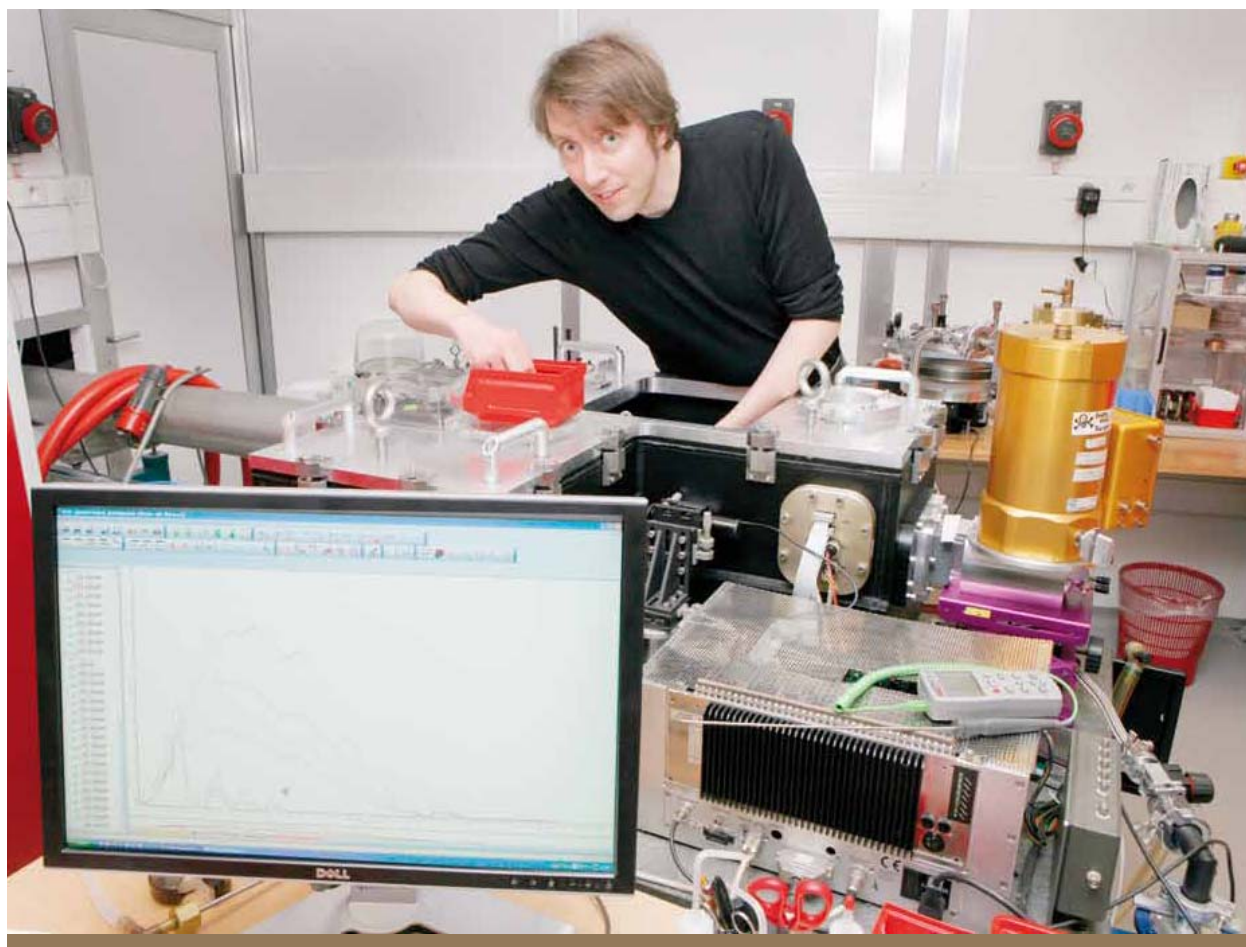


MÉTALLOPROTÉINES ET STRESS OXYDANT

L'apport des TéraHertz

Plus du tiers des enzymes contiennent un métal jouant un rôle clé dans leur site actif. Les métalloenzymes sont impliquées dans des processus cellulaires essentiels tels que la respiration, le transfert électronique, la synthèse de l'ADN ou les processus de détoxification. La ligne AILES de SOLEIL propose une approche particulièrement adaptée à l'étude de ces sites métalliques.

Jean-Blaise Brubach, scientifique sur AILES, prépare le spectromètre à transformée de Fourier.



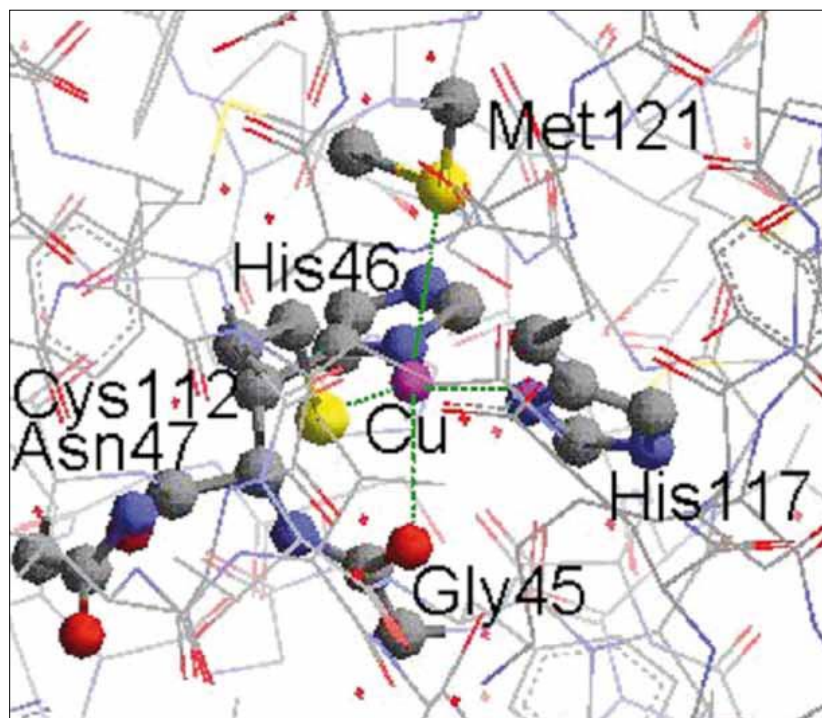
La diversité des réactions catalysées par les métalloenzymes (cf réf. 1) résulte non seulement de la nature du métal présent dans le site actif (Fe, Cu, Mn et Zn par exemple) mais également et principalement du fait que la structure de la protéine régule très finement les propriétés du centre métallique. La réactivité de ce dernier est contrôlée par la nature de ses ligands, par

les chaînes latérales des acides aminés au niveau de la première sphère de coordination, ainsi que par des interactions spécifiques (électrostatiques) mettant en jeu des motifs structuraux de la protéine à plus grande distance du métal (la seconde sphère de coordination). Il est par conséquent de la première importance d'étudier en détail les paramètres contrôlant la réactivité et la spécificité des sites métalliques dans les métalloprotéines.

Quand l'oxygène peut devenir toxique

Le stress oxydatif est un problème majeur qui touche toutes les cellules vivant en présence de dioxygène (O₂). Il est caractérisé par la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) hautement toxiques, inévitablement générés par le métabolisme aérobie en tant que produits secondaires de la respiration aérobie. Ces DRO correspondent aux intermédiaires des

Figure 1 : Site actif
Cu de l'azurine



processus de réduction de O_2 et comprennent les radicaux superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles. Heureusement, les cellules ont mis au point des systèmes enzymatiques antioxydants spécialisés dans l'élimination de chaque type de DRO. Cependant, toute faiblesse ou surcharge de ces systèmes antioxydants peut provoquer de graves lésions dans les cellules pouvant à terme conduire à la mort cellulaire. Il est à présent établi que le stress oxydatif est impliqué dans le développement de plusieurs maladies (cancers, Alzheimer, Parkinson), la dégénérescence maculaire liée à l'âge, ainsi que le vieillissement.

Jusqu'à présent, seuls deux types de métalloenzymes sont connus pour catalyser la détoxication des radicaux superoxydes hautement toxiques. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD) et de la superoxyde réductase (SOR) plus récemment découverte.

La Cu, Zn-SOD est omniprésente et représente près de 90 % de l'activité SOD totale dans les cellules humaines. Des dysfonctionnements ou des mutations de la SOD ont été

associés à plusieurs maladies et en particulier à la sclérose latérale amyotrophique familiale. La protection contre les maladies dégénératives liées au stress oxydatif a engendré une activité de recherche intense pour mettre au point des molécules antioxydantes possédant une activité SOD. Les résultats de telles approches sont cependant restés rares en raison des difficultés liées à la synthèse de petites molécules de complexes métalliques possédant une activité SOD efficace.

Les atouts de la spectroscopie différentielle

La superoxyde réductase, qui peut également détoxifier les superoxydes, présente un mécanisme réactionnel et des centres métalliques actifs différents de ceux de la SOD. Bien que la SOR ait uniquement été observée dans les cellules procaryotes, elle offre des applications potentiellement importantes en santé humaine. Elle pourrait constituer un modèle pour de nouvelles molécules antioxydantes présentant une alternative par rapport

aux mimétiques de la SOD et ayant la capacité de détoxifier les radicaux superoxydes avec une activité SOR. En conséquence, plusieurs groupes, principalement aux Etats-Unis, développent actuellement dans ce but des synthèses chimiques afin de modéliser le site actif de la SOR.

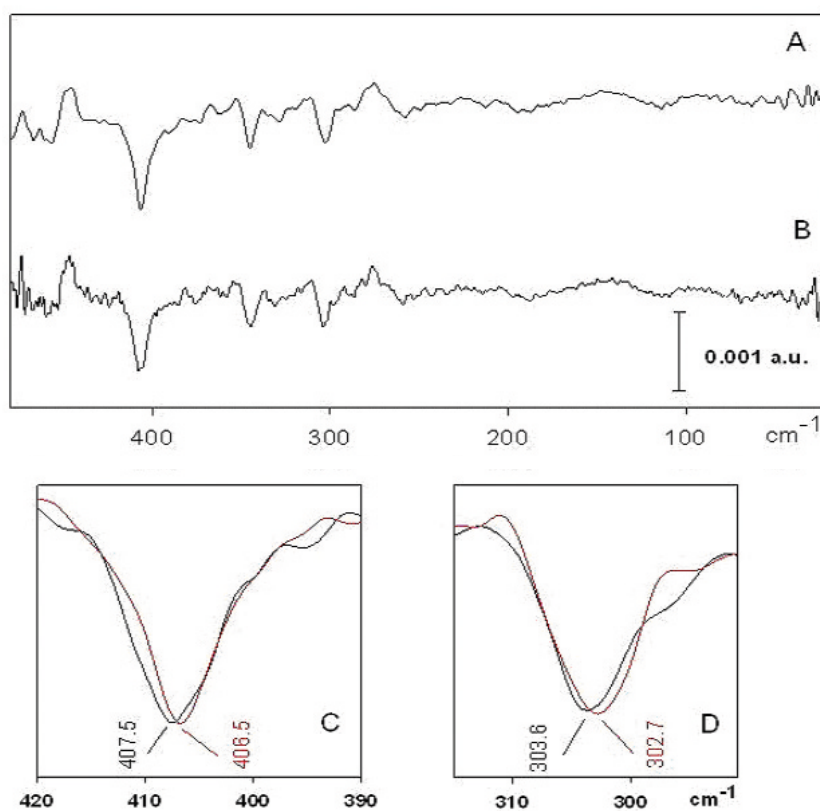
Toutes ces approches de synthèse exigent une connaissance des caractéristiques essentielles du ligand avec les liaisons métalliques devant être reproduites dans le complexe métallique afin d'imiter l'activité SOD ou SOR. Ces informations ne sont pas de nature triviale et sont loin d'avoir été obtenues pour les enzymes SOR et SOD.

L'étude fondamentale de la SOD et de la SOR sur AILES par spectroscopie dans l'infrarouge lointain vise à mieux caractériser les propriétés de ces liaisons métal-ligand, en lien avec la réactivité avec les superoxydes. Une application possible des résultats obtenus sera d'améliorer la conception de mimétiques plus actifs de ces deux enzymes.

La spectroscopie vibrationnelle (infrarouge) est extrêmement utile pour déterminer les propriétés des interactions métal-ligand, principalement en raison du fait qu'il s'agit d'une des rares techniques permettant de sonder directement la force de chaque liaison de coordination. Une absorption dans l'infrarouge se produit lorsqu'un changement du moment dipolaire est induit par l'excitation d'un mode de vibration. Par conséquent, presque toutes les vibrations provenant de n'importe quel groupe chimique d'une protéine sont susceptibles d'absorber dans l'infrarouge. La richesse des informations peut donc devenir une faiblesse, des informations spécifiques sur une liaison donnée étant parfois masquées par d'autres absorptions dans la même gamme d'énergie.

L'utilisation de la spectroscopie différentielle permet cependant de détecter des vibrations provenant de vibreurs individuels perturbés de manière spécifique en déclenchant une réaction hautement spécifique dans la protéine (cf réf. 2).

Figure 2 : spectres différentiels «réduit moins oxydé» IRTF à pH=8,5. A) résolution de 2cm⁻¹ B) résolution de 1cm⁻¹. C) D) superposition de spectres enregistrés avec la ⁶³Cu (noir) et la ⁶⁵Cu (rouge) -azurine.



Cu-azurine, enzyme « modèle »

Les équipes de LIPM (CNRS-CEA, Marseille), du LGPB (CNRS-CEA, Marseille) et de la ligne AILES ont tout d'abord démontré la faisabilité du couplage de l'électrochimie à la spectroscopie différentielle infrarouge à transformée de Fourier (IRTDF) dans l'infrarouge lointain pour identifier des bandes IR de vibrateurs individuels au niveau du site actif de la Cu-azurine. Cette métalloprotéine, impliquée dans des réactions de transfert électronique, a été choisie en raison de sa petite taille (14 kDa) et du fait que la sphère de coordination du Cuivre est similaire aux ligands de la SOD et de la SOR. L'ion redox Cu est coordonné au groupe thiolate d'une cystéine (Cys112) et à deux atomes d'azote d'une histidine (His46 et His117) en une géométrie triangulaire plane. Deux ligands axiaux, un thioéther de méthionine (Met121) et un atome d'oxygène d'un amide de glycine (Gly45), complètent la sphère de coordination du Cu (Figure 1). L'environnement de la protéine influence fortement les propriétés du centre Cu et en particulier les liaisons hydrogène for-

mées entre les acides aminés His46-Asn47 et l'atome de soufre de la Cys112. Ce modèle est utilisé comme référence pour mettre au point une méthodologie spectroscopique et théorique, visant à interpréter les spectres dans l'infrarouge lointain de métalloprotéines telles que la SOD et la SOR. Dans cette étude, les chercheurs se sont concentrés sur l'identification des vibrations Cu-ligand dans l'azurine. Pour ce faire, ils ont enregistré sur la ligne de lumière AILES des spectres différentiels IRTDF induits électrochimiquement dans la région 500-20 cm⁻¹ sur des échantillons d'azurine reconstituée avec du ⁶³Cu et du ⁶⁵Cu (Figure 2). En raison de la brillance élevée et de la grande stabilité de la ligne de lumière IR de SOLEIL, la qualité spectrale est plus élevée, le temps d'acquisition est bien plus court et la gamme spectrale est plus large qu'avec une source IR interne. Ceci sera de la plus haute importance pour étudier des protéines qui ne peuvent être utilisées à des concentrations élevées. Afin d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant, les résultats sont moyennés sur 15 à 20 cycles électrochimiques dont la durée totale est d'environ 20 heures.

Une approche validée par de premiers résultats

La substitution du Cu par ⁶³Cu et ⁶⁵Cu devrait altérer de manière spécifique les bandes IR mettant en jeu le Cu, c'est-à-dire les vibrations des liaisons métal-ligand. Des décalages de fréquence très faibles sont attendus. En effet, avec une résolution de 2 cm⁻¹ et de longs temps d'accumulation (de l'ordre de 20 heures), il a été possible d'identifier des décalages de bande inférieurs à 1 cm⁻¹ pour certaines des bandes détectées dans les spectres «réduit moins oxydé» (Figure 2). Le décalage d'environ 1 cm⁻¹ détecté pour la bande située à 406 cm⁻¹ confirme le fait que cette bande correspond au mode d'élongation de la CysS-Cu²⁺. Cette bande fait partie d'un massif de bandes détecté par spectroscopie de résonance Raman et associé aux vibrations de la Cys-Cu²⁺. Une seconde bande à 303 cm⁻¹ a été décalée de -0,8 cm⁻¹ suite à un échange ⁶³Cu/⁶⁵Cu. Cette bande est donc associée à la vibration ν_{as} (HisN-Cu²⁺-NHis). Par contre, les autres bandes n'ont pas été affectées par le marquage par le cuivre. Ces résultats expérimentaux préliminaires constituent la première identification certaine de vibrations infrarouge métal-ligand dans la Cu-protéine, comprenant des vibrations Cu-His. Ces résultats seront également comparés à ceux obtenus avec des échantillons dans H₂O et ²H₂O pour identifier des bandes infrarouge de la protéine mettant en jeu des protons échangeables.

Tous ces résultats posent les bases d'une analyse par calculs de chimie quantique des spectres de vibration.

Ce travail est financé par l'ANR (projet ANR PROMETHZ 2009)

→ Contacts :

catherine.berthomieu@cea.fr
jean-blaise.brubach@synchrotron-soleil.fr
rainer.hienerwadel@univmed.fr

Réf.1 : Gray, H.B. (2003) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100, 3563-3568.
Réf.2 : Berthomieu, C. and Hienerwadel, R. (2005) Biochim. Biophys. Acta 1707, 51-66.