

Le stress oxydant, acteur de l'inflammation

Oxydation de peptides

Résumé Toute maladie s'accompagne d'une formation d'entités oxydantes dans les cellules et les fluides biologiques, un phénomène connu sous le nom de stress oxydant. Ces oxydants, nommés espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui proviennent de la réduction de l'oxygène, sont à la fois néfastes car destructeurs de biomolécules et indispensables pour la lutte contre les infections. La chimie sous rayonnement est un outil indispensable pour l'étude des modifications subies par les biomolécules lors de ce stress oxydant, car elle permet d'identifier les réactions radicalaires, les radicaux libres formés et leurs propriétés chimiques, et de mesurer les constantes de vitesse des réactions qui se produisent. De telles études permettent de proposer des mécanismes réactionnels et de comprendre les dommages liés au stress oxydant. Cet article présente le résultat de l'étude de l'oxydation de dipeptides soufrés, principale cible des radicaux libres oxygénés, depuis la caractérisation des radicaux libres oxydés en radiolyse pulsée et leur identification par la simulation moléculaire, jusqu'aux produits finals obtenus par oxydation en radiolyse gamma ou électrochimie et caractérisés par spectrométrie de masse et spectroscopie IR. La structure et le nombre des radicaux libres peptidiques varient avec la séquence. Les produits finals comprennent le peptide sulfoxyde et d'autres produits, le nombre et la structure des radicaux libres variant avec la séquence peptidique.

Mots-clés Stress oxydant, radiolyse, radicaux libres, spectroscopie IRMPD, simulations moléculaires.

Abstract Oxidative stress, an agent of inflammation: the oxidation of peptides

All diseases are accompanied by the formation of oxidizing species in cells and in biological fluids, a phenomenon known as oxidative stress. These species derived from oxygen reduction and called reactive oxygen species (ROS) are at the same time necessary in order to fight infections and dangerous as they may damage biomolecules. Radiation chemistry is an essential tool to study modifications induced by free radicals during oxidative stress, to identify the free radicals coming from biomolecules, to study radical reactions and finally to measure the rate constants of the reactions occurring. Such studies allow to understand the damages linked to oxidative stress. This paper presents a recent study about the oxidation of sulphur-containing peptides, from the characterization of free radicals produced by pulse radiolysis and their identification by molecular simulation, up to the final products obtained by oxidation of dipeptides by gamma radiolysis or electrochemistry and characterized by mass spectrometry and IR spectroscopy. While the main end product is often the sulfoxide peptide with other species, the structure and number of peptide free radicals vary with the sequence.

Keywords Oxidative stress, radiolysis, free radicals, IRMPD spectroscopy, molecular simulations.

Toutes les maladies s'accompagnent de la formation d'entités oxydantes dans les cellules et les fluides biologiques ; c'est ce que l'on nomme le « stress oxydant ». Ces composés sont, entre autres, des radicaux libres ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{NO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$ etc.) et des molécules ou ions (H_2O_2 , $\text{ClO}\cdot$, $\text{ONOO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot^-$, $\text{NO}_3\cdot^-$ etc.). Le stress oxydatif ou oxydant est indispensable à la lutte contre les infections car il est à la base de la destruction oxydative des pathogènes, virus, bactéries... dans les globules blancs (neutrophiles et macrophages), mais il est délétère quand il est incontrôlé localement et temporellement (voir encadré 1). Il donne naissance à l'inflammation avec douleur, échauffement local et gonflement par œdème.

La chimie sous rayonnement est un outil indispensable pour l'étude des modifications subies par les biomolécules lors de ce stress. La radiolyse pulsée (encadré 2) permet d'étudier les réactions radicalaires, de visualiser les radicaux libres formés et d'étudier leurs propriétés chimiques, et enfin de mesurer les constantes de vitesse des réactions qui se produisent. Ceci doit être complété par une étude analytique qui caractérise les produits stables formés. Pour produire une quantité plus importante de produits, on utilise la radiolyse gamma continue (encadré 2). Enfin, les espèces transitoires observées sont

souvent difficiles à identifier par leur seul spectre d'absorption et l'attribution à une structure doit être assurée par des calculs théoriques. En fait, il y a peu d'études complètes car elles peuvent être lourdes et difficiles.

Dans cet article, nous prenons un exemple d'étude complète que nous avons menée sur l'oxydation de deux peptides contenant l'acide aminé méthionine par les radicaux libres $\cdot\text{OH}$: les peptides méthionine valine (Met Val) et valine méthionine (Val Met) (figure 1).

Ce travail s'insère dans une recherche plus vaste concernant l'oxydation de peptides, polypeptides et protéines. En effet, de nombreux troubles neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer sont associés à une accumulation de protéines oxydées dans l'organisme [1].

Le choix de la méthionine repose sur les raisons suivantes :

- c'est un acide aminé qui s'oxyde très facilement *in vivo* comme *in vitro* ;
- il existe des enzymes qui catalysent la réduction de sa forme oxydée la plus commune, la méthionine sulfoxyde, ce qui indique que l'oxydation de cet acide aminé a un rôle protecteur dans l'organisme ;
- enfin, la méthionine intervient dans des processus vitaux comme les méthylations de l'ADN ou la synthèse protéique.

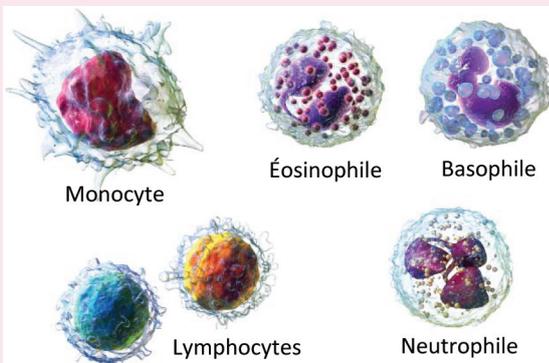
Encadré 1

Le stress oxydant et les globules blancs ou leucocytes

De nombreuses réactions enzymatiques ou non enzymatiques aboutissent à la réduction mono-électronique du dioxygène dans l'organisme, en formant des ions superoxyde $O_2^{\cdot-}$; c'est en particulier le cas lors de la phagocytose. Les ions $O_2^{\cdot-}$ sont relativement peu réactifs, mais donnent naissance dans des temps de l'ordre de la microseconde-milliseconde à d'autres produits radicalaires (comme des radicaux $\cdot OH$, oxydants forts) ou moléculaires (comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2) que l'on nomme communément les « espèces réactives de l'oxygène » (ERO, ou ROS en anglais pour « reactive oxygen species »). On désigne par **stress oxydatif ou oxydant** les conséquences d'un excès de ERO dans une partie de l'organisme. En effet, il aboutit à la destruction partielle ou totale des cellules, au gonflement local et à la douleur, ce qu'on nomme inflammation.

Les leucocytes ou globules blancs sont des cellules produites dans la moelle osseuse, présentes dans divers fluides biologiques dont le sang et de nombreux tissus conjonctifs de l'organisme. Il en existe plusieurs types (voir figure), chacun jouant un rôle important au sein du système immunitaire en participant à la protection contre les agressions d'organismes extérieurs de manière coordonnée. Ils constituent un maillon important dans la protection contre les infections en permettant l'élimination de nombreux agents étrangers (virus, bactéries, champignons, parasites). Il en existe deux grandes catégories : les leucocytes de l'immunité innée et ceux de l'immunité adaptative.

Les neutrophiles et les macrophages détruisent les cellules par phagocytose : ils ingèrent les bactéries ou virus et les détruisent par oxydation grâce à une formation massive d'agents oxydants dont les radicaux libres oxygénés et le peroxyde d'hydrogène (ERO).



Les leucocytes ou globules blancs. CC BY 3.0, Blausen.com staff (2014).

Encadré 2

Radiolyses pulsée et gamma

La radiolyse pulsée est une méthode résolue en temps, de visualisation des réactions provoquées par un rayonnement ionisant. Ce rayonnement est une impulsion d'électrons de haute énergie (3 à 10 MeV selon l'installation), avec des impulsions d'environ 1 ps à 1 μs . On suit les modifications radio-induites dans la solution par diverses méthodes, la plus commune étant l'absorption UV-visible. Le débit de dose est très élevé (ex. 10^6 à 10^9 Gy/s selon l'installation), alors que la dose est relativement faible (1 à 35 Gy environ, selon les cas) (voir schéma). Rappelons que l'unité Gray (Gy) se définit par 1 Gy = 1 J/kg.

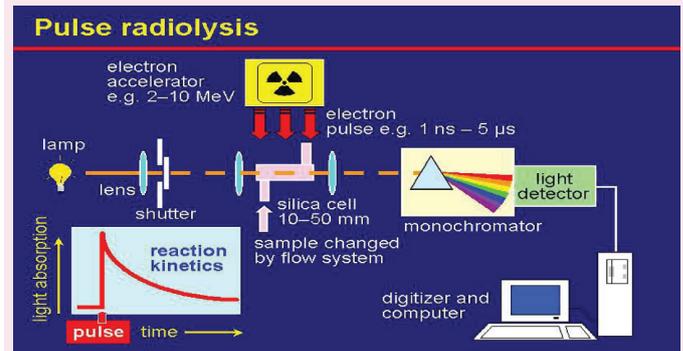


Schéma d'un montage de radiolyse pulsée (reproduit avec l'aimable autorisation de P. Wardman).

La radiolyse gamma (γ) utilise le rayonnement γ issu d'une source radioactive, ^{60}Co ou ^{137}Cs . Le débit de dose est beaucoup plus faible qu'en radiolyse pulsée (de 0,1 à 30 Gy/min) et la dose peut être beaucoup plus élevée (jusqu'à 10 kGy par exemple). On utilise cette méthode pour préparer des quantités plus importantes de produits de radiolyse, par exemple pour les analyser ou pour en faire la synthèse.

Oxydation en radiolyse pulsée : formation des espèces transitoires

L'oxydation de la méthionine est étudiée depuis très longtemps [2] et on sait que les radicaux libres formés (figure 2, réaction 1 ou 1') ont des spectres d'absorption qui varient d'un peptide à l'autre. Ces variations ont été longtemps mystérieuses : le soufre cation se complexerait avec un atome possédant un doublet libre formant ainsi une liaison à deux centres et trois électrons (2c-3e) dans laquelle ces trois

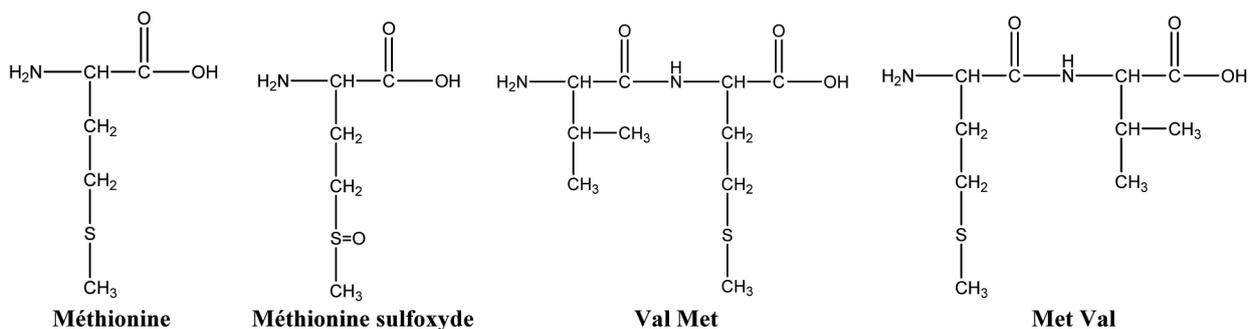


Figure 1 - Formules développées de la méthionine, de la méthionine sulfoxyde et des deux peptides Met Val et Val Met étudiés dans ce travail. On nomme N-terminale l'extrémité qui contient le groupement $-NH_2$ et C-terminale celle qui contient le groupement $-CO_2H$.

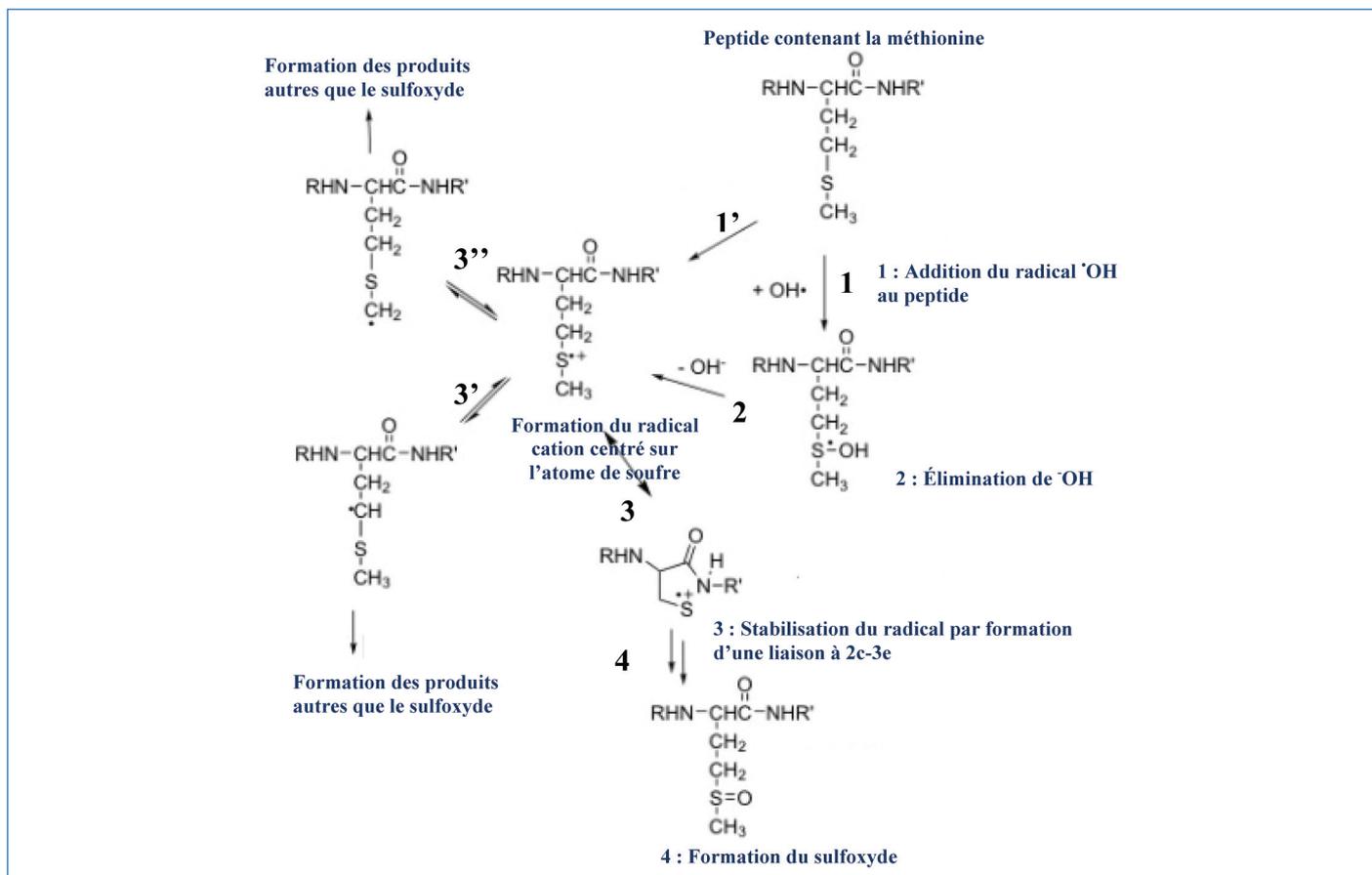


Figure 2 - Mécanisme d'oxydation d'un peptide contenant la méthionine.

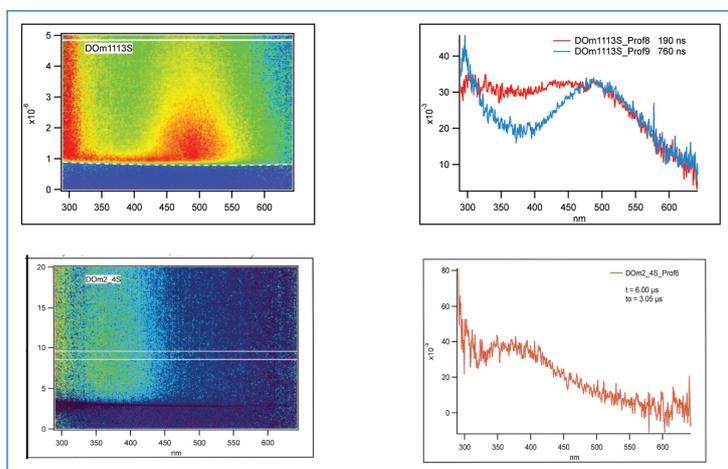


Figure 3 - Spectres d'absorption transitoire après oxydation des dipeptides Val Met (haut) et Met Val (bas) par les radicaux libres $\cdot\text{OH}$, mesurés grâce à la plateforme de radiolyse pulsée picoseconde ELYSE de l'Institut de Chimie Physique à Orsay. À gauche : données brutes (intensité en fonction de la longueur d'onde) ; à droite : spectres d'absorption. Concentration 1 mM dans l'eau ; dose 35 Gy.

électrons sont partagés par deux atomes, deux électrons dans une orbitale liante et le troisième dans une antiliante (figure 2, réaction 3).

Dans les peptides et les protéines, les hétéroatomes sont l'oxygène et l'azote, on peut aussi trouver le phosphore. Par la suite, le radical subit un deuxième transfert d'électron, une dismutation, suivie ou non d'une hydratation ou autres processus mal connus et non détectables en radiolyse pulsée (figure 2, réactions 3' ou 3'').

La figure 3 réunit les spectres d'absorption transitoires à l'échelle de la nanoseconde, après l'oxydation de chacun des deux peptides par les radicaux $\cdot\text{OH}$, mesurés sur la plateforme

de radiolyse pulsée ELYSE [3]. Leur observation montre qu'alors que les radicaux libres oxydés de Met Val présentent une large bande centrée sur 360 nm, ceux provenant de Val Met ont tout d'abord un large plateau qui évolue vers une bande centrée sur 500 nm. Ceux provenant de Val Met varient avec le temps et la concentration en peptide (de 100 μM à 5 mM), contrairement à ceux issus de Met Val qui restent semblables à eux-mêmes quand la température et la concentration varient. Il apparaît donc que la réaction d'oxydation a un mécanisme différent dans les deux peptides.

Identification des radicaux libres formés

Les spectres d'absorption sont les « empreintes digitales » des espèces transitoires ; c'est ce qui permet de les identifier. L'une des méthodes consiste à les calculer par la chimie quantique.

Nous avons calculé les spectres d'absorption par simulation moléculaire (voir encadré 3) d'un grand nombre d'espèces, issues de l'oxydation des deux peptides considérés Met Val et Val Met (formules données dans la figure 1).

Pour chacun des deux peptides, nous avons considéré les trois possibilités suivantes (figure 2) :

- le radical $\cdot\text{OH}$ se fixe sur l'atome de soufre ; on obtient ainsi un système appelé « adduit-OH » (réaction 1) ;
- le radical $\cdot\text{OH}$ prend un électron au peptide et s'éloigne sous forme d'un anion hydroxyle $\cdot\text{OH}^-$; un radical cation centré sur le soufre est formé (réaction 2) ;
- le radical $\cdot\text{OH}$ prend un atome H au peptide et s'éloigne sous la forme d'une molécule d'eau H_2O ; un radical neutre centré sur le soufre est formé. Nous avons considéré cinq possibilités pour cette prise de H : le groupe NH de la liaison peptidique,

le groupe NH_3^+ et les groupes CH en α des groupes $-\text{NH}_3^+$, $-\text{COO}^-$ et $-\text{SCH}_3$.

Nous avons donc fait 14 simulations moléculaires et en avons déduit les spectres d'absorption des systèmes correspondants – voir les spectres simulés sur la *figure 4*.

Pour interpréter les spectres mesurés, il faut réunir les arguments de la spectroscopie (les spectres simulés) et de la thermochimie. Cette dernière consiste à calculer les énergies libres des trois types de réaction mentionnés plus haut. Le calcul nous a donné les résultats suivants :

- la formation de l'adduit-OH présente des ΔG voisins de zéro ; il est difficile de conclure s'il se forme ou non ;
- la formation du radical cation est possible pour Val Met avec $\Delta G = 0,0$ kJ/mol, mais impossible pour Met Val avec $\Delta G = + 40,0$ kJ/mol ;
- la formation de radicaux neutres par prise de H et élimination d'une molécule d'eau est toujours facile, avec des ΔG très négatifs, entre - 50 et - 100 kJ/mol.

Nous pouvons désormais proposer une interprétation des spectres mesurés (*figure 3*).

- Le peptide Met Val est le plus simple : l'adduit-OH n'est pas formé car il serait instable et disparaîtrait à l'échelle de la nanoseconde, ce qui n'est pas observé. La seule possibilité est donc la formation de radicaux neutres par prise de H. Si cette prise se fait sur le groupe $-\text{NH}_3^+$, alors le système est stabilisé par liaison SN^+ à trois électrons (*figure 5*) et présente une bande d'absorption intense à 363 nm (*figure 4*). Tous les autres radicaux neutres peuvent se former, avec des prises de H en des sites variés, et leur absorption explique la partie gauche du spectre observé.

- Le cas du peptide Val Met est plus compliqué : on doit d'abord admettre que l'adduit-OH ne se forme pas, par analogie avec Met Val. Cela étant dit, on peut attribuer la bande principale du spectre mesuré au radical cation du peptide, puisque le spectre calculé présente une large bande à 367 nm (*figure 4*). Le système est stabilisé par une liaison SO^+ à trois électrons (*figure 5*). Quant à la partie gauche du spectre mesuré, elle peut être attribuée aux radicaux neutres formés par prise de H, exactement comme dans le cas de Met Val.

- Il reste deux choses à expliquer à propos de Val Met. D'abord la bande à 500 nm qui ne dépend pas du temps : nous l'attribuons à des dimères neutres $(\text{Val Met})_2$ présents en solution avant la radiolyse ; l'oxydation d'un tel dimère produit le dimère cationique $(\text{Val Met})_2^+$, qui est connu pour absorber dans cette zone. Ensuite l'effet de concentration observé : nous l'attribuons à la réaction bimoléculaire de transfert de proton :



Ainsi la déprotonation du cation produit un radical neutre identique à ceux obtenus par prise de H sur le peptide initial. Cette réaction de déprotonation alimente donc la partie gauche du spectre d'absorption, ce qui explique le comportement temporel observé (*figure 3*).

Électrochimie

Il est intéressant de connaître les propriétés chimiques des radicaux libres formés, car on pourrait ainsi avoir une idée des conséquences de leur formation dans une protéine *in vivo*. C'est pourquoi nous avons eu recours à l'électrochimie.

La *figure 6* montre les courbes de voltammétrie cyclique obtenues avec des solutions des deux dipeptides, Val Met

Encadré 3

La simulation moléculaire : deux méthodes

On appelle simulation moléculaire l'exploration de la surface de potentiel d'une molécule, c'est-à-dire la recherche des arrangements atomiques pertinents à la température demandée (ici 300 K). Le résultat d'une telle simulation est donc une liste de configurations de la molécule représentant son comportement thermique. Dans cette liste, les configurations courantes apparaissent un grand nombre de fois et les configurations rares un petit nombre de fois, ces nombres étant gouvernés par la loi de Boltzmann. La théorie de l'ensemble canonique montre qu'une simulation à volume constant est gouvernée par la constance de l'énergie libre : $F = E - TS = \text{cste}$, où E est l'énergie et S l'entropie [10]. Pour avoir une description réaliste du comportement thermique de nos peptides, nous avons bâti des listes de 20 000 configurations, et parfois 50 000 pour contrôler la précision.

Choisir une méthode de simulation moléculaire signifie faire trois choix indépendants : comment explorer la surface de potentiel ? Comment calculer l'énergie potentielle des configurations moléculaires ? Et comment simuler le solvant si le système est en solution ? Nous avons utilisé deux méthodes courantes d'exploration de surface de potentiel : la dynamique moléculaire (DM) et la méthode Monte-Carlo (MC). La DM utilise les équations de la dynamique newtonienne – il faut donc calculer les gradients de l'énergie du système – et un thermostat qui impose la température. La MC utilise le hasard : les déplacements atomiques sont gouvernés par un générateur de nombres aléatoires, ces déplacements sont acceptés ou refusés par l'algorithme de Metropolis qui impose la loi de Boltzmann. Pour nos calculs, nous avons utilisé la dynamique moléculaire BOMD (« born-Oppenheimer molecular dynamics ») avec le logiciel CP2K [11] et la méthode Monte-Carlo du code Gibbs [12].

Le calcul de l'énergie potentielle doit être rapide car il faut le faire 20 000 fois pour bâtir la liste de configurations. Deux méthodes sont possibles : les champs de force classiques et la DFT (« density functional theory »). Nous avons choisi cette dernière car elle est bien adaptée aux systèmes radicalaires observés en radiolyse à temps court. Les calculs ont été faits avec le logiciel Gaussian 09 [13].

La simulation du solvant peut se faire de façon explicite ou implicite. De façon explicite, on place le soluté dans une boîte d'eau, contenant quelques centaines de molécules d'eau ; cela signifie que l'exploration de la surface de potentiel doit inclure ces molécules. De façon implicite, on assimile le solvant à un milieu continu polarisable ; c'est la méthode PCM (« polarisable continuum medium »), que nous avons choisie.

Dans ces conditions, une simulation moléculaire de 20 000 conformations par MC demande environ deux semaines de calcul sur un ordinateur actuel à huit cœurs. Une fois que la simulation est faite, il faut calculer le spectre d'absorption de la molécule, c'est-à-dire sa capacité d'absorption d'un photon d'énergie variable. Les spectres d'absorption IR peuvent être calculés à partir des simulations moléculaires grâce à des outils mathématiques qui exploitent le signal obtenu à partir des simulations [14]. Les spectres d'absorption UV sont calculés à l'aide de la méthode TDDFT (« time dependent DFT »), qu'on a appliquée à une sous-liste de configurations Monte-Carlo, c'est-à-dire à une configuration sur 50 de la liste complète.

et Met Val. Le démarrage de l'oxydation de Val Met a lieu à des valeurs de potentiel moins positives que pour Met Val (1,266 et 1,322 V, respectivement), et les potentiels de pic suivent le même ordre (1,520 et 1,550 V, respectivement), et donc Val Met est plus facile à oxyder que Met Val. La même tendance a été observée pour les dipeptides Gly Met et

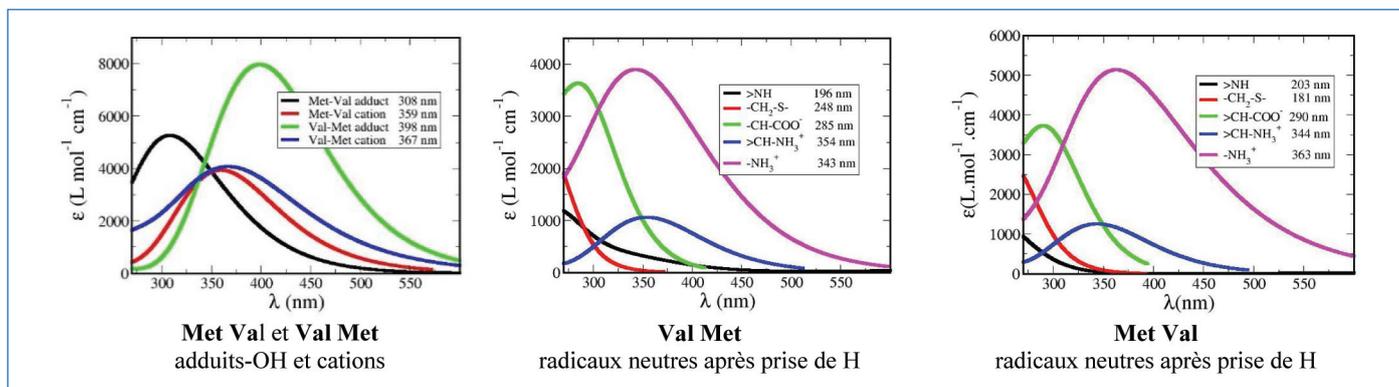


Figure 4 - Spectres d'absorption simulés des différents radicaux obtenus par oxydation des deux peptides : adduits-OH, radicaux cations et radicaux neutres obtenus par prise de H.

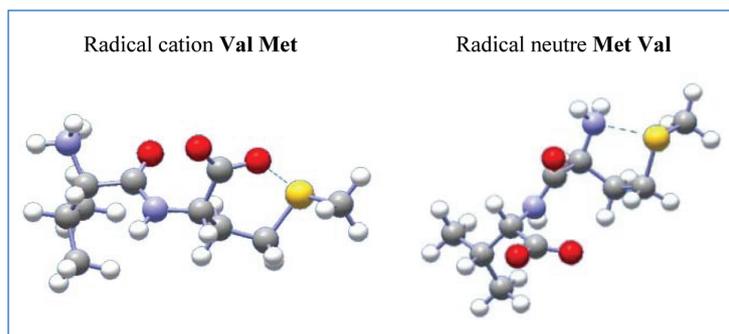


Figure 5 - Structures moléculaires des deux principaux radicaux libres observés. On montre en pointillés les liaisons SO et SN à 2-centres et 3-électrons.

Met Gly. Ceci semble indiquer que le potentiel redox du dipeptide contenant la méthionine est moins positif lorsque le résidu méthionine est en position C-terminale. Il semble donc que les radicaux libres n'aient pas les mêmes propriétés chimiques : il est plus facile de former un radical libre avec une liaison SN (Met Val) qu'initier un processus complexe (Val Met). Ces peptides, quoique très semblables, ont une chimie différente. Ceci peut avoir des conséquences *in vivo* : un radical plus oxydant prendra plus facilement des électrons aux autres biomolécules.

Identification des produits finals formés

Avant cette étude, le seul produit final connu était la méthionine sulfoxyde. Afin d'identifier tous les produits de l'oxydation de peptides contenant la méthionine, nous avons utilisé une technique originale qui couple la spectroscopie infrarouge (IR) à la spectrométrie de masse en piège à ions : la spectroscopie IRMPD (« IR multiple photon dissociation »). Les produits sont tout d'abord caractérisés par spectrométrie de masse à haute résolution – qui permet d'avoir la masse exacte des espèces étudiées – et la spectrométrie de masse tandem – qui donne accès aux fragments de l'espèce et permet par conséquent d'avoir des renseignements sur la structure des ions –, puis par spectroscopie IRMPD [4] (encadré 4). Les spectres IR expérimentaux sont enfin comparés aux spectres simulés pour plusieurs géométries possibles des dipeptides protonés en phase gazeuse afin d'attribuer les bandes observées dans le spectre IR, de déterminer la présence de certains groupements fonctionnels (notamment le groupement S=O dans ces études) et la structure tridimensionnelle adoptée par l'ion en phase gazeuse.

Nous avons tout d'abord caractérisé la signature spectrale du groupement S=O dans la méthionine sulfoxyde commerciale,

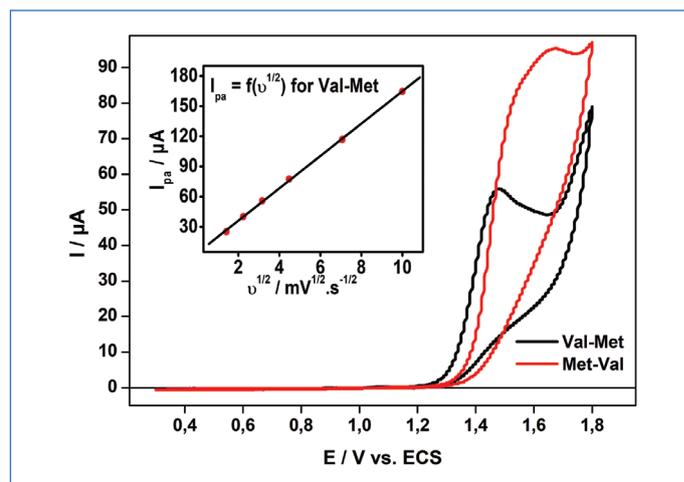


Figure 6 - Voltammogrammes cycliques obtenus avec des solutions de dipeptides Val Met et Met Val à 1 mM dans du perchlorate de sodium 0,1 M, pH = 2, à une vitesse de balayage de 10 mV/s. Électrode de travail : diamant dopé au bore ; électrode auxiliaire : platine ; électrode de référence : calomel saturé (ECS). La dépendance linéaire du courant de pic par rapport à la racine carrée de la vitesse de balayage montre que le processus est contrôlé par la diffusion des espèces vers la surface de l'électrode.

utilisée comme modèle. L'élongation du groupement S=O a été identifiée vers 950 cm^{-1} (figure 7) dans une région peu congestionnée du spectre IR.

Nous avons ensuite étudié plusieurs peptides oxydés pour sonder l'effet des groupements voisins sur la nature des produits finals d'oxydation. Afin de simuler l'effet du stress oxydant, les peptides ont été irradiés en utilisant la source au cobalt 60 à l'Institut de Chimie Physique (encadré 2) de façon que le principal agent oxydant dans nos solutions soit le radical $\cdot\text{OH}$.

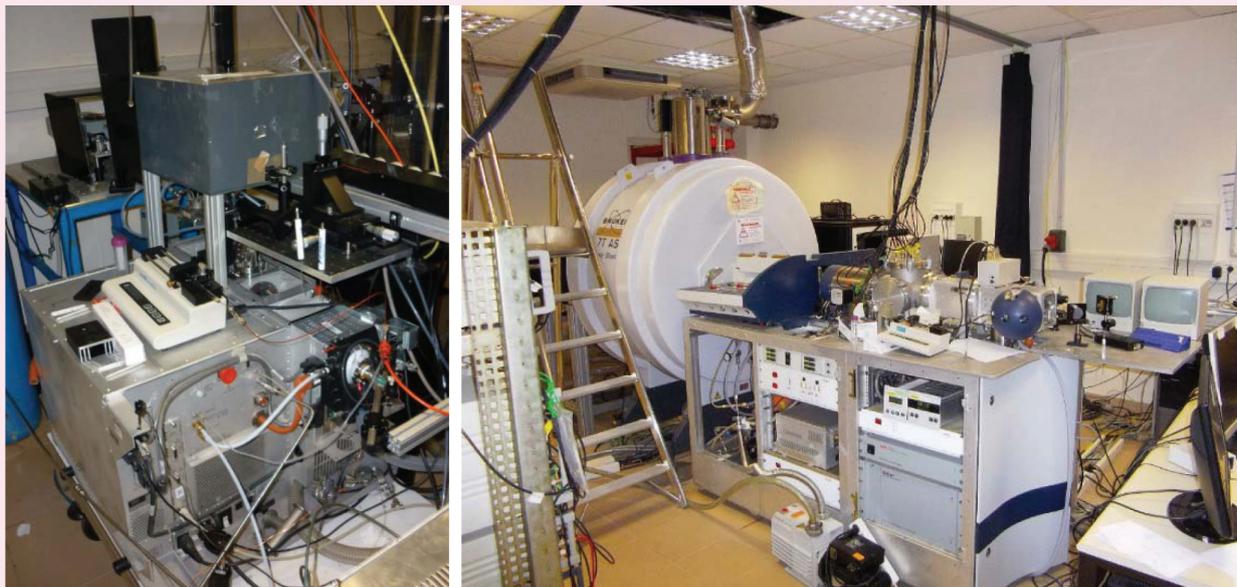
Grâce à la spectrométrie de masse et à la spectroscopie IRMPD, nous avons observé que l'oxydation de peptides ne conduit pas toujours aux mêmes produits finals. De plus, le rendement des réactions de formation de produits secondaires varie en fonction de la position de la méthionine dans la séquence du peptide [5]. Dans le cas de plusieurs dipeptides contenant la méthionine en position N- ou C-terminale, la radiolyse conduit principalement à la formation de la méthionine sulfoxyde.

En ce qui concerne Val Met et Met Val, nous avons observé que la présence de la valine, comme environnement de la méthionine dans le dipeptide, mène à la formation de plusieurs produits. Pour les deux dipeptides, le sulfoxyde est observé parmi les produits d'oxydation. Les spectres IRMPD des espèces correspondant au peptide +16 Da (addition d'un

Pièges à ions et spectroscopie IRMPD

La spectrométrie de masse permet de mesurer la masse d'objets chargés (le rapport m/z). Un piège à ions est un type particulier de spectromètre de masse qui permet en plus de stocker les ions (particules chargées) suffisamment longtemps (1 s ou plus) afin de permettre l'interaction avec les photons. La densité d'ions dans un piège étant faible, il n'est pas possible de mesurer la variation d'intensité après absorption de photons IR, comme dans un spectrophotomètre IR classique. Par conséquent, deux pièges à ions commerciaux (un piège de Paul et un FT-ICR 7T) [15] équipés avec une source électrospray (ESI) – source bien adaptée à mettre des biomolécules intactes en phase gazeuse – ont été modifiés au sein de la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie Physique à Orsay (voir photos) pour permettre l'accès des photons IR. Une impulsion laser infrarouge permet d'induire la fragmentation des ions, sélectionnés en masse suite à l'absorption résonante de plusieurs photons ; on parle alors de spectroscopie IRMPD.

Le déclenchement de la fragmentation détectée par spectrométrie de masse est donc une sonde d'absorption. En variant l'énergie des photons sur une large gamme dans la région IR ($800\text{-}3\,800\text{ cm}^{-1}$) en utilisant le laser à électrons libres CLIO (Centre Laser Infrarouge d'Orsay) [16] ou bien un laser commercial OPO/OPA (« optical parameter oscillator/optical parameter amplifier »), cette technique permet d'enregistrer le spectre IR de l'espèce sélectionnée en masse.



Les pièges à ions de type piège de Paul (à gauche) et FT-ICR 7T (« Fourier transform ion cyclotron resonance ») (à droite) installés au sein de la plateforme de spectrométrie de masse SMAS de l'Institut de Chimie Physique et modifiés pour réaliser les expériences de spectroscopie IRMPD.

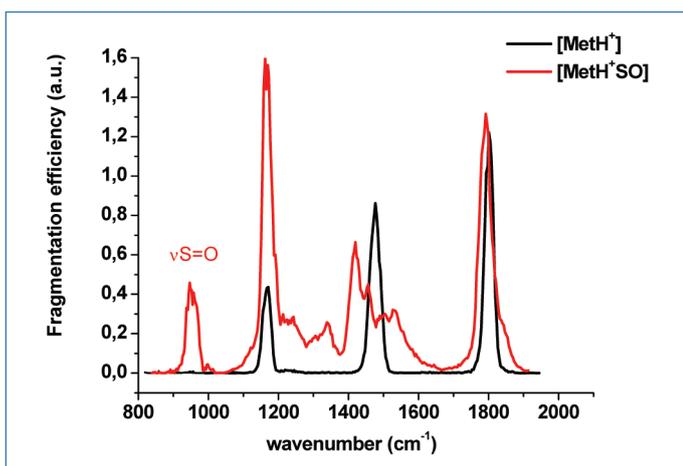


Figure 7 - Comparaison des spectres IRMPD de la méthionine protonée (en noir) et de la méthionine sulfoxyde protonée (en rouge).

atome d'oxygène), reportés sur la figure 8, présentent une bande supplémentaire par rapport au peptide non oxydé autour de $1\,000\text{ cm}^{-1}$.

Dans le cas de Met Val, c'est le principal produit d'oxydation. Dans le cas de Val Met, le principal produit d'oxydation correspond à la perte de H_2 du sulfoxyde aboutissant à une double

liaison -C=C- . Nous pouvons essayer de mettre en relation ce comportement avec les espèces transitoires formées. Dans le cas de Val Met, un radical cation est observé. Ceci semble donc être de première importance pour l'élimination de H_2 , car ce produit n'est pas observé dans le cas de Met Val, qui donne essentiellement un radical neutre qui a déjà perdu un H au cours des premiers instants de l'oxydation et qui par conséquent ne peut pas en perdre un deuxième après la formation du sulfoxyde. La position C-terminale de la méthionine dans le dipeptide semble être également très importante pour la formation des produits autres que le sulfoxyde.

Pour interpréter les spectres IRMPD et prendre en compte la grande flexibilité de ces systèmes à température ambiante (température de nos expériences), des calculs de dynamique moléculaire type BOMD (encadré 3) ont été réalisés. Ces calculs prennent en compte des effets de température et permettent un bon accord des spectres théoriques avec les spectres IRMPD, comme illustré dans la figure 9 pour le dipeptide Met Val.

Une variation importante de l'angle dièdre entre les groupements -NH et -CO de la liaison peptidique, ainsi qu'une variation de la distance entre les groupements -NH_3^+ et -S=O , illustre cette dynamique entre plusieurs conformations des dipeptides qui sont en réalité présents en phase gazeuse et contribuent au spectre IRMPD, d'où la nécessité de l'utilisation

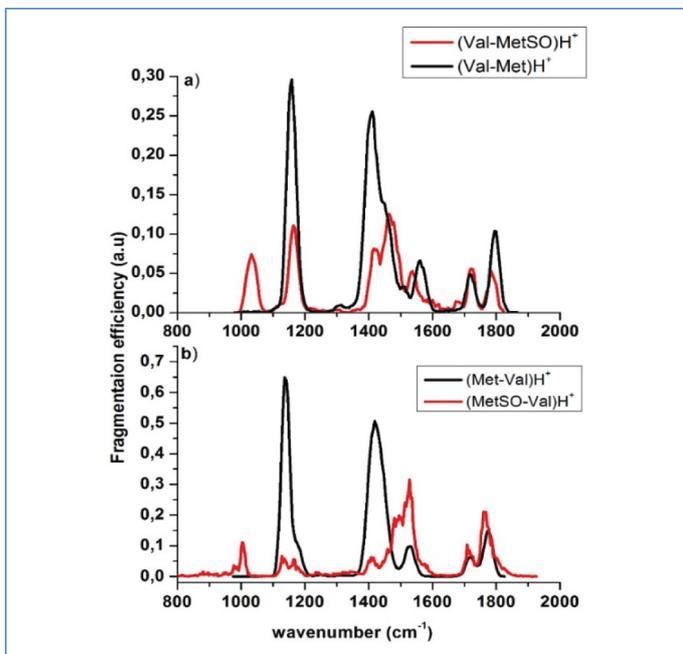


Figure 8 - Spectres IRMPD des dipeptides a) (Val Met) H^+ (noir) et (Val MetSO) H^+ (rouge) et b) (Met Val) H^+ (noir) et (MetSO Val) H^+ (rouge).

de la dynamique moléculaire. Les calculs nous fournissent la structure tridimensionnelle de l'ion en phase gazeuse et permettent de confirmer que la bande à $1\ 000\text{ cm}^{-1}$ est bien attribuable au groupement $-S=O$.

En plus du sulfoxyde et de la formation de la double liaison, on observe d'autres produits d'oxydation si la valine est remplacée par un autre acide aminé (figure 10). La décarboxylation a été observée suite à l'oxydation du peptide lysine méthionine (Lys Met) et le S-méthyl glutathion (GS Me), un tripeptide formé d'acide glutamique, de S-méthyl cystéine et de glycine. Les résultats obtenus ont montré que pour les produits finals de l'oxydation, comme observé pour les intermédiaires réactionnels, deux mécanismes de décarboxylation sont possibles. Le premier mécanisme observé pour Lys Met nécessite la présence d'une méthionine en position

C-terminale et a lieu essentiellement quand le soufre et le groupement carboxylique sont localisés sur le même acide aminé via un mécanisme impliquant l'interaction entre le soufre oxydé et le groupement carboxylique.

Les résultats obtenus pour le peptide GS Me montrent que la décarboxylation peut avoir lieu même si le groupement carboxylique (de l'acide glutamique) se trouve en position N-terminale. Ce mécanisme implique l'interaction entre un adduit contenant un radical $\cdot OH$, formé dans les premières étapes de l'oxydation et le groupe amine protoné.

Pour la première fois, la formation d'un sulfone (addition de deux atomes d'oxygène au soufre) a pu être mise en évidence parmi les produits finals d'oxydation dans le cas de GS Me ; son rôle n'est pas encore bien connu.

Quels sont les débouchés et perspectives ?

Grâce à la complémentarité des méthodes employées, nous avons élucidé le mécanisme total de l'oxydation de la méthionine dans les peptides. Rappelons que cet acide aminé essentiel – il faut en ingérer, nous ne le synthétisons pas – a un rôle vital car il gouverne la synthèse peptidique et intervient dans des mécanismes de modification de l'ADN [6]. L'importance du processus d'oxydation de la méthionine est illustrée par l'existence d'enzymes de réduction de sa forme oxydée sulfoxyde, les méthionine sulfoxyde réductases. Il se pourrait donc que la méthionine joue un rôle d'antioxydant cellulaire. Les résultats de radiolyse pulsée ont montré que les radicaux libres formés varient selon la séquence du peptide et la nature des acides aminés voisins. Ces radicaux libres ont été identifiés grâce aux simulations moléculaires. L'électrochimie indique que les potentiels redox des radicaux libres varient, donc d'éventuelles réactions de transfert d'électron entre le radical méthionyl et d'autres résidus sont affectées par la structure. Il n'a pas été possible de mesurer les potentiels redox car les oxydations étaient irréversibles, mais des calculs de chimie quantique ont montré qu'ils varient avec la structure des radicaux libres, et notamment avec la liaison que fait le soufre, en accord avec ces résultats expérimentaux.

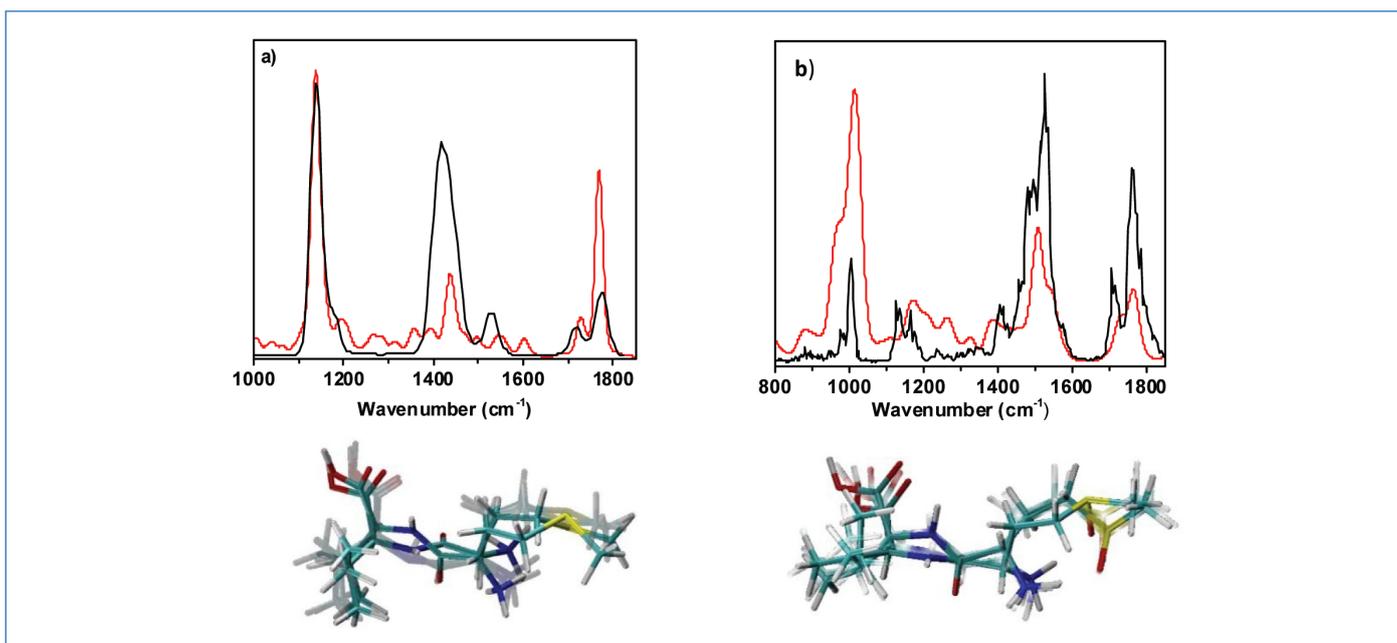


Figure 9 - Comparaison du spectre IRMPD (noir) et simulé (rouge) pour a) (Met Val) H^+ et b) (MetSO Val) H^+ . Les structures reportées représentent la superposition d'images (snapshots) sélectionnées à partir de trajectoires de dynamique moléculaire et illustrent la flexibilité des systèmes étudiés et l'effet de température.

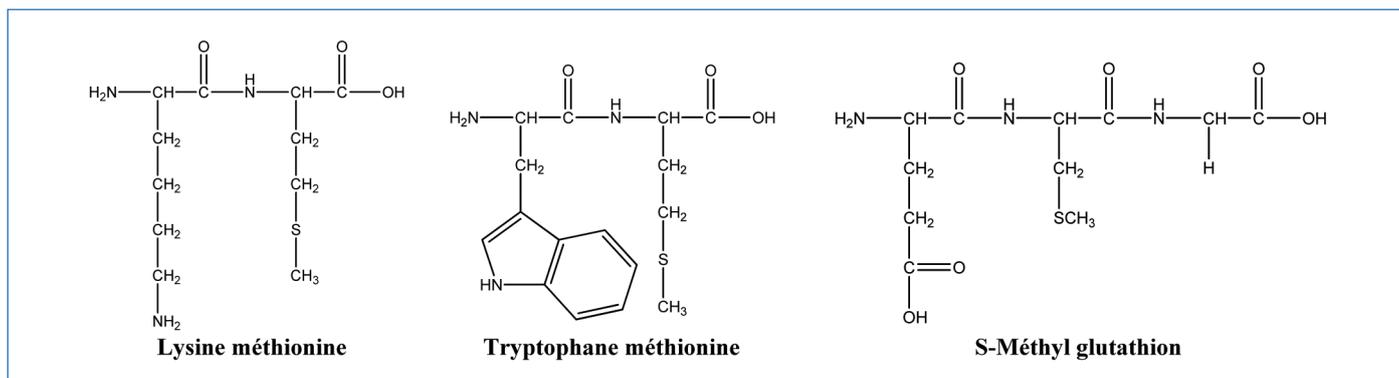


Figure 10 - Formules développées des dipeptides lysine méthionine, tryptophane méthionine et S-méthyl glutathion.

En ce qui concerne les produits finals formés, nous en avons mis en évidence bien d'autres en plus de la méthionine sulfoxyde qui est le principal composé final de l'oxydation [7]. Son rendement de formation dépend de plusieurs facteurs, pas tous connus à ce jour, parmi lesquels la géométrie du composé. Nous avons aussi observé le sulfone, le peptide ayant subi la décarboxylation, ou la perte de H₂. La formation de ces produits (figure 2), en compétition avec la sulfoxyde, représente des modifications irréversibles qui peuvent influencer la conformation des protéines et altérer leur activité [8]. De plus, ils ne sont pas réparables et constituent donc des modifications irréversibles et potentiellement nocives.

Rappelons que les protéines sont présentes partout dans les cellules et qu'elles effectuent tout le travail nécessaire à la vie : utilisation de l'oxygène, stockage de l'énergie contenue dans les aliments, synthèse de l'ADN, l'ARN... Les études présentées ici permettent de comprendre ce qui peut se passer lorsque les protéines sont soumises à un stress oxydant, donc au cours des inflammations : pourront-elles encore faire leur travail correctement ? N'auront-elles pas des propriétés chimiques parasites ? Ce type d'étude permet de prédire la réactivité des protéines oxydées par les radicaux hydroxyle par exemple : pour les radicaux libres, apparition de propriétés oxydantes qui vont pouvoir léser les molécules voisines comme dans le peptide méthionine enképhaline (présent dans le cerveau), où la méthionine joue un rôle de pro-oxydant [9] ; additions de ces radicaux libres sur d'autres protéines, sur l'ADN... et bien d'autres. Il est tout aussi important de connaître les produits finals qui peuvent, selon les cas, s'accumuler dans les cellules comme dans les maladies neurodégénératives et tuer les neurones, être éliminés, ou encore acquérir de nouvelles propriétés inconnues.

Les auteurs remercient tous les collaborateurs ayant participé aux travaux et discussions décrits dans cet article : M.E. Crestoni, L. Guidoni et B. Gregori (Université de Rome « La Sapienza », Italie), M. Ignasiak (Université Adam Mickiewicz, Poznan, Pologne), J. Bergés (Laboratoire de Chimie Théorique, Sorbonne Université), J.-M. Teuler (ICP) et les moyens de calculs de l'ICP pour les simulations Monte-Carlo, ainsi que J.-L. Marignier et M. Mostavafi (ICP) pour l'accès à la plateforme ELYSE, J.-M. Ortega et P. Maître pour l'accès au laser à électrons libres CLIO (Centre laser infrarouge d'Orsay du ICP) et à la plateforme de spectrométrie de masse SMAS de l'ICP.

[1] A.D. Butterfield, β -amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease, *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, 10, p. 495-506; A.D. Butterfield, J. Kanski, Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid β -peptide 1-42, *Peptides*, **2002**, 23, p. 1299-309.

[2] K.-O. Hiller, K.-D. Asmus, Oxidation of methionine by X₂ in aqueous solution and characterization of some S therefore X three-electron bonded intermediates: a pulse radiolysis

study, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1981**, 40, p. 583-95; J. Mönig, M. Göbl, K.-D. Asmus, Free radical one-electron versus hydroxyl radical-induced oxidation: reaction of trichloromethylperoxyl radicals with simple and substituted aliphatic sulphides in aqueous solution, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1985**, 5, p. 647-51; K.-O. Hiller, K.-D. Asmus, Ti²⁺ and Ag²⁺ metal-ion-induced oxidation of methionine in aqueous solution: a pulse radiolysis study, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys., Chem. Med.*, **1981**, 40, p. 597-604.

[3] J. Belloni *et al.*, ELYSE, a picosecond electron accelerator for pulse radiolysis research, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. A: Accel. Spectrom., Detect. Assoc. Equip.*, **2005**, 539, p. 527-39.

[4] P. Maître *et al.*, Applications of infrared multiple photon dissociation (IRMPD) to the detection of posttranslational modifications, *Chem. Rev.*, **2020**, 120, p. 3261-95.

[5] M. Ignasiak *et al.*, Characterisation by mass spectrometry and IRMPD spectroscopy of the sulfoxide group in oxidized methionine and related compounds, *Chem. Phys. Lett.*, **2011**, 502, p. 29-36; M. Ignasiak, P. de Oliveira, C. Houée-Levin, D. Scuderi, Oxidation of methionine-containing peptides by [•]OH radicals: is sulfoxide the only product? Study by mass spectrometry and IRMPD spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **2013**, 590, p. 35-40; D. Scuderi, M.T. Ignasiak, X. Serfaty, P. de Oliveira, C. Houée-Levin, Tandem mass spectrometry and infrared spectroscopy as a help to identify peptide oxidized residues, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2015**, 17, p. 25998-6007; B. Gregori *et al.*, One electron oxidation of methionine-containing dipeptides of reverse sequence: sulfur versus sulfoxide characterized by IRMPD spectroscopy, static and dynamics DFT simulations, *J. Phys. Chem. B*, **2017**, 121, p. 2083-94.

[6] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*, 4th ed., Wiley & Sons, **2010**.

[7] D.B. Oien, J. Moskovitz, Substrates of the methionine sulfoxide reductase system and their physiological relevance, *Curr. Top. Dev. Bio.*, **2007**, 80, p. 93-133.

[8] Z.J. Cui, Z.Q. Han, Z.Y. Li, Modulating protein activity and cellular function by methionine residue oxidation, *Amino Acids*, **2012**, 43, p. 505-17.

[9] J. Bergés, P. de Oliveira, I. Fourré, C. Houée-Levin, The one-electron reduction potential of methionine-containing peptides depends on the sequence, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, p. 9352-62; O. Mozziconacci *et al.*, Methionine residue acts as a prooxidant in the [•]OH-induced oxidation of enkephalins, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, p. 12460-72; P. Archirel, C. Houée-Levin, J.L. Marignier, Radiolytic oxidation of two inverse dipeptides, methionine-valine and valine-methionine: a joint experimental and computational study, *J. Phys. Chem. B*, **2019**, 123, p. 9087-97.

[10] D. Frenkel, B. Smit, *Understanding Molecular Simulations*, Academic Press, New York, **1996**.

[11] www.cp2k.org

[12] P. Ungerer, B. Tavitian, A. Boutin, *Applications of Molecular Simulations in the Oil and Gas Industry*, Éditions Technip, Paris, **2005**.

[13] Gaussian 09, Rev. D01, Gaussian Inc., Wallingford, CT 2009.

[14] M. Martinez, M.P. Gaigeot, D. Borgis, R. Vuilleumier, Extracting effective normal modes from equilibrium dynamics at finite temperature, *J. Chem. Phys.*, **2006**, 125, 144106.

[15] J.M. Bakker, T. Besson, J. Lemaire, D. Scuderi, P. Maître, Gas-phase structure of a π -allyl-palladium complex: efficient infrared spectroscopy in a 7T Fourier transform mass spectrometer, *J. Phys. Chem. A*, **2007**, 111, p. 13415-24; L. Mac Aleese *et al.*, Mid-IR spectroscopy of protonated leucine methyl ester performed with an FTICR or an Paul type ion-trap, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 249, p. 14-20.

[16] R. Prazeres, F. Glotin, C. Insa, D.A. Jaroszynski, J.M. Ortega, Two-colour operation of a Free-Electron Laser and applications in the mid-infrared, *Eur. Phys. J.*, **1998**, 3, p. 87-93.

Debora SCUDERI*, maître de conférences, **Pierre ARCHIREL**, chercheur honoraire bénévole, **Pedro DE OLIVEIRA**, professeur, **Chantal HOUÉE-LEVIN**, professeure émérite, Institut de Chimie Physique UMR 8000, CNRS, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex.

*debora.scuderi@universite-paris-saclay.fr