## recherche et développement

### La réaction des hydrogénases FeFe avec le dioxygène

### Étude expérimentale et théorique

### Résumé

Les hydrogénases sont des métalloenzymes qui catalysent l'oxydation et la production du dihydrogène. Les « hydrogénases FeFe », dont le site actif est composé d'un centre [Fe<sub>6</sub>(CN)<sub>2</sub>(CO)<sub>3</sub>], sont particulièrement efficaces, mais leur inactivation par le dioxygène limite leur utilisation dans des procédés biotechnologiques. Le mécanisme moléculaire de la diffusion de O<sub>2</sub> dans l'enzyme et sa réaction au site actif ont été élucidés en combinant des techniques d'électrochimie, de mutagenèse dirigée, des calculs de dynamique moléculaire et de chimie quantique. Les résultats obtenus indiquent dans quelle mesure il est aujourd'hui possible de comprendre les mécanismes et calculer les vitesses de réactions complexes qui se produisent au sein de métalloenzymes. Ils apportent des informations qui permettront d'élaborer des hydrogénases modifiées plus résistantes aux dommages oxydatifs.

### **Mots-clés**

Chimie biologique, chimie théorique, chimie bioinorganique, cinétique enzymatique, électrochimie, hydrogène, hydrogénase.

#### **Abstract**

### Experimental and theoretical study of the reaction of FeFe hydrogenases with dioxygen

Hydrogenases are enzymes that catalyze hydrogen oxidation and production. The so-called "FeFe hydrogenases", the active site of which is a  $[Fe_6(CN)_2(CO)_3]$  cluster, are particularly efficient. Their inhibition by  $O_2$  prevents them from being used for  $H_2$  production. Combining electrochemical experiments, site-directed mutagenesis, molecular dynamics calculations and quantum chemistry calculations allowed to elucidate all steps of the reaction with  $O_2$  and to predict the rate of inhibition. These results will pave the way for engineering enzymes that resist  $O_2$ .

### **Keywords**

Chemical biology, theoretical chemistry, bioinorganic chemistry, enzyme kinetics, electrochemistry, dihydrogen, hydrogenase.

epuis le XIX<sup>e</sup> siècle, nous savons produire de l'électricité en oxydant le dihydrogène dans des piles à combustible. La production d'hydrogène par électrolyse de l'eau et son oxydation pourraient faire partie des stratégies de stockage et de restitution de l'énergie produite de façon intermittente par des systèmes « durables », éoliens ou solaires [1]. Un peu de la même façon, la plupart des microorganismes utilisent aussi le dihydrogène comme vecteur énergétique. L'hydrogène produit, principalement par fermentation, est immédiatement réoxydé en lien avec le métabolisme énergétique soit de la bactérie dans lequel H<sub>2</sub> est produit, soit dans une bactérie différente partageant le même habitat.

La production et l'oxydation de  $\rm H_2$  sont catalysées par des métalloenzymes complexes et fragiles appelées « hydrogénases ». Isolées pour la première fois dans les années 1930, elles ont été caractérisées par un grand nombre de techniques biophysiques depuis le début des années 1980, et cristallisées pour en déterminer la structure pour la première fois en 1995 grâce à une collaboration entre des équipes marseillaises et grenobloises. Leur étude est encore un sujet de recherche très dynamique, en lien en particulier avec la stratégie de chimie biomimétique, qui consiste à comprendre et s'inspirer des catalyseurs biologiques [2].

Nous ne parlerons ici que des hydrogénases dites « fer-fer » (FeFe), dont le site actif (la partie de l'enzyme où s'effectue la réaction chimique) est un agrégat dinucléaire di-fer attaché par le soufre d'une cystéine à un agrégat 4Fe4S (figure 1) [2]. Un ligand azadithiolate est positionné entre les deux ions fer, qui portent aussi des ligands carbonyle et cyanure. Des calculs de dynamique moléculaire (voir [3]) montrent que le site actif et son environnement sont beaucoup plus flexibles que ne le suggèrent les images de la figure 1, et cette flexibilité a des conséquences fonctionnelles. Cette description du site actif

a été l'aboutissement d'années de recherche et de la combinaison d'un grand nombre de résultats expérimentaux de biochimie, d'analyses élémentaires, de spectroscopie, et, évidemment, de cristallographie. Une différence majeure entre le mécanisme d'oxydation de l'hydrogène par ces enzymes

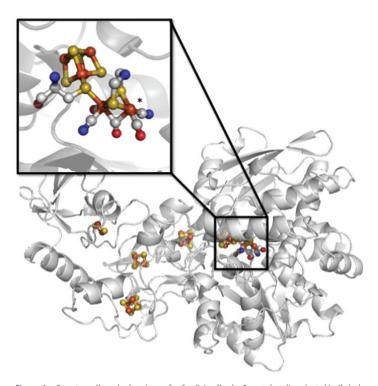


Figure 1 - Structure d'une hydrogénase fer-fer (ici celle de *C. acetobutylicum*) et détail de la structure de son site actif (le « cluster H »). On note la présence de ligands carbonyle et cyanure et d'un pont azadithiolate. L'astérisque indique le site de fixation du dihydrogène et de l'inhibiteur 0<sub>2</sub> sur l'ion fer que l'on qualifie de « distal ».

et par le platine est que, dans les hydrogénases, le dihydrogène est coupé de façon hétérolytique en un proton et un hydrure, alors que la rupture de liaison sur le platine est homolytique. Dans le cas des hydrogénases FeFe, on a observé récemment que l'activité décroît très fortement si l'on remplace l'atome d'azote du pont azadithiolate par un carbone ou un oxygène [2c], ce qui a finalement démontré que cet atome d'azote est indispensable pour accepter le proton qui provient de la coupure hétérolytique du dihydrogène, confirmant ainsi les hypothèses antérieures basées sur des structures cristallines et des analyses spectroscopiques avancées. Le site actif est évidemment le point focal pour le chimiste inorganicien, mais il faut cependant garder à l'esprit que les hydrogénases sont beaucoup plus grosses et plus complexes que leur seul site actif. Celui-ci est enfoui à l'intérieur de la protéine et connecté au solvant par des cavités hydrophobes qui guident la diffusion intramoléculaire de l'hydrogène et des inhibiteurs (O<sub>2</sub>, CO), par une série d'acides aminés protonables qui permettent le transfert de protons à longue distance, et dans certains cas par un chapelet de centres redox fer-soufre qui servent de médiateurs pour le transfert d'électrons entre le site actif et le partenaire rédox de l'enzyme (figure 1). Le mécanisme catalytique de l'hydrogénase fait donc intervenir des étapes de natures très différentes, dont certaines se produisent à distance du site actif.

La réaction de l'hydrogénase avec le dioxygène, un de ses inhibiteurs, est presque aussi étudiée par la communauté scientifique que le cycle catalytique. C'est parce que l'inhibition des hydrogénases est un obstacle pour leur utilisation dans certaines applications, comme par exemple la réalisation de biopiles H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> [4] ou la production biologique photosynthétique d'hydrogène. Nous avons récemment élucidé le mécanisme de cette réaction en utilisant une approche nouvelle qui combine mesures cinétiques (par électrochimie), mutagenèse dirigée (pour mettre en évidence le rôle d'acides aminés particuliers) et calculs de chimie théorique (dynamique moléculaire pour prédire la diffusion du dioxygène à l'intérieur de l'enzyme et DFT pour identifier les produits de réaction). L'accord entre l'expérience et la théorie va jusqu'au calcul de la vitesse de réaction [5]. Cet article présente un résumé des résultats obtenus.

# Mesure par électrochimie de la vitesse d'inhibition par le dioxygène

Nous avons décrit récemment dans ce journal la technique électrochimique qui permet de mesurer la fréquence de turnover d'une hydrogénase [6a]. Il suffit pour cela d'attacher ou d'adsorber une petite quantité d'hydrogénase sur une électrode, de telle sorte que les électrons peuvent être transférés directement. L'électrode est immergée dans une solution saturée en hydrogène par barbotage. Dans des conditions suffisamment oxydantes, l'enzyme est continûment réduite par sa réaction catalytique avec le dihydrogène et réoxydée en transférant des électrons vers l'électrode. Le courant qui en résulte est directement proportionnel à la fréquence de turnover de l'enzyme [6]. On force la convection (à l'aide d'une électrode à disque tournant) pour minimiser la déplétion en hydrogène près de l'électrode.

Avec cette même technique, il est aussi possible de mesurer la vitesse d'inhibition (la vitesse de réaction de l'enzyme avec le dioxygène) en détectant la variation de la vitesse de la réaction catalytique lors d'une exposition contrôlée de l'enzyme

à l'oxygène, comme cela est illustré sur la figure 2. La concentration en dioxygène varie au cours du temps car le dioxygène initialement injecté est chassé de la cellule par le barbotage d'hydrogène, mais il est possible de mesurer sa concentration instantanée grâce à une deuxième électrode tournante, d'un matériau quelconque, immergée dans la même cellule électrochimique et polarisée à suffisamment bas potentiel pour qu'elle réduise le dioxygène [5b] (figure 2, panel du haut).

La figure 2 montre que le courant catalytique diminue suite à l'exposition au dioxygène, ce qui reflète l'inhibition de l'enzyme par O<sub>2</sub>. Après chaque exposition temporaire à l'oxygène, on observe une réactivation partielle de l'enzyme, plus ou moins prononcée selon l'hydrogénase considérée. Cette variation d'activité est quantitativement en accord avec le mécanisme suivant :

$$\begin{array}{ccc}
k_{\text{in}} \times [\mathcal{O}_2] & k_3 \\
A & \rightleftharpoons & \mathcal{I} \to \mathcal{D} \\
k_a
\end{array} \tag{1}$$

selon lequel l'enzyme active (A) réagit avec le dioxygène (avec une constante de vitesse bimoléculaire  $k_{in}$ ) pour former un état inactif (I) qui peut être transformé irréversiblement en une espèce inactive (« dead end », D), ou bien redonner la forme active de l'enzyme (avec une constante de vitesse du premier ordre  $k_a$ ). Chacune des flèches dans la réaction (1) correspond à une transformation chimique qui se produit avec une cinétique du premier ordre (dans le cas de la transformation  $A \rightarrow I$ , la constante de vitesse pseudo-premier ordre  $k_{in}$  x  $[O_2]$  dépend du temps). La modélisation quantitative de données comme celles de la figure 2 permet de mesurer les trois constantes de vitesse définies par l'équation (1) [5b]. L'expérience peut être répétée pour examiner comment ces constantes de vitesse varient avec le pH, le potentiel d'électrode, sous l'effet d'un changement du solvant (H<sub>2</sub>O versus D<sub>2</sub>O) ou de modifications par mutagenèse dirigée de certains acides aminés de l'enzyme [5a].

Pour comprendre le détail de la réaction de l'enzyme avec le dioxygène, nous nous sommes mis au défi de calculer sa vitesse à l'aide des outils de la chimie théorique.

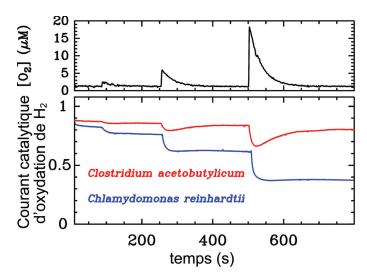


Figure 2 - La variation de courant catalytique (u.a.) résultant de trois expositions transitoires au dioxygène d'hydrogénases de deux microorganismes différents, C. acetobutylicum et C. reinhardtii, adsorbées sur des électrodes tournantes à disque de graphite. En haut : courant de réduction de  $O_2$ , proportionnel à la concentration de  $O_2$  dans la cellule, mesuré dans la même expérience avec une deuxième électrode tournante polarisée à bas potentiel. En bas : courant catalytique d'oxydation de  $O_2$ , qui diminue sous l'effet de l'inhibition des enzymes par  $O_2$  (adapté de [5a]).

# Calcul de la vitesse initiale d'inhibition par le dioxygène

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la toute première étape, bimoléculaire, de réaction de l'enzyme avec le dioxygène, cherchant à en comprendre le mécanisme et à en prédire la vitesse à l'aide de calculs de chimie théorique. Cette réaction est en fait complexe, et peut être décomposée en deux étapes : la diffusion du dioxygène depuis le solvant vers un site très proche du site actif, appelé « site géminé », puis la formation réversible d'une liaison chimique avec le site actif. La transformation A 

l est ainsi décomposée en :

$$\begin{array}{ccc}
k_1 \times [\mathcal{O}_2] & k_2 \\
A & \rightleftharpoons & \mathcal{G} & \rightleftharpoons & \mathcal{I} \\
k_{-1} & k_{-2}
\end{array} \tag{2}$$

Ces étapes sont de natures très différentes. La première, de nature physique, est la diffusion du dioxygène à l'intérieur de l'enzyme; elle doit être décrite à l'aide de calculs de type dynamique moléculaire. La deuxième, de nature chimique, est la formation d'une liaison fer-dioxygène; les modèles théoriques permettant de la modéliser relèvent de la chimie quantique.

### L'étape de diffusion (calculs de dynamique moléculaire)

De nombreuses enzymes produisent, consomment ou sont inhibées par des petites molécules, et les travaux visant à utiliser la dynamique moléculaire pour prédire les chemins utilisés préférentiellement par les molécules pour diffuser à l'intérieur de ces enzymes sont très nombreux. Dans le cas des hydrogénases FeFe, les premiers calculs utilisant la dynamique moléculaire pour déterminer les *chemins* de diffusion intramoléculaire ont été publiés par Klaus Schulten *et coll*. en 2005 [7], mais des méthodes pour prédire les *vitesses* de diffusion n'ont été proposées que récemment. Nous décrivons brièvement ici la méthode utilisée dans notre travail [5a], expliquée en détail dans la référence [8].

Les simulations de la diffusion du dioxygène dans l'enzyme mettent en évidence que celui-ci pénètre la protéine sur une échelle de temps de quelques centaines de ps, et un état stationnaire est atteint en environ 10 ns. Le dioxygène se déplace de façon discontinue, en explorant des cavités et en sautant de l'une à l'autre de façon markovienne (sans mémoire). Les simulations longues (> 100 ns) permettent de définir ces cavités (leurs positions sont indiquées par des sphères sur la figure 3) et de déterminer les probabilités de saut entre chaque cavité et ses voisines. Les transitions entre sites explorés peu fréquemment sont mal échantillonnées, mais on peut les forcer en appliquant une force et extrapoler le temps de transition à force nulle. Le résultat combiné de ces simulations à l'équilibre et hors équilibre permet de remplir les éléments  $k_{ii}$ de la matrice décrivant toutes les vitesses de saut entre les cavités j et i. La probabilité  $p_i$  que le site i soit occupé à un instant t est alors calculée en résolvant un système d'équations différentielles de type :

$$\dot{p}_i(t) = \sum_j k_{ij} \, p_j(t) \tag{3}$$

où les  $k_{ij}$  sont les vitesses des sauts  $j \rightarrow i$  ( $k_{ik} > 0 \ \forall \ i \neq j \ \text{et} \ k_{ji} < 0$ , et  $\sum_i k_{ii} = 0$ ).

On s'intéresse en particulier à la diffusion du ligand depuis le solvant vers le site géminé, en vert sur la *figure 3*. La solution de l'équation (3), avec une condition initiale correspondant à tous les sites vides et le ligand dans le solvant, est une

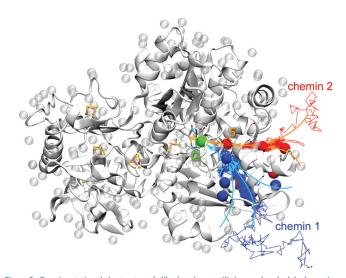


Figure 3 - Représentation de la structure de l'hydrogénase utilisée pour le calcul de dynamique moléculaire de la diffusion du dioxygène depuis le solvant vers le site actif. Deux chemins principaux vers le site géminé (G, sphère verte) sont identifiés (en rouge et en bleu). Chaque sphère de couleur représente un site de fixation temporaire le long de ces chemins. Un film montrant une simulation de la dernière transition vers le site géminé est accessible sur Internet (http://wp.me/p4Gdcg-3P). Les calculs permettent de remonter aux constantes de vitesses de diffusion de l'oxygène entre le solvant et le site actif (adapté de [5a]).

relaxation exponentielle avec le temps. On peut paramétrer l'évolution calculée de  $p_G(t)$  par l'équation phénoménologique (4) pour déterminer les constantes de vitesses apparentes pour la diffusion entre le solvant et le site géminé  $(k_1)$  et entre le site géminé et le solvant  $(k_{-1})$  ([L] étant la concentration en dioxygène dans le solvant):

$$p_{\rm G}(t) = \frac{k_1[{\rm L}]}{k_1[{\rm L}] + k_{-1}} \left[ 1 - \exp^{(-(k_1[{\rm L}] + k_{-1})t)} \right] \tag{4}$$

On déduit de ces calculs théoriques les valeurs  $k_1 = 3 \pm 2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$  et  $k_{-1} = 7.7 \pm 0.3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ .

Ces simulations permettent aussi d'identifier les acides aminés dont les chaines latérales entravent le passage des petites molécules, et nous avons pu confirmer ces prédictions en examinant l'effet du remplacement sélectif de ces acides aminés par mutagenèse dirigée [5a].

### L'étape de fixation (calculs DFT)

Des données structurales montrent que l'inhibiteur CO se fixe sur l'ion Fe distal du cluster H (figure 1a), et l'observation antérieure que l'inhibiteur CO protège l'enzyme de l'oxygène [9] a démontré que CO et l'oxygène ont le même site de fixation, l'ion Fe distal. L'étape 2 ci-dessus (équation (2)) est donc la formation réversible d'une liaison chimique entre le dioxygène dans le site géminé et l'ion Fe distal, qu'il est possible de modéliser à l'aide de calculs de type DFT [10]. La contribution entropique à l'énergie libre de la réaction est significative en raison de la perte des degrés de liberté translationnels et rotationnels du dioxygène qui accompagne la formation de la liaison chimique. L'énergie libre d'activation de la formation de la liaison chimique est élevée mais la réaction est thermodynamiquement favorable (-7,1 kcal/mol soit -29,7 kJ/mol). Les constantes de vitesse  $k_2$  et  $k_{-2}$  sont obtenues en utilisant l'équation de Eyring pour convertir en vitesses les barrières d'énergie libre (12,9 kcal/mol soit 54 kJ/mol pour la liaison, et 20,0 kcal/mol soit 83,7 kJ/mol pour la dissociation):

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G_{\rm act}}{R T}\right) \tag{5}$$

On obtient  $k_2 = 2.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  et  $k_{-2} = 1.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

## Calcul de la vitesse globale d'inhibition et comparaison avec l'expérience

Les valeurs des constantes de vitesse premier ordre ou pseudo-premier ordre  $k_2$  et  $k_1 \times 1$  mmol L<sup>-1</sup> sont toutes les deux beaucoup plus élevées que la valeur expérimentale  $k_1 \times 1$  mmol L<sup>-1</sup> = 1,1 s<sup>-1</sup>, ce qui démontre qu'un grand nombre de molécules de dioxygène repartent du site actif sans réagir. En effet, la vitesse globale d'inhibition mesurée dans nos expériences est reliée aux constantes de vitesses définies dans l'équation (2) par :

$$k_{\rm in} = \frac{k_1 \, k_2}{k_{-1} + k_2} \tag{6}$$

et la valeur de  $k_2$  est très inférieure à  $k_{-1}$ . En combinant toutes les valeurs calculées, on obtient  $k_{\rm in} = 8.6 \pm 5.1 \times 10^{-2} \, {\rm s}^{-1}/{\rm mmol} \, {\rm L}^{-1}$ , qui est juste un ordre de grandeur plus petit que la valeur mesurée ( $k_{\rm in} = 1.1 \, {\rm s}^{-1}/{\rm mmol} \, {\rm L}^{-1}$ ). Il s'agit d'un accord raisonnable, compte tenu du fait que les vitesses d'étapes de natures très différentes sont combinées dans le résultat final et que l'erreur sur  $k_{\rm in}$  cumule les erreurs sur toutes les constantes de vitesse calculées.

### Les étapes ultérieures de la réaction

Nous décrivons brièvement ici la succession d'évènements qui se produisent après la fixation de O<sub>2</sub> sur l'ion Fe distal, schématisée sur la *figure 5* et déterminée en combinant des observations expérimentales et des calculs de type DFT.

### **Observations expérimentales**

Initialement, nous avions imaginé que la réactivation observée sur la  $figure\ 2$  au moment où l'oxygène est chassé de la solution (la réaction  $I \to A$  dans l'équation (1)) reflète simplement la dissociation du dioxygène fixé sur le site actif. Mais on peut conclure des résultats d'expériences d'électrochimie rapportés sur la  $figure\ 4$  que ce n'est pas la raison principale de la réactivation. En effet, une observation expérimentale cruciale est que la vitesse de réactivation (la constante de vitesse  $k_a$ ) dépend du potentiel d'électrode, du pH et de la nature du solvant ( $H_2O$  ou  $D_2O$ ), ce qui implique que cette réaction fait intervenir des électrons et des protons. Il ne peut donc pas s'agir de la simple dissociation de  $O_2$ . Plus précisément, la constante de vitesse varie exponentiellement avec le potentiel d'électrode ( $figure\ 4$ ), ce qui montre que la réaction dont

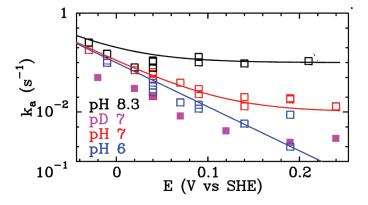


Figure 4 - L'analyse quantitative d'une expérience comme celles de la figure 2 permet de mesurer les trois constantes de vitesses définies par l'équation (1). En répétant ces expériences dans différentes conditions de pH et potentiels d'électrode, nous avons obtenu les valeurs de la constante de vitesse  $k_a$  reportées sur cette figure en fonction du potentiel d'électrode, selon le pH ou la nature du solvant ( $H_2O$  ou  $D_2O$ ). On note que  $k_a$  augmente exponentiellement lorsque le potentiel d'électrode diminue (adapté de [5a]).

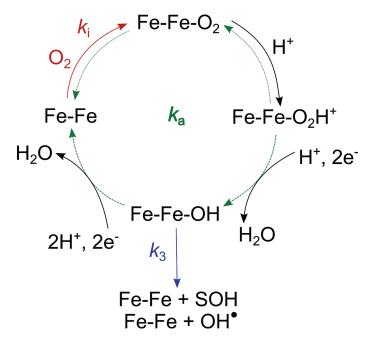


Figure 5 - Mécanisme proposé pour expliquer l'inhibition partiellement réversible de l'hydrogénase par le dioxygène. La fixation de  $0_2$  avec une vitesse  $k_{in} \times [0_2]$  est indiquée en rouge, et les deux voies qui contribuent à la réactivation (le relargage de  $0_2$  ou sa réduction en eau) sont indiquées en vert. La flèche bleue correspond à la libération d'un radical hydroxyle et à la formation irréversible d'un état inactif de l'enzyme (adapté de [5a]).

la vitesse est  $k_a$  est en fait *la réduction* du dioxygène fixé sur l'ion Fe distal.

### Une hypothèse de mécanisme basée sur des calculs DFT

Les calculs permettent de proposer le mécanisme de cette réduction. Le produit de la réduction du dioxygène fixé sur le site actif de l'hydrogénase n'est ni le superoxyde ni le peroxyde d'hydrogène, mais l'eau, formée à la suite d'une série de quatre étapes de réduction monoélectronique couplée à un transfert de protons (figure 5). Une animation GIF du mécanisme réactionnel est visible en ligne (voir [11]). Selon les calculs, cette réduction n'impliquerait aucun intermédiaire de haute énergie, contrairement à, par exemple, la formation hypothétique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La limite de notre approche ici est que nous pouvons mesurer la vitesse globale de réactivation (réduction multi-électronique de l'adduit Fe-O<sub>2</sub>) mais pas les vitesses des étapes intermédiaires ; il n'est donc pas possible d'interpréter quantitativement la valeur de la constante de vitesse de réactivation, ni, par exemple, celle de l'effet isotopique.

Les calculs suggèrent aussi qu'au cours de cette réduction, dans certaines conditions expérimentales (haut pH, haut potentiel d'électrode), un intermédiaire dans la réduction du dioxygène, le radical hydroxyle fixé au fer distal, peut être relargué et attaquer les chaines latérales d'acides aminés voisins. Notre hypothèse est qu'une cystéine conservée et indispensable au transfert de protons depuis et vers le site actif est une cible particulière de ce radical hydroxyle, et qu'elle peut ainsi être oxydée en acide sulfénique. Cette cystéine oxydée a récemment été observée dans des études cristallographiques d'hydrogénases FeFe exposées à l'oxygène. Cette réaction peut expliquer au moins en partie que l'inhibition par O<sub>2</sub> n'est pas parfaitement réversible (figure 2). On sait par ailleurs que l'exposition prolongée au dioxygène conduit à la destruction du cluster H (même s'il reste des désaccords dans la littérature sur l'ordre dans lequel les deux sous-clusters, 2Fe et 4Fe, sont détruits). Ces réactions très complexes sont aujourd'hui hors de portée des calculs de chimie théorique et peuvent difficilement être sondées par électrochimie : la mesure électrochimique d'activité permet de mettre en évidence la disparition ou l'apparition de la forme active du cluster H, mais les transformations ultérieures entre formes inactives du site actif ne sont pas observables en électrochimie car elles ne font pas varier le courant catalytique.

### **Conclusion et perspectives**

Nous avons montré ici que l'on pouvait combiner l'utilisation de méthodes cinétiques et de calculs de chimie théorique par des approches diverses (MD, DFT) pour étudier le mécanisme d'une réaction complexe se produisant au site actif d'une métalloenzyme. Il nous a en effet été possible de déterminer le mécanisme détaillé d'un certain nombre d'étapes de la réaction d'inhibition de l'hydrogénase par le dioxygène et de calculer ces vitesses à l'aide de modèles qui prennent en compte la diffusion du dioxygène à l'intérieur de l'enzyme et sa fixation sur l'ion fer distal. Les données expérimentales et les calculs DFT suggèrent que le dioxygène fixé sur le site actif est ensuite réduit en eau dans les étapes ultérieures d'une réaction complexe qui implique électrons et protons.

Nous n'avons pas caché les limites actuelles de cette approche: si les mesures cinétiques ne permettent que de déterminer des constantes de vitesses de réactions multiétapes, les vitesses de toutes les étapes élémentaires doivent être calculées et combinées pour recalculer la vitesse globale. Ce n'est pas encore possible en ce qui concerne la réduction multi-électronique de l'adduit Fe-O<sub>2</sub>.

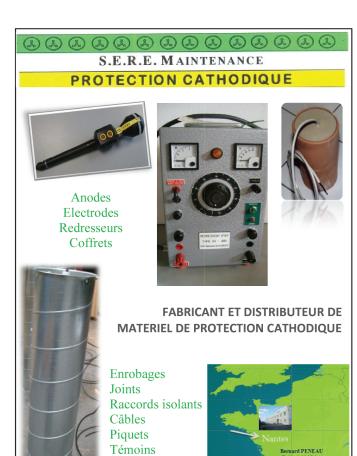
Dans une perspective de ce travail, nous nous sommes attachés maintenant à comprendre l'effet de la lumière UV et visible sur les propriétés catalytiques du cluster H, en réalisant des expériences d'électrochimie dans lesquelles l'enzyme adsorbée sur l'électrode est éclairée avec une lumière de puissance et longueur d'onde contrôlées, et des calculs TD-DFT (TD: « time dependant ») permettant d'élucider les mécanismes des réactions photoinduites [12]. Nous avons observé qu'une irradiation dans le domaine visible modifie la réactivité du cluster H alors que certains UV détruisent ce cluster. Nos études permettront de sonder les propriétés spectroscopiques du cluster H à travers la réactivité de ses états excités, mais aussi d'évaluer et de repousser certaines limites aux procédés de photo-bioproduction d'hydrogène.

Les auteurs, membres du Groupe Français de Chimie Bioinorganique (FrenchBIC, www.frenchbic.cnrs.fr), remercient le CNRS, Aix-Marseille Université et l'ANR (projet ECCHYMOSE, www.anrecchymose. wordpress.com) pour le financement de la partie française de ce travail. Ce travail a bénéficié d'une aide du gouvernement français au titre du Programme Investissements d'Avenir, Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université-A\*MIDEX.

[1] Voir le numéro spécial « Chimie et transition énergétique » de *L'Actualité Chimique*, **2016**, *408-409*, et en particulier l'article de M. Fontecave et M. Gomez-Mingot, Chimie bioinspirée pour l'énergie : transformer le Soleil en carburants, p. 46.

[2] a) Léger C., Dementin S., Structure et fonction des hydrogénases, in *L'énergie à découvert*, CNRS Éditions, **2013**; b) Actes du colloque « Biomimétisme et chimie durable, quelles voies de recherches pour la catalyse de l'hydrogène et la valorisation du dioxyde de carbone ? », novembre **2015** (https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/sites/default/files/Th%C3% A9ma%20-%20Biomimetisme%20et%20chimie%20durable.pdf); c) Berggren G. *et al.*, Biomimetic assembly and activation of [FeFe]-hydrogenases, *Nature*, **2013**, *499*, p. 66. [3] http://wp.me/p4Gdcq-2o

[4] de Poulpiquet A., Biopiles enzymatiques H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>: nanostructuration de l'interface électrochimique pour l'immobilisation des enzymes redox, *L'Act. Chim.*, **2016**, *411*, p. 17. [5] a) Kubas A. *et al.*, Mechanism of O<sub>2</sub> diffusion and reduction in FeFe hydrogenases, *Nat. Chem.*, **2017**, *9*, p. 88 (http://rdcu.be/jSMZ); b) Orain C. *et al.*, Electrochemical measurements



of the kinetics of inhibition of two FeFe hydrogenases by  $0_2$  demonstrate that the reaction is partly reversible, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, p. 12580.

Kits Protection

Cathodique

[6] a) Baffert C., Dementin S., Fourmond V., Léger C., L'electrochimie, un outil pour étudier les mécanismes enzymatiques, *L'Act. Chim.*, **2015**, *392*, p. 9; b) Sensi M., del Barrio M., Baffert C., Fourmond V., Léger C., New perspectives in hydrogenase direct electrochemistry, *Curr. Opin. Electrochem.*, **2017**, *5*, p. 135; c) Fourmond V., L'électroenzymologie, un outil pour étudier les enzymes redox, *L'Act. Chim.*, **2017**, *424*, p. 42.

[7] a) Cohen J., Kim K., King P., Seibert M., Schulten K., Finding gas diffusion pathways in proteins: application to  $0_2$  and  $H_2$  transport in CpI [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects, *Structure*, **2005**, *13*, p. 1321; b) Amaro R.E., A reflection on Klaus Schulten, *J. Chem. Theory Comput.*, **2017**, *13*, p. 1.

[8] a) Wang P.-H., Sancho D.D., Best R., Blumberger J., Computation of rate constants for diffusion of small ligands to and from buried protein active sites, *Methods Enzymol.*, **2016**, *578*, p. 299; b) Greco C. *et al.*, Combining experimental and theoretical methods to learn about the reactivity of gas-processing metalloenzymes, *Energy Environ. Sci.*, **2014**, *7*, p. 3543. [9] Baffert C. *et al.*, Hydrogen-activating enzymes: activity does not correlate with oxygen sensitivity, *Angew. Chem.*, **2008**, *120*, p. 2082.

[10] Kubas A., Sancho D.D., Best R.B., Blumberger J., Aerobic damage to [FeFe]-hydrogenases: activation barriers for the chemical attachment of O<sub>2</sub>, *Angew. Chem.*, **2014**, *126*, p. 4165. [11] http://wp.me/p4Gdcg-3S

[12] a) Sensi M., Baffert C., Greco C., Caserta G., Gauquelin C., Saujet L., Fontecave M., Roy S., Artero V., Soucaille P., Meynial-Salles I., Bottin H., de Gioia L., Reactivity of the excited states of the H-cluster of FeFe hydrogenases, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, p. 13162; b) Sensi M., Baffert C., Fradale L., Gauquelin C., Soucaille P., Meynial-Salles I., Bottin H., de Gioia L., Bruschi M., Fourmond V., Léger C., Bertini L., Photoinhibition of FeFe hydrogenase, *ACS Catalysis*, **2017**, *7*, p. 7378.

Christophe ORAIN était postdoctorant au moment de la réalisation de ce travail, Matteo SENSI est doctorant, Carole BAFFERT, maître de conférences, Vincent FOURMOND, chargé de recherche au CNRS, et Christophe LÉGER\*, directeur de recherche au CNRS, au Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Aix-Marseille Université, CNRS, Marseille.

\*christophe.leger@imm.cnrs.fr http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06