams were recorded by using a combination of a polychromator and a charge-coupled device camera. During each experiment, data were accumulated corresponding to $\approx 10^5$ pulse pairs in the whole sample volume. All experiments were carried out at 21°C .

Data Analysis. Basic data matrix manipulations and presentation were done with MATLAB (Mathworks, Natick, MA). The absorbance changes were treated by using the SPL YMOD algorithm (29), with a MATLAB interface developed by Morgan and Verkhovskiy and detailed in ref. 30. Singular value decomposition was used to subtract baseline fluctuations in some cases.

Results

We recorded optical absorbance changes after CO photolysis in the FR and MV states of CcO on the timescale up to 4 ns . In the case of the FR enzyme, spectral changes associated with the subpicosecond (31) and presumably ballistic (32) transfer of CO to CuB and the full decay of the excited states of both hemes in $<30 \text{ ps}$ have been described (32, 33). In the following, we will refer to the spectrum following these decay phases as the photolysis spectrum and focus on the subsequent spectral evolution. The overview of the transient spectra of Fig. 1 clearly shows that for MV, there is significant spectral evolution after photolysis, whereas for FR, the spectrum hardly changes, implying a significant difference in the dynamics involving the hemes.

Photolysis Spectra. To be able to take into account photoselection effects, the experiments in the Soret region were performed under both parallel (ΔA_{\parallel}) and perpendicular (ΔA_{\perp}) polarization of the pump pulse with respect to the probe pulse. Generally, for hemes, because of the near two-fold symmetry of the porphyrin ring, the two in-plane optical transitions are thought to be close-lying or “degenerate”, and therefore the polarization effects are expected to be small. For FR, small differences were observed in the photolysis spectrum (data not shown). The extrema of the spectra were at the same positions, but the isosbestic points were shifted by $\approx 1 \text{ nm}$. At the extrema, $\Delta A_{\parallel}/\Delta A_{\perp} = 1.14$, close to the value reported for dissociated carboxy-myoglobin, but somewhat lower than the theoretical value for planar (two-fold degenerate) optical transitions of $4/3$ (34). These findings indicate that the two transitions composing the Soret band of heme a_3 are not completely degenerate,

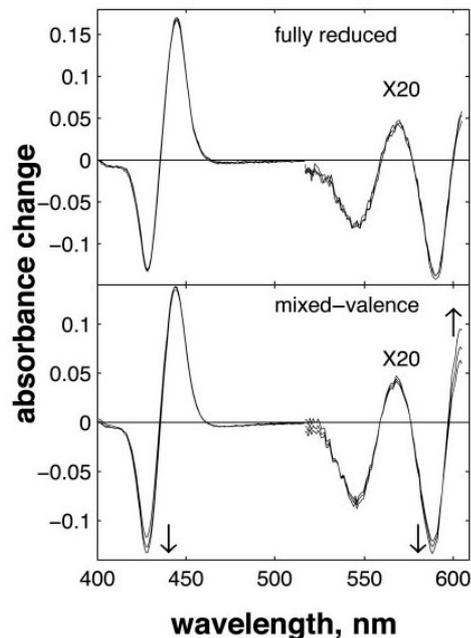


Fig. 1. Evolution of the spectrum after CO photolysis in the FR (Upper) and MV (Lower) states of CcO. Time points: 40 ps, 1 ns, and 4 ns. Pump and probe pulses were perpendicular. The α band region measurements, obtained in separate experiments, were normalized to the Soret band experiments by using an overlapping region near 550 nm and multiplied by 20.

indicating asymmetry in the heme environment. Interactions between the optical transitions of hemes a and a_3 (see below) may also contribute to these observations. Unfortunately, scattering from the pump-pulse around 590 nm precludes collection of high-quality spectra under parallel polarization conditions over the whole α band region, and a similar assessment of polarization effects was not possible.

Significantly larger differences in spectral shape were found between CO photolysis spectra of the FR and MV states of CcO (Fig. 2). To eliminate polarization effects, here the data are isotropically represented as $\Delta A_{\text{iso}} = (\Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp})/3$, corresponding to magic angle configuration. To take into account incomplete formation of the MV state (a small fraction remained oxidized and did not contribute to the signal at $t > 30$ ps), the spectra were normalized at the absorption minimum at 428 nm. Even though the spectra coincide in the blue region, differences are observed at $\lambda > 440$ nm, as shown in Fig. 2 Lower. This difference spectrum deviates strongly from that expected for $a_3 \rightarrow a$ ET, which should have its main features at $\lambda < 440$ nm (see below). Thus, whereas interheme electron equilibration appears insignificant before 30 ps, considerable spectral differences are observed in the ($a_3^{2+} - a_3^{3+} - \text{CO}$) photolysis difference spectrum. Hence, the redox state of heme a influences this spectrum, an observation pointing to spectral interactions between the two hemes; i.e., the charges on each heme contribute to the electronic absorption spectrum of the other heme, and the electronic structure of the aa_3 complex cannot be strictly considered as that of the sum of the individual hemes. Similar spectral interactions have been proposed (35) from variations in the spectra of heme a under different configurations of the active site and from variations in the spectrum associated with CO migration out of the active site under different redox state of heme a and Cu_A (25).

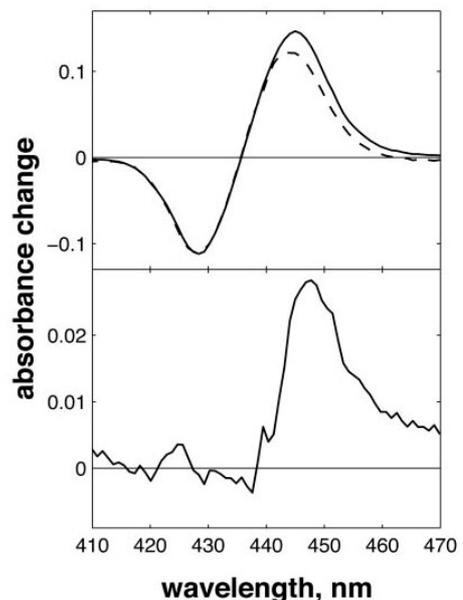


Fig. 2. CO photolysis spectra in CcO, obtained from extrapolating global fits to the data at $t > 30$ ps to $t = 0$. (Upper) CO photolysis spectra in FR (solid line) and MV (dashed line) states, normalized at 428 nm. Both spectra are calculated to be isotropic $((\Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp})/3)$. (Lower) the difference spectrum.

Spectral Evolution and ET. For the case of the FR enzyme, after photolysis, the kinetics at all wavelengths stay almost unchanged during the whole time span of 4 ns (Fig. 3, filled circles). Only in the Soret region, a small but reproducible, yet unassigned, phase with a time constant 100–200 ps was observed. The maximal amplitude of this phase was more than five times smaller than that of the 1.2-ns phase observed in MV-CO (see below). By contrast, in the case of the MV enzyme, we observed a substantial evolution of the spectrum on this timescale (Figs. 1 and 3, open circles). By fitting these data separately in the Soret and α regions, using a global multiexponential procedure, we found that they can be adequately described by a single exponential component of 1.2 ns in both spectral regions. The spectral shape of the nanosecond component is shown as dots in Fig. 4. We modeled this spectrum as a ($a_3^{2+} - a_3^{3+} - a_3^{2+} - a_3^{3+}$) difference spectrum, i.e., assuming that heme a_3 is oxidizing and heme a

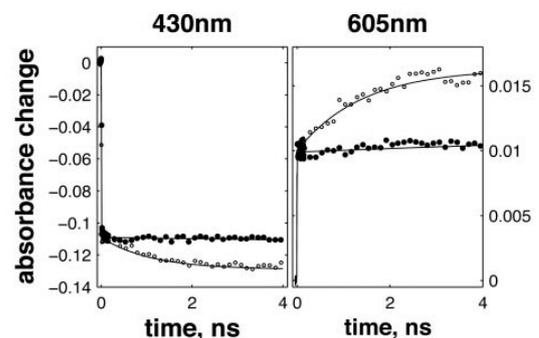


Fig. 3. Kinetics after photolysis of CO at 430 nm (Left) and at 605 nm (Right) of the FR (filled circles) and MV (open circles) state of CcO, normalized at $t = 30$ ps.

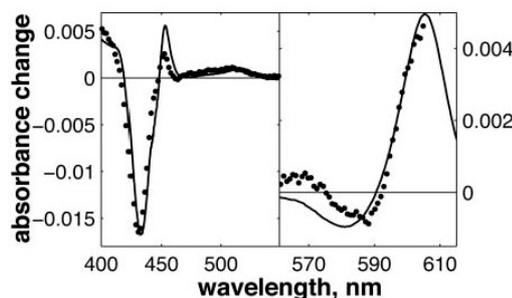


Fig. 4. The spectrum of the 1.2-ns component in the Soret (Left) and α (Right) regions is represented as dots. The solid line is the calculated difference spectrum heme a_3 – heme a . The estimated extent of the ET between hemes is 11–16%.

reducing with a 1:1 ratio, using the basis set of the a and a_3 hemes absorbance from Liao and Palmer (36). The best correspondence between the experimental and the model spectra was obtained by assuming a quantum yield of this ET process of 11% for the α band and 16% for the Soret band, as determined by normalizing the corresponding photodissociation spectra to the steady-state photodissociation spectra. The difference in the calculated extent of heme a reduction in the two spectral regions may be due to photoselection effects, differences between steady-state and time-resolved difference spectra that influence the normalization involving the CO dissociation spectrum, and interactions among hemes (see below).

The striking similarity of the measured 1.2-ns component and the model spectrum implies that the component can safely be ascribed to $a_3 \rightarrow a$ ET. The determined extent of ET implies that after CO dissociation (and when CO is presumably bound to Cu_B), the difference in free energy between the states $a^{2+}a_3^{2+}$ and $a^{3+}a_3^{2+}$ is 45–55 meV.

Discussion

Using sensitive pump-probe transient absorption spectroscopy with a time window out to several nanoseconds, and the concept of back-flow ET, we have been able to establish the intrinsic timescale of electron injection into the active site of CcO at 1.2 ns. This value probably corresponds to the highest rate directly established for a physiological ET reaction in a nonnaturally photoactivatable system.

ET on the nanosecond timescale in bovine CcO was predicted indirectly, by comparing the transient absorption spectra in the α band region after CO photolysis from the FR and MV states measured with submicrosecond time resolution (3). These spectral differences were confirmed, their assessment extended to the Soret region, and the timescale of the spectra trimmed down to ≈ 10 ns (at -20°C) by Namslauer *et al.* (4). These authors did not observe spectral evolution on the supra-10-ns timescale and mentioned that they could not observe any absorption changes associated with ET on a timescale below 600 ps using femtosecond spectroscopy. Our present assessment that the “missing” ET component has a time constant of 1.2 ns can be considered consistent with these findings, because it falls in the time-window gap not investigated in ref. 4. However, we clearly do not share their conclusion that no submicrosecond interheme ET occurs. The relatively small amplitude of the experimentally measured component, compared with that of the CO photolysis spectrum (Fig. 1), may additionally have played a role in the difficulty to assess this phase.

We modeled the spectral shape of the determined component using a basis set of heme a and heme a_3 steady-state reduced-minus-oxidized difference spectra. Several different decomposi-

tions were discussed by Namslauer *et al.* (4) in the framework of their different FR-CO and MV-CO transient spectra on a much longer timescale but were judged not to correspond well with interheme ET as an origin. Presumably, this is due to the added complexity of spectral interactions, as documented (25, 35), and as witnessed to play a role in the heme a_3 photodissociation spectra in a direct way by our CO photolysis spectra (Fig. 2).

The spectrum associated with the 1.2-ns component and the corresponding model spectrum display considerable differences from that of the 3- μs component (23) also ascribed to interheme electron equilibration. As will be discussed below, these differences can be well understood in terms of synchronous CO migration associated with the latter phase, a finding that further strengthens the assignment of the 1.2-ns phase.

The scheme of Fig. 5 summarizes the interpretation of our findings. Initially, heme a_3 and Cu_B are the only reduced cofactors. Light-induced transfer of CO from heme a_3 to Cu_B (in < 1 ps; ref. 31) lowers the effective midpoint potential of heme a_3 to a value close to that of heme a . Subsequently, redistribution of the electron density takes place by partial ET from heme a_3 to heme a , in 1.2 ns. Our experiments indicate that this phase corresponds to oxidation of 11–16% of the initially reduced heme a_3 . Assuming that the 1.2-ns phase corresponds to full equilibration, this implies that the equilibrium constant K is ≈ 6 –9, and that the difference in free energy ΔG^0 between the states $a^{3+}a_3^{2+}$ Cu_B-CO and $a^{2+}a_3^{2+}$ Cu_B-CO amounts to ≈ 45 –55 meV. The measured equilibration rate of $(1.2 \text{ ns})^{-1}$ corresponds to the sum $k_{\text{for}} + k_{\text{back}}$ of the microscopic rate constants of forward ($a \rightarrow a_3$) and backward ($a_3 \rightarrow a$) ET and $K = k_{\text{for}}/k_{\text{back}}$. Taking these together, we determine k_{for} and k_{back} at $(1.4 \text{ ns})^{-1}$ and $(10 \text{ ns})^{-1}$, respectively. We conclude that the microscopic time constant of heme a_3 reduction by heme a is ≈ 1.4 ns.

Origin of the Previously Established Microsecond ET Component.

As mentioned in the Introduction, an additional well established further equilibration phase, corresponding to oxidation of $\approx 25\%$ of heme a_3 , occurs with a time constant 3 orders of magnitude longer, $\approx 3 \mu\text{s}$ (22, 23). However, the spectral characteristics of this phase (23) differ significantly from the one assessed here as intrinsic equilibration and cannot be well described (4) by the model spectra of Liao and Palmer (36) used here. Under the hypothesis of the now-established 1.2-ns intrinsic equilibration time, Verkhovsky *et al.* (3) suggested that this phase is related either to a very slow protein relaxation or to CO migration out of the active site. For reasons outlined below, we favor the latter suggestion, as indicated in the right-most box of Fig. 5.

In the FR-CO complex, transient IR spectroscopy has shown that the Cu_B-CO bond is broken, and CO is presumably released by the protein, with a time constant of $\approx 1.5 \mu\text{s}$ (37). Einarsdóttir and coworkers (24) have shown that this phase is accompanied by a small shift in the optical spectrum of the $a^{2+}a_3^{2+}$ state, presumably mostly due to the heme a_3 contribution, which is located closest to Cu_B. Assuming that similar CO release in the MV-CO complex takes place in 3 μs and gives rise to a similar spectral shift,† the total 3- μs spectral component can be described by adding this spectral shift to the “pure” ET component. This has been done by Namslauer *et al.* (ref. 4, figure in supporting information), where the ≈ 1.5 - μs phase in the FR enzyme was added to the 3- μs component in the MV, and this sum was compared with different steady-state decompositions of heme absorbance. Fig. 6 shows that with the opposite approach, adding the ≈ 1.5 - μs phase from ref. 24 to our measured nanosecond component compares favorably with the 3- μs ET phase shown in ref. 4. Thus, electron equilibration and CO migration would occur simultaneously, most likely because the free

†It is reasonable to assume that the spectral effect mostly affects the spectrum of heme a_3 , which lies closest to Cu_B, and therefore the effect to be similar for the FR and MV states.

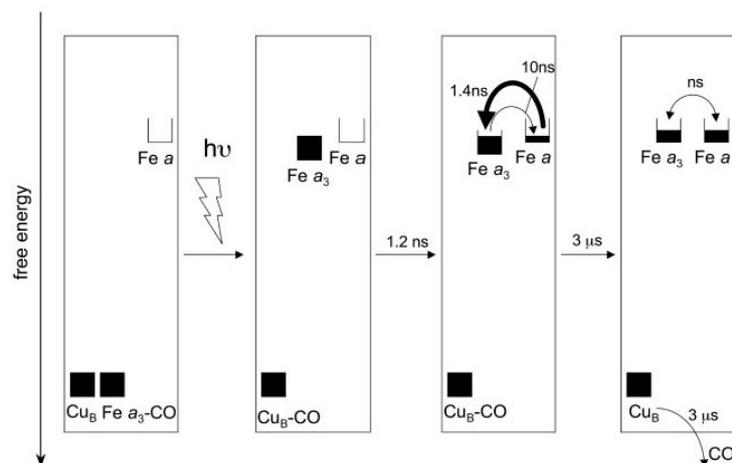


Fig. 5. Scheme summarizing our findings. The boxes reflect filling of the reduced forms of the redox centers. Starting from the MV-CO complex, CO photolysis from heme a_3 results in its binding to Cu_B and a rise of the effective midpoint potential of heme a_3 . Electron redistribution between the two hemes according to the new equilibrium occurs in 1.2 ns. We suggest that the previously observed 3- μ s ET phase (transition to rightmost box) reflects a modest change in redox equilibrium due to CO migration out of the active site.

energy gap between the states $a^{3+}a_3^{2+}$ and $a^{2+}a_3^{3+}$ would be lowered by CO migration. Because intrinsic equilibration is on the nanosecond timescale, this implies that this ET phase closely follows CO migration. Altogether, this proposal thus offers a consistent spectral interpretation of the ensemble of interheme ET phases observed after the photolysis of the MV-CO complex. Determination of the microsecond CO migration kinetics in the MV complex by infrared spectroscopy could further test this proposition.

In this view, the 3- μ s ET phase can thus be considered as an additional equilibration phase related to the need to use CO to initiate the reaction.

Mechanism of ET. The rate k of intraprotein ET can be described, in the nonadiabatic limit, as factorized into electronic and nuclear terms:

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} V^2 FC, \quad [1]$$

where V is the electronic matrix coupling element, and FC is the Frank-Condon factor, describing the influence of the nuclear motions. In the classical Marcus description,

$$FC = \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda k_B T}\right), \quad [2]$$

where λ is the reorganization energy, k_B the Boltzmann factor, and T the temperature (38). The nuclear coupling V decreases strongly with distance between redox centers.

Different approaches have been used to estimate V and therewith the rate. One is to consider the protein as a homogeneous material and describe $V = V^0 \exp(-\beta r)$, where r is the edge-to-edge distance of the redox partners. This approach, applied to a compilation of biological ET reactions, led to the semiempirical "ruler" advocated by Moser, Dutton, and coworkers (26, 39, 40), which directly correlates distance and optimal (activationless, $\Delta G^0 = -\lambda$) rate. Using this ruler and the interheme edge-to-edge distance of 4.7 Å (8), the thus-found optimal rate is $\approx (1 \text{ ps})^{-1}$. This value is ≈ 3 orders of magnitude faster than the observed rate. The difference could then be ascribed to substantial reorganization energy. Indeed, $\lambda = 0.7 \text{ eV}$ was invoked by Verkhovsky *et al.* (3) to predict a rate of $(1.4 \text{ ns})^{-1}$, exactly the rate that we observe. However, we note that the rather large value of 0.7 eV for λ is obtained from the temperature dependence of the $\approx 3\text{-}\mu\text{s}$ interheme ET equilibration phase (5, 41). If this phase is controlled by CO dissociation from Cu_B and migration out of the protein, as discussed above, then the temperature dependence reflects the activation barrier for CO dissociation from Cu_B rather than the ET reaction itself. In

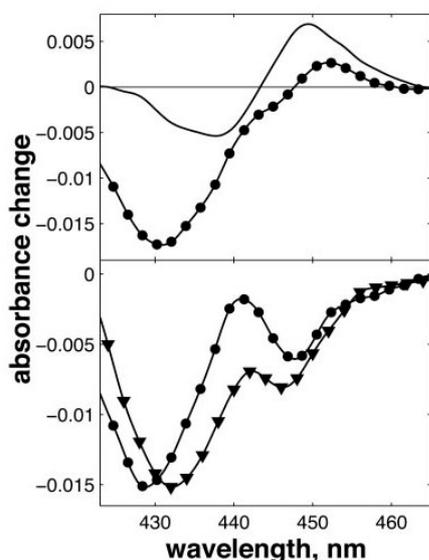


Fig. 6. Simulation of this spectrum associated with the 3- μ s ET phase. (Upper) Solid line, the 1.5- μ s phase in FR CcO taken from ref. 24; circles, the 1.2-ns ET component measured in the MV complex, taken from Fig. 4. The amplitude ratio between two phases was taken as 100% for the 1.5- μ s FR phase and 25% for the 1.2-ns phase. (Lower) The sum of the 1.2-ns phase and the inverse (the sign convention in ref. 24 is the inverse of ours) of the 1.5- μ s phase (circles) and the spectrum of the 3- μ s ET phase shown in ref. 4. Solid lines between points are splines to guide the eye.

this case, the extremely close agreement between the thus-predicted (3) and measured (our work) rates may be fortuitous.

A more "intimist" approach to estimate the coupling V is to identify and calculate explicitly through-bond and through-space ET pathways between donor and acceptor (42). This strategy has been applied to interheme ET in CcO by several groups (5–7). Medvedev *et al.* (6) identified two major ET pathways, one major involving protein residues and one direct, and calculated the rate at $(17 \mu\text{s})^{-1}$. Because this rate was obtained assuming a large λ (0.76 eV) (see above), the optimal rate could be ≈ 2 orders of magnitude faster, bringing it closer to, but still 2 additional orders of magnitude slower than, the measured rate. A very similar optimal rate of $(140 \text{ ns})^{-1}$ was calculated by Regan *et al.* (5) from a model including three through-protein pathways. Very recently, Tan *et al.* (7) combined pathway analysis and molecular dynamics simulations. By thus including the effect of thermal motions, the dominant pathway was found to be direct through-space interheme transfer. The estimated optimal rate of $(3 \text{ ns})^{-1}$ from this work is in remarkably good agreement with our experimental rate of $(1.4 \text{ ns})^{-1}$. Future work on the temperature dependence of this ET step may allow verification of the correspondingly predicted near-activationlessness of the reaction.

Potential Functional Implications. One might question the functional relevance of the final step of electron injection into the binuclear site being orders of magnitude faster than discrete established steps of the catalytic cycle of CcO. Under physiological turnover conditions, before oxygen binding, the enzyme is more likely near the two-electron reduced form than near the FR form (43). Oxygen can bind only to reduced heme a_3 . For the two-electron reduced form, one electron resides on CuB, and one is in equilibrium between hemes a and a_3 , which operate at very close redox potential. We can assume that O_2 is efficiently trapped if heme a_3 is in the reduced

form at any time during the dwell time of a passage of unbound oxygen in the active site. If electron equilibration is slow compared with this dwell time, the trapping rate will be equal to the frequency of O_2 passages to the active site multiplied by the $[a^{3+}a_3^{3+}]/([a^{3+}a_3^{2+}] + [a^{2+}a_3^{3+}])$ equilibrium constant. However, if electron equilibration is fast compared with this dwell time, the trapping rate will be equal to the frequency of O_2 passages to the active site. Hence, once O_2 is bound, the electron will remain on heme a_3 until O_2 is released or reduced, but to optimize the overall chances of trapping O_2 after its passage to CuB (44) under conditions of limited O_2 availability, it may appear useful that interheme electron equilibration is much more rapid than microseconds. In this context, we note that it has been shown that intrinsic transfer of O_2 from CuB to heme a_3 , a reaction competing with O_2 migration out of the protein, occurs faster than $1 \mu\text{s}$ (44).

On the same note, one might even speculate that the efficiency of initial reduction of the active site, which is gated by the arrival of a proton (45), benefits from rapid ET to the active site to stabilize the new state.

Conclusion

We have demonstrated that, in bioenergetic systems, very fast and functional intraprotein ET reactions are not restricted to photosynthetic systems. This notion may help to construct realistic models of the coupling and temporal adaptation of these reactions to other functional, and also often not time-resolved, intraprotein events, such as proton translocation and substrate transport toward the active site. Because the intrinsic timescale of global protein motions guiding such events is (sub)picosecond, even faster ET reactions than the one elucidated in this work may be expected to play a role.

A.J. is the recipient of a long-term fellowship from the European Molecular Biology Organisation.

- Vos, M. H. & Martin, J.-L. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 1–20.
- Sundström, V. (2000) *Prog. Quant. Electron.* **24**, 187–238.
- Verkhovskiy, M. I., Jasaitis, A. & Wikström, M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1506**, 143–146.
- Namslauer, A., Branden, M. & Brzezinski, P. (2002) *Biochemistry* **41**, 10369–10374.
- Regan, J. J., Ramirez, B. E., Winkler, J. R., Gray, H. B. & Malmström, B. G. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 35–48.
- Medvedev, D. M., Daizadeh, I. & Stuchebrukhov, A. A. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6571–6582.
- Tan, M.-L., Balabin, I. & Onuchic, J. N. (2004) *Biophys. J.* **86**, 1813–1819.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Takashi, T., Yamaguichi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136–1144.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. & Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660–669.
- Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tomroth, S., Brzezinski, P. & Iwata, S. (2002) *J. Mol. Biol.* **231**, 329–339.
- Hill, B. C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 2219–2226.
- Kobayashi, K., Une, H. & Hayashi, K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7976–7980.
- Nilsson, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6497–6501.
- Kotlyar, A. B., Hazani, M., Borovok, N., Szundi, I. & Einarsdóttir, O. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5805–5809.
- Brzezinski, P. & Wilson, M. T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6176–6179.
- Verkhovskiy, M. I., Morgan, J. E., Puustinen, A. & Wikström, M. (1996) *Nature* **380**, 268–270.
- Wikström, M., Verkhovskiy, M. I. & Hummer, G. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1604**, 61–65.
- Boelens, R. & Wever, R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **547**, 296–310.
- Boelens, R., Wever, R. & Van Gelder, B. F. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 264–272.
- Brzezinski, P. & Malmström, B. G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **894**, 29–38.
- Morgan, J. E., Li, M. P., Jang, D.-J., El-Sayed, M. A. & Chan, S. I. (1989) *Biochemistry* **28**, 6975–6983.
- Oliveberg, M. & Malmström, B. G. (1991) *Biochemistry* **30**, 7053–7057.
- Verkhovskiy, M. I., Morgan, J. E. & Wikström, M. (1992) *Biochemistry* **31**, 11860–11863.
- Georgiadis, K. E., Jhon, N.-I. & Einarsdóttir, O. (1994) *Biochemistry* **33**, 9245–9256.
- Einarsdóttir, O., Georgiadis, K. E. & Sucheta, A. (1995) *Biochemistry* **34**, 496–508.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. & Dutton, P. L. (1999) *Nature* **402**, 47–52.
- Martin, J.-L. & Vos, M. H. (1994) Ph.D. thesis (Univ. of Amsterdam, Amsterdam).
- Provencher, S. W. & Vogel, R. H. (1983) in *Numerical Treatment of Inverse Problems in Differential and Integral Equations*, eds Deuffhard, P. & Hairer, E. (Birkhäuser, Boston), pp. 304–319.
- Morgan, J. E., Verkhovskiy, M. I., Puustinen, A. & Wikström, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 15633–15637.
- Dyer, R. B., Peterson, K. A., Stoutland, P. O. & Woodruff, W. H. (1994) *Biochemistry* **33**, 500–507.
- Liebl, U., Lipowski, G., Négrier, M., Lambry, J.-C., Martin, J.-L. & Vos, M. H. (1999) *Nature* **401**, 181–184.
- Stoutland, P. O., Lambry, J.-C., Martin, J.-L. & Woodruff, W. H. (1991) *J. Phys. Chem.* **95**, 6406–6408.
- Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J.-L., Zhang, J., Gennis, R. B., Konstantinov, A. A. & Vos, M. H. (2002) *Biochemistry* **41**, 1654–1662.
- Blair, D. F., Bocian, D. F., Babcock, G. T. & Chan, S. I. (1982) *Biochemistry* **21**, 6928–6935.
- Liao, G. L. & Palmer, G. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1274**, 109–111.
- Dyer, R. B., Einarsdóttir, O., Killough, P. M., López-Garriga, J. J. & Woodruff, W. H. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7657–7659.
- Marcus, R. A. & Sutin, N. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 265–322.
- Möser, C. C. & Dutton, P. L. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 171–176.
- Möser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S. & Dutton, P. L. (1992) *Nature* **355**, 796–802.
- Adelroth, P., Brzezinski, P. & Malmström, B. G. (1995) *Biochemistry* **34**, 2844–2849.
- Onuchic, J. N., Bertran, D. N., Winkler, J. R. & Gray, H. B. (1992) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 349–377.
- Mancada, S. & Erusalimsky, J. D. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 214–220.
- Bailey, J. A., James, C. A. & Woodruff, W. H. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 1055–1060.
- Verkhovskiy, M. I., Morgan, J. E. & Wikström, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 7482–7491.

Résumé de thèse

Les cytochrome *c* oxydases (CcO), situées dans les chaînes respiratoires eucaryotes et des bactéries aérobiques, catalysent la réduction de l'oxygène en eau, une réaction qui utilise quatre électrons et quatre protons. Ces complexes protéiques membranaires participent également à la formation de la force protonmotrice nécessaire à la synthèse d'ATP, en pompant quatre protons supplémentaires par molécule de dioxygène réduit. Le site actif des CcO aa_3 contient un hème de type *a* de haut spin, l'hème a_3 , et un atome de cuivre, le Cu_B . Ces deux cofacteurs peuvent fixer, outre l'O₂, d'autres ligands diatomiques impliqués dans la signalisation tel que le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO). Les travaux présentés dans ce manuscrit, effectués sur l'oxydase mitochondriale et sur des oxydases bactériennes, aa_3 et ba_3 , concernent à la fois l'interaction de ligands avec la CcO et le transfert interne d'électrons. Les oxydases étudiées possèdent quatre centres redox, l'hème a_3 et le Cu_B ainsi que l'hème *a* (resp. *b* pour ba_3) et le centre Cu_A , impliqués dans le transfert d'électron (ET) du donneur, le cytochrome *c*, à l'accepteur, l'oxygène fixé au site actif.

L'inhibition réversible de la CcO par le NO est un processus de régulation de la respiration. En étudiant l'influence de la concentration de NO sur la dynamique du NO au sein des oxydases aa_3 de *P. denitrificans* et ba_3 de *T. thermophilus* nous avons mis en évidence une interaction entre plusieurs ligands dans le site actif. Pour l'oxydase aa_3 , la recombinaison géminée du NO, après sa photodissociation de l'hème a_3 , a lieu selon deux phases de 200 ps et 20 ns, dont l'intensité augmente pour les concentrations de NO superstoichiométriques. A l'inverse, aucun effet de la concentration n'est observé pour l'oxydase ba_3 où l'activité NO réductase de cette CcO exclut la présence stable de deux molécules de NO dans le site actif. L'ensemble de ces résultats converge vers la présence d'une seconde molécule de NO dans ou à proximité du site actif dans l'oxydase aa_3 , créant un encombrement favorisant une recombinaison géminée plutôt qu'un cheminement vers l'extérieur de la protéine.

Des expériences de spectroscopie RPE ont été effectuées afin de déterminer la nature du second site de fixation du NO. La modification du signal avec la concentration de NO est observée uniquement pour l'oxydase aa_3 . Si le spectre à basses concentrations (NO:CcO <1:1), très similaire à celui obtenu avec l'oxydase ba_3 , est caractéristique de la liaison du NO sur un hème ayant pour 5^{ème} ligand une histidine, le spectre enregistré à hautes concentrations est similaire à celui mesuré lorsque NO est lié à un hème sans autre ligand en trans. Comme le spectre visible de l'oxydase n'indique pas une rupture de la liaison Fe-N_εHis, nous proposons que la 2nd molécule de NO induise une rotation du NO lié à l'hème depuis une position parallèle au plan de l'histidine à une position perpendiculaire à ce plan, rompant ainsi les interactions paramagnétiques entre l'histidine et le NO. Cette interprétation est renforcée par des modélisations de la structure de l'oxydase aa_3 avec un et deux molécules de NO dans le site actif. Elles montrent qu'en effet la présence d'un second NO, lié au Cu_B dans le site actif, induit une rotation du NO lié à l'hème de ~70°. Par ailleurs, à hautes concentrations de NO, il y a apparition d'un signal caractéristique d'une interaction métal de transition-NO, qui peut être attribué, par élimination, à la liaison Cu_B -NO. L'établissement de la présence simultanée de deux molécules de NO dans le site actif de la CcO aa_3 de *P. denitrificans* dès les faibles concentrations de NO, ouvrent de nouvelles voies dans la compréhension des mécanismes d'inhibition de l'oxydase par le NO.

Afin d'étudier plus en détail l'influence de l'environnement du site actif sur la dynamique du NO dans le site actif, le résidu V279 a été substitué par mutagenèse dirigée. Les premiers résultats sur des souches exprimant les oxydases mutées indiquent des modifications de leur activité O₂ réductase.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la vitesse de réduction du site actif par l'hème *a*. Cette réaction étant trop rapide pour être visualisée par injection d'électrons, nous avons étudié le flux des électrons en sens inverse. Ces expériences ont été effectuées sur l'oxydase mitochondriale dont l'hème *a* était oxydé et l'hème a_3 réduit et lié une molécule de CO. Après photodissociation du CO de l'hème a_3 , les électrons se répartissent entre les deux hèmes de potentiel redox proche. Par spectroscopie, nous avons ainsi mesuré que 13 ± 3 % de ce transfert s'effectue en 1,2 ns; ce temps correspond au transfert intrinsèque. Des études précédentes avaient montré une phase de 3 μs, considérée jusqu'ici comme la phase la plus rapide du ET entre les hèmes. Au regard de nos résultats, cette phase de ET peut être expliquée par le départ du CO du Cu_B , ce qui modifierait le potentiel redox de l'hème a_3 . Le transfert intrinsèque des électrons en 1,2 ns, permettrait à l'oxydase, dans des conditions physiologiques ([O₂] faibles et e⁻ peu disponibles) de capturer et de réduire l'oxygène en diminuant la durées des périodes où le site actif n'est pas réduit.

Mots clés : Cytochrome *c* oxydase, oxyde nitrique, recombinaison géminée, transfert d'électrons, purification de protéines, spectroscopie résolue dans le temps, résonance paramagnétique électronique, modélisation moléculaire.

Thesis abstract

Cytochrome *c* Oxidase (CcO) membrane protein complexes catalyse the reduction of oxygen that takes place in the respiratory chains of eukaryotes and aerobic bacteria. During this reaction, that requires four protons and four electrons, four additional protons are pumped across the membrane and these participate in the formation of the protonmotive force that is required for ATP synthesis. The active site of CcO *aa*₃ contains a high-spin heme, heme *a*₃, and a copper atom, Cu_B. These cofactors can bind, apart from O₂, other diatomic molecules involved in signalling such as NO or CO. My thesis work concerns both CcO-ligand interactions and internal electron transfer (ET), in mitochondrial CcO and in bacterial oxidases *aa*₃ and *ba*₃. These oxidases accommodate four redox centres, heme *a*₃ and Cu_B as well as heme *a* (resp. *b* for *ba*₃) and Cu_A, involved in ET from the donor, cytochrome *c* to the acceptor, the oxygen bound to the active site.

The reversible inhibition of CcO by NO is involved in the regulation of respiration. By studying the influence of the NO concentration on the dynamics of NO in the oxidases *aa*₃ from *P. denitrificans* and *ba*₃ from *T. thermophilus*, we have demonstrated that multiple ligands interact in the active site. For *aa*₃, geminate recombination of NO, after its photodissociation from heme *a*₃, occurs in two phases of 200 ps and 20 ns. The amplitude of this phase increases with supra-stoichiometric NO concentrations. In contrast, no effect of the NO concentration is observed for oxidase *ba*₃, where the NO-reductase activity prevents the stable copresence of two NO molecules. Altogether, these results imply that a second NO molecule can be accommodated in/near the active site of CcO *aa*₃ favouring geminate recombination of the first NO molecule, rather than its motion out of the protein.

In order to determine the nature of this second NO-binding site, EPR experiments were performed. A spectral change as a function of the NO concentration was only observed for *aa*₃ oxidase. At low concentrations (CcO:NO <1:1), the signal, very similar to that of *ba*₃, is specific for an NO molecule bound to a histidine coordinated heme. However, at higher concentrations, the spectrum resembles that of a five coordinated nitrosylated heme. As the visible spectrum does not indicate a rupture of the heme-N_εHis bond, we propose that the second NO molecule induces a rotation of the heme-bound NO from an orientation parallel to the histidine ring to a more perpendicular one. Such a rotation would disrupt the paramagnetic interaction between the histidine ring and NO. Our interpretation is strengthened by molecular modelling studies of the active site of CcO *aa*₃, with one and two NO molecules bound. These studies indicated that the presence of a second NO molecule, bound to Cu_B, induces a ~70° rotation of the heme-bound NO. In addition, at high NO concentrations, a signal characteristic of an NO-metal interaction appears that can be attributed to Cu_B. The assessment of the simultaneous presence of two NO molecules in the active site of CcO *aa*₃, even at low NO concentrations, has implications for understanding the mechanism of CcO inhibition by NO.

In order to study the influence of the active site environment modifications on NO dynamics, the amino acid V279 has been substituted. Preliminary studies of strains expressing the mutants indicate modification of their O₂ reductase activities.

Along a different line, we investigated the reduction kinetics of the active site by heme *a*. As this reaction occurs too fast to be observed by electron injection into the system, we studied reverse electron transfer. The experiments were performed on mammalian CcO *aa*₃ with heme *a* oxidised, heme *a*₃ reduced and CO-bound. After the cleavage of the CO-Fe bond by a light pulse, the electrons can equilibrate between the two hemes which have close-lying redox potentials. Spectroscopically, we measured that 13 ± 3 % of this transfer takes place in 1.2 ns; this time corresponds to the intrinsic transfer. The fastest rate previously measured for interheme ET in CcO was 3 μs. In the light of our results, this phase can be explained by a modification of the heme *a*₃ redox potential due to CO leaving Cu_B. The very fast electron exchange determined between the two hemes may help to increase the oxygen trapping efficiency under physiological conditions ([O₂] low and weak e⁻ flux), by decreasing the duration of the periods where heme *a*₃ is not reduced.

Key words:

Cytochrome *c* Oxidase, nitric oxide (NO), protein purification, geminate recombination, electron transfer (ET), time resolved spectroscopy, electrons paramagnetic resonance (EPR), molecular modelling.