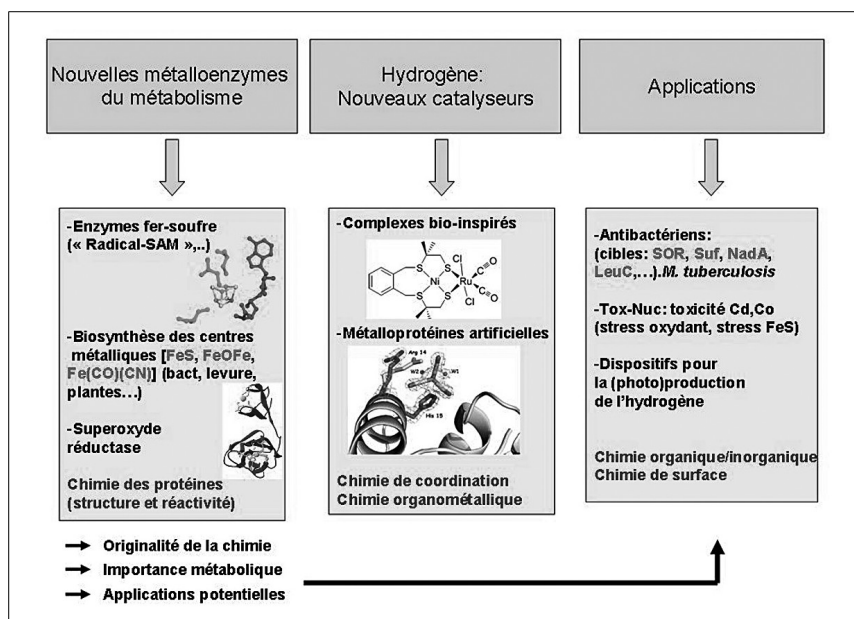


RECHERCHE

L'équipe, intitulée biocatalyse, animée par Marc FONTECAVE, fait partie du laboratoire de chimie et biologie des métaux (UMR université Joseph Fourier-CEA-CNRS n° 5249, directeur Marc Fontecave) est localisée sur le centre du CEA à Grenoble. Elle est constituée actuellement de 9 chercheurs et enseignants-chercheurs permanents (chercheurs CEA : V. ARTERO, M. ATTA, L. LEPAPE ; 2 enseignants-chercheurs : M. FONTECAVE, C. GEREZ ; chercheurs CNRS : V. NIVIÈRE, E. MULLIEZ, S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, F. PIERREL).

Etudiants en thèse : S. CANAGUIER, F. BONNOT, E. TREMEY, S. ARRAGAIN

Post-Docs : S. WOLLERS, P. TRAN DINH, P.-A. JACQUES, C. TRON, V. AMBIKE



Les projets de l'équipe « biocatalyse » concernent l'étude de métalloenzymes à la fois du point de vue de leur structure et de leurs propriétés chimiques (mécanismes réactionnels). Les systèmes sont choisis soit parce qu'ils mettent en œuvre une chimie tout à fait originale (en particulier l'équipe s'intéresse aux enzymes qui font intervenir en les contrôlant des espèces radicalaires très actives), soit parce qu'ils remplissent des fonctions biologiques de toute première importance (synthèse et réparation de l'ADN, modification des ARNs de transfert, biosynthèse des centres fer-soufre, etc.), soit, enfin, parce qu'ils peuvent conduire à des applications intéressantes sur le plan de la santé (nouveaux antibiotiques, nouveaux antioxydants), de la catalyse (production d'hydrogène) ou de l'environnement (toxicologie nucléaire). Certains de ces systèmes biologiques constituent de fait des sources uniques d'inspiration pour les chimistes de synthèse. Cette approche,

biomimétique ou bio-inspirée, est en particulier très développée dans le cas des hydrogénases, des enzymes possédant des propriétés catalytiques uniques pour la réduction des protons en hydrogène ou pour l'oxydation de l'hydrogène en eau.

Les différents projets de l'équipe et les résultats marquants des dernières années sont résumés dans les pages qui suivent.

1. Métalloenzymes radicalaires (M. ATTA, M. FONTECAVE, E. MULLIEZ)

L'activation de liaisons C-H est un thème central thème en chimie biologique. En général, cela requiert la présence d'un ion métallique dont le rôle est de créer une espèce radicalaire à haute énergie capable d'arracher un atome d'hydrogène sur le substrat. Dans le cas de certaines monoxygénases, cette espèce radicalaire provient d'une activation réductrice de l'oxygène par un centre à fer binucléaire (*figure 1A*). Avec les enzymes de la famille « Radical-SAM », elle provient de la réduction monoélectronique de la S-Adénosylméthionine (SAM) catalysée par un cluster fer-soufre (*figure 1B*).

Ces deux mécanismes sont étudiés de façon active au laboratoire à travers l'étude de la monoxygénase à fer, MiaE, qui catalyse la transformation d'un ARN de transfert (*figure 1A*) et de deux enzymes « Radical-SAM » : la Spore Photoproduct Lyase (SPL), une enzyme de réparation de l'ADN, et MiaB, une tRNA-thiométhyltransférase (*figure 1B*).

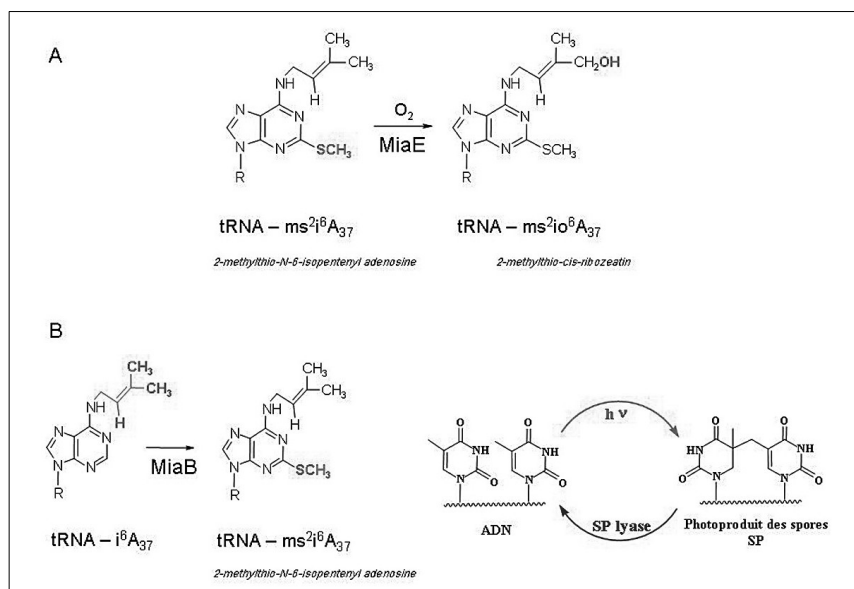


Figure 1: Activation et fonctionnalisation de liaisons C-H: (A) oxydation catalysée par la monoxygénase MiaE ; (B) MiaB et SP Lyase, deux enzymes fer-soufre de la famille « Radical-SAM »

1.1. Réactions dépendantes de l'oxygène (*MiaE*)¹

MiaE catalyse l'hydroxylation allylique post-transcriptionnelle de la 2-méthylthio-N-6-isopentényl adénosine dans les tRNAs. Récemment, nous avons purifié l'enzyme de *Salmonella typhimurium*. En utilisant un ensemble de méthodes spectroscopiques, nous avons montré que MiaE contenait un cluster dinucléaire de fer non hémérique, semblable à celui trouvé dans la méthane monoxygénase, le prototype de cette classe de monoxygénases. Il s'agit du premier exemple d'une enzyme de cette famille impliquée dans l'hydroxylation d'une macromolécule biologique et le second exemple d'une métalloenzyme rédox participant à une modification d'ARN de transfert.

1.2. Réactions dépendantes de SAM (*SPL* and *MiaB*)

1.2.1. *SPL* une enzyme de réparation de l'ADN : une coupure de liaison C-C^{2, 3, 4, 5}

Le photo-produit majoritaire de l'ADN de spores de *Bacillus subtilis* irradiés par des UVs est le dimère de thymine appelé spore photo-produit (SP, 5-(α -thyminyl)-5,6-dihydrothymine, *figure 1B*). Cette lésion de l'ADN est spécifiquement réparée par la SPL qui convertit SP en deux thymines intactes (*figure 1B*). Nous avons démontré que la SPL appartient à la famille « Radical-SAM » et accepte comme substrat non seulement de l'ADN de spores irradiés mais aussi le dinucléoside monophosphate SPTpT (*figure 1B*), suggérant que le site actif de l'enzyme est capable de fixer sélectivement le dimère de thymine pour le réparer à l'extérieur de la double hélice². Nous avons également déterminé la structure de SPTpT, en particulier la configuration absolue du carbone 5 dans le SP naturel par une combinaison de spectroscopie RMN et de calculs DFT⁴. Nous avons démontré que le SPTpT est le dinucléotide 5' \rightarrow 3' avec une configuration R sur le carbone C_{5a}. Enfin, en mutant la cystéine-141, un résidu totalement conservé dans *Bacillus* et essentiel pour la réparation de l'ADN des spores *in vivo*, nous avons pu montrer que cette cystéine joue un rôle important dans le contrôle de la réaction³. En particulier, ce mutant nous a permis de piéger l'un des intermédiaires réactionnels et de proposer un mécanisme pour la réaction de réparation de SP par l'enzyme SPL³.

1. MATHEVON C., PIERREL F., ODDOU J.-L., GARCIA-SERRES R., BLONDIN G., LATOUR J.-M., MENAGE S., GAMBARELLI S., FONTECAVE M., ATTA M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 13295-13300.

2. CHANDOR A., BERTEAU O., DOUKI T., GASPARUTTO D., SANAKIS Y., OLLAGNIER DE CHOUDENS S., ATTA M. et FONTECAVE M., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 26922-26931.

3. CHANDOR-PROUST A., BERTEAU O., DOUKI T., GASPARUTTO D., OLLAGNIER DE CHOUDENS O., FONTECAVE M. et ATTA M., *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 36361-36368.

4. MANTEL C., CHANDOR-PROUST A., GASPARUTTO D., DOUKI T., ATTA M., FONTECAVE M., BAYLE P., MOUESCA J.-M., BARDET M., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 16978-16984.

5. CHANDOR A., DOUKI T., GASPARUTTO D., GAMBARELLI S., SANAKIS Y., NICOLET Y., OLLAGNIER DE CHOUDENS S., ATTA M. et FONTECAVE M., *CRAS*, 2007, 10, 756-765.

1.2.2. *MiaB est une tRNA-thiométhyltransférase : formation de liaison C-S*⁶

Les organismes vivants contiennent des molécules soufrées qui jouent des rôles biologiques importants. Il peut s'agir de complexes inorganiques comme les clusters fer-soufre ou des composés organiques comme la biotine ou l'acide lipoiique, dont la biosynthèse dépend d'enzymes de la famille « Radical-SAM ». Dans ce cas, il est proposé que le radical substrat intermédiaire réagit avec une espèce soufrée, encore inconnue et sujette à controverse, pour former la liaison C-S du produit final. La tRNA-thiométhyltransférase (MiaB) (qui intervient dans le processus complexe de modification d'un ARN de transfert) a été choisie comme modèle pour l'étude de cette réaction fascinante pour le chimiste (*figure 1B*).

Grâce à l'utilisation poussée de spectroscopies et de méthodes analytiques variées, nous avons montré que, comme d'autres enzymes de cette famille (BioB, la biotine synthase, et LipA, la lipoate synthase), MiaB contient deux clusters fer-soufre. Un cluster pourrait servir de source d'atomes de soufre actif (une fonction nouvelle pour cette classe de centre métallique), alors que le second servirait à la réduction de la S-adénosylméthionine (SAM).

2. Biosynthèse de sites métalliques

(S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, C. GEREZ, M. FONTECAVE)

2.1. *Biosynthèse de clusters Fe-S*⁷⁻¹⁵

Les clusters fer-soufre (Fe-S) sont des combinaisons d'atomes de fer et de soufre polynucléaires qui sont utilisés par une très grande variété d'enzymes pour des fonctions diverses. Ils servent de centres catalytiques dans des enzymes de transfert d'électrons impliquées dans des processus biologiques aussi importants que la photosynthèse et la respiration. Il a été montré, *in vivo*, que la biosynthèse des centres Fe-S met en œuvre des machineries biosynthétiques complexes. Chez *E. coli*, deux familles différentes de tels systèmes ont été identifiées : les systèmes ISC et SUF. Le premier est utilisé dans des conditions normales de croissance tandis que le second opère dans des conditions dangereuses pour les centres Fe-S comme un stress oxydant ou une carence en fer. Les deux machineries possèdent une cystéine désulfurase qui permet une utilisation de la cystéine comme source d'atomes de soufre ainsi qu'une protéine d'assemblage qui fournit un site pour la construction d'un cluster qui sera ultérieurement transféré à des apoprotéines. Les systèmes ISC et SUF contiennent aussi des protéines pour l'hydrolyse de l'ATP. Nous avons été récemment invités à écrire deux articles de revue sur ce sujet^{7, 8}.

6. HERNANDEZ H.-F., PIERREL P., ELLEINGAND E., GARCIA-SERRES R., HUYNH B.-H., JOHNSON M.-K., FONTECAVE M., ATTA M., *Biochemistry*, 2007, 46, 5140-5147.

7. FONTECAVE M. et OLLAGNIER DE CHOUDENS S. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, 474, 226-37.

8. FONTECAVE M., PY B., OLLAGNIER DE CHOUDENS S. et BARRAS F., In *Escherichia coli and Salmonella*, 2008, chapitres 3.6, 3.14 (Editor section : T. Begley).

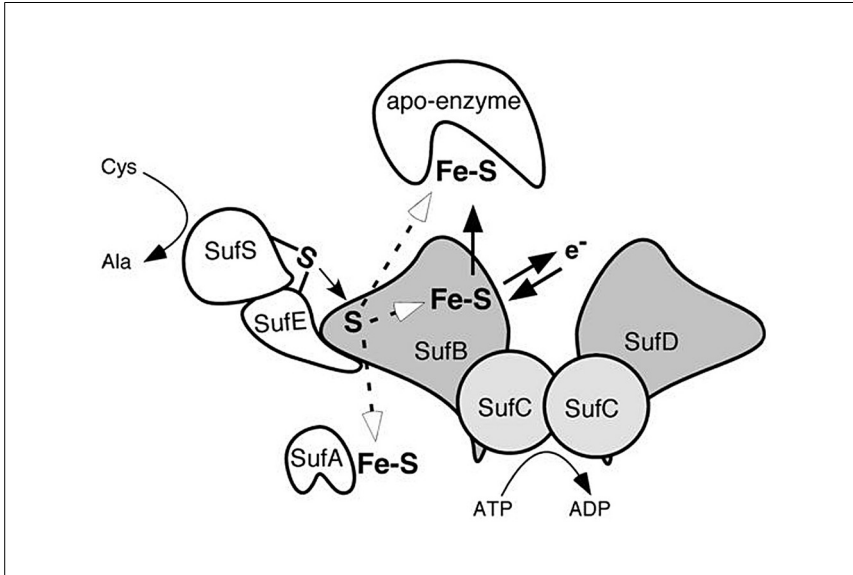


Figure 2 : Représentation schématique du système SUF

Notre projet est de comprendre au niveau moléculaire comment ces complexes multi-protéiques fonctionnent pour mobiliser les atomes de fer et de soufre à partir de sources biologiques, d'assembler ces atomes sous forme de clusters, et enfin de fournir ces matériaux inorganiques organisés à des protéines acceptrices. Pour ce faire, nous avons choisi le système bactérien SUF comme modèle de ces machineries et avons montré qu'en effet il fonctionnait sous la forme d'un large complexe SufSEBC₂D (*J. Biol. Chem.* 2007, 282, 13342-13350) (*figure 2*).

Nous avons été les premiers à caractériser les protéines d'assemblage IscA/SufA ainsi que les cystéines désulfurases à deux composants SufS-SufE/CsdA-CsdE. Dans ce contexte, nous avons récemment isolé et caractérisé, en collaboration avec le groupe de M. Pilon (Colorado), deux protéines de type SufE dans les chloroplastes de *A. thaliana*⁹. L'une d'elles a été identifiée pour la première fois comme étant la quinolinate synthase (NadA) de cet organisme, une enzyme fer-soufre. L'acide quinolinique est un précurseur biosynthétique du NAD. Cette nouvelle protéine contient deux domaines, un domaine SufE et un domaine NadA portant un cluster essentiel. C'est la première fois qu'une enzyme Fe-S contient un domaine fonctionnel impliqué dans l'assemblage de son cluster. Cette association originale permet la formation et la réparation du cluster dans des conditions de concentrations

9. MURPHY N., OLLAGNIER DE CHOUDENS S., SANAKIS Y., ABDEL-GHANY S.E., ROUSSET C., YE H., FONTECAVE M., PILON-SMITH E. et PILON M., *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 18254-18264.

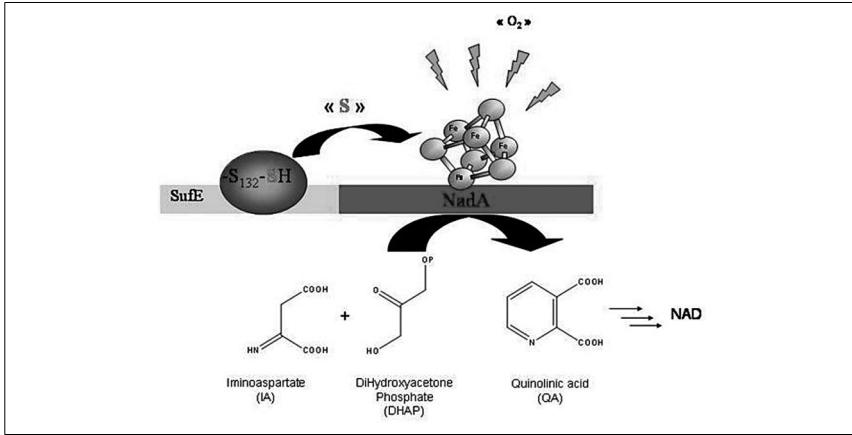


Figure 3 : La quinolinate synthase d'*A. thaliana* : une association d'un domaine catalytique contenant un centre Fe-S (NadA) et d'un domaine impliqué dans l'assemblage du fer-soufre (SufE)

élevées d'O₂, dangereuses pour les clusters, que l'on trouve dans des compartiments comme les chloroplastes (*figure 3*). La caractérisation détaillée de NadA provenant d'*A. thaliana* mais aussi d'*E. coli* a été réalisée^{10, 11}.

Nous nous sommes intéressés également à l'identification du donneur physiologique de fer lors de la biosynthèse des clusters. Nous avons été les premiers à montrer un lien entre ce processus, dans le cas du système ISC, et la protéine à fer appelée CyaY : celle-ci se fixe à la cystéine désulfurase IscS et peut fournir son fer à la protéine d'assemblage IscU lors de la synthèse du cluster¹². Il est intéressant de noter que CyaY est la frataxine bactérienne, une protéine impliquée dans la synthèse des clusters Fe-S chez les mammifères. L'inactivation de la frataxine conduit à l'ataxie de Friedreich, une maladie génétique.

Un autre aspect de notre projet a concerné le lien entre biosynthèse des clusters fer-soufre et stress métallique. Nous avons démontré que la toxicité du cobalt, par exemple, chez *E. coli* était due à l'inactivation de protéines Fe-S. Les protéines Suf sont spécifiquement impliquées dans la résistance au cobalt et des études *in vitro* ont montré une compétition entre le Co et le Fe pendant l'assemblage des clusters¹³.

10. OLLAGNIER DE CHOUDENS S., LOISEAU L., SANAKIS Y., BARRAS F. et FONTECAVE M., *FEBS Lett.*, 2005, 579, 3737-3743.

11. ROUSSET C., FONTECAVE M. et OLLAGNIER DE CHOUDENS S., *FEBS Lett.* 2008, 582, 2937-44.

12. LAYER G., OLLAGNIER DE CHOUDENS S., SANAKIS Y., and FONTECAVE M., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 16256-16263.

13. RANQUET C., OLLAGNIER DE CHOUDENS S., LOISEAU L., BARRAS F. and FONTECAVE M., *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 30442-30451.

Enfin deux études, menées en collaboration avec F. BARRAS, Marseille (CNRS), nous ont conduits à la découverte de deux acteurs importants du processus de biosynthèse des clusters Fe-S chez *E. coli* grâce à une approche originale combinant de la génétique microbienne, de la biologie moléculaire, de la chimie des protéines et de la spectroscopie (ANR Blanc 2007). Nous avons identifié une protéine, appelée ErpA, qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme respiratoire à travers la maturation de GcpE et LytB, deux enzymes Fe-S essentielles, responsables de la formation de l'isopentenyl diphosphate, un précurseur des isoprénoides, en particulier les quinones¹⁴. D'autre part, un nouveau type de protéine de transport de cluster Fe-S a été identifié, provenant d'une fusion entre un domaine IscA/SufA et un domaine Nfu (Nfu est un autre type de protéine d'assemblage). Par des approches *in vivo* et *in vitro* nous avons montré que cette protéine, appelée NfuA, participait à la maturation de protéines Fe-S chez *E. coli* dans des conditions de stress oxydant et de carence en fer et que les deux domaines étaient essentiels¹⁵.

2.2. Maturation des hydrogénases¹⁶⁻¹⁹

Les [Fe₂]-hydrogénases contiennent un centre bi-nucléaire à fer original (*figure 3*) dont la biosynthèse implique aussi une machinerie protéique complexe. Les trois composants protéiques, HydE, HydG et HydF ont été isolés et caractérisés. Il est remarquable que les trois protéines soient des enzymes Fe-S, HydE and HydG appartenant à la famille « Radical-SAM », comme cela a été montré par des études spectroscopiques et cristallographiques^{16,17,18}. Cependant on sait très peu de choses sur leurs fonctions : HydF présente une activité GTP-ase et semble jouer le rôle de protéine d'assemblage du site dinucléaire qui est ensuite transféré à l'apo-hydrogénase, tandis que HydE et HydG sont probablement impliquées dans la biosynthèse des petits ligands, CO, CN et le pont dithiolate (*figure 4A*). Nous avons récemment avancé que la protéine HydG est spécifiquement impliquée dans la synthèse de ce dithiolate, en utilisant la tyrosine comme précurseur, à travers une réaction chimique fascinante (*figure 4B*)¹⁹.

14. LOISEAU L., GEREZ C., BEKKER M., OLLAGNIER DE CHOUDENS S., PY B., SANAKIS Y., TEIXEIRA DE MATTOS J., FONTECAVE M. et BARRAS F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 13626-13631.

15. ANGELINI S., GEREZ G., OLLAGNIER-DE CHOUDENS S., SANAKIS Y., FONTECAVE M., BARRAS F. et PY B., *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 14084-14091.

16. RUBACH J.K., BRAZZOLOTTO X., GAILLARD J., FONTECAVE M., *FEBS Lett.*, 2005, 579, 5055-5060.

17. BRAZZOLOTTO X., RUBACH J.K., GAILLARD J., GAMBARELLI S., ATTA M., FONTECAVE M., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 769-774.

18. NICOLET Y., RUBACH J.K., POSEWITZ M.C., AMARA P., MATHEVON C., ATTA M., FONTECAVE M., FONTECILLA-CAMPS J.C., *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 18861-18872.

19. PILET E., NICOLET Y., MATHEVON C., DOUKI T., FONTECILLA-CAMPS J.C., FONTECAVE M., *FEBS Lett.*, 2009, 583, 506-511.

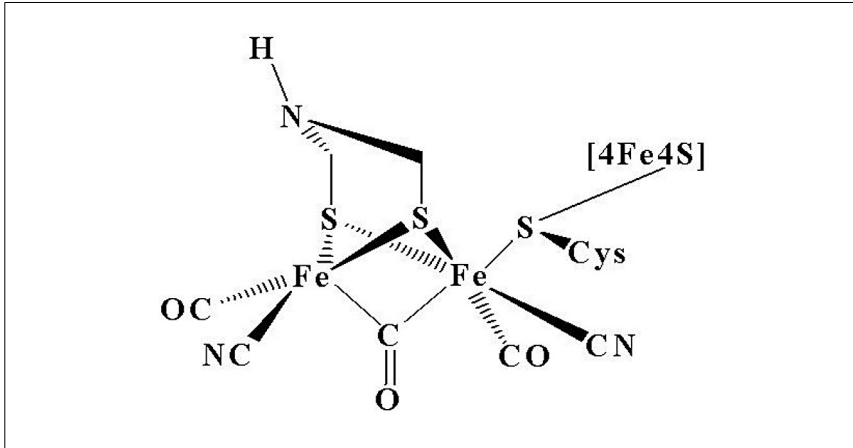


Figure 4A : le centre binucléaire à fer des [Fe-Fe]-hydrogénases

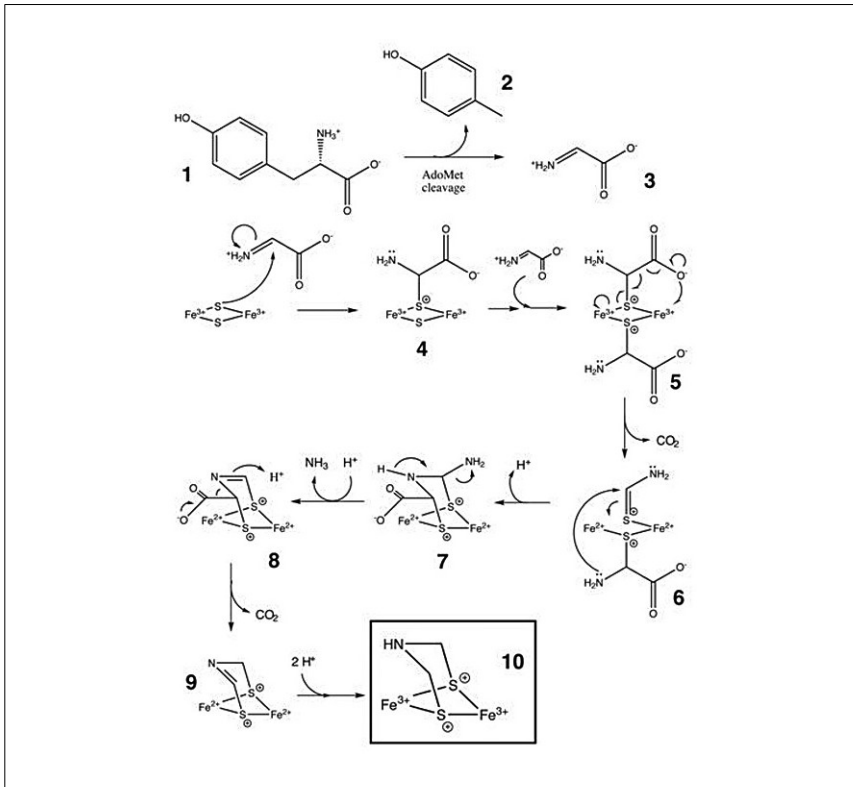


Figure 4B : mécanisme de biosynthèse du pont azadithiolate

3. Une enzyme antioxydante : la superoxyde réductase²⁰⁻²⁴ (V. NIVIÈRE)

Le stress oxydant représente un problème majeur pour la vie aérobie et la compréhension des mécanismes par lesquels la cellule se protège des espèces réactives de l'oxygène constitue un domaine important de la biologie. Les métalloenzymes jouent des rôles essentiels dans ces processus et en 2000 notre groupe a découvert une nouvelle famille d'enzymes antioxydantes que nous avons appelées les superoxydes réductases (SOR). SOR détruit les radicaux superoxydes par une réduction monoélectronique produisant du peroxyde d'hydrogène exclusivement: $O_2^{\bullet-} + 1e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$, donc par un mécanisme différent de celui des superoxydes dismutases SODs. Le site actif de SOR comporte un ion ferreux avec une coordination originale $[Fe^{2+}(HisN)_4(CysS)_1]$. Le projet consiste à comprendre le mécanisme chimique de cette réaction.

En particulier nous avons réussi à piéger un intermédiaire de la réaction, une espèce fer(III)-peroxyde, dans un mutant de SOR (*figure 4*). Dans le cadre d'une collaboration avec D. Bourgeois (IBS Grenoble), ce mutant a été cristallisé et l'intermédiaire produit dans le cristal. Différentes structures à haute résolution ont pu être obtenues et rapportées dans un article dans le journal Science en 2007²⁰. Ces structures montrent une coordination du ligand peroxyde de type « end-on » et qu'un résidu lysine, à travers un réseau de liaisons hydrogène, permet de maintenir une molécule d'eau à proximité de l'oxygène proximal du peroxyde (Fe-O-OH), suggérant une protonation de cet atome (*figure 5*). Ceci est capital pour l'étape de coupure de la liaison Fe-O et la formation du produit H_2O_2 .

Le site actif de la SOR contient également un ligand axial cystéine qui joue un rôle dans la catalyse. En collaboration avec T.A. Mattioli (CEA Saclay) et C. Houée-Levin (Orsay), nous avons montré que l'environnement de cette cystéine exerçait un contrôle fin de la force de la liaison CysS-Fe, et donc sur la réactivité du complexe fer(III)-peroxyde. Ce contrôle est utilisé pour fragiliser la liaison Fe-O favorisant sa rupture pour former H_2O_2 ^{21,22}. Nous comprenons donc comment le site actif de la SOR produit H_2O_2 à partir d'un intermédiaire Fe(III)-peroxyde et évite la rupture de la liaison O-O qui produirait une espèce fer-oxo comme dans les oxygénases.

Nous avons également montré que la fixation spécifique de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ sur le fer du site actif modifie la réactivité de ce dernier. Le complexe SOR-ferrocyanure réduit bien le superoxyde, mais sans production de H_2O_2 . C'est le premier exemple d'un système catalytique conduisant à l'élimination du superoxyde sans production de H_2O_2 ²³.

20. KATONA G., CARPENTIER P., NIVIÈRE V., AMARA P., ADAM V., OHANA J., TSANO N. et BOURGEOIS D., *Science*, 2007, 316, 449-453.

21. MATHÉ C., NIVIÈRE V., HOUÉE-LEVIN C. and MATTIOLI T.A., *Biophysical Chemistry*, 2006, 119, 38-48.

22. MATHÉ C., WEILL C.O., MATTIOLI T.A., BERTHOMIEU C., HOUÉE-LEVIN C., TREMEY T. et NIVIÈRE V. J., *Biol. Chem*, 2007, 282, 22207-22216.

23. MOLINA-HÉRÉDIA F.P., HOUÉE-LEVIN C., BERTHOMIEU C., TOUATI D., TREMEY E., FAVAUDON V., ADAM V. et NIVIÈRE V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 14750-14755.

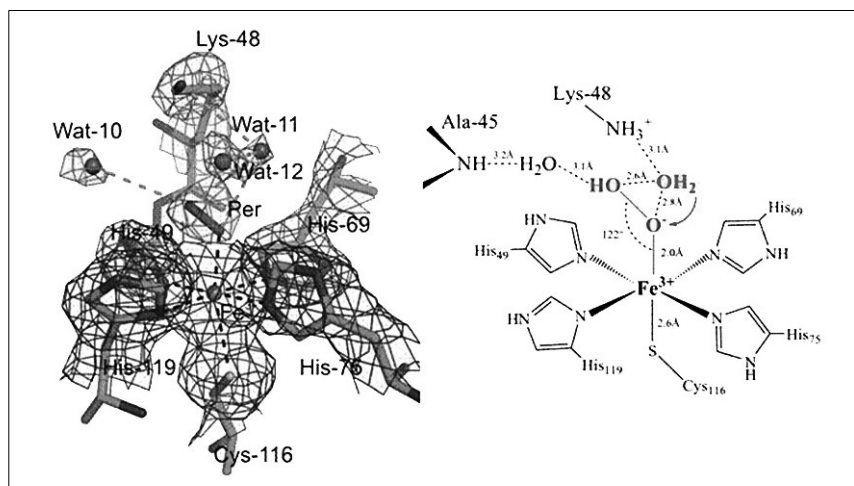


Figure 5 : Structure du site actif de SOR dans son état Fe(III)-peroxyde, résolution de 1.95 Å (Science, 2007).

Enfin, nous avons démontré qu'à l'état ferrique le ligand carboxylate (Glu) peut être déplacé par un ion hydroxyde à pH basique. Ces résultats ont été déterminants pour l'interprétation du spectre UV-Vis du second intermédiaire observé pendant la catalyse²⁴.

4. Métaux et hydrogène²⁵⁻³¹ (V. ARTERO, M. FONTECAVE)

L'hydrogène est aujourd'hui considéré comme un vecteur énergétique du futur et peut être vu comme un carburant pour remplacer les carburants fossiles dont les réserves sont limitées. La production d'hydrogène par photolyse de l'eau est l'une des solutions pour la conversion de sources d'énergie renouvelables comme le soleil en carburants. Cela demande la mise au point de dispositifs photoélectrochimiques pour la décomposition de l'eau et d'électrolyseurs à coupler à des panneaux photovoltaïques. Les technologies actuelles sont basées sur des catalyseurs à base de platine. Cependant ce métal est cher et peu abondant (seulement 37 ppb dans la croûte terrestre). Il y a donc nécessité et urgence à trouver de nouveaux matériaux basés sur des éléments abondants pour la production électrochimique et la photo-production de l'hydrogène. Des solutions peuvent être trouvées en s'inspirant des hydrogénases, des métalloenzymes qui catalysent la production/oxydation d'H₂ aussi efficacement que le platine, mais en utilisant des métaux comme le fer et le nickel.

24. MATHÉ C., NIVIÈRE V., MATTIOLI T.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 16436-16441.

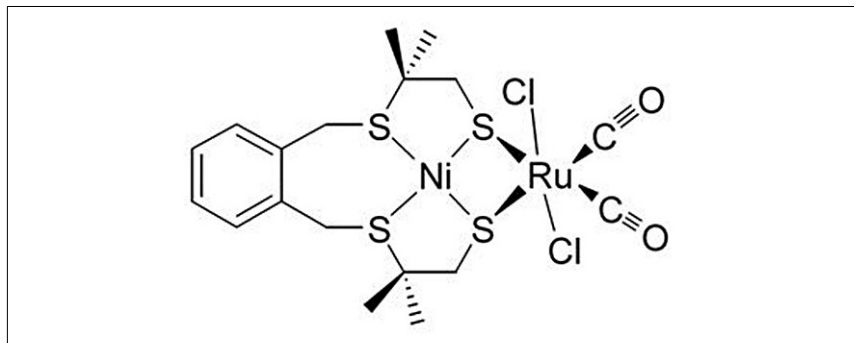


Figure 6 : un exemple de catalyseur Ni-Ru

La connaissance des structures des hydrogénases permet une approche biomimétique et la définition de la structure minimale requise pour un complexe bio-inspiré pour catalyser une production électrochimique d'hydrogène. Nous avons publié une série d'articles sur la synthèse et les propriétés catalytiques de divers complexes nickel-ruthénium bio-inspirés (*figure 6*), dans lesquels des entités organométalliques de ruthénium riches en électrons miment le fragment $\{\text{Fe}(\text{CO})(\text{CN})_2\}$ ^{25, 26}. Ces complexes NiRu sont les premiers modèles structuraux et fonctionnels des hydrogénases à Ni-Fe. De plus, de récentes études structurales et des calculs DFT sur ces systèmes, en collaboration avec Martin Field (IBS, Grenoble), ont confirmé que ces composés étaient de bons modèles pour l'étude des mécanismes de production et d'oxydation de l'hydrogène catalysés au site actif des hydrogénases²⁷.

Dans le même temps nous avons été les premiers à découvrir que les cobaloximes formaient une autre classe de catalyseurs intéressants pour la production d'hydrogène^{28, 29}. Avec les complexes nickel bis-diphosphine de Dan DuBois (voir ci-dessous), ces cobaloximes sont actuellement les meilleurs catalyseurs en termes de surtension et d'activité. Nous avons ensuite intégré les cobaloximes et des unités de collecte de la lumière (complexes diimine de ruthénium, iridium or rhénium) au sein d'une structure supramoléculaire et obtenu le système photocatalytique le plus performant actuellement connu en termes de stabilité et de rendement quantique pour la photoproduction de l'hydrogène (*figure 7A*). Ces systèmes,

25. OUDART Y., ARTERO V., PÉCAUT J., FONTECAVE M., *Inorg. Chem.*, 2006, 45, 4334-4336.

26. OUDART Y., ARTERO V., PÉCAUT J., LEBRUN C., FONTECAVE M., *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, 2613-2626.

27. CANAGUIER S., ARTERO V., VACCARO L., OSTERMANN R., PÉCAUT J., FIELD M., FONTECAVE M., *Chem. Eur. J.*, 2009, in press.

28. RAZAVET M., ARTERO V., FONTECAVE M., *Inorg. Chem.*, 2005, 44, 4786-4795.

29. BAFFERT C., ARTERO V., FONTECAVE M., *Inorg. Chem.*, 2007, 46, 1817-1824.

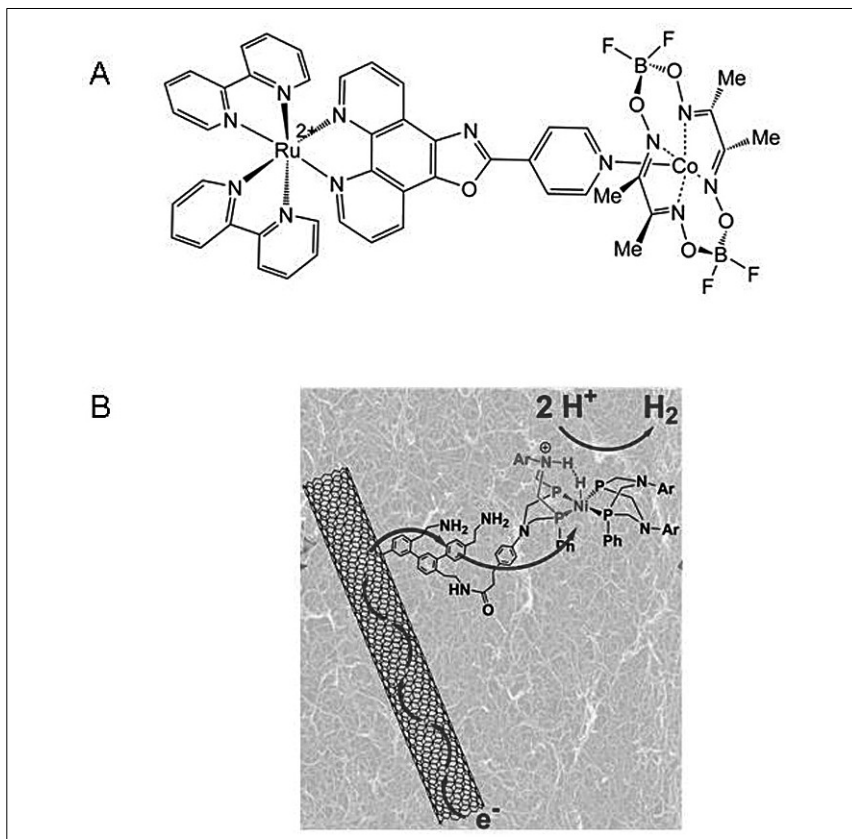


Figure 7A : Structure d'un photocatalyseur supramoléculaire contenant une cobaloxime.

B : Représentation d'un nanotube de carbone fonctionnalisé avec un catalyseur bio-inspiré à base de nickel.

publiés dans *Angew. Chem. Int. Ed.* (2008), sont les premiers à utiliser un métal de transition de la première ligne, le cobalt, donc plus abondant et moins cher que le platine, pour la catalyse^{30, 31}.

En collaboration avec Serge Palacin (SPCSI, CEA-Saclay), nous avons combiné cette approche moléculaire bio-inspirée avec l'utilisation d'outils nanochimiques et montré que le greffage covalent des complexes nickel-bisdiphosphine développés par D. DuBois sur des nanotubes de carbone conduit à des nanomatériaux de

30. Fihri A., Artero V., Razavet M., Baffert C., Leibl W., Fontecave M., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 47, 564-567.

31. Fihri A., Artero V., Pereira A., Fontecave M., *Dalton trans.*, 2008, 5567-5569.

cathode à base de nickel avec des performances remarquables (European Patent 08 290 988.8) (*figure 7B*) : l'hydrogène est produit à partir de l'acide sulfurique aqueux avec de très faibles surtensions (20 mV) et la stabilité du matériau est exceptionnelle (20 000 turnovers par heure). Ce catalyseur peut donc être exploité pour la production de H₂ dans les conditions très acides mises en œuvre dans la technologie PEM (proton-exchange-membrane). Ce travail vient d'être accepté pour publication dans *Science*.

PUBLICATIONS

2008

« Cobaloxime-based photocatalytic devices for hydrogen production », A. FIHRI, V. ARTERO, M. RAZAVET, C. BAFFERT, W. LIEBL, M. FONTECAVE, *Angew. Chem.*, 2008, 47, 564-567.

« Mimicking NiFe hydrogenases: Nickel-based electrocatalysts for hydrogen production », S. CANAGUIER, V. ARTERO, M. FONTECAVE, *Dalton Trans.*, 2008, 315-325.

« Iron-Sulfur biosynthesis: mechanisms of cluster assembly and transfer », M. FONTECAVE, S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, 474, 226-237.

« NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress conditions », S. ANGELINI, C. GEREZ, S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, Y. SANAKIS, M. FONTECAVE, F. BARRAS, B. PY, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 14084-14091.

« The two-component FMN-dependent monooxygenase ActVA-ActVB from *Streptomyces coelicolor*: mechanism and regulation », J. VALTON, C. MATHEVON, M. FONTECAVE, V. NIVIÈRE, D.P. BALLOU, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 10287-10296.

« From iron and cysteine to iron-sulfur clusters: the biosynthetic protein machineries », M. FONTECAVE, S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, B. PY, F. BARRAS, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2008, Chapter 3.6.3.14.

A. BÖCK, R. CURTISS III, J.B. KAPER, P.D. KARP, F.C. NEIDHARDT, T. NYSTRÖM, J.M. SLAUCH et C.L. SQUIRES (ed.), *EcoSal*; ASM Press, Washington, D.C.

« New light on methylthiolation reactions », M. FONTECAVE, E. MULLIEZ, M. ATTA, *Chemistry and Biology*, 2008, 15, 209-210.

« X-ray Structure of the [FeFe]-Hydrogenase Maturase HydE from *Thermotoga maritima* », Y. NICOLET, J.K. RUBACH, M.C. POSEWITZ, P. AMARA, C. MATHEVON, M. ATTA, M. FONTECAVE, J.C. FONTECILLA-CAMPS, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 18861-18872.

« Hydrogen evolution catalyzed by {CpFe(CO)₂}-based complexes », V. ARTERO, M. FONTECAVE, *Comptes Rendus de l'Académie des sciences*, 2008, 11, 926-931.

« A new polydentate ligand and catalytic properties of the corresponding ruthenium complex during sulfoxidation and alkene epoxidation », O. HAMELIN, S. MÉNAGE, F. CHARNAY, M. CHAVAROT, J.-L. PIERRE, M. FONTECAVE, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 6413-6420.

« Efficient H₂-producing photocatalytic systems based on cyclometalated iridium- and tricarbonylruthenium-diimine photosensitizers and cobaloxime catalysts », A. FIHRI, V. ARTERO, A. PEREIRA, M. FONTECAVE, *Dalton Trans.*, 2008, 5567-5569.

« The [4Fe-4S] cluster of Quinolinate Synthase from *Escherichia coli*: investigation of cluster ligands », C. ROUSSET, M. FONTECAVE, S. OLLAGNIER DE CHOUDENS, *FEBS Letters*, 2008, 582, 2937-2944.

« Combined NMR and DFT studies for the absolute configuration elucidation of the spore photoproduct, a UV-induced DNA lesion », C. MANTEL, A. CHANDOR, D. GASPARUTTO, T. DOUKI, M. ATTA, M. FONTECAVE, P.A. BAYLE, J.M. MOUESCA, M. BARDET, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, *130*, 16978-16984.

« DNA repair and free radicals: New insights into the mechanism of spore photoproduct lyase revealed by single mutation », A. CHANDOR-PROUST, O. BERTEAU, T. DOUKI, D. GASPARUTTO, S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, M. ATTA, M. FONTECAVE, *J. Biol. Chem.*, 2008, *283*, 36361-36368.

2009

« The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly », E. PILET, Y. NICOLET, C. MATHEVON, T. DOUKI, J. FONTECILLA-CAMPS, M. FONTECAVE, *Febs Letters*, 2009, *583*, 506-11.

« Synthesis, crystal structure, magnetic properties and reactivity of a Ni-Ru model of NiFe hydrogenases with a pentacoordinated triplet ($S = 1$) Ni^{II} center », Y. OUDART, V. ARTERO, L. NOREL, C. TRAIN, J. PÉCAUT, M. FONTECAVE, *J. OrganoMet. Chem.*, 2009, *694*, 2866-2869.

« Native *E. coli* SufA, co-expressed with SufBCDSE, purifies as a [2Fe-2S] protein and acts as an Fe-S transporter to Fe-S target enzymes », V. GUPTA, M. SENDRA, S.G. NAIK, H.K. CHAHAL, B.H. HUYNH, F.W. OUTTEN, M. FONTECAVE, S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, *131*, 6149-6153.

« Cyclopentadienyl Nickel-Ruthenium Catalysts for Biomimetic Hydrogen Evolution: Electrocatalytical properties and Mechanistic DFT Studies », S. CANAGUIER, L. VACCARO, V. ARTERO, R. OSTERMANN, J. PÉCAUT, M.J. FIELD, M. FONTECAVE, *Chem. Eur. J.*, 2009 (sous presse).

« Iron sulfur clusters in “Radical-SAM” enzymes: spectroscopy and coordination », S. GAMBARELLI, E. MULLIEZ, M. FONTECAVE, *Biological Magnetic Resonance*, 2009 (sous presse).

« The Zn center of the anaerobic ribonucleotide reductase from *E. coli*. », F. LUTTRINGER, E. MULLIEZ, B. DUBLET, D. LEMAIRE, M. FONTECAVE, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, *14*, 923-933.

« Snapshots of Dynamics in Synthesizing *N*⁶-isopentenyladenosine at tRNA Anticodon », S. CHIMNARONK, F. FOROUHAR, J. SAKAI, M. YAO, C.M. TRON, M. ATTA, M. FONTECAVE, J.F. HUNT, I. TANAKA, *Biochemistry*, 2009, *48*, 5057-5065.

« RNA-modifying metalloenzymes », M. ATTA, M. FONTECAVE ET E. MULLIEZ, *DNA and RNA Modification Enzymes: Comparative Structure, Mechanism, Functions, Cellular Interactions and Evolution*, edited by Henri Grosjean, ©2009 Landes Bioscience.

« The CsdA cysteine desulfurase interacts with SufBCD proteins in Fe/S biogenesis and with CsdL (ex-YgdL), a ubiquitin-modifying like protein, in a new sulfur transfer pathway », V. TROTTER, D.L. VINELLA, L. LOISEAU, S. OLLAGNIER-DE CHOUDENS, M. FONTECAVE, F. BARRAS, *Mol. Microbiol.*, 2009 (sous presse).

BREVETS

Novel Materials and their use for the electrocatalytic evolution or uptake of H₂, V. ARTERO, M. FONTECAVE, S. PALACIN, A. LE GOFF, B. JOUSSELME, *European patent application*, 2008, EP-08 290 988.8.

LISTE DES CONFÉRENCES ET SÉMINAIRES INVITÉS (2008-2009)

En 2008

Journées de Chimie de coordination-SFC, Dijon (28-29 janvier 2008), « Nouveaux complexes de Ruthénium : applications en catalyse rédox ».

Conférence-débat de l'Académie des sciences, Paris (1^{er} avril 2008), « L'hydrogène, énergie du futur ? ».

Institut Universitaire de France, Grenoble (26 mai 2008), « Les défis de l'hydrogène : de l'eau, du soleil et des catalyseurs ».

Institut de Génomique, Génoscope, Evry (19 juin 2008), « Clusters Fer-Soufre et biocatalyse radicalaire : une chimie bio-inorganique fascinante ».

Second « Trends in enzymology » Conference, Saint-Malo (2-5 juillet 2008), « DNA repair and free radicals: the case of the spore photoproduct lyase, a Radical-SAM enzyme ».

GECO (Groupe d'Etudes de Chimie Organique) 49, Seillac (24-29 août 2008), « Flavin reductases and oxygen activation : applications in antibiotic biosynthesis and artificial nucleases ».

Eurobic 9, 9th European Conference on BioInorganic Chemistry, Wroclaw, Pologne (2-6 septembre 2008), « DNA repair and iron-sulfur clusters : the case of the spore photoproduct lyase, a Radical-SAM enzyme ».

SyCOCAL VI, Symposium en Chimie organique en Centre-Auvergne-Limousin, La Bourboule (21-24 septembre 2008), « L'hydrogène : de l'eau, du soleil et des catalyseurs ».

Académie des sciences, Paris (23 septembre 2008), « Fer et soufre : un mélange bio-inorganique très réactif ».

Centre de Recherche Servier, Croissy-sur-Seine (21 octobre 2008), « Chimie et Biologie : quelles sont les nouvelles frontières ? ».

Second International Conference on Vitamins, Coenzymes and Biofactors, University of Georgia, USA (26-31 octobre 2008), « Biosynthesis of mineral cofactors : the case of [Fe-S] clusters ».

CEFIPRA Indo-French meeting : Biohydrogen, from basic concepts to technology, Mussorie, Inde (6-9 novembre 2008), « Radical-SAM enzymes and maturation of hydrogenase ».

Conférence Louis Pasteur, ENS Paris (10 décembre 2008), « Fer et soufre, un mélange bioinorganique très réactif : des origines aux biocatalyseurs d'aujourd'hui ».

En 2009

Nineteenth National Symposium on Catalysis, Pune, Inde (18-21 janvier 2009), « Hydrogenase-inspired catalysts for photoproduction of hydrogen ».

Journées de l'École Doctorale, Université Paris VI (21 janvier 2009), « L'hydrogène : de l'eau, du soleil et des catalyseurs ».

Lycée du Grésivaudan, Meylan, France (28 janvier 2009), « Chimie et Biologie : quelles sont les nouvelles frontières ? ».

Gordon Research Conference : Solar Fuels, Ventura, USA (31 janvier-5 février 2009), « From hydrogenase to bioinspired nanomaterials : Ni-based compounds and hydrogen production ».

EMBO-FEMS Workshop on Microbial Sulfur Metabolism, Tomar, Portugal (15-18 mars 2009), « A metal-escorted sulphur tour: from cysteine to sulfurated compounds ».

Conférence Internationale : *From Synthetic Chemistry to Synthetic Biology*, Collège de France, Paris (5 mai 2009), « Between biology and chemistry : bioinspired catalysis and synthesis ».

Club des industriels, Académie des sciences, Paris (12 mai 2009), « Quand le vivant inspire les chimistes : vers de nouveaux catalyseurs ».

Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille (2 juin 2009), « Hydrogène : de l'eau, du soleil et des catalyseurs ».

National Institute for Medical Research, Londres, Angleterre (25 juin 2009), « A metal-escorted sulphur tour: from cysteine to sulfurated compounds ».

THÈSES SOUTENUES EN 2008 ET 2009

Alexia CHANDOR (co-direction M. FONTECAVE, M. ATTA), « Réparation de l'ADN par une protéine "Radical-SAM" : étude de la spore photoproduct lyase ». Soutenue le 28 novembre 2008.

Carine ROUSSET (co-direction M. FONTECAVE, S. OLLAGNIER-DE-CHOUDENS), « Étude structurale et fonctionnelle de la quinolinate synthase : une protéine fer-soufre cible d'agents antibactériens ». Soutenue le 28 avril 2009.