

Marc Fontecave

Chaire Chimie des interactions moléculaires (1980-2010)

TRAVAUX PERSONNELS

Le domaine de recherche dans lequel se sont inscrits mes travaux tout au long de ma carrière, et ce dès ma thèse, est celui de la **chimie bioinorganique**, à l'interface de la chimie et de la biologie. Cette science, en pleine expansion aujourd'hui, est née du constat relativement récent que les ions métalliques jouent des rôles absolument essentiels pour la vie cellulaire. Elle a pour objet en particulier la caractérisation des centres métalliques présents dans les protéines, appelées métalloprotéines, aussi bien du point de vue de leur structure que de leur réactivité. On peut citer des centaines de voies métaboliques et de réactions cellulaires de biosynthèse, conduisant à la formidable diversité chimique du vivant, qui sont catalysées par des métalloenzymes. Ces centres métalliques biologiques possèdent des propriétés chimiques uniques qui, d'une certaine façon, renouvellent certains concepts de la chimie, par exemple dans le domaine de la catalyse. Ce dernier domaine a constitué pour moi une ligne directrice permanente, comme on le verra dans les pages qui suivent.

1978-1984

Après l'obtention de l'**agrégation de chimie** en 1978, en tant qu'élève de l'ENSET (Cachan), j'ai obtenu d'abord un DEA de chimie organique (Paris-VI) puis une thèse de troisième cycle en 1981 (Paris-VI) et enfin une **thèse d'État (Paris-VI) en 1984**. Je suis entré au CNRS en 1981. Mon travail de recherche a été mené au cours de ces années d'abord au laboratoire de chimie de l'École normale supérieure, rue d'Ulm, puis dans le laboratoire de chimie et biochimie toxicologiques et pharmacologiques (URA CNRS 400) à l'université R. Descartes (Paris-V), **sous la direction de Daniel Mansuy**. Mon projet, assez original à l'époque, était de m'appuyer sur ma culture en chimie organique et physique pour aborder des problèmes de chimie du vivant. Il a pu trouver auprès de D. Mansuy, l'un des pionniers de l'interface chimie-biologie en France, les meilleures conditions pour sa réalisation. Concrètement, il s'agissait pour moi de contribuer à l'étude de la réactivité chimique de métalloporphyrines, modèles d'hémoprotéines comme le cytochrome P-450. Une dizaine de publications sont issues de ce travail qui ne sera pas davantage commenté dans ce rapport. Néanmoins, c'est à partir de ce moment-là que je me suis intéressé à la chimie du fer et aux questions de catalyse et de biocatalyse, en particulier d'oxydation. Ces préoccupations ne m'ont plus jamais quitté et ont inspiré de nombreux projets de recherche tout au long de ma carrière.

1985-1986

Afin de mieux maîtriser les techniques modernes de la biologie et d'acquérir cette double culture qui m'apparaissait et m'apparaît toujours comme une nécessité, j'ai choisi de faire un **stage postdoctoral dans le département de biochimie de l'institut Karolinska, à Stockholm (Suède)**, sous la direction de Peter Reichard. P. Reichard avait, dans les années 60, apporté une contribution majeure à la biologie en découvrant **la ribonucléotide réductase (classe I)**, une enzyme à fer non hémunique responsable, chez les organismes aérobies, de la transformation des ribonucléotides en désoxyribonucléotides et donc essentielle à la biosynthèse de l'ADN et à la prolifération cellulaire. C'est au cours de ces années que j'ai acquis des compétences en chimie des protéines (purification et caractérisation) et en biologie moléculaire (expression de gènes, mutagenèse...) Mon travail de recherche postdoctoral a conduit à 2 résultats très importants, non seulement sur le plan scientifique mais également en ce qu'ils ont pu être poursuivis par moi-même en France pendant de nombreuses années :

- **La découverte du système d'activation de la ribonucléotide réductase**, qui permettait de comprendre le rôle du centre métallique dans cette enzyme ;
- La découverte d'une nouvelle classe d'enzymes, les flavine réductases.

1987-1988

À mon retour dans l'URA CNRS 400 (Paris-V ; Dir. : Daniel Mansuy) et avec le soutien de son directeur, j'ai consacré mon activité à l'étude du mécanisme chimique de l'activation de la ribonucléotide réductase qui consiste en une activation de l'oxygène moléculaire par un centre binucléaire de fer non hémunique et une oxydation spécifique d'une tyrosine de la protéine en radical tyrosinyle, absolument essentiel à l'activité enzymatique. L'étude des propriétés physicochimiques, spectroscopiques, rédox de ce centre métallique et de sa réactivité a constitué l'essentiel de **la première thèse que j'ai dirigée (C. Gerez)**. À cette époque, la chimie de ce type de centre métallique était totalement inconnue. Au cours des 15 années suivantes, on découvrira que les protéines contenant un site binucléaire de fer non hémunique constituent en fait une très grande famille de métalloenzymes, qui deviendra un sujet majeur de la chimie bioinorganique des années 1990-2000. La ribonucléotide réductase et la méthane monooxygénase, qui catalyse l'oxydation du méthane en méthanol et que j'ai étudiée partiellement en raison de l'importance de la réaction catalysée, constituent les prototypes de cette classe d'enzymes.

Par ailleurs, c'est en 1987 et 1988 que j'ai abordé, en collaboration avec Peter Reichard, l'étude de la biosynthèse des désoxyribonucléotides chez les organismes anaérobies. Assez curieusement, à la fin des années 80, cette partie du métabolisme était encore un territoire vierge. **Ce travail m'a conduit à découvrir, en 1988, la ribonucléotide réductase de classe III, qui a constitué jusqu'au début des années 2000 un projet prioritaire du laboratoire que je dirige.**

1989-1997

Après ma nomination comme **professeur à l'université Joseph-Fourier (Grenoble)** en 1989 et mon affectation au **LEDSS** dirigé par **Jean Lhomme**, j'ai eu, très tôt grâce au soutien de son

directeur, l'opportunité de créer une équipe de recherche autonome. Les sujets suivants ont pu ainsi se développer entre 1989 et 1997 :

— L'étude des ribonucléotide réductases (RNRs) de classe I, II et III

Nous avons poursuivi l'étude de la réactivité et de la structure du site actif de la RNR de classe I (formation du radical et réduction des centres rédox). Par ailleurs, nous avons pu fractionner et identifier tous les constituants de ce système complexe qu'est la RNR de classe III. Nous avons montré que l'activation de cette enzyme, extrêmement fragile à l'oxygène, passait par une réductolyse d'un sulfonium biologique, la S-adénosylméthionine, catalysée par le centre fer-soufre de l'enzyme. Cette réaction, sans équivalent en chimie, conduit à la production d'un radical organique, localisé sur une glycine de la protéine et absolument essentiel à l'activité enzymatique. Ce n'est que plus tard dans les années 2000 qu'on s'apercevra que cette chimie est mise en œuvre probablement dans plusieurs milliers d'enzymes essentielles du métabolisme et que, de fait, **la RNR de classe III apparaîtra comme le prototype d'une large classe d'enzymes qui constitue aujourd'hui l'un des grands sujets de la chimie bioinorganique**. Nos résultats constituent aujourd'hui un modèle de référence pour l'étude de ces systèmes. Par ailleurs, nous avons montré que la RNR de classe III utilisait le formiate pour la réduction des ribonucléotides, ce qui est également sans précédent en chimie. Il faut enfin noter que nous avons été les premiers à isoler et identifier **une ribonucléotide réductase d'une archaebactérie** et montrer que son activité dépendait de la présence de l'adénosylcobalamine (vitamine B12) comme cofacteur générateur de radicaux, une caractéristique des RNRs de classe II.

— La préparation et l'étude de nouveaux inhibiteurs des ribonucléotide réductases de classe I, destinés à des applications comme anticancéreux, antiviraux et antibactériens

Avec ces objectifs, nous avons démarré des travaux dans le domaine de la chimie des **nucléosides**, des piègeurs de radicaux et de l'oxyde d'azote. Nous avons par exemple obtenu, en collaboration avec Rhône-Poulenc, l'inhibiteur de ribonucléotide réductase le plus puissant connu à ce jour. Malheureusement, son utilisation *in vivo* s'est avérée difficile. Autre exemple : l'étude originale de la chimie des **S-nitrosothiols** nous a permis de montrer que ces molécules constituaient de puissants inhibiteurs de l'enzyme, par une variété de mécanismes d'interaction entre les centres rédox de la protéine et le NO libéré. Enfin, le **resvératrol**, un polyphénol naturel, s'est avéré être un inhibiteur efficace de l'enzyme, par piégeage du radical tyrosinyle. Pour toutes ces études, nous avons été amenés à travailler sur des enzymes issues de mammifères, de plantes (*Arabidopsis thaliana*), de bactéries (*Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*) et de virus (Herpès Simplex). On peut noter que nous avons été les premiers à isoler une ribonucléotide réductase de plantes.

— L'étude de la structure et des mécanismes d'action des flavine-réductases

Si pratiquement rien n'était connu de la structure et la chimie des flavine-réductases lorsque je découvrais celle d'*E. coli*, il apparaîtra plus tard que ce type d'enzyme est présent dans tous les organismes vivants (constituant donc une large famille) et fonctionne avec le même mécanisme chimique, celui que nous nous sommes attachés à comprendre au cours de ces années. Ces systèmes enzymatiques ont ceci d'intéressant qu'ils impliquent une reconnaissance et une utilisation chimique originale de la flavine par la chaîne polypeptidique, différentes des flavoprotéines. Nous avons obtenu **la première structure cristallographique d'une flavine réductase**. Par ailleurs, nous avons

commencé à comprendre le rôle physiologique de ces enzymes et à en exploiter les propriétés dans des applications originales (capteurs électrochimiques). Enfin, guidé par ce souci constant de coupler mes recherches en biochimie à des développements en chimie fondamentale, j'ai pu développer une **chimie originale de synthèse de flavines et de conjugués oligonucléotide (PNA)-flavines**, aujourd'hui exploités comme nucléases artificielles ou détecteurs d'ADN (puces à ADN) ayant fait l'objet de brevets.

— La préparation et l'étude de complexes binucléaires de fer non héminique, modélisant le site actif de monooxygénases

Les centres binucléaires de fer non héminique sont présents dans un grand nombre de monooxygénases (méthane monooxygénase) ainsi que, comme nous l'avons vu ci-dessus, dans la RNR de classe I. Notre objectif, original au milieu des années 90, était d'évaluer la capacité de complexes modélisant ces sites actifs d'activer l'oxygène moléculaire et divers peroxydes pour catalyser des réactions d'oxydation. Ce sujet, nécessitant la mise en place d'activités de synthèse organique et inorganique, a été et reste un sujet où la compétition est très importante, notamment vis-à-vis de laboratoires d'excellence aux États-Unis.

Néanmoins, notre travail a pu conduire à des résultats originaux :

- Mise au point de **nouveaux catalyseurs d'oxydation**, notamment pour l'oxydation d'hydrocarbures par le peroxyde d'hydrogène ;
- Compréhension des mécanismes mis en jeu, en particulier via l'isolement et la caractérisation de **complexes peroxo du fer**.

1997-2007

À partir de 1995, la création d'une nouvelle unité de recherche associant l'Université, le CNRS et le CEA a constitué pour moi un objectif prioritaire. Ceci a été finalisé avec le déménagement de l'équipe au centre du CEA de Grenoble au cours de l'automne 1997 et la reconnaissance du **laboratoire de chimie et biochimie des centres rédox biologiques comme UMR UJF/CNRS/CEA n°5047**, dans le cadre du contrat quadriennal 1999-2002 puis 2003-2006. L'activité de recherche était centrée sur l'étude de la structure et de la réactivité chimique de systèmes comportant des centres rédox avec une attention particulière pour les protéines à fer et les flavoenzymes. Mon ambition est toujours d'aborder ces questions par la maîtrise d'une pluridisciplinarité à la fois thématique et expérimentale s'appuyant les méthodes de la **biochimie** (purification et caractérisation des protéines, enzymologie), de la **biologie moléculaire** (expression de gènes, mutagenèse), de la **chimie organique** (synthèse d'analogues de substrats et d'inhibiteurs d'enzymes), de la **chimie inorganique** (complexes de coordination, catalyse) et de diverses **spectroscopies** (RMN et RPE en particulier). Cette approche, qui implique **la double culture et la convergence de chimistes et de biologistes**, est finalement encore peu développée en France. Elle a constitué le fil directeur de mon activité de recherche depuis le début et est toujours pour moi le véritable défi scientifique. Néanmoins, même si les objets d'étude sont le plus souvent des molécules biologiques ou des modèles, de préférence choisis en fonction de leur intérêt physiologique, de leur originalité du point de vue de la biocatalyse et de leurs applications potentielles, ce sont les problèmes de chimie fondamentale (structure et réactivité) sous-jacents qui ont constitué le moteur de ma recherche. Enfin, il convient de dire que le défi scientifique n'a pu être relevé que grâce à l'intelligence, la compétence et la diversité de mes collaborateurs les plus proches, parmi lesquels je me dois de mentionner **Étienne**

Mulliez, Stéphane Ménage et Vincent Nivière, aujourd'hui DR CNRS, **Sandrine Ollagnier-de-Choudens**, CR CNRS, **Mohammed Atta, Vincent Artero**, chercheurs CEA, ainsi que les enseignants-chercheurs, **Catherine Gerez et Olivier Hamelin**, maîtres de conférences, qui, comme moi, essaient de maintenir à un haut niveau leur activité de recherche malgré les lourdes charges d'enseignement et d'administration.

À partir de 1998, le nouveau contexte de recherche a permis non seulement de poursuivre certains des projets anciens (et d'en arrêter d'autres, notamment ceux liés à l'étude des RNR de classe I et II) mais également de démarrer, en biochimie et en chimie, de nouveaux projets de recherche. On peut citer en particulier celui mené en étroite collaboration avec V. Nivière suite à notre **découverte d'une nouvelle enzyme antioxydante, la superoxyde réductase**, qui a constitué ensuite le grand projet de recherche de V. Nivière. Autre projet majeur démarré à l'aube du XXI^e siècle : l'étude des **hydrogénases**, ces fascinantes métalloenzymes catalysant la réduction de l'eau en hydrogène, de leur maturation et de **systèmes chimiques bioinspirés** dans le but de mettre au point de nouveaux catalyseurs et matériaux d'électrodes pour la (photo)production d'hydrogène ou pour son oxydation (piles à combustibles). Ceci a pu se faire grâce à l'arrivée de **Vincent Artero** au laboratoire qui joue un rôle majeur dans le développement de ce projet. Enfin, il faut citer le nouveau projet portant sur la modification des ARNs de transfert, avec **Mohammed Atta**, conduisant à la découverte de nouvelles métalloenzymes fascinantes.

2007-2012

Une nouvelle étape a été franchie au 1^{er} janvier 2007, date à laquelle j'ai pris la direction d'une **nouvelle unité de recherche, intitulée « laboratoire de chimie et biologie des métaux »**, qui constituait le résultat d'un projet personnel de fédération sur Grenoble des forces de la chimie et la biologie travaillant dans le domaine des métaux en biologie. Ce nouveau laboratoire résulte de la fusion de mon ancienne unité avec deux autres UMR, l'une de chimie spécialisée dans les études physico-chimiques des métalloenzymes, l'autre de biologie apportant ses compétences en biologie cellulaire et spécialisée dans l'étude de l'homéostasie cellulaire des métaux chez les eucaryotes. À ma connaissance, cette nouvelle unité est unique dans le paysage national et probablement dans le paysage international, notamment par sa dimension pluridisciplinaire entre chimie, physique et biologie. Dans ce nouveau contexte, les travaux de recherche de mon équipe ont porté sur :

- La préparation d'oligonucléotides ou de PNA modifiés (en particulier par des flavines ou des analogues) pour des applications dans le domaine des puces à ADN et du contrôle de l'expression génique (nucléases artificielles...) (collaboration C. Giovanangelli, Museum Paris) ;
- L'étude de toute une série d'enzymes fer-soufre. D'une part, celles de la famille appelée « Radical-SAM » dont la ribonucléotide réductase de classe III est un prototype : une enzyme de réparation de l'ADN des spores bactériens ; des enzymes de modification des ARNs de transfert et de protéines ; des enzymes de la maturation des hydrogénases ; des enzymes de biosynthèse de cofacteurs essentiels comme la biotine ou le lipoate. D'autre part, des enzymes essentielles chez des microorganismes pathogènes et leur évaluation comme cibles de nouveaux antibiotiques : par exemple les protéines fer-soufre impliquées dans la biosynthèse du NAD ou des isoprénoides. (collaborateurs : S. Ollagnier-de-Choudens ; M. Atta, E. Mulliez) ;

- L'étude des mécanismes chimiques et biologiques de la biosynthèse des clusters fer-soufre chez les procaryotes et les eucaryotes (collaborateur : S. Ollagnier-de-Choudens, C. Gerez) ;
- L'étude de la biosynthèse de l'ubiquinone chez les eucaryotes et les procaryotes (collaborateur : F. Pierrel) ;
- L'étude de nouveaux complexes bioinspirés des hydrogénases, catalyseurs de production ou d'oxydation de l'hydrogène et leur couplage à des catalyseurs d'oxydation de l'eau et des photosensibilisateurs pour la mise au point de dispositifs de photoproduction de l'hydrogène (cellules photoélectrochimiques). Certains de ces catalyseurs seront greffés sur des surfaces nanostructurées pour en améliorer les propriétés électrochimiques et la stabilité (collaborateur : V. Artero). **Les réalisations les plus importantes portent sur : (i) la mise au point de matériaux d'électrode à base de nanotubes de carbone fonctionnalisés avec un complexe de nickel, rapportée dans le journal *Science* en décembre 2009, ou un complexe de cobalt rapporté dans le journal *Nature Chemistry* en 2013 ; (ii) l'activation des hydrogénases à fer par des complexes mimant le site actif de ces enzymes, publiée dans les revues *Nature* et *Nature Chemical Biology* en 2013.** J'ai abandonné la direction du laboratoire de chimie et biologie des métaux au 1^{er} janvier 2011 (remplacé par S. Ménage), pour me consacrer à la création d'un nouveau laboratoire au Collège de France, à Paris.

2012...

Le grand projet sur lequel se concentrent mes efforts depuis 2012 et surtout depuis 2014, date de création de l'UMR8229, est celui de la montée en puissance des nouvelles activités de recherche, à l'interface de la chimie et de la biologie, au sein du **laboratoire de chimie des processus biologiques au Collège de France (UMR 8229 Collège de France-CNRS-UPMC)**. Ce nouveau laboratoire, que je dirige, a vu le jour le 1^{er} janvier 2012 et est installé dans les locaux rénovés du site Marcelin-Berthelot depuis le printemps 2014. Il rassemble divers chercheurs spécialistes de chimie organique et inorganique, de chimie du solide, de chimie des protéines et de biologie structurale (notamment à travers l'activité d'une plateforme de cristallographie des protéines mise en place en 2014), et d'étudiants (doctorants et postdoctorants), autour des projets suivants :

- Photosynthèse artificielle et valorisation du dioxyde de carbone ; nouveaux catalyseurs, aussi bien moléculaires que solides et hybrides, pour des dispositifs de photo-électro-réduction et hydrogénation du CO₂ (collaborateurs : **Y. Xu-Li, P. Simon, C. Mellot-Draznieks, M. Gomez-Mingot**).
- Structure et réactivité des enzymes de la biosynthèse de l'ubiquinone (collaborateurs : **M. Lombard, L. Pecqueur, ; B. Faivre**).
- Structure et réactivité des enzymes de modification des ARNs (collaborateurs : **B. Golinelli, D. Hamdane**).
- Étude des hydrogénases et de leur maturation pour la production biologique d'hydrogène, un vecteur énergétique d'avenir (collaborateur : **L. Pecqueur**).

Quelques-unes des contributions récentes les plus marquantes concernent :

- La découverte de nouveaux catalyseurs moléculaires pour la réduction du CO₂ : catalyseurs à base de Cobalt (*Chem. Sci* 2015, *JACS* 2017, *Angew. Chem.* 2020) ; catalyseurs biomimétiques à base de molybdène mimant le site actif des formiate déshydrogénases (*Angew. Chem.* 2015 et 2018) ;
- La découverte de catalyseurs solides pour la réduction du CO₂, notamment monométalliques à base de cuivre pour la synthèse d'éthylène ou d'éthanol (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019, *Angew. Chem.* 2019 et *Nature Materials* 2019) ou bimétalliques, ZnCu et ZnAg, pour la synthèse sélective du CO (*ChemSusChem* 2019 ; *Joule* 2020) ;
- La découverte de nouveaux acteurs essentiels pour la biosynthèse de l'ubiquinone (*J Bacteriol* 2014, *J Biol Chem* 2017) et celle du système enzymatique pour la biosynthèse anaérobie de l'ubiquinone (*mBio* 2019) ;
- La découverte d'un nouveau mécanisme de méthylation enzymatique impliquant un cofacteur flavinique (*JACS* 2012) ;
- La compréhension de mécanismes de sulfuration biologique impliquant des enzymes fer-soufre (*Nucl. Ac. Res.* 2014, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017) ;
- La première structure cristallographique de HydF, une enzyme clé de la maturation des hydrogénases (*Nature Chem Biol* 2017) ;
- La mise au point d'hydrogénases artificielles pour la production d'hydrogène (*ACS Catal* 2019).

Mon investissement personnel au Collège de France s'est traduit par ma nomination comme secrétaire de l'assemblée des professeurs, entre septembre 2012 et septembre 2018, et par la présidence de la Fondation du Collège de France que j'assume depuis le 1^{er} janvier 2015.