

Les acides aminés et les protéines en photochimie

Patricia Vicendo (*coordinatrice*), Laurent Bijeire, Benjamin Elias, Christophe Jouvét, Andrée Kirsch-De Mesmaeker et Cécile Moucheron

Résumé

Les processus de photo-oxydation des protéines peuvent résulter soit d'une réactivité directe des acides aminés comme la tyrosine ou le tryptophane avec le rayonnement UV, soit de l'action de photosensibilisateurs. Des résultats récents mettent en évidence le rôle prépondérant des états dissociatifs des acides aminés aromatiques protonés dans le phénomène de photofragmentation suite à une excitation directe. Ce processus peut résulter en particulier de la perte d'un atome d'hydrogène avec formation d'un radical cation. Ceci ouvre la perspective de pouvoir casser un peptide sélectivement. À l'instar de l'ADN, les protéines peuvent être la cible de photosensibilisateurs comme les complexes de ruthénium. La réactivité photochimique de ces composés avec des cibles biologiques dépend du caractère oxydant de leur état triplet excité appelé $^3\text{MLCT}$ (transfert de charge du métal au ligand). Par transfert d'électron photo-induit, certains complexes avec des ligands très oxydants peuvent réagir avec la guanine de l'ADN et le tryptophane pour générer des photo-adduits. Cette réactivité originale fait de ces complexes des agents potentiels pour la thérapie photodynamique. Ces composés peuvent également réagir sous illumination avec des metallo-protéines *via* des réactions de transfert d'électron très complexes conduisant à une inhibition enzymatique dans le cas de la superoxyde dismutase Cu/Zn.

Mots-clés

Acides aminés protonés, polypeptides, tryptophane, état excité, photofragmentation, photodissociation, calculs *ab initio*, complexes polypyridiniques du ruthénium^{II}, transfert d'électron photo-induit, photo-adduits, superoxyde dismutase Cu/Zn.

Abstract

Amino acids and proteins in photochemistry

Photooxidation of proteins may result from a direct reactivity of the amino acids such as tyrosin or tryptophane with UV radiation. Recent data highlight the major role of the dissociative states of protonated aromatic amino acids in photofragmentation. This process can result from the loss of a hydrogen atom with formation of a radical cation. This will be a powerful tool to cleave selectively peptides. Proteins as DNA may also be the target of photosensitizers such as polyazaaromatic Ru^{II} complexes. An important property of these compounds with very oxidative ligands is their very high oxidation power in the $^3\text{MLCT}$ (metal-to-ligand charge transfer) state. At the excited state, they are able to abstract an electron from electron donors such as the tryptophane. This reactivity can give rise to the formation of covalent photoadducts with the tryptophane. The formation of such damage displays a potent interest for the photodynamic therapy. Moreover, complex electron transfer reactions may also occur between ruthenium compounds under illumination and a metallo-protein such the superoxyde dismutase Cu/Zn leading to an inhibition of the enzymatic activity.

Keywords

Protonated amino acids, polypeptides, tryptophan, excited states, photofragmentation, *ab initio* calculation, polyazaaromatic Ru^{II} complexes, photoinduced electron transfer, photoadduct formation, superoxide dismutase Cu/Zn.

En raison de leur abondance au niveau cellulaire, les protéines comme l'ADN sont des cibles privilégiées pour les processus de photo-oxydation. Leur réactivité avec le rayonnement UV dépend de la présence de chromophores au niveau de leur structure, tels certains acides aminés (tryptophane, tyrosine, phénylalanine, histidine, cystéine), mais également dans certains cas de la présence de groupements prosthétiques comme l'hème, les flavines. Le rôle de ces structures sera illustré dans l'article suivant (photoperception et protéines). Comme pour l'ADN, la photo-oxydation des protéines résulte de deux voies majeures. La première est liée à une absorption directe des radiations UV par certains constituants des protéines conduisant à la formation d'espèces à l'état excité ou de radicaux. Ce mécanisme est actuellement à l'origine d'une approche originale concernant la fragmentation des protéines au

niveau de séquences peptidiques précises, véritable microchirurgie des protéines au laser. Une telle démarche est très utile aux biologistes qui explorent la nature et la structure des protéines afin d'en déterminer les fonctions. La seconde voie met en jeu des processus indirects faisant intervenir des photosensibilisateurs exogènes. Les mécanismes photochimiques responsables de la photosensibilisation des protéines sont identiques à ceux décrits pour l'ADN (oxygène singulet, transfert d'électron, attaque par des radicaux). Les dommages photo-induits au niveau du squelette peptidique, encore peu étudiés et complexes, aboutissent généralement à une perte de la fonctionnalité des protéines. Ces effets apparemment délétères peuvent cependant être mis à profit pour développer des agents thérapeutiques qui auraient pour mission d'inhiber certaines protéines impliquées dans des processus physiopathologiques.

Des états excités des acides aminés à la photofragmentation des protéines

Depuis quelques années, l'équipe de Christophe Jouvét a développé des modèles théoriques permettant de rationaliser le comportement sous irradiation de molécules biologiques comportant des groupements aromatiques (par exemple tyrosine, tryptophane ou encore bases nucléiques) [1]. Que ces molécules se trouvent isolées ou dans un environnement défini, ces nouveaux modèles, associant théorie et expérience, montrent que les états excités des molécules aromatiques neutres contenant un groupement énole (C=COH) ou amine (NH) sont pré-dissociés par un état répulsif suivant la coordonnée OH ou NH. Cet état est très polaire et son énergie est donc très sensible à l'environnement. Suivant la position de cet état, différents comportements photochimiques sont attendus : augmentation ou diminution du rendement quantique de fluorescence, relaxation rapide vers l'état fondamental, éjection d'un atome d'hydrogène. Ce dernier processus est d'un intérêt tout particulier car il conduit à la formation de deux espèces radicalaires dont le devenir en milieu biologique doit être étudié. En modifiant la position relative des états excités, l'environnement de solvant ou la présence d'autres acides aminés dans un petit polypeptide change le comportement photochimique de ces molécules et en particulier leur durée de vie.

Dans les espèces protonées, les états dissociatifs jouent un rôle prépondérant dans leur photofragmentation. Des résultats récents sur la photofragmentation d'acides aminés aromatiques protonés montrent qu'il y a des voies de fragmentations, particulièrement la perte d'un atome d'hydrogène avec formation d'un radical cation, qui correspondent à une fragmentation directe *via* un état dissociatif [2-3].

Les mesures pompe-sonde (technique spéciale en photolyse éclair) effectuées sur ces systèmes indiquent que la relaxation des états excités est rapide (quelques centaines de femtosecondes). Cette dynamique permet de comprendre la formation d'hydrogène dans les protéines éclairées par un rayonnement UV et aussi pourquoi le rendement de fluorescence du tryptophane en solution très acide (pH = 2) devient très faible.

Les calculs *ab initio* semblent indiquer que ce résultat est très général et devrait se retrouver dans tous les polypeptides protonés [3]. Il semble que dès que l'on ajoute un proton, il existe un état à transfert de charge où l'électron se localise sur le groupement où le proton s'est attaché, l'énergie de cet état dépendant du peptide (entre 4 et 7 eV). Lorsqu'un électron se localise sur cet état, cela conduit à la perte d'un atome d'hydrogène, comme dans les radicaux NH_4 ou CH_3NH_3 qui ne sont pas stables (un électron de trop dans les liaisons) (figure 1).

Nos résultats récents montrent que la durée de vie des états excités des polypeptides contenant un résidu tryptophane est dépendante de la structure primaire du peptide, mais aussi de sa conformation secondaire. De plus, ces différentes conformations entraînent des ruptures sélectives du peptide après excitation par un photon. Ainsi, le pentapeptide (Ala-Leu-Trp-Gly-Lys) [4] protoné deux fois fragmente dix fois moins efficacement que le même pentapeptide protoné une fois (la fragmentation est en effet induite par le transfert d'un électron du tryptophane (partie aromatique) vers le groupement NH_3^+). Le peptide dichargé aura tendance à avoir une structure étendue où l'interaction entre le résidu aromatique et les groupements amine est

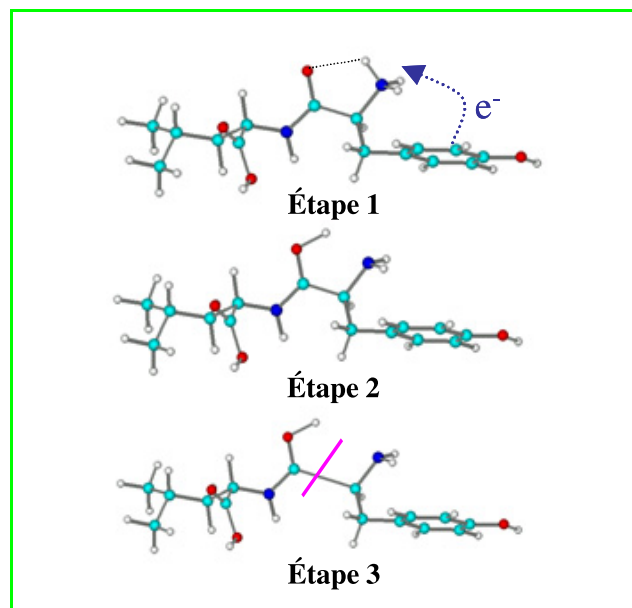


Figure 1 - Mécanisme de photofragmentation d'un peptide contenant un résidu tyrosine.

Étape 1 : transfert d'électron ; Étape 2 : transfert ou perte d'hydrogène ; Étape 3 : réorganisation, rupture des liaisons.

faible, tandis que le composé monochargé pourra adopter une structure plus globulaire favorisant ces interactions.

Ceci ouvre la perspective de pouvoir casser un peptide sélectivement, non seulement en fonction de sa structure primaire, mais aussi de son arrangement conformationnel. Des mesures utilisant les techniques de double résonance pompe-sonde IR-UV ou IR-VUV permettent de relier la structure (conformation) aux voies de fragmentation.

Photo-inactivation des protéines par des complexes organométalliques de ruthénium

Photosensibilisation du tryptophane par des complexes de ruthénium - Similitudes avec les unités guanine de l'ADN

Les protéines, comme l'ADN, peuvent être la cible privilégiée de certains photosensibilisateurs. Les mécanismes photochimiques (attaque par des espèces oxygénées réactives, oxydation par transfert d'électron) mis en jeu dépendront du caractère oxydant de la molécule photo-activable à l'état excité.

Dans ce contexte, les complexes polypyridiniques du ruthénium^{II} sont très intéressants. Ce sont des sels dicationiques qui présentent une structure octaédrique rigide et chirale avec un ruthénium^{II} (configuration d_6) central hexadenté. En raison de leurs propriétés photoredox modulables, ces composés présentent un grand intérêt dans le domaine de la photobiologie et leur réactivité avec l'ADN a été largement explorée [5]. Ces études ont permis de mettre en évidence une propriété très originale : sous irradiation, certains complexes très oxydants peuvent s'additionner de façon covalente sur la guanine de l'ADN *via* un processus par transfert d'électron [6-7]. En contrepartie, peu d'études ont été réalisées sur leur comportement photochimique en présence d'acides aminés ou de protéines.

L'équipe d'Andrée Kirsch-De Mesmaeker (Bruxelles), largement impliquée dans l'étude de la photoréactivité des complexes organométalliques de ruthénium avec l'ADN, s'est aussi intéressée au comportement photochimique de ces composés avec des acides aminés. Guidée par l'analogie structurale entre le tryptophane et la guanine ainsi que par le faible potentiel d'oxydation de cet acide aminé (figure 2), cette équipe s'est demandée si un transfert d'électron pouvait également intervenir entre cet acide aminé et des complexes de ruthénium et conduire à la formation de photo-adduits tryptophane-complexe de ruthénium [8].

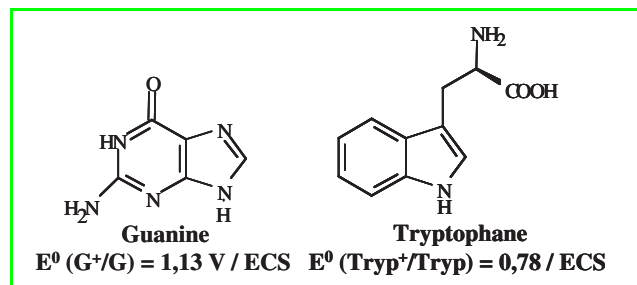
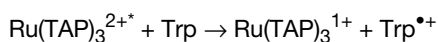


Figure 2 - Potentiel redox de la guanine et du tryptophane.

Des études en spectroscopie UV-visible, émission stationnaire et photolyse éclair ont permis de caractériser la nature des réactions photochimiques entre le tryptophane et ces complexes. Il apparaît ainsi que parmi tous les acides aminés testés, le tryptophane (et dans une moindre mesure la tyrosine) est capable de modifier le comportement photochimique de ces composés photo-activables : il éteint en effet la luminescence de ces complexes, processus qui est associé à une importante constante de vitesse d'extinction de l'émission. Ce comportement suggère la participation d'un transfert d'électron entre les complexes à l'état excité et l'acide aminé. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences en photolyse éclair réalisées avec ces complexes, qui ont permis de mettre en évidence la formation d'espèces transitoires correspondant au complexe de ruthénium monoréduit. Celui-ci est donc produit par un transfert d'électron qui génère bien sûr aussi le cation radical du tryptophane :



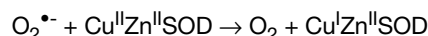
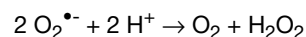
Cette réaction s'apparentant à celle observée en présence de guanine, la formation d'adduits covalents a été aussi recherchée. L'analyse en spectrométrie de masse de solutions de tryptophane photosensibilisées par ce complexe a révélé sans ambiguïté la formation d'un adduit entre cet acide aminé et le ligand du complexe (figure 3).

Cette réactivité tout à fait originale ouvre des perspectives importantes sur un plan photochimique, notamment dans la compréhension des mécanismes mis en jeu au cours

des photopontages entre une protéine et l'ADN via la formation d'un radical tryptophane, espèce hautement réactive [8].

Photosensibilisation de la superoxyde dismutase Cu/Zn par des complexes de ruthénium

La superoxyde dismutase Cu/Zn (Cu/ZnSOD) est une protéine appartenant à la famille des métallo-enzymes non hémiques. Elle est caractéristique des organismes eucaryotes et exerce une fonction de détoxification puisque son rôle consiste en la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire. Son activité catalytique repose sur une oxydoréduction cyclique de son centre cuivrique.



C'est une protéine dimère (chaque sous-unité ayant une masse comprise entre 15 et 17 kDa) constituée d'une chaîne polypeptidique formée principalement de feuillets bêta entourant le site actif. Le cuivre est localisé au fond d'un canal étroit chargé positivement, situé sur la face externe de l'enzyme. Des études récentes ont montré que la Cu/ZnSOD peut être une cible de choix pour l'élimination sélective de cellules cancéreuses. Dans ce type de cellules, la Cu/ZnSOD est sous-exprimée et la production d'anion superoxyde est importante. L'inhibition de la Cu/ZnSOD causerait donc une augmentation importante du stress oxydant à l'intérieur des cellules cancéreuses et pourrait conduire à leur mort par apoptose, alors que les cellules saines seraient peu affectées par ce type de stratégie.

Cette enzyme étant impliquée dans des réactions de type redox, l'équipe de Patricia Vicendo (Toulouse) s'est interrogée sur la possibilité de modifier l'activité enzymatique de cette protéine par le biais de transfert d'électron photo-induit avec des complexes de ruthénium ($\text{Ru}[(\text{Ligand})_3]^{2+}$) fortement photo-oxydants à l'état excité. Cette stratégie s'est avérée très intéressante, car il est en effet possible de photo-inactiver l'enzyme Cu/ZnSOD avec un complexe $\text{Ru}[(\text{Ligand})_3]^{2+}$. Le mécanisme d'action responsable de l'inhibition enzymatique s'est révélé particulièrement complexe. Les premières études en émission stationnaire ont clairement mis en évidence une forte réactivité entre cette protéine et le complexe à l'état excité, laissant présager la participation d'un transfert d'électron. Seules des études en photolyse éclair, réalisées en collaboration avec l'équipe d'Andrée Kirsch-De Mesmaeker, et en résonance paramagnétique électronique (RPE) à basse température, ont permis d'élucider en partie le mécanisme d'action. Les résultats mettent en évidence la participation de deux transferts d'électron successifs [9-10]. Tout d'abord, une réduction du complexe de Ru^{II} par la Cu/ZnSOD a lieu. La formation de l'espèce transitoire monoréduite $\text{Ru}[(\text{Ligand})_3]^{1+}$ a été caractérisée par photolyse éclair et RPE à basse température au cours de l'irradiation du complexe en présence de Cu/ZnSOD (figure 4, réaction 1). Cependant, la question qui se pose est de savoir quelle est l'entité qui participe au transfert d'électron au niveau de la protéine. Un acide aminé en surface de la protéine tel que la tyrosine (SOD bovine) ou le tryptophane (SOD humaine) semble être l'hypothèse la plus vraisemblable. Cette argumentation est confortée par les travaux décrits dans le paragraphe précédent, démontrant la possibilité de transfert d'électron entre un acide aminé comme le tryptophane et un

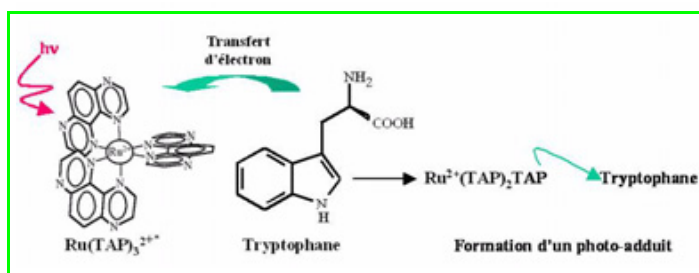


Figure 3 - Formation d'un photo-adduit entre un complexe de ruthénium et le tryptophane.



Figure 4 - Réactions de photosensibilisation de la Cu/ZnSOD par un complexe de ruthénium à l'état excité (1-3). Réaction d'oxydation de l'adénine par l'espèce Ru^{III} (4).

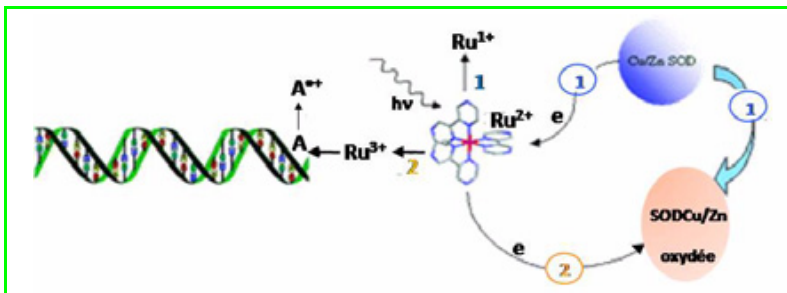


Figure 5 - Double transfert d'électron photo-induit entre le complexe excité et la superoxyde dismutase cuivre/zinc.

1) Transfert d'électron de type réductif conduisant à la formation de l'espèce Ru^{I} et d'une $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{ZnSOD}$ oxydée et modifiée ; 2) Transfert d'électron de type oxydatif conduisant à la formation de l'espèce Ru^{III} et de Cu^{I} au niveau du site catalytique de l'enzyme.

complexe de ruthénium photo-oxydant à l'état excité. De plus, cette première réaction entre le complexe de ruthénium excité et la superoxyde dismutase semble être responsable d'un changement conformationnel de la protéine (figure 4, réaction 2), indispensable pour qu'un second transfert d'électron puisse avoir lieu entre le site catalytique de l'enzyme et le complexe de ruthénium excité. La réaction correspond alors à une oxydation du complexe excité par le cuivre Cu^{II} du site catalytique. Elle conduit à la formation du complexe de ruthénium à l'état Ru^{III} , espèce très oxydante, et du cuivre à l'état Cu^{I} (figure 4, réaction 3). Ce dernier transfert d'électron a été mis en évidence par photolyse éclair et de façon indirecte grâce à des études en RPE à basse température. Ces expériences ont permis de suivre la disparition du Cu^{II} au niveau du site actif de la protéine après sa photosensibilisation par le complexe métallique et d'observer l'oxydation de l'adénine au cours de l'irradiation du complexe de ruthénium en présence de Cu/ZnSOD et de polyd(AT)_2 . En raison de son potentiel d'oxydation plus élevé, l'adénine ($E^0(\text{A}^{\bullet+}/\text{A}) = +1,79 \text{ V/ECS}$) ne peut être oxydée que par l'espèce Ru^{III} ($E^0(\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}) = +1,89 \text{ V/ECS}$) pour le complexe choisi. Cette réaction conduit à la formation d'un radical cation adénine (figure 4, réaction 4).

En conclusion, l'inhibition de la Cu/ZnSOD par photosensibilisation par le complexe de ruthénium semble donc résulter d'un double transfert d'électron (figure 5). Ces réactions conduisent à une réduction du cuivre Cu^{II} en cuivre Cu^{I} . Des modifications structurales photo-induites au cours du premier transfert d'électron doivent intervenir et contribuer à rendre accessible le cuivre Cu^{II} enfoui dans le site catalytique de l'enzyme.

Cet exemple d'inhibition enzymatique par transfert d'électron photo-induit ouvre de nouvelles perspectives quant à la conception de nouveaux inhibiteurs enzymatiques photo-activables.

Conclusion

La compréhension des mécanismes de photosensibilisation directe et indirecte des protéines ouvrent de nouvelles

perspectives tant dans le développement d'outils performants pour les biologistes, photofragmentation sélective de peptides, que dans la conception de nouveaux outils pour la photothérapie dynamique.

Références

- [1] Sobolewski A.L., Domcke W., Dedonder-Lardeux C., Jouvét C., Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive (1) pi sigma* states: a new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2002**, *4*, p. 1093.
- [2] Kang H., Dedonder-Lardeux C., Jouvét C., Grégoire G., Desfrancois C., Schermann J.-P., Barat M., Fayeton J.A., Control of bond-cleaving reactions of free protonated tryptophan ion by femtosecond laser pulses, *J. Phys. Chem. A*, **2005**, *109*, p. 2417.
- [3] Grégoire G., Jouvét C., Dedonder C., Sobolewski A.L., On the role of dissociative pi sigma* states in the photochemistry of protonated tryptamine and tryptophan: an *ab initio* study, *Chem. Phys.*, **2006**, *324*, p. 398.
- [4] Antoine R., Broyer M., Chamot-Rooke J., Dedonder C., Desfrancois C., Dugourd P., Grégoire G., Jouvét C., Onidas D., Poulain P., Tabarin T., van der Rest G., Comparison of the fragmentation pattern induced by collisions, laser excitation and electron capture. Influence of the initial excitation, *Rapid Comm. Mass Spectrometry*, **2006**, *20*, p. 1648.
- [5] Bouskila A., Amouyal E., Verchère-Béaur C., Sasaki I., Gaudemer A., Mononuclear and binuclear ruthenium(II) heteroleptic complexes based on 1,10-phenanthroline ligands. Part II: spectroscopic and photophysical study in the presence of DNA, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2004**, *76*, p. 69.
- [6] Blasius R., Moucheron C., Kirsch-De Mesmaeker A., Photoadducts of metallic compounds with nucleic acids - Role played by the photoelectron transfer process and by the TAP and HAT ligands in the $\text{Ru}(\text{II})$ complexes, *Eur. J. Inor. Chem.*, **2004**, p. 3971.
- [7] Nunez M.E., Barton J.K., Probing DNA charge transport with metallointercalators, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2000**, *4*, p. 199.
- [8] Gicquel E., Boisdenghein A., Defrancq E., Moucheron C., Kirsch-De Mesmaeker A., Adduct formation by photo-induced electron transfer between photo-oxidising $\text{Ru}(\text{II})$ complexes and tryptophan, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **2004**, *23*, p. 2764.
- [9] Gicquel E., Paillous N., Vicendo P., Mechanism of DNA damage photosensitized by $\text{Ru}(\text{bpz})_3^{2+}$. Unusual role of the Cu/Zn superoxide dismutase, *Photochem. Photobiol.*, **2000**, *72*, p. 583.
- [10] Bijeire L., Elias B., Souchard J.-P., Gicquel E., Moucheron C., Kirsch-De Mesmaeker A., Vicendo P., Photoelectron transfer processes with ruthenium(II) polypyridyl complexes and Cu/Zn superoxide dismutase, *Biochemistry*, **2006**, *45*, p. 6160.



P. Vicendo

Patricia Vicendo est chargée de recherche CNRS et Laurent Bijeire est doctorant au Laboratoire Interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique de l'Université Paul Sabatier de Toulouse¹.

Andrée Kirsch-De Mesmaeker (professeur, directeur du laboratoire), Cécile Moucheron (professeur) et Benjamin Elias (post-doctorant) font partie du laboratoire de Chimie Organique et Photochimie de l'Université Libre de Bruxelles².

Christophe Jouvét est directeur de recherche CNRS au Laboratoire de photophysique moléculaire de l'Université Paris-Sud³.



L. Bijeire



A. Kirsch-De Mesmaeker



C. Moucheron



B. Elias



C. Jouvét

¹ Laboratoire Interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique (IMRCP), UMR 5623 CNRS, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 09. Courriel : vicendo@chimie.ups-tlse.fr

² Laboratoire Chimie organique et photochimie, Université Libre de Bruxelles, CP 160/08, 50 avenue F.D. Roosevelt, 1050 Bruxelles (Belgique). Courriel : akirsch@ulb.ac.be

³ Laboratoire de photophysique moléculaire (LPPM), UPR 3361 CNRS, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex. Courriel : christophe.jouvet@ppm.u-psud.fr