STÉPHANIE GÉLINAS

CARACTÉRISATION DES COMPLEXES OXYGÉNÉS GÉNÉRÉS PAR L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE INDUCTIBLE (INOS)

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Biochimie pour l'obtention du grade de Maître és sciences (M. Sc)

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE FACULTÉ DE SCIENCES ET DE GENIE UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC

2007

© Stéphanie Gélinas, 2007

Résumé

L'oxyde nitrique (NO), un important messager biologique, est biosynthétisé par une hémoprotéine nommée Oxyde Nitrique Synthase (NOS). Il est produit par une réaction d'oxydation du groupement guanidino de la L-arginine en N[®]-hydroxy-L-arginine, qui est ensuite elle-même oxydée en NO et en L-citrulline. Chez les mammifères, deux types de complexes oxygénés formés durant la catalyse par les NOS ont été identifiés: hème-oxy 1 (Bande de Soret centrée à 420 nm) et hème-oxy 2 (Bande de Soret centrée à 430 nm). On sait que hème-oxy 2 possède un caractère ferrique superoxyde (Fe^{III}-O₂⁻), puisqu'il a déjà été caractérisé en spectroscopie de résonance Raman. Cependant, peu d'informations sont connues sur le complexe hème-oxy 1. Dans le but de caractériser la nature de complexe hème-oxy 1 ansi que certains intermédiaires impliqués dans le mécanisme de catalyse des NOS, ce dernier a été l'objet d'études en spectroscopie de résonance Raman.

Abstract

Nitric oxide (NO), an important biological messenger, is a gaseous free radical whose biosynthesis is catalysed by a flavo-heme enzyme named Nitric Oxide Synthase (NOS). NO is produced by the hydroxylation of a guanidino group of the substrate L-arginine to form the intermediate N^{ω}-hydroxy-L-arginine, which is then oxidized into NO and L-citrulline. Two distinct oxygenated complexes formed during catalysis have been identified for the three mammal NOSs. They were named heme-oxy 1 (Soret peak at 420 nm) and heme-oxy 2 (Soret peak at 430 nm). Heme-oxy 2 has been characterised by resonance Raman spectroscopy and described as a ferric superoxide complex (Fe^{III}-O₂) with a thiolate bound between the heme iron and the proximal cysteine. The nature of heme-oxy 1 has been discussed, but it has not yet been characterised. To get further knowledge into the nature of heme-oxy 1, we investigated this oxygenated complex by resonance Raman spectroscopy.

Avant-Propos

L'accomplissement d'un projet de maîtrise et la rédaction d'un mémoire demande beaucoup de temps et de travail. Bien que seulement mon nom soit écrit sur la page couverture, il implique également plusieurs personnes que je tiens à remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Manon Couture, pour son soutient et ses précieux conseils tout au long de mes études ma maîtrise.

Je tiens également à remercier François Chartier pour sa complicité et sa précieuse collaboration. Je tiens de plus à remercier Sébastien Blais, Mélanie Plante et Jérôme Lang pour leur aide toujours très appréciée.

Finalement, merci au Dr Michel Guertin et son équipe pour l'aide ainsi que pour l'équipement qui a permis de mener à bien ce projet.

Bien que les connaissances scientifiques aient été mises à profit lors de ces études, certaines personnes ont amené leur amour et amitié à ce projet, ce qui fut tout autant nécessaire!!!!

Tout d'abord, merci à mon conjoint, Dany Medeiros, qui par son amour et sa confiance m'a supportée d'une façon admirable! Je t'adore Dany!

Mes parents, Alain et Ginette, qui m'ont démontré plus d'une fois leur fierté et qui ont su si bien me mener où je suis aujourd'hui.

Mes amies (elles se reconnaîtront!!!) avec qui j'ai partagé de bons moments! Merci les filles!!

Finalement, un petit clin d'œil à mon grand-papa, Jean-Paul Houle, pour qui « je fabrique des remèdes pour nos petits bobos ». Le sentiment de fierté qu'il a démontré lorsqu'il m'a dit cela est un prix inestimable que m'ont apporté les études qui ont menées à la rédaction de ce mémoire.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	. iii
Avant-Propos	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des schémas	x
Liste des abréviations	xi
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 L'oxyde nitrique : synthèse et rôle biologique	1
1.1.1 L'oxyde nitrique (NO)	1
1.1.2 La biosynthèse du NO chez les mammifères	2
1.1.3 L'implication du NO dans les maladies cardiovasculaires et rénales	4
1.1.4 L'implication du NO dans la défense contre les cellules tumorales et agents	
infectieux.	6
1.1.5 L'implication du NO dans la transmission des influx nerveux	8
1.1.6 L'utilisation du NO à des fins thérapeutiques	.10
1.2 Les hémoprotéines	.13
1.2.1 Les protéines dont la molécule d'hème est coordonnée à un groupement	
imidazole	.13
1.2.2 Les protéines dont la molécule d'hème est coordonnée à un groupement lysine	;
ou tyrosine	.14
1.2.3 Les protéines dont la molécule d'hème est coordonnée à un résidu cystéine	.15
1.3 L'oxyde nitrique synthase : Composantes et structure	.16
1.3.1 Généralités sur les NOS	.16
1.3.2 Le domaine oxygénase des NOS de mammifères	.17
1.3.3 Le domaine réductase des NOS	.23
1.4 Le mécanisme de catalyse des NOS	.23
1.5 Les caractéristiques spectroscopiques des NOS	.27
1.5.1 Aspects théoriques de la spectroscopie de résonance Raman	.27
1.5.2 Le fer de l'hème sous sa forme ferrique et sous sa forme ferreuse	.30
1.5.3 Les complexes générés avec le NO chez les NOS	.32
1.5.4 Les complexes générés avec le CO chez la NOS	.35
1.6 Les complexes oxygénés générés par les NOS	.38
1.6.1 Leur rôle essentiel des complexes oxygénés dans le mécanisme de catalyse	.38
1.6.2 Le complexe oxygéné hème-oxy 1	.39
1.6.3 Le complexe oxygéné hème-oxy 2	.40
1.7 La nature des complexes oxygénés hème-oxy 1 et hème-oxy 2	.42
1.7.1 Les propriétés électroniques des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2	.42
1.7.2 Les propriétés électroniques du ligand proximal des complexes hème-oxy 1 et	
hème-oxy 2	.43
1.8 Objectifs	.44

Chapitre 2 Méthode expérimentale	.46
2.1 Les principaux composés chimiques utilisés pour les études	.46
2.2 Obtention de la COD-iNOSoxy purifiée	.46
2.2.1 Procédé d'expression et de purification de la COD-iNOSoxy	.46
2.2.2 Analyses quantitatives et qualitatives de la COD-iNOSoxy purifiée	.49
2.3 Études cinétiques en spectrométrie d'absorbance à l'aide d'un mélangeur à flux	
arrêté	.51
2.3.1 Spécificités de la technique et acquisition des données	.51
2.3.2 Analyse des données obtenues avec le mélangeur à flux arrêté	.55
2.4 La spectroscopie de résonance Raman	.56
2.4.1 L'étude de complexes stables en spectroscopie de résonance Raman	.56
2.4.2 La spectroscopie de résonance Raman couplée à un mélangeur en flux continu	159
Chapitre 3 Présentation des résultats obtenus	.63
3.1 Purification de la COD-iNOSoxy	.63
3.2 Détermination de la zone de stabilité en fonction du pH pour la COD-iNOSoxy	.67
3.3 Cinétiques de formation et de disparition des complexes oxygénés au mélangeur à	
flux arrêté	.69
3.3.1 Complexe oxygéné formé en absence de L-arginine et de bioptérine	.69
3.3.2 Complexe oxygéné généré en présence de H ₄ B uniquement	.76
3.3.3 Complexe oxygéné généré en présence de L-arginine uniquement	.83
3.3.4 Complexe oxygéné généré en présence de L-arginine et de H ₄ B	.87
3.4 Caractérisation des complexes Fe ²⁺ -CO en spectroscopie de résonance Raman	.93
3.5 Caractérisation des complexes oxygénés en spectroscopie de résonance Raman	.95
3.5.1 Le complexe oxygéné hème-oxy 2	.95
3.5.2 Le complexe oxygéné hème-oxy 1	.98
3.5.3 Le complexe avec la bande de Soret à 408 nm	103
Partie 4 Discussion	107
4.1 Formation des complexes oxygénés au mélangeur à flux arrêté	107
4.1.1 Conditions dans lesquelles les complexes oxygénés sont formés	107
4.1.2 Impact du H ₄ B, de la L-arginine et du pH sur les cinétiques de la réaction	109
4.2. Formation des complexes oxygénés au mélangeur en flux continu	110
4.2.1 Nature du complexe hème-oxy 2	110
4.2.2 Nature du complexe hème-oxy 1	111
4.2.3 Nature du complexe avec la bande de Soret à 408 nm	113
4.2.4 Conclusions quant à la nature des complexes oxygénés générés par la COD-	
iNOSoxy	113
4.3 Formation du complexe Fe ²⁺ CO chez la COD-iNOSoxy et effet du pH sur ces	
complexes	114
4.4 Implication pour la catalyse enzymatique	115
Conclusion	117
Bibliographie	118
Annexe 1 Composition de solutions et milieux	128
Annexe 2 Modèle cinétique concomitant pour deux étapes de liaison de l'oxygène appliq	ué
à l'étude de hème-oxy 1	130

Liste des tableaux

Tableau I Médicaments exploitant les effets du NO en pharmacothérapie12
Tableau II Résultats obtenus en spectroscopie d'absorbance au mélangeur en flux
arrêté lors du mélange de la COD-iNOSoxy avec l'O2 (68 μM concentration après
le mélange)
Tableau III Propriétés optiques et fréquences des modes d'étirement Fe-O et O-O
pour les complexes oxygéné, peroxy et ferryle (composé I et II) de certaines
protéines hémiques et composés modèles

.

Liste des figures

Figure 1 Rôle du NO dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins	5
Figure 2 Rôle du NO dans le système immunitaire	7
Figure 3 Rôle du NO dans le processus de neurotransmission	9
Figure 4 Structure du gène des NOS de mammifères	19
Figure 5 Domaine oxygenase et site catalytique des NOS	20
Figure 6 Domaine réductase de la iNOS de rat et la trajectoire des électrons da	ns ce
domaine	22
Figure 7 Réaction enzymatique catalysée par les NOS de mammifères	25
Figure 8 Mécanisme de catalyse enzymatique proposé pour les NOS de mamm	ifères26
Figure 9 L'effet de Rayleigh et l'effet Raman	
Figure 10 Courbe de corrélation entre les modes vFe-CO et vC-O assignés en	
spectroscopie de résonance Raman pour certaines protéines à hème	
Figure 11 Procédé de purification de la COD-iNOSoxy	
Figure 12 La spectrométrie avec un mélangeur en flux arrêté ainsi que l'analys	e des
données obtenues par cette technique	52
Figure 13 Informations tirées de l'analyse des données obtenues au mélangeur	à flux
arrêté	54
Figure 14 Schéma du système de spectroscopie de résonance Raman à l'équilib	re57
Figure 15 Spectroscopie de résonance Raman couplée à un mélangeur en flux o	continu
	60
Figure 16 Dosage pyridine-hemochrome pour la COD-iNOSoxy nouvellement	64
Figure 17 Spectrus d'absorbance de la COD iNOSerry dens la forme orrudée, la	
rigure 17 Spectres d'absorbance de la COD-inOSoxy dans la forme oxydee, la	forme 65
Figure 18 SDS-PACE montrant la COD-iNOSovy purifiée ainsi que sa taille	
Figure 10 Distermination de la zone de stabilité au nH nour la COD-iNOSovy	68
Figure 19 Determination de la zone de stabilité au pri pour la COD-itOSoxy	Soxy (-
L-arg/-H/R) à nH 7.5	71
Figure 21 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNO	Soxy (-
L-arg/-H/B) à pH 6.5	
Figure 22 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOS	Soxy (-
L-arg/-H/B) à pH 9.5	
Figure 23 Expérience de détermination de la vitesse bimoléculaire pour la for	nation
du complexe hème-oxy 2 en absence de L-arginine et de H ₄ B à pH 7.5	74
Figure 24 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOS	Soxy (-
L-arg/+H ₄ B) à pH 7.5	
Figure 25 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOS	Soxy (-
L-arg/+H4B) à pH 6.5	
Figure 26 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOS	šoxy (-
L-arg/+H ₄ B) à pH 9.5	
Figure 27 Expérience de détermination de la vitesse bimoléculaire pour la form	nation
du complexe hème-oxy 1 en présence de H4B avec 68, 136 et 204 µM d'ox	ygène à

рН 7.5
Figure 28 Expérience de détermination de la vitesse bimoléculaire pour la formation du complexe à 408 nm en présence de H₄B avec 68, 136 et 204 µM d'oxygène à
pH 7.5
Figure 29 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy
(+L-arg/-H ₄ B) à pH 7.5
Figure 30 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy
(+L-arg/-H4B) à pH 6.5
Figure 31 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy
(+L-arg/-H4B) à pH 9.5
Figure 32 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+
L-arg/+ H ₄ B) à pH 7.5
Figure 33 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+
L-arg/+ H ₄ B) à pH 6.5
Figure 34 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+
L-arg/+ H ₄ B) à pH 9.590
Figure 35 Spectres de résonance Raman du complexe Fe ²⁺ CO à différents pH94
Figure 36 Spectres de résonance Raman pour le complexe hème-oxy 2 généré par la
COD-iNOSoxy
Figure 37 Spectres de résonance Raman pour le complexe hème-oxy 1 généré chez la
COD-iNOSoxy à pH 7.5
Figure 38 Spectres de résonance Raman pour le complexe hème-oxy 1 généré chez la
COD-iNOSoxy à pH 9.5
Figure 39 Spectres de résonance Raman pour le complexe ayant une bande de Soret
centrée à 408 nm généré chez la COD-iNOSoxy101
Figure 40 Régression à l'aide du logiciel GRAMS/AI sur les bandes obtenues dans le
spectre différentiel de l'expérience décrite à la figure 39102
Figure 41 Analyse avec un modèle cinétique implicant deux étapes concomittantes de
liaison de l'O ₂ concomittant des données au mélangeur en flux arrêté pour la
COD-iNOSoxy (-L-arg/+H4B) à pH 7.5

Liste des schémas

Schéma 1: Liaison d	e l'oxygène au fer de l'hème et formation d'un complexe
hydroperoxyde	

Liste des abréviations

acide désoxyribonucléique			
4-amino-tétrahydrobioptérine			
adénosine triphosphate			
oxyde nitrique synthase de Bacillus subtilis			
complexe Calcium/ Calmoduline			
guanosine monophosphate cyclique			
monoxyde de carbone			
domaine oxygénase (acides aminés 75-500) de la iNOS			
chloroperoxidase			
cytochrome P450 oxydant le camphre			
oxyde nitrique synthase de Deinococcus radiodurans			
dithiotréitol			
« endothelium releasing factor »			
acide éthylènedinitrolo-tétraacétique			
oxyde nitrique synthase endothéliale			
domaine oxygénase de l'oxyde nitrique synthase endothéliale			
flavine-adénine dinucléotide			
fer sous forme ferreuse			
fer sous forme ferrique			
flavine mononucléotide			
oxyde nitrique synthase de Geobacillus stearothermophilus			
S-nitrogluthatione			
guanosine tri-phosphate			
dihydrobioptérine			
sulfure d'hydrogène			
(6R)-5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine			
protoporphyrine de fer IX			
oxygénase de l'hème			
peroxidase de raifort			
oxyde nitrique synthase inductible			
domaine oxygénase de l'oxyde nitrique synthase inductible			
lactoperoxidase			
oxyde nitreux			
nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate			
oxyde nitrique synthase neurale			
domaine oxygénase de l'oxyde nitrique synthase neurale			
N-méthyle-D-aspartate			
ion nitroxyle			
oxyde nitrique			
ion nitronium			
nitrite			

NO ₂ :	dioxyde d'azote
NO3 :	nitrate
N_2O :	oxyde nitreux
NOHA :	N ^{oo} -hydroxy-L-arginine
NOS:	oxyde nitrique synthase
O ₂ :	oxygène
ONOO ⁻ :	peroxynitrite
ROS :	espèces oxygénées réactives
saNOS:	oxyde nitrique synthase de Staphylococcus aureus
sGC :	forme soluble de la guanylate cyclase
SNP :	sodium nitroprusside
SNAP :	N- acétylpénicillamine
THF :	tétrahydrofolate
TNF :	Facteur nécrosant des tumeurs ("tumor necrosis factor")

Chapitre 1 Introduction

1.1 L'oxyde nitrique : synthèse et rôle biologique

1.1.1 L'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule à laquelle on a attribué, il y a quelques décennies, un rôle de messager biologique qui est très important dans le bon fonctionnement de la neurotransmission, la vasodilatation et la protection contre les cellule tumorales (1-3). Il s'est de plus révélé être d'une valeur thérapeutique inestimable, puisqu'une faille dans le bon fonctionnement de ces procédés physiologiques peut souvent être traitée en augmentant ou en diminuant la production de NO par l'organisme. Son implication dans une grande variété de fonctions biologiques telles que la neurotransmission, la vasodilatation et la protection de l'organisme par le système immunitaire rend cependant le défi d'utiliser le NO à une fin thérapeutique colossal. Plusieurs médicaments exploitant les effets bénéfiques du NO sont toutefois déjà disponibles sur le marché. L'un des exemples bien connu d'utilisation à cette fin est la nitroglycérine, qui est un vasodilatateur notamment utilisé pour soulager les effets néfastes de l'angine de poitrine et de l'hypertension (2, 4, 5).

Les dérivés du NO incluent une grande variété de composés biologiquement actifs, tels que les nitrites (NO₂⁻), les nitrates (NO₃⁻), l'ion nitroxyle (NO⁻), l'ion nitronium (NO⁺) et le peroxynitrite (ONOO⁻) (1, 3, 6-9). Le NO fait partie des oxydes d'azotes, un groupe de composés dont le membre le plus connu est l'oxyde nitreux (N₂O), qui est un gaz hilarant possédant des propriétés anesthésiques. Ce gaz est incolore et inodore, tout comme le NO, ce qui le rend difficile à détecter. Un autre membre de ce groupe est le dioxyde d'azote (NO₂), un gaz brunâtre produit lorsqu'on mélange de l'acide nitrique avec un métal et qui surplombe les villes par les belles et chaudes journées d'été (1). Les dérivés du NO (ex. peroxynitrites) s'avèrent de plus être un polluant atmosphérique reconnu comme étant toxique, puisqu'il réduit la fonction pulmonaire (1). Il est donc surprenant qu'une molécule

reconnue comme étant toxique puisse tenir un rôle qui puisse également être bénéfique au sein d'un organisme vivant (10)!

Le NO est biosynthétisé chez une grande variété d'organismes, incluant les champignons, les plantes et les insectes (2, 11-16). Certaines bactéries du sol possèdent des activités de nitrification et de dénitrification (2, 17-20). Elles peuvent par conséquent former des nitrates à partir du NO et transformer les nitrates en NO. Les végétaux, quant à eux, utilisent aussi les oxydes d'azotes dans leurs procédés biologiques, et l'on connaît leur capacité à produire du NO (14-16). Le NO est également produit chez les mammifères, où il joue un rôle très important pour le bon fonctionnement de l'organisme. Il agit notamment au niveau de la régulation de la tension artérielle (2, 21, 22), de la neurotransmission (23) ainsi que dans la fonction rénale (24). Il est également reconnu comme étant un agent cytotoxique qui agit au niveau du système immunitaire (25, 26). C'est une protéine nommé Oxyde Nitrique Synthase (NOS), une flavo-enzyme qui possède une molécule d'hème au sein de son site actif, qui a pour fonction de catalyser la biosynthèse du NO chez les mammifères (3, 27). Cette enzyme est de plus présente chez les bactéries telles que Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis et Deinococcus radiodurans (28-30) ainsi que chez certains organismes eucaryotes comme les insectes et les champignons. Chez les mammifères, trois isoformes de NOS ont été identifiés : la NOS neurale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). Elles ont été nommées ainsi à cause du lieu d'expression de leurs gènes respectifs initialement identifié dans l'organisme. Les gènes codant pour ces isoformes peuvent cependant être exprimés plus largement dans différents tissus (Section 1.1.3 à 1.1.5).

1.1.2 La biosynthèse du NO chez les mammifères

La recherche sur le NO chez les mammifères a commencé à susciter un véritable intérêt autour des années 1980. Avant ce temps, on croyait que le NO avait peu à voir avec le monde des vivants, puisqu'il était plutôt reconnu pour ses effets toxiques (2, 10). En fait, la biosynthèse du NO était connue, mais elle ne semblait être réservée qu'aux bactéries impliquées dans la nitrification et la dénitrification des sols. En 1980, Furchgott et Zawadzki (31) ont déterminé que les cellules endothéliales jouaient un rôle dans la relaxation des vaisseaux sanguins en présence d'un neurotransmetteur nommé acétylcholine. En effet, des vaisseaux sanguins possédant un endothélium intact préalablement contractés à l'aide de phényléphrine se dilataient en présence de l'acétylcholine. Ces chercheurs ont alors conclu que les cellules endothéliales participaient activement à cette relaxation, puisque leur absence provoque au contraire une vasoconstriction des vaisseaux sanguins lorsqu'ils sont mis en contact avec l'acétylcholine. Une substance semblait donc être larguée des cellules endothéliales, et elle a d'abord été identifiée en tant qu'*Endothelium Releasing Factor* (EDRF). Des recherches furent menées de façon parallèle par F. Murad qui, en 1977, démontra que le NO et ses dérivés permettaient l'activation de la forme soluble de la guanylate cyclase (sGC) (32). Ils ont eu finalement l'évidence que le facteur EDRF est le NO lui-même (33).

Entre 1981 et 1985, Tannenbaum (25) et Stuehr (34) ont remarqué une augmentation de la quantité de nitrites et de nitrates sanguins lorsqu'une inflammation se manifestait chez le rat. Ces chercheurs ont aussi établi que la quantité de nitrites et de nitrates augmente lorsque des cytokines et des suppléments comme des acides aminés sont ajoutés au milieu de la culture cellulaire de macrophages. De cette façon, ils ont déterminé que la production de nitrates et de nitrites provenait d'une réaction enzymatique qui consistait en l'oxydation d'un acide aminé, la L-arginine, et que cette réaction permettait d'engendrer la formation de NO ainsi que de la L-citrulline comme produit secondaire (35). John Hibbs (26, 36) et ses collègues ont ensuite démontré que le NO est bel et bien un agent cytotoxique qui agit au niveau des macrophages et qu'il était produit par la iNOS. Ignarro en arriva aussi à cette conclusion (33, 37). L'implication du NO en tant que messager biologique dans les systèmes nerveux et rénaux a par la suite été établie. La recherche sur le NO a cu une telle importance scientifique que Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad se sont partagé le prix Nobel de médecine en 1998 pour l'attribution du rôle de messager biologique à cette petite molécule qu'est le NO.

1.1.3 L'implication du NO dans les maladies cardiovasculaires et rénales

Selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) et l'Institut de recherche en santé du Canada (IRSC), les maladies cardiovasculaires sont très communes dans les pays industrialisés et constituent l'une des causes principales de décès dans ces pays. Les maladies cardiovasculaires telles que l'artériosclérose et l'hypertension sont dues à une déficience au niveau de l'endothélium, une couche de cellules qui est située à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Or, il apparaît que les cellules endothéliales expriment l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), qui va permettre la production de NO au sein de ces cellules. Il va sans dire qu'une déficience au niveau de l'endothélium peut signifier que la production de NO par la eNOS sera affectée partiellement ou entièrement, selon la déficience qui y est présente (2, 21, 22, 33, 37, 38). Il reste cependant à savoir si le manque de NO dans les cellules endothéliales est la cause ou le résultat de cette déficience. Il y a toutefois une certitude qui a été établie, c'est que la synthèse de NO est très importante par le bon fonctionnement du système cardiovasculaire et, plus particulièrement, des vaisseaux sanguins. La eNOS est une enzyme constitutive dont l'activité est contrôlée par sa liaison à un complexe calcium/calmoduline (Ca²⁺/CaM), qui permet le transfert des électrons du domaine réductase au domaine oxygénase de l'enzyme. La production de NO est par conséquent régulée par la liaison de ce complexe, ainsi que par d'autres signaux cellulaires, tels que la sécrétion d'acétylcholine par des cellules adjacentes, qui permettent l'entrée de calcium dans les cellules endothéliales (Figure 1). Le NO ainsi produit est diffusé librement hors de la cellule et active la sGC, qui est exprimée dans les cellules musculaires lisses adjacentes. La sGC est une enzyme qui, tout comme les NOS, possède une molécule d'hème. Son activation passe par le clivage du lien proximal avec une histidine suite à la liaison du NO. Cette enzyme catalyse la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (cGMP), et c'est précisément le produit de cette réaction enzymatique qui provoque la vasodilatation des vaisseaux sanguins (Figure 1) (2, 21, 22, 33, 37, 38).



Figure 1 Rôle du NO dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins

Le NO ne joue pas seulement un rôle au niveau de la vasodilatation des vaisseaux sanguins dans le système cardiovasculaire. Il se révèle également un médiateur clé de l'angiogénèse, c'est-à-dire la formation collatérale de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà formés. Le NO produit par la eNOS diffuse également jusqu'aux plaquettes sanguines, où il participe au bon fonctionnement de la coagulation sanguine. Le NO a en effet la capacité de réduire l'affinité des plaquettes pour les cellules endothéliales, ainsi que leur affinité entre elles (2, 21, 22, 38). Il est donc pertinent de conclure que le NO possède une gamme d'action très importante au sein du système cardiovasculaire, ce qui en fait un acteur important dans la protection des vaisseaux sanguins.

Le gène codant pour la eNOS est également exprimé dans le rein et, par conséquent, le NO y est biosynthétisé (24, 39-42). Le NO joue tout d'abord un rôle dans le maintient de l'hémodynamique du rein, c'est-à-dire des caractéristiques physiques de la circulation du sang dans le système rénal. Il est très important de maintenir une bonne tension au niveau des vascularisations présentes dans le rein, puisque ce dernier est reconnu pour avoir une résistance vasculaire plus faible que la plupart des autres organes (24, 42). Il a été de plus démontré qu'une déficience significative en NO au niveau du rein était l'une des premières causes de l'hypertension (39). Le NO serait aussi impliqué dans le transport et l'absorption du sodium ainsi que dans la sécrétion de la rénine, qui contrôle la tension artérielle au niveau du rein (24, 39-42). La régulation de la biosynthèse du NO et son action sur les vascularisations présentes dans le rein sont des aspects qui demeurent toutefois à éclaircir (24, 39-42).

1.1.4 L'implication du NO dans la défense contre les cellules tumorales et agents infectieux.

Il existe trois isoformes de NOS chez les mammifères. Le gène de la iNOS, contrairement à ceux de la nNOS et de la eNOS, n'est pas exprimé de façon constitutive *in vivo*. La transcription du gène est plutôt activée suite à des stimuli tels que la présence de



Figure 2 Rôle du NO dans le système immunitaire

7

cytokines (26, 35). Le NO biosynthétisé par la iNOS a pour fonction de défendre l'organisme contre les agents infectieux et les cellules tumorales. La iNOS a la capacité de produire plus de NO que la eNOS et la nNOS, et cela rend cet isoforme plus apte à la transformation du NO en dérivés tels que le peroxynitrite, ce qui peux être toxique pour la cellule. Des études menées sur les macrophages ont permis de comprendre comment le NO est impliqué dans la protection de l'organisme contre les cellules tumorales et les agents infectieux (Figure 2). Drapier et Hibbs Jr (36) ont avant tout démontré que le NO produit par les macrophages diffuse jusqu'aux cellules tumorales et réagit avec plusieurs macromolécules impliquées dans la chaîne de transport des électrons mitochondriale (36). C'est notamment le cas pour deux oxydoréductases ainsi que de l'acotinase, qui sont directement impliquées dans cette chaîne. Ces enzymes possèdent en effet un centre fersoufre qui leur permet de lier le NO. En conséquence, la chaîne de transport des électrons est inhibée. La production d'ATP est alors arrêtée au niveau de la cellule tumorale, ce qui lui est fatal (2, 26, 36, 43). Le NO agit aussi au niveau de la synthèse de l'ADN non seulement des cellules tumorales et des agents infectieux, mais de toute cellule en phase de division. Dans ce cas-ci, il provoque une inhibition d'une enzyme nommée ribonucléotide réductase, qui convertit les ribonucléotides en désoxyribonucléotides dans une réaction qui s'avère être absolument nécessaire à la synthèse de l'ADN (44, 45). Sans la possibilité de duplication de l'ADN, la prolifération cellulaire devient tout à fait impossible. On sait aussi que le NO peut causer certains dommages à l'ADN (46, 47), ce qui ajoute à l'effet que peut avoir le NO sur la ribonucléase. Le NO produit par la iNOS agit donc en tuant directement les cellules tumorales et des agents infectieux ou en interférant au niveau de leur progression. Il va donc sans dire qu'il joue un rôle de premier plan en tant qu'agent cytotoxique au niveau du système immunitaire.

1.1.5 L'implication du NO dans la transmission des influx nerveux

Il a été établi que le NO joue un rôle dans la transmission des influx nerveux entre les neurones. Il a été démontré que le NO est directement impliqué dans des pathologies



Figure 3 Rôle du NO dans le processus de neurotransmission

telles que l'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que la sclérose en plaques. Il peut aussi être impliqué dans le processus de mémorisation (23, 48, 49).

La production de NO débute lorsque le neurone pré-synaptique, qui transmet l'influx nerveux, largue un messager biologique qui diffuse jusqu'au neurone postsynaptique, qui reçoit l'influx. Prenons par exemple le glutamate, qui est l'un de ces messagers biologiques. Il est sécrété par le neurone pré-synaptique et diffusé jusqu'au neurone post-synaptique. Il se lie à des récepteurs nommés N-méthyle-D-aspartate (NMDA) qui sont situés sur le neurone post-synaptique. Suite à la liaison de ces récepteurs, des canaux qui permettent au calcium de pénétrer dans le neurone post-synaptique s'ouvrent. Le calcium peut ensuite se complexer à la calmoduline pour former le complexe Ca^{2+}/CaM . Ce complexe se lie ensuite à la NOS neurale (nNOS), qui est l'isoforme exprimée dans le neurone (1, 23, 50, 51). La nNOS liée au complexe Ca^{2+}/CaM est activée et peut par conséquent produire du NO. Le NO stimulera la sGC dans le neurone postsynaptique en se liant à la molécule d'hème contenue dans cette enzyme, de la même manière que dans les cellules endothéliales (Figure 3). Le NO peut aussi diffuser jusqu'au neurone pré-synaptiquè, y activer la forme sGC et ainsi participer à une bonne communication entre les deux neurones (1, 23, 50, 51).

Comme le cerveau contient également des vaisseaux sanguins, on y remarque aussi l'expression du gène de la eNOS, tel que présenté en section 1.1.3. L'activité métabolique du cerveau ne tolére pas un flux sanguin réduit, alors l'expression et l'action de la eNOS sont très importante dans le bon fonctionnement du cerveau et de la neurotransmision (1). La nNOS est aussi présente au niveau du rein. Elle est surtout exprimée au niveau de la médulla rénale, où se trouvent de petits nerfs non cholinergiques qui ont besoin d'exprimer la nNOS afin d'exercer la neurotransmission (24, 41).

1.1.6 L'utilisation du NO à des fins thérapeutiques

Depuis quelques années, les propriétés bénéfiques du NO ont amené les chercheurs à se demander si le NO pouvait servir à une fin thérapeutique. Comme il agit au niveau de plusieurs procédés physiologiques, il est difficile de cibler une pathologie en particulier et de la traiter avec un médicament exploitant l'action du NO sans se demander quels effets ce traitement aura sur les autres procédés dans lesquels le NO est impliqué. Il existe toutefois plusieurs traitements médicaux qui utilisent les effets du NO, et l'un des plus connus est la nitroglycérine, qui est utilisée depuis 100 ans. Ce médicament est notamment utilisé comme traitement contre l'angine de poitrine. Les médicaments utilisant les propriétés du NO ont une vaste gamme d'action. Il y a tout d'abord certains médicaments qui produisent du NO et qui sont utilisés dans le traitement de maladies gastro-intestinales, de l'œdème, de l'arthrite, des colites ulcéreuses ainsi que des maladies inflammatoires du système nerveux central (52-54). Ils sont aussi utilisés dans le traitement chimiothérapique pour vaincre le cancer, l'ostéoporose ainsi que dans le traitement des maladies pulmonaires telles que l'asthme et l'hypertension pulmonaire (4, 55). On retrouve finalement en pharmacothérapie des médicaments qui agissent à titre de donneurs de NO et qui sont utilisés dans le traitement contre la dysfonction érectile ainsi que des maladies hépatiques (4) (Tableau I).

Certains agents jouent un rôle dans la modulation de la biosynthèse du NO. Par exemples, certaines substances telles que la nifédipine et la lacidipine ont pour effet de bloquer le transport du calcium dans la cellule, ce qui nuit bien évidemment aux NOS constitutives présentes chez les mammifères (la nNOS et la eNOS), qui sont ainsi bloquées dans leur action. D'autres traitements ont pour effet d'inhiber la production de NO par les NOS, notamment en empêchant la liaison du substrat, des cofacteurs ou du complexe Ca²⁺/CaM (4). C'est notamment le cas de composés tels que L-NMMA et d'autres analogues de la L-arginine qui empêchent sa liaison lors du mécanisme de catalyse. D'autres agissent au niveau des interactions protéines-protéines pouvant être effectuées avec les NOS (56-58).

Une avenue qui semble intéressante et qui émerge en tant que traitement est la thérapie génique. Elle est notamment utilisée dans le traitement de maladies cardiovasculaires,

Médicament	Utilité	Avantages	Désavantages	Refs
Gaz NO	Traitement de l'hypertension pulmonaire	Soluble à pH physiologique	Toxicité, demi-vie courte	4
SNP	Vasodilatateur pour le traitement de l'hypertension	puissant	Tolerance, toxicité à long terme	4
Molsidomine	Prévient la thrombose	-		4
GSNO	Propriétés vasodilatatrices	Habileté limitée à agir sur le stress oxydatif	-	4
SNAP	Renverse la constriction par l'endothéline-1 dans les artères	Habileté limitée à agir sur le stress oxydatif	-	4
Nitroglycérine	Vasodilatateur	-	Effets hémodynamiques potentiels	4
Amyl nitrite	Traitements des accidents cérébro-vasculaires	· · ·	Résistance, manque de sélectivité	4
L-NMMA	Traitement contre les céphalées	-	-	4

Tableau I Médicaments exploitant les effets du NO en pharmacothérapie

surtout pour prévenir les lésions au niveau des artères. Mais cette avenue a besoin d'être étudiée un peu plus avant d'être appliquée aux humains, puisqu'elle est à peine connue (59, 60). On peut donc conclure que le NO a une gamme d'action assez vaste et qu'il peut être utilisé comme médicament pour résorber les effets néfastes de certaines pathologies (4).

1.2 Les hémoprotéines

Les protéines à hème, ou hémoprotéines, possèdent une molécule d'hème (protoporphyrine de fer IX), qui consiste en un groupement porphyrine contenant en son centre un atome de fer (Figure 5, en bleu). Ce cofacteur joue un rôle crucial dans le mécanisme de catalyse des enzymes liant ce groupement prosthétique (61-63). Les hémoprotéines peuvent, entre autre, être séparés selon leur ligand proximal, ou axial, de la molécule d'hème. Un groupe contient les hémoprotéines qui ont comme ligand proximal de l'hème un groupement imidazole provenant d'un résidu histidine comme les hémoglobines et de la myoglobine (section 1.2.1). Les protéines coordonnées à un résidu tyrosine ou à un résidu lysine ont été rassemblées dans un deuxième groupe (section 1.2.2). C'est notamment les cas de la nitrite réductase. Un dernier groupe contient les protéines qui forment un lien thiolate impliquant un résidu cystéine (section 1.2.3)(64). C'est dans ce dernier groupe que l'on retrouve les cytochromes P450 et les NOS.

1.2.1 Les protéines dont la molécule d'hème est coordonnée à un groupement imidazole

Certaines hémoprotéines sont coordonnées en position axiale de la molécule d'hème à un groupement imidazole provenant d'un résidu histidine, qui est très conservé dans la séquence primaire en acides aminés (65). C'est en fait ce lien qui relie l'hème à la protéine et qui lui permet de conserver son intégrité et ainsi accomplir son rôle dans la cellule (66, 67). Chez les vertébrés, les hémoprotéines les plus connus sont les hémoglobines, la myoglobine, certains senseurs pour le monoxyde de carbone cytochromes comme la cytochrome c oxydase, ainsi que la sGC, le NO et l'oxygène (O_2) (ex. : dioxygénase) (68).

Les hémoglobines ont de multiples fonctions dans la cellule. Elles agissent premièrement dans le stockage, le transport et la diffusion de l'oxygène (65, 69, 70). Elles jouent aussi un rôle dans le transport de petites molécules telle que le sulfure d'hydrogène (H₂S) et les acides gras. Elles protègent également la cellule contre les chocs induits par l'O₂ et le NO (71, 72). La cytochrome c oxydase a pour fonction de réduire l'O₂ et agit comme accepteur terminal dans la chaîne respiratoire (73, 74). Quant à la sGC, elle a pour fonction de lier sélectivement le NO afin de, par exemple, induire la vasodilatation des vaisseaux sanguins ou intervenir dans le processus de neurotransmission (75, 76). Finalement, les senseurs du CO, du NO et de l'O₂ jouent un rôle de médiateur de la réponse cellulaire (77-79).

La myoglobine a pour fonction principale le stockage de l'oxygène dans les muscles. Elle serait ensuite capable de fournir de l'oxygène pendant les périodes d'anoxie ou d'hypoxie (80). Deux nouvelles protéines apparentées aux hémoglobines et à la myoglobine ont de plus récemment été identifiées chez les vertébrés. On les a nommées neuroglobine et cytoglobine (81, 82). Leurs fonctions sont toutefois peu connues, bien qu'il semblerait que la neuroglobine ait pour fonction de protéger les neurones contre l'hypoxie ou l'ischémie dans le cerveau. Elle pourrait de plus jouer un rôle dans la protection des chocs induits par le NO. On voit donc que les fonctions remplies par les hémoprotéines coordonnées par un résidu histidine sont vastes.

1.2.2 Les protéines dont la molécule d'hème est coordonnée à un groupement lysine ou tyrosine

Le fer de l'hème, en plus de pouvoir être coordonné à un résidu cystéine et un résidu histidine, peut également se coordonner à un résidu lysine ou à un résidu tyrosine. C'est notamment le cas de la nitrite réductase, pour laquelle le fer est coordonné à l'enzyme par un résidu lysine. La nitrite réductase a pour fonction de transformer le nitrite en azote ammoniacal. Certaines catalases possèdent un lien fer-tyrosine. C'est aussi le cas notamment pour les transferrines et les lactoferrines. La transferrine possède une fonction de transport de fer aux organes, tandis que la lactoferrine possède une fonction qui est plus ciblée vers la protection de l'organisme par le système immunitaire. Cette courte description montre donc que l'atome de fer peut lier différents ligands du côté proximal de la molécule d'hème, ce qui fait des hémoprotéines une classe d'enzyme qui est très diversifiée (83-90).

1.2.3 Les protéines dont la molécule d'hème est coordonnée à un résidu cystéine

La particularité des hémoprotéines avec lesquelles la molécule d'hème forme un lien thiolate impliquant un résidu cystéine est le remarquable déplacement vers le rouge de la bande de Soret lorsque le complexe Fe²⁺-CO est formé et analysé par spectroscopie d'absorbance. En effet, la bande d'absorption maximale de ce spectre, nommée bande de Soret, se situe à 450 nm lorsque l'on complexe le fer de l'hème avec du monoxyde de carbone (CO), ce qui est très marginal pour une protéine à hème, puisque la majorité de ces dernières ont un pic d'absorption maximal centré autour de 420 nm (91).

Les principaux membres de cette famille d'enzymes sont les cytochromes P450, la chloroperoxydase ainsi que les NOS (64, 92, 93). Les cytochromes P450 et les NOS catalysent toutes deux des réactions de monooxygénation de type 1. Leur mécanisme de catalyse requière en effet l'activation d'une molécule d'oxygène pour oxyder leur substrat. Leur fonctions sont cependant bien diverses. Si les NOS agissent dans les procédés qui ont été mentionnés dans la section 1.1, les cytochromes P450 forment une superfamille d'enzymes qui sont directement impliqués dans des procédés physiologiques tels que la stéroïdogénèse, dans la détoxification de xénobiotiques ainsi que de d'autres médicaments dans le foie et agissent dans la cascade des acides arachinoïques qui résulte en la production de prostaglandines (64, 93) Plusieurs cytochromes P450 ont la capacité de lier et oxyder une grande variété de substrats, contrairement aux NOS qui n'ont qu'un seul substrat

physiologique et ne peuvent lier qu'une quantité limitée de substrats non-naturels apparentés à la L-arginine.

La famille des cytochromes P450 contient des membres qui peuvent lier autant les hydrocarbures aromatiques que les acides gras. Ils sont classés en plusieurs groupes, selon leur fonction ainsi que leur séquence primaire en acides aminés. Les différences chez les cytochromes sont donc plutôt fonctionnelles, par exemple le type de substrat transformé, que structurales ou mécanistiques (64, 93). Les NOS sont les enzymes les plus près des cytochromes P450 en ce qui concerne leurs mécanismes de catalyse qui sont similaires (64). Ces deux catégories enzymes sont toutefois différentes au niveau de leur structure tertiaire respective.

1.3 L'oxyde nitrique synthase : Composantes et structure

1.3.1 Généralités sur les NOS

Il a déjà été mentionné que trois isoenzymes de NOS ont été identifiées chez les mammifères, et elles ont été nommées selon le principal site où leur gène est exprimé. La NOS neurale (nNOS) agit dans les neurones, alors que la NOS inductible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS) agissent respectivement dans les macrophages et dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ces isoformes possèdent un domaine oxygénase contenant un site de liaison pour l'hème, la L-arginine et le (6R)-5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine (H₄B) (Figure 5) ainsi qu'un domaine réductase possédant un site de liaison pour deux flavines ainsi que pour le NADPH (Figure 6). Deux de ces enzymes, la eNOS et la nNOS sont dites « constitutives », puisque leur gène est exprimé de façon constitutive. Leur activité enzymatique dépend cependant de la liaison du complexe Ca^{2+}/CaM et, par conséquent, de la présence de calcium dans la cellule (2, 3). Par contre, il semblerait que ce complexe soit lié si fermement à la iNOS que cela rend son activité indépendante de la liaison du complexe Ca^{2+}/CaM . L'expression du gène de la iNOS dans la cellule est plutôt régulée par des modificateurs de la réponse biologique tels que des cytokines et les

lipopolysaccharides (LPS) (3). Il y a de 51 à 57 % d'identité de séquence entre ces isoformes. Certains acides aminés qui sont considérés comme étant importants pour la liaison de la L-arginine et du H₄B sont effectivement conservés parmi ces isoformes. Par contre, des différences notables dans leur structure primaire sont observées (Figure 4). On remarque la présence d'un domaine PDZ amino-terminal chez la nNOS qui est absent chez les autres isoformes. Ce domaine est très important pour cet isoforme, car des interactions protéines-protéines lui permettent de se localiser plus spécifiquement et de mieux s'accrocher aux protéines présentes dans le neurone (3). Dans un même ordre d'idées, on remarque chez la eNOS la présence de deux sites qui permettent deux modifications posttraductionelles cruciales pour cet isoforme : l'acylation par le palmitate et l'acylation par le myristate. Ces deux acylations combinées permettent à la eNOS de se lier efficacement à des microdomaines sur la membrane plasmatique qui contiennent des lipides tels que le cholestérol et des phospholipides ainsi qu'un groupe de protéines nommées calvéolines. Ces domaines sont appelés « calveolae » et ils constituent le site d'ancrage pour la eNOS (94, 95). Les NOS de bactéries telles que la NOS de Staphylococcus aureus (saNOS) (96) et de Bacillus subtilis (bsNOS) (97) sont légèrement différentes des isoformes retrouvées chez les mammifères. Elles possèdent un pourcentage d'identité assez élevé avec le domaine oxygénase des NOS de mammifères (28-30, 97). Elles ne possèdent toutefois pas de domaine réductase, et leur extrémité amino-terminale est tronquée par rapport aux NOS de mammifères (30, 56, 97). Cette délétion amino-terminale d'acides aminés provoque des différences à l'interface de dimérisation et au site de liaison du cofacteur. Plusieurs des bactéries contenant un gène de NOS ne possèdent cependant pas les enzymes nécessaires pour produire elles-même le H₄B. On croit plutôt que le cofacteur naturel des NOS de bactéries serait du tétrahydrofolate (THF). Cela signifie que les NOS de bactéries et les NOS de mammifères diffèrent au niveau de l'apport en électrons, ainsi qu'au niveau du cofacteur qui est employé lors de la catalyse enzymatique (3, 98).

1.3.2 Le domaine oxygénase des NOS de mammifères

Le domaine oxygénase des NOS de mammifères est composé à la fois d'hélices alpha et de feuillets bêta (Figure 5). Il comprend tout d'abord un site de liaison pour la molécule d'hème. Si on avait à établir une image pour ce domaine, on pourrait le comparer à un gant de baseball, et la molécule d'hème pourrait être la balle qui serait attrapée dans ce gant (3). Ce domaine contient aussi un site de liaison pour la L-arginine, qui est le substrat de l'enzyme, ainsi que pour le H₄B, qui en est le cofacteur naturel. C'est en effet dans ce domaine que se situe le site de catalyse des NOS. La L-arginine se lie dans la poche distale de la molécule d'hème au moyen de ponts hydrogène avec des acides aminés situés près du site actif (insert Figure 5). Le H_4B , quant à lui, se lie aux environs des groupements propionates qui sont situés sur les côtés du groupement porphyrin de la molécule d'hème (Figure 5). Le domaine oxygénase contient également un atome de zinc, situé à l'interface de dimérisation, qui semble avoir pour fonction de maintenir la stabilité du dimère ainsi que l'intégrité du site de liaison du H_4B (3). Certains résidus entourant le site catalytique ont aussi un rôle très important à jouer dans le maintient de la structure de l'enzyme ainsi que dans son mécanisme de catalyse. C'est notamment le cas d'un résidu tryptophane (Trp188 chez la iNOS), qui semble jouer un rôle dans la stabilisation du lien axial de la molécule d'hème, soit le lien thiolate, par un pont hydrogène avec la cystéine proximale et permet en quelque sorte de conserver l'intégrité de la protéine (Figure 5) (99).

1.3.2.1 La molécule d'hème, ou centre de catalyse des NOS

L'hème est un groupement prosthétique important retrouvé chez certains enzymes et qui permet d'accomplir leur fonction dans la cellule. Il est, tel que mentionné, retrouvé chez les NOS. Il peut permettre à des protéines d'accomplir plusieurs fonctions, selon la protéine à laquelle il est lié (section 1.2). Chez la NOS, il constitue le siège de la catalyse enzymatique (Figure 5).



Figure 4 Structure du gène des NOS de mammifères

Cette figure est inspirée de Alderton et al (3).



Figure 5 Domaine oxygenase et site catalytique des NOS

Cette figure (fichier PBD:1NOD) présente la structure bidimensionnelle du domaine oxygénase des NOS de mammifères, et l'insert présente le site catalytique de l'enzyme.

L'hème est biosynthétisé par l'organisme à partir de l'hémine, et se coordonne ensuite à des protéines telles que les NOS (100). Cependant, des molécules d'hème peuvent également exister librement dans la cellule. Elles ont toutefois des effets positifs et négatifs sur l'organisme. Par exemple, l'hème a pour effet bénéfique d'influencer l'expression de certains gènes, particulièrement ceux qui servent à sa biosynthèse. Il joue de plus un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Il peut malheureusement, s'il est retrouvé en trop grande concentration, amener une surproduction d'espèces oxygénées réactives (ROS), ce qui peut être dangereux car cela provoque un stress oxydatif chez l'organisme (101).

Chez les NOS, c'est surtout la capacité de lier des gaz tels que l'O₂ ainsi que le NO qui est requise, puisque le mécanisme de catalyse requiert la liaison de l'oxygène et le largage du NO (102, 103). L'hème sert aussi à transférer les électrons provenant du domaine réductase vers l'oxygène pour l'activer et permettre la catalyse enzymatique.

L'hème est maintenu en contact avec la NOS grâce non seulement à différents ponts hydrogène et des interactions hydrophobes, et surtout grâce à sa coordination avec un atome de soufre provenant d'un résidu cystéine, qui la classe parmi les protéines hèmethiolate. Une poche distale, qui est située au-dessus de la molécule d'hème, permet aux différents ligands d'avoir accès à l'atome de fer situé au centre de l'hème. La molécule d'hème permet donc de lier l'O₂, ce qui permet à la NOS de catalyser les deux réactions de monooxygénation qui caractérisent son mécanisme de catalyse (section 1.4) (3, 64, 93).

1.3.2.2 Le rôle du cofacteur naturel des NOS, le H₄B

Le H_4B est un cofacteur utilisé par plusieurs enzymes pour contribuer à l'hydroxylation de différents acides aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et l'arginine (104-108). L'une des pathologies très connues en relation avec une déficience en H_4B est la phénylcétonurie, qui est une accumulation de phénylalanine due à l'inhibition de la phénylalanine hydroxylase, qui catalyse la conversion de L-phénylalanine en L-tyrosine. Le H_4B semble aussi interagir avec la phénylalanine et la



Figure 6 Domaine réductase de la iNOS de rat et la trajectoire des électrons dans ce domaine

Cette figure présente (fichier PDB:1TLL) présente le domaine réductase des NOS, et le transfert des électrons d'un domaine à l'autre est présenté en insert.

tyrosine dans le but de former des neurotransmetteurs chimiques tels que la dopamine, la noradrénaline et la sérotonine (107).

Chez les NOS, le H₄B a adopté le rôle de donneur de proton et d'électron pour la catalyse. En effet, le H₄B semble contribuer au don d'un électron pour l'activation de l'espèce oxygénée ce qui permet l'hydroxylation de la L-arginine en N^{ω}-hydroxy-L-arginine (NOHA) et, par dans une deuxième réaction, l'hyroxylation de la NOHA en NO et citrulline (109). De plus, cette source d'électrons semble être préférée aux flavines du domaine réductase, puisqu'elle est située tout près du site catalytique et que, par conséquent, le H₄B peut donner plus rapidement son électron. La première réduction est effectuée par le domaine réductase, et c'est l'activation de l'O₂ qui demande un électron donné par le H₄B (3, 110).

1.3.3 Le domaine réductase des NOS

Le domaine réductase des NOS est aussi important que le domaine oxygénase pour la catalyse enzymatique (Figures 4 et 7). Il contient deux sites de liaison pour deux flavines, le domaine flavine dinucléotide (FAD) et le domaine flavine mono-nucléotide (FMN), ainsi qu'un site de liaison pour le nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Le domaine réductase a pour rôle d'assurer le transfert des électrons qui sont délivrés par le NADPH vers le domaine oxygénase de l'enzyme via le FAD et le FMN, respectivement. Le transfert des électrons entre les deux domaines est modulé par le complexe Ca²⁺/CaM (3). L'échange des électrons entre le domaine oxygénase et le domaine rédutase se fait de manière croisée, c'est-à-dire que le domaine oxygénase d'un premier monomère reçoit ses électrons du domaine réductase situé dans l'autre monomère (3, 111-115). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle les NOS ne sont actives que sous forme de dimère.

1.4 Le mécanisme de catalyse des NOS

La biosynthèse du NO par les NOS s'effectue en deux étapes distinctes. Le substrat, qui est la L-arginine, est tout d'abord transformé en NOHA par une première réaction d'hydroxylation. Cette réaction consomme 1 équivalent de NADPH, la source d'électrons provenant du domaine réductase de l'enzyme. La N^{∞}-hydroxy-L-arginine est ensuite utilisée comme substrat dans une seconde réaction d'hydroxylation pour produire du NO ainsi que de la L-citrulline comme produit secondaire. Cette deuxième réaction consomme quant à elle 0.5 équivalent de NADPH, toujours fourni par le NADPH lié au domaine réductase de l'enzyme (Figure 7). Les changements proposés au niveau de la molécule d'hème en cours de catalyse sont présentés en Figure 8 (91, 109). Lorsque l'enzyme est au repos, le fer de l'hème est retrouvé sous sa forme ferrique (Espèce 1). Après la liaison de la L-arginine, l'atome de fer est réduit par un électron provenant du domaine réductase de l'enzyme (Espèce 2). Cette étape est la plus lente et par conséquent, elle est considérée comme étant l'étape limitante de tout le cycle de catalyse (109). La réduction de l'atome de fer permet à ce dernier de lier une molécule d'O₂ (Espèces 3 et 4).

L'intermédiaire oxygéné formé accepte un autre électron et un proton, qui cette foisci proviennent du cofacteur H₄B. Un radical H₃B^{•+} est ainsi formé. Cet électron peut aussi, en l'absence de H₄B, être fourni encore une fois par le domaine réductase de l'enzyme (109). Toutefois, le H₄B a la propriété de céder plus rapidement son électron, étant donné la courte distance entre le H₄B et le site catalytique comparativement à celle entre le domaine réductase et le site catalytique (109). L'intermédiaire ainsi formé par cette réduction est un complexe hème-hydroperoxo (Espèce 5). Cet intermédiaire accepte ensuite un second proton pour former un complexe hème-oxo (Espèce 6). C'est ce complexe qui oxydera la L-arginine dans la première réaction du cycle catalytique pour la transformer en NOHA. Cette première réaction ressemble grandement à la réaction de monooxygénase de type 1 catalysée par les cytochromes P450.

Dans un second cycle, qui est un peu moins connu que le premier, il est proposé que la NOHA réagit avec le complexe hème-hydroperoxo (espèce 5) pour produire le NO, ainsi que de la L-citrulline comme produit secondaire. La molécule de NO nouvellement synthétisée peut ensuite diffuser hors de l'enzyme et exercer ses effets dans les différents


Figure 7 Réaction enzymatique catalysée par les NOS de mammifères



Figure 8 Mécanisme de catalyse enzymatique proposé pour les NOS de mammifères

procédés physiologiques mentionnés en section 1.1. Un autre point à mentionner est que le radical $H_3B^{\bullet+}$ produit lors de la catalyse est réduit afin de régénérer le H_4B . Celui-ci peut ensuite être impliqué dans un autre cycle de catalyse puisqu'il demeure lié à l'enzyme. Il est intéressant de noter ici que la NOS est la seule enzyme connue à régénérer complètement ce cofacteur pour s'en de servir à nouveau.

1.5 Les caractéristiques spectroscopiques des NOS

1.5.1 Aspects théoriques de la spectroscopie de résonance Raman

La spectroscopie Raman est une technique de spectroscopie vibrationnelle qui se définit comme étant « *une expérience de diffusion de la lumière inélastique* » (116). Lorsqu'un faisceau incident monochromatique traverse l'échantillon, les photons émanant de cette radiation entrent en collision avec les molécules de cet échantillon. Une bonne partie de la lumière est alors diffusée à la même longueur d'onde que la radiation incidente envoyée sur l'échantillon. Ce phénomène constitue ce que l'on nomme la diffusion élastique de la lumière, ou diffusion de Rayleigh (Figure 9). Une faible proportion de la lumière frappant l'échantillon est toutefois diffusée à des fréquences qui sont soit plus hautes ou plus basses en énergie que la radiation incidente. On est alors en présence d'une diffusion de la lumière inélastique, ou effet Raman, qui est beaucoup plus faible que l'effet de Rayleigh. Lorsque l'échantillon donne de l'énergie au photon incident, on parle d'effet Raman « Anti-Stokes ». S'il enlève de l'énergie au photon incident, il s'agit plutôt d'un effet « Stokes » (116-119).

Deux types de photons sont donc émis en spectroscopie Raman, ce qui la rend particulière comparativement à la spectroscopie infrarouge, une autre technique de spectroscopie vibrationnelle pour laquelle un seul photon est émis. Ces deux techniques sont toutefois complémentaires puisqu'elles possèdent la capacité de fournir approximativement les mêmes informations sur l'échantillon étudié. La spectroscopie Raman s'avère toutefois plus utile que la spectroscopie infrarouge dans le cadre d'études



Figure 9 L'effet de Rayleigh et l'effet Raman

sur des macromolécules biologiques, car celles-ci contiennent des molécules d'eau. Si ces molécules d'eau ne produisent que de faibles signaux en spectroscopie Raman, elles produisent des transitions prononcées en spectroscopie infrarouge, ce qui n'est pas souhaitable car la qualité des spectres obtenus est affectée (117, 118).

L'effet Raman est produit selon un mécanisme qui est dit « *classique* ». Lorsque la radiation est envoyée sur l'échantillon, un champ électrique E est créé. « *Cette modification dans le champ électrique provoque une déformation de la molécule, car le pôle négatif de ce champ électrique attire les noyaux, alors que le pôle positif attire les électrons. Un moment dipolaire \mu est alors induit dans la molécule, où \mu = \alpha * E » (116). Le paramètre \alpha correspond à la polarisabilité de la molécule, qui se définit comme étant la « <i>facilité avec laquelle on peut déformer le nuage électronique de la molécule analysée* » (116). Ce paramètre est un tenseur, puisque μ et E sont considérés comme des vecteurs et que, par conséquent, ils ne vont pas nécessairement dans la même direction. De plus, il semble que ce paramètre soit anisotrope, c'est-à-dire qu'il peut varier selon la direction qui lui est donnée. Il est représenté par un ellipsoïde, et il permet de déterminer si les vibrations sont actives ou non en spectroscopie Raman. « *Une vibration est dite active si cet ellipsoïde de polarisabilité varie en forme ou en grandeur au cours de la vibration* ». Cela est notamment le cas pour les molécules possédant peu de symétrie (116-119).

La spectroscopie Raman comporte ses avantages et ses inconvénients. Parmi les avantages qui lui sont attribuables, il y a entre autre la versatilité des études pouvant être menées ainsi que la possibilité de les effectuer sur des échantillons se présentant sous les formes gazeuse, liquide et solide. La spectroscopie Raman comporte aussi quelques inconvénients tels que la faible intensité de l'effet Raman par rapport à l'effet Rayleigh ainsi que l'interférence entre l'effet Raman et la fluorescence, qui produisent des photons qui sont sensiblement de même fréquence. L'impact de ces inconvénients peut toutefois être moindre si l'on utilise une source monochromatique située tout près de la fréquence d'excitation de l'échantillon. Le phénomène de diffusion de la lumière inélastique, soit l'effet Raman s'en trouve alors augmenté et on se retrouve face à un phénomène de résonance. La technique se spécialise alors pour devenir de la spectroscopie de résonance Raman. Elle a pour avantage de nécessiter moins de matériel et d'être plus sélective en ce qui concerne les longueurs d'onde où les macromolécules peuvent être étudiées.

La grande différence entre la spectroscopie Raman et la spectroscopie de résonance Raman se situe dans la théorie appliquée au tenseur de polarisabilité. Si ce dernier est symétrique dans le cas de la spectroscopie Raman, il peut être non-symétrique en spectroscopie de résonance Raman. Un tenseur de polarisabilité se trouve à être écrit sous la somme de deux tenseurs dont les équations ne seront pas décrites ici: un tenseur isotropique et un tenseur anisotropique. Lorsqu'un tenseur est non-symétrique, il se doit d'être écrit sous la somme de trois tenseurs. En plus des tenseurs isotropiques et anisotropiques, un tenseur anti-symétrique est considéré. Cela affecte nécessairement les propriétés de polarisation ainsi que l'intensité des signaux qui seront présentes sur le spectre. Les trois tenseurs peuvent générer des bandes qui sont complètement différentes. Il est important, pour bien obtenir l'information propre à chacune des composantes (anisotrope, isotrope et anti-symétrique), de collecter la lumière à 90 degrés ou de polariser la lumière de façon circulaire. Le fait d'inclure un troisième tenseur aura certainement un impact sur le ratio de dépolarisation, qui est très important lorsque vient le temps d'assigner un mode de vibration sur le spectre (117-119).

La spectroscopie de résonance Raman offre donc plusieurs avantages par rapport à la spectroscopie Raman. En plus de nécessiter de faibles concentration d'échantillon (environ 40 μ M), la position des pics sur le spectre s'avère être une propriété des états électroniques fondamentaux et leur intensité procure de l'information sur l'état électronique excité. Elle est couramment utilisée dans le cadre d'études sur des macromolécules biologiques telles que les métalloprotéines comme les NOS (120). Elle est aussi très utilisée en médecine et dans le domaine de l'alimentation (121-123). Finalement, elle permet des études sur le repliement des protéines, des acides nucléiques ainsi que sur les virus (124-127).

1.5.2 Le fer de l'hème sous sa forme ferrique et sous sa forme ferreuse

Avant de procéder à l'étude d'un complexe ligand-fer de l'hème, il est tout d'abord nécessaire de caractériser l'enzyme sans ligand lorsque l'atome de fer est retrouvé sous la forme ferrique (Fe^{3+}) ou sous la forme réduite (Fe^{2+}). En fait, la caractérisation de ces formes en spectroscopie d'absorbance et en spectroscopie de résonance Raman permet d'obtenir des informations sur la coordination de l'atome de fer ainsi que sur l'état de spin de ses électrons, ce qui permet ainsi de mieux compléter l'analyse des résultats obtenus lors de l'étude de la liaison d'un ligand.

En spectroscopie d'absorbance, la bande de Soret, qui est la bande dont l'absorption est maximale dans la région 390-450 nm, est située aux environs de 420 nm pour la iNOS étudiée sans L-arginine et sans H₄B. Cela indique que l'atome de fer est hexacoordonné, possiblement avec une molécule d'eau comme sixième ligand (128). Lorsque la L-arginine est liée à la protéine, cette bande se déplace à 400 nm. L'atome de fer est alors partiellement pentacoordonné. Le résultat est exactement le même lorsqu'uniquement du H₄B est lié à la protéine. En présence de L-arginine et de H₄B, la bande de Soret est située à 395 nm, ce qui indique que l'atome de fer est alors complètement pentacoordonné. La liaison de la L-arginine, du H₄B ou des deux entraîne donc un changement de coordination de l'hème.

Cette coordination de l'atome de fer a été établie de façon précise à l'aide de spectres de résonance Raman. Les spectres enregistrés dans les hautes fréquences nous renseignent sur l'état de coordination et de spin des électrons de l'atome de fer, notamment par les modes v_2 , v_3 et v_4 (91). Le mode v_4 est sensible à la densité électronique et donc à l'état d'oxydation du fer de l'hème. Il se trouve à des fréquences situées entre 1340 et 1372 cm⁻¹. Le mode v_3 est quant à lui sensible à la coordination et à l'état de spin des électrons. Il se situe à des fréquences situées entre 1475 et 1520 cm⁻¹. Le mode v_2 , qui est situé à des fréquences entre 1560 et 1590 cm⁻¹, est finalement sensible à l'état de spin des électrons. En absence de L-arginine et de H₄B, le fer de l'hème est hexacoordonné et de bas spin, avec un mode v_3 à 1500 cm⁻¹. Suite à l'inclusion de la L-arginine, de H₄B ou des deux à la préparation de protéine oxydée, l'atome de fer devient majoritairement pentacoordonné, de haut spin, tel que révélé par la fréquence du mode v_3 à 1487 cm⁻¹.

Lorsque l'atome de fer est réduit à l'aide de dithionite de sodium, la bande de Soret est située à 412 nm pour la forme pentacoordonnée (91). Cette forme est celle présente pour les NOS contenant du H₄B. En absence de H₄B, une forme hexacoordonnée peut être observée. Les spectres de résonance Raman de la forme réduite (Fe²⁺) dans les hautes fréquences en présence de L-arginine ou de H₄B montrent deux bandes v₄ et deux bandes v₃, dont une intense à 1465 cm⁻¹ qui indique la présence de H₄B, la forme réduite est donc pentacoordonnée et prête à lier l'oxygène.

1.5.3 Les complexes générés avec le NO chez les NOS

À la fin du cycle enzymatique, le NO produit par la NOS peut se lier à la molécule d'hème et de cette façon inhiber les cycles enzymatiques ultérieurs. Ces complexes ont . donc été caractérisés par plusieurs groupes de recherche afin de comprendre les interactions entre la NOS et le NO nouvellement produit, ce qui permet par la même occasion d'en apprendre plus sur le processus d'auto-inhibition de l'enzyme.

L'auto-inhibition de la NOS dépend de trois facteurs. Le premier de ces facteurs est la vitesse à laquelle le NO se dissocie du fer de l'hème lorsqu'il se trouve sous forme ferrique. Il dépend également de la vitesse de réduction du complexe Fe^{3+} -NO en complexe Fe^{2+} NO. Ce complexe possède en effet une affinité beaucoup plus grande pour le NO que le complexe Fe^{3+} -NO, ce qui inhibe d'autant plus l'enzyme. Finalement, l'auto-inhibition est aussi dépendante de la facilité avec laquelle le complexe Fe^{2+} NO réagit avec l'O₂ pour ramener le fer à l'état ferrique et produire du nitrate (91). Chez les isoformes retrouvés chez les mammifères, ces caractéristiques diffèrent selon les isoformes ce qui fait que la capacité d'auto-inhibition de l'enzyme peut varier. Il est en fait très grand chez la nNOS à l'équilibre (70 à 90%), mais il est beaucoup plus bas chez la iNOS (25%) et négligeable chez la eNOS (27, 91). Il semblerait que le NO joue également un rôle de maintient l'équilibre entre les proportions de monomères inactifs et de dimères actifs présents (131-133).

1.5.3.1 État de coordination et de spin des électrons lors de la liaison du NO

Les complexes ferreux et ferrique avec le NO ont notamment été étudiés à l'aide de techniques spectroscopiques pour en améliorer leur compréhension. En spectroscopie d'absorbance, la coordination du NO au fer de l'hème présent sous forme ferrique provoque un déplacement vers le rouge de la bande de Soret de 420 à 439 nm. La coordination du NO au fer de l'hème sous sa forme réduite provoque quant à lui un déplacement de la bande de Soret de 412 à 437 nm (130). Il est très difficile d'établir une comparaison efficace entre ces deux complexes en spectroscopie d'absorbance, puisque leurs bandes de Soret sont très près l'une de l'autre. La spectroscopie de résonance Raman a donc été utilisée pour approfondir l'étude de ces complexes et ainsi mieux les distinguer. Elle permet de statuer sur l'état de coordination et de spin des électrons en regardant la fréquence à laquelle se situe les modes v_4 et v_3 mentionnés plus tôt (section 1.5.2). Dans le cas d'un complexe Fe^{3+} -NO formé en absence de L-arginine et de H₄B, on peut voir les bandes v₄ et v₃ à des fréquences de 1372 cm⁻¹ et 1500 cm⁻¹, respectivement. Cela est caractéristique d'un complexe hexacoordonné de bas spin, qui témoigne de la liaison du NO à la molécule d'hème. Pour un complexe Fe²⁺-NO formé en absence de L-arginine et de H₄B, un complexe pentacoordonné est observé avec un mode v_3 à 1508 cm⁻¹, ce qui révèle le bris du lien fer-cystéine.

1.5.3.2 Effet de la L-arginine et du H₄B sur la liaison du NO

De études sur les complexes Fe^{3+} -NO et Fe^{2+} -NO ont été effectuées en spectroscopie de résonance Raman chez la nNOS, la nNOSoxy et la iNOSoxy. Il s'est alors avéré que les modes dépendant de l'addition du NO ainsi que les modes reliés aux changements de conformation de la molécule d'hème se trouvent grandement influencés par l'addition de L-arginine et de H₄B.

Pour la iNOSoxy étudiée en absence de L-arginine et de H4B, le mode d'élongation du lien Fe-NO (v_{Fe-NO}) a été identifié au moyen d'une substitution isotopique avec le ¹⁵N¹⁶O à une fréquence de 537 cm⁻¹. L'addition de L-arginine n'induit aucun changement à cette fréquence. On ne sait toutefois pas si c'est parce que le substrat se lie trop loin pour interagir avec le ligand, ou si la L-arginine ne se lie tout simplement pas à la protéine (91, 130). En présence de H₄B, deux modes situés à des fréquences de 541 et 550 cm⁻¹ correspondant respectivement aux modes vFe-NO et 8Fe-N-O ont été observés. L'augmentation d'intensité du mode de balancement Fe-N-O (\deltaFe-N-O) à 550 cm-1 indique que le Fe-N-O adopte une conformation penchée, alors qu'il est plutôt perpendiculaire en en absence du substrat et du cofacteur. En présence de L-arginine et de H4B, ces deux modes se fusionnent en un seul mode qui est situé à une fréquence de 545 cm⁻¹. Selon les auteurs, ce mode coorespond principalement à une mode δ_{Fe-N-O} (avec une petite contribution du mode v_{Fe-NO}), ce qui porte à penser qu'une interaction entre le NO et la L-arginine accentue la conformation penchée déjà observée lorsque seulement le H4B était présent dans l'échantillon à l'étude (91, 130). Il est établi qu'un complexe Fe³⁺-NO est formé à la fin du cycle catalytique chez les trois NOS de mammifères (28, 134). La manière dont les effets de la L-arginine et du H₄B sur le complexe Fe³⁺-NO influence l'auto-inhibition des NOS par la dissociation du NO et la réduction au complexe Fe²⁺-NO n'est pas encore connue.

Les complexes Fe²⁺-NO ont également été étudiés chez la nNOSoxy et la iNOSoxy en spectroscopie de résonance Raman. Tel que mentionné précédemment, en absence de Larginine et de H₄B, le complexe est pentacoordonné. En présence de H₄B, de L-arginine ou des deux, le complexe Fe²⁺NO est hexacoordonné. Cependant, chez la iNOSoxy, le complexe Fe²⁺-NO formé en présence de H₄B seulement est instable et s'oxyde rapidement. Pour former un complexe Fe²⁺-NO stable, la L-arginine doit être liée à la iNOSoxy. L'épuisement de la L-arginine dans le milieu mènerait conséquemment à une conversion rapide du complexe Fe²⁺NO en complexe Fe³⁺-NO chez la iNOSoxy. Cela expliquerait son degré d'inactivation plus faible comparativement à la nNOSoxy (91, 130).

1.5.4 Les complexes générés avec le CO chez la NOS

1.5.4.1 État de coordination et de spin des électrons lors de la liaison du CO

Bien qu'il ne soit pas un ligand physiologique de la molécule d'hème, le monoxyde de carbone (CO) est couramment utilisé pour étudier les différentes propriétés structurales et électroniques des hémoprotéines (135-137). De la même manière que pour les complexes générés avec le NO, le complexe formé entre le fer réduit et le CO a été l'objet d'études en spectroscopie d'absorbance ainsi qu'en spectroscopie de résonance Raman. Il s'agit d'ailleurs du seul complexe pouvant être formé entre le CO et le fer de l'hème. En spectroscopie d'absorbance, la liaison du CO au fer réduit de la molécule d'hème forme un complexe hexacoordonné dont la bande de Soret est situé à 445 nm. Il s'agit d'ailleurs là d'une particularité des protéines à hème coordonnées à un lien thiolate. Les fréquences v_3 et v_4 montrent également que ce complexe est hexacoordonné et de bas spin.

1.5.4.2 Effet de la L-arginine et du H₄B sur la liaison du CO

En spectroscopie de résonance Raman, le mode d'élongation Fe-CO (v_{Fe-CO}) a été assigné entre 480 et 520 cm⁻¹ chez les NOS. De même, le mode de balancement du lien Fe-C-O (δ_{Fe-C-O}) a été détecté entre 560 et 590 cm⁻¹ et le mode d'élongation du lien C-O (v_{C-O}) a aussi pu être assigné entre 1900 et 1970 cm⁻¹. Chez la iNOSoxy, les modes d'élongation du lien Fe-CO (v_{Fe-CO}) et de balancement du lien Fe-C-O (v_{Fe-C-O}) sont retrouvés respectivement à 491 et 562 cm⁻¹ en l'absence de H₄B et de L-arginine. Les fréquences de ces modes ont été confirmées par les spectres différentiels obtenus par substitution isotopique. Aucun changement n'est remarqué pour ces modes lorsque du H₄B uniquement est ajouté à la préparation de la protéine (91, 130).



Figure 10 Courbe de corrélation entre les modes vFe-CO et vC-O assignés en spectroscopie de résonance Raman pour certaines protéines à hème

Lorsque la L-arginine est ajoutée, seule ou en présence de H₄B, le déplacement et l'affinement du mode v_{Fe-CO} à 512 cm⁻¹ suggèrent que la L-arginine stabilise la liaison du CO au fer de l'hème à l'aide d'un pont hydrogène. Chez la nNOS et la eNOS, on peut voir que le mode v_{Fe-CO} en présence de L-arginine est plus bas (503 cm⁻¹), ce qui indique que la force du pont hydrogène est moindre pour la nNOS et la eNOS que chez la iNOS (91, 130).

On peut remarquer que les changements de fréquence du mode d'élongation C-O (v_{C-O}) suivent de façon intrigante ceux qui se produisent pour le mode d'élongation Fe-CO (v_{Fe-CO}) (91, 130). Il existe en effet une corrélation inverse entre la fréquence du mode d'élongation du lien Fe-CO (v_{Fe-CO}) et celle du mode d'élongation du lien C-O (v_{C-O}). Elle est due à un phénomène de « back bounding » entre l'obitale d_{π} de l'atome de fer et l'orbitale π^* libre du CO. Sur un graphique de la fréquence du mode d'élongation Fe-CO $(\nu_{Fe\text{-}CO})$ en fonction de celle du mode d'élongation C-O $(\nu_{C\text{-}O})$ pour quelques protéines à hème, on peut observer que les NOS sont situées entre les enzymes cordonnées à un résidu histidine et aux protéines coordonnées à une cystéine (le cytochrome P450_{cam} et la chloroperoxydase) (Figure 10) (138). On remarque à la Figure 10 que la droite où sont répertoriés les données du cytochrome P450_{cam} est située plus bas que celle répertoriant les données des NOS. Cette observation suggèrerait que la capacité de la cystéine proximale à donner des électrons est plus faible chez les NOS que chez le cytochrome P450_{cam} (91, 139). Cette prédiction a été confirmée par la mesure directe de la fréquence du lien fercystéine chez la eNOS (347 cm⁻¹) et bsNOS (317 cm⁻¹), qui est plus basse que celle du cytochrome P450cam (351 cm⁻¹) (140). Les études avec le CO ont donc révélé que ce ligand forme des interactions hydrogène avec la L-arginine et que le ligand proximal des NOS a une moindre capacité à donner un électron. De plus, la stabilité du complexe formé et sa sensibilité à son environnement font du CO un ligand de choix pour les études structurales chez les NOS.

1.6 Les complexes oxygénés générés par les NOS

1.6.1 Le rôle des complexes oxygénés dans le mécanisme de catalyse

L'étude des interactions entre l' O_2 et les métallo-protéines est un domaine suscitant l'intérêt depuis plusieurs années. En effet, l'étude des réactions de monooxygénation et de dioxygénation est importante du à la variété des voies métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées. La compréhension de ces mécanismes de réaction ainsi que la caractérisation de leurs intermédiaires réactionnels sont donc maintenant nécessaires, vu l'importance de ces réactions dans le fonctionnement de nombreux procédés physiologiques (64, 141).

Le grand défi dans l'étude des complexes oxygénés des NOS est sans aucun doute leur très courte demie-vie qui ne va pas au-delà de quelques dizaines de millisecondes à température ambiante. Cela implique donc qu'il faut adopter des techniques particulières pour entreprendre l'étude de ces complexes. Contrairement aux hémoglobines, qui lient l'oxygène pour former des complexes stables, les NOS forment des complexes oxygénés qui sont très peu stables (67, 69, 70, 142, 143). Dans le but d'étudier ces complexes, des études en spectroscopie d'absorbance à l'aide d'un mélangeur à flux arrêté (Stopped-flow) et/ou un mélangeur à flux continu (Continuous-flow) ont été effectuées (131, 144-153). Ces méthodes seront plus amplement expliquées lorsque la méthode expérimentale sera abordée (section 2.3). Des études spectroscopiques à l'équilibre peuvent aussi être effectuées à basse température sur des complexes oxygénés en solution avec du polyéthylène glycol ou du glycérol, ou sur des intermédiaires produits par la radiolyse d'échantillons préalablement refroidis à 77 K (131, 144-153).

L'étude en spectroscopie d'absorbance des complexes oxygénés ($Fe^{2+}-O_2$) chez les NOS a révélé la formation de deux complexes oxygénés distincts chez les NOS de mammifères. Ces complexes ont été nommés hème-oxy 1 et hème-oxy 2 et seront plus amplement décrits dans les sections 1.6.2 et 1.6.3. Ces deux complexes sont formés dans des conditions expérimentales différentes. De plus, ils se forment et s'oxydent à des vitesses différentes. Malgré ces différences, ils se transforment tous deux rapidement en la forme ferrique de l'enzyme, ce qui rend difficile l'identification des intermédiaires oxygénés subséquents qui sont générés lors de la catalyse enzymatique (141). Notre étude a été consacrée à la caractérisation des deux complexes oxygénés générés par les NOS de mammifères afin d'établir leur nature et identifier en quoi ils diffèrent au niveau électronique et structural.

1.6.2 Le complexe oxygéné hème-oxy 1

Le complexe hème-oxy 1 est le moins connu des deux complexes oxygénés générés par les NOS de mammifères (141). Il ressemble beaucoup au complexe oxygéné généré chez le cytochrome P450, car il présente une bande de Soret à environ 420 nm comme la P450_{cam} (91, 141). Le complexe hème-oxy 1 est formé généralement en présence de H₄B uniquement. Il peut aussi être formé en présence d'autres ptéridines telles que le 4-aminotétrahydrobioptérine (aH_4B) ou la dihydrobioptérine (H_2B) (154, 155). Sa formation n'a été observée que chez les NOS de mammifère. En effet, il n'a pas été observé chez les NOS bactérienne telles que saNOS (146). Le complexe hème-oxy 1 est plus stable en présence de H₄B qu'en présence d'aH₄B ou de H₂B, ce qui peut s'expliquer par le fait que le H₄B est le cofacteur naturel de l'enzyme. Bien que l'absence de L-arginine ou de la NOHA empêche la catalyse, l'étude de ce complexe a eu un certain impact sur la compréhension du mécanisme de catalyse enzymatique, puisqu'il a permis de confirmer le rôle de donneur de proton et d'électron du H₄B (154). Il est établi que le complexe hème-oxy 1 est un complexe oxygéné puisqu'il a la capacité d'effectuer l'échange de l'oxygène par du CO, contrairement à hème-oxy 2 qui ne possède pas cette caractéristique (152). Cette propriété a amené Meyer et coll. à postuler l'hypothèse que hème-oxy 1 est un complexe oxyferreux (Fe²⁺-O₂) alors que hème-oxy 2 est un complexe ferrique superoxyde (Fe³⁺-O₂⁻). Cette interprétation n'est toutefois pas totalement satisfaisante, puisque les hémoglobines ont la capacité d'échanger l'O₂ pour le CO bien que leur complexe oxygéné soit de type ferrique superoxyde (152). On peut identifier la longueur d'onde centrale de la bande de Soret entre 416 et 420 nm. Un autre maximum d'absorbance, cette fois-ci situé dans la région du visible, a été noté à 560 nm (131, 144-153). Le complexe hème-oxy 1 se forme très rapidement. En effet, la vitesse bimoléculaire pour la formation de ce complexe chez la eNOS à des températures cryogéniques (-30°C) est de $2.5*10^6$ M⁻¹s⁻¹ (153). Le H₄B a pour effet d'accélérer l'oxydation de ce complexe. Il disparaît donc rapidement en plus de se former rapidement (141). La L-arginine semble toutefois favoriser la formation de l'autre complexe oxygéné, soit hème-oxy 2, et il arrive très rarement que le complexe hème-oxy 1 soit généré en sa présence (131, 145-153). Le complexe hème-oxy 1 est toutefois formé en présence de L-arginine pour la eNOS étudiée à des températures cryogéniques (141, 151-154, 156). L'étude de la réaction entre la NOS réduite et l'O₂ en présence de H₄B, qui mène à la formation d'un complexe de type hème-oxy 1, est susceptible de livrer des informations indispensables sur le mécanisme de catalyse enzymatique des NOS, puisque l'absence de substrat est susceptible de générer un complexe qui s'accumule faute de pouvoir aller plus loin dans le mécanisme de catalyse enzymatique.

1.6.3 Le complexe oxygéné hème-oxy 2

Le complexe oxygéné hème-oxy 2 est un complexe qui est formé en absence de Larginine et de H₄B dans la préparation de protéine, en présence de L-arginine et de H₄B ainsi qu'en présence de L-arginine uniquement. La présence du substrat de l'enzyme semble favoriser la formation de ce complexe. La présence d'analogues de la L-arginine induit également la formation du complexe hème-oxy 2 (91, 141, 144, 148, 153, 157). La bande de Soret du complexe hème-oxy 2 est située entre 427 et 435 nm, et un maximum d'absorbance à 564 nm est présent dans la région du visible sur le spectre d'absorbance (91, 141, 144, 148, 153, 157). La formation d'un complexe oxygéné de type hème-oxy 2 a également pu être notée chez les NOS bactériennes dont la NOS de *Staphylococcus aureus*, de *Bacillus subtilis*, de *Deinococcus radiodurans* ainsi que celle de *Geobacillus stearothermophilus* (28, 29, 158). Elles génèrent des complexes oxygénés dont la bande de Soret se trouve aux environs de 427 nm.

Contrairement à hème-oxy 1, le complexe hème-oxy 2 a été caractérisé par substitution isotopique en spectroscopie de résonance Raman. Ces études ont confirmé sans aucun doute que hème-oxy 2 est un complexe oxygéné (145) puisque le mode O-O a pu être assigné en spectroscopie de résonance Raman. Puisque le mode d'élongation du lien O-O (v_{0-0}) a été assigné à 1135 cm⁻¹ chez la nNOS sans substrat et que l'addition de Larginine déplace le mode à 1123 cm⁻¹, ce qui indique possiblement qu'une interaction entre la molécule d'oxygène et la L-arginine est établie au moyen d'un pont hydrogène. La Larginine stabiliserait la liaison de l'oxygène au fer de l'hème, ce qui se traduit par une diminution de la vitesse d'oxydation du complexe hème-oxy 2 (91, 145, 146). Les complexes oxygénés générés par saNOS ont été étudiés en spectroscopie de résonance Raman. Les modes d'élongation des liens Fe-O (vFe-O) ont été assignés par substitution isotopique à 1135 cm⁻¹, et les effets induit par l'addition du substrat ont été les mêmes que chez la nNOS (145, 146). Cette caractérisation a permis d'établir que le complexe hèmeoxy 2 possède un caractère ferrique superoxyde, puisque la valeur de son mode d'élongation tombe dans la région spectrale ou l'on voit ces mode pour les superoxydes inorganiques tels que le superoxyde de potassium (145).

Il a été déterminé que le complexe hème-oxy 2 se formait assez rapidement ($k_{on} = 3*10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), bien que sa vitesse de formation soit moindre que celle de hème-oxy 1 ($k_{on} = 2.5*10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (153). La vitesse d'oxydation du complexe hème-oxy 2 est significativement plus lente que le complexe hème-oxy 1 (144 s⁻¹ pour hème-oxy 1 vs 60 s⁻¹ pour hème-oxy 2), ce qui signifie que le complexe hème-oxy 2 est plus stable comparativement à hème-oxy 1.

La L-arginine et le H₄B ont un effet sur les constantes de formation et de disparition du complexe oxygéné. La présence de L-arginine dans la préparation de protéine ralentit la formation ainsi que la disparition de ce complexe (91, 141, 144, 148, 153, 157). Si par contre on combine l'action de la L-arginine avec celle du H₄B, on peut noter une baisse de la vitesse de formation du complexe, mais l'addition du H₄B a eu pour effet d'augmenter sa vitesse d'oxydation chez la eNOSoxy ainsi que chez la nNOS (141). Globalement, les études ont montré que la L-arginine stabilise le complexe oxygéné hème-oxy 2 alors que le H₄B accélère l'oxydation puisqu'il permet l'hydroxylation en NOHA.

1.7 La nature des complexes oxygénés hème-oxy 1 et hème-oxy 2

Il a été établi que hème-oxy 2 possède un caractère ferrique superoxyde (Fe³⁺O₂) selon sa caractérisation en spectroscopie de résonance Raman(145). Cependant, la nature du complexe hème-oxy 1 reste encore à établir. Deux hypothèses ont toutefois été avancées quant aux différences qu'il peut y avoir entre ces deux complexes. La première hypothèse propose des différences dans les propriétés électroniques du complexe Fe-O₂ (Fe³⁺-O₂⁻ vs Fe²⁺-O₂), tandis que la deuxième propose plutôt une différence quant aux propriétés électroniques du ligand présent du côté proximal de la molécule l'hème. Chacune de ces hypothèses sera expliquée dans les sections 1.7.1 et 1.7.2.

1.7.1 Les propriétés électroniques des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2

Mayer et al (153) ont, à la suite de leurs études sur les complexes oxygénés générés par les NOS de mammifères, soumis l'hypothèse que hème-oxy 1 serait un complexe oxyferreux ($Fe^{2+}O_2$), par contraste avec hème-oxy 2 qui possède, c'est connu, un caractère ferrique superoxyde ($Fe^{3+}O_2$). La logique de cette hypothèse repose sur les expériences effectuées par cette équipe de recherche sur les échanges entre l'oxygène et le CO. Or, le CO se lie uniquement au fer de l'hème lorsqu'il est réduit (Fe^{2+}). Ils ont montré que hèmeoxy 1 échange l' O_2 avec le CO mais pas hème-oxy 2. Ils ont donc émis l'hypothèse que hème-oxy 2, à cause de son caractère ferrique superoxyde, ne peut lier le CO (152, 153). Cette logique doit par contre être prise avec un certain recul, puisque certaines hémoglobines génèrent aussi un complexe oxygéné possédant un caractère superoxyde, et elles ont pourtant la capacité d'effectuer l'échange de l'oxygène par le CO (159). Un mécanisme de résonance entre les formes oxyferreuse et ferrique superoxyde est généralement reconnu chez les hémoprotéines (3, 109).

Cependant, le moyen de valider ou invalider l'hypothèse selon laquelle hème-oxy 1 est oxyferreux et hème-oxy 2 est un ferrique superoxyde est l'utilisation d'une technique qui permettra de cibler les distinctions entre les propriétés électroniques de ces complexes. Par exemple, en identifiant la fréquence du mode d'élongation du lien O-O en spectroscopie de résonance Raman. La fréquence ainsi assignée permettrait d'établir le caractère plus ou moins superoxyde des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2.

1.7.2 Les propriétés électroniques du ligand proximal des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2

Des études ont prouvé qu'en plus de former un lien thiolate avec la cystéine proximale, la molécule d'hème pourrait former un lien thiol (160-163). En effet, le complexe oxygéné généré par la myoglobine H93G liant le cyclopentanediol, qui a la propriété d'imiter les actions des protéines de la familles des P450 et de former un lien thiolate a été identifié. Le complexe oxygéné formé par cette protéine-modèle a montré une bande de Soret à environ 415 nm, ce qui ressemble étrangement à ce qui est observé dans le cas de hème-oxy 1 chez les NOS de mammifères (160-163). C'est de cette manière que l'hypothèse voulant que les propriétés électroniques du ligand proximal soient différentes pour hème-oxy 1 et hème-oxy 2 en est venue à être postulée (153). En effet, si cette hypothèse se vérifie, hème-oxy 1 serait un complexe où la molécule d'hème formerait un lien thiol, tandis qu'elle formerait plutôt un lien thiolate pour ce qui est de hème-oxy 2. Il serait donc réaliste de penser qu'un changement de pH dans l'environnement de la NOS puisse permettre d'influencer la formation de l'un ou l'autre des deux complexes oxygéné puisque le pKa normal de la cystéine est de 8.3. Par exemple, la formation de hème-oxy 1 serait favorisée dans un cas où le pH de la réaction serait acide, puisque la quantité de protons disponibles serait plus grande. Par conséquent, le lien thiol serait plus facilement formé que le lien thiolate, qui lui serait favorisé à un pH basique. Si cette hypothèse se

vérifie, le contrôle du complexe oxygéné obtenu pourrait donc être modulé selon le pH dans lequel la protéine est étudiée.

Les conditions dans lesquelles se produit une réaction enzymatique peut effectivement avoir plusieurs effets sur la stabilité, les cinétiques ainsi que sur la structure d'une enzyme. Parmi les paramètres environnementaux qui peuvent engendrer des différences sur le comportement d'une enzyme, on note le pH. Ce dernier peut avoir, par exemple, un effet sur l'association entre les sous-unités. Il peut aussi perturber l'association entre l'enzyme et le substrat, ou même rendre le substrat incompatible pour l'enzyme. De plus, chaque enzyme a une zone de pH pour laquelle son fonctionnement est maximal. En dehors de cette zone, une enzyme peut être instable et ne pas pouvoir être étudiée dans ces conditions, qui sont défavorables. Il devient donc important de déterminer la zone de stabilité de l'enzyme avant d'inclure une variante telle que le pH dans l'étude d'une réaction enzymatique (164)

1.8 Objectifs

Dans le but d'étudier les complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 générés chez la COD-iNOSoxy et de caractériser hème-oxy 1 pour la première fois en spectroscopie de résonance Raman, les cinétiques de formation et d'oxydation du complexe oxygéné seront d'abord déterminées à l'aide d'un mélangeur à flux arrêté suivant différentes conditions expérimentales, soit en présence ou en absence de substrat et/ou de cofacteur pour tenter de former et identifier ce complexe chez cette enzyme. Ces études permettront d'établir des comparaisons avec le complexe hème-oxy 2. Elles nous guideront de plus pour les expériences en spectroscopie de résonance Raman couplé à un mélangeur en flux continu afin d'obtenir le spectre de ces complexes à l'aide de cette technique. À plus long terme, ces études permettront de mieux comprendre le mécanisme de catalyse des NOS.

Afin de vérifier si le pH a une influence sur la formation des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2, des études au mélangeur à flux arrêté seront d'abord entreprises à différents pHs en présence ou en absence de L-arginine et/ou H₄B dans le but d'obtenir un portrait général de ce qui se passe au niveau réactionnel lorsque le pH est changé. Dans le but le voir si le changement de pH peut avoir une influence sur la conformation de la molécule d'hème ou sur la liaison du ligand en tant que tel, des études sur le complexe Fe²⁺CO en spectroscopie de résonance Raman seront également entreprises.

Les objectifs spécifiques de ce projet sont de :

- 1. Définir sous quelles conditions hème-oxy 1 est formé chez la COD-iNOSoxy.
- Identifier la fréquence du mode d'étirement O-O des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 chez la COD-iNOSoxy en spectroscopie de résonance Raman.
- 3. Déterminer l'influence du pH la formation de l'un ou l'autre de ces complexes.

Chapitre 2 Méthode expérimentale

2.1 Les principaux composés chimiques utilisés pour les études

La L-arginine, l'imidazole, le H₄B, le SDS, le sulfate de nickel, l'imidazole ainsi que les tampons Bis-tris propane, la base tris et le tampon CHES ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario Canada). Le dithionite de sodium a été obtenu chez Fluka (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Les gaz tels que Argon, C¹²O¹⁶ and ¹⁶O₂ ont été obtenus chez Praxair (Mississauga, Ontario, Canada). L'isotope ¹⁸O₂ a été obtenu lcon isotopes (St-Marion, NY, USA). Le tampon HEPES a été obtenu de Roche diagnostics (Laval, Québec, Canada). Le Dithiothreitol (DTT) a finalement été obtenu de Promega (Nepean, Ontario, Canada).

2.2 Obtention de la COD-iNOSoxy purifiée

2.2.1 Procédé d'expression et de purification de la COD-iNOSoxy

Les résultats décrits à la section 3 ont été obtenus par l'étude de la COD-iNOSoxy, une protéine correspondant au domaine oxygénase de la iNOS murine et tronquée de ses soixante-quinze premiers acides aminés (a.a. 75-500) par rapport au type sauvage. Le gène codant pour la COD-iNOSoxy porté sur plasmide pET23a-COD_{iNOSoxy} en fusion avec une étiquette de 6 résidus histidine a été gracieusement fourni par le Dr Steven Rafferty (Université Trent, Peterborough, Ontario) (165). Le plasmide pET23a-COD_{iNOSoxy}-His₆ a tout d'abord été transformé dans des cellules chimio-compétentes *E. coli* C41 [DE3]. Les cellules transformées ont ensuite été étalées sur un milieu gélosé contenant du milieu Luria Burtani (LB) supplémenté d'ampicilline à une concentration de 100 μ g/ml (Annexe 1). Le lendemain, deux colonies isolés ont été sélectionnés et inoculés dans une préculture de 250 ml contenant un milieu « Terrific Broth » (TB) supplémenté d'ampicilline à une concentration de 100 μ g/ml (Annexe 1). Cette préculture a ensuite été incubée à une température de 37°C et avec agitation à une vitesse de 250 rpm. Lorsque le milieu inoculé est arrivé à une densité optique d'environ 0.5 à 600 nm, onze fioles contenant chacune 1L de milieu TB supplémenté d'ampicilline à une concentration de 100 μ g/ml ont été ensemencées avec 2 ml de la préculture chacune. Elles ont ensuite été incubées durant toute une nuit à une température de 30°C et une vitesse de rotation de 250 rpm. Aucune induction à l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) n'est nécessaire dans ce cas-ci, puisque les cellules chimiocompétentes *E. coli* C41[DE3] utilisées produisent un niveau basal de T7 ADN polymérase suffisant pour la transcription du gène.

Les cellules ont été récoltées par centrifugation à une température de 4°C et une vitesse de 6000*g pendant dix minutes (Rotor GS3). Elles ont ensuite été lysées à l'aide d'une cellule de presse de French 20K pouvant contenir 40 ml de bactéries resuspendues à une pression de 10 000 PSI. La fraction de protéines solubles contenant la COD-iNOSoxy a par la suite été récoltée par deux centrifugations successives à une température de 4°C et à une vitesse de 13 000 rpm (Rotor GSA), et ce pendant trente et vingt minutes, respectivement. Un aliquot de ce surnageant (50 µl) a été prélevé, mélangé à 1 volume de tampon de dénaturation 2X (Annexe 1), chauffé à 95°C pendant cinq minutes et conservé pour analyse par SDS-PAGE. Des aliquots ont ainsi été prélevés à chacune des étapes de la purification et ils ont subit exactement le même traitement avant d'être déposés sur SDS-PAGE. Le plasmide pET-23a permet l'ajout d'une étiquette amino-terminale de six résidus histidine à la protéine recombinante, ce qui permet la purification par chromatographie d'affinité avec le nickel. Le surnageant récupéré, contenant la fraction de protéines solubles, a par conséquent été déposé sur une colonne de chromatographie d'affinité avec le nickel, chargée avec 100 mM de sulfate de nickel, et préalablement lavée avec dix volumes d'eau bidistillée et cinq volumes de tampon de purification (tampon 40 mM HEPES pH 7.5 contenant 500 mM NaCl). Les protéines non liées à la résine provenant de la fraction de protéines solubles ont tout d'abord été récoltées. La colonne a ensuite été lavée avec 10 volumes de tampon de purification afin d'éliminer les protéines contaminantes qui ne s'étaient pas liées à la résine. La colonne a par la suite été lavée avec avec six et trois volumes de tampon de purification



Figure 11 Procédé de purification de la COD-iNOSoxy

contenant 50 et 75 mM imidazole, respectivement. La protéine a finalement été éluée avec trois volumes de tampon de purification contenant 300 mM imidazole. La dernière étape du procédé de purification consiste en une dialyse contre quatre litres de tampon 40 mM HEPES pH 7.5 contenant 500 mM NaCl, 1mM dithiothréitol (DTT) et 50 μ M EDTA. Ce dernier permet de chélater le nickel qui a été élué de la colonne avec la protéine pure. Deux autres dialyses ont ensuite été effectuées le lendemain dans un tampon 40 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 1 mM DTT (Cutoff : 30 kDa). Le glycérol est ajouté au tampon de dialyse afin de prévenir les effets néfastes de la congélation sur la protéine. La protéine a finalement été aliquotée et conservée à -80 °C (Figure 11 pour schéma du protocole). Pour obtenir la COD-iNOSoxy liée au H₄B lorsque nécessaire,100 μ M H₄B a été ajouté avant la lyse des cellules à la presse de French. Une concentration de 10 μ M H₄B a par la suite été maintenue au cours de chromatographie d'affinité avec le nickel et des dialyses effectuées. L'ajout de H4B a été fait pour les expériences où il était requis et n'est par conséquent pas systématique à chaque purification.

2.2.2 Analyses quantitatives et qualitatives de la COD-iNOSoxy purifiée

2.2.2.1 Analyses en spectroscopie optique

Plusieurs contrôles ont été effectués sur la protéine purifiée afin de s'assurer de sa qualité avant de procéder aux expériences voulues. De plus, il a fallu s'assurer que la quantité d'enzyme nécessaire avait été obtenue afin d'effectuer les expériences prévues. Pour s'assurer de la qualité de la protéine purifiée, deux contrôles s'imposaient : l'étude de la COD-iNOSoxy en spectroscopie optique ainsi que la vérification de la pureté par gel SDS-PAGE. L'étude de la protéine en spectroscopie optique a consisté en l'acquisition du spectre oxydé, du spectre réduit ainsi que du spectre du complexe Fe²⁺CO de la protéine nouvellement purifiée. Un échantillon de 1 ml contenant 50 µl de la protéine purifiée et 950 µl de tampon 40 mM HEPES pH 7.5 contenant 500 mM NaCl a tout d'abord été préparé. Cet échantillon contient la forme oxydée de l'enzyme. Il peut donc servir afin d'obtenir le spectre d'absorbance de la forme oxydée de l'enzyme. Par la suite, la protéine a été mise sous atmosphère d'argon avec agitation pendant 10 à 15 minutes afin d'enlever le

maximum d'O₂ et ainsi la rendre anaérobie. La forme réduite a ensuite été obtenue en ajoutant l équivalent de dithionite de sodium qui avait été préparé sous atmosphère d'argon pour éviter sa dégradation et les contacts avec l'O₂. Le spectre d'absorbance de cette forme a ensuite été acquis. Finalement, la forme réduite a été exposée avec agitation pendant 10 à 15 minutes à un mélange gazeux 95% N₂/5% CO afin de former le complexe Fe²⁺CO. La formation de ce complexe peut se voir très facilement par le changement de couleur de l'échantillon, qui passe d'une teinte rosée à une teinte jaunâtre. Le spectre d'absorbance de ce complexe a été acquis. Il est très important d'obtenir le spectre optique de la forme Fe²⁺-CO, puisqu'il renseigne sur la proportion d'enzyme qui a un maximum d'absorption à 445 nm, qui constitue la forme active de la protéine.

2.2.2.2 Évaluation de la pureté de l'enzyme purifiée

Une autre caractéristique importante à vérifier est la pureté de l'enzyme. Pour ce faire, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) a été effectuée (165). Les gels ont été préparés selon les protocoles décrits en annexe 1. Les aliquotes récoltés lors de la purification ont servi à préparer les échantillons qui ont été déposés sur gel. Un échantillon de marqueurs de protéine a aussi été préparé. Les échantillons ont été chauffés à 95°C et déposés sur gel. Ils ont été mis à migrer à 12 V/cm pendant environ 75 minutes. Les gels ont finalement été colorés avec du bleu de Coomassie, sous agitation pendant 1 heure et décolorés à l'aide d'une solution décolorante constituée de 30% méthanol et de 10% acide acétique sous agitation pendant 2 heures avec un changement de solution décolorante aux 30 minutes.

2.2.2.3 Dosage pyridine-hémochrome

Afin de doser la COD-iNOSoxy purifiée, une méthode permettant de doser spécifiquement la quantité d'hème présente dans un échantillon a été utilisée : le dosage pyridine-hémochrome (166). Pour ce faire, il fallait d'abord s'assurer d'avoir une concentration de protéine assez faible afin d'éviter d'avoir une trop grande absorbance lors du dosage, ce qui causerait un biais. Dans le même ordre d'idées, il était important de diminuer la concentration en sels au minimum dans l'échantillon, car cela pourrait causer des biais dans le dosage (observations non publiées). Pour préparer l'échantillon, on a mélangé 20 µl de protéine purifiée, 480 µl de tampon 40 mM HEPES pH 7.5 contenant 40 mM NaCl ainsi que 500 µl d'une solution pyridine-NaOH fraîchement préparée (Annexe 1). Un spectre d'absorbance de ce mélange a alors été acquis. La couleur de l'échantillon est alors jaunâtre. La protéine a ensuite été mise sous atmosphère d'argon pendant 10 à 15 minutes. L'échantillon a ensuite été réduit à l'aide d'une solution de dithionite de sodium 1 mM préparée sous atmosphère d'argon. L'échantillon a alors pris une teinte rosée. Le spectre d'absorbance de la forme réduite a finalement été enregistré. Après la soustraction du spectre oxydé, le spectre différentiel obtenu a permis de calculer la concentration d'hème de l'échantillon selon cette formule :

 $[Heme](\mu M) = (vol. echantillon/ vol. proteine)*[46.7*(DO_{555}- DO_{539}) - 9.3*(DO_{550}- DO_{535})]$

Ces analyses ont été effectuées après chaque purification de COD-iNOSoxy.

2.3 Études cinétiques en spectrométrie d'absorbance à l'aide d'un mélangeur à flux arrêté

2.3.1 Spécificités de la technique et acquisition des données

La spectrométrie d'absorbance à l'aide d'un mélangeur en flux arrêté permet de mesurer des variations d'absorbance ayant lieu pour des réactions qui se passent sur de courtes durées, nommées cinétiques pré-stationnaires. Cette technique a permis de mesurer les variations d'absorbance induites par la formation et la disparition des complexes oxygénés générés chez les NOS de mammifères (91, 113, 150, 154, 167). Tous les résultats



Figure 12 La spectrométrie avec un mélangeur en flux arrêté ainsi que l'analyse des données obtenues par cette technique

découlant des expériences décrites à la section 3.3 ont été acquis dans une tente anaérobie afin d'éviter toute contamination avec $l'O_2$ de l'air. L'appareil SX.18MV de Applied Photophysics (Leatherhead, Surrey, UK) qui a été utilisé pour effectuer les mélanges (Figure 12) est par conséquent installé dans une tente anaérobie (MBraun Labmaster, Stratham, NH, USA). La concentration d'O2 à l'intérieur de la tente anaérobie a été maintenue en-dessous de 4 ppm. La cuvette utilisée possède un chemin optique de 10 mm et le temps mort de l'appareil est de 1,5 millisecondes. La température du mélangeur à flux arrêté a été maintenue à 20°C grâce à un bain circulant. Avant de débuter les expériences, les seringues contenant la protéine ainsi que les fioles servant à sa préparation ont été traitées pendant une heure avec une solution de dithionite de sodium 1mM afin d'éliminer toute trace d'O₂. Le matériel a ensuite été rincé à l'aide de tampon anaérobie préalablement agité pendant une nuit dans la tente anaérobie. Cette étape permet d'enlever le dithionite de sodium. Ce composé peut réagir avec l'oxygène et, s'il n'est pas enlevé, peut diminuer la quantité d'oxygène disponible pour l'expérience et donc influencer les résultats. La protéine, concentrée à 5µM avant le mélange, a été réduite à l'aide de 1,5 équivalents de dithionite de sodium. Le spectre optique acquis avant le mélange a permis de vérifier que la réduction de la NOS était complète avant d'enregistrer les cinétiques. L'enzyme réduite a ensuite été mélangée avec une solution contenant 136 µM d'oxygène. Ce mélange était effectué dans la cellule de détection, où une source lumineuse réglée à une longueur d'onde spécifique fournie par un monochromateur était dirigée. Le monochromateur permet de choisir la longueur d'onde voulue pour suivre la réaction. Les variations d'absorbance à une longueur d'onde précise ont par la suite été détectées à l'aide d'un tube photomultiplicateur et retransmises sur ordinateur.

La formation et la disparition des complexes oxygénés de la COD-iNOSoxy ont été suivies à l'aide de balayages cinétiques. Un balayage a été fait dans la région de la bande de Soret, entre 450 et 380 nm, à des intervalles de 5 nm. Un balayage cinétique a de plus été fait dans la région du visible entre 620 et 520 nm (intervalle = 7 nm) afin d'identifier les bandes caractéristiques à chacun des complexes oxygénés se trouvant dans cette région spectrale. Afin de calculer la vitesse bimoléculaire d'association de l'O₂ pour hème-oxy 1 et hème-oxy 2, ces balayages cinétiques ont été fait en effectuant le mélange avec trois concentrations d'oxygène différentes (68, 136 et 204 μ M après mélange). Les vitesses de



Figure 13 Informations tirées de l'analyse des données obtenues au mélangeur à flux arrêté

formation des complexes oxygénés ont pu être calculées en fonction de la concentration d'oxygène et mises en graphique. La pente de ce graphique correspond à la constante bimoléculaire pour la formation du complexe oxygéné étudié. L'intercepte sur l'ordonnée correspond quant à lui à la vitesse à laquelle l'oxygène se dissocie de l'atome de fer de l'hème. Les cinétiques ont été acquises en absence ou en présence de L-arginine et de H₄B, et ce à différents pHs (6.5, 7.5 et 9.5). Un tampon différent a été sélectionné selon son pKa à chaque pH afin d'éviter de perdre l'effet tampon. À pH 6.5, un tampon 40 mM Bis-tris propane contenant 500 mM NaCl a été utilisé. À pH 7.5, un tampon 40 mM HEPES contenant 500 mM NaCl a été utilisé, alors qu'un tampon 40 mM CHES contenant 500 mM NaCl a plutôt été utilisé à pH 9.5.

2.3.2 Analyse des données obtenues avec le mélangeur à flux arrêté

Les balayages cinétiques pratiqués ont permis d'obtenir les spectres optiques acquis en fonction du temps (Figures 12 et 13). Un modèle cinétique a été appliqué à ces données afin de reconstituer les spectres optiques des différentes espèces qui sont impliquées dans la réaction étudiée, ainsi que leurs vitesses d'apparition et de disparition. Le logiciel qui a été utilisé dans le cadre des études ici présentées est SPECFIT/32 (Spectrum Software Associates, Chapel Hill, NC). Ce dernier permet d'entrer un modèle cinétique, par exemple $A \rightarrow B \rightarrow C$, où l'espèce A se convertit en une espèce B avec une constante k₁ et l'espèce B se convertit en une espèce C avec une constante k2. Dans le cas de la formation des complexes oxygénés de la COD-iNOSoxy, le modèle le plus simple qui peut être appliqué est un modèle à trois espèces, où la première espèce impliquée selon l'analyse serait la forme réduite de la protéine (espèce A). La liaison de l'oxygène formerait ensuite le complexe oxygéné, qui constituerait la deuxième espèce impliquée dans la réaction étudiée (espèce B). Finalement, la troisième et dernière espèce impliquée dans la réaction serait la forme oxydée de la protéine (espèce C). Bien sûr, il peut arriver que le modèle soit plus complexe, du à la présence d'intermédiaires réactionnels ou tout simplement à un processus de relaxation de l'enzyme plus apparent à la fin de la réaction. L'analyse des données a souvent demandé l'utilisation d'un modèle plus complexe et qui, par conséquent, pouvait

contenir quatre ou même cinq espèces. Plusieurs informations sont obtenues suite à la régression effectuée avec le modèle cinétique sur les données, ce qui permet d'obtenir une analyse complète des résultats obtenus (Figure 13).

Les premières informations obtenues sont les résiduelles, ou la différence d'absorbance entre les données établies par le modèle, qui proviennent de la régression effectuée sur les données analysées, et les données expérimentables. Ces résiduelles ont été utilisées pour évaluer la validité du modèle appliqué sur les données. Par exemple, une série de résiduelles de grandes amplitudes montrent que les données du modèle et les données expérimentales ne concordent pas. Pour un tel résultat, on doit donc conclure que le modèle n'est pas approprié pour les données (Figure 13B). Les spectres optiques déconvolués de chacune des espèces impliquées dans la réaction sont aussi obtenus. Il est par conséquent possible de déterminer la longueur d'onde du maximum d'absorbance au niveau de la bande de Soret dans le cas d'un balayage qui est effectuée entre 450 et 380 nm et d'identifier ces espèces. Finalement, il est possible d'obtenir la concentration de chacune des espèces en fonction du temps pour lequel le balayage cinétique a été effectué. Cette information a été extrêmement importante pour les études présentées ici, puisqu'elle permet de procéder aux expériences en spectroscopie de résonance Raman avec un mélangeur en flux continu pour lesquelles le temps où le complexe oxygéné atteint sa concentration maximale doit être connu (section 2.4).

2.4 La spectroscopie de résonance Raman

2.4.1 L'étude de complexes stables en spectroscopie de résonance Raman

L'étude de certains complexes en spectroscopie de résonance Raman, tels les complexes Fe²⁺CO, peut s'effectuer à l'équilibre. Le système utilisé est assez simple (Figure 14). Le faisceau incident provient d'un laser émettant à une longueur d'onde spécifique. Pour obtenir l'effet de résonance, on choisit un laser qui émet à une longueur



Figure 14 Schéma du système de spectroscopie de résonance Raman à l'équilibre

d'onde près de celle du maximum d'absorption de l'échantillon, par exemple dans la région 400-450 nm pour les NOS, ce qui correspond à la bande de Soret. Pour l'étude de la forme ferrique et de la forme réduite de la COD-iNOSoxy, un laser au Krypton, émettant à 406 et 413 nm, a été utilisé. Un laser Hélium-Cadmium a été utilisé dans le cas d'études sur des complexes ayant une bande de Soret avoisinant 442 nm, comme c'est le cas pour les complexes Fe²⁺CO. La lumière diffusée par l'échantillon a été collectée à 90 degrés par une lentille.

Avant d'entrer dans le spectromètre, le faisceau est envoyé au travers d'un filtre NOTCH, ce qui permet d'éliminer les photons Rayleigh. À la sortie du spectromètre, la lumière a été détectée à l'aide d'une caméra « charged-coupled device » (CCD). Cette information est retransmise sur ordinateur à l'aide du logiciel Winspec/32 (Roper Scientific, Princeton Instruments). Avant l'acquisition des spectres de résonance Raman, une calibration du système a été effectuée à l'aide d'indène dans la région spectrale voulue.

Pour la préparation de l'échantillon, un volume de 150 μ l de COD-iNOSoxy concentrée à 50 μ M a été utilisé. La protéine était tout d'abord dessalée dans une colonne auquel on avait ajouté de la résine P6DG (Biorad, Missisauga, Ontario, Canada) préalablement équilibrée avec le tampon choisi auquel on avait ajouté 1 mM DTT. Au besoin, le substrat L-arginine (10 mM) et/ou du H₄B (100 μ M) étaient ajoutés dans le tampon d'équilibration ainsi que dans la préparation de protéine. Cet échantillon a ensuite été placé dans une cuvette de forme cylindrique. L'échantillon a finalement été mis sous rotation dans un porte-cuvette à une vitesse de 1000 rpm pour éviter que l'échantillon ne surchauffe lors de l'acquisition des données et ainsi limiter les dommages pouvant être induits par le faisceau lumineux. Des spectres d'absorbance ont été enregistrés avant et après l'acquisition du spectre de résonance Raman pour vérifier si le laser et le temps écoulé avaient affecté l'échantillon.

Typiquement, des spectres individuels de quatre minutes ont été enregistrés. Ce procédé a été répété quatre fois pour enregistrer un total de cinq spectres, ce qui représente un total de 20 minutes d'acquisition. Ces cinq spectres ont ensuite été additionnés et analysés à l'aide du logiciel GRAMS AI (ThermoGalactic, Salem, NH, USA). La fonction

de correction pour la ligne de base a également été utilisée, notamment pour éliminer le signal de fluorescence des spectres.

2.4.2 La spectroscopie de résonance Raman couplée à un mélangeur en flux continu

Pour étudier des complexes instables, tels que les complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 générés par les NOS, des modifications doivent être apportées au système de spectroscopie décrit en section 2.4.1. En fait, le système de détection demeure le même. La seule différence est que l'on doit générer le complexe instable (Figure 15). Un mélangeur en flux continu a par conséquent été utilisé pour ce faire (168). Ce mélangeur est constitué d'une partie servant au mélange et d'une partie servant à exclure le liquide mélangé. Ces deux parties sont reliées à l'aide d'un petit tube de quartz possédant un canal de 250 µm* 250 µm. Par rapport au point de mélange (temps zéro), le faisceau laser peut être placé sur ce tube de quartz à l'aide d'une vis micrométrique à une distance correspondant au temps exact où la concentration du complexe qui est à l'étude est maximale. Le débit de l'écoulement liquide étant connu, de même que les dimensions du canal, on a pu calculer que 1 mm de distance sur le tube de quartz équivalait à un temps écoulé de 1.25 ms lorsque le débit est de 3 ml/min. Ce temps où la concentration du complexe oxygéné est maximale est calculé d'après le graphique de la concentration de chacune des espèces impliquées dans la réaction en fonction du temps obtenu par les analyses des données acquises au mélangeur en flux arrêté, tel que mentionné en section 2.3.2.

Les conditions dans lesquelles les échantillons sont préparés pour l'acquisition d'un spectre à l'aide d'un mélangeur en flux continu sont semblables à celles utilisées lors d'une expérience au mélangeur à flux arrêté. La seule différence se situe dans la concentration de protéine, qui est beaucoup plus élevée pour une expérience au mélangeur en flux continu, soit 60µM comparativement à 5µM pour une expérience au mélangeur à flux arrêté. Celle-ci doit être plus élevée puisque le signal est plus difficile à obtenir en spectroscopie de résonance Raman. Cet échantillon est préparé en anaérobie dans une tente




anaérobie (MBraun Labmaster, Stratham, NH, USA) où la concentration en oxygène est maintenue en dessous de 4ppm. Deux seringues contenant 10 ml de protéine ont ainsi été préparées. La COD-iNOSoxy a été réduite à l'aide de 1.5 équivalents de dithionite de sodium. La réduction complète a été vérifiée par la présence caractéristique d'une bande à 555 nm dans la région visible. Lors de l'étude de hème-oxy 1, qui est généré en présence de H₄B uniquement, 100 μ M du cofacteur a été inclus dans la préparation de protéine. Le spectre optique de la forme ferrique avant la réduction a été obtenu pour vérifier la réduction du H₄B. Pour la forme ferrique liée au H₄B, la forme pentacoordonnée caractérisée par la présence de la bande de Soret à 400 nm en spectroscopie d'absorbance est observée.

L'enregistrement des spectres de résonance Raman des complexes oxygénés a été effectué à l'extérieur de la tente, ce qui signifie qu'il a fallu faire extrêmement attention à la contamination par l'O₂ de l'air. Le mélangeur en flux continu a tout d'abord été mis sous anaérobie y injectant une solution contenant 10 mM de dithionite de sodium. Il a ensuite été rincé à l'aide de tampon anaérobie pour enlever l'excès de dithionite de sodium. Un spectre Raman du tampon utilisé a alors été enregistré afin de faire les corrections attribuables au tampon et à la cellule de quartz le cas échéant. Les échantillons de protéine réduite et les seringues contenant l'oxygène ont finalement été branchés sur le mélangeur. Dix spectres de trente secondes chacun ont été enregistrés, pour un total d'environ cinq minutes d'acquisition à l'aide du logiciel Winspec/32 (Roper Scientific, Princeton Instruments). Les spectres de résonance Raman de la COD-iNOSoxy réduite et mélangée respectivement à l'¹⁶O₂ et l'¹⁸O₂ ont été enregistrés exactement dans les mêmes conditions, l'un à la suite de l'autre. La soustraction de ces deux spectres a permis d'obtenir un spectre différentiel qui montre les changements spectraux induits par la différence de masse entre l'¹⁶O₂ et l'¹⁸O₂ sont liés à la molécule d'hème.

Les analyses et la correction pour la ligne de base ont finalement été effectuées avec le logiciel GRAMS/AI (ThermoGalactic, Salem, NH, USA), de la même manière que celles faites sur les spectres de résonance Raman acquis à l'équilibre et mentionnés en section 2.4.2. Cependant, étant donné que la calibration du spectromètre a été effectuée à l'équilibre avec l'indène par l'entrée de côté du spectromètre et que les spectres enregistrés à l'aide du mélangeur à flux continu ont été enregistrés à l'entrée frontale du spectromètre, un spectre de myoglobine a été enregistré du côté de l'équilibre et du côté du mélangeur en flux continu afin de corriger pour le déplacement du miroir du côté du mélangeur. Ces deux spectres ont été comparés afin de voir la différence entre les deux spectres acquis, différence induite par le changement de position du miroir dans le spectromètre. Le cas échéant, une correction de calibration a été effectuée pour les spectres de résonance Raman des complexes oxygénés de la COD-iNOSoxy.

Chapitre 3 Présentation des résultats obtenus

3.1 Purification de la COD-iNOSoxy

Les analyses pratiquées à la suite du processus de purification de la COD-iNOSoxy ont permis de s'assurer de la qualité et de la quantité de la protéine nouvellement purifiée. La concentration d'hème a tout d'abord été déterminée à l'aide du dosage pyridine-hémochrome (Figure 16). L'équation écrite à la section 2.2.2 a permis de calculer la concentration d'hème, et le rendement du processus de purification a ainsi été obtenu. Dans le cas du procédé de purification décrit à la section 2.2.2, le rendement typique pour une purification de COD-iNOSoxy est situé entre 9 et 11 mg par litre de milieu de culture préparé. Ce rendement était suffisant pour effectuer les études voulues au mélangeur à flux arrêté et, par la suite, au mélangeur en flux continu.

Pour s'assurer de la qualité de la protéine nouvellement purifiée, les spectres d'absorbance de la forme oxydée, la forme réduite ainsi que celui du complexe Fe^{2+} -CO ont été enregistrés (Figure 17). L'analyse de chacun des spectres a permis de statuer sur la qualité de la protéine purifiée. Le spectre de la forme oxydée montre que la bande de Soret est centrée à 420 nm, ce qui correspond à celle observée pour la forme oxydée chez les NOS non-saturées en H₄B. La réduction du fer de l'hème à l'aide de dithionite de sodium a déplacé la bande de Soret à 412 nm, ce qui était attendu. Finalement, la liaison de CO à la forme réduite a provoqué un déplacement de la bande de Soret à 445 nm. Ce dernier spectre permet d'évaluer si l'enzyme se trouve majoritairement sous la forme P450, ce qui est souhaitable afin de pouvoir procéder aux études voulues (64, 91, 93) Dans le cas de la COD-iNOSoxy, cette forme était présente en forte majorité (environ 90 %) (Figure 17), par rapport à une forme P420 a peine détectée par un épaulement à 420 nm. Des changements ont aussi été remarqués dans la région du visible de ces spectres. Des maximas étaient situés à 545



Figure 16 Dosage pyridine-hémochrome pour la COD-iNOSoxy nouvellement purifiée



Figure 17 Spectres d'absorbance de la COD-iNOSoxy dans la forme oxydée, la forme réduite et pour la complexe Fe²⁺-CO



Figure 18 SDS-PAGE montrant la COD-iNOSoxy purifiée ainsi que sa taille

dans le cas de la forme oxydée, alors qu'une seule bande située à 555 nm a été observée dans le cas de la forme réduite et du complexe Fe²⁺CO. En conclusion, la protéine purifiée par le protocole établi semble être dans la forme native, selon les spectres d'absorbance obtenu.

Un autre facteur important à vérifier suite à la purification est la pureté de la protéine nouvellement purifiée. Les analyses par SDS-PAGE permettent de séparer et voir le contenu en protéine de chacun des échantillons. Il est de cette manière facile de déterminer si l'échantillon contenant la protéine purifiée arbore une seule ou plusieurs bandes sur le gel. Si une seule bande est présente sur le gel, on peut conclure que la protéine est pure. Si plusieurs bandes apparaissent sur le gel, on concluera à la présence de protéines contaminantes ou à de la protéolyse, ce qui n'est pas souhaitable dans le cas d'étude en spectroscopie, notamment en spectroscopie de résonance Raman. En effet, la présence de protéines contaminantes peut induire de la fluorescence, ce qui affectera en bout de ligne la qualité du spectre qui sera enregistré. L'analyse par SDS-PAGE permet également de suivre la bonne progression du processus de purification ainsi que l'élimination des protéines contaminantes. Finalement, l'addition d'un marqueur de protéines sur ces gels permet d'évaluer la taille de la protéine purifiée. Dans le cas de la COD-iNOSoxy, la taille a été estimée à 48 kDa (Figure 18), ce qui correspond à la taille théorique attendue pour la protéine (165). On voit de plus que le niveau de pureté de la protéine est élevé. En conclusion, la protéine n'a subit aucune protéolyse en cours de purification et ne contient pas de contaminants. Elle peut être utilisée pour les études ultérieures sans problèmes.

3.2 Détermination de la zone de stabilité en fonction du pH pour la COD-iNOSoxy

Avant d'inclure une variante telle que le pH dans l'étude de caractéristiques propres à une protéine, il est crucial de déterminer la zone de pH dans laquelle cette protéine est



Figure 19 Détermination de la zone de stabilité au pH pour la COD-iNOSoxy

À remarquer que la correction pour le spectre de référence s'est mal effectuée, ce qui explique la présence anormale d'une bande dans la région autour de 640 nm. L'importance de ces résultats se situent dans la présence de la bande de Soret à 450 nm ou 420 nm, ce qui permet de voir si l'enzyme possède en majorité la forme P450.

stable. Dans le cas de la COD-iNOSoxy, cela peut être effectué en enregistrant le spectre d'absorbance du complexe Fe²⁺CO. Si l'enzyme se dénature partiellement, on pourra voir une portion d'enzyme avec une bande de Soret à 420 nm plutôt qu'à 445 nm. Des spectres de ce complexe ont par conséquent été enregistrés à trois pH (6, 6.5 et 9.5) afin d'analyser la structure du site actif de l'enzyme lors d'une variation du pH (Figure 19).

Ces spectres ont permis de démontrer que la COD-iNOSoxy était beaucoup plus tolérante à un milieu basique qu'à un milieu acide. En effet, on a observé la présence majoritaire de forme P420 dans le spectre d'absorbance du complexe $Fe^{2+}CO$ à pH 6 (166). Nous avons noté de plus la présence d'un précipité dans l'échantillon à ce pH. Le spectre d'absorbance à pH 6.5 a montré que la COD-iNOSoxy était sous la forme P450 en majorité. La zone de pH 6-6.5 constitue donc une zone critique pour la COD-iNOSoxy. Cela démontre que la protéine est sensible à la dénaturation en milieu acide. En milieu basique, la COD-iNOSoxy s'est avérée être stable à pH 9.5, ce qui représente un écart considérable par rapport au pH physiologique (pH 7). En conclusion, la zone de stabilité au pH pour la COD-iNOSoxy se situe entre pH 6.5 et pH > 9.5. Trois pHs ont par conséquent été sélectionnés dans cette zone pour mener nos études (6.5, 7.5 et 9.5).

3.3 Cinétiques de formation et de disparition des complexes oxygénés au mélangeur à flux arrêté

3.3.1 Complexe oxygéné formé en absence de L-arginine et de bioptérine

Lorsque le mélange entre la COD-iNOSoxy (-L-arginine/ -H₄B) préalablement réduite à l'aide de dithionite de sodium et une solution oxygénée est effectué, un complexe oxygéné avec une bande de Soret à 430 nm est formé. Les données brutes acquises sont montrées à la Figure 20A. On peut notamment y remarquer un point isobestique près de 430 nm, ce qui indique qu'à cette longueur d'onde, tous les intermédiaires réactionnels présentent la même valeur de coéfficient d'extinction molaire. Un modèle séquentiel à quatre espèces a été appliqué sur ces données, et les constantes ont été calculées pour chacune des espèces impliquées dans le modèle. La faible amplitude d'absorbance des résiduelles indique que le modèle convient bien aux données analysées (Figure 20E). La Figure 13B montre un exemple typique de résiduelles obtenues à partir d'une analyse avec un modèle qui ne correspond pas aux données soumises à cette analyse.

Les spectres d'absorbance reconstitués dans la région de la bande de Soret (Figure 20C) ainsi que dans la région du visible ont été obtenus (Figure 20D). La première espèce impliquée dans la réaction a une bande de Soret centrée aux environs de 412 nm. Dans la région du visible, la bande correspondante à cette espèce est située aux environs de 555 nm. Cette espèce correspond donc à la forme réduite de la COD-NOSoxy (91). La deuxième espèce impliquée dans la réaction étudiée montre une bande de Soret à 430 nm et la bande retrouvée dans la région du visible est située aux environs de 564 nm. Cette espèce correspond au complexe oxygéné formé lors du mélange de la COD-NOSoxy réduite et de l'oxygène. Un complexe similaire a été identifié par spectroscopie de résonance Raman chez la nNOSoxy. Ce complexe est apparenté à hème-oxy 2 (section 3.5). La troisième espèce montre quant à elle une bande de Soret aux environs de 420 nm. Dans la région du visible, cette espèce présente une bande située aux environs de 560 nm. Finalement, la quatrième et dernière espèce impliquée dans la réaction est caractérisée par une bande de Soret plus affinée à 420 nm et une bande dans le visible très large aux environs de 545 nm. Ces deux dernières espèces correspondent vraisemblablement à la forme oxydée de la COD-iNOSoxy qui est hexacoordonnée et de bas spin en absence de H₄B (91). Le graphique de la concentration de chacune de ces espèces en fonction du temps est aussi montré sur une échelle de 0,1s (Figure 20B). On voit que la concentration de la deuxième espèce, qui correspond au complexe hème-oxy 2, est maximale cinq millisecondes après le début de la réaction. Les régressions sur deux cinétiques acquises à des longueurs d'ondes simples (410 nm et 435 nm) sont montrées à la figure 20F. Ces longueurs d'ondes permettent de suivre respectivement les changements liés à la forme réduite et au complexe oxygéné pour chacune des étapes de la réaction. Ces données montrent que le complexe oxygéné atteint une concentration maximale 5 ms après le mélange. Elles montrent également qu'un minimum de trois espèces est requis pour le modèle cinétique. Les



Figure 20 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (-L-arg/-H₄B) à pH 7.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèce A (rouge), B (bleu), C (vert) et D (orange) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Spectres d'absorbance dans la région du visible (entre 530 et 580 nm) pour chacune des espèces E. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. F. Variation d'absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en vert et la régression est montrée en rouge.



Figure 21 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (-L-arg/-H₄B) à pH 6.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu), C (vert) et D (orange) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en vert et la régression est montrée en rouge.



Figure 22 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (-L-arg/-H₄B) à pH 9.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu) et C (vert) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en vert et la régression est montrée en rouge.



Figure 23 Expérience de détermination de la vitesse bimoléculaire pour la formation du complexe hème-oxy 2 en absence de L-arginine et de H₄B à pH 7.5.

Les k_{obs} de cinétiques de réaction avec 68, 136 et 204 μ M sont montrés en fonction de la concentration d'oxygène. La pente de la droite correspond à la constante bimoléculaire. L'ordonnée à l'origine correspond quant à elle à une estimation de la constante de dissociation de l'oxygène.

constantes cinétiques observées pour chacune des étapes de la réaction ont été déteminées. Le passage de la forme réduite à la forme oxygénée se fait très rapidement, soit à une vitesse observée de 1082 s⁻¹. Le passage à la forme oxydée se fait en deux étapes successives, à des vitesses de 56 et 23 s⁻¹, respectivement (Tableau 2). La dernière étape, avec une constante de 23 s⁻¹ constitue vraissemblement une étape de relaxation de la forme oxydée de la COD-iNOSoxy. La constante bimoléculaire calculée à l'aide de cinétiques obtenues en utilisant plusieurs concentrations d'oxygène est 6,4 µM⁻¹s⁻¹ (Figure 23). La constante de dissociation de l'oxygène est quant à elle de 362 s⁻¹. Les autres constantes ont également été mises en graphique pour voir si on pouvait observer une dépendance à l'oxygène, mais ce ne fut pas le cas. L'étude du complexe oxygéné généré en absence de Larginine et de H₄B a également été effectué à pH 6.5 (Figure 21) ainsi qu'à pH 9.5 (Figure 22) pour voir l'influence du pH sur les cinétiques de formation et de disparition du complexe oxygéné. Un modèle séquentiel à quatre espèces a été appliqué pour les études à ces deux pHs. Le pH a pour effet de diminuer la vitesse de formation et de disparition du complexe oxygéné. En effet, la vitesse de formation du complexe hème-oxy 2 passe de 1082 s⁻¹ à pH 7.5 à 782 s⁻¹ pour les études à pH 6.5. Il en est de même pour la vitesse d'oxydation du complexe, qui passe de 56 s⁻¹ à 35 s⁻¹ (Tableau 2). Une diminution de ces vitesses pour la formation et l'oxydation du complexe est aussi observée à pH 9.5. La vitesse de formation du complexe diminue en fait à 121 s⁻¹ quand la protéine est étudiée à ce pH. La vitesse d'oxydation du complexe étudié à ce même pH diminue également, passant de 56 s⁻¹ (pH 7.5) à 5 s⁻¹ (pH 9.5). L'augmentation et la diminution de pH auraient donc pour action de diminuer la vitesse de formation et d'oxydation du complexe hème-oxy 2. Par contre, en absence de H₄B et de L-arginine, il n'agit en aucun cas sur le type de complexe oxygéné qui est formé, puisque c'est toujours le complexe avec une bande de Soret à 430 nm, ou hème-oxy 2, qui est généré. Le complexe oxygéné montre une bande de Soret à 435 nm à pH 9.5. Typiquement, les complexes hème-oxy 2 montrent une bande de Soret entre 428 et 433 nm (153). À pH 9.5, les résiduelles montrent des écarts aux longueurs d'ondes plus petites que 410 nm. Toutefois, l'amplitude demeure faible, alors on peut conclure que le modèle appliqué aux données expérimentales est tout de même valide. L'effet du pH semble donc ici se limiter aux cinétiques de la réaction.

3.3.2 Complexe oxygéné généré en présence de H₄B uniquement

Lorsque les études sont menées sur la COD-iNOSoxy en présence de 100 µM H₄B uniquement, un complexe oxygéné différent de celui obtenu en section 3.3.1 est observé. C'est d'ailleurs en présence de ce cofacteur ou l'un de ses analogues seulement que ce complexe est formé chez d'autres NOS (130). Les données obtenues pour la formation de ce complexe pour la COD-iNOSoxy à pH de 7.5 sont présentées en figure 24A. Celles-ci montrent un point isobestique situé à 430 nm, ce qui indique la présence d'au moins deux espèces. L'analyse révèle que le meilleur modèle cinétique qui a pu être appliqué à ces données est un modèle séquentiel à cinq espèces auquel le spectre initial a été assigné afin de voir la première espèce impliquée dans la réaction qui est rapide (forme réduite). Les résiduelles obtenues lors de l'analyse de ces données ont des amplitudes très faibles. Les cinétiques à une longueur d'onde à pH 7.5 (Figure 24F) montrent qu'un minimum de quatre espèces sont nécessaires à l'analyse des données. Le temps sur lequel ces cinétiques sont montrées est toutefois trop court pour montrer la cinquième et dernière espèce, qui se révèle être un processus de relaxation de la COD-iNOSoxy. Les temps plus courts permettent toutefois de voir ce qui se passe lors de la formation du complexe oxygéné, et c'est pourquoi les résultats ont été présentés ainsi. Les spectres reconstitués pour chacune des espèces ont aussi été obtenus. La première espèce (Figure 24 C et D, en rouge) représente la forme réduite de la COD-iNOSoxy, avec sa bande de Soret située aux environs de 412 nm et une bande dans la région du visible située à 555 nm. Le complexe oxygéné est ensuite formé, et il a une bande de Soret aux environs de 415 nm ainsi qu'une bande dans le visible centrée à 560 nm. Sa formation dépend de la concentration d'oxygène, tel qu'attendu (Figure 27). Un deuxième complexe oxygéné ayant une bande de Soret aux environs de 408 nm est aussi formé. La vitesse de formation de ce complexe dépend également de la concentration d'O₂ (Figure 28). Finalement, on assiste à l'oxydation de la COD-iNOSoxy avec une constante de 123 s⁻¹ ainsi qu'à un processus de relaxation de celle-ci avec une constante de 14 s⁻¹. Les deux espèces impliquées montrent des bandes de Soret aux environs de 400 nm. Cette forme est donc la forme 5C de la COD-iNOSoxy formée en



Figure 24 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (-L-arg/+ H_4B) à pH 7.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèce A (rouge), B (bleu), C (vert), D (orange) et E (mauve) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Spectres d'absorbance dans la région du visible (entre 530 et 580 nm) pour chacune des espèces E. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. F. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en vert et la régression est montrée en rouge.



Figure 25 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (-L-arg/+H₄B) à pH 6.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu), C (vert) et D (orange) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en rouge et la régression est montrée en vert.



Figure 26 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (-L-arg/+H4B) à pH 9.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu), C (vert), D (orange) et E (mauve) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en vert et la régression est montrée en rouge.



Figure 27 Expérience de détermination de la vitesse bimoléculaire pour la formation du complexe hème-oxy 1 en présence de H_4B avec 68, 136 et 204 μ M d'oxygène à pH 7.5.

Les k_{obs} de cinétiques de réaction avec 68, 136 et 204 μ M sont montrées en fonction de la concentration d'oxygène. La pente de la droite correspond à la constante bimoléculaire. L'ordonnée à l'origine correspond quant à elle à une estimation de la constante de dissociation de l'oxygène.



Figure 28 Expérience de détermination de la vitesse bimoléculaire pour la formation du complexe à 408 nm en présence de H₄B avec 68, 136 et 204 µM d'oxygène à pH 7.5.

Les k_{obs} de cinétiques de réaction avec 68, 136 et 204 μ M sont montrées en fonction de la concentration d'oxygène. La pente de la droite correspond à la constante bimoléculaire. L'ordonnée à l'origine sur le graphique correspond quant à lui à une estimation de la constante de dissociation de l'oxygène.

présence de H₄B. Il est à noter que dans un modèle séquentiel, on ne s'attendait pas à ce qu'il y ait deux réactions avec des constantes variant en fonction de la concentration d'O₂. Nous avons donc aussi analysé les données avec un modèle concomitant où la forme réduite de la COD-iNOSoxy réagirait avec l'oxygène avec deux vitesses différentes pour former deux complexes distincts. Le modèle ne s'applique pas bien aux données (Annexe 2). La concentration de chacune des espèces en fonction du temps est également montrée (Figure 24B). Selon ce graphique, la concentration du complexe oxygéné formé ayant une bande de Soret à 415 nm est maximale 2.5 millisecondes après le mélange de la CODiNOSoxy réduite avec l'oxygène. Ce complexe sera dès maintenant appelé hème-oxy 1. Finalement, les vitesses de formation et de disparition de chacune des espèces ont été déterminées. On a pu noter que le complexe hème-oxy 1 se forme très rapidement, soit à une vitesse de 850 s⁻¹ à 68 µM d'oxygène (Tableau II). L'espèce avant une bande de Soret à 408 nm est formée à une vitesse de 217 s⁻¹, et l'oxydation est effectuée à une vitesse de 160 s⁻¹. Finalement, il se passe un processus de relaxation de la protéine. La vitesse de formation bimoléculaire a été déteminée à 4,6 μ M⁻¹ s⁻¹ pour le complexe hème-oxy 1 (Figure 27). La constante bimoléculaire a de plus été déterminée à 0,7 µM⁻¹s⁻¹ pour l'espèce qui a une bande de Soret à 408 nm (Figure 28). Les constantes de dissociation de l'oxygène sont de 536 s⁻¹ pour le complexe à 415 nm et de 369 s⁻¹ pour le complexe à 408 nm.

Pour les données acquises à pH 6.5, un modèle séquentiel de quatre espèces a été appliqué sur les données (Figure 25). Une différence surprenante avec les données obtenues à pH 7.5 est que le complexe hème-oxy 1 à 415 nm n'est pas formé. La seconde espèce impliquée dans la réaction est une espèce ayant une bande de Soret à 408 nm. Elle se forme à une vitesse de 174 s⁻¹. L'oxydation de cette dernière se fait finalement à une vitesse de 192 s⁻¹, ce qui est plus rapide que ce qui a été observé à pH 7.5 (Tableau II). Tout comme les données acquises à pH 7.5, un modèle séquentiel à cinq espèces a été appliqué aux données lorsque la COD-iNOSoxy est étudiée à une vitesse de 111 s⁻¹. Le complexe ayant une bande de Soret à 408 nm, une espèce reconnu comme étant dépendante de la concentration d'oxygène lorsque la protéine est étudiée à pH 7.5, est aussi généré, et sa vitesse de formation est de 217 s⁻¹. Le passage à la forme oxydée de l'enzyme se fait plus lentement, soit à une vitesse de 1.37 s⁻¹, pour finalement se terminer en un processus de relaxation.

Une augmentation de pH influence donc les cinétiques de la réaction, mais pas le type de complexe formé. En effet, un complexe de type hème-oxy 1 ayant une bande de Soret à 415 nm et une espèce ayant une bande de Soret aux environs de 408 nm sont formés à pH 7.5. Par contre, le complexe hème-oxy1 qui absorbe à 415 nm n'est pas formé à pH 6.5. À ce pH, seul le complexe avec la bande de Soret à 408 nm est formé.

Selon les résultats analysés jusqu'à présent, on ne peut pas induire la formation de l'un ou l'autre des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 en moditifiant le pH de l'environnement dans laquelle la protéine est étudiée. Hème-oxy 1 est observé en présence de H₄B et hème-oxy 2 est formé en absence de H₄B. Il est important de mentionner que le spectre de la forme réduite a du être assigné afin de mesurer la vitesse de conversion de la forme réduite au complexe hème-oxy 1, car celui-ci se forme très rapidement. Si ce spectre n'est pas assigné, l'analyse demeure la même en ce qui concerne les espèces formées, mais la première espèce observée est le complexe hème-oxy 1, ce qui empêche la détermination de sa vitesse de formation.

3.3.3 Complexe oxygéné généré en présence de L-arginine uniquement

Les cinétiques de formation du complexe oxygéné de la COD-iNOSoxy ont été analysées en présence de L-arginine. Les données obtenues pour la COD-iNOSoxy en présence de L-arginine uniquement et à pH 7.5 sont montrées (Figure 29A). Un modèle séquentiel à trois espèces a été appliqué à ces données. Les résiduelles obtenues (Figure 29D) démontrent que ce modèle est très approprié pour ces données à cause de leur faible amplitude. Les spectres reconstitués ont aussi été obtenus pour chacune des espèces impliquées dans la réaction (Figure 29C). La première espèce impliquée dans la réaction est la forme réduite de l'enzyme, qui a une bande de Soret à 412 nm. La deuxième espèce impliquée dans la réaction est le complexe oxygéné en lui-même, qui a une bande de Soret autour de 435 nm. Finalement, la troisième et dernière espèce est la forme oxydée de l'enzyme, qui a une bande de Soret située à 400 nm. Les spectres reconstitués dans le visible n'ont pas été obtenus dans ce cas-ci.



Figure 29 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+L-arg/-H₄B) à pH 7.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu) et C (vert) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en rouge et la régression est montrée en vert.



Figure 30 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+L-arg/-H4B) à pH 6.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu) et C (vert) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en rouge et la régression est montrée en vert.



Figure 31 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+L-arg/-H4B) à pH 9.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu), C (vert) et D (orange) en fonction du temps (s) C. Spectre d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en rouge et la régression est montrée en vert.

Le graphique de la concentration de chacune des espèces en fonction du temps (Figure 29B) a également été obtenu. Sur ce graphique, le temps où la concentration du complexe oxygéné est maximale est 20 ms après le début de la réaction. Les cinétiques à 410 nm et 430 nm, correspondant respectivement à la bande de Soret de la forme réduite et de la forme oxygénée, sont présentées (Figure 29E). Le complexe de type hème-oxy 2 généré en présence de L-arginine se forme beaucoup plus lentement que celui qui est généré en absence de H₄B et de L-arginine. Ce complexe est généré à une vitesse de 163 s⁻¹ (Tableau II). L'oxydation de ce complexe est quant à elle très lente et elle est effectuée à une vitesse de 0,16 s⁻¹. La L-arginine semble donc avoir pour effet de ralentir les étapes de formation et d'oxydation du complexe oxygéné généré dans ces conditions. Le pH ne semble pas avoir un gros effet sur la formation du complexe oxygéné en présence de Larginine, mais il a un effet considérable sur sa vitesse d'oxydation. En effet, la vitesse d'oxydation augmente de 0,16 s⁻¹ lorsque la protéine est étudiée à pH 7.5 à 2 s⁻¹ lorsque les études ont été effectuées à pH 6.5 (Figure 30) (Tableau II). Cette augmentation est encore plus importante lorsque la COD-iNOSoxy est étudiée à pH 9.5 (Figure 31), puisque la vitesse d'oxydation a été déterminée à 4.6 s⁻¹ (Tableau II). De plus, un modèle à quatre espèces a été utilisé à pH 9.5, alors qu'un modèle à trois espèces a plutôt été utilisé pour effectuer l'analyse sur les données enregistrées aux pHs 6.5 et 7.5, puisque la régression semblait être bonne sur les données acquises à pH 9.5 avec un modèle à quatre espèces. Dans ce cas-ci, cette quatrième espèce pourrait correspondre à un processus de relaxation de la protéine. En somme, les cinétiques en présence de L-arginine indiquent que la vitesse d'oxydation est augmentée par le changement de pH, mais la vitesse de formation est peu affectée. Par conséquent, des complexes moins stables sont générés à pH 6.5 et 9.5.

3.3.4 Complexe oxygéné généré en présence de L-arginine et de H₄B

Les données de l'étude de la formation du complexe oxygéné généré en présence de L-arginine et de H₄B à pH 7.5 sont présentées en Figure 32. Le modèle appliqué sur les données est un modèle séquentiel possédant trois espèces. L'amplitude des résiduelles permet de conclure que le modèle sied bien aux données analysées (Figure 32D). Les



Figure 32 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+ L-arg/+ H₄B) à pH 7.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu) et C (vert) C. Spectre d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en rouge et la régression est montrée en vert.



Figure 33 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+ L-arg/+ H₄B) à pH 6.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu) et C (vert) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en rouge et la régression est montrée en vert.



Figure 34 Analyse des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (+ L-arg/+ H₄B) à pH 9.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) pour les espèces A (rouge), B (bleu) et C (vert) en fonction du temps (s) C. Spectres d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) pour chacune des espèces. D. Résiduelles à chacune des longueurs d'ondes entre les données expérimentales et les données du modèle cinétique. E. Absorbance en fonction du temps à 410 et 430 nm. Les données obtenues sont montrées en rouge et la régression est montrée en vert.

Échantillon préparé	pH de l'environnement	Vitesse de formation du complexe oxygéné (s ⁻¹)	Bande de Soret (nm)	Vitesse d'oxydation du complexe (s ⁻¹)
COD-iNOSoxy (-) L- arginine / (-) H ₄ B	6.5	782 +/- 18	435	29,9 +/- 0,2
	7.5	$1082 + -7 (K_{off} = 362 s^{-1})$	432	56 +/- 1
	9.5	121 +/- 2	430	5,1 +/- 0,9
COD-iNOSoxy (-) L- arginine / (+) H ₄ B	6.5	174 +/- 2	405	192, 0 +/- 0,7
	7.5	850 ($K_{off} = 536 \text{ s}^{-1}$)	415	123 +/- 2
	7.5	217 ($K_{off} = 370 \text{ s}^{-1}$)	408	123 +/- 2
	9.5	111	415	1,37 +/- 0,6
	9.5	13	405	1,37 +/- 0,6
COD-iNOSoxy (+) L- arginine / (-) H ₄ B	6.5	163,4 +/- 0,5	435	2,0 +/- 0,2
	7.5	126,6 +/- 0,5	435	0,160 +/- 0,001
	9.5	153,5 +/- 0,7	435	4,6 +/- 0,4
COD-iNOSoxy (+) L- arginine / (+) H ₄ B	6.5	40,5 +/- 0,4	430	1,2 +/- 0,009
	7.5	100,6 +/- 0,6	430	38,3 +/- 0,2
	9.5	44,5 +/- 0,1	430	0,5 +/- 0,1

Tableau II Résultats obtenus en spectroscopie d'absorbance au mélangeur en flux arrêté lors du mélange de la COD-iNOSoxy avec l'O₂ (68 µM concentration après le mélange)

spectres d'absorbance reconstitués pour chacune des espèces ont également pu être obtenus (Figure 32C). La première espèce est la forme réduite de l'enzyme, qui a une bande de Soret à 412 nm. Le complexe oxygéné, qui possède une bande de Soret aux environs de 430 nm, est ensuite formé. Ensuite, on assiste à la formation du complexe oxydé de de l'enzyme qui a une bande de Soret à 395 nm. Le graphique de la concentration de chacune des espèces impliquées dans la réaction a été obtenu (Figure 32B). Selon ce graphique, la concentration du complexe oxygéné, qui a une bande de Soret à 430 nm, est à sa concentration maximale 20 ms après le début de la réaction.

Les vitesses de formation et de disparition de chacune des espèces ont pu être calculées. La formation du complexe oxygéné se fait à une vitesse de 100 s⁻¹ (Tableau II). L'oxydation de ce complexe se fait à une vitesse de 38 s⁻¹. Une régression a aussi été effectuée sur les cinétiques à une seule longueur d'onde. Les cinétiques à 410 nm et 430 nm, qui correspondent respectivement à la bande de Soret de la COD-iNOSoxy réduite et à celle du complexe oxygéné qui ont été analysées. On peut voir que la régression est bonne sur ces cinétiques (Figure 32E). Des expériences ont également été effectuées à pH 6.5 (Figure 33) et à pH 9.5 (Figure 34) pour la COD-iNOSoxy en présence de substrat et de cofacteur. Lorsque le pH de l'environnement est à pH 6.5, un modèle de trois espèces a été appliqué à nos données. La vitesse la formation du complexe oxygéné diminue à 40 s⁻¹ lorsque les études sont menées à 6.5 (Figure 33). La vitesse d'oxydation diminue également à 1.1 s⁻¹, ce qui constitue une baisse considérable. Il en est de même pour les données analysées pour la protéine étudiée dans un environnement à un pH de 9.5 (Figure 34). La vitesse la formation du complexe oxygéné diminue alors à 44 s⁻¹. La vitesse d'oxydation, quant à elle, diminue à 0,5 s⁻¹ (Tableau II). Ces résultats montrent que le pH a un effet sur les cinétiques de la réaction. Cependant, le type de complexe oxygéné formé est le même aux trois pHs, soit hème-oxy 2. On peut donc conclure que le changement de pH ne permet pas de sélectionner pour la formation de hème-oxy 1 ou de hème-oxy 2 en présence de Larginine et de H₄B.

3.4 Caractérisation des complexes Fe²⁺-CO en spectroscopie de résonance Raman

Bien que le CO ne soit pas un ligand physiologique du fer de la molécule d'hème présente chez les hémoprotéines, l'étude du complexe Fe^{2+} -CO en spectroscopie de résonance Raman permet d'acquérir certaines informations sur les NOS (section 1.5 de l'introduction) (130, 139). Les effets du changement de pH sur la protéine sont cependant inconnus. Le CO forme un complexe stable avec le fer de l'hème, qui est beaucoup plus facile à étudier que les complexes oxygénés, qui eux sont instables. C'est pourquoi ce ligand a été choisi pour suivre le comportement de la NOS en fonction du pH. Des spectres de résonance Raman ont par conséquent été enregistrés en absence de L-arginine et de H₄B, en présence de H₄B, en présence de L-arginine et de H₄B, et ce à trois pHs (6.5, 7.5 et 9.5) (Figure 35).

En absence de L-arginine et de H₄B, un mode d'élongation du lien Fe-CO (v_{Fe-CO}) large est centré à 491 cm⁻¹ (130). Le mode de balancement du lien Fe-C-O (δ_{Fe-C-O}) est quant à lui situé à 561 cm⁻¹, ce qui est attendu pour la iNOSoxy. Lorsque la COD-iNOSoxy était à pH 6.5 et à pH 9.5, aucun changement n'a été noté pour ces fréquences. Les spectres montrent également certains modes qui renseignent sur la conformation de la molécule d'hème situés à 693 cm⁻¹ (saddling), 718 cm⁻¹ (ruffling), 752 cm⁻¹ (saddling) et 803 cm⁻¹ (dooming) (130). Ces modes n'ont pas été influencés par le changement de pH imposé lors de ces études (Figure 35).

En présence de H₄B, les modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} sont situés exactement à la même fréquence que ceux assignés dans les spectres enregistrés sans L-arginine et H₄B. Les modes associés à la conformation d'hème sont aussi les mêmes, à l'exception d'un mode qui apparaît à 693 cm⁻¹, ce qui reflète un changement de la structure de l'hème vers une conformation comprenant une conformation en forme de selle à cheval qui a déjà été observé chez la iNOSoxy (130). Cela indique que ce mode est directement induit par la



Figure 35 Spectres de résonance Raman du complexe Fe²⁺CO à différents pH

présence de H₄B dans la préparation de la COD-iNOSoxy. Le changement de pH n'a pas influencé les fréquences des autres modes assignées pour la conformation de la molécule d'hème, de la même manière qu'il n'a pas influencé ces modes dans les spectres enregistrés en absence de L-arginine et de H₄B. Cela a également été le cas pour le mode δ_{Fe-C-O}. En présence de 10 mM L-arginine, les modes induits par la liaison du CO, c'est-à-dire les modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} , sont situés à 512 cm⁻¹ et 569 cm⁻¹, respectivement. Le substrat influence donc ces modes contrairement au H4B, ce qui a également été observé chez la iNOSoxy (91, 130). Lorsque le pH de l'environnement dans lequel la protéine est étudiée est 6.5 ou 9.5, ces modes demeurent aux mêmes fréquences. Le pH ne semble donc pas avoir d'influence lorsque la L-arginine est inclus dans la préparation de NOS. En présence de 10 mM L-arginine et 100 μ M H₄B, les modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} sont situés à 512 cm⁻¹ et 569 cm⁻¹ respectivement, tout comme lorsque la COD-iNOSoxy est étudiée en présence de L-arginine uniquement. Les modes de conformation de la molécule d'hème sont également les mêmes, à l'exception du mode à 693 cm⁻¹ qui est un peu plus apparent que lorsque la NOS est étudiée en présence de H₄B uniquement. Lorsque les études en présence de Larginine et de H₄B sont menées à pH 6.5 et 9.5, aucun changement n'est noté dans les fréquences assignées pour les différents modes présents (Figure 35). En somme, le pH ne semble pas avoir une influence sur les modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} lors de l'étude du complexe Fe²⁺-CO chez la COD-iNOSoxy. Les modes associés à la conformation de la molécule d'hème ne sont également pas influencés par ces changements de pH, peut importe si la Larginine et le H₄B sont présents dans l'échantillon préparé pour enregistrer le spectre.

3.5 Caractérisation des complexes oxygénés en spectroscopie de résonance Raman

3.5.1 Le complexe oxygéné hème-oxy 2

Le complexe oxygéné hème-oxy 2 a été caractérisé pour la COD-iNOSoxy en spectroscopie de résonance Raman en absence de L-arginine et de H₄B à pH 7.5 à l'aide d'un mélangeur en flux continu. Dans ces conditions expérimentales, la concentration du




complexe oxygéné est maximale 5 millisecondes après le début de la réaction, selon ce qui a été révélé par le graphique de la concentration des espèces en fonction du temps obtenu lors des analyses au mélangeur à flux arrêté (Figure 24 section 3.3.1). C'est donc à ce temps que le laser a été focalisé sur le mélangeur en flux continu. La concentration maximale du complexe oxygéné obtenu est de 2.1 µM, ce qui correspond à 84% de la concentration totale en hème disponible (2.5 μ M). Le spectre de résonance Raman enregistré dans les hautes fréquences a tout d'abord été obtenu (Figure 36B). La forme réduite de la COD-iNOSoxy présente deux bandes v_4 situées respectivement à 1360 cm⁻¹ et 1347 cm⁻¹, ainsi qu'une bande v_3 située à une fréquence de 1466 cm⁻¹. La bande v_4 à 1347 cm^{-1} et la bande v₃ à 1466 cm^{-1} sont caractéristiques d'une forme pentacoordonnée de haut spin, alors que la bande 1360 cm⁻¹ indique la présence d'une forme hexacoordonné de bas spin (91). Pour cette dernière forme, la bande v_3 n'est pas visible. Ces spectres sont typiques de la iNOSoxy sans H4B. Suite au mélange avec l'oxygène, des bandes v3 et v4 caractéristiques d'un complexe hexacoordonnée de bas spin sont observées respectivement à 1500 cm⁻¹ et 1372 cm⁻¹. Ces fréquences sont identiques à celles observées pour la forme oxydée chez la COD-iNOSoxy (Figure 36B). Cependant, la formation du complexe oxygéné est révélée par la bande à 1132 cm⁻¹, qui est plus intense pour la forme oxygénée que la forme oxydée, et qui se déplace à 1068 cm⁻¹ avec l'¹⁸O₂ (Ci-dessous).

La COD-iNOSoxy a été mélangée avec de l'¹⁶O₂ et de l'¹⁸O₂ et les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales (section 2.4.3). La soustraction de ces spectres donne un spectre différentiel (¹⁶O₂ - ¹⁸O₂) qui montre un déplacement Raman de 1132 cm⁻¹ à 1068 cm⁻¹, ce qui représente un déplacement de 64 cm⁻¹ (Figure 36B). Cette valeur est en accord avec la valeur théorique calculée pour un oscillateur harmonique diatomique (O-O), qui est de 65 cm⁻¹. Le mode d'élongation du lien O-O (v_{o-o}) a donc pu être assigné à 1132 cm⁻¹ pour la COD-iNOSoxy. Des spectres ont également été enregistrés dans les basses fréquences afin de voir s'il était possible d'assigner le mode d'élongation du lien Fer-oxygène (v_{Fe-O}), mais il semble que ce ne soit pas possible. En effet, le spectre différentiel ne montre aucune bande sensible à l'isotope dans la région entre 400 et 600 cm⁻¹, qui est la région spectrale où l'on retrouve ce mode habituellement (Figure 36A) (146). Étant donné qu'il s'agit d'un mode de faible intensité, il se peut que le ratio signal-sur-bruit soit trop faible pour le détecter. Le mode $v_{Fe-O}a$ été détecté chez une NOS de bactéries mais pas chez la nNOS (145, 146).

3.5.2 Le complexe oxygéné hème-oxy 1

L'étude du complexe hème-oxy 1 au mélangeur en flux continu a été effectuée pour la COD-iNOSoxy en présence de H₄B. Selon le graphique de la concentration des espèces (μ M) en fonction du temps, le complexe hème-oxy 1 atteint une concentration maximale de 1.5 μ M, 2.5 ms après le début de la réaction (Figure 24, section 3.3.2). C'est donc à ce temps que le laser a été focalisé sur le canal de quartz afin d'enregistrer les spectres de résonance Raman. Une substitution isotopique a également été effectuée afin de procéder à l'identification du mode v₀₋₀ (Figure 37). Cette expérience a été répétée plusieurs fois, et ce mode ne semblait pas être facile à identifier, puisque chacune de ces expériences a été soldée par un spectre différentiel plat, ce qui signifie qu'aucune différence n'a été induite par le changement de masse d'oxygène lors de l'enregistrement des spectres avec l'¹⁶O₂ et l'¹⁸O₂.

Sur le spectre obtenu lorsque le laser a été focalisé 2.5 ms après le début de la réaction, les bandes v_4 et v_3 ont été localisées à 1372 et 1487 cm⁻¹, respectivement (Figure 37 A et B). Ces bandes proviennent de la forme ferrique de l'enzyme, qui est pentacoordonnée et de haut spin en présence de H₄B. Il s'agit donc d'une indication que le laser avait possiblement été focalisé trop loin sur le canal de quartz. Le laser a donc été placé sur le mélangeur en flux continu le plus près possible du point de mélange, soit à une distance correspondant à 0,5 ms. À ce temps, les bandes v₄ et v₃ de la COD-iNOSoxy étaient toujours situées à 1372 et 1487 cm⁻¹ (Figure 37 C et D). Cependant, la bande v₃ à 1487 cm⁻¹ est moins intense que sur le spectre enregistré à 2.5 ms, ce qui indique que la forme ferrique est moins présente, puisque la réaction est suivie plus tôt. À 0,5 ms et 2.5 ms après le mélange, on détecte également une bande v₃ à 1466 cm⁻¹, qui provient vraissemblablement de la forme réduite de la COD-iNOSoxy, étant donné que la fréquence



Figure 37 Spectres de résonance Raman pour le complexe hème-oxy 1 généré chez la COD-iNOSoxy à pH 7.5

A. Spectre du complexe hème-oxy 1 enregistrer 2.5 ms après le début de la réaction avec $1'^{18}O_2$. B. Spectre du complexe hème-oxy 1 enregistrer 2.5 ms après le début de la réaction avec $1'^{16}O_2$. C. Spectre du complexe hème-oxy 1 enregistrer 0.5 ms après le début de la réaction avec $1'^{18}O_2$. D. Spectre du complexe hème-oxy 1 enregistrer 0.5 ms après le début de la réaction avec $1'^{18}O_2$. D. Spectre du complexe hème-oxy 1 enregistrer 0.5 ms après le début de la réaction avec $1'^{16}O_2$. E Spectre différentiel (${}^{16}O_2 - {}^{18}O_2$).



Figure 38 Spectres de résonance Raman pour le complexe hème-oxy 1 généré chez la COD-iNOSoxy à pH 9.5

Le spectre en orange montre le complexe enregistré 15 ms après le début de la réaction avec $1'^{16}O_2$. Le spectre en vert montre le complexe enregistré 15 ms après le début de la réaction avec $1'^{18}O_2$. Le spectre en bleu montre le spectre différentiel (${}^{16}O_2 - {}^{18}O_2$).

* emplacement hypothétique du mode d'élongation O-O (ν_{O-O})



Figure 39 Spectres de résonance Raman pour le complexe ayant une bande de Soret centrée à 408 nm généré chez la COD-iNOSoxy

Le spectre en bleu montre le spectre complexe ayant une bande de Soret aux environs de 408 nm enregistré 15 ms après le début de la réaction avec $1^{16}O_2$. Le spectre en rouge a été enregistré 15 ms après le début de la réaction avec $1^{18}O_2$. Le spectre en vert montre le spectre différentiel (${}^{16}O_2 - {}^{18}O_2$). Les spectres de la forme ferrique (Fe³⁺) et de la forme ferreuse (Fe²⁺) sont également présentés.

* Bande de laser vue dans les spectres.



Figure 40 Régression à l'aide du logiciel GRAMS/AI sur les bandes obtenues dans le spectre différentiel de l'expérience décrite à la figure 39

On voit qu'il y a un maximum centré à 740 cm⁻¹ (bande avec $1^{16}O_2$) et deux minima centrés à 692 cm⁻¹ et 676 cm⁻¹ (bande avec $1^{18}O_2$).

 v_3 de la forme réduite est 1366 cm⁻¹ (Figure 36B). Par contre, la bande v_3 attendue de la forme oxygénée à 1500 cm⁻¹ n'est pas détectée. Ce qui est observé semble donc être un mélange de la forme réduite et de la forme ferrique dans le cas du complexe hème-oxy 1 formé chez la COD-iNOSoxy (Figure 37), que ce soit à 0,5 s et 2.5 s suivant le mélange.

Des spectres de résonance Raman pour la COD-iNOSoxy en présence de H₄B dans un environnement à pH 9.5 ont également été enregistrés car la vitesse d'oxydation est beaucoup plus lente et, par conséquent, le complexe oxygéné aurait pu être plus facile à caractériser (Figure 38). Ce complexe atteint une concentration maximale de 1.5 μ M, 15 ms après le mélange, ce qui correspond à 60% de la concentration d'hème disponible (Figure 26). De la même manière que ce qui a été observé à pH 7.5, le mode v₀₋₀ n'a pu être identifié (Figure 38). On voit le mode v₃ à 1487 cm⁻¹ et le mode v₄ à 1372 cm⁻¹ de la forme ferrique pentacoordonnée de haut spin. On détecte également un peu de la forme ferreuse avec un mode v₃ à 1466 cm⁻¹. La bande v₃ attendue d'un complexe oxygéné (autour de 1500 cm⁻¹) n'est pas observée. En somme, le mode v₀₋₀ est difficile à identifier en spectroscopie de résonance Raman pour hème-oxy 1, parce que ce complexe ne semble pas formé (sera discuté en section 4.2.2).

3.5.3 Le complexe avec la bande de Soret à 408 nm

En focalisant le laser 15 millisecondes après le début de la réaction et en enregistrant des spectres dans la région entre 600 et 1200 cm⁻¹ pour la COD-iNOSoxy en présence de H₄B à pH 7.5, il a été possible d'obtenir le spectre de résonance Raman de l'espèce ayant une bande de Soret à 408 nm et qui était, selon les résultats obtenus lors de la détermination de la constante bimoléculaire, dépendante de la concentration d'oxygène (Figure 39). Le spectre différentiel provenant des spectres enregistrés avec $1^{16}O_2$ et $1^{18}O_2$ ($1^{16}O_2 - 1^{18}O_2$) a montré qu'un bande à 740 cm⁻¹ et une autre à 676 cm⁻¹ étaient sensibles aux changements isotopiques. Lorsque $1^{16}O_2$ est substitué par $1^{18}O_2$, on remarque une baisse d'intensité pour la bande à 740 cm⁻¹. Cela présente une différence de fréquence de 64

Tableau III Propriétés optiques et fréquences des modes d'étirement Fe-O et O-O pour les complexes oxygéné, peroxy et ferryle (composé I et II) de certaines protéines hémiques et composés modèles.

Composé	Protéine	Bande de Soret (nm)	v ₄ , v ₃ (cm ⁻¹)	Fe-O (Fe- ¹⁸ O) (cm ⁻¹)	O-O (¹⁸ O- ¹⁸ O) (cm ⁻¹)	Référence
Oxygéné (Fe ^{III} O ₂ [*])	COD-iNOSox	~430	1372, 1500	N.D.	1132 (1068)	Ce mémoire
	nNOSoxy	~430	1372, N.D.	N.D.	1135 (1068)	144
	saNOS	~430	1373, 1500	517 (487)	1135 (1071)	145
	P450 _{cam} /camphor	420	1374, N.D.	541 (511)	1140 (1074)	172
Peroxy/Hydroperoxy Fe ^{III} OO /Fe ^{III} OOH ⁻	CYP101	440	N. D.	N. D.	N. D.	167
	СРО	449	N. D.	N. D.	N. D.	167
	HO	420	N. D.	N. D.	N. D.	167
	HRP	419	N. D.	N. D.	ND	167
	Mb (Fe ^{lll} OO)	428	N. D.	N. D.	N. D.	169
	Mb (Fe [⊞] OOH ⁻)	N.D.	1379, 1512	617 (592)	N. D.	
	Composés modèles (Fe ^{III} OOH)	ND	ND	ND	N. D.	168
	bas-spin			617-644	781-906	
	haut-spin			438-621	816-850	
Composé I	HRP	N. D.	1359, 1504	794	N. D.	171
	CPO	N. D.	1359, (-)	792	N. D.	171
Composé II	HRP	N. D.	1379,1509	774	N. D.	171
	CPO (forme protonée)	N. D.	1377, N.D.	565	N. D.	170
	LPO II	N. D.	N. D.	745 (712)	N. D.	171

cm⁻¹, ce qui ne correspond pas à ce qui est attendu pour un modèle diatomique harmonique dans cette région spectrale. Cependant, une régression précise a été effectuée sur la bande négative située à 676 cm⁻¹ sur le spectre différentiel. Cette régression a montré la présence de deux modes, situés à des fréquences de 676 cm⁻¹ et 692 cm⁻¹, respectivement (Figure 40). La différence entre la bande à 692 cm⁻¹ et celle à 740 cm⁻¹ (48 cm⁻¹) correspond de plus près à ce qui est calculé théoriquement pour un modèle diatomique harmonique (O-O) pour un complexe ferrique superoxyde (42 cm⁻¹). La bande à 676 cm⁻¹ quant à elle serait un mode d'hème qui aurait gagné de l'intensité par résonance de Fermi avec la bande à 692 cm⁻¹. D'après les données obtenues au mélangeur à flux arrêté, le complexe avec une bande de Soret à 408 nm est formé en grande quantité (1,5 μ M, soit 60% de la quantité d'hème) et s'accumule plus que le complexe hème-oxy 1, ce qui fait qu'il est plus facile à caractériser en spectroscopie de résonance Raman (Figure 24).

L'assignation la plus probable du mode à 740 cm⁻¹ est celle du mode O-O d'un complexe hydroperoxyde (Tableau III) étant donné la fréquence et l'amplitude du déplacement isotopique. Cependant, avec une bande de Soret à 408 nm, le spectre d'absorbance ne correspond pas aux spectres publiés pour les complexes hydroperoxy (169-171). Mais il est important de mentionner que ces complexes sont générés lors d'expérience à très basses températures, ils ne correspondent pas à la forme relaxée de ces complexes. Les autres possibilités concernant l'assignement du mode à 740 cm⁻¹ sont le mode Fe-O du composé I ou composé II (Tableau III) (172-174). Bien que la fréquence de ces modes se situe dans la région 565-794, l'amplitude du déplacement isotopique mesuré pour la COD-iNOSoxy (48 cm⁻¹) est trop grand pour correspondre à un mode Fe-O pour lequel on s'attend à un déplacement isotopique de 33 cm⁻¹. De plus, le composé I est très difficile à étudier en spectroscopie de résonance Raman parce qu'il se réduit au composé II par exposition au laser (174). Un composé II est par contre consistant avec le spectre optique obtenu de la forme ayant une bande de Soret à 408 nm, mais le déplacement isotopique mesuré (48 cm⁻¹) est grand par rapport au déplacement attendu. Des expériences dans les hautes fréquences en spectroscopie de résonance Raman devront être effectuées afin d'établir la fréquence des modes v3 et v4. En effet, les composés II présentent des fréquences v4 plus élevées que celles des formes hydroperoxydes. De plus, les expériences

devront être répétées dans les basses fréquences pour la substitution isotopique avec $1'^{18}O_2$ et la sensibilité au D₂O devra être déterminée. En effet, si le complexe est un hydroperoxy, on s'attend à ce que le proton de l'hydroperoxy s'échange avec le deutérium. Ces expériences permettront de confirmer ou d'infirmer l'assignation à un complexe hydroperoxyde.

Bien qu'il n'ait pas été possible d'identifier le mode v_{0-0} pour le complexe hèmeoxy 1, il a toutefois été possible d'identifier un mode sensible à l'¹⁸O₂ pour l'espèce subséquente à la formation de ce complexe, c'est-à-dire l'espèce ayant une bande de Soret à 408 nm.

Chapitre 4 Discussion

4.1 Formation des complexes oxygénés au mélangeur à flux arrêté

4.1.1 Conditions dans lesquelles les complexes oxygénés sont formés

4.1.1.1 Le complexe hème-oxy 1

Les complexes oxygénés hème-oxy 1 et hème-oxy 2 sont générés dans des conditions expérimentales bien distinctes, comme l'ont montré les résultats obtenus en spectroscopie d'absorbance au mélangeur à flux arrêté pour la COD-iNOSoxy. Ces résultats correspondent de plus à ce qui est attendu, selon ce qui a été déterminé pour la eNOS et la nNOS à ce sujet dans la littérature scientifique (141, 153).

Selon la littérature, le complexe hème-oxy 1 est formé uniquement en présence de H_4B ou de l'un de ses analogues, tels que l'a H_4B et le H_2B (154, 156). Nos résultats montrent que ce complexe, pour la COD-iNOSoxy, est formé également en présence de H_4B sans substrat. Ce complexe a une bande de Soret à 415 nm et une bande dans le visible qui est centrée à 560 nm. Cela concorde avec les résultats qui ont été précédemment publiés par d'autres groupes de recherche pour la eNOS et la nNOS (151-154, 156).

4.1.1.2 Le complexe ayant une bande de Soret à 408 nm

Lors des expériences effectuées en présence de H₄B, on a remarqué la présence d'une espèce ayant une bande de Soret aux environs de 408 nm dont la formation semble, selon les expériences de détermination de la vitesse bimoléculaire pour la COD-iNOSoxy, être dépendante de la concentration d'oxygène utilisée lors de l'expérience (Figures 28 et 32). Une espèce similaire a déjà été observé chez la nNOS (149) et chez saNOS (146). Sa présence récurrente dans les résultats d'analyse pour la COD-iNOSoxy en présence de H₄B porte à croire que cet intermédiaire est réel et bel et bien formé au cours de la réaction. Sa formation pourrait être associée à la réduction du complexe oxygéné induite par le don d'un électron provenant du H₄B et sa protonation. En effet, suite à la liaison de l'oxygène, le complexe oxygéné pourrait se transformer en un intermédiaire hydroperoxyde, qui est présumé comme faisant partie intégrante du mécanisme de catalyse de la réaction. Pour expliquer la dépendance envers la concentration d'oxygène pour la formation de cet intermédiaire, il faudrait que les étapes de liaison et de dissociation de l'oxygène soient rapides, de sorte que l'effet net est l'apparence de la conversion de la forme ferreuse à une forme hydroperoxy (Schéma 1b) et non pas le simple ajout d'un électron et d'un proton au complexe oxygéné (Schéma-1a).

a.
$$Fe^{II} + O_2 \leftrightarrow Fe^{II}O_2 + H^+ + e^- \rightarrow Fe^{III}$$
-OOH
b. $Fe^{II} + O_2 + H^+ + e^- \rightarrow Fe^{III}$ -OOH

Schéma 1: Liaison de l'oxygène au fer de l'hème et formation d'un complexe hydroperoxyde

Lorsque le pH de l'environnement de la protéine est varié à 6.5, le complexe hèmeoxy 1 ne semble pas être formé (Figure 25). En effet, la deuxième espèce formée à la suite de la forme réduite est plutôt l'espèce ayant une bande de Soret aux environs de 408 nm. Cela peut concorder avec l'hypothèse selon laquelle cette espèce serait un hydroperoxy, puisque le passage en milieu acide augmente le nombre de protons libres présents dans l'échantillon de protéine préparé. La formation de l'espèce hydroperoxo s'en trouverait alors favorisée. Lorsque le pH de l'environnement est basique (pH 9.5), les mêmes espèces sont formées que lorsque les études sont effectuées a pH 7.5. Cela indique que le passage en milieu basique affecte moins le cours de la réaction qu'un passage en milieu acide.

4.1.1.3 Hème-oxy 2

Le complexe oxygéné hème-oxy 2, quant à lui, est généré en absence de L-arginine et/ou de H₄B, en présence de L-arginine uniquement ainsi qu'en présence de L-arginine et de H₄B. Le complexe formé a une bande de Soret aux environs de 430 nm, et ce quel que soit le pH de l'environnement dans lequel la COD-iNOSoxy est étudiée.

On peut donc conclure que le pH ne semble pas, selon les résultats obtenus, avoir une influence sur le type de complexe oxygéné formé, hème-oxy 1 ou hème-oxy 2. La formation des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 est par conséquent plutôt influencée par la présence ou l'absence de L-arginine ou de H₄B.

4.1.2 Impact du H₄B, de la L-arginine et du pH sur les cinétiques de la réaction

On a pu voir lors des expériences au mélangeur à flux arrêté que la présence ou l'absence de L-arginine et/ou de H₄B ainsi que le pH ont un effet significatif sur les vitesses de formation et d'oxydation des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2.

L'addition de L-arginine à la COD-iNOSoxy a pour effet de diminuer la vitesse de formation du complexe hème-oxy 2 généré en présence du substrat. Cet effet a également été observé chez d'autres NOS (145, 146, 149, 153, 175). La vitesse d'oxydation est toutefois augmentée en présence de L-arginine, ce qui est contraire à ce qui est observé chez la nNOS et la eNOS, mais qui a été observé auparavant avec la iNOSoxy (145, 146, 149, 153, 175). La raison pour laquelle la iNOS se comporte différemment de la nNOS et la eNOS n'est pas encore connue. Le cofacteur H₄B a également un effet sur les vitesses de formation et d'oxydation du complexe hème-oxy 1. Il contribue en effet à diminuer la vitesse de formation de ce complexe ainsi qu'à en augmenter sa vitesse d'oxydation. Cet effet est également connu chez les autres NOS (3, 141). L'effet combiné de la L-arginine et

du H₄B, par rapport à la L-arginine seule, est d'augmenter la vitesse d'oxydation ce qui, dans ce cas, correspond en fait à la vitesse de conversion de la L-arginine en NOHA.

Le pH semble également avoir un effet sur les vitesses de formation et de disparition des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2. En absence de H₄B et de L-arginine, l'augmentation ou la diminution de pH provoque une diminution de la vitesse de formation du complexe. Il en est de même pour la vitesse d'oxydation de ce complexe. Les vitesses de formation et de disparition maximales de ce complexe semblent donc être optimales lorsque le pH est à 7.5. En présence de H₄B uniquement, les vitesses de formation et d'oxydation sont également diminuées à pH 9.5. Toutefois, le processus d'oxydation de la COD-iNOSoxy est favorisé lorsque celui-ci est étudié à pH 6.5. Lorsque de la L-arginine seulement est incluse dans la préparation de protéines, il semblerait que le pH n'ait aucun effet sur le complexe qui est formé dans ces conditions. Ce phénomène peut s'expliquer logiquement par le fait que la L-arginine se lie directement dans la poche distale de l'hème, ce qui peut potentiellement bloquer l'effet de l'augmentation ou de la diminution de pH. De plus, la L-arginine a un pKa de 12,5. Elle ne subit donc pas les effets des changements de pH imposés lors de ces études. L'action combinée de la L-arginine et du H4B forme finalement un complexe dont les vitesses de formation et d'oxydation sont diminuées par un passage en milieu acide ou basique. On peut donc conclure que le pH affecte l'étape de catalyse en présence de L-arginine et de H₄B.

En somme, le pH semble avoir un effet significatif sur les vitesses de formation et d'oxydation des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 générés par la COD-iNOSoxy. La L-arginine et le H₄B affectent également à leur manière les cinétiques de la réaction.

4.2. Formation des complexes oxygénés au mélangeur en flux continu

4.2.1 Nature du complexe hème-oxy 2

L'une des hypothèses qui avait été avancée quant à la nature des complexes oxygénés hème-oxy 1 et hème-oxy 2 est que le complexe hème-oxy 1 serait un complexe oxyferreux ($Fe^{2+}O_2$) et hème-oxy 2 serait un complexe ferrique superoxyde ($Fe^{3+}O_2$). L'une des manières de valider cette hypothèse est l'étude des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 chez la COD-iNOSoxy en spectroscopie de résonance Raman, puisqu'elle permet d'obtenir de l'information sur les propriétés électrostatiques de ces complexes.

Le spectre de résonance Raman du complexe hème-oxy 2 a déjà obtenu pour la nNOSoxy et il a été établi que le complexe de type hème-oxy 2 possédait un caractère ferrique superoxyde (145). En effet, un mode d'élongation du lien O-O (v_{O-O}) à une fréquence de 1135 cm⁻¹ a été déterminé par substitution isotopique de l'¹⁶O₂ par l'¹⁸O₂. Cette fréquence est similaire à celles des composés peroxydes. Cette expérience a été effectuée chez la COD-iNOSoxy afin d'établir une bonne comparaison entre ce complexe et celui généré par la nNOSoxy ainsi qu'entre les complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 générés par la COD-iNOSoxy.

Le spectre de résonance Raman du complexe hème-oxy 2 généré chez la CODiNOSoxy a permis de révéler que le mode d'élongation du lien O-O était situé à 1132 cm⁻¹ en absence de L-arginine et de H₄B, une fréquence similaire à celle observée chez la nNOSoxy (145). Cet assignement de mode a également été fait par substitution isotopique. On peut donc conclure que le complexe hème-oxy 2 généré par la COD-iNOSoxy possède un caractère ferrique superoxyde très similaire à celui observé chez la nNOS.

4.2.2 Nature du complexe hème-oxy 1

Les résultats obtenus au mélangeur en flux continu pour la COD-iNOSoxy en présence de 100 μ M H₄B n'ont pas permis d'identifier le mode v₀₋₀ en spectroscopie de résonance Raman du complexe hème-oxy 1. Le spectre enregistré 2.5 ms après le début de la réaction a montré, grâce à la fréquence attribuée pour les modes v₃ et v₄, que la forme ferrique est majoritairement présente à ce point de la réaction. Cette expérience a été

effectuée à quatre reprises, et les résultats obtenus ont été les mêmes à chaque fois. Nous avons émis l'hypothèse que la focalisation du laser a été effectuée trop loin sur le canal du mélangeur en flux continu. La focalisation du laser a donc été effectuée à une distance correspondant 0.5 ms suivant le début de la réaction. Les spectres ont montré que la forme ferrique était toujours présente, mais en quantité moindre qu'à 2.5 ms. Dans les deux cas, à 0.5 et 2.5 ms, la forme réduite de la iNOSoxy avec le mode v₃ à 1466 cm⁻¹ a été détectée. Ces résultats suggèrent que la COD-iNOSoxy passe directement de la forme réduite à la forme ferrique sans accumuler suffisamment de complexe oxygéné pour le détecter.

Il est donc possible de conclure sur le complexe hème-oxy que 1) Considérant les résultats obtenus au mélangeur à flux arrêté pour la COD-iNOSoxy en présence de H₄B, et constatant que seulement 60% de la concentration en hème disponible forme le complexe hème-oxy 1, il se peut que ce complexe ne s'accumule pas suffisamment pour être visible lors des expériences en spectroscopie de résonance Raman. 2) Il se peut également que l'exposition au laser augmente considérablement la vitesse d'oxydation du complexe hème-oxy 1. L'hypothèse que le mode v_{0-0} est silencieux en spectroscopie de résonance Raman peut être exclue pour le moment étant donné que le mode v_3 de la forme oxygénée n'est pas détecté, ce qui indique clairement la non-détection de ce complexe. Pour tenter d'obtenir le spectre de résonance Raman du complexe hème-oxy 1, le pH de l'environnement de la protéine a été augmenté à pH 9.5 puisqu'à ce pH, le complexe hème-oxy 1 s'oxyde moins rapidement (850 à pH 7.5 vs 111 s⁻¹ à pH 9.5). Nos résultats ont montré que le mode v_{0-0} du complexe hème-oxy 1 est demeuré impossible à identifier.

L'expérience à pH 7.5 effectuée à un temps plus long a permis d'en apprendre plus sur la raison de la non-détection du mode O-O. Étant donné que nous avons identifié le mode v_{O-O} potentiel d'une forme ferrique hydroperoxy à un temps de 15 ms, il n'est pas possible qu'aux temps de 0,5 ou 2,5 ms, une grande portion de la protéine ait déjà été naturellement réoxydée. L'hypothèse la plus plausible est donc que l'exposition au laser de hème-oxy 1 étudiée à 0,5 et 2,5 ms ait causée son oxydation.

4.2.3 Nature du complexe avec la bande de Soret à 408 nm

Il a été possible d'identifier le mode v_{0-0} pour l'espèce subséquente à la formation du complexe hème-oxy 1 ayant une bande de Soret à 408 nm. Ce mode serait situé à 740 cm⁻¹, et la substitution de l'¹⁶O₂ par l'¹⁸O₂ déplace ce mode à 692 cm⁻¹. En effet, deux modes ont été identifiés dans la régression des modes O¹⁸ négatifs situés respectivement à 676 cm⁻¹ et 692 cm⁻¹ (Figure 40). La différence de 48 cm⁻¹ entre le mode à 740 cm⁻¹ et le mode à 692 cm⁻¹ est plus près de la valeur théorique calculée pour le mode v_{0-0} pour un hydroperoxyde, soit 42 cm⁻¹. Comme la bande à 676 cm⁻¹ est intense, il est possible que celle-ci ait gagné de l'intensité au profit du mode à 692 cm⁻¹ par résonance de Fermi. Un tel phénomène a été effectivement observé pour un composé modèle hydroperoxy (170).

4.2.4 Conclusions quant à la nature des complexes oxygénés générés par la COD-iNOSoxy

En somme, il a été impossible dans le cadre de ce projet d'identifier le mode v_{0-0} pour le complexe hème-oxy 1 généré par la COD-iNOSoxy en spectroscopie de résonance Raman, puisqu'il apparaît que ce complexe s'oxyde rapidement par une exposition à un faisceau laser. D'autres techniques, telles que l'étude de ces complexes à des températures cryogéniques, devront être utilisées pour acquérir de l'information sur le complexe hème-oxy 1. Il a toutefois été possible d'identifier le mode v_{0-0} pour l'espèce subséquente à la formation du complexe hème-oxy 1, qui est possiblement un complexe hydroperoxyde. Cette expérience devra toutefois être répétée afin de bien s'en assurer et ce complexe devra être caractérisé en présence de D₂O. Étant donné que les spectres de résonance Raman d'un complexe hydroperoxyde n'ont jamais été obtenus pour une NOS ni un cytochrome P450, l'identification de ce complexe chez la COD-iNOSoxy si elle est confirmée, peut former la base d'une publication scientifique.

4.3 Formation du complexe Fe²⁺CO chez la COD-iNOSoxy et effet du pH sur ces complexes

Le complexe Fe²⁺-CO formé chez la COD-iNOSoxy a été étudié en spectroscopie de résonance Raman à l'équilibre, et ce à pH 6.5, 7.5 et 9.5. Lorsque ce complexe est étudié en absence de L-arginine et de H₄B, on peut voir les modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} à 491 cm⁻¹ et 561 cm⁻¹, respectivement. Ces résultats sont semblables à ceux qui ont été obtenus pour la iNOSoxy (91, 130). Quant aux modes qui sont assignés en tant que modes de conformation de la molécule d'hème, ils sont également semblables à ceux assignés pour la iNOSoxy. La coupure des 75 premiers acides aminés pour cette enzyme semble donc ne pas avoir d'effet sur le comportement de celle-ci. Le pH n'a finalement pas semblé avoir un effet sur la formation du complexe en absence de L-arginine et de H₄B, puisque les modes sont situés à la même fréquence à pH 6.5, 7.5 et 9.5.

En présence de H₄B uniquement, les modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} se retrouvent exactement à la même fréquence que ceux assignés en absence de L-arginine et de H₄B. Le cofacteur de l'enzyme ne semble pas avoir d'effet sur ces modes, ce qui a été observé pour la iNOSoxy. Les modes de conformation de la molécule d'hème sont également les mêmes, à l'exception d'un mode qui semble être plus intense à 693 cm⁻¹, comparativement au spectre obtenu en absence de L-arginine et de H₄B. Ce mode réfère à une conformation de la molécule en forme de fer à cheval, qui est accrue par la liaison du H₄B. Le cofacteur semble donc induire une autre conformation à la molécule d'hème, tel qu'observé pour la iNOSoxy (130). Le pH ne semble pas, en présence de H₄B, induire des différences dans les spectres obtenus.

En présence de L-arginine uniquement, il y a un changement dans la fréquence assignée pour les modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} , qui se retrouvent respectivement à 512 cm⁻¹ et 569 cm⁻¹. L'addition de L-arginine à l'échantillon semble donc avoir un effet sur la liaison du CO à la COD-iNOSoxy. Le mode v_{Fe-CO} est à une fréquence plus élevé et est plus intense et plus fin que celui observé en présence de H₄B ou en absence de L-arginine et de H₄B. Le fait d'avoir une fréquence plus élevée indique la présence d'interactions électrostatiques entre la L-arginine et le CO lié au fer de l'hème. Finalement, le pH n'a aucun effet sur ces fréquences, ainsi que sur les modes assignés en tant que modes de conformation de la molécule d'hème. En présence de L-arginine et de H₄B, les modes sont exactement à la même fréquence que ceux assignés en présence de L-arginine uniquement. Cela a également été observé pour la iNOSoxy. Le pH semble encore une fois ne pas influencer ces modes, de même que les spectres qui ont été enregistrés aux différents pHs.

En conclusion, seule la L-arginine semble avoir un effet sur la liaison du CO sur le fer de l'hème du à un changement de fréquence des modes v_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} lorsque celle-ci est ajoutée. La conformation de la molécule d'hème est toutefois changée en présence de H₄B. Celle-ci adopte effectivement une conformation en forme de fer à cheval, comme en témoigne l'apparition d'une bande à 693 cm⁻¹ sur le spectre de résonance Raman du complexe Fe²⁺-CO. Cet effet est additif lorsque la L-arginine et le H₄B sont tous deux liés à la COD-iNOsoxy. Le pH semble quant à lui n'avoir aucun effet sur les complexes Fe²⁺-CO formés et analysés en spectroscopie de résonance Raman à pH 6.5, 7.5 et 9.5. Cela confirme donc que le pH n'a aucune influence sur les propriétés électroniques de ce complexe.

4.4 Implication pour la catalyse enzymatique

En condition où la catalyse par les NOS est possible, c'est-à-dire en présence de Larginine et de H₄B, nos résultats ont montré que le complexe hème-oxy 2 est formé. L'identification du mode v_{0-0} à 1132 cm⁻¹ permet de conclure que ce complexe est de type ferrique superoxyde comme chez la nNOS et la saNOS (145, 146). L'activation de ce complexe par l'ajout d'un électron (et de protons) et l'hydroxylation de la L-arginine en NOHA se font rapidement de sorte qu'aucun autre intermédiaire réactionnel ne s'accumule à un niveau suffisant pour permettre sa détection par spectroscopie optique au mélangeur à flux arrêté. Cette situation a aussi été observé chez la nNOS et la eNOS (145, 147, 153, 157). En conditions où la catalyse n'est pas possible, nos analyses de la COD-iNOSoxy en présence de H_4B seulement ont permis d'établir que c'est la seule condition où un complexe hème-oxy 1 est formé initialement (Bande de Soret à 415 nm) suivi de la formation d'un complexe avec une bande de Soret aux environs de 408 nm.

En présence de H₄B et en absence de L-arginine, il est possible d'activer l'O₂ par l'ajout d'un électron et d'un proton, mais pas d'hydroxyler un substrat parce qu'il est absent. Il est donc théoriquement possible d'activer l'oxygène en présence de H_4B et d'obtenir un intermédiaire réactionnel puisqu'il ne peut réagir rapidement avec le substrat étant donné l'absence de ce dernier. C'est l'hypothèse que nous émettons concernant le complexe avec la bande de Soret à 408 nm, soit qu'il s'agit d'un intermédiaire réactionnel. L'identification d'un mode sensible à l'oxygène a permis de confirmer qu'il s'agit d'un intermédiaire oxygéné. Son identification formelle n'est pas complétée mais de façon plausible, il s'agit soit d'un complexe hydroperoxy (Figure 8) ou un composé II, qui est la forme réduite sans radical de l'espèce 6 (Figure 8). La détection de ce complexe permet donc d'identifier un intermédiaire avec une bande de Soret à 408 nm autre que le complexe oxygéné pour la première fois chez une NOS. Il est intéressant de noter que chez saNOS, un complexe avec une bande de Soret aux environs de 405 nm a été observé en addition au complexe hème-oxy 2, qui a une bande de Soret aux environs de 430 nm en présence de H_4B (146). Le fait que saNOS forme un complexe similaire en condition de catalyse indique la possibilité que le complexe avec la bande de Soret à 408 nm soit réellement formé en cours de catalyse, mais qu'il ne s'accumule pas suffisamment pour être détecté chez la COD-iNOSoxy lorsque celle-ci est analysée en présence de L-arginine et de H₄B.

Conclusion

Nous avons montré que le pH n'influence pas la formation des complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 générés chez la COD-iNOSoxy, puisque le même complexe est formé aux différents pH dans lesquels l'enzyme a été étudiée lors des expériences en spectroscopie d'absorbance au mélangeur en flux arrêté. Les études en spectroscopie de résonance Raman effectuées sur les complexes Fe²⁺-CO ont aussi montré qu'aucune différence n'est induite par le changement de pH lors de la formation de ce complexe chez la COD-iNOSoxy. Les complexes hème-oxy 1 et hème-oxy 2 ont été formés et étudiés en spectroscopie de résonance Raman à l'aide d'un mélangeur en flux continu. Alors qu'un caractère ferrique superoxyde a été attribué au complexe hème-oxy 2 par l'identification du mode O-O à 1132 cm⁻¹, il n'a pas été possible d'identifier le mode d'élongation O-O du complexe hème-oxy 1. Nos résultats suggèrent que l'exposition au laser induit l'oxydation du complexe ce qui a empêché la détection du complexe oxygéné hème-oxy 1. Un mode sensible à l'18O2 a toutefois été identifié pour un complexe ayant une bande de Soret située à 408 nm et formé en présence de H₄B uniquement. Ce complexe pourrait être un complexe hydroperoxyde, mais une plus ample caractérisation devra, en perspective de ce projet, être effectuée afin de s'en assurer.

Bibliographie

1. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. Mol Aspects Med 2005;26:3-31.

2. Paul L. Feldman OWG, Dennis J. Stuehr. The surprising life of Nitric Oxide. C&EN 1993;Special feature:26-38.

3. Alderton WK, Cooper CE et Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 2001;357:593-615.

4. Low SY. Application of pharmaceuticals to nitric oxide. Mol Aspects Med 2005;26:97-138.

5. Marsh N et Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000;27:313-319.

6. Thomas DD, Miranda KM, Colton CA, Citrin D, Espey MG et Wink DA. Heme proteins and nitric oxide (NO): the neglected, eloquent chemistry in NO redox signaling and regulation. Antioxid Redox Signal 2003;5:307-317.

7. Hughes MN. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. Biochim Biophys Acta 1999;1411:263-272.

8. Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G et Nijkamp FP. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. Life Sci 1997;60:1833-1845.

9. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. Free Radic Biol Med 2006;41:691-701.

10. Burney S, Tamir S, Gal A et Tannenbaum SR. A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. Nitric Oxide 1997;1:130-144.

11. Xu M, Dong J et Zhu M. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in Pueraria thomsonii Benth. suspension cells through a salicylic acid (SA)-dependent and a jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway. Sci China C Life Sci 2006;49:379-389.

12. Maier J, Hecker R, Rockel P et Ninnemann H. Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in Phycomyces blakesleeanus. Plant Physiol 2001;126:1323-1330.

13. Foley E et O'Farrell PH. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in Drosophila. Genes Dev 2003;17:115-125.

14. Klessig DF, Durner J, Noad R, et al. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:8849-8855.

15. Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF et Durner J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. Trends Plant Sci 2001;6:177-183.

16. del Rio LA, Corpas FJ et Barroso JB. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochemistry 2004;65:783-792.

17. Davidson EA et Swank WT. Environmental Parameters Regulating Gaseous Nitrogen Losses from Two Forested Ecosystems via Nitrification and Denitrification. Appl Environ Microbiol 1986;52:1287-1292.

18. Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H2, CO, CH4, OCS, N2O, and NO). Microbiol Rev 1996;60:609-640.

19. Avrahami S, Conrad R et Braker G. Effect of soil ammonium concentration on N2O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. Appl Environ Microbiol 2002;68:5685-5692.

20. Davidson EA, Swank WT et Perry TO. Distinguishing between Nitrification and Denitrification as Sources of Gaseous Nitrogen Production in Soil. Appl Environ Microbiol 1986;52:1280-1286.

21. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Mol Aspects Med 2005;26:33-65.

22. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. Biosci Rep 1999;19:235-251.

23. Duncan AJ et Heales SJ. Nitric oxide and neurological disorders. Mol Aspects Med 2005;26:67-96.

24. Mount PF et Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. Acta Physiol (Oxf) 2006;187:433-446.

25. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, et al. Nitrate biosynthesis in man. Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78:7764-7768.

26. Hibbs JB, Jr. Infection and nitric oxide. J Infect Dis 2002;185 Suppl 1:S9-17.

27. Li H et Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. J Inorg Biochem 2005;99:293-305.

28. Adak S, Aulak KS et Stuehr DJ. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from Bacillus subtilis. J Biol Chem 2002;277:16167-16171.

29. Adak S, Bilwes AM, Panda K, et al. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from Deinococcus radiodurans. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:107-112.

30. Gautier C, Mikula I, Nioche P, Martasek P, Raman CS et Slama-Schwok A. Dynamics of NO rebinding to the heme domain of NO synthase-like proteins from bacterial pathogens. Nitric Oxide 2006.

31. Furchgott RF et Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-376.

32. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S et Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:3203-3207.

33. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE et Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:9265-9269.

34. Stuehr DJ et Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82:7738-7742.

35. Granger DL, Hibbs JB, Jr., Perfect JR et Durack DT. Specific amino acid (Larginine) requirement for the microbiostatic activity of murine macrophages. J Clin Invest 1988;81:1129-1136.

36. Drapier JC et Hibbs JB, Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. J Immunol 1988;140:2829-2838.

37. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM et Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. Circ Res 1987;61:866-879.

38. Furchgott RF. Nitric oxide: from basic research on isolated blood vessels to clinical relevance in diabetes. An R Acad Nac Med (Madr) 1998;115:317-331.

39. Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005;289:R913-935.

40. Ortiz PA et Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. Am J Physiol Renal Physiol 2002;282:F777-784.

41. Garvin JL et Ortiz PA. The role of reactive oxygen species in the regulation of tubular function. Acta Physiol Scand 2003;179:225-232.

42. Majid DS et Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. Am J Hypertens 2001;14:74S-82S.

43. Li J et Billiar TR. The role of nitric oxide in apoptosis. Semin Perinatol 2000;24:46-50.

44. Lepoivre M, Flaman JM, Bobe P, Lemaire G et Henry Y. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. J Biol Chem 1994;269:21891-21897.

45. Roy B, Guittet O, Beuneu C, Lemaire G et Lepoivre M. Depletion of deoxyribonucleoside triphosphate pools in tumor cells by nitric oxide. Free Radic Biol Med 2004;36:507-516.

46. Tamir S, Burney S et Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. Chem Res Toxicol 1996;9:821-827.

47. Tamir S, deRojas-Walker T, Wishnok JS et Tannenbaum SR. DNA damage and genotoxicity by nitric oxide. Methods Enzymol 1996;269:230-243.

48. Moncada S et Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem 2006;97:1676-1689.

49. Chen HS et Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. J Neurochem 2006;97:1611-1626.

50. Garthwaite J, Charles SL et Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature 1988;336:385-388.

51. Guimaraes FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC et de Lucca AC. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. Neurosci Biobehav Rev 2005;29:1313-1322.

52. Barber SC, Mead RJ et Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. Biochim Biophys Acta 2006.

53. Pluta RM et Oldfield EH. Sodium nitrite as a therapeutic agent for central nervous system diseases. Surg Neurol 2006;66:5-7; discussion 8-10.

54. Janero DR. Nutritional aspects of nitric oxide: human health implications and therapeutic opportunities. Nutrition 2001;17:896-903.

55. George I, Xydas S, Topkara VK, et al. Clinical indication for use and outcomes after inhaled nitric oxide therapy. Ann Thorac Surg 2006;82:2161-2169.

56. Zhang W, Kuncewicz T, Yu ZY, Zou L, Xu X et Kone BC. Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. Acta Physiol Scand 2003;179:137-142.

57. Kone BC. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. Acta Physiol Scand 2000;168:27-31.

58. Jaffrey SR et Snyder SH. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. Science 1996;274:774-777.

59. Chen AF, Ren J et Miao CY. Nitric oxide synthase gene therapy for cardiovascular disease. Jpn J Pharmacol 2002;89:327-336.

60. Turunen MP, Hiltunen MO et Yla-Herttuala S. Gene therapy for angiogenesis, restenosis and related diseases. Exp Gerontol 1999;34:567-574.

61. Wittenberg JB, Bolognesi M, Wittenberg BA et Guertin M. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. J Biol Chem 2002;277:871-874.

62. Kundu S, Trent JT, 3rd et Hargrove MS. Plants, humans and hemoglobins. Trends Plant Sci 2003;8:387-393.

63. Roesner A, Fuchs C, Hankeln T et Burmester T. A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. Mol Biol Evol 2005;22:12-20.

64. Poulos TL. Structural biology of heme monooxygenases. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:337-345.

65. Henri Wajcman LK. L'hémoglobine, des microorganismes à l'homme: un motif structural unique, des fonctions multiples. CR biologies 2002;Sect. 1159-1174.

66. Herold S et Fago A. Reactions of peroxynitrite with globin proteins and their possible physiological role. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2005;142:124-129.

67. Frey AD et Kallio PT. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. FEMS Microbiol Rev 2003;27:525-545.

68. Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, et al. Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:11385-11389.

69. Guanghui Wu LMWaRKP. Microbial Globins. In: Advances in microbial physiology, 2003: 255-309.

70. Farres J, Rechsteiner MP, Herold S, Frey AD et Kallio PT. Ligand binding properties of bacterial hemoglobins and flavohemoglobins. Biochemistry 2005;44:4125-4134.

71. Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, et al. Truncated hemoglobin HbN protects Mycobacterium bovis from nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:5902-5907.

72. Poole RK et Hughes MN. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. Mol Microbiol 2000;36:775-783.

73. Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K, et al. Reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. Biochim Biophys Acta 2006;1757:395-400.

74. La Penna G, Furlan S et Banci L. Molecular statistics of cytochrome c: structural plasticity and molecular environment. J Biol Inorg Chem 2006.

75. Boon EM et Marletta MA. Ligand discrimination in soluble guanylate cyclase and the H-NOX family of heme sensor proteins. Curr Opin Chem Biol 2005;9:441-446.

76. Bicker G. STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. Bioessays 2005;27:495-505.

77. Freitas TA, Hou S et Alam M. The diversity of globin-coupled sensors. FEBS Lett 2003;552:99-104.

78. Gilles-Gonzalez MA et Gonzalez G. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. J Inorg Biochem 2005;99:1-22.

79. Papa S, Capitanio N, Villani G, et al. Cooperative coupling and role of heme a in the proton pump of heme-copper oxidases. Biochimie 1998;80:821-836.

80. Ordway GA et Garry DJ. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. J Exp Biol 2004;207:3441-3446.

81. Couture M, Burmester T, Hankeln T et Rousseau DL. The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket. J Biol Chem 2001;276:36377-36382.

82. Weber RE et Fago A. Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. Respir Physiol Neurobiol 2004;144:141-159.

83. Crane BR, Siegel LM et Getzoff ED. Probing the catalytic mechanism of sulfite reductase by X-ray crystallography: structures of the Escherichia coli hemoprotein in complex with substrates, inhibitors, intermediates, and products. Biochemistry 1997;36:12120-12137.

84. Egeberg KD, Springer BA, Martinis SA, Sligar SG, Morikis D et Champion PM. Alteration of sperm whale myoglobin heme axial ligation by site-directed mutagenesis. Biochemistry 1990;29:9783-9791.

85. Lanznaster M, Neves A, Bortoluzzi AJ, et al. Electronic effects of electron-donating and -withdrawing groups in model complexes for iron-tyrosine-containing metalloenzymes. Inorg Chem 2006;45:1005-1011.

86. Kurts S. [Competitiveness, mutuality, indifference?]. Soins Psychiatr 1990:9-13.

87. Que L, Jr., Heistand RH, 2nd, Mayer R et Roe AL. Resonance Raman studies of pyrocatechase-inhibitor complexes. Biochemistry 1980;19:2588-2593.

88. Que L, Jr., Lipscomb JD, Zimmermann R, Munck E, Orme-Johnson NR et Orme-Johnson WH. Mossbauer and EPR spectroscopy of protocatechuate 3,4-dioxygenase from Pseudomonas aeruginosa. Biochim Biophys Acta 1976;452:320-334.

89. Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ, et al. Structure of human lactoferrin at 3.2-A resolution. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:1769-1773.

90. Bailey S, Evans RW, Garratt RC, et al. Molecular structure of serum transferrin at 3.3-A resolution. Biochemistry 1988;27:5804-5812.

91. Rousseau DL, Li D, Couture M et Yeh SR. Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase. J Inorg Biochem 2005;99:306-323.

92. Sono M, Stuehr DJ, Ikeda-Saito M et Dawson JH. Identification of nitric oxide synthase as a thiolate-ligated heme protein using magnetic circular dichroism spectroscopy. Comparison with cytochrome P-450-CAM and chloroperoxidase. J Biol Chem 1995;270:19943-19948.

Omura T. Heme-thiolate proteins. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:404-409.

94. Goligorsky MS, Li H, Brodsky S et Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. Am J Physiol Renal Physiol 2002;283:F1-10.

95. Knowles RG et Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 1994;298 (Pt 2):249-258.

96. Bird LE, Ren J, Zhang J, et al. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from Staphylococcus aureus. Structure 2002;10:1687-1696.

97. Pant K, Bilwes AM, Adak S, Stuehr DJ et Crane BR. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from Bacillus subtilis. Biochemistry 2002;41:11071-11079.

98. Chartier FJ et Couture M. Stability of the heme environment of the nitric oxide synthase from Staphylococcus aureus in the absence of pterin cofactor. Biophys J 2004;87:1939-1950.

99. Wilson DJ et Rafferty SP. A structural role for tryptophan 188 of inducible nitric oxide synthase. Biochem Biophys Res Commun 2001;287:126-129.

100. Ajioka RS, Phillips JD et Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. Biochim Biophys Acta 2006;1763:723-736.

101. Arruda MA, Graca-Souza AV et Barja-Fidalgo C. Heme and innate immunity: new insights for an old molecule. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100:799-803.

102. Tsiftsoglou AS, Tsamadou AI et Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. Pharmacol Ther 2006;111:327-345.

103. Spiro TG et Jarzecki AA. Heme-based sensors: theoretical modeling of hemeligand-protein interactions. Curr Opin Chem Biol 2001;5:715-723.

104. Gorren AC et Mayer B. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthesis: a novel biological role for pteridines. Curr Drug Metab 2002;3:133-157.

105. Wei CC, Wang ZQ, Wang Q, et al. Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase. J Biol Chem 2001;276:315-319.

106. Shintaku H. Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment. Curr Drug Metab 2002;3:123-131.

107. Werner-Felmayer G, Golderer G et Werner ER. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. Curr Drug Metab 2002;3:159-173.

108. Erlandsen H et Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. Mol Genet Metab 1999;68:103-125.

109. Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC et Adak S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. J Biol Chem 2004;279:36167-36170.

110. Wei CC, Crane BR et Stuehr DJ. Tetrahydrobiopterin radical enzymology. Chem Rev 2003;103:2365-2383.

111. Roman LJ et Masters BS. Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. J Biol Chem 2006;281:23111-23118.

112. Daff S, Noble MA, Craig DH, et al. Control of electron transfer in neuronal NO synthase. Biochem Soc Trans 2001;29:147-152.

113. Knight K et Scrutton NS. Stopped-flow kinetic studies of electron transfer in the reductase domain of neuronal nitric oxide synthase: re-evaluation of the kinetic mechanism reveals new enzyme intermediates and variation with cytochrome P450 reductase. Biochem J 2002;367:19-30.

114. Sorescu D, Somers MJ, Lassegue B, Grant S, Harrison DG et Griendling KK. Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. Free Radic Biol Med 2001;30:603-612.

115. Knudsen GM, Nishida CR, Mooney SD et Ortiz de Montellano PR. Nitric-oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin-dependent activity. J Biol Chem 2003;278:31814-31824.

116. Auger MPeM. Spectroscopie moléculaire 2 CHM-21423. 2002.

117. Carey PR. Biochemical applications of Raman and Resonance raman spectroscopy. Pasadena, California, USA: Academic Press, 1982.

118. Spiro TG. Biological applications of resonance Raman spectroscopy. New-York: Wiley and sons, 1987.

119. Prasad. Introduction to biophotonics. New-York, NY, USA: Wiley and sons, 2003.

120. Callahan PM et Babcock GT. Insights into heme structure from Soret excitation Raman spectroscopy. Biochemistry 1981;20:952-958.

121. Bhosale P, Ermakov IV, Ermakova MR, Gellermann W et Bernstein PS. Resonance Raman quantification of nutritionally important carotenoids in fruits, vegetables, and their juices in comparison to high-pressure liquid chromatography analysis. J Agric Food Chem 2004;52:3281-3285.

122. Bernstein PS et Gellermann W. Measurement of carotenoids in the living primate eye using resonance Raman spectroscopy. Methods Mol Biol 2002;196:321-329.

123. Bernstein PS, Zhao DY, Sharifzadeh M, Ermakov IV et Gellermann W. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in the living human eye. Arch Biochem Biophys 2004;430:163-169.

124. Wen ZQ, Overman SA, Bondre P et Thomas GJ, Jr. Structure and organization of bacteriophage Pf3 probed by Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy. Biochemistry 2001;40:449-458.

125. McEachern MJ, Krauskopf A et Blackburn EH. Telomeres and their control. Annu Rev Genet 2000;34:331-358.

126. Krafft C, Benevides JM et Thomas GJ, Jr. Secondary structure polymorphism in Oxytricha nova telomeric DNA. Nucleic Acids Res 2002;30:3981-3991.

127. Chi Z et Asher SA. UV resonance Raman determination of protein acid denaturation: selective unfolding of helical segments of horse myoglobin. Biochemistry 1998;37:2865-2872.

128. Poulos TL, Finzel BC et Howard AJ. Crystal structure of substrate-free Pseudomonas putida cytochrome P-450. Biochemistry 1986;25:5314-5322.

129. Schelvis JP, Berka V, Babcock GT et Tsai AL. Resonance Raman detection of the Fe-S bond in endothelial nitric oxide synthase. Biochemistry 2002;41:5695-5701.

130. Li D, Stuehr DJ, Yeh SR et Rousseau DL. Heme distortion modulated by ligandprotein interactions in inducible nitric-oxide synthase. J Biol Chem 2004;279:26489-26499.

131. Abu-Soud HM, Wang J, Rousseau DL, Fukuto JM, Ignarro LJ et Stuehr DJ. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. J Biol Chem 1995;270:22997-23006.

132. Chen Y, Panda K et Stuehr DJ. Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme-NO-dependent mechanism. Biochemistry 2002;41:4618-4625.

133. Li D, Hayden EY, Panda K, et al. Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. J Biol Chem 2006;281:8197-8204.

134. Wang J, Rousseau DL, Abu-Soud HM et Stuehr DJ. Heme coordination of NO in NO synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:10512-10516.

135. Stevenson TH, Gutierrez AF, Alderton WK, Lian L et Scrutton NS. Kinetics of CO binding to the haem domain of murine inducible nitric oxide synthase: differential effects of haem domain ligands. Biochem J 2001;358:201-208.

136. Tetreau C, Tourbez M, Gorren A, Mayer B et Lavalette D. Dynamics of carbon monoxide binding with neuronal nitric oxide synthase. Biochemistry 1999;38:7210-7218.

137. Li H, Igarashi J, Jamal J, Yang W et Poulos TL. Structural studies of constitutive nitric oxide synthases with diatomic ligands bound. J Biol Inorg Chem 2006;11:753-768.

138. Nakajima R, Yamazaki I et Griffin BW. Spectra of chloroperoxidase compounds II and III. Biochem Biophys Res Commun 1985;128:1-6.

139. Spiro TG et Wasbotten IH. CO as a vibrational probe of heme protein active sites. J Inorg Biochem 2005;99:34-44.

140. Santolini J, Roman M, Stuehr DJ et Mattioli TA. Resonance Raman study of Bacillus subtilis NO synthase-like protein: similarities and differences with mammalian NO synthases. Biochemistry 2006;45:1480-1489.

141. Marchal S, Gorren AC, Andersson KK et Lange R. Hunting oxygen complexes of nitric oxide synthase at low temperature and high pressure. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:529-535.

142. Yeh SR, Couture M, Ouellet Y, Guertin M et Rousseau DL. A cooperative oxygen binding hemoglobin from Mycobacterium tuberculosis. Stabilization of heme ligands by a distal tyrosine residue. J Biol Chem 2000;275:1679-1684.

143. Couture M, Yeh SR, Wittenberg BA, et al. A cooperative oxygen-binding hemoglobin from Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:11223-11228.

144. Boggs S, Huang L et Stuehr DJ. Formation and reactions of the heme-dioxygen intermediate in the first and second steps of nitric oxide synthesis as studied by stopped-flow spectroscopy under single-turnover conditions. Biochemistry 2000;39:2332-2339.

145. Couture M, Stuehr DJ et Rousseau DL. The ferrous dioxygen complex of the oxygenase domain of neuronal nitric-oxide synthase. J Biol Chem 2000;275:3201-3205.

146. Chartier FJ, Blais SP et Couture M. A weak Fe-O bond in the oxygenated complex of the nitric oxide synthase of staphylococcus aureus. J Biol Chem 2006.

147. Ledbetter AP, McMillan K, Roman LJ, Masters BS, Dawson JH et Sono M. Lowtemperature stabilization and spectroscopic characterization of the dioxygen complex of the ferrous neuronal nitric oxide synthase oxygenase domain. Biochemistry 1999;38:8014-8021.

148. Sato H, Sagami I, Daff S et Shimizu T. Autoxidation rates of neuronal nitric oxide synthase: effects of the substrates, inhibitors, and modulators. Biochem Biophys Res Commun 1998;253:845-849.

149. Bec N, Gorren AC, Voelker C, Mayer B et Lange R. Reaction of neuronal nitricoxide synthase with oxygen at low temperature. Evidence for reductive activation of the oxy-ferrous complex by tetrahydrobiopterin. J Biol Chem 1998;273:13502-13508.

150. Abu-Soud HM, Gachhui R, Raushel FM et Stuehr DJ. The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. J Biol Chem 1997;272:17349-17353.

151. Marchal S, Girvan HM, Gorren AC, et al. Formation of transient oxygen complexes of cytochrome p450 BM3 and nitric oxide synthase under high pressure. Biophys J 2003;85:3303-3309.

152. Marchal S, Lange R, Sorlie M, Andersson KK, Gorren AC et Mayer B. CO exchange of the oxyferrous complexes of endothelial nitric-oxide synthase oxygenase

domain in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin. J Inorg Biochem 2004;98:1217-1222.

153. Marchal S, Gorren AC, Sorlie M, Andersson KK, Mayer B et Lange R. Evidence of two distinct oxygen complexes of reduced endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem 2004;279:19824-19831.

154. Sorlie M, Gorren AC, Marchal S, et al. Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin: proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor. J Biol Chem 2003;278:48602-48610.

155. Ost TW et Daff S. Thermodynamic and kinetic analysis of the nitrosyl, carbonyl, and dioxy heme complexes of neuronal nitric-oxide synthase. The roles of substrate and tetrahydrobiopterin in oxygen activation. J Biol Chem 2005;280:965-973.

156. Gorren AC, Sorlie M, Andersson KK, Marchal S, Lange R et Mayer B. tetrahydrobiopterin as combined electron/proton donor in nitric oxide biosynthesis: cryogenic UV-Vis and EPR detection of reaction intermediates. Methods Enzymol 2005;396:456-466.

157. Bec N, Gorren AFC, Mayer B, Schmidt PP, Andersson KK et Lange R. The role of tetrahydrobiopterin in the activation of oxygen by nitric-oxide synthase. J Inorg Biochem 2000;81:207-211.

158. Sudhamsu J et Crane BR. Structure and reactivity of a thermostable prokaryotic nitric-oxide synthase that forms a long-lived oxy-heme complex. J Biol Chem 2006;281:9623-9632.

159. Couture M, Das TK, Savard PY, et al. Structural investigations of the hemoglobin of the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 reveal a unique distal heme pocket. Eur J Biochem 2000;267:4770-4780.

160. Lin IJ, Gebel EB, Machonkin TE, Westler WM et Markley JL. Changes in hydrogen-bond strengths explain reduction potentials in 10 rubredoxin variants. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:14581-14586.

161. Fernandez ML, Marti MA, Crespo A et Estrin DA. Proximal effects in the modulation of nitric oxide synthase reactivity: a QM-MM study. J Biol Inorg Chem 2005;10:595-604.

162. Gregoret LM, Rader SD, Fletterick RJ et Cohen FE. Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. Proteins 1991;9:99-107.

163. Perera R, Sono M, Sigman JA, Pfister TD, Lu Y et Dawson JH. Neutral thiol as a proximal ligand to ferrous heme iron: implications for heme proteins that lose cysteine thiolate ligation on reduction. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3641-3646.

Couture M. Notes pour le cours Enzymologie BCM-21140. Quebec, Automne 2003.
 McDonald JK, Taylor CM et Rafferty S. Design, preparation, and characterization of mixed dimers of inducible nitric oxide synthase oxygenase domains. Protein Expr Purif 2003;27:115-127.

166. Wang, J., Stuehr, D. J., Rousseau, D. L., Tetrahydrobiopterin-deficient nitric oxide synthase has a modified heme environment and forms a cytochrome P-420 analogue, Biochemistry, 34, 7080-87.

167. Appleby CA. Purification of Rhizobium cytochromes P-450. Methods Enzymol 1978;52:157-166.

168. Scheele JS, Bruner E, Kharitonov VG, et al. Kinetics of NO ligation with nitricoxide synthase by flash photolysis and stopped-flow spectrophotometry. J Biol Chem 1999;274:13105-13110.

169. Shastry MC, Luck SD et Roder H. A continuous-flow capillary mixing method to monitor reactions on the microsecond time scale. Biophys J 1998;74:2714-2721.

170. Sligar SG, Makris TM et Denisov IG. Thirty years of microbial P450 monooxygenase research: peroxo-heme intermediates--the central bus station in heme oxygenase catalysis. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:346-354.

171. Roelfes G, Vrajmasu V, Chen K, et al. End-on and side-on peroxo derivatives of non-heme iron complexes with pentadentate ligands: models for putative intermediates in biological iron/dioxygen chemistry. Inorg Chem 2003;42:2639-2653.

172. Ibrahim M, Denisov IG, Makris TM, Kincaid JR et Sligar SG. Resonance Raman spectroscopic studies of hydroperoxo-myoglobin at cryogenic temperatures. J Am Chem Soc 2003;125:13714-13718.

173. Songzhou Hu AS, James R. Kincaid. Resonance Raman studies of oxycytochrome P450cam

J. Am. Chem. Soc 1991;113:4815-4822.

174. Stone KL, Behan RK et Green MT. Resonance Raman spectroscopy of chloroperoxidase compound II provides direct evidence for the existence of an iron(IV)-hydroxide. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:12307-12310.

175. Terner J, Palaniappan V, Gold A, et al. Resonance Raman spectroscopy of oxoiron(IV) porphyrin pi-cation radical and oxoiron(IV) hemes in peroxidase intermediates. J Inorg Biochem 2006;100:480-501.

176. Lefevre-Groboillot D, Boucher JL, Mansuy D et Stuehr DJ. Reactivity of the hemedioxygen complex of the inducible nitric oxide synthase in the presence of alternative substrates. Febs J 2006;273:180-191.

Annexe 1 Composition de solutions et milieux

1. Milieu Luria Burtani (LB)

Pour 100 ml de milieu : - 1 gramme de bacto-tryptone (BD, Le Pont de Claix, France)

- 1 gramme de NaCl (EMD, Gibbstown, NJ, USA)
- 0,5 gramme d'extrait de levure (BD, Le Pont de Claix, France)

Si milieu solide : ajouter Agar (15 gramme/ litre de milieu) (BD, Le Pont de Claix, France)

Dissoudre dans 100 ml d'eau bidistillée et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

2. Terrific Broth (TB)

Dans 900 ml d'eau bidistillée, mettre:	 12 grammes de Bacto-tryptone 24 grammes d'extrait de levure 4 ml de glycérol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)
Dans 100 ml d'eau bidistillée, mettre :	 12,51 grammes de phosphate de potassium dibasique (EMD, Gibbstown, NJ, USA) 2,31 grammes de phosphate de potassium monobasique (EMD, Gibbstown, NJ, USA)

Sceller et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Mélanger ces deux solutions lors de l'ensemencement

3. Gels de polyacrylamide en conditions dénaturante (SDS-Page)

<u>Gel de séparation (10%)</u> <u>Gel d'empilement (5%)</u>

Eau bidistillée	4.0 ml	3.00 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml	-
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	-	1.25 ml
Polyacrylamide	3.3 ml	0.63 ml
Sodium dodécyl sulfate (SDS)	100 µl	50 µl
Persulfate d'ammonium	50µl	25µl

Pour 50 ml de tampon : - 15 ml de SDS 10 % (GIBCO, Green Island, NJ, USA)

- 6.25 ml de Tris-HCl 0.5M pH 6.8
- 5 ml de glycérol
- 13.75 ml d'eau bidistillée
- Traces de bleu de bromophénol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)

Le β -mercaptoéthanol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) est ajouté juste avant la préparation des échantillons dans une proportion 70:30.

5. Tampon Tris-glycine-SDS pour gel SDS-Page

Pour 1L de tampon :

- Dissoudre 15.1 grammes de base Tris (ICN, Aurora, Ontario, Canada) et 94 grammes de glycine (Boehringer Mannheim Corp, Indianapolis, IN, USA) dans 900 ml d'eau bidistillée.
- 2. Ajouter 50 ml de SDS 10% et compléter à 1000 ml avec de l'eau bidistillée.

6. Solution Pyridine-NaOH

Pour 1 ml de solution : - 340µl de pyridine (Anachemia, Rouses Point, NY, USA)

- 620 µl d'eau bidistillée
- 40 µl de NAOH (EMD, Gibbstown, NJ, USA)

Mélanger et utiliser!

Annexe 2 Modèle cinétique pour deux étapes de liaison de l'oxygène appliqué à l'étude de hème-oxy 1



Figure 41 Analyse avec un modèle cinétique implicant deux étapes concomittantes de liaison de l'O₂ concomittant des données au mélangeur en flux arrêté pour la COD-iNOSoxy (-L-arg/+H4B) à pH 7.5

A. Données brutes provenant du balayage cinétique B. Graphique de la concentration (μ M) en fonction du temps C. Spectre d'absorbance dans la région de la bande de Soret (entre 380 et 450 nm) D. Résiduelles obtenues lors de l'analyse E. Cinétiques à une longueur à 410 et 430 nm.