

Processus ultra-rapides dans les hémoprotéines

Marten Vos

Résumé

Les hémoprotéines sont impliquées dans une grande diversité de fonctions biologiques qui incluent transport et stockage d'oxygène, catalyse, transfert d'électron et signalisation. Le fer de l'hème peut être lié aux acides aminés et également aux molécules diatomiques (O_2 , NO, CO). Ces liaisons peuvent être rompues par une impulsion lumineuse avec un rendement élevé. En utilisant des techniques de spectroscopie optique ultra-rapide, cette propriété donne la possibilité unique d'étudier la dynamique structurale et électronique de l'hème et de son environnement protéique à l'échelle femtoseconde-picoseconde, c'est-à-dire à l'échelle même des vibrations internes de la macromolécule. Cet article décrit des développements récents dans ce domaine, en particulier l'implication de mouvements concertés hème-protéine dans des réactions balistiques de transfert de ligands et la possibilité de suivre des étapes intermédiaires de propagation d'un « signal » au sein de protéines de signalisation.

Mots-clés

Hémoprotéines, spectroscopie femtoseconde, dynamique moléculaire, ligand.

Abstract

Ultrafast processes in heme proteins

Heme proteins contribute to a large variety of biological functions including transport and storage of oxygen, catalysis, electron transfer and signalling. The iron atom in the heme can bind amino acids and also diatomic molecules (O_2 , NO, CO). These bonds can efficiently be broken by a light pulse. Using ultrafast optical spectroscopy techniques, this property allows the study of structural and electronic dynamics in the heme and its proteic environment at femtosecond-picosecond time scales, i.e. at the time scale of internal vibrations of the macromolecular systems. This review describes recent progress in this domain, specifically the role of concerted movements of the heme-protein system in ballistic ligand transfer reactions as well as the real-time monitoring of signal propagation within signalling proteins.

Keywords

Heme proteins, femtosecond spectroscopy, molecular dynamics, ligand.

Le fonctionnement des protéines est basé sur leur capacité à adopter des configurations distinctes suite à l'interaction avec un élément spécifique de l'environnement. Les premiers changements structuraux s'effectuent typiquement sur l'échelle de temps des mouvements internes des macromolécules, c'est-à-dire l'échelle femtoseconde-picoseconde. Afin de pouvoir étudier ces réactions primaires en temps réel, il est nécessaire de les déclencher avec une perturbation ultra-brève. Actuellement, le seul moyen d'y parvenir est l'utilisation d'impulsions de radiation électromagnétique. Seuls les processus photoactivables dans des protéines possédant des cofacteurs ou des conformations de résidus colorés peuvent donc être étudiés expérimentalement. Néanmoins, ce domaine d'étude n'est pas limité aux processus physiologiquement photoinductibles, tels que la photosynthèse, la vision et le phototactisme (mouvement simulé par la lumière), mais comprend aussi des processus induits par des phénomènes photochimiques dans d'autres protéines, en particulier les protéines à hème. L'absorption d'un photon par l'hème peut résulter de façon quasi instantanée en la rupture d'une liaison avec un ligand externe, comme l'oxygène, ou un résidu interne, avec un rendement quantique élevé. Cette propriété unique permet de synchroniser, donc d'observer, la dissociation d'une liaison chimique intraprotéique, qui serait rompue par effet thermique dans les réactions physiologiques.

L'hème est associé à la protéine par des liaisons axiales du fer avec un ou deux résidus, presque toujours une histidine (figure 1) (et aussi par des liaisons cystéine-vinyl dans le cas de l'hème c). Si le fer est réduit (Fe^{2+}), la sixième position peut être occupée par un ligand externe, en particulier O_2 , NO et CO. L'état excité électronique de l'hème a un caractère antiliant et la liaison Fe-ligand (enthalpie

~ 7 500 cm^{-1} pour Fe-CO [1]) peut être rompue par une impulsion lumineuse (un photon à 600 nm, dans la transition électronique la plus basse, correspond à ~ 17 000 cm^{-1}) en moins de quelques dizaines de femtosecondes [2] avec un rendement de 100 % pour le CO et un peu moins pour NO et O_2 [3]. En principe, la dissociation pourrait aussi s'effectuer par l'absorption de plusieurs photons infrarouges ; le développement de méthodes de façonnage d'impulsions à cette fin est en cours [4]. La spectroscopie femtoseconde permet ainsi de sonder les propriétés électroniques et vibrationnelles de l'hème et de son environnement après la dissociation impulsive de la liaison chimique dans un ensemble d'hémoprotéines.

Les hémoprotéines sont impliquées dans une grande diversité de fonctions biologiques. L'hémoprotéine « modèle » est la myoglobine (Mb), une petite protéine

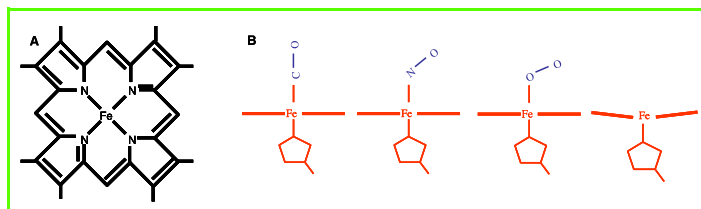


Figure 1 - Structure générale d'un hème (fer-protoporphyrine).

A : vue perpendiculaire au plan. Des substituants latéraux y sont associés selon le type d'hème. Le fer est coordonné aux quatre atomes d'azote de l'anneau porphyrinique ; **B :** vue schématique dans le plan de l'hème complexé avec une histidine et avec CO, NO et O_2 . Dans le complexe isolé, les angles Fe-X-O sont ~ 180°, 145° et 120° respectivement ; au sein de la protéine, ils peuvent dévier par des contraintes de l'environnement. Le plan de l'hème 5-fois coordonné est légèrement « domé » (Fe ~ 0,5 Å hors du plan).

(17 kD) qui sert essentiellement au stockage d'oxygène dans les muscles, mais est probablement non essentielle pour tous les mammifères [5]. En particulier, la dynamique du système Mb-CO a été caractérisée de façon exhaustive. Le transporteur d'oxygène hémoglobine est composé de quatre sous-unités proches de la myoglobine qui s'influencent mutuellement. De nombreuses enzymes incorporent des hèmes comme élément du site actif pour lier le substrat, et/ou comme centre d'oxydoréduction. C'est par exemple le cas pour l'enzyme respiratoire cytochrome c oxydase aa_3 (voir détails ci-après). Ces dernières années, un grand nombre de nouvelles hémoprotéines ont été découvertes, qui sont souvent exprimées dans de faibles quantités *in vivo*, mais qui peuvent être repérées grâce à des outils de bioinformatique et (sur)exprimées avec des outils de la biologie moléculaire. Leur fonction n'est pas toujours bien établie, mais un nombre considérable paraît impliqué dans la signalisation cellulaire. Par exemple, la NO synthase et la guanylate cyclase sont respectivement producteur et cible de la molécule de signalisation NO, et la protéine FixL est un modèle de senseur à oxygène, régulant le mode de respiration bactérienne. Dans les senseurs, en principe le cheminement de signalisation intraprotéine peut être suivi en fonction du temps, après dissociation du ligand physiologique de l'hème. Plusieurs types de dynamique étudiés, avec des exemples venant de différentes protéines, sont présentés ci-après.

Cohérence vibrationnelle

Les vibrations internes des protéines ont des périodes de $\sim 10^{-14}$ - 10^{-11} s. Il est connu depuis le début des années 90 que la phase de ces vibrations peut être maintenue pendant plusieurs picosecondes (10^{-12} s) [6-7], probablement parce qu'une protéine, bien que complexe, constitue un environnement extrêmement bien défini. Ceci ouvre la possibilité que des réactions soient couplées à des mouvements cohérents plutôt que stochastiques. Une telle réaction a été mise en évidence dans la cytochrome c oxydase, l'enzyme respiratoire membranaire où la réduction d'oxygène en eau s'effectue au sein d'un site actif contenant deux centres de fixation de ligands, l'hème a_3 et un atome de cuivre, Cu_B , distant de ~ 5 Å du fer de l'hème (figure 2).

À cause de la réaction catalytique, l'oxycomplexe est un intermédiaire instable de la réaction et la dynamique de l' O_2 ne peut pas être étudiée à l'échelle ultra-rapide. Par contre, dans l'enzyme « empoisonnée » par le compétiteur inhibitif CO, le transfert photoinduit du CO de l'hème a_3 au Cu_B constitue une réaction bien définie et commutable optiquement.

Cette réaction s'effectue en moins d'une picoseconde comme établi par spectroscopie infrarouge du mode d'étirement C-O [8]. En même temps, par spectroscopie visible, nous avons établi que la population de l'état fondamental de l'hème pentacoordonné avec le fer hors du plan s'accroît, non pas par une cinétique exponentielle comme dans les processus stochastiques, mais par des sauts en marche d'escalier avec des marches de ~ 700 fs et le premier saut après une demi-période, 350 fs (figure 2). Ceci indique une trajectoire réactionnelle plus balistique que diffuse [9]. Un tel phénomène n'est pas observé dans des protéines comme la myoglobine, qui ne possède pas de deuxième site de fixation du ligand. Des simulations de la dynamique moléculaire – un outil très puissant de guidage de l'interprétation et accessible à la même échelle de temps que la spectroscopie femtoseconde – indiquent que la

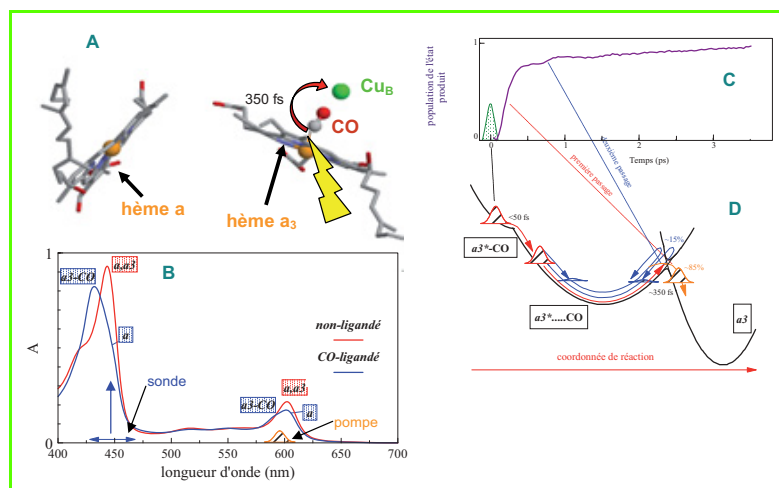


Figure 2 - Spectroscopie d'absorption femtoseconde du transfert de CO au sein de la cytochrome c oxydase aa_3 .

Trois cofacteurs sont arrangés en proximité (A). Le Cu_B sert à acheminer le substrat et l'hème a (coordonné par deux histidines) à acheminer des électrons vers l'hème a_3 . Le spectre d'absorption de l'enzyme réduit dépend de l'état de « ligandation » (B). En excitant le système carboxylé avec une impulsion brève (ici 55 fs) dans la transition la plus basse, la population de l'état produit est sondée dans la région de Soret (vers 450 nm). La contribution de la photophysique de l'hème a, qui est aussi excitée, peut être prise en compte en étudiant le complexe non ligandé. La cinétique résultante en marches d'escalier (C) peut être comprise en termes de couplage de la réaction à des mouvements cohérents de paquets d'onde, menant à la population périodique de la zone de transition (D). Des simulations de la dynamique moléculaire indiquent que la coordonnée de la réaction inclut la rotation du CO.

rotation du CO, autorisée par sa dissociation, mène en ~ 350 fs (première marche) à une configuration proche de la zone de transition pour la formation d'un lien Cu_B -CO, et constitue donc, outre le mouvement de dôme de l'hème, un élément important de la coordonnée de réaction.

La mise en évidence de réactions cohérentes illustre l'intérêt des mouvements concertés au sein des protéines. Dans l'approche décrite ci-dessus, le spectre électronique de l'hème est utilisé comme sonde du système. En principe, des renseignements plus détaillés sur la dynamique du système chromophore-protéine peuvent être obtenus en utilisant la spectroscopie vibrationnelle, et en particulier infrarouge pour ce qui concerne la protéine. À cet effet, des spectroscopies transitoires d'émission [10] et d'absorption infrarouge [11] pour les hémoprotéines sont développées dans le laboratoire.

Recombinaison de ligands

La dissociation du ligand distal (par rapport à l'histidine axiale) du fer de l'hème conduit à une déformation du plan de l'hème, qui se courbe vers l'histidine. Ce processus s'effectue en moins de 1 ps pour des ligands externes comme le CO dans l'hémoglobine [12], ou internes comme la méthionine dans le cytochrome c [13]. Le ligand dissocié peut migrer vers d'autres sites de fixation, comme dans la cytochrome oxydase, ou vers des poches de la protéine sans être lié, et finalement sortir de la protéine. Ces processus de migration interne dans la protéine sont facilités par la dynamique même de la chaîne peptidique, car souvent des « ouvertures » temporaires permettent le passage d'un ligand de la poche de l'hème au solvant. Le ligand dissocié peut aussi se réassocier avec l'hème avant de quitter la protéine. Ce processus, qui concerne les mêmes partenaires dissociés au préalable, est nommé la *recombinaison géminée*. Il se distingue de la *recombinaison bimoléculaire* par son échelle

de temps plus courte (typiquement pico-nanoseconde) et l'indépendance de la concentration du ligand dans le solvant. La cinétique et le rendement de la recombinaison gémée dépendent fortement de la nature du ligand et de la structure de la poche de l'hème. Ainsi, les caractéristiques de ce processus sont souvent utilisées comme sonde de l'environnement de l'hème et de l'interaction hème-ligand. Par exemple, de nombreuses études sur l'effet de mutations ponctuelles de la myoglobine sur la recombinaison hème-NO ont été interprétées en termes de configuration électrostatique et stérique de la poche de l'hème [14].

Dans la plupart des protéines étudiées, le rendement de recombinaison gémée hème-CO est faible, probablement (au moins en partie) parce que la configuration perpendiculaire requise (figure 1) limite la liberté conformationnelle favorable pour la formation de la liaison, très stable une fois formée. Néanmoins dans les dernières années, quelques exceptions intéressantes ont été décrites, comme par exemple des formes modifiées du cytochrome c, où la rigidité de la matrice protéique, favorable pour la fonction d'oxydoréduction de la protéine, empêche probablement la rotation/migration du CO de sa position initiale [15].

La recombinaison hème-O₂ (relativement peu étudiée, en partie à cause de l'instabilité du complexe menant à l'oxydation de l'hème) est toujours marquée par une phase de ~ 5 ps, relativement faible en myoglobine, suivie par une phase beaucoup plus lente de centaines de nanosecondes. Les interactions hème-oxygène sont particulièrement intéressantes dans le cas des senseurs à oxygène à base d'hème, car la dissociation hème-oxygène y mène à des changements de l'activité d'un domaine enzymatique distant. En principe, la propagation du « signal » à travers la protéine peut être engendrée par une impulsion lumineuse. Néanmoins, dans deux de ces protéines, les senseurs FixL (rhizobien) et Dos (« direct oxygen sensor », de *E. coli*), la recombinaison gémée de ~ 5 ps est extrêmement efficace (> 90 %) [16] (figure 3). Cela indique que l'environnement de l'hème constitue une « cage » spécifique pour l'O₂, mais complique aussi la perspective de suivre le signal au-delà de

la poche de l'hème. De l'autre côté, le spectre de l'hème juste après dissociation de l'O₂ dévie considérablement de l'hème 5-coordonné au repos, ce qui signifie que l'hème joue un rôle dans les premiers intermédiaires de transmission du signal. En associant la mutagenèse dirigée à la spectroscopie femtoseconde, nous avons pu mettre en évidence dans FixL le rôle important d'un résidu arginine spécifique, qui est en liaison hydrogène avec l'oxygène lié à l'hème, à la fois dans la constitution de la cage à oxygène et dans la population de l'intermédiaire de signalisation [17]. Dans nos présentes études, la spectroscopie vibrationnelle résolue en temps (Raman et infrarouge) sera associée à la mutagenèse dirigée et les simulations moléculaires pour établir la dynamique structurale associée au chemin de signalisation de l'O₂.

Dans la perspective de suivre le signal à travers une protéine « bascule », le cas du senseur Dos est particulièrement intéressant (figure 3). Dans cette protéine, l'hème en repos est toujours hexacoordonné : l'oxygène peut prendre la place d'un ligand interne, un résidu méthionine, et vice versa, et la réorganisation structurale associée à cet échange constitue un élément du cheminement du signal. Comme la méthionine peut aussi être photodissociée, nous pouvons suivre les premières étapes de ce processus des deux côtés. Ainsi, il apparaît que la recombinaison initiale du ligand interne est sensiblement plus lente que celle de l'oxygène, bien qu'il fasse partie de la chaîne polypeptidique et ne peut donc pas s'échapper de la protéine (par contre, ~ 4 % de l'O₂ peut échapper) [18]. Ceci reflète probablement une flexibilité structurale de la méthionine nécessaire pour pouvoir induire un réarrangement de la chaîne polypeptidique. La cinétique de recombinaison de la méthionine s'avère bi-exponentielle (7 ps et 35 ps, 1:1) dans Dos, ce qui contraste avec celle dans la protéine de transfert d'électron cytochrome c, où elle est quasi monoexponentielle (5 ps). Ainsi, un deuxième intermédiaire est probablement peuplé en ~ 7 ps, en compétition avec la reformation sans barrière du lien hème-méthionine. En absence du ligand externe dans la protéine au moment de la dissociation, la méthionine se relie ensuite à l'hème en 35 ps, mais un échange pourrait s'effectuer en présence de ligand externe (situation expérimentalement non accessible). Une autre indication de la présence d'une succession d'étapes dans la signalisation initiale est que, inversement, la formation du lien hème-méthionine prend place dans l'échelle de temps microseconde après dissociation du CO. Les concepts et les analyses d'intermédiaires, ici esquissés pour le senseur à oxygène Dos, seront très utiles pour comprendre le fonctionnement d'hémoprotéines hexacoordonnées, dont un grand nombre a été découvert ces dernières années, souvent avec des fonctions inconnues, comme par exemple la neuroglobine, une hémoglobine exprimée en faible quantité dans les systèmes nerveux des mammifères.

Perspectives

La possibilité unique d'induire un changement de structure local et bien défini par une impulsion lumineuse ultra-brève permet de suivre des processus très divers, y compris des réactions rapides d'oxydoréduction [19-20], au sein des hémoprotéines en utilisant les techniques de la spectroscopie femtoseconde. Au-delà d'études de l'interaction hème-protéine, le développement de techniques comme la diffraction de rayons X résolue dans le temps (voir l'article suivant de D. Bourgeois) et la spectroscopie

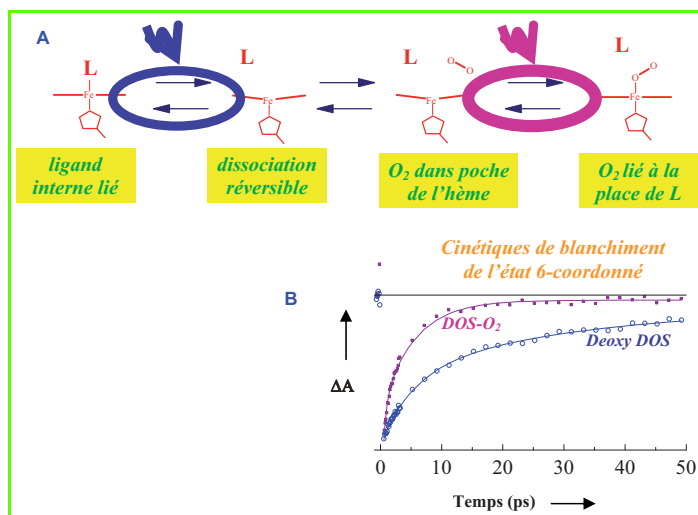


Figure 3 - Échange de ligands au sein d'hémoprotéines 6-fois coordonnées.

A : schéma général d'échange bidirectionnel d'un ligand interne L (méthionine dans Dos) et externe (O₂). Des deux côtés, le processus est initié par la dissociation thermique ou photoinduite du ligand. Les processus primaires des deux côtés (encadrés) peuvent être suivis par spectroscopie. B : cinétiques de religandation dans Dos après dissociation d'O₂ et de méthionine [18].

infrarouge multidimensionnelle permettront de caractériser les mécanismes de propagation de perturbations à travers la chaîne peptidique à l'échelle de temps femto-picoseconde.

Remerciements

L'auteur remercie le grand nombre de chercheurs non permanents et permanents du Laboratoire d'optique et biosciences (LOB) et les collaborateurs extérieurs qui ont contribué aux travaux résumés dans cet article.

Références

- [1] Lumry R., Keyes M.H., Falley M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, p. 2035.
- [2] Vos M.H., *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1777, p. 15.
- [3] Ye X., Demidov A., Champion P.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, p. 5914.
- [4] Ventalon C., Fraser J.M., Vos M.H., Alexandrou A., Martin J.-L., Joffre M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101, p. 13216.
- [5] Garry D.J., Ordway G.A., Lorenz J.N., Radford N.B., Chin E.R., Grange R.W., Bassel-Duby R., Williams R.S., *Nature*, **1998**, 395, p. 905.
- [6] Vos M.H., Lambry J., Robles S.J., Youvan D.C., Breton J., Martin J.-L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, p. 8885.
- [7] Dexheimer S.L., Wang Q., Peteanu L.A., Pollard W.T., Mathies R.A., Shank C.V., *Chem. Phys. Letters*, **1992**, 188, p. 61.
- [8] Treuffet J., Kubarych K.J., Lambry J.-C., Pilet E., Masson J.-B., Martin J.-L., Vos M.H., Joffre M., Alexandrou A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, p. 15705.
- [9] Liebl U., Lipowski G., Negrerie M., Lambry J.-C., Martin J.-L., Vos M.H., *Nature*, **1999**, 401, p. 181.
- [10] Groot M.-L., Vos M.H., Schlichting I., van Mourik F., Joffre M., Lambry J.-C., Martin J.-L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, p. 1323.
- [11] Polack T., Ogilvie J.P., Franzen S., Vos M.H., Joffre M., Martin J.-L., Alexandrou A., *Phys. Rev. Lett.*, **2004**, 93, p. 018102.
- [12] Franzen S., Lambry J.-C., Bohn B., Poyart C., Martin J.-L., *Nature Struct. Biol.*, **1994**, 1, p. 230.
- [13] Cianetti S., Negrerie M., Vos M.H., Martin J.-L., Kruglik S.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, p. 13932.
- [14] Olson J.S., Phillips G.N. Jr, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, p. 17593.
- [15] Silkstone G., Jasaitis A., Wilson M.T., Vos M.H., *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, p. 1638.
- [16] Liebl U., Bouzhir-Sima L., Negrerie M., Martin J.-L., Vos M.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, p. 12771.
- [17] Jasaitis A., Hala K., Bouzhir-Sima L., Lambry J.-C., Balland V., Vos M.H., Liebl U., *Biochemistry*, **2006**, 45, p. 6018.
- [18] Yamashita T., Bouzhir-Sima L., Lambry J.-C., Liebl U., Vos M.H., *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, p. 344.
- [19] Pilet E., Jasaitis A., Liebl U., Vos M.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, p. 16198.
- [20] Jasaitis A., Rappaport F., Pilet E., Liebl U., Vos M.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, p. 10882.



Marten Vos

est directeur de recherche CNRS au Laboratoire d'optique et biosciences (LOB), École polytechnique*.

* Laboratoire d'optique et biosciences (LOB), Inserm U696, CNRS UMR 7645, École polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex.
Courriel : marten.vos@polytechnique.edu

Étude de la dynamique structurale de la myoglobine par cristallographie sub-nanoseconde

Dominique Bourgeois

Résumé

Le comportement « dynamique » des macromolécules biologiques est une propriété fondamentale du monde vivant. Pour étudier le mouvement des protéines, les chercheurs utilisent la myoglobine depuis près de trente ans. Cette petite protéine est formée d'environ 150 acides aminés repliés sous forme d'hélices pour enserrer un hème au cœur duquel est fixé un atome de fer. L'oxygène se fixe au fer par une liaison de coordination dont l'intensité dépend des contraintes structurales imposées par la protéine. Les ligands diatomiques (O₂, CO, NO) peuvent être dissociés au moyen d'une impulsion laser ultracourte, générant un état photoexcité au sein d'une grande population de protéines de manière parfaitement synchronisée. Le retour à l'équilibre de cet état excité peut alors être étudié par une panoplie de méthodes spectroscopiques et structurales. Grâce à la cristallographie aux rayons X résolue en temps, développée ces dernières années, les modifications structurales induites par la photodissociation du monoxyde de carbone peuvent être visualisées de manière directe et à l'échelle atomique avec une résolution temporelle approchant la picoseconde.

Mots-clés

Cristallographie résolue en temps, dynamique des protéines, myoglobine, photolyse laser.

Abstract

The structural dynamics of myoglobin investigated by sub-nanosecond crystallography

The dynamical behaviour of biological macromolecules is one of the fundamental properties of living systems. Over 30 years, myoglobin has been used as a model for the study of the movement of proteins. This small protein is formed of 150 aminoacids folded in helices and surrounding the heme at the centre of which sits an iron atom. Oxygen binds iron by coordination and the strength of the bond depends upon the structural constraints of the protein. Experimentally myoglobin offers a great advantage: diatomic ligands (O₂, CO, NO) can be readily dissociated by an ultrashort laser pulse, thereby producing synchronously a large population of excited states within the specified proteins. The return of this state to equilibrium can be studied by several structural and spectroscopic methods. Using time resolved X-ray crystallography developed recently and described here, structural modifications in myoglobin induced by the photoejection of CO can be revealed directly at the atomic scale with a time resolution approaching the picosecond time scale.

Keywords

Time-resolved crystallography, protein dynamics, myoglobin, laser photolysis.