

Chimie des processus biologiques

M. Marc FONTECAVE, membre de l'Institut
(Académie des sciences), professeur

ENSEIGNEMENT ^a

Cours : De la chimie biologique aux biotechnologies : recherche et applications

Pour reprendre une vision très originale développée par J.-M. Lehn, la chimie est marquée à la fois par une grande diversité mais également une faible complexité moléculaire tandis qu'à l'inverse la biologie met en œuvre une grande complexité moléculaire basée sur une diversité limitée (20 acides aminés, 4 bases nucléiques, etc.). Si l'on veut exploiter la puissance grandissante des concepts et des outils de ces disciplines, qui continuent à s'étendre après la grande révolution scientifique du XX^e siècle, pour inventer de nouveaux procédés de synthèse, qu'on appellera « biotechnologiques » (plus efficaces, plus respectueux de l'environnement, plus économes en énergie et moins coûteux), il convient de renforcer la recherche à l'interface de la chimie et de la biologie. Le cours tente de montrer quelques directions de cette recherche qui consistent à utiliser la chimie pour étudier des systèmes moléculaires de plus en plus complexes, pour modifier les organismes vivants et la biologie pour transformer les cellules en usines cellulaires pour la production de molécules non naturelles. Cette science nouvelle, qui combine chimie bioinspirée et biologie de synthèse, est amenée à développer des organismes synthétiques, des biocatalyseurs et des enzymes artificielles à travers le développement de méthodologies nouvelles : ingénierie métabolique, mutagenèse et évolution dirigée pour des applications biotechnologiques originales.

Cours 1. Chimie et biotechnologies : vers des organismes synthétiques

Dans ce premier cours est présentée une courte histoire des biotechnologies, en partant de l'Antiquité, période lors de laquelle les levures étaient déjà utilisées pour

a. Les cours et les séminaires sont disponibles en audio et vidéo sur le site internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/marc-fontecave/course-2014-2015.htm> [NdÉ].

faire le pain, les fromages et les alcools, et en passant par toute une série d'étapes clés comme les travaux de Louis Pasteur au milieu du XIX^e siècle, la découverte des enzymes par Büchner (1897), les premières productions industrielles biotechnologiques (1915-1930), la révolution des antibiotiques (1940), qui ouvrent l'ère de la microbiologie industrielle, la révolution génétique avec la découverte de la double hélice de l'ADN par Watson et Crick (1953) et la mise au point des techniques de séquençage et de production de protéines recombinantes (1970-1980), pour finir avec le séquençage de génomes entiers (1995-...), y compris celui de l'homme (2001), leur synthèse chimique (2003-2008) et enfin l'avènement des cellules synthétiques (2010).

Tous ces outils permettent d'envisager une nouvelle biologie, dite « synthétique », s'appuyant sur des organismes génétiquement et chimiquement modifiés à un degré inégalé (introduction de voies métaboliques non naturelles) pour produire des médicaments, des carburants, etc. Ce concept est illustré avec la présentation des travaux de F. Romesberg au Scripps Institute, qui vient de réussir ce formidable exploit de construire un génome avec 6 et non 4 bases nucléiques, et de mettre au point un organisme vivant capable de répliquer cet ADN.

Cours 2. Biocatalyseurs : usines cellulaires et enzymes

Les procédés biotechnologiques utilisent aussi bien des microorganismes, comme la levure ou *Escherichia coli*, que des systèmes enzymatiques. Dans ce cours sont présentées les différentes familles d'enzymes les plus utilisées, l'histoire de l'ingénierie enzymatique ainsi que les méthodes à haut débit pour les modifier, dans le but d'améliorer leur activité, d'élargir leur spécificité de substrat, accroître leur résistance, etc. Ces méthodes modernes sont en général classées sous le terme de « méthodes d'évolution dirigée » : mutagenèse aléatoire (PCR pro-erreurs), mutagenèse à saturation de site, brassage génétique. Plusieurs exemples concrets de travaux récents d'évolution dirigée illustrent la puissance de ces méthodes. Enfin, plusieurs exemples de réalisations industrielles (production de médicaments, de sirop de fructose, d'acrylamide, de vitamines, d'antibiotiques, etc.) sont présentés.

Cours 3. De l'ingénierie métabolique à la biologie de synthèse

Pour la production de molécules d'intérêt, les laboratoires disposent aujourd'hui, et depuis longtemps, de la synthèse chimique ainsi que – beaucoup plus récemment – des outils de l'ingénierie métabolique et de la biologie de synthèse. Une définition précise de ces différents domaines est donnée afin de faire apparaître leurs spécificités, leurs différences, leurs avantages respectifs et leurs inconvénients. Il semble qu'à l'avenir l'industrie utilisera ces différents outils, choisis en fonction de la cible visée. Par exemple dans le domaine pharmaceutique on observe que, malgré le développement de la biologie et les perspectives réelles des biomédicaments (anticorps, vaccins, hormones, etc.), de la thérapie génique et de la thérapie cellulaire, les médicaments mis sur le marché sont encore en grande partie de petites molécules de synthèse. Néanmoins, de grands succès ont été obtenus avec le développement de l'ingénierie métabolique qui utilise des organismes modifiés pour la production biotechnologique de molécules d'intérêt. Plusieurs exemples intéressants sont montrés en détail : synthèse d'une vitamine par un champignon,

synthèse d'alcools par des levures ou des bactéries modifiées, synthèse de l'artémisinine, un antipaludique en plein développement.

Cours 4. Oxydations enzymatiques sélectives : monooxygénases

Les réactions d'oxydation sont sans doute les plus difficiles à réaliser en chimie industrielle. Les organismes fournissent cependant des systèmes enzymatiques fascinants qui utilisent l'oxygène de l'air comme oxydant pour des insertions d'atomes d'oxygène dans divers substrats – y compris très inertes chimiquement comme les alcanes – avec d'étonnantes sélectivités (régio-, chimio-, stéréo-sélectivité). Dans ce cours sont présentés les structures et les mécanismes d'action des monooxygénases à cytochrome P450, des hydroxylases à flavines (à un ou deux composants) ainsi que quelques applications biotechnologiques qui mettent en œuvre ces enzymes : synthèse de l'hydrocortisone, de la pravastine, d'antibiotiques, de composés halogénés ainsi que biodégradation de composés toxiques.

Cours 5. Oxydations enzymatiques sélectives : développements biotechnologiques

Un intérêt particulier est porté sur les monooxygénases à flavine à deux composants, à la fois parce qu'il s'agit de systèmes possédant de fortes potentialités de développement biotechnologique et parce qu'ils sont étudiés au laboratoire. Elles sont composées d'une flavine réductase qui produit des flavines réduites libres. Ces dernières sont captées par le partenaire monooxygénase où elles réagissent avec l'oxygène de l'air pour donner un hydroperoxyde de flavine intermédiaire qui est responsable de l'oxydation du substrat. Ces enzymes sont ubiquitaires et sont impliquées dans les cellules (bactériennes en particulier) pour une large gamme de réactions d'oxydation. On montre deux réactions catalysées par ces monooxygénases, qui ont fait l'objet de recherches poussées y compris au niveau industriel : l'oxydation de composés soufrés dans le contexte de la mise au point de procédés de désulfuration des pétroles ; l'époxydation de styrènes pour obtenir des époxydes énantiomériquement purs.

Dans ce cours est discuté également le cas des Baeyer-Villigéras, des monooxygénases à flavine à un composant, qui catalysent des réactions de conversion stéréosélective de cétones cycliques en lactones, réactions très utiles pour l'industrie chimique. Après une présentation des structures et des mécanismes d'action de cette classe d'enzymes, on montre quels développements biotechnologiques sont attendus (systèmes d'oxydation de terpénoïdes, de stéroïdes et transformations asymétriques).

Cours 6. Évolution et adaptation des protéines : vers des activités non naturelles

Le cytochrome P450 BM3 est un cytochrome bactérien qui a fait l'objet de l'étude la plus poussée à ce jour du point de vue de l'application des techniques d'évolution dirigée. Ces études, essentiellement menées par F. Arnold (Caltech, États-Unis) et exposées dans ce cours, illustrent la possibilité qui nous est offerte de transformer par mutagenèse à haut débit une enzyme douée pour l'oxydation d'un substrat naturel (acide gras à longue chaîne dans ce cas précis) en une enzyme douée pour l'oxydation d'un substrat très différent et non naturel (propane, alcane à chaîne

courte). Ce travail permet de nous éclairer à la fois sur les chemins que les processus d'évolution et d'adaptation des protéines doivent prendre, et, peut-être, sur les chemins pris par l'évolution naturelle des organismes vivants. On observe que plus une protéine est mutée et instable, moins elle est capable d'évoluer. Ce sont donc les variants les plus stables, c'est-à-dire possédant les mutations les moins déstabilisantes, qui auront les plus grandes chances d'évoluer pour améliorer une activité. Les autres disparaîtront. Un des mécanismes par lesquels la sélection naturelle favorise la capacité à évoluer est la stabilisation des protéines qui font l'objet d'une évolution adaptative, ou les compensations qui sont trouvées aux effets des mutations déstabilisantes. Par ailleurs la capacité qu'a une protéine d'évoluer est liée à sa capacité à avoir des activités accessoires et une grande liberté de substrats.

Séminaires

Théorie et pratique de la xénobiologie

Séminaire du 11 mars 2015 : Philippe Marlière, directeur scientifique, Institute of Systems and Synthetic Biology

Le principal apport de la biologie moléculaire au XX^e siècle fut de démontrer l'unité de constitution des organismes vivants ainsi que la conservation des procédés informationnels (réplication, transcription, traduction) qui régissent la condensation covalente des composants canoniques (4 désoxynucléotides, 4 ribonucléotides, 20 acides aminés et 3 surnuméraires, une dizaine de coenzymes) par l'écheveau intra- et intermoléculaire de liaisons non-covalentes.

Une telle unité organisationnelle du vivant suscite l'interrogation quant à ses fondements théoriques au regard des principes de la physique et quant à sa malléabilité au cours de l'évolution. C'est à la discipline de la xénobiologie, au sein de la biologie synthétique, qu'échoit au XXI^e siècle la tâche pratique d'engendrer des formes de vie déviant, par leurs constituants chimiques et leurs procédés informationnels, de l'ensemble des espèces qui vivent sur terre.

Le séminaire met l'accent sur l'accès expérimental aux « organismes chimiquement modifiés » par évolution automatisée de populations bactériennes en forçant l'utilisation nutritionnelle d'ersatz chimiques en remplacement de composants canoniques.

L'application au long cours de cette approche à la substitution systématique de nucléotides et d'acides aminés permet de suivre en temps réel la radiation évolutive vers des génomes, des ribosomes et des protéomes chimiquement inédits et nutritionnellement captifs.

Les étapes expérimentales nécessaires à la polymérisation *in vivo* de nucléotides supplémentaires déviant de l'ADN et de l'ARN par les nucléobases, le squelette phospho-furannosique ou le groupe partant pyrophosphate sont exposées, en posant comme objectif la propagation d'acides xéno-nucléiques (AXN) et l'extension du « dogme central » (ADN → ARN → protéine) à des catégories supplémentaires de polymères informationnels.

Enfin, l'élaboration de coenzymes inédits et des biocatalyseurs informationnels qui exploiteront *in vivo* les capacités catalytiques de tels coenzymes est abordée, en mettant l'accent sur l'avènement de la métathèse dans le métabolisme.

Quelques faits marquants de la brève histoire de la biologie synthétique

Séminaire du 18 mars 2015 : Jean Weissenbach, membre de l'Académie des sciences, CEA/Institut de Génomique / Genoscope (Évry)

La biologie synthétique est récente mais a déjà une histoire à défaut d'avoir une définition consensuelle. Nous adhérons à une définition plutôt large selon laquelle il s'agirait d'une ingénierie de systèmes biologiques visant à obtenir des objets répondant aux spécifications définies par le concepteur. Comme les autres sciences de l'ingénieur, elle fait appel à une multiplicité de techniques qui, dans ce cas, s'appliquent à des processus biologiques variés et cherchent à modifier leurs propriétés et leurs modalités de fonctionnement. Le champ d'application de cette discipline est immense et il est déjà illusoire de vouloir le couvrir dans sa globalité. Nous nous restreignons donc ici à l'examen des progrès réalisés depuis une dizaine d'années dans le contrôle de certains processus clés.

Ces progrès concernent diverses ingénieries : ADN, protéines, circuits de régulation et de contrôle, voies métaboliques, processus de signalisation, etc. Dans de nombreux cas, ces ingénieries restent rudimentaires et font souvent appel à des optimisations reposant sur des approches testant en parallèle de grand nombre de combinaisons expérimentales.

De l'ingénierie métabolique à la biologie de synthèse et aux biotechnologies industrielles

Séminaire du 25 mars 2015 : Pierre Monsan, professeur Mines ParisTech ; professeur émérite INSA, université de Toulouse ; directeur de Toulouse White Biotechnology ; membre de l'Académie des technologies

Les progrès extraordinaires effectués dans le domaine de la lecture (séquençage) et de l'écriture (synthèse) de l'ADN, molécule support du patrimoine génétique des êtres vivants, associés à augmentation conjointe des moyens informatiques et de modélisation mathématique, ainsi qu'à la performance sans cesse améliorée des outils analytiques, débouchent sur une nouvelle dimension de la possibilité de programmation ou de reprogrammation des voies métaboliques des cellules microbiennes pour les transformer en véritables « usines cellulaires » capables de produire, à partir de carbone renouvelable, et non pas fossile, des composés d'intérêt pour la chimie, les matériaux et l'énergie, et développer ainsi une nouvelle « bioéconomie ».

Référence : Monsan P., *L'actualité chimique*, 375-376, 2013, 17-23.

Un système peu performant mais très versatile d'oxydation des molécules par des monoxygénases : les cytochromes P450, promoteurs de la défense contre les agressions chimiques chez les mammifères et catalyseurs d'oxydations particulièrement difficiles

Séminaire du 1^{er} avril 2014 : Gilles Truan, chercheur au CNRS, laboratoire d'Ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, INSA (Toulouse)

Il existe, chez les mammifères, un système analogue au système immunitaire pour lutter contre les agressions chimiques auxquelles nous sommes soumis : nous ingérons, volontairement ou non, des milliers de molécules différentes (polluants,

médicaments, toxines, substances alimentaires etc.) que notre corps doit éliminer. Ces molécules, souvent hydrophobes, peuvent s'accumuler dans les membranes cellulaires et subissent une première étape d'activation chimique avant d'être conjuguées avec des molécules solubles puis éliminées. Cette phase est réalisée via une étape de mono-oxygénation catalysée par des enzymes appelées cytochromes P450. Cette famille de métallo-enzymes est présente dans tout le règne vivant et plus de 20 000 cytochromes P450 ont été séquencés et répertoriés. La réaction générique d'un cytochrome P450 sur une molécule quelconque RH est la suivante :



L'enzymologie des cytochromes P450 est complexe car ils reconnaissent et oxydent des molécules simples comme l'éthanol, jusqu'à des molécules comportant une trentaine d'atomes de carbones. Cette « reconnaissance floue » permet à la vingtaine de cytochromes P450 différents présents chez les mammifères de métaboliser l'ensemble des xénobiotiques auxquels nous sommes quotidiennement confrontés (plus de 800 molécules différentes). Une fois le substrat au site actif, la réaction de mono-oxygénation introduit, de manière régio- et stéréospécifique, des hydroxyles sur des liaisons carbone-carbone considérées comme chimiquement peu réactives, et peut ensuite conduire à des réarrangements moléculaires induisant des déalkylations oxydatives, déaminations, sulfoxydations etc. Les mécanismes fondamentaux à la base de cette diversité de réaction ne sont pas encore complètement compris car ils mettent en jeu plusieurs phénomènes concomitants : la reconnaissance moléculaire des substrats, les mécanismes catalytiques d'activation de l'oxygène, mais également les étapes de transfert des électrons, via des partenaires redox, qui peuvent réorienter le devenir normal du cycle catalytique vers des cycles abortifs.

Nous revenons au cours de ce séminaire sur les connaissances actuelles, au niveau moléculaire, de la reconnaissance de substrats et des mécanismes d'activation de l'oxygène durant le cycle catalytique. Nous faisons notamment le point sur les motifs moléculaires permettant la reconnaissance floue des substrats. Nous analysons les méthodes capables de modifier, par ingénierie rationnelle ou par évolution dirigée, cette reconnaissance. Nous décrivons également les étapes de transfert des deux électrons nécessaires à l'activation de l'oxygène. Nous nous attachons notamment à mettre en lumière la versatilité des donneurs d'électrons, les aspects dynamiques associés aux différents transferts d'électrons, et comment cette modularité peut également être exploitée du point de vue biotechnologique.

Références : Urban P., Truan G., Pompon D., « High-throughput functional screening of steroid substrates with wild-type and chimeric P450 enzymes », *Biomed Res Int.*, 2014, 764102 ; Aigrain L., Pompon D., Moréra S., Truan G., « Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase », *EMBO Rep.*, 10(7), j2009, 742-7.

Baeyer-Villiger monoxygénases : de la complexité du mécanisme à la simplicité d'utilisation

Séminaire du 8 avril 2015 : Véronique Alphand, directrice de recherche CNRS, Institut des sciences moléculaires, Aix Marseille université

La biocatalyse (la synthèse de molécules à l'aide d'enzymes ou de microorganismes) se présente à la fois comme une alternative et comme un complément aux procédés chimiques classiques, permettant d'obtenir de façon éco-compatible des composés

provenant traditionnellement de la chimie du pétrole. Néanmoins, des innovations sont encore nécessaires pour vaincre les habitudes et rendre ces procédés plus compétitifs que les procédés chimiques établis de longue date.

Certaines familles d'enzymes, comme les lipases ou les laccases, sont de maniement très facile. Elles ont montré depuis longtemps leurs avantages et ont largement convaincu les milieux industriels. D'autres restent quasi inexploitées, sur les étagères des laboratoires. Bien qu'elles soient d'un intérêt synthétique évident, leur fragilité ou la complexité de leur mécanisme d'action restreignent souvent leur usage comme biocatalyseur à large échelle.

C'est une de ces familles que nous décrivons ici : les Baeyer-Villiger monoxygénases, des monoxygénases à flavine dépendantes de cofacteurs à nicotinamide capables d'oxyder des cétones aussi bien que des hétéroatomes. Nous discutons de leurs avantages sur les réactifs chimiques conventionnels. À travers l'exemple, entre autres, d'une augmentation d'échelle réussie, nous montrons ensuite comment contourner les contraintes liées à l'utilisation de ce type d'enzymes afin d'élaborer des procédés biocatalytiques efficaces et faciles à mettre en œuvre.

Références : Bornscheuer U.T., Huisman G.W., Kazlauskas R.J., Lutz S., Moore J.C., Robins K., 2012, « Engineering the third wave of biocatalysis », *Nature*, 485, 185-194 ; Turner N.J., O'Reilly E., 2013. Biocatalytic retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 285-288 ; Alphand V., Wohlgemuth R., 2010, « Applications of Baeyer-Villiger monoxygenases in organic synthesis », *Curr. Org. Chem.*, 14, 1928-1965 ; Leisch H., Morley K., Lau P.C.K., 2011, « Baeyer-Villiger monoxygenases: more than just green chemistry », *Chem. Rev.*, 111, 4165-4222 ; Hilker I., Gutiérrez M.C., Furstoss R., Ward J., Wohlgemuth R., Alphand V., 2008, « Preparative scale Baeyer-Villiger biooxidation at high concentration using recombinant *Escherichia coli* and in situ substrate feeding and product removal process », *Nat. Protoc.*, 3, 546-554.

Découverte de nouveaux biocatalyseurs par exploration systématique de la biodiversité

Séminaire du 15 avril 2015 : Véronique de Berardinis, chef du laboratoire de criblage des activités de bioconversions (LCAB), CEA/Institut de Génomique/Genoscope/UMR Génomique métabolique (Évry)

L'industrie (chimie fine, pharmaceutique, etc.) est amenée par des considérations économiques mais surtout écologiques à introduire une variété croissante de biocatalyseurs dans ses procédés de production. Cette prise en compte grandissante de l'impact environnemental des procédés de synthèse fait suite à la formulation des 12 principes de la « chimie verte », au cours des années 1990 aux États-Unis. L'introduction de méthodes biocatalytiques peut en effet avoir un effet positif qui concerne jusqu'à 9 des 12 principes et se place ainsi loin devant les autres pratiques mises en œuvre ou envisagées. Une demande s'est ainsi créée pour obtenir de nouveaux biocatalyseurs efficaces et robustes permettant d'étendre le catalogue des activités enzymatiques disponibles pour des applications. Les méthodes couramment utilisées s'appuient sur l'évolution d'enzymes, déjà connus ou utilisés, par biologie moléculaire. Cette stratégie est cependant très lourde à mettre en œuvre. L'exploration à grande échelle et systématique de la biodiversité enzymatique, assistée par des approches bio-informatiques qui permettent de réduire la complexité de l'échantillonnage, constitue une alternative efficace. Du fait des nouvelles technologies de séquençage, le nombre de protéines issues de génomes et

métagénomiques (consortium d'organismes) s'accroît de manière exponentielle et ces bases de données représentent un réservoir exceptionnel d'enzymes aux capacités biocatalytiques inexploitées.

PUBLICATIONS

2014

AUSSEL L., LOISEAU L., CHEHADE M.H., POCACHARD B., FONTECAVE M., PIERREL F. et BARRAS F., « UbiJ, a New Gene Required for Aerobic Growth and Proliferation in Macrophage, Is Involved in Coenzyme Q Biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium », *Journal of Bacteriology*, 196(1), janvier 2014, 70-79, DOI : 10.1128/JB.01065-13.

SIMMONS T.R., BERGGREN G., BACCHI M., FONTECAVE M. et ARTERO V., « Mimicking hydrogenases: from biomimetics to artificial enzymes », *Coordination Chemistry Reviews*, 270, juillet 2014, 127-150, DOI : 10.1016/j.ccr.2013.12.018.

BERGGREN G., GARCIA-SERRES R., BRAZZOLOTTO X., CLEMANCEY M., GAMBARELLI S., ATTA M., LATOUR J.-M., HERNANDEZ H.L., SUBRAMANIAN S., JOHNSON M.K. et FONTECAVE M., « An EPR/HYSCORE, Mössbauer, and resonance Raman study of the hydrogenase maturation enzyme HydF: a model for N-coordination to [4Fe-4S] clusters », *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, janvier 2014, 19(1), 75-84, DOI : 10.1007/s00775-013-1062-9.

BARRAS F., AUSSEL L., PIERREL F., LOISEAU L., LOMBARD M. et FONTECAVE M., « Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria », *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1837(7), juillet 2014, 1004-1011, DOI : 10.1016/j.bbabi.2014.01.015.

ELGRISHI N., CHAMBERS M.B., ARTERO V. et FONTECAVE M., « Terpyridine complexes of first row transition metals and electrochemical reduction of CO₂ to CO », *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(27), 2014, 13635-13644, DOI : 10.1039/c4cp00451e.

BOUVIER D., LABESSAN N., CLEMANCEY M., LATOUR J.-M., RAVANAT J.-L., FONTECAVE M. et ATTA M., « TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe-S cluster », *Nucleic Acids Research*, 42(12), 2014, 7960-7970, DOI : 10.1093/nar/gku508.

ESTELLON J., OLLAGNIER DE CHOUDENS S.O., SMADJA M., FONTECAVE M. et VANDENBROUCK Y., « An integrative computational model for large-scale identification of metalloproteins in microbial genomes: a focus on iron-sulfur cluster proteins », *Metallomics*, 2014, 6(10), 1913-1930, DOI : 10.1039/c4mt00156g.

BACCHI M., BERGGREN G., NIKLAS J., VEINBERG E., MARA M.W., SHELBY M.L., POLUEKTOV O.G., CHEN L.X., TIEDE D.M., CAVAZZA C., FIELD M.J., FONTECAVE M. et ARTERO V., « Cobaloxime-Based Artificial Hydrogenases », *Inorganic Chemistry*, 53(15), 4 août 2014, 8071-8082, DOI : 10.1021/ic501014c.

BHATTACHARJEE A., CHAVAROT-KERLIDOU M., DEMPSEY J.L., GRAY H.B., FUJITA E., MUCKERMAN J.T., FONTECAVE M., ARTERO V., ARANTES G.M. et FIELD M.J., « Theoretical Modeling of Low-Energy Electronic Absorption Bands in Reduced Cobaloximes », *Chemphyschem*, 15(14), 6 octobre 2014, 2951-2958, DOI : 10.1002/cphc.201402398.

TRAN P.D., FONTECAVE M. et ARTERO V., « Electrode Materials and Artificial Photosynthetic Systems », dans WEIGAND W. et SCHOLLHAMMER P. (éd.), *Bioinspired Catalysis: Metal-Sulfur Complexes*, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014, 383-410, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527664160.ch14/summary>.

BLANC B., CLEMANCEY M., LATOUR J.-M., FONTECAVE M. et OLLAGNIER DE CHOUDENS S., « Molecular Investigation of Iron Sulfur Cluster Assembly Scaffolds under Stress », *Biochemistry*, 23 décembre 2014, 53(50), 7867-7869, DOI : 10.1021/bi5012496.

2015

CHAMBERS M.B., WANG X., ELGRISHI N., HENDON C.H., WALSH A., BONNEFOY J., CANIVET J., QUADRELLI E.A., FARRUSSENG D., MELLOTT-DRAZNIKS C. et FONTECAVE M., « Photocatalytic Carbon Dioxide Reduction with Rhodium-based Catalysts in Solution and Heterogenized within Metal-Organic Frameworks », *ChemSusChem*, février 2015, 8(4), 603-608, DOI : 10.1002/cssc.201403345.

ADAMSKA-VENKATESH A., SIMMONS T.R., SIEBEL J.F., ARTERO V., FONTECAVE M., REIJERSE E. et LUBITZ W., « Artificially matured [FeFe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*: a HYSCORE and ENDOR study of a non-natural H-cluster », *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(7), 2015, 5421-5430, DOI : 10.1039/c4cp05426a.

CASERTA G., ROY S., ATTA M., ARTERO V. et FONTECAVE M., « Artificial hydrogenases: biohybrid and supramolecular systems for catalytic hydrogen production or uptake », *Current Opinion in Chemical Biology*, 25, avril 2015, 36-47, DOI : 10.1016/j.cbpa.2014.12.018.

TRAN P.D., MOROZAN A., ARCHAMBAULT S., HEIDKAMP J., CHENEVIER P., DAU H., FONTECAVE M., MARTINENT A., JOUSSELME B. et ARTERO V., « A noble metal-free proton-exchange membrane fuel cell based on bio-inspired molecular catalysts », *Chemical Science*, 2015, 6(3), 2050-2053, DOI : 10.1039/c4sc03774j.

ELGRISHI N., CHAMBERS M.B. et FONTECAVE M., « Turning it off! Disfavouring hydrogen evolution to enhance selectivity for CO production during homogeneous CO₂ reduction by cobalt-terpyridine complexes », *Chemical Science*, 6(4), 16 mars 2015, 2522-2531, DOI : 10.1039/C4SC03766A.

HUAN T.N., ANDREIADIS E.S., HEIDKAMP J., SIMON P., DERAT E., COBO S., ROYAL G., BERGMANN A., STRASSER P., DAU H., ARTERO V. et FONTECAVE M., « From molecular copper complexes to composite electrocatalytic materials for selective reduction of CO₂ to formic acid », *Journal of Materials Chemistry A*, 3(7), 2015, 3901-3907, DOI : 10.1039/c4ta07022d.

ELGRISHI N., GRIVEAU S., CHAMBERS M.B., BEDIQUI F. et FONTECAVE M., « Versatile functionalization of carbon electrodes with a polypyridine ligand: metallation and electrocatalytic H⁺ and CO₂ reduction », *Chemical Communications*, 51(14), 2015, 2995-2998, DOI : 10.1039/c4cc10027a.

GOMEZ-MINGOT M., PORCHER J.-P., TODOROVA T.K., FOGERON T., MELLOTT-DRAZNIKS C., XU-LI Y. et FONTECAVE M., « Bioinspired Tungsten Dithiolene Catalysts for Hydrogen Evolution: A Combined Electrochemical, Photochemical, and Computational Study », *Journal of Physical Chemistry B*, 29 octobre 2015, 119(43), 13524-13533, DOI : 10.1021/acs.jpcc.5b01615.

FONTECAVE M., « Sustainable Chemistry for Energizing the Planet », *Angewandte Chemie-International Edition*, 54(24), 8 juin 2015, 6946-6947, DOI : 10.1002/anie.201502134.

KAEFFER N., QUEYRIAUX N., CHAVAROT-KERLIDOU M., FONTECAVE M. et ARTERO V., « Les carburants solaires : photosynthèse artificielle et procédés électrochimiques », *L'actualité chimique*, 397-398, juillet 2015, 63-68.

GIRARDI M., BLANCHARD S., GRIVEAU S., SIMON P., FONTECAVE M., BEDIQUI F. et PROUST A., « Electro-Assisted Reduction of CO₂ to CO and Formaldehyde by (TOA)₆[α -SiW₁₁O₃₉Co()] Polyoxyometalate », *European Journal of Inorganic Chemistry*, 22, août 2015, 3642-3648, DOI : 10.1002/ejic.201500389.

ISMAIL A., LEROUX V., SMAJA M., GONZALEZ L., LOMBARD M., PIERREL F., MELLOTT-DRAZNIKS C. et FONTECAVE M., « Coenzyme Q biosynthesis: Evidence for a substrate access channel in the FAD-dependent monooxygenase Coq6 », soumis pour publication à *PLOS Computational Biology*, 2015.

HAMDANE D., BOU-NADER C., CORNU D., HUI-BON-HOA G. et FONTECAVE M., « Flavin-Protein Complexes: Aromatic Stacking Assisted by a Hydrogen Bond », *Biochemistry*, 54(28), 21 juillet 2015, 4354-4364, DOI : 10.1021/acs.biochem.5b00501.

ADAMSKA-VENKATESH A., ROY S., SIEBEL J.F., SIMMONS T.R., FONTECAVE M., ARTERO V., REIJERSE E. et LUBITZ W., « Spectroscopic Characterization of the Bridging Amine in the Active Site of [FeFe] Hydrogenase Using Isotopologues of the H-Cluster », *Journal of the American Chemical Society*, 137(40), 14 octobre 2015, 12744-12747, DOI : 10.1021/jacs.5b06240.

PORCHER J.-P., FOGERON T., GOMEZ-MINGOT M., DERAT E., CHAMOREAU L.-M., LI Y. et FONTECAVE M., « A Bioinspired Molybdenum Complex as a Catalyst for the Photo- and Electroreduction of Protons », *Angewandte Chemie International Edition*, 54(47), 16 novembre 2015, 14090-14093, DOI : 10.1002/anie.201505607.

ARTERO V., BERGGREN G., ATTA M., CASERTA G., ROY S., PECQUEUR L. et FONTECAVE M., « From Enzyme Maturation to Synthetic Chemistry: The Case of Hydrogenases », *Accounts of Chemical Research*, 48(8), août 2015, 2380-2387, DOI : 10.1021/acs.accounts.5b00157.

OZEIR M., PELOSI L., ISMAIL A., MELLOTT-DRAZNIIEKS C., FONTECAVE M. et PIERREL F., « Coq6 is Responsible for the C4-Deamination Reaction in Coenzyme Q Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* », soumis pour publication à *The Journal of Biological Chemistry*, 2015.

Collaborateurs

Murielle Lombard

DUCASSOU L., JONASSON G., DHERS L., PIETRANCOSTA N., RAMASSAMY B., XU-LI Y., LORIOT M.-A., BEAUNE P., BERTHO G., LOMBARD M., MANSUY D., ANDRÉ F. et BOUCHER J.-L., « Expression in yeast, new substrates, and construction of a first 3D model of human orphan cytochrome P450 2U1: Interpretation of substrate hydroxylation regioselectivity from docking studies », *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1850(7), juillet 2015, 1426-1437, DOI : 10.1016/j.bbagen.2015.03.014.

Caroline Mellot-Draznieks

MELLOTT-DRAZNIIEKS C., « Computational exploration of metal-organic frameworks: examples of advances in crystal structure predictions and electronic structure tuning », *Molecular Simulation*, 2 novembre 2015, 41(16-17), 1422-1437, DOI : 10.1080/08927022.2015.1048511.

MELLOTT-DRAZNIIEKS C. et KERKENI B., « Exploring the interplay between ligand and topology in zeolitic imidazolate frameworks with computational chemistry », *Molecular Simulation*, 2 janvier 2014, 40(1-3), 25-32, DOI : 10.1080/08927022.2013.845298.

WHARMBY M.T., HENKE S., BENNETT T.D., BAIPE S.R., SCHWEDLER I., THOMPSON S.P., GOZZO F., SIMONCIC P., MELLOTT-DRAZNIIEKS C., TAO H., YUE Y. et CHEETHAM A.K., « Extreme flexibility in a zeolitic imidazolate framework: porous to dense phase transition in desolvated ZIF-4 », *Angewandte Chemie-International Edition*, 54(22), 26 mai 2015, 6447-6451, DOI : 10.1002/anie.201410167.

BAXTER E.F., BENNETT T.D., MELLOTT-DRAZNIIEKS C., GERVAIS C., BLANC F. et CHEETHAM A.K., « Combined experimental and computational NMR study of crystalline and amorphous zeolitic imidazolate frameworks », *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 17(38), 14 octobre 2015, 25191-25196, DOI : 10.1039/c5cp02552d.

Chapitre de livre

CAROLINE MELLOTT-DRAZNIKS, BEN SLATER et RAIMONDAS GALVELIS, « Computational approaches to the design, crystal structure prediction, and structure-property relationships of metal-organic frameworks », dans *Metal-Organic Frameworks*, Pan Stanford, 2015, 1-52, <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b18039-2>.

Béatrice Golinelli-Pimpaneau et Djemel Hamdane

HAMDANE D., GUELORGET A., GUERINEAU V. et GOLINELLI-PIMPANEAU B., « Dynamics of RNA modification by a multi-site-specific tRNA methyltransferase », *Nucleic Acids Research*, 42(18), 13 octobre 2014, 11697-11706, DOI : 10.1093/nar/gku820.

GUIMARAES B.G., HAMDANE D., LECHAUVE C., MARDEN M.C. et GOLINELLI-PIMPANEAU B., « The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity », *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 70, avril 2014, 1005-1014, DOI : 10.1107/S1399004714000078.

CONFÉRENCES

2014

Comité local d'action sociale, Collège de France, Paris (28 janvier 2014) : « La science aux interfaces : chimie et biologie ».

Conférences « Sciences à cœur », université Pierre et Marie Curie, Paris, France (27 mars 2014) : « Chimie bioinspirée : le vivant au service des nouvelles technologies de l'énergie ».

Symposium « Dynamics and Intermediates of Molecular Transformations », Venise, Italie (30 mars-4 avril 2014) : « tRNA modification : new enzyme mechanisms ».

Journées d'étude « Modélisation, construction et imitation des processus vitaux. Approche pluridisciplinaire du biomimétisme », Collège de France, Paris (10 au 11 juin 2014) : « Chimie bioinspirée : le vivant au service des nouvelles technologies de l'énergie ».

Gordon Research Conferences on Iron Sulfur Enzymes, Stonehill College (Easton, MA), États-Unis (15 au 20 juin 2014) : « When chemistry helps biology and vice versa: the case of hydrogenases ».

Forum du Savoir, Rouen, France (26 juin 2014) : « Chimie et Énergie : des carburants à partir de l'eau et du soleil ».

Theo Murphy International Scientific Meeting « Do we need a global project on artificial photosynthesis (solar fuels and chemicals)? » The Royal Society at Chicheley Hall, Angleterre (8-10 juillet 2014) : « Towards artificial photosynthesis: catalytic reduction of CO₂ ».

Solvay, Centre de recherches et innovations de Lyon (15 juillet 2014) : « Hydrogénases et catalyseurs bioinspirés : vers la photosynthèse artificielle ».

International Symposium « Catalytic Systems for Chemical Energy Conversion », *Max Planck Institute for Chemical Energy Conversion*, Mülheim / Ruhr, Allemagne (23-25 juillet 2014) : « (Photo)electrochemical reduction of CO₂ and catalysts ».

Gordon Research Conference on Photosynthesis, West Dover, VT, États-Unis (10 au 15 août 2014) : « Artificial photosynthesis: bioinspired catalysts and artificial enzymes ».

EUROBIC 12, Zurich, Suisse (25 au 28 août 2014) : « Towards artificial photosynthesis: catalytic reduction of CO₂ ».

Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Suède (16 septembre 2014) : « tRNA Modification: New Enzyme Mechanisms ».

Arrhenius laboratory, Université de Stockholm, Suède (17 septembre 2014) : « Natural and Artificial Hydrogenases for Hydrogen Production ».

Ångström Laboratory, université d'Uppsala, Suède (18 septembre 2014) : « Towards Artificial Photosynthesis: Catalysts for (Photo)electrochemical Reduction of CO₂ ».

International Forum on CO₂ chemistry and biochemistry, troisième édition, Lyon, France (25 au 26 septembre 2014) : « Artificial photosynthesis : (photo)catalysts for CO₂ reduction ».

Colloque de rentrée du Collège de France, Paris (16 au 17 octobre 2014) : « Charles Moureu : du Collège de France aux gaz de combat ».

4th International Symposium for Solar Fuels and Solar Cells (4th SFSC), Dalian, Chine (21 au 24 octobre 2014) : « (Photo)electrochemical reduction of CO₂: from molecular complexes to heterogeneous catalysts ».

Journées professionnelles de l'École technique supérieure de chimie de l'Ouest, Angers (12 novembre 2014) : « Chimie et énergie : des carburants à partir de l'eau et du soleil ».

2015

Gordon Research Conference on Metals in Biology, Ventura, États-Unis : (25 au 30 janvier 2015) : « Artificial hydrogenases: a new class of H₂-evolving catalysts ».

Workshop Nanomaterials for Energy and Environment, CEA Saclay (18 au 20 mars 2015) : « (Photo)electrochemical reduction of CO₂: from molecular complexes to heterogeneous catalysts ».

Third International Symposium on Green Chemistry, La Rochelle (3-7 mai 2015) : « Catalysis from bioinspired chemistry to artificial photosynthesis »

Académie des sciences, Zagreb, Croatie (26 mai 2015) : « Chemistry and Energy Issues: Fuels from water, carbon dioxide and sun », Institut Rudjer Boskovic, Zagreb, Croatie (27 mai 2015) : « Catalysis for Energy : enzymes, artificial enzymes and bioinspired catalysts ».

Conférence « Défis du XIX^e siècle », Académie des sciences, Paris (16 juin 2015) : « Du CO₂ aux carburants, un renversement salutaire ».

15^e congrès de la société chimique française, SCF15, Lille, France (6 au 9 juillet 2015) : « Catalysis for Energy : enzymes, artificial enzymes and bioinspired catalysts ».

Symposium of our International Research Training Group (IRTG) *Metal Sites in Biomolecules: Structures, Regulation and Mechanisms (BioMetals)*, université de Göttingen, Allemagne (27-28 août 2015) : « Towards artificial photosynthesis: catalysts for (photo) electrochemical reduction of CO₂ ».

Air liquide, centre de Saclay (1^{er} septembre 2015) : « Catalyseurs pour le stockage chimique de l'énergie : enzymes, enzymes artificielles, catalyseurs bioinspirés ».

Challenges in Chemical Renewable Energy (ISACS17), Rio de Janeiro, Brésil (8-11 septembre 2015) : « New homogeneous and heterogeneous catalysts for (photo)electro-reduction of protons and carbon dioxide ».

Sixth International IMBG meeting, Villard de Lans, France (14 au 18 septembre 2015) : « Synthetic maturation of natural and artificial [FeFe]-hydrogenases: opportunities ».

Collaborateurs

Caroline Mellot-Draznieks

15^e congrès de la Société chimique française, SFC2015, Lille (7-9 juillet 2015) : « Photocatalytic reduction of CO₂ in Metal-Organic Frameworks: towards the control of optical response and framework incorporation of molecular catalysts ».

Cecam Workshop on Flexibility and disorder in Metal-Organic Frameworks, Paris, (3-5 juin 2015) : « Metal Organic Frameworks as platforms for the photocatalytical reduction of CO₂ Simulation versus experiment ».

Rencontres Scientifiques de L'IFPEN, NEXTLAB 2014, Rueil-Malmaison (2-4 avril 2014) : « In silico approaches in Metal organic Frameworks: Crystal structure prediction and computational design of structure-property relationships. ».

École normale supérieure, département de Chimie, Paris (22 mai 2015) : « Metal Organic Frameworks as platforms for the photocatalytical reduction of CO₂ »

Université de Cambridge, Department of Materials Science and Metallurgy, Cambridge, Royaume-Uni (4 Juillet 2014) : « Functionalizing Metal Organic Frameworks for the photocatalytical reduction of CO₂: Combining simulation and experiments ».

Journée de lancement PSL-Chimie, Paris (11 septembre 2014) : « Réduction photocatalytique du CO₂ par fonctionnalisation de solides à charpente hybride : Récents développements et perspectives ».

Béatrice Golinelli-Pimpaneau

Colloque du Collège de France « L'analyse chimique : histoire et innovations » Paris (26-27 juin 2014) : « L'analyse structurale pour comprendre la réactivité chimique d'enzymes. »

RECHERCHE

Travaux réalisés par l'équipe Biocatalyse (Grenoble) dirigée par M. Fontecave

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, dirigé par Stéphane Ménage) localisé sur le Centre du CEA à Grenoble. Elle est constituée actuellement de 6 chercheurs et enseignant-chercheurs permanents (chercheur CEA : M. Atta ; 2 enseignant-chercheurs : M. Fontecave, C. Gerez ; chercheurs CNRS : S. Ollagnier de Choudens, F. Pierrel, J. Willison). À partir du 1er janvier 2016, M. Fontecave ne fera plus partie de cette équipe dont la direction sera assurée par S. Ollagnier de Choudens.

A) Protéines fer-soufre : fonctions et maturation (M. Fontecave, M. Atta, S. Ollagnier de Choudens, C. Gerez)

A.1. Enzymologie structurale et mécanistique des enzymes fer-soufre

Nous nous intéressons aux enzymes fer-soufre impliquées dans des modifications complexes et sélectives de macromolécules biologiques¹. La caractérisation de ces systèmes est à la fois structurale et fonctionnelle et permet de mettre au jour des mécanismes enzymatiques originaux. Il s'agit par exemple de l'enzyme TtcA, qui catalyse une réaction de sulfuration d'ARNs de transfert².

1. J. Estellon, S. Ollagnier de Choudens, M. Smadja, M. Fontecave, Y. Vandenbrouck, *Metalomics*, 6, 2014, 1913-1930.

2. D. Bouvier, N. Labessan, M. Clemancey, J.-M. Latour, J.-L. Ravanat, M. Fontecave, M. Atta, *Nucleic Acid Res.*, 42, 2014, 7960-70.

Une autre protéine fer-soufre à l'étude est HydF qui participe à la maturation des hydrogénases. Ce travail a conduit à des caractérisations spectroscopiques originales de la coordination de ligands azotés, comme l'histidine, au centre fer-soufre³.

A.2. Assemblage des centres fer-soufre

Les cellules disposent de machineries protéiques complexes pour la biosynthèse et l'assemblage des centres métalliques au sein de sites actifs d'enzymes. Certaines pathologies sont liées à des déficiences dans ces systèmes essentiels. L'étude de ces complexes protéiques et de leurs mécanismes d'action constituent un sujet prioritaire de l'équipe depuis plusieurs années.

Nous nous intéressons en particulier aux deux machineries protéiques de biosynthèse des clusters fer-soufre chez *E. coli* : ISC et SUF. Nous avons pu montrer, par des études biochimiques, que le second est beaucoup plus stable en conditions de stress (stress oxydant, carence en fer,...), en accord avec l'hypothèse du rôle de SUF dans des cellules sous stress pour assurer la maturation des protéines fer-soufre⁴.

B) Nouveaux (photo)électrocatalyseurs pour la production et l'oxydation de l'hydrogène (collaboration avec V. Artero, M. Chavarot-Kerlidou)

Le développement de « l'économie à hydrogène » nécessite en particulier la mise au point de nouveaux catalyseurs pour la production d'hydrogène par réduction de l'eau (électrolyse) et pour l'oxydation de l'hydrogène en eau (pile à combustible). En effet, le platine actuellement utilisé est coûteux et peu abondant. Les organismes vivants qui mettent en œuvre cette chimie utilisent des biocatalyseurs remarquablement efficaces, les hydrogénases, des métallo-enzymes à base de fer et de nickel. Le projet de recherche que nous développons depuis de nombreuses années consiste à inventer de nouveaux catalyseurs en nous inspirant des sites actifs de ces enzymes, à en évaluer les propriétés catalytiques pour l'électro-réduction des protons et à les utiliser dans des dispositifs pour des applications pratiques (nouvelles électrodes modifiées, nouvelles piles⁵). La logique de cette approche bioinspirée a été récemment expliquée dans une série d'articles⁶.

Plus récemment, nous avons démarré un projet consistant à mettre au point des hydrogénases artificielles⁷. Il s'agit ici de créer un système hybride qui est constitué d'une protéine et d'un catalyseur biomimétique de synthèse. Une première réalisation

3. G. Berggren, R. Garcia, X. Brazzolotto, M. Clemancey, S. Gambarelli, M. Atta, J.-M. Latour, H.-L. Hernández, S. Subramanian, M.K. Johnson, M. Fontecave, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 19, 2014, 75-84.

4. B. Blanc, M. Clemancey, J.-M. Latour, M. Fontecave, S. Ollagnier de Choudens, *Biochemistry*, 53, 2014, 7867-7869.

5. P.D. Tran, A. Morozan, S. Archambault, J. Heidkamp, P. Chenevier, H. Dau, M. Fontecave, A. Martinent, B. Jousselme, V. Artero, *Chem. Sci.*, 6, 2015, 2050-2053.

6. T.R. Simmons, G. Berggren, M. Bacchi, M. Fontecave, V. Artero, *Coord. Chem. Rev.*, 2014, 270-271, 127-150 ; P.D. Tran, M. Fontecave, V. Artero in Wolfgang Weigand et Philippe Schollhammer (éd.), *Bioinspired Catalysis: Metal-Sulfur Complexes*, 2015, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 385-410 ; N. Kaeffer, N. Queyriaux, M. Chavarot-Kerlidou, M. Fontecave, V. Artero, *L'Actualité chimique*, 397-398, 2015, 63-68.

7. G. Caserta, S. Roy, M. Atta, V. Artero, M. Fontecave, *Curr. Op. Chem. Biol.*, 25, 2015, 36-47.

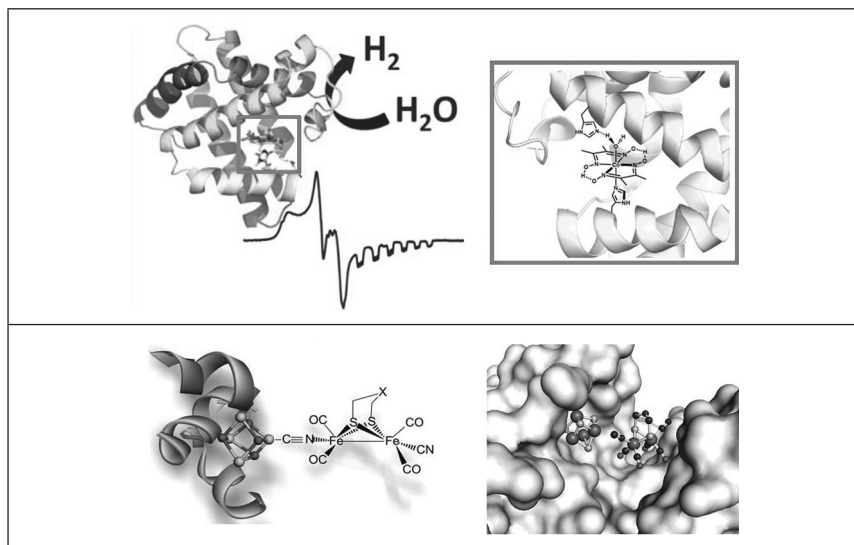


Figure 1 : Hydrogénases artificielles. En haut, l'assemblage myoglobine-cobaloxime. En bas le complexe entre une protéine fer-soufre (HydF) et un composé organométallique, mimant le site actif des hydrogénases à fer naturelles.

(figure 1) a consisté en la préparation d'un tel système, en combinant la myoglobine et une cobaloxime, la cobaloxime prenant la place de l'hème dans le site actif. Cet hybride est capable de catalyser la réduction et la photoréduction des protons en hydrogène, se comportant ainsi comme une hydrogénase⁸.

Nous avons construit d'autres systèmes protéiques hybrides en utilisant des complexes biomimétiques des hydrogénases à fer, c'est-à-dire des complexes organométalliques binucléaires de fer. De tels complexes ont pu être insérés dans la cavité protéique de la protéine HydF (figure 1). Des résultats préliminaires montrent que cette protéine hybride se comporte bien comme une hydrogénase et constitue une plate-forme idéale pour étudier l'effet de l'environnement protéique sur l'activité du site actif métallique⁹.

Ces complexes de synthèse peuvent être également incorporés dans le site actif des apo-hydrogénases elles-mêmes, conduisant à une activation de l'enzyme. Ceci constitue une méthodologie particulièrement pratique pour créer de nouvelles hydrogénases ou pour marquer sélectivement certains des atomes du site actif avec des isotopes adaptés à des études spectroscopiques ou structurales originales¹⁰.

8. M. Bacchi, G. Berggren, J. Niklas, E. Veinberg, M.W. Mara, M.L. Shelby, O.G. Poluektov, L.X. Chen, D.M. Tiede, C. Cavazza, M.J. Field, M. Fontecave, V. Artero, *Inorg. Chem.*, 53, 2014, 8071-8082.

9. V. Artero, G. Berggren, M. Atta, G. Caserta, S. Roy, L. Pecqueur, M. Fontecave, *Accounts Chem Res.*, 2015 (sous presse).

10. A. Adamska-Venkatesh, T.R. Simmons, J. Siebel, V. Artero, M. Fontecave, E. Reijerse, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 2015, 5421-5430 ; A. Adamska-Venkatesh, S. Roy, J.F. Siebel, T.R. Simmons, M. Fontecave, V. Artero, E. Reijerse, W.L. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015 (sous presse).

Travaux réalisés par le laboratoire de chimie des processus biologiques (Collège de France) dirigé par M. Fontecave

Le laboratoire, est devenu à partir du 1^{er} janvier 2014 l'UMR 8229, sous les tutelles conjointes du Collège de France, du CNRS et de l'université P. et M. Curie. Il est constitué actuellement de 11 membres permanents (1 enseignant-chercheur : M. Fontecave ; 4 chercheurs CNRS : C. Mellot-Drazniek, B. Golinelli, M. Lombard, D. Hamdane ; 2 ingénieurs de recherche CNRS : Y. Xu-Li, P. Simon ; 1 ingénieur de recherches Collège de France : L. Pecqueur, 1 ingénieur d'études Collège de France : B. Faivre ; 1 administratif : M-P. Maisonnaive ; 1 technicien : J. Tondeleir).

Étudiants en thèse : N. Elgrishi, J.P. Porcher, A. Ismail, L. Gonzales, G. Caserta, P. Hardouin, X. Wang.

Postdocs : M. Chambers, M. Gomes-Mingot.

Stagiaires : T. Fogeron, G. Paille, O. Bimai.

A) Étude des enzymes de modification des ARN (D. Hamdane, B. Golinelli, M. Fontecave, L. Pecqueur)

Il s'agit de comprendre, à travers des études mécanistiques et la détermination de structures tridimensionnelles enzyme-substrat(ARNt), comment ces enzymes procèdent pour des transformations chimiques parfois fascinantes et accèdent à une très grande sélectivité. Par ailleurs, certaines de ces modifications jouent des rôles physiologiques importants et ces projets ont des implications dans le domaine de la santé. Par exemple, nous étudions une nouvelle classe d'enzymes de méthylation d'ARNt utilisant le méthylène-tétrahydrofolate comme donneur de méthylène et la flavine (FAD) comme agent réducteur. Des études mécanistiques très récentes du laboratoire sur l'enzyme TrmFO ont démontré une utilisation très originale, jamais observée auparavant, de la flavine dans le transfert de méthyle. Cette enzyme sert également pour étudier des aspects structuraux très généraux et très fondamentaux de la fixation et la réactivité des cofacteurs flaviniques¹¹.

B) Étude des enzymes de la biosynthèse de l'ubiquinone (M. Lombard, D. Hamdane, C. Mellot-Drazniek, M. Smadja, A. Ismael, L. Gonzales, L. Pecqueur)

L'étude de l'enzymologie de la biosynthèse de l'ubiquinone ou coenzyme Q, à partir du modèle bactérien *Escherichia coli* et d'un modèle eucaryote, la levure, s'appuie sur une collaboration avec F. Barras (CNRS Marseille), microbiologiste, spécialiste de la génétique d'*E. coli*, et F. Pierrel, CR CNRS à Grenoble, qui développe des approches génétiques sur le modèle levure. Ceci est pertinent car il y a une très grande conservation de la biosynthèse du coenzyme Q (notamment entre la levure et l'homme, et en partie avec *E. coli*). De façon étonnante, on sait encore très peu de choses sur cette voie de biosynthèse, que ce soit chez les bactéries ou chez les eucaryotes, notamment en ce qui concerne les enzymes impliquées dans les différentes étapes de la biosynthèse : réactions d'hydroxylation aromatique, de méthylation, de décarboxylation et de désamination sur le même noyau aromatique

11. D. Hamdane, C. Bou-Nader, D. Cornu, G. Hui-Bon-Hoa, M. Fontecave, *Biochemistry*, 2015 (sous presse).

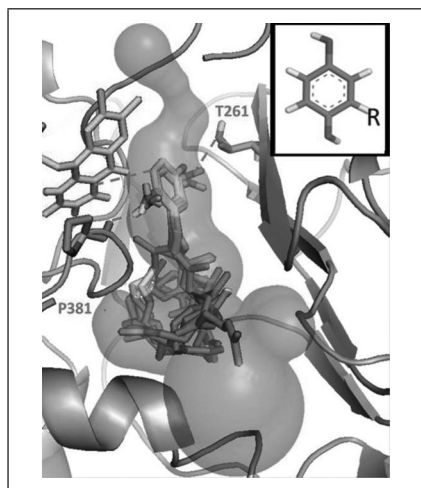


Figure 2 : Site de fixation du substrat de Coq6. Une cavité est adaptée à la fixation de la chaîne polyisoprénoïde et met le noyau aromatique à proximité du cofacteur flavinique pour l'hydroxylation.

du 4-hydroxybenzoate (4-HB) ou du 4-aminobenzoate, les précurseurs. Un article récent fait le point sur cette voie biosynthétique¹².

Les résultats les plus récents concernent tout d'abord la découverte et l'étude d'un nouveau gène important (appelé « UbiJ ») pour la biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli*. La fonction de la protéine correspondante est encore inconnue mais son domaine C-terminal présentant une homologie avec LpxD, une N acyltransférase impliquée dans la biosynthèse du lipide A, elle pourrait être impliquée dans la liaison avec des intermédiaires lipidiques de la biosynthèse. Par ailleurs, il apparaît qu'UbiJ joue un rôle important dans la pathogénicité de bactéries comme *Salmonella*¹³. Ceci ouvre des perspectives nouvelles dans le domaine de la recherche de nouveaux antibiotiques puisque, par exemple, UbiJ, une cible potentielle, est absente chez l'homme. Plus généralement, nous avons démontré, pour la première fois, un lien entre pathogénicité bactérienne et biosynthèse de l'ubiquinone.

Nous nous sommes récemment intéressés à Coq6, l'homologue fonctionnel de UbiI chez la levure *S. cerevisiae*. UbiI, dont nous avons résolu la structure tridimensionnelle et identifié la fonction (voir annuaires précédents) et Coq6 sont des monoxygénases à flavine qui participent à l'hydroxylation en C5 du noyau aromatique. Nous avons pu montrer que le cofacteur FAD de cette enzyme ne reçoit pas ses électrons directement du NADPH mais d'une chaîne de transfert d'électrons composée d'une NADPH : ferrédoxine réductase (Arh1p) et d'une ferrédoxine (Yah1) (résultats non publiés). Nous avons également obtenu des cristaux de Coq6 possédant un tag MBP à l'extrémité N-terminale (résolution 5 Å), et nous essayons actuellement d'avoir des cristaux de meilleure qualité afin de résoudre la structure de Coq6. En absence de structure, l'élaboration d'un modèle moléculaire (figure 2)

12. F. Barras, L. Aussel, F. Pierrel, L. Loiseau, M. Lombard, M. Fontecave, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics*, 1837, 2014, 1004-1011.

13. L. Aussel, L. Loiseau, M.H. Chehade, B. Pocachard, M. Fontecave, F. Pierrel, F. Barras, *J. Bacteriol.*, 196, 2014, 70-79.

a permis d'identifier les sites de fixation et le canal d'entrée du substrat¹⁴. Enfin, nous avons découvert que Coq6 est responsable d'une seconde réaction enzymatique, la désamination du noyau aromatique quand l'ubiquinone dérive du second précurseur naturel, l'acide para-amino benzoïque¹⁵.

Nous avons également résolu la structure d'UbiX d'*E. coli*, l'une des deux enzymes impliquées dans une réaction de décarboxylation aromatique de la voie de biosynthèse de CoQ et pour laquelle le mécanisme catalytique est encore inconnu à ce jour (résultats non publiés).

C) Photosynthèse artificielle : étude de catalyseurs moléculaires et matériaux catalytiques pour la décomposition de l'eau et la réduction du CO₂ (Y. Xu-Li, P. Simon, N. Elgrishi, J.P. Porcher, M. Chambers, T. Fogeron, M. Gomez-Mingot)

Le projet porte sur la mise au point de systèmes de stockage des énergies renouvelables (énergie solaire en particulier). Cela passe par le développement de catalyseurs moléculaires ou solides pour la réduction de l'eau ou du CO₂ et de dispositifs de photosynthèse artificielle¹⁶. Plusieurs directions sont mises en œuvre.

Nous étudions tout d'abord, à l'aide de méthodes électrochimiques et photochimiques ainsi que par des approches théoriques (calculs DFT), les propriétés catalytiques de complexes moléculaires bioinspirés originaux pour l'électroréduction et la photoréduction des protons et du CO₂. Il s'agit plus particulièrement de complexes dithiolènes du molybdène et du tungstène (figure 3), qui miment le site actif des formiate-déshydrogénases¹⁷.

Nous étudions également des complexes de cobalt et de nickel, plus simples, utilisant des ligands polypyridiniques. Dans le cas du ligand terpyridine (figure 3), on obtient des complexes qui possèdent des activités catalytiques intéressantes pour l'électroréduction du CO₂. Le complexe de nickel est très sélectif pour la production de CO. À l'inverse, des mélanges CO et H₂ sont obtenus avec le complexe de cobalt. Ce comportement est intéressant car il offre la possibilité d'étudier les paramètres qui contrôlent le rapport CO:H₂, une question centrale pour la réduction du CO₂. Plus spécifiquement, nous avons montré que ce contrôle pouvait être assuré par le potentiel appliqué pendant l'électrolyse¹⁸ ou par des modifications électroniques et stériques du ligand terpyridine¹⁹.

14. A. Ismail, V. Leroux, M. Smaja, L. Gonzalez, M. Lombard, F. Pierrel, C. Mellot-Draznieks, M. Fontecave, *PLOS Computational Biology*, 2015 (soumis).

15. M. Ozeir, L. Pelosi, A. Ismail, C. Mellot-Draznieks, M. Fontecave, F. Pierrel, *J. Biol. Chem.*, 2015 (soumis).

16. M. Fontecave, *Angew. Chem. Int Ed.*, 54, 2015, 6946-6947 ; N. Kaeffler, N. Queyriaux, M. Chavarot-Kerlidou, M. Fontecave, V. Artero, *L'Actualité chimique*, 397-398, 2015, 63-68.

17. M. Gomez-Mingot, J.-P. Porcher, T.K. Todorova, T. Fogeron, C. Mellot-Draznieks, Y. Xu-Li, M. Fontecave, *J. Phys. Chem. B* (sous presse) ; J.-P. Porcher, T. Fogeron, M. Gomez-Mingot, E. Derat, L.-M. Chamoreau, Y. Li, M. Fontecave, *Angewandte Chemistry*, 2015 (soumis).

18. N. Elgrishi, M.B. Chambers, V. Artero, M. Fontecave, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, 2014, 13635-44.

19. N. Elgrishi, M.B. Chambers, M. Fontecave, *Chem. Sci.*, 6, 2015, 2522-2531.

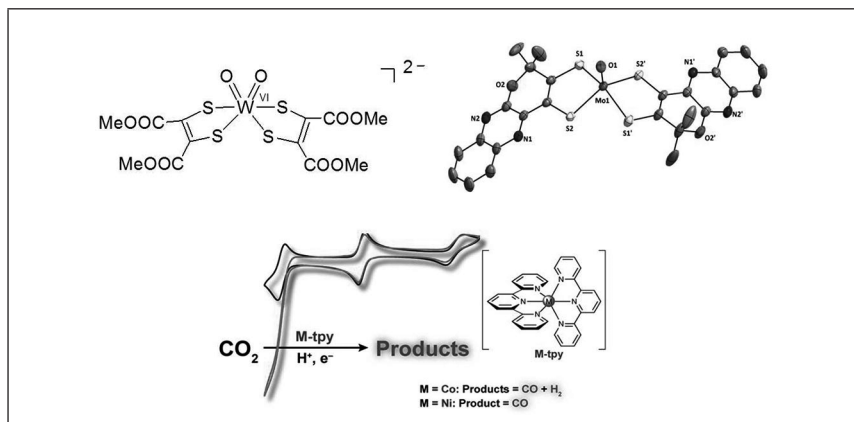


Figure 3 : Catalyseurs bioinspirés ($M = W, Mo$, en haut) pour la réduction des protons en hydrogène et catalyseurs terpyridiniques ($M = Ni, Co$, en bas) pour l'électroréduction du CO_2 en CO .

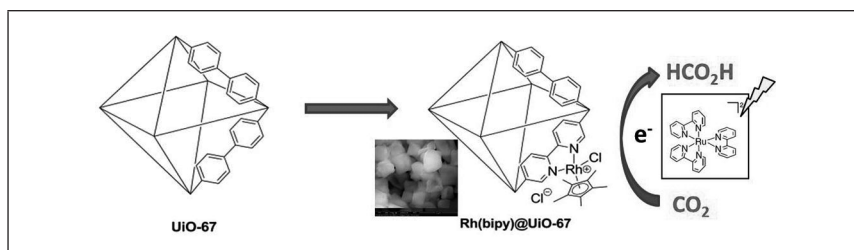


Figure 4 : Fixation d'un complexe moléculaire à base de Rh dans un MOF (UiO-67) produisant un catalyseur solide pour la photoréduction du CO_2 .

La question de l'hétérogénéisation des catalyseurs moléculaires pour produire des matériaux d'électrodes implantables dans des dispositifs pratiques est centrale. Par exemple, les terpyridines peuvent être greffées sur des électrodes de carbone qui sont ensuite « métallées » pour donner des matériaux d'électrodes actifs notamment pour la réduction des protons en hydrogène²⁰. Un autre exemple est l'utilisation de MOF (*Metal-organic frameworks*) solides pour fixer des catalyseurs de réduction du CO_2 . La preuve du concept a été apportée avec un complexe de rhodium qui est un bon catalyseur de photoréduction du CO_2 . Le matériau obtenu (figure 4) a l'avantage non seulement d'être actif mais également stable et recyclable²¹. Enfin, des catalyseurs solides peuvent être électrodéposés sur des électrodes. C'est ce que nous

20. N. Elgrishi, S. Griveau, M.B. Chambers, F. Bedioui, M. Fontecave, *Chem. Commun.*, 51, 2015, 2995-2998.

21. M.B. Chambers, X. Wang, N. Elgrishi, C.H. Hendon, A. Walsh, J. Bonnefoy, J. Canivet, E.A. Quadrelli, D. Farrusseng, C. Mellot-Draznieks, M. Fontecave, *ChemSusChem*, 8, 2015, 603-608.

avons fait pour la première fois avec des complexes simples de cuivre. De telles électrodes s'avèrent très efficaces et très sélectives pour la transformation du CO₂ en acide formique²².

Annexe : activités propres de collaborateurs

B. Golinelli et D. Hamdane : Dynamique de la modification d'ARNt par une ARNt méthyltransférase multi-site-spécifique

La formation de la modification 1-méthyl- adénosine en position 58 des ARNt (m1A58), conservée dans la plupart des organismes, est catalysée par l'enzyme site-spécifique TrmI qui utilise la S- adénosyl-L- méthionine (SAM) comme donneur de méthyle. Chez les archées, TrmI méthyle aussi l' adénine adjacente en position 57, m1A57 étant un intermédiaire obligatoire dans la synthèse de la 1-méthyl- inosine57. Pour étudier cette multi-site spécificité, nous avons utilisé trois substrats oligoribonucléotides de TrmI de l'archée *Pyrococcus abyssi* (PabTrmI) contenant une 2-aminopurine (2-AP) fluorescente aux deux positions cibles et suivi les cinétiques de liaison de l'ARN et de réaction de méthylation par *stopped-flow* et spectrométrie de masse. PabTrmI ne modifie pas la 2-AP mais méthyle l' adénine cible adjacente. La 2-AP diminue sérieusement la méthylation de A57 mais pas de A58, confirmant que PabTrmI méthyle efficacement la première adénine d'une séquence A57A58A59. La liaison de PabTrmI provoque une rapide augmentation de fluorescence attribuée au désempliment des bases dans l'environnement de 2-AP. Puis, une lente décroissance est observée seulement avec 2-AP en position 57 et la SAM, suggérant que la formation de m1A58 entraîne le relargage de l'ARN. Un modèle structural du complexe protéine-ARNt montre que les deux adénines cibles sont à proximité de la SAM et souligne qu'aucun changement de conformation majeur de l'ARNt n'a lieu lors de la réaction, en dehors du retournement de base. L'accessibilité au solvant de la poche de liaison de la SAM n'est pas affectée par l'ARNt, ce qui permet à la S- adénosyl-L- homocystéine formée lors de la première méthylation d'être remplacée par une nouvelle molécule de SAM sans relargage préalable de l'ARNt monométhylé.

D. Hamdane, A. Guelorget, V. Guérineau, B. Golinelli-Pimpaneau, « Dynamics of RNA modification by a multi-site-specific tRNA methyltransferase », *Nucleic Acids Res.*, 42, 2014, 11697-706.

C. Mellot-Draznieks

Les solides à charpente hybride organique-inorganique de type ZIF (*zeolitic imidazolate frameworks*) sont constitués de cations en coordinance tétraédrique reliés par des imidazolates. Ils sont bien connus pour leur stabilité chimique et thermique exceptionnelle, leurs propriétés d'adsorption/séparation de gaz (CO₂/CH₄) ainsi que pour leur grande variété structurale, réminiscente de celle caractérisant la grande famille des zéolithes. Néanmoins, les facteurs qui déterminent quelles sont les structures accessibles des ZIF (parmi le grand nombre de structures

22. Tran Ngoc Huan, E.S. Andreiadis, J. Heidkamp, P. Simon, E. Derat, S. Cobo, G. Royal, H. Dau, V. Artero, M. Fontecave, *J. Mat. Chem. A*, 3, 2015, 3901-3907.

possibles, denses comme poreuses) en synthèse hydrothermale sont mal connus, ce qui de fait limite une synthèse rationnelle et contrôlée. Il est empiriquement admis que les substituants de l'imidazolate jouent un rôle essentiel dans la nature de la structure obtenue. À des fins de rationalisation, nous utilisons une approche de chimie *in silico*, i.e. de modélisation moléculaire et simulation numérique, pour explorer le polymorphisme complexe des ZIFs²³. La combinaison de calculs DFT (*density functional theory*), QSPR (*quantitative structure properties relationships*) et NCI (*non covalent interactions*) a récemment permis d'élucider et de quantifier le coût thermodynamique associé à la formation de certaines topologies particulièrement peu denses (donc très poreuses), très recherchées en synthèse²⁴. Ces calculs ont permis de rationaliser et de prédire l'impact déterminant de la position et du nombre de substituants de l'imidazolate sur la nature de la structure obtenue, conférant ainsi au *linker* organique un rôle d'agent structurant. Il est ainsi montré que les substituants de l'imidazolate introduisent une discrimination énergétique entre des topologies de ZIF qui seraient, sans eux, isoénergétiques. Les ZIF sont également sujets à des transitions structurales, sous l'effet de la température, de la pression ou de l'adsorption de gaz. La structure de ZIF-4, poreuse à température ambiante, devient dense à basse température (140 K), avec une contraction de la maille très importante (23 %). Des calculs DFT ont établi, en accord avec des mesures calorimétriques, la stabilisation enthalpique relative de la phase dense à basse température, confirmés par des mesures calorimétriques²⁵.

23. C. Mellot-Draznieks, « Computational Approaches of Metal-Organic Frameworks: examples of advances in crystal structure and electronic structure predictions », *Mol. Simulation*, 2015, 10.1080/08927022.2015.1048511 (sous presse).

24. C. Mellot-Draznieks, B. Kerkeni, Exploring the interplay between ligand and topology in zeolitic imidazolate frameworks with computational chemistry, *Mol. Simulation*, 40, 2014, 25-32.

25. M.T. Wharmby, S. Henke, T.D. Bennett, S.R. Bajpe, I. Schwedler, S.P. Thompson, F. Gozzo, P. Simoncic, C. Mellot-Draznieks, H. Tao, Y. Yue, A.K. Cheetham Extreme Flexibility in a Zeolitic Imidazolate Framework: Porous to Dense Phase Transition in Desolvated ZIF 4., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 2015, 6447-6451.

