HAL
open science

Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson

Anaïs Pujol

To cite this version:

Anaïs Pujol. Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson. Chimie. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00598705

HAL Id: tel-00598705

https://theses.hal.science/tel-00598705

Submitted on 7 Jun 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Grenoble

T H È S E

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Spécialité : Chimie Inorganique et Bioinorganique

Présentée et soutenue publiquement par

Anaïs PUJOL

le 24 Septembre 2010

Thèse dirigée par Dr. Pascale Delangle

Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson

COMPOSITION DU JURY

Pr P. Faller	*Université Paul Sabatier*	Rapporteur
Dr I. Schalk	*Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg*	Rapporteur
Pr J.P. Mahy	*Université Paris-Sud 11*	Président du jury
Dr E. Mintz	*CEA Grenoble*	Examinateur
Dr C. Gateau	*CEA Grenoble*	Examinateur
Dr P. Delangle	*CEA Grenoble*	Examinateur

Laboratoire de Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination
Service de Chimie Inorganique et Biologique
Institut Nanosciences et Cryogénies, CEA-Grenoble

A mes parents

« Savoir où l'on veut aller, c'est très bien, mais il faut encore montrer qu'on y va. »

ZOLA.E, *l'argent*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Faller, Mme Schalk et M. Mahy pour avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger mon travail.

Je tiens à remercier Pascale Maldivi pour m'avoir accueilli et permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire de reconnaissance ionique du CEA Grenoble qu'elle dirige.

Je remercie particulièrement Pascale, Elisabeth et Christelle pour leur temps consacré à la relecture de mon manuscrit mais aussi individuellement.

• En premier lieu Pascale, ma directrice de thèse, qui m'a encadrée et dirigée pendant ces trois ans. Ses compétences scientifiques notamment en chimie de coordination, ainsi que son aide au cours des différentes expériences m'ont aidée à comprendre les phénomènes observés. Elle m'a appris la rigueur nécessaire à tout travail scientifique, et m'a donné l'occasion de travailler sur un sujet qui m'a passionnée. Enfin, elle m'a appris à toujours positiver, même quand les résultats n'étaient pas à la hauteur de nos attentes. Merci aussi d'avoir consacré du temps à chaque fois que j'en avais besoin et de m'avoir donné l'occasion de travailler sur ce sujet de thèse qui m'a passionnée.

• Christelle, ensuite pour son aide judicieuse au cours des différentes synthèses. Elle a su corriger mes défauts et me permettre d'avancer tout en précisant une méthodologie que je pensais maîtriser en synthèse organique. A tout moment j'ai pu compter sur elle.

• Elisabeth enfin, pour toutes nos discussions sur les différents aspects biologiques de mon sujet. Elle a su toujours trouver du temps pour répondre à mes diverses questions et je l'en remercie. Merci aussi de m'avoir permis de rencontrer les médecins qui s'occupent de la maladie de Wilson en France, me permettant ainsi d'avoir une vision globale de cette maladie.

Je n'oublie pas dans mes remerciements :

• Colette, la maman de l'HPLC et de la spectrométrie de masse. Merci d'avoir consacré du temps à m'enseigner l'art des purifications par HPLC et d'avoir toujours été là au moment des purifications difficiles ou de « problèmes de tuyauterie ». Sa gentillesse, sa patience, sa pédagogie ont rendu plus facile l'analyse des différents complexes avec les divers cations métalliques par spectrométrie de masse. Je la remercie aussi pour sa contribution à la réalisation de certains dosages UV-visible.

• Martine, pour le temps passé à la prise de vue et au dépouillement des diverses images cellulaires, ainsi que pour tous les tests cellulaires réalisés. Sa gentillesse et sa bonne humeur ont toujours rendu le travail plus simple.

• Zohra, sans qui le laboratoire ne pourrait fonctionner. Toujours présente pour règler les questions administratives qui m'ont paru parfois à combien difficiles.

• Olivier, pour sa disponibilité et pour les nombreuses discussions très instructives concernant la chimie des thiols et des cations métalliques ce qui m'a permis de mieux comprendre et d'analyser certaines de mes données.

• Doris, la mère des cellules WIF-B9 et Can 10. Merci de m'avoir accueilli pendant quelques jours au sein de son laboratoire, d'avoir pris du temps pour m'expliquer l'histoire et la généalogie de ces cellules et de nous avoir permis de travailler avec ces dernières.

Je remercie également :

• Pierre-Alain et Peggy pour leur expertise dont j'ai pu profiter respectivement en RMN et culture cellulaire. Je les remercie aussi pour leur gentillesse et leur disponibilité.

• Olivier du département de chimie moléculaire pour son encadrement lors de la synthèse de Vect1 et Vect1-TRITC, ainsi que M. Dumy pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

• Les deux personnes qui ont partagé mon bureau : Fédérico toujours là pour répondre à mes questions avec bonne humeur et Agnieszka dont la gentillesse et le calme ont été très agrables pendant cette dernière année de thèse.

• Mickaël d'avoir toujours été disponible pour échanger pendant ses pauses cigarettes

• Toute l'équipe RICC pour leur gentillesse et leur disponibilité en toutes circonstances. Merci à Lydia pour son aide précieuse pour les diverses commandes et autres questions administratives et à Yves pour sa contribution sur certains dosages UV-visible. Merci aux étudiants passés et présents ainsi qu'aux divers stagiaires qui ont contribué ou pas à mon projet de thèse.

Je garde le meilleur pour la fin car je tiens surtout à remercier ma famille et tout particulièrement mes parents pour m'avoir toujours soutenue depuis toute petite dans les moments faciles et difficiles. Je n'en serais pas là où j'en suis sans eux. Merci à eux deux. Merci à Sylvain d'avoir toujours était disponible pour m'aider de façon continue pendant ces trois années de thèse pas toujours faciles.

A Grenoble, le 28 mai 2011.

Table des matières

I Introduction **19**

II Le cuivre et le vivant, une vue d'ensemble **25**

1 Le cuivre, généralité **25**

1.1 Le cuivre métallique 25

1.2 Le cuivre, réactivité chimique et coordination 26

2 Le cuivre en biologie **28**

2.1 Protéines à cuivre 28

2.1.1 Les protéines avec un site de type I 29

2.1.2 Les protéines avec un site de type II 29

2.1.3 Les protéines avec un site de type III 29

2.1.4 Les protéines avec un site tétranucléaire 30

2.1.5 Autres sites plus complexes 31

2.2 L'homéostasie du Cuivre 32

2.2.1 Le cuivre dans l'intestin 33

2.2.2 Le cuivre dans le foie 35

2.2.3 Les métallochaperonnes 35

2.2.4 Transfert du cuivre(I) entre une métallochaperonne et sa protéine cible, exemple de Atox1 36

2.2.5 Les métallothionéines, séquestrant d'ions métalliques 38

2.3 Les dérèglements liés au Cuivre 39

2.3.1 Le cuivre, les maladies neurodégénératives et le stress oxydant . . . 40

2.3.2 Les maladies génétiques : Menkes et Wilson 46

3 Thiols et ions métalliques d^{10}, une veille histoire **53**

3.1 Chélateurs et médecine 53

3.1.1 Le British Anti-Lewisite ou BAL 54

3.1.2 La D-pénicillamine 55
3.1.3 L'acide meso-2,3-dimercaptosuccinic ou DMSA 55
3.1.4 Le 2,3-dimercapto-1-propane ou DMPS 56
3.1.5 L'acide éthylène diamine tétra acétique ou EDTA 56
3.2 Les complexes thiols-ions métalliques d^{10} 57
3.2.1 Métallothionéines et modèles structuraux 57
3.2.2 Protéines « à doigt de Zinc » 63
3.2.3 Les modèles de protéine MerR, site HgS_3 66
3.2.4 Cas de la protéine APP 70
3.2.5 Modèles de métallochaperonnes 71

4 Problématique **74**
4.1 Préambule 74
4.2 Perspectives de recherches 75

III Cyclodécapeptides à deux cystéines comme complexants du cuivre(I) **80**

5 Préambule : Stratégie de conception **80**

6 Synthèse et caractérisation **83**
6.1 Synthèse peptidique 83
6.2 Préparation des solutions de peptides face à la sensibilité de ces derniers . 84
6.3 Caractérisation par RMN 85
6.3.1 Spectre proton 85
6.3.2 Analyse de la conformation majoritaire par RMN 2D 88

7 Complexation et efficacité de ces peptides **90**
7.1 Formation d'un complexe de type CuP 91
7.1.1 Stabilité du cuivre(I) en solution aqueuse 91
7.1.2 Etudes spectroscopiques 91
7.1.3 Affinité des peptides P^1 et P^2 pour le cuivre(I) 95

7.2 Complexes avec les ions divalents 97

7.2.1 Etudes spectroscopiques 97

8 Conclusions et perspectives 103

IV Polyaminocarboxylates fonctionnalisés par trois ou quatre cystéines : synthèse et complexes métalliques 109

9 Préambule : Vers des chélateurs du Cu(I) plus efficaces ? 109

10 Synthèse et caractérisation des ligands 111

10.1 Synthèse des différents podands 111

10.1.1 Stratégie 1 : Couplage peptidique entre la Cys(Trt)OEt et le polyaminocarboxylate 112

10.1.2 Stratégie 2 : substitution nucléophile sur les polyamines 114

10.2 Modification de fonctions 116

10.2.1 Synthèse de deux autres podands dérivés du NTA 116

10.3 Détermination du pKa des différentes fonctions dans la famille NTA 118

11 Complexation du cuivre(I) 121

11.1 Rôle de la plate-forme chimique 121

11.1.1 UV-visible 121

11.1.2 Dichroïsme circulaire 122

11.1.3 Affinité de ces podands pour le cuivre(I) 124

11.2 Famille NTA : influence de la fonction adjacente au thiol 125

11.2.1 UV-visible 125

11.2.2 Dichroïsme circulaire 127

11.2.3 Analyse des spectres protons et mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé 130

11.2.4 Spectrométrie de masse 134

11.2.5 Mise en évidence de liaisons hydrogènes intramoléculaires par RMN proton 136

11.2.6 Affinité des tripodes pour le cuivre(I) 138

11.2.7 Comparaison aux chélateurs connus 140

11.3 Conclusion sur la complexation de ces cinq podands vis-à-vis du cuivre(I) . 141

12 Complexation du mercure(II) 141

12.1 Famille NTA 141

12.1.1 Spectroscopie UV-visible 142

12.1.2 Analyse des spectres protons et mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé 143

12.1.3 Complexes HgL visualisés par ES-MS 145

12.1.4 Mise en évidence de liaisons hydrogènes intramoléculaires par RMN proton 146

12.1.5 Formation de complexes HgS_2-HgS_3 détermination du pKa de la troisième cystéine 147

12.1.6 Confirmation de la coordination du Hg^{2+} par RMN ^{199}Hg 149

12.1.7 Affinité de ces tripodes pour le mercure(II) 151

12.1.8 Conclusion Famille NTA et complexation Hg^{2+} 152

12.2 Complexation du mercure(II) par le ligand $NOTA(Cys(OEt))_3$ 152

12.2.1 Spectroscopie UV-visible 152

12.2.2 Mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradients de champ pulsé et analyse des spectres protons 153

12.2.3 Formation du complexe HgL visualisé par ES-MS 154

13 Complexes des tripodes avec les métaux divalents, Pb^{2+}, Cd^{2+} et Zn^{2+} 155

13.1 Complexes de type $(ML)_x$ pour la famille NTA 155

13.1.1 Spectroscopie UV-visible 155

13.1.2 Analyse des spectres protons à 1 eqv. de cations métalliques et mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé 161

13.1.3 Spectrométrie de masse 163

13.1.4 Affinité des tripodes de la famille NTA pour les divalents 164

13.2 Originalité du NOTA, complexation au niveau du cycle azoté, études par spectroscopie UV-visible 166

14 Conclusions et perspectives 169

V Vectorisation des chélateurs vers les hépatocytes 173

15 Optimisation et conception des vecteurs 173

15.1 Vers un ciblage efficace 173

15.1.1 Les récepteurs aux asialoglycoprotéines 173

15.1.2 Reconnaissance des résidus galactose (Gal) et *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) : 174

15.1.3 Interactions multivalentes : l'effet cluster 175

15.2 Conception des chélateurs vectorisés 177

15.2.1 Plate-forme peptidique de type RAFT 178

15.2.2 Structure tripode 180

15.2.3 Vecteurs prodrogues 182

15.3 Introduction d'un fluorophore 182

15.3.1 Choix de la couleur 182

15.3.2 Fonctionnalisation par le fluorophore 184

15.4 Conclusion 184

16 Synthèse du premier vecteur issu des cyclodécapeptides P^1 et P^2 185

16.1 Conception de Vect1 et Vect1-TRITC, stratégie de synthèse 185

16.1.1 Introduction des sucres 185

16.1.2 Greffage du fluorophore 186

16.1.3 *N*-acétylgalactosamine comme résidu sucre 187

16.2 Synthèse et discussion 187

16.2.1 Synthèse du dipeptide Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]-OH : 187

16.2.2 Synthèse de la plate-forme cyclodécapeptide 188

16.2.3 Oxydation des sérines 189

16.2.4 Introduction des résidus sucres via un lien oxime 189

16.2.5 Greffage du fluorophore tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC) 191

16.3 Conclusion sur cette synthèse 192

17 Synthèse du deuxième vecteur issu du tripode $NTA(Cys(NH_2))_3$ 193

17.1 Conception de Vect2 193
17.1.1 Plate-forme chimique issue du NTA 193
17.1.2 Greffage du fluorophore 194
17.1.3 Formule du deuxième vecteur 194
17.2 Synthèses et discussions 195
17.2.1 Synthèse de l'intermédaire **24** contenant le résidu GalNac 197
17.2.2 Partie tripode, synthèse des produits $\mathbf{A}_1$ et $\mathbf{A}_2$ 202
17.2.3 Formation des trois liaisons disulfure 204
17.2.4 Couplage du fluorophore 206
17.3 Conclusion sur ce paragraphe 208

18 Complexation du cuivre(I) par les deux vecteurs *in vitro* et dans les cellules 209

18.1 Mesures de la complexation des vecteurs par spectroscopie UV-visible . . . 209
18.1.1 Mesures et résultats 209
18.1.2 Conclusions 210
18.2 Tests cellulaires : Internalisation et évaluation de la complexation du cuivre(I) intracellulaire 211
18.2.1 Types cellulaires utilisés 211
18.2.2 Internalisation des vecteurs et cinétique d'entrée 216
18.2.3 Utilisation d'une sonde biologique de la concentration en cuivre intracellulaire pour évaluer la complexation 220
18.3 Conclusion de ce chapitre 223

19 Conclusion générale de cette partie 223

VI Conclusion 228

VII Partie Expérimentale 236

20 Cyclodecapeptides Synthesis 236

20.1 General Details 236

20.2 Synthesis of the cyclodecapeptide P^1 and P^2 236
20.3 ^{1}H NMR characterization 237

21 Podands synthesis **239**
21.1 General Details 239
21.2 (Trt)compounds synthesis 240
21.3 (SH)compounds synthesis 244

22 Vector1 synthesis **248**
22.1 General Details 248
22.2 Dipeptide (Fmoc-Lys[Boc-Ser(^{t}Bu)]-OH) synthesis 248
22.3 Sugar synthesis 250
22.4 Synthesis of peptide scafold 256

23 Vector 2 synthesis **260**
23.1 General Details 260
23.2 Sugar + spacer 260
23.3 Tripodal part 264
23.4 Coupling reaction 270

24 Physicochemical characterization methods **273**
24.1 Solutions 273
24.1.1 Metallic cation solutions 273
24.1.2 Ligand solutions 273
24.1.3 Bathocuproin disulfonate solution 274
24.2 Spectroscopic titrations 275
24.2.1 UV titrations 275
24.2.2 CD titrations 275
24.3 ES-MS titrations 275
24.4 NMR experiments 276
24.4.1 ^{1}H NMR titrations 276
24.4.2 Diffusion cœfficient measurements 276

24.4.3 Temperature cœfficient measurement 277
24.4.4 ^{199}Hg NMR 277
24.5 Apparent affinity constants 277
24.5.1 Copper(I) affinity 277
24.5.2 Mercury(II) affinity 278
24.5.3 Lead (II) affinity 279
24.5.4 Cadmium(II) and zinc(II) affinity 279
24.6 Potentiometry 279
24.6.1 Materials 279
24.6.2 Electrode calibration 280
24.6.3 Titration 280
24.7 pH titration of HgL 281

25 Biological experiments **281**
25.1 Cell culture 281
25.2 Localization of ATP7B by immunofluorescence 281
25.3 Experimental Procedures 282
25.3.1 Uptake of Vect1-TRITC 282
25.3.2 Trafficking of ATP7B 282

VIII Annexes **286**

26 Figures : déplacement chimiques des NH en fonction de la température **287**
26.1 Complexes du cuivre(I) 287
26.2 Complexes du mercure(II) 288

27 Spectres de masse des différents vecteurs **289**
27.1 Vecteur 1 289
27.2 Vecteur 2 290

28 Calcul des constantes d'affinité **291**
28.1 Constantes de formation des complexes 292

28.2 Constantes de protonation 292
28.3 Cas particulier 293

Liste des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
AD	Azheimer Disease
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ac_2O	Anhydride Acétique
Ac	Acétyls
AcN	Acétonitrile
AgOTf	trifluorométhanesulfonate d'argent
ALAD	Protéine aminolævulinate dehydratase
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
APP	Amyloid Precursor Protein
ASGP-R	Récepteur aux asialoglycoprotéines
BAG	Boite à Gants
BAL	British Anti Lewisite
Bcs	Bathocuproïne Disulfonate
BF_3Et_2O	Ethérate de trifluorure de bore
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
Boc	*tert*-Butylcarbamate
CAN	Cérium nitrate d'ammonium
CD	Dichroïsme Circulaire
CD_3CN	Acétonitrile deutéré
ConA	Conconavalin A
COSY	Correlation Spectroscopy
D_2O	Eau deutéré
DAST	Diméthylaminosulfure trifluorure
DCC	*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
Dde	*N*-2-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthylamine
DIEA	*N,N*-Diisopropyléthyl amine
DMF	Diméthyle Fornamide
DMPS	le 2,3-Dimercapto-1-Propane
DMSA	l'Acide Meso-2,3-Dimercaptosuccinic
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetra acetic acid
D-Pen	D-pénicillamine
DTT	Dithiothreihol
EDC	1-éthyl-3-3diméthylaninopropyl-carbodiimide
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
eqv.	équivalent
ESI	Electrospray Ionization

ES-MS	Electrospray-Mass Spectroscopy
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyle
Gal	Galactose
GalNac	*N*-acétyl Galactosamine
GATA	Facteur se fixant préférentiellement sur les séquences(A/T)GATA(A/G) de l'ADN
GIF	Growth Inhibitory Factor
GSH	Glutathion
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HIV	Human Immunodeficiency Virus
$HO^{\bullet}$	radical Hydroxyle
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSAB	Hard ans Soft Acids and Bases
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
LMCT	Ligand Metal Charge Transfert
MT	Métallothionéines
MXCXXC	Méthionine X Cystéine X X Cystéine
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
NOTA	Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique
NTA	Acide Nitrilotriacétique
NTA(Lys)	N_α-N_α-Bis(carboxymethyl)-L-lysine
Pbf	2,2,4,6,7-Pentaméthyldihydrobenzofuran-5-sulphonyle
PEG	Polyéthylène Glycol
PYS	2-pyridyl-sulfanyl
PNA	Peanut Agglutinin
PrP^C	Protéine Prion Cellulaire
PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-Pyrrolidino-Phosphonium Hexafluorophosphate
QM/MM	Quantum Mechanics/Molecular Mechanics
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating-Frame Overhauser Effect Spectroscopy
RX	Rayons X
SLA	Sclérose Latéral Amyotrophique
SOD	Superoxide Dismutase
SPPS	Synthèse Peptidique sur Phase Solide
TACA	Tumor-Associated Carbohydrate Antigens
TAMRA	carboxyTetramethylrhodamine succinimidyl ester

tamp.	Tampon
TASP	Template-Assembled Synthetic Peptide
^{t}Bu	*tert* Butyl
Tcn	1,4,7-triazacyclononane
TFA	Acide Trifluoroacétique
TMSOTf	Triméthylsilyle trifluorométhanesulfonate
TRITC	Trétraméthyl-rhodamine isothiocyanate
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TNB^{2-}	2-nitro-5-thiobenzoate
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Trt	Trityl
TTM	Tétrathiomolybdate
WD	Wilson Disease

Code des Acides Aminés

G	Glycine	*(Gly)*
P	Proline	*(Pro)*
A	Alanine	*(Ala)*
V	Valine	*(Val)*
L	Leucine	*(Leu)*
I	Isoleucine	*(Ile)*
M	Méthionine	*(Met)*
C	Cystéine	*(Cys)*
F	Phénylalanine	*(Phe)*
Y	Tyrosine	*(Tyr)*
W	Tryptophane	*(Trp)*
H	Histidine	*(His)*
K	Lysine	*(Lys)*
R	Arginine	*(Arg)*
Q	Glutanine	*(Gln)*
N	Asparagine	*(Asn)*
E	Acide Glutamique	*(Glu)*
D	Acide Aspartique	*(Asp)*
S	Sérine	*(Ser)*
T	Thréonine	*(Thr)*

Introduction

Première partie

Introduction

La chimie du vivant a longtemps été perçue comme essentiellement « organique » et donc « bioorganique ». Mais depuis ces dernières années, l'analyse du monde vivant a révélé l'importance du rôle que jouent les ions métalliques dans la machinerie cellulaire de production et de transformation des molécules naturelles. En effet, le vivant possède une face métallique aux reflets multiples, puisque 13 métaux sont considérés comme essentiels à la vie. Le monde du vivant est donc, par conséquent, également « bioinorganique ». Il est estimé qu'environ 30% des enzymes utilisent des cations métalliques pour assurer correctement leur fonction [1].
L'importance de ces cations métalliques dans le monde du vivant apparait dès l'origine de la vie. En effet, des « réacteurs » métalliques, par exemple les sulfures solides de nickel et de fer [2] produits à haute température sur les cratères des fumeurs noirs au fond des océans, ont été essentiels pour l'optimisation des premières réactions « biologiques ».
Parmis ces 13 métaux, quatre sont abondants dont deux alcalins (sodium et potassium) et deux alcalino-terreux (magnésium et calcium) (Table 1). Les neufs autres métaux appartiennent au bloc d de la classification périodique et existent à l'état de trace (Fer, Zn, Cu) ou d'ultra-trace (V, Cr, Mn, Co, Ni, Mo) (Table 1). Le plus abondant d'entre eux est le fer.

Métaux	Pourcentage	Métaux	Pourcentage
Ca	1.90%	Zn	0.002%
K	0.23%	Cu	0.0002%
Na	0.08%	Mn	0.00005%
Mg	0.027%	Co	0.000003%
Fe	0.005%	Mo	0.0000005%

Table 1 – Teneurs en métaux de l'organisme humain (% en masse totale) [3]

Ces métaux exercent des fonctions très variées. Beaucoup interviennent dans le transfert d'électrons, le transport, mais peuvent aussi servir d'électrolytes, ou avoir un

rôle structurant pour les édifices moléculaires biologiques ou encore être impliqués dans des processus d'oxydo-réduction (Table 2). La liste n'est bien sûr pas exhaustive. Leurs rôles dans les divers processus biologiques dépendent de leurs propriétés uniques liées à leur charge électrique, leur taille, la présence dans certains cas d'électrons célibataires qui confèrent aux molécules qui les portent de la couleur, du magnétisme et de la réactivité. La plupart de ces métaux sont présents dans des protéines appelées métallo-protéines ou métalloenzymes.

Métaux	Fonction
Na	Balance osmotique, porteur de charge
K	Balance osmotique, porteur de charge
Ca	Structure, porteur de charge, messager
Mg	Structure, hydrolase, isomérase
Fe	Oxydase, transport et stockage de l'oxygène, transfert d'électron, hydrogénase, dismutase, oxygénase,
Zn	Structure, hydrolase
Cu	Oxydase, transport de l'oxygène, dismutase, transfert d'électron, réductase, oxygénase
Ni	Hydrogénase, hydrolase
Co	Oxydase, transfert de groupement alkyle
Mn	Oxydase, réductase, structure, photosynthèse
Mo	Oxydase, nitrogénase,transfert d'oxo
Cr	Inconnue (peut être impliqué dans le métabolisme du glucose)
V	Oxydase, nitrogénase

Table 2 – Métaux essentiels et quelques unes de leurs principales fonctions [4]

Quand on regarde ces enzymes, on se rend compte que les ions métalliques fer et cuivre sont présents dans les mîmes types d'enzymes. D'après la théorie de l'évolution et l'adaptation du vivant à la présence d'oxygène, les ions Fe^{2+} s'oxydent en Fe^{3+} qui précipite et devient indisponible pour le vivant. Par contre, Cu^{+} soluble s'oxyde en Cu^{2+}. Il est donc biodisponible et est utilisé à la place du fer. On observe alors une évolution des protéines à cuivre au détriment des protéines à fer corrélée à l'augmentation de la présence d'oxygène.

Malgré le rôle essentiel de ces métaux pour l'organisme leur concentration est extrêmement régulée par divers processus biologiques. En effet, en excés ils peuvent être toxiques. Tout problème dans l'homéostasie de ces métaux entraîne de graves consèquences pour l'organisme. Certains métaux, qui possèdent un caractère d'oxydo-réducteur, peuvent engendrer la formation de radicaux et donc une augmentation du stress oxydant s'ils s'accumulent dans l'organisme (surcharges métalliques).
La maladie de Wilson est une maladie génétique qui a pour conséquence une surcharge

hépatique en cuivre au degré d'oxydation +I. Les traitements actuels, qui utilisent des chélateurs, ne sont pas assez efficaces et sont peu sélectifs du cation métallique ciblé. Voilà pourquoi nous proposons d'élaborer de nouveaux chélateurs qui soient sélectifs du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson.

Après un premier chapitre introductif sur le cuivre et la biologie, l'élaboration de deux familles de chélateurs à bases de cystéines sera présentée ainsi que les études de complexations de ces deux types de ligands pour le cuivre(I) mais aussi pour d'autres cations métalliques aux propriétés de complexation similaires.
Enfin, la fonctionnalisation de ces deux familles de chélateurs sera proposée ainsi que les premiers tests cellulaires sur des lignées cellulaires issues d'hépatocytes.

Le cuivre et le vivant, une vue d'ensemble

Deuxième partie

Le cuivre et le vivant, une vue d'ensemble

1 Le cuivre, généralité

1.1 Le cuivre métallique

Le cuivre vient du grec Kupros qui signifie Chypre. Il a été exploité dès l'Antiquité. Il est connu, extrait et utilisé par les humains depuis plus de 5 000 ans. Un des gisements les plus célèbres et les plus exploités se situait alors sur l'île de Chypre, Kupros en grec, qui devint cyprium en latin, et donna cuprum pour désigner le cuivre. L'abondance du cuivre dans la croûte terrestre est de 68 ppm.

Le cuivre est un métal rougeâtre de configuration électronique [Ar] $3d^{10}$ $4s^1$, de numéro atomique 29. Il est situé dans la colonne 11 et sur la 4ème période de la classification périodique de Mendeleiev. Le cuivre présente des degrés d'oxydation pour lesquels les sous couches « d » sont incomplètes et est donc un métal de transition.

Les métaux de transition sont caractérisés par le rôle de leurs orbitales « d » dans la formation des liaisons chimiques. Ils sont en général plus denses que les autres métaux tels que le calcium ou le sodium. Ils montrent un large spectre d'états d'oxydations qui leur confère une activité oxydoréductrice intéressante et une chimie riche. Ils sont d'excellents conducteurs thermiques et électriques. Les métaux, comme le cuivre, qui possède un état d'oxydation bas (Cu(I)) ont des propriétés catalytiques qui sont très utilisées en synthèse organique. Pareillement, ces métaux ont la capacité de former des complexes avec un grand nombre de ligands organiques différents et sont connus pour jouer des rôles importants dans les processus biologiques, mais nous en reparlerons plus loin.

Notons que sous sa forme métallique le cuivre s'oxyde au contact de l'air, mais contrairement au fer qui rouille au contact de l'humidité contenue dans l'air, le cuivre n'est pas

réactif avec l'eau et son oxydation entraîne la formation d'une couche d'oxyde de cuivre protectrice de couleur « vert de gris ». Ce processus se voit très bien sur la statue de la liberté qui s'est recouverte d'une couche d'oxyde de cuivre avec le temps.
Dans la nature, le cuivre est présent sous forme de métal ou de minéraux, surtout de cuprite (Cu_2O) et de malachite ($Cu_2CO_3(OH)_2$).

1.2 Le cuivre, réactivité chimique et coordination

En solution, le cuivre forme majoritairement des ions cuivreux Cu(I) et cuivriques Cu(II). Comme vu plus haut, sous forme métallique, les électrons du cuivre se répartissent suivant la configuration électronique [Ar] $3d^{10}$ $4s^1$. L'ion cuivreux (Cu(I)) est obtenu par la perte d'un électron de la couche 4s et l'ion cuivrique (Cu(II)) est obtenu par la perte d'un second électron de la couche 3d. Les ions cuivriques en solution dans l'eau sont de couleur bleue, cela est dû à une transition électronique d-d qui se situe dans la région du visible. Les propriétés d'oxydoréduction du cuivre sont fortement liées à la distribution de ses électrons sur ses orbitales électroniques. Le potentiel standard d'oxydoréduction du couple Cu^+/Cu^{2+} est de 0.16 V. Le cuivre(I) a tendance à s'oxyder facilement et donc à perdre un électron sur sa couche « d ». C'est donc un réducteur puissant qui, en biologie, peut réagir avec H_2O_2 selon un mécanisme de type Fenton (équation 1) et engendrer un radical hydroxyle $HO^\bullet$ qui est un oxydant très puissant et donc extrêmement toxique pour l'organisme.

$$Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^- + OH^\bullet \tag{1}$$

Comme énoncé précédemment, le cuivre se situe dans la colonne 11, la même colonne que l'argent et l'or. Ces trois métaux ont des propriétés chimiques et de coordination similaires. Ils ne sont pas oxydés par les ions H^+ dans les conditions standards et ce caractère noble explique leur usage en joaillerie. Notons que les ions Cu^+ et Au^+ se dismutent en solution dans l'eau selon les équations 2 et 3. Par contre, Ag^+ ne se dismute pas.

$$2Cu^+ \rightarrow Cu^{2+} + Cu(s) \tag{2}$$

$$3Au^+ \rightarrow 2Au(s) + Au^{3+} \tag{3}$$

La différence de réactivité chimique entre les ions cuivriques et cuivreux s'explique par le théorie « Hard and Soft Acids and Bases » (HSAB). Ralph Pearson [5] a introduit la théorie HSAB dans le début des années 60. L'impact de cette nouvelle théorie a été immédiat et elle est très largement utilisée en chimie pour expliquer la stabilité de composés et leur réactivité. Pearson a divisé les espèces métalliques ou acides de Lewis en trois catégories, dur (Hard), mou (Soft) et intermédiaire (Borderline). Il en est de même pour les bases. Le terme **dur** s'applique aux acides ou ions métalliques qui sont petits (rayon ionique < 90 pm), ont un état d'oxydation élevé, sont peu polarisables et ont une faible électronégativité de Pauling (0.7 - 1.6). Le terme **mou** s'applique aux acides ou ions

métalliques qui sont gros (rayon ionique > 90 pm), ont un état d'oxydation bas (+1 ou +2), sont très polarisables et ont une électronégativité de Pauling assez élevée (1.9 - 2.54). La catégorie des **intermédiaires** regroupe les acides ou ions métalliques qui ont des propriétés intermédiaires entre celles des acides durs et celles des acides mous (Table 3). En ce qui concerne les bases, celles qui sont dites dures sont celles qui ont une électronégativité de Pauling très élevée (3.44 - 3.98) et sont les plus petites des non-métaux (rayon ionique ≈ 120 pm). Les bases dites molles ont une électronégativité modérée (2.1 - 2.96) et sont les plus grosses des non-métaux (r_i > 170 pm)(Table 4)

Dur	Intermédiaire	Mou
H^+, Li^+, Na^+, K^+, Mg^{2+} Ca^{2+}, Sn^{2+}, Be^{2+}, Sr^{2+}, La^{3+}, Co^{3+}, Fe^{3+}, Cr^{3+} Al^{3+}, Si^{4+}, Ti^{4+}	**Cu^{2+}**, **Zn^{2+}**, **Pb^{2+}**, Fe^{2+} Co^{2+}, Ni^{2+}, Sn^{2+}	**Cu^+**, Ag^+, Au^+, Ti^+, **Hg^+**, Pd^{2+} **Cd^{2+}**, Pt^{2+}, Hg^{2+}

Table 3 – Classification des acides de Pearson [5]

Dur	Intermédiaire	Mou
H_2O, OH^-, F^-, NH_3, ROH Cl^-, RO^-, RNH_2, R_2O, NO_3^- N_2H_4, PO_4^{3-}, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, ClO_4^-	N_2, NO_2^-,Br^-, N_3^-, C_5H_5N SO_3^{2-}, $C_6H_5NH_2$	R_2S, RSH, RS^-, I^-, CO CN^-, H^-, SCN^-, R_3P, C_6H_6 R^-, RNC, C_2H_4,$(RO)_3P$, $S_2O_3^{2-}$

Table 4 – Classification des bases de Pearson [6]

Cette théorie permet d'expliquer les différences de comportement lors des complexations entre ligands et cations en terme de donneur d'électrons et d'accepteur d'électrons. Les cations métalliques appartenant à la même classe auront des similarités en terme de réactivité et de coordination. Selon Pearson, l'ion cuivrique est donc plus dur que l'ion cuivreux. Les deux cations auront donc des comportements différents. Le premier aura tendance à se lier avec des ligands N-donneurs de type histidine, amine. . .ou O-donneurs de type carboxylate ou alcool. Le second, aura une affinité plus prononcée pour les ligands mous comme les thiols.
Quant à leur coordination, les complexes de Cu^+, Ag^+ et Au^+ sont souvent linéaires. Cette tendance à la coordination linéaire est due à la similitude énergétique des orbitales externes ns, np et (n-1)d qui permet la formation d'hybrides « spd » colinéaires. Cependant, ils peuvent aussi former des complexes tétraédriques et trigonaux.
Les complexes plans carrés sont plus courants pour Cu^{2+} et Au^{3+}. Le cuivre(II) a tendance, en solution, à avoir une coordination de 4 (plan carré), 5 (bipyramide à base triangulaire ou pyramide à base carrée) ou 6 (octaédrique). Le cuivre(II) est entouré de quatre voisins dans une géométrie plane et un 5ème ou 6ème ligand est connecté selon un

axe perpendiculaire.
Notons aussi que le cuivre(II) est paramagnétique alors que le cuivre(I) ne l'est pas. Ces propriétés permettent d'étudier les complexes de cuivre(II) par Résonance Paramagnétique Electronique.
Le cuivre(I) et le cuivre(II) ont donc des propriétés très différentes. Selon la classification de Pearson, le cuivre(I) a un comportement et une réactivité qui se rapprochent de ceux des autres cations métalliques mous tels que Hg^{2+} et Cd^{2+} mais aussi des ions métalliques intermédiaires de même configuration électronique (d^{10}) comme Zn^{2+} et Pb^{2+}. Ces cations métalliques présentent aussi des similarités au niveau de leurs interactions dans le vivant. Pareillement, le mercure(II) a tendance tout comme le cuivre(I), à former avec certains ligands des systèmes dicoordinés linéaires. Au contraire, le cadmium(II) a plutôt tendance à former des coordinances plus élevées de 4 ou 6 comme le zinc(II) et le plomb(II).

En résumé, le cuivre(I) et le cuivre(II) possèdent une configuration électronique différente, respectivement d^{10} et d^9. Selon la classification de Pearson, le premier est plus mou que le second. Ces deux cations ont donc des propriétés très différentes. Le cuivre(I) a un comportement proche de celui des cations métalliques de même configuration électronique (d^{10}) comme Hg^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+} et Pb^{2+} ($ns^2(n\text{-}1)d^{10}$). En particulier, ces cinq ions établissent des interactions similaires et de même type avec les protéines, spécialement avec celles qui sont riches en soufre. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons donc aux cinq ions Cu^+, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+} et Pb^{2+} que nous nommerons par commodité les ions d^{10}.

2 Le cuivre en biologie

Les couples d'ions Fe^{2+}/Fe^{3+} et Cu^+/Cu^{2+} sont les systèmes rédox les plus communs des processus biologiques. Pour cela, le cuivre est présent dans un grand nombre d'enzymes. Mais, le cuivre libre est toxique pour l'être vivant, voilà pourquoi sa concentration est extrêmement contrôlée par l'organisme. Dans le vivant, le cuivre existe sous les deux degrés d'oxydation +I et +II. Le cuivre(II) est principalement le cuivre circulant que l'on retrouve dans le sang. Dans les cellules, le cuivre est, quant à lui, au degré d'oxydation +I en raison du milieu réducteur des cellules dû à la présence notamment de glutathion. Au sein de l'organisme, le cuivre va donc être pris en charge par différents types de protéines qui vont l'utiliser, le transporter ou le stocker.

2.1 Protéines à cuivre

Les protéines à cuivre sont des enzymes qui possèdent des sites actifs présentant un ou plusieurs atomes de cuivre. Ce dernier a un rôle de cofacteur et il intervient donc

dans de nombreux processus tels que le transfert d'électrons, le transport de l'oxygène, le métabolisme du fer, la régulation des neurotransmetteurs et des neuropeptides, la synthèse des phospholipides, le fonctionnement du cerveau, la pigmentation ...
L'utilisation du cuivre par le vivant est étroitement liée aux propriétés d'oxydo-réduction du couple Cu^{+}/Cu^{2+} dont le potentiel standard redox, est de 160 mV. Le cuivre a aussi une capacité à former des liaisons de coordination stables avec les groupements thiolate et imidazole.
Ces protéines à cuivre peuvent se classer en différents types selon la structure du site liant le cuivre.

2.1.1 Les protéines avec un site de type I

Les protéines de type I (ou T1) ont dans leur site actif un seul atome de cuivre ayant une géométrique tétraédrique. Cet atome de cuivre est coordonné par deux histidines et une cystéine formant une structure trigonale plane et un quatrième ligand, variable, vient se lier selon un plan axial. Ce type de protéine est aussi appelé « protéine bleue »(Blue copper protein). Cette appellation vient de la bande à transfert de charge $S^{-} \longrightarrow Cu^{2+}$ située à 600 nm qui a une couleur d'un bleu très intense [7] [8] [9] [10]. On peut aussi trouver le nom de cuprédoxine dans la littérature. Parmi ce type d'enzyme, on peut citer l'amicyanine et la plastocyanine qui jouent un rôle dans le transfert d'électrons, l'azurine qui est une oxydoréductase [11].

2.1.2 Les protéines avec un site de type II

Ces enzymes ont un atome de cuivre avec une géométrie plan carré. Il est coordonné par des ligands de types N-donneurs ou N/O-donneurs. Aucun atome de soufre ne coordonne l'atome de cuivre, les enzymes n'ont donc pas de couleur bleue. La sphère de coordination du cuivre est moins rigide dans les centres de type II et le cuivre peut donc directement réagir avec un substrat [7] [8] [10]. Ce type de centre actif se rencontre chez les monooxygénases comme la dopamine-β-hydroxylase, qui convertit la dopamine en norépinéphrine (ou noradrénaline) et chez les galactoses oxydases qui participent au métabolisme du galactose.

2.1.3 Les protéines avec un site de type III

Ces enzymes présentent un centre binucléaire comportant deux atomes de cuivre pontés par un oxygène moléculaire. Chaque cuivre est lié par trois histidines. Entre les deux atomes de cuivre, il y a un couplage antiferromagnétique dû à la liaison (μ-η^2:η^2-peroxo) entre les deux cuivres (Fig 1). La géométrie du site Cu-O_2-Cu est plane et le substrat se présente perpendiculairement [7] [8] [10].

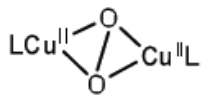


FIGURE 1 – Centre binucléaire de cuivre

Ce type de site se rencontre chez les oxydases et les protéines transportant l'oxygène. Citons par exemple, la catéchol oxydase qui catalyse l'oxydation des catéchols, la tyrosinase qui catalyse la production de mélanine par oxydation [12] et l'hémocyanine qui intervient dans le transport de l'oxygène chez les crustacés.

2.1.4 Les protéines avec un site tétranucléaire

Dans ces enzymes, le centre possédant le cuivre, se compose de sites de type I, de type II et de type III. Elles contiennent au final quatre atomes de cuivre. Elles jouent un rôle dans l'activation du dioxygène. Le mécanisme de cette activation, décrit dans la figure 2, est le suivant : le substrat vient interagir avec le centre cuivre de type I et lui arrache un électron. Cet électron est alors transféré au centre trinucléaire de cuivre (type II et type III) sur une distance de 13 Å. Il y a alors réduction des trois atomes de cuivre. Ensuite, l'oxygène interagit avec le centre trinucléaire afin d'être réduit en eau (formation d'un centre binucléaire de cuivre Fig 1) [9].

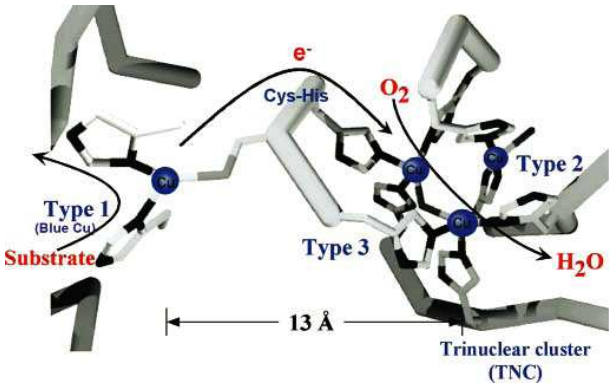


FIGURE 2 – Mécanisme de l'activation de l'oxygène [13]

Ce type de site se rencontre notamment dans la famille des oxydases à cuivre (multicopper oxydases [10]) telles que la laccase qui oxyde les polyphénols et donc active le dioxygène, ou chez la céruloplasmine qui intervient dans le transport du cuivre et dans sa distribution dans tout l'organisme. Cette enzyme est aussi impliquée dans le métabolisme du fer où le cuivre est cofacteur.

2.1.5 Autres sites plus complexes

Certaines enzymes sont constituées de sites plus complexes de type, Cu_A (Fig 3) où les atomes de cuivre sont liés par des histidines, une méthionine, un carbonyle d'un acide aminé et sont pontés par un atome de soufre d'une cystéine, ou de type Cu_B où le cuivre est coordiné par trois histidines dans une géométrie trigonale (Fig 3) ou plus complexe encore, avec d'autres ions métalliques tels que le fer, le manganèse ou le zinc. Parmi ces enzymes, on trouve la cytochrome *c* oxydase [14] qui est située dans les mitochondries et joue un rôle dans le processus de la respiration, l'ubiquinone oxydase qui est l'analogue de la cytochrome *c* oxydase chez les bactéries, la supéroxide dismutase (à zinc [15], à fer, à manganèse ou à nickel) qui intervient dans la défense contre les radicaux libres, la lysyl oxydase qui intervient lors du pontage entre le procollagène et la proélastine dans le tissu conjonctif.

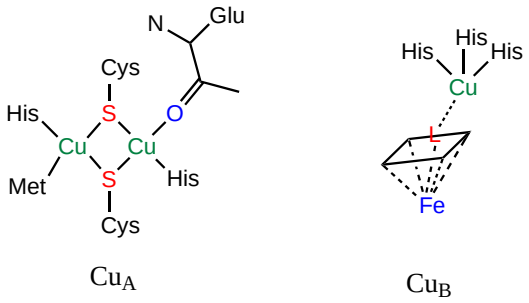


FIGURE 3 – Centre de type Cu_A et Cu_B [8]

Enfin le site Cu_Z que l'on rencontre dans l'enzyme oxyde nitreux réductase est quant à lui constitué de quatre atomes de cuivre, entourés par 7 Histidines et reliés par un atome de soufre pontant(Fig 4) [16].

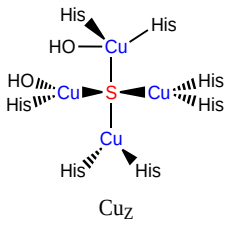


FIGURE 4 – Centre de type CuZ [16]

Pour conclure sur les protéines à cuivre, nous retiendrons que le cuivre est un élément essentiel à l'organisme car il est utilisé comme cofacteur dans de nombreux processus biologiques. Dans la plupart de ces enzymes, le cuivre est complexé au degré d'oxydation +II et est ensuite réduit lors du cycle catalytique. Mais il ne faut pas oublier que l'excès de cuivre peut être toxique. Le cuivre(I) peut engendrer des réactions radicalaires de type Fenton. Voilà pourquoi sa régulation est extrêmement contrôlée.

2.2 L'homéostasie du Cuivre

L'organisation mondiale de la santé a recommandé un apport quotidien de 30 μg/kg par jour (ou 2.1 mg/jour) dans le cas d'un homme adulte et 80 μg/kg par jour pour les nourrissons [17]. Le cuivre arrive principalement dans l'organisme par l'alimentation. Les aliments les plus riches en cuivre sont le foie, les crustacés (huîtres, homards, écrevisses), les coquillages, le chocolat et les noix [18], [19]. La teneur en cuivre de ces aliments peut varier de 20 à 400 μg/kg. Les concentrations en cuivre dans divers produits alimentaires sont indiquées table 5.

Type d'aliment	Concentration (μg/kg poids humide)
Fruits de mer (poissons, crustacés et mollusques)	1.49
Viandes (volaille, porc, bœuf, agneau)	3.92
Oeufs et produits laitiers (lait, beurre)	1.76
Légumes (salades, fèves, plantes-racine)	1.17
Fruits	0.82
Graines et céréales	2.02
Huiles et graisses	4.63
Noix	14.82
Condiments et épices	6.76
Boissons (vin, bière)	0.44

Table 5 – Concentration moyenne de cuivre dans certains aliments [18]

La quantité de cuivre dans l'organisme chez un adulte varie entre 75 et 150 mg/Kg. Les concentrations tissulaires de cuivre sont maximales dans le foie et le cerveau (environ un tiers de la charge corporelle). Des concentrations plus faibles se retrouvent dans le cœur, la rate, les reins et le sang. La teneur en cuivre de l'iris et de la charoïde de l'œil est très élevée. Deux organes jouent un rôle important dans l'homéostasie du cuivre, l'intestin où le cuivre est assimilé et le foie qui est l'organe régulateur où se fait la balance entre distribution et régulation (Fig 5).

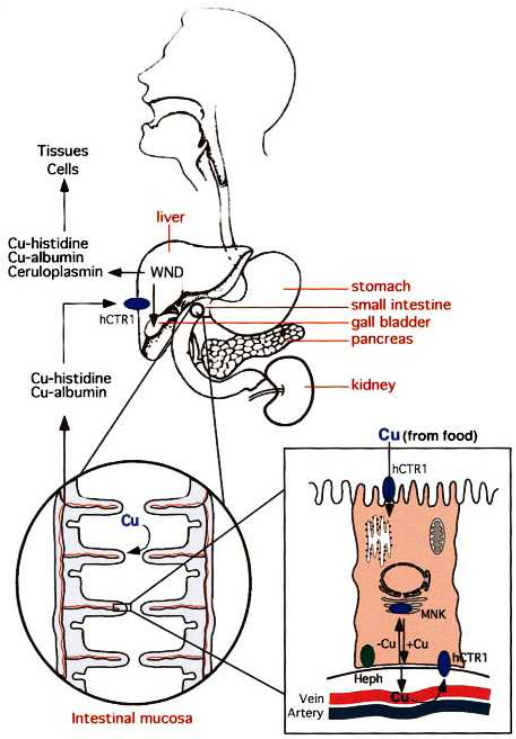


FIGURE 5 – Distribution du cuivre dans l'organisme [20]

2.2.1 Le cuivre dans l'intestin

L'assimilation du cuivre au niveau de l'intestin se fait par la traversée de la membrane apicale des entérocytes (cellules de l'intestin) par un transporteur de haute affinité hCtr1 [21] [22](Fig 6). Cependant la participation d'autres transporteurs tels que DMT1 [23] ou hCtr2 n'est pas à exclure.

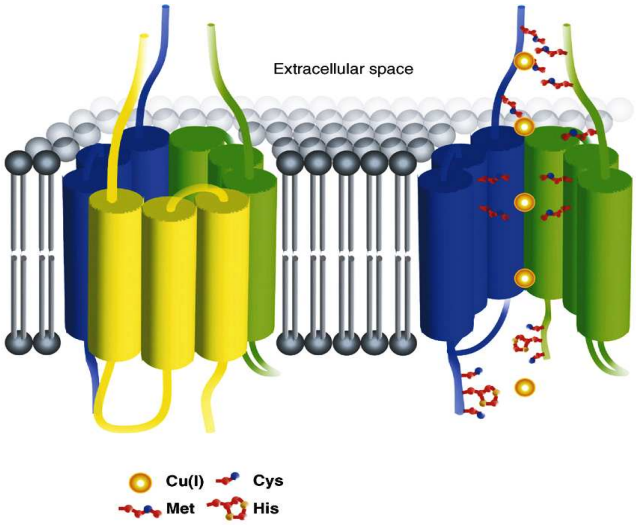


FIGURE 6 – Passage du cuivre à travers hCtr1 [24]

Juste avant de passer par la protéine transmembranaire hCtr1 et entrer dans les cellules intestinales, le cuivre(II) est réduit en cuivre(I), le mécanisme de cette réduction n'est pas clairement élucidé dans la littérature. A cause de sa toxicité (réaction de Fenton), le cuivre(I) n'est jamais libre dans la cellule. C'est pourquoi, il est tout de suite pris en charge par des molécules de faibles poids moléculaires comme le glutathion ou par les différents transporteurs de la cellule [25]. Enfin il existe d'autres protéines qui sont les métallothionéines et qui ont un rôle de séquestrant de cuivre(I) quand celui-ci est en excès dans la cellule. Les transporteurs, qui sont des métallochaperonnes, ont pour objectif de délivrer le cuivre au sein de la cellule à des protéines qui en ont besoin et qui se situent dans les différents compartiments de la cellule [22] [26]. Parmi les transporteurs : la métallochaperonne CCS transporte et donne le cuivre(I) à la superoxide dismutase. La métallochaperonne COX17 transporte et donne son cuivre à la cytochrome oxydase située dans les mitochondries. La métallochaperonne Atox1 délivre son cuivre à une ATPase située dans l'appareil de Golgi ATP7A (ou protéine de Menkes) [27] [28]. Le rôle d'ATP7A est très important dans la régulation du niveau de cuivre intracellulaire. En effet, quand celui-ci atteint un niveau toxique, ATP7A migre à la membrane basolatérale de la cellule et exporte le cuivre dans la circulation sanguine (Fig 7) [27] [28] [29]. La concentration intracellulaire basale en cuivre total lié à des protéines, est d'environ 100 μM. Il a été estimé que la concentration intracellulaire, dans une cellule normale, en cuivre non lié à des protéines (libre) est inférieure à 10^{-18}M [30].
Dans le sang, le cuivre est à nouveau au degré d'oxydation +II. Il est principalement pris en charge par: l'albumine (180 μg de Cu associé par litre de plasma [19]), la transcupréine et des acides aminés ou autres molécules de petits poids moléculaires (20-50 μg de Cu associé par litre de plasma [19]), jusqu'au foie.

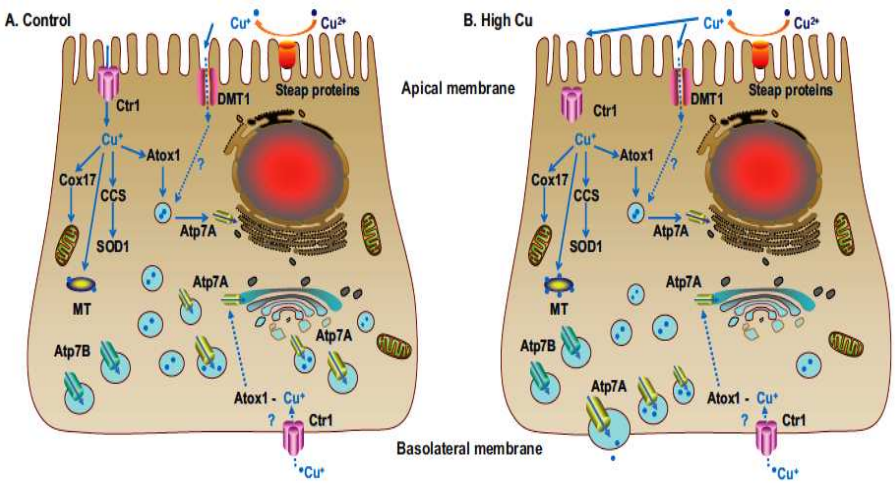


FIGURE 7 – Modèle du trafic du cuivre au sein des cellules intestinales [29]

2.2.2 Le cuivre dans le foie

Le cuivre est incorporé dans les cellules hépatiques, par le même transporteur hCtr1. Dans la cellule hépatique il est pris en charge par les mêmes métallochaperonnes (CCS, COX17, Atox1) [22]. La différence va venir de la protéine ATPase à laquelle Atox1 transmet le cuivre(I). Dans l'intestin, nous avons vu que c'était la protéine ATP7A qui recevait le cuivre. Dans les cellules hépatiques, c'est l'ATPase, ATP7B ou protéine de Wilson qui reçoit le cuivre [22] [31]. Elles ont toutes les deux le même rôle : délivrer le cuivre aux protéines qui en ont besoin et qui se trouvent dans l'appareil de Golgi (en conditions normales) et excréter le cuivre(I) hors de la cellule en cas d'excès [32] [31]. Notons qu'elles se situent toutes deux dans l'appareil de Golgi. Dans les cellules hépatiques, le gêne codant pour ATP7A existe, mais la protéine n'est pas exprimée. Voilà pourquoi dans les cellules hépatiques, on ne parle que de ATP7B [22].
Le premier rôle d'ATP7B au sein des cellules hépatiques est de fournir du cuivre(I) à la ceruloplasmine, ferroxidase à cuivre, qui est ensuite excrétée vers le sang. Grâce à la circulation sanguine, le cuivre est distribué dans tout l'organisme [33]. Le deuxième rôle d'ATP7B est de réguler la concentration intracellulaire du cuivre(I). En effet, quand celle-ci atteint le niveau de toxicité, ATP7B se déplace de l'appareil de Golgi vers le pôle apical de la cellule et déverse le cuivre dans le canalicule biliaire où il est transporté avec la bile jusqu'aux intestins et éliminé avec les fèces (Fig 8).

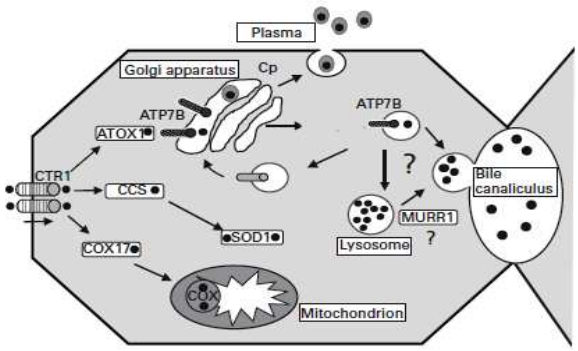


FIGURE 8 – Transport et excrétion du cuivre au sein des cellules hépatiques [34]

Nous avons vu que dans les cellules intestinales ou hépatiques, nous avions les mêmes types de chaperonnes qui véhiculent le cuivre au sein des cellules. Intéressons-nous donc à ce type de protéines et voyons comment Atox1 donne le cuivre à ATP7A ou ATP7B.

2.2.3 Les métallochaperonnes

Comme évoqué précédemment, les métallochaperonnes sont des transporteurs du cuivre(I) au sein des cellules. En anglais, elles sont d'ailleurs appelées « Shuttle proteins ».

Sur leur extrémité N-terminale, elles possèdent un site de fixation du métal de séquence d'acides aminés MXCXXC commune à toutes. C'est par les thiolates de leurs cystéines qu'elles complexent le cuivre, mais aussi le mercure ou le cadmium. Cette séquence est conservée chez toutes les métallochaperonnes. Le site de fixation du métal est flexible mais l'affinité pour le cuivre est très forte [35], ce qui évite toute oxydation du cuivre ou une éventuelle compétition avec le glutathion.
Nous nous intéresserons dans tout le reste de la thèse à la métallochaperonne Atox1 et à l'ATPase ATP7B. La figure 9 représente la structure de Atox1 et de l'ATPase ATP7B où l'on voit bien les deux cystéines liant le cuivre(I).

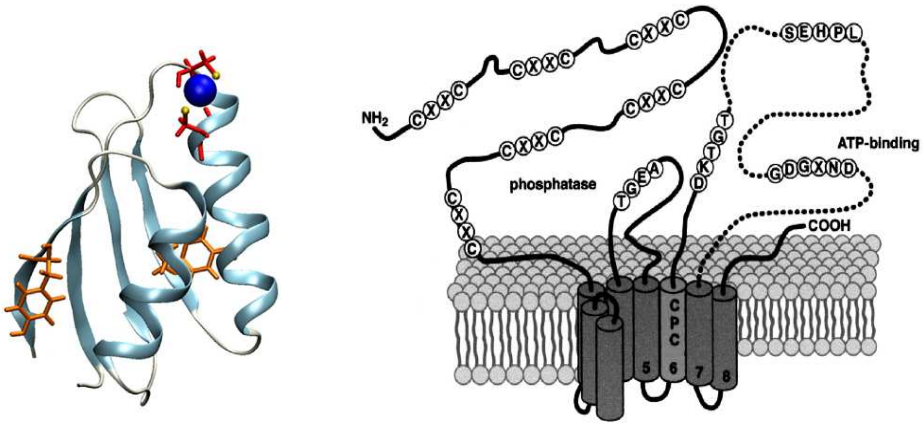


FIGURE 9 – A gauche Structure de Atox1 : en jaune, les thiolates des cystéines, en bleu, le cuivre(I) [36] ; A droite Structure de ATP7A/B [37]

2.2.4 Transfert du cuivre(I) entre une métallochaperonne et sa protéine cible, exemple de Atox1

La métallochaperonne et sa cible ont le même repliement $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$. Elles ont aussi le même site de fixation du métal à savoir MXCXXC [38]. Ces similitudes jouent un rôle dans la communication entre les deux protéines.
Atox1 est une métallochaperonne constituée de 68 acides aminés et qui contient un site de fixation du cuivre(I) (MBD : Metal Binding Domaine). Ce même site de fixation (nommé WD1-6) est reproduit 6 fois sur les ATPase ATP7A/B en leur extrémité N-terminale [31]. Plusieurs études ont été réalisées sur Atox1 (ou son analogue Atx1 chez la levure) et ATP7A/B par diverses méthodes (RMN, simulations ...) pour montrer l'interaction entre les deux protéines lors du transfert du cuivre(I) de Atox1 aux domaines WD de l'ATPase [39] [40] [41] [42] [43]. Strausak et Coll. ont mis en évidence que la mutation d'une cystéine du domaine de fixation de Atox1 ne permet pas le transfert du cuivre(I) entre les deux protéines [44]. Une autre étude, réalisée par Wernimont et Coll. [45], montre que le tryptophane 11 établit une liaison hydrogène avec la première cystéine du domaine de

fixation du métal, située dans la protéine de Wilson. Récemment des études réalisées par dichroïsme circulaire effectuées par Hussain et Coll. mettent en évidence le rôle de la lysine 60 dans la stabilité de l'hétérocomplexe (Fig 10) lors du transfert du cuivre de Atox1 au domaine WD4 de l'ATPase [46].

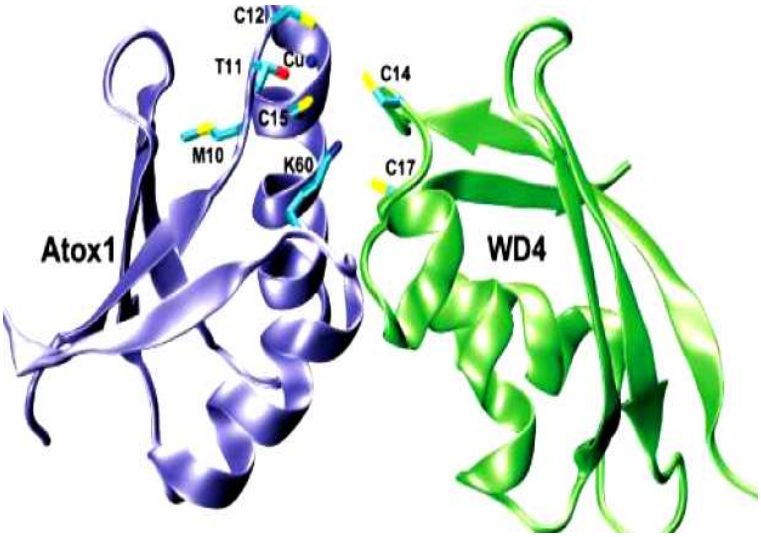


FIGURE 10 – Structure de l'hétérocomplexe entre Cu-Atox1 en violet et apoWD4 en vert [46]

Le domaine de fixation du métal intervient donc dans le transfert du cuivre(I) entre les deux protéines qui intéragissent que s'il y a Cu(I). L'affinité pour le cuivre(I) a aussi un rôle dans le transfert du cuivre(I). En effet, l'ATP7A/B a une affinité supérieure que la protéine Atox1 qui oriente donc le transfert [47].
Malgré toutes ces études, le mécanisme, les énergies mises en jeu, restent encore mal connus, mais l'échange de cuivre(I) serait rapide entre Atox1 et sa protéine cible. Récemment, une étude réalisée par simulation en utilisant la méthode QM/MM, met en évidence la formation de deux intermédiaires tri-coordinnés en accord avec les résultats expérimentaux [48](Fig 11).

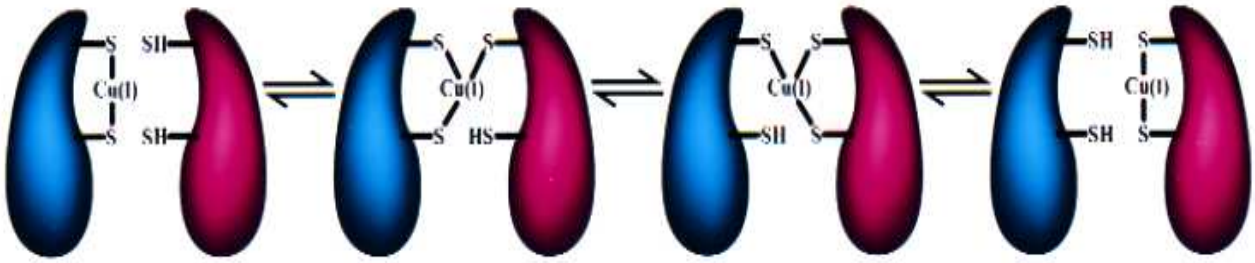


FIGURE 11 – Proposition de mécanisme lors du transfert du cuivre entre Atox1 et ATP7A/B [45]

2.2.5 Les métallothionéines, séquestrant d'ions métalliques

Les métallothionéines (MT) sont des protéines riches en soufre (30% des acides aminés sont des cystéines), de faible poids moléculaire, constituées d'environ 60 à 70 acides aminés, et ne présentant ni acide aminé aromatique ni histidine. Il existe quatre types de métallothionéines chez les mammifères : MT-1, MT-2, MT-3 et MT-4. Les MT-1 et MT-2 sont généralement localisées dans les tissus parenchymateux comme le foie ou les reins. Ces deux types de MT ont un rôle dans l'homéostasie du cuivre et du zinc. Elles séquestrent ou stockent le cuivre ou le zinc, quand cela est nécessaire. La production de métallothionéines, dans les cellules, dépend de la concentration en cuivre et en zinc. Elles prennent aussi part dans la détoxication de métaux tels que le mercure et le cadmium. Elles ont également un rôle contre le stress oxydant [49]. Les MT-3 ou GIF (Growth Inhibitory Factor) sont localisées essentiellement dans le cerveau. Ces MT ont, quant à elles, un rôle mal connu chez l'homme mais ont été identifiées comme un facteur de l'inhibition de la croissance des cellules neuronales chez le rat. Elles contiennent des atomes de cuivre et des atomes de zinc [50]. Notons que les MT-4 sont limitées aux cellules épithéliales de la peau ou de la langue [51].

Outre leur rôle dans l'homéostasie du cuivre et du zinc, les MT possèdent la capacité de fixer des ions métalliques des groupes Ib et IIb (colonnes 11 et 12) (rôle dans la détoxication de métaux). Cette capacité est liée à la présence de nombreux résidus cystéines au sein de la chaîne polypeptidique [52]. Les métallothionéines fixent les ions métalliques par l'intermédiaire de leurs nombreux groupements thiols. Les cations métalliques peuvent être complexés par ces groupements et il est possible de classer ces ions en fonction de leur capacité à se lier aux fonctions thiols. On admet généralement le classement $Hg > Cu > Cd > Zn$ [53]. La fixation des cystéines aux ions métalliques entraîne un repliement centré sur ces ions. Alors que le cadmium et le zinc sont au centre d'un tétraèdre [54] [55], des métaux tels que le cuivre ainsi que l'argent adoptent des géométries trigonales et même digonales [56] [57] [58] [59].
Chez les mammifères, les cystéines contribuent à la complexation de sept ions métalliques divalents par métallothionéine. La grande proportion en cystéines et leur disposition au sein de la protéine favorisent l'apparition d'une structure tridimensionnelle formée de deux domaines de topologies similaires. Ils sont communément appelés domaine α et domaine β. Ils ne participent pas de la même manière à la fixation des ions métalliques. Le domaine α est disposé à l'extrémité C-terminale et permet la fixation de quatre ions divalents par l'intermédiaire de onze cystéines (cluster $\mathrm{M}_4^{II}\mathrm{Cys}_{11}$, Fig 12). Le domaine β permet la fixation de trois ions métalliques divalents par l'intermédiaire de neuf résidus cystéines et est disposé à l'extrémité N-terminale (cluster $\mathrm{M}_3^{II}\mathrm{Cys}_9$, Fig 12).

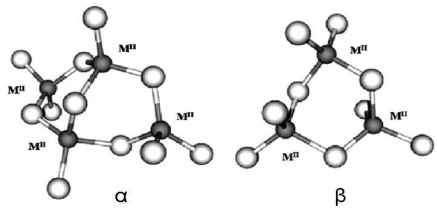


FIGURE 12 – Structure des sites actifs M^{II}-MT (domaine α : M_4S_{11} (à gauche) ; domaine β : M_3S_9 (à droite)) [60]

Ces deux domaines sont de taille équivalente. Ils ne présentent pas la même affinité pour les différents ions métalliques. Le zinc et le cadmium se lient plus fermement au domaine α alors que le domaine β présente une meilleure affinité pour le cuivre et l'argent. Chacun des deux domaines peut fixer jusqu'à six ions monovalents tel que Cu^+ [52]. En effet, les métallothionéines peuvent complexer 11 à 12 ions cuivre(I). Ces derniers sont aussi répartis en deux clusters de type Cu_6Cys_{11} et Cu_6Cys_9 situés respectivement sur le domaine α et β (Fig 13).

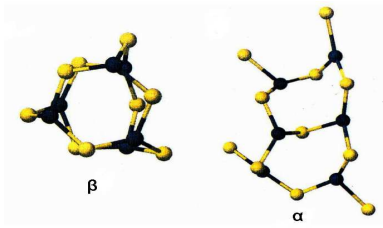


FIGURE 13 – Structure des sites actifs Cu-MT, domaine β (à gauche), domaine α (à droite) [61]

En résumé, nous voyons que le cuivre est un élément essentiel à l'organisme car présent comme cofacteur dans un grand nombre de processus biologiques. Sa concentration est extrémement régulée par l'organisme par différentes protéines. Si un problème survient au niveau de sa régulation, ou au niveau d'une des protéines à cuivre, cela peut engendrer de graves conséquences sur l'organisme.

2.3 Les dérèglements liés au Cuivre

Comme nous l'avons vu précédemment, le cuivre intervient comme cofacteur dans un grand nombre de processus biologiques. Un dysfonctionnement au niveau de ces protéines à cuivre peut contribuer à l'apparition de nombreux symptômes et notamment des troubles neurologiques et donc de maladies neurologiques. Un problème dans l'homéostasie du cuivre entraîne un dysfonctionnement de toutes ces protéines (Table 6).

Enzymes	Fonctions	Conséquences et dysfonctionnements
Céruloplasmine	Transport du cuivre et du fer	Accumulation du fer et troubles neurologiques
Cytochrome *c* oxydase	Intervient dans la respiration (dans la chaîne du transfert d'électrons)	Cerveau anormal, hypothermie et muscles fragiles
Dopamine β-monoxygénase	Conversion de la dopamine en norépinéphrine	Effets neurologiques, Possible hypothermie
Lysyl oxydase	Pontage entre le procollagène et la proélastine	Tissus conjonctives défectueux
Superoxide dismutase	Régulation et défense contre les radicaux libres	Augmentation du stress oxydant
Tyrosinase	Formation de mélanine	Hypopigmentation
Autres enzymes	Pontage de la kératine	Cheveux dur comme la laine

TABLE 6 – Exemples de déréglements liés aux dysfonctionnements des protéines à cuivre [62]

2.3.1 Le cuivre, les maladies neurodégénératives et le stress oxydant

Le dysfonctionnement de protéines est à l'origine d'un grand nombre de désordres neurodégénératifs. C'est d'ailleurs le cas des maladies telles que Creutzfeld-Jacob, Alzheimer ou Parkinson. Ces protéines « altérées », qui ne sont pas dégradées par l'organisme, s'accumulent dans le cerveau et forment des agrégats. En plus de ces agrégats de protéines altérées, une accumulation de métaux tels que le cuivre, le zinc et le fer et une augmentation du stress oxydant ont été observés dans le cerveau. La cause et le mécanisme de la formation de ces protéines non fonctionnelles, ne sont pas encore bien compris.
Nous avons souligné que le cuivre est présent dans l'organisme aux degrés d'oxydation (+II) et (+I). La forme Cu(II) est la plus stable. Le cuivre(I) est un réducteur fort qui peut donc réagir, quand il est sous forme libre, avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon un mécanisme de Fenton et générer un radical hydroxyle ($HO^\bullet$). Ce radical, une fois généré, va pouvoir réagir à son tour, avec tous les constituants de la cellule, protéines, lipides et acides nucléiques. Comme $HO^\bullet$ est hautement réactif, il va causer des dommages importants. De plus, le cerveau est un organe relativement pauvre en enzymes antioxydantes (SOD Cu/Zn, catalase, peroxydase) et riche en substances facilement oxydables (acides gras polyinsaturés), les hypothèses les plus récentes suggèrent un rôle important du stress oxydant dans la mort neuronale. Ce stress oxydant serait causé par une distribution anormale de cations métalliques essentiels (Cu, Fe, Zn...) dans le cerveau. Ce déséquilibre traduit un dérèglement de l'homéostasie des ions métalliques et peut entraîner une augmentation de production de radicaux libres.

Sclérose Latérale Amyotrophique, SLA : Cette maladie est une maladie neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs (maladie neuromusculaire). Elle touche 5-7 personnes sur 100 000 [63]. Les personnes touchées sont d'âge moyen. La maladie atteint d'abord les neurones moteurs au niveau du cerveau puis se propage dans le système respiratoire. Les personnes meurent en 5 ans. Cette maladie existe sous deux formes, une sporadique et une génétique (ou familiale). Dans ce cas, le gène anormal identifié est celui codant pour la SOD Cu/Zn cytosolique [64]. A ce jour, plus de 100 mutations ont été décrites [65] [66]. Dans le tissu neuronal, des agrégats de la forme mutée de la SOD Cu/Zn ont été observés sur des souris de type SLA transgéniques [67]. Une revue récente [68] fait un bilan sur les processus pathologiques mis en jeu dans la SLA, notamment sur le rôle du zinc. Dans cette pathologie, l'implication de métaux tels que le cuivre ou le zinc est évidente. Le cuivre peut provoquer, par des réactions de type Fenton, la formation de radicaux. La forme mutée de la SOD n'est pas assez réactive pour protéger les neurones, ce qui provoque leur mort. De bons résultats ont été obtenus sur des modèles de souris en utilisant des chélateurs du cuivre tels que la D-pénicillamine [69] ou le 2,9-dimethyl-1,10-phénantholine (néocuproïne) [70](Fig 14), montrant l'inhibition de la mort cellulaire. Ces résultats encourageant ouvrent la voie vers une thérapie par chélation du cuivre.

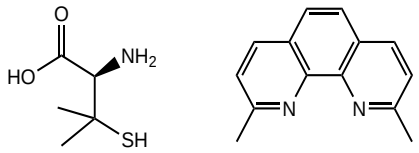


FIGURE 14 – Structure de la D-pénicillamine (à gauche) et de la néocuproïne (à droite)

Les maladies à Prions : Les maladies à Prions se présentent comme un groupe de maladies neurodégénératives comprenant principalement la maladie de Creutzfelt-Jacob (Fig 15) chez l'homme et l'encéphalopathie spongiforme bovine chez l'animal (aussi appelée maladie de la « vache folle ») [71]. Les conséquences sont une rapide progression de la démence qui est accompagnée de troubles neurologiques sévères tels que l'ataxia ou convulsions musculaires involontaires, puis la mort [72]. Ces maladies se caractérisent par l'accumulation d'une protéine appelée PrP^{Sc}. Cette protéine correspond à une forme altérée d'une protéine normale, la PrP^{C}. En effet, une modification de structure est à noter lors du passage de la protéine normale (PrP^{C}) à celle altérée (PrP^{Sc}). La forme normale PrP^{C} est constituée d'hélices α alors que sa forme altérée possède des feuillets β. Le rôle de PrP^{C} dans l'organisme reste encore mal connu. Plusieurs suppositions existent cependant, notamment sur son rôle dans le transport du cuivre du milieu extracellulaire vers la SOD [71]. En effet, la protéine PrP^{C}, localisée au niveau des synapses [73], contient une série d'octapeptides riches en glycine et proline, sur sa partie N-terminale, capable de se lier au cuivre(II) [74] [75]. Une activité de type superoxyde dismutase est aussi évoquée.

La fixation du cuivre entraînerait l'activation de cette fonction et aurait donc un rôle de protection contre le stress oxydant [76]. La fixation du cuivre, *in vitro*, sur la protéine PrP^C montre une structuration de la partie N-terminale de PrP^C (formation d'hélices α [77] [78]). La protéine altérée adopte un repliement β qui implique une modification du site de fixation du cuivre(II). La conséquence directe est la formation d'un excès d'espèces radicalaires entraînant de nombreux dommages neurologiques. Les maladies à Prions sont contagieuses dans une même espèce mais aussi d'une espèce à l'autre (maladie de la vache folle contagieuse pour l'homme). Après trente années de recherche concernant cette maladie, des traitements commencent à apparaître, notamment ceux utilisant des chélateurs du cuivre tels que la D-pénicillamine qui a montré des résultats satisfaisants [79].

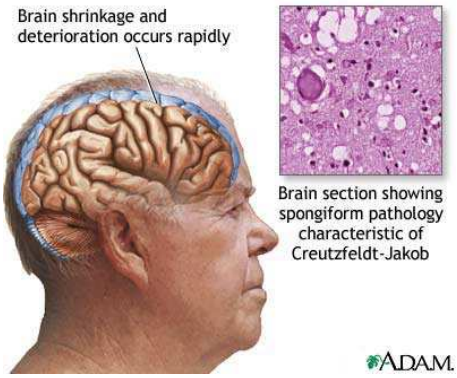


FIGURE 15 – Cerveau atteint de la maladie de Creutzfelt-Jacob (©ADAM) [80]

La maladie d'Alzheimer : La maladie d'Alzheimer (AD) est la plus connue et la plus répandue des maladies neurodégénératives. Cette forme de démence existe sous deux formes, une qui touche des personnes de moins de 65 ans et une qui touche les personnes de plus de 65 ans. De nos jours, cette maladie touche plus de 24 millions de personne à travers le monde et atteindra en 2040 plus de 84 millions de personne [81]. Elle a été découverte en 1907 par Alois Alzheimer [82]. La première patiente a avoir manifesté cette maladie et atteinte de démence, était Auguste D., elle avait 51 ans (Fig 16).

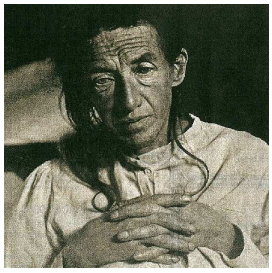


FIGURE 16 – Première patiente Auguste D. atteinte de la maladie d'Alzheimer [83]

La maladie est irréversible, il en résulte une perte progressive de la mémoire, un comportement inhabituel, un changement de personnalité et un déclin dans les capacités à

penser et réfléchir. AD s'accompagne au niveau cérébral de trois changements structuraux [84] [85] :

- Perte diffuse de neurones
- Dépôts dans le milieu intracellulaire de la protéine Tau hyperphosphorylée (forme de filaments anormaux)
- Dépôts dans le milieu extracellulaire du peptide amyloïde Aβ (appelés aussi plaques séniles) entourés de neurites dystrophiques.

Ces différents types de symptômes notamment l'hyperphosphorylation de la protéine Tau peuvent se voir par IRM (Fig 17). En effet, l'IRM facilite le diagnostic précoce de la maladie. On voit par IRM une atrophie de l'hippocampe (structure clé du cerveau pour la mémorisation des souvenirs) (Fig 17 et Fig 18). Cette atrophie cérébrale est liée à la présence d'une dégénérescence neurofibrillaire due à l'accumulation de protéine Tau sous forme de filaments anormaux.

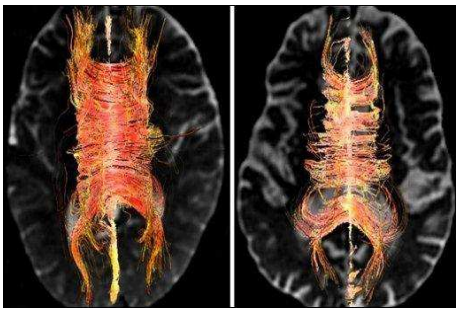


FIGURE 17 – IRM du cerveau, sujet sain (à gauche), sujet atteint de la maladie d'Alzheimer (à droite),(©AFP) [86]

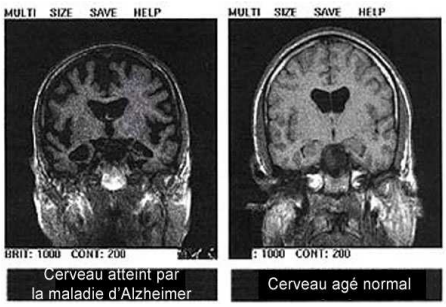


FIGURE 18 – Autre vue d'un IRM du cerveau, sujet atteint de la maladie d'Alzheimer (à gauche), sujet sain (à droite), (©NASA) [87])

L'agrégation du peptide amyloïde Aβ est une des conséquences importantes dans la maladie d'Alzheimer, on peut même parler de « clé de la maladie ». Selon un schéma hypothétique en cascade (Fig 19), l'agrégation du peptide Aβ est toxique pour les neurones du fait de la production d'espèces radicalaires réactives, cause directe de la maladie. Le

peptide Aβ résulte du clivage d'une protéine précurseur APP par des enzymes sécrétases α et β (Fig 19) [88] [89]. La protéine APP est une protéine transmembranaire de 695-770 acides aminés existant sous différents isoformes.

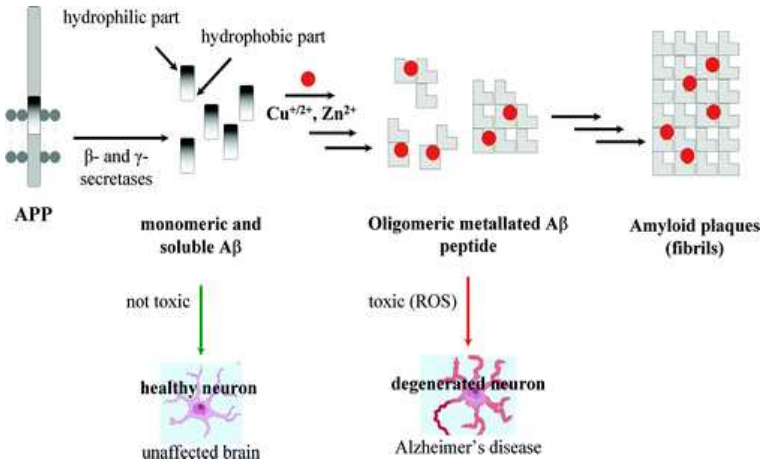


FIGURE 19 – Schéma « de l'hypothèse de la cascade amyloïde » [90]

Le peptide Aβ est situé dans la région transmembranaire. Il est constitué de 39-43 acides aminés avec une partie hydrophile en son extrémité N-terminale (acides aminés 1-28) et d'une partie hydrophobe en son extrémité C-terminale (acides aminés 29-39/43). Le peptide Aβ existe, dans un cerveau normal, sous forme soluble [91]. *In-vivo*, les formes prédominantes de Aβ sont : la forme constituée de 40 acides aminés nommée Aβ40 et celle de 42 acides aminés nommée Aβ42 (Fig 20). Comparé à la forme soluble, le rapport entre ces deux formes, augmente dans les plaques amyloïdes. Ces deux formes jouent un rôle important dans la maladie bien que Aβ42 soit plus toxique pour les neurones car elle s'agrège plus facilement que Aβ40 [92].

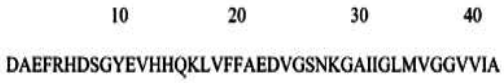


FIGURE 20 – Séquence des peptides Aβ40 et Aβ42 [93]

Bien que le passage de la forme soluble de Aβ aux formes de type amyloïde soit encore peu claire, il a été établi que la concentration physiologique des ions Cu^{2+}, Zn^{2+} et Fe^{3+} avait un rôle dans le processus d'agrégation du peptide Aβ. Ce processus pourrait être le prélude de la formation des plaques Aβ [94]. La concentration de ces métaux est très élevée dans les dépôts des plaques amyloïdes : 0.4 mM de Cu^{2+} [95], 1 mM de Zn^{2+} [95] et $\approx$1 mM de fer [95] [96]. Cependant, *in vivo*, le fer n'interagit pas directement avec le peptide Aβ, par contre le Cu^{2+}, à pH $\leq$ 6.8, entraîne la précipitation du peptide Aβ. Notons que la neurotoxicité du peptide amyloïde Aβ est liée aux dommages provoqués par l'oxydation induite par les métaux. Ceci est une caractéristique de la

maladie d'Alzheimer [96]. Le caractère rédox des métaux cuivre et fer, induit des réactions de type Fenton avec le peptide Aβ selon le mécanisme écrit ci-dessous dans le cas du cuivre :

$$A\beta + Cu^{2+} \rightarrow A\beta^{+\bullet} + Cu^{+} \tag{4}$$

$$Cu^{+} + O_2 \rightarrow Cu^{2+} + O_2^{-} \tag{5}$$

$$2O_2^{-} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \tag{6}$$

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + HO^{\bullet} + HO^{-} \tag{7}$$

$$O_2^{-} + H_2O_2 \rightarrow HO^{-} + O_2 + HO^{\bullet} \tag{8}$$

L'équation (4) correspond à la réduction du cation métallique par la protéine Aβ. L'équation (5) équivaut au cycle rédox du cation métallique (Cu^{2+}, Fe^{3+}). L'équation (6) est la production de H_2O_2. L'équation (7) est une réaction de Fenton et l'équation (8) est le processus de Haber-Weiss qui produit le radical hydroxyle. [97]

Au vu des concentrations élevées des ions cuivre, zinc et fer et du rôle du cuivre et du zinc dans la précipitation du peptide Aβ, les chélateurs représentent une voie thérapeutique possible pour la maladie d'Alzheimer. Ces chélateurs doivent pouvoir entrer en compétition avec le peptide Aβ sans pour autant voler le cuivre aux autres protéines. Il a donc été proposé que l'affinité envers le cuivre et le zinc soit moyenne (logK_d = 11-12 pour Cu^{2+} et 8 pour Zn^{2+} [90]). Le chélateur doit aussi être capable de passer la Barrière Hémato-Encéphalique(BHE). Voilà pourquoi un des chélateurs à avoir été testé pour traiter la maladie d'Alzheimer est le clioquinol (Fig 21). Ce chélateur passe la BHE, et a des constantes de dissociations (K_d) de 7 pour le zinc et 8.9 pour le cuivre, à pH physiologique. Il a montré des résultats intéressants sur des souris transgéniques APP2576, avec une diminution des plaques de 49% et une augmentation de Aβ soluble [98]. Ces résultats ont permis de réaliser des tests précliniques en phase II sur quelques patients atteints d'Alzheimer. Bien que les études aient été concluantes, elles ont dû être arrêtées en raison de la toxicité d'un sous-produit du clioquinol, la 5,7-diiodo-8-hydroxyquioléine [99]. Notons tout de même l'essor actuel du développement de chélateurs du cuivre(II) et du zinc(II) pour ralentir et diminuer la formation des plaques Aβ.

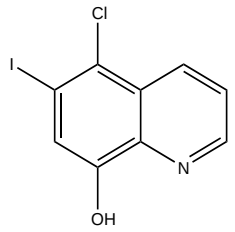


FIGURE 21 – Le clioquinol, structure

En résumé, les métaux et notamment le cuivre ont un rôle important dans les maladies neurodégénératives. Un dysfonctionnement d'une protéine entraîne un dérèglement dans l'homéostasie du cuivre. Du fait de son caractère oxydoréducteur, le cuivre, sous forme libre, intervient donc dans la formation d'espèces radicalaires et provoque des dommages neurologiques sévères. Il existe cependant d'autres types de maladies liées au dérèglement de l'homéostasie du cuivre. Ces maladies sont génétiques, elles sont dues à des mutations des gènes codant pour les protéines ATPase : ATP7A et ATP7B. Ces maladies sont respectivement la maladie de Menkes et la maladie de Wilson.

2.3.2 Les maladies génétiques : Menkes et Wilson

Les maladies de Menkes et Wilson sont deux maladies génétiques orphelines dont le gène malade code pour l'ATP7A, pour la première, et l'ATP7B, pour la seconde. Il en résulte un dysfonctionnement dans l'homéostasie du cuivre puisque ces protéines lient essentiellement le cuivre au niveau cellulaire. Au niveau de l'organisme, les conséquences sont un déficit en cuivre pour Menkes et une concentration anormalement élevée en cuivre pour Wilson.

La maladie de Menkes : La maladie de Menkes est une maladie génétique récessive, orpheline qui touche un bébé sur 250 000. Elle se caractérise par une dégénérescence neuronale et une anormalité des tissus conjonctifs. Elle a été décrite par Menkes en 1962, mais c'est en 1993 que le gène malade a été identifié sur le chromosome X comme codant pour la protéine de la famille des ATPases de type P, ATP7A (Fig 9) [100] [101] [102]. Il en résulte un désordre au niveau de l'homéostasie du cuivre. Le cuivre des cellules intestinales n'est pas transmis dans le sang par ATP7A. La première conséquence est une accumulation de celui-ci dans les cellules intestinales. La seconde conséquence est une absence de cuivre dans le sang: l'organisme manque donc de cuivre. Les protéines qui en ont besoin, cytochrome-c-oxydase, dopamine-β-hydroxylase, la superoxyde dismutase..., ne fonctionnent plus [37]. Les symptômes qui en résultent sont, un retard de croissance, une hypothermie, des muscles fragiles, des dommages neurologiques (ataxia, dysarthia, développement mental retardé, convulsions), une hypotension, une faible pigmentation de la peau et des cheveux, des cheveux fins (Fig 22), l'apparition de stress oxydant et donc de radicaux libres (résultant de l'accumulation du cuivre(I) dans les cellules), une concentration basse en cuivre circulant et une hyperélasticité de la peau qui est épaisse et dure. La maladie de Menkes peut être décelée par un diagnostic prénatal [103] [104] ou dès l'âge de 3 mois. Le gène étant porté par le chromosome X, la maladie touche plus les garçons que les filles. La durée de vie moyenne est de 3-4 ans, seuls les enfants atteints d'une forme moins prononcée de la maladie peuvent atteindre l'âge de 10 ans [105]. Le seul traitement actuel est de donner du cuivre sous forme de complexe histidine-cuivre pour une meilleure assimilation par l'organisme [106]. Le mécanisme d'action n'est pas encore bien identifié [107]. Il y a cependant

une amélioration par ce traitement au niveau de l'augmentation du cuivre dans le sérum, de la concentration en céruloplasmine dans l'organisme, et une normalisation de certaines protéines, comme la dopamine β hydroxylase, après trois mois de traitement [108]. Ces normalisations améliorent les problèmes neurologiques. Seule la protéine lysyl oxydase semble ne pas récupérer le cuivre par ce traitement et les désordres des tissus conjonctifs persistent. Le traitement doit être pris assez tôt (avant 2 mois) pour diminuer de manière significative les désordres neurologiques. Notons tout de même que cette maladie est lætale, le traitement augmente juste la survie de l'enfant. Il est hélas bien difficile de vivre sans cuivre.

FIGURE 22 – Bébé atteint de la maladie de Menkes [109]

La maladie de Wilson : La maladie de Wilson est une maladie génétique autosomique récessive (les deux parents sont porteurs sains Fig 23) dont le gène malade se situe sur le chromosome 13. Elle touche une personne sur 30 000 à 100 000 [110]. Comme Menkes, elle est orpheline. La maladie a été décrite pour la première fois par le médecin neurologue britannique, Kinnier Wilson, en 1912 [111]. Le gène malade code pour la protéine ATPase de type P, ATP7B et a été découvert en 1993 [112] [113] [114]. Il existe plus de 300 mutations répertoriées (Base de données [115]). L'anomalie de cette protéine entraîne une accumulation du cuivre dans les cellules hépatiques (Fig 8). Le cuivre n'est plus excrété vers la bile, quand son niveau atteint le seuil toxique. La transmission vers la céruloplasmine ne se fait plus. Il n'y a donc plus de distribution du cuivre dans le reste de l'organisme ce qui induit un manque de cuivre pour les protéines qui en ont besoin, et par conséquent un dysfonctionnement de ces dernières. Le cuivre accumulé dans le foie provoque alors des réaction de type Fenton [97]. Les organes principalement touchés, par cette accumulation de cuivre, sont le foie, le cerveau et les yeux. La céruloplasmine est, quant à elle, très basse.

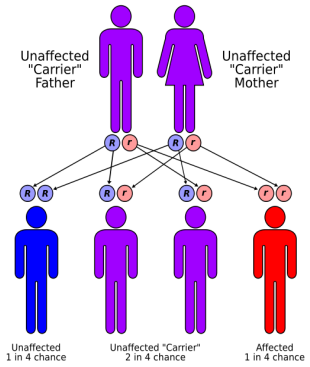


FIGURE 23 – Maladie autosomique récessive

Les symptômes [116] [117] :
Les symptômes cliniques de cette maladie se déclenchent après l'âge de 5 ans. Les organes touchés dépendent de l'âge.
Le cuivre est accumulé dans les cellules hépatiques, le foie est donc le premier organe touché. Les malades sont atteints d'une hépatite chronique active. Peu de malades souffrent d'une hépatite fulgurante. En général, les symptômes hépatiques se déclenchent avant les symptômes neurologiques bien qu'ils ne soient pas facilement décelables chez certains patients. Les symptômes hépatiques apparaissent vers l'âge de 10-15 ans.
Les troubles neurologiques apparaissent ensuite, vers l'âge de 19-22 ans. Les symptômes sont, des mouvements anormaux avec des tremblements au repos et accrus pendant une activité, une rigidité semblable à celle de la maladie de Parkinson notamment au niveau du visage avec un sourire de type joker (sourire fixe et très large) et au niveau de la racine des membres. Cette rigidité est responsable de la dysarthrie (difficulté à la déglutition). Les malades ont aussi une difficulté à l'élocution.

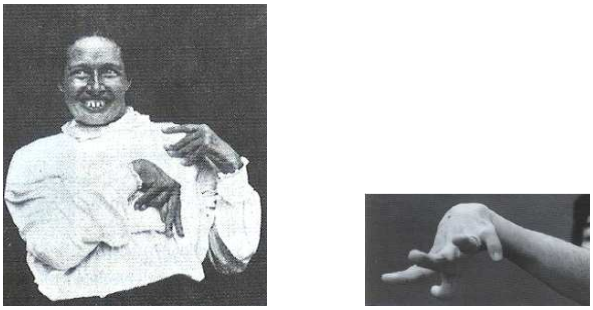


FIGURE 24 – Image de gauche : Malade atteint de rigidité faciale et des membres [111] ; Image de droite main atteinte de rigidité [111]

Les malades souffrent aussi de troubles psychiatriques, caractérisés par une dépression, un désintérêt scolaire ou professionnel, des modifications de caractère avec une hyperémotivité et des états psychotiques. Le dernier symptôme se caractérise par la présence

d'un anneau de cuivre autour de l'œil appelé anneau de Kayser-Fleisher (Fig 25).

FIGURE 25 – Anneau de Kayser Fleisher : ©2003-2010 Wilson Disease Association International

Le Diagnostic [116] [117] :
Le diagnostic consiste en plusieurs analyses :

- Un bilan biologique. Quatre mesures sont faites :
  1. Dosage de la ceruloplasmine, cette dernière est faible: 10 mg/100 mL de sérum.
  2. Dosage de la cuprémie, taux de cuivre dans le sang très faible.
  3. Dosage de la cuprurie sur 24 heures, taux de cuivre dans les urines élevé: 200 à 400 μg.
  4. Dosage des transaminases. Leur augmentation montre que le foie est atteint.
- Une biopsie du foie qui permet de doser la quantité de cuivre retenu dans le foie. La biopsie du foie (ou ponction biopsie hépatique) consiste à prélever un petit échantillon de foie.
- Scanner et IRM cérébrale pour visualiser les symptômes neurologiques.
- Diagnostic génétique : par voie indirecte, permettant de savoir si un frère ou une sœur est atteint lui aussi, résultats fiables à 99% (étude de la filiation). Par voie directe, permettant de repérer et décrire l'anomalie génétique par analyse du gène du patient et comparaison avec les mutations répertoriées. Les résultats sont fiables à 40-60%.
- Diagnostic ophtalmologique et présence de l'anneau de Kayser-Fleisher.

Quand le diagnostic est fait, l'avis du centre de référence est nécessaire avant d'instaurer un traitement qui doit être maintenu à vie. La maladie est fatale s'il n'y a pas de traitement. Le suivi du patient est régulier, pluridisciplinaire et il s'effectue en lien avec le centre de référence. En France, il existe un centre de référence principal localisé à l'hôpital Lariboisière à Paris et coordonné par le Docteur F. Woimant, neurologue. Plusieurs autres centres de la maladie de Wilson sont localisés dans certaines grandes villes telles que Rennes, Lyon, Besançon, Bordeaux et Marseille.
Malgré tout cela, le diagnostic n'est pas facile et bien souvent la maladie est mal diagnostiquée ou diagnostiquée trop tardivement. La maladie de Wilson est très mal connue des médecins et du public. Les patients touchés par la maladie ont en moyenne les premiers symptômes cliniques vers 14-15 ans. La dépression, le retard scolaire sont alors souvent considérés comme des troubles de l'adolescence. Les malades non diagnostiqués ne

sont donc pas traités pour la maladie de Wilson. Il en résulte une hépatite active souvent traitée comme une hépatite virale. La maladie non traitée entraîne une aggravation hépatique suivie par une apparition des symptômes neurologiques. A partir de là, tout se détériore très vite d'un point de vue neurologique : perte de la déglutition, perte de poids, tremblements parkinsoniens, paralysie faciale, problème d'élocution... A ce stade là, quand le diagnostic est trop tardif et que l'hépatique est aigüe, la seule solution est la greffe du foie [118]. Si le foie est trop touché, elle ne réussit pas car le patient est souvent trop faible.
Un des diagnostics les plus fiables est la présence de l'anneau de Kayser Fleisher. Mais pour le repérer, l'ophtalmologue doit être averti.
Notons aussi que le diagnostic est difficile car les différentes analyses sont souvent contradictoires. Par exemple, le bilan cuprique peut être d'interprétation difficile. La biologie moléculaire ne permet d'affirmer le diagnostic que dans 80% des cas. Dans certains cas, la biopsie montre un foie sain, puisque l'accumulation du cuivre dans celui-ci n'est pas homogène, et que l'on ne prélève qu'une partie du foie à un endroit donné. Dans ce cas les malades ont des symptômes neurologiques et un foie atteint sans pouvoir le déceler par bilan biologique ou biopsie. Le foie évoluera donc vers une hépatite aigüe. Le seul recours est là aussi, une greffe de foie mais cette greffe n'est pas envisagée sans l'assurance de l'atteinte du foie (protocoles à suivre pour recevoir un greffon). Notons aussi que 50% des personnes greffées en France pour la maladie de Wilson, sont définitivement guéries [118].

Les Traitements [119] [116] :
Le traitement est pris à vie et les patients sont étroitement suivis. Malgré tout, il n'y a pas de guérison juste une possible amélioration. Le premier traitement concerne le régime alimentaire qui doit être pauvre en cuivre. Les aliments tels que le chocolat, les crustacés...sont alors interdits. Les autres traitements concernent des chélateurs du cuivre ou l'activation de la production de MT. Il est possible de ralentir la progression de la maladie et de la stabiliser par ces chélateurs. Ils interviennent majoritairement sur l'absorption du cuivre au niveau intestinal. En France, les patients avec symptômes déclarés sont traités par la D-pénicillamine ou la trientine et les patients pré-symptomatiques sont traités avec de l'acétate de zinc. Le traitement est spécifique au patient. Par exemple, dans une même famille, un enfant peut être sous D-pénicillamine, un autre sous trientine et le petit dernier, pré-symptomatique, sous zinc.

- *La D-pénicillamine ou ©Trolovol :*

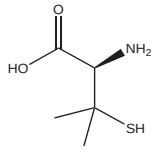


FIGURE 26 – Structure chimique de la D-Pen

La D-pénicillamine (D-Pen) est utilisée comme traitement de la maladie de Wilson depuis 1956 [120]. Elle est de faible poids moléculaire et comporte une fonction acide carboxylique, une fonction thiol et une fonction amine (Fig 26). Elle chélate le cuivre et forme un complexe qui est éliminé par voie urinaire [116]. La D-Pen est très vite absorbée [121] [122] [123] par l'intestin en formant un pont dissulfide avec la membrane des entérocytes, suivi d'une pinocytose (type d'endocytose) [116]. Dans le plasma, la D-Pen circule sous forme liée par des ponts dissulfure aux cystéines ou sous formes de dimères. Peu de D-Pen est sous forme libre. Elle est administrée par voie orale chez le patient. Pour un adulte, la prise est de 1.5 à 1.8 g/jour en deux ou quatre prises [118]. Pris à vie, ce traitement est relativement efficace : 10 à 50% de perte de symptômes neurologiques durant la phase initiale du traitement [124] [125]. Son efficacité se mesure par le taux de cuivre éliminé dans les urines. Cependant, certains patients (20 à 30%) ne le supportent pas [116] [119]. De nombreux effets secondaires peuvent apparaître au cours du traitement et la liste est relativement longue (Table 7). Dans certains cas, le traitement par la D-Pen est arrété et modifié. La D-pénicillamnine a une affinité moyenne pour le cuivre(I) et le cuivre(II), elle est peu sélective du cuivre et peut donc chélater aussi le zinc. Une baisse de la concentration en zinc peut donc être observée. Pour cette raison, du zinc est souvent ajouté en complément à la D-Pen.

- *Le triethylènetétramine ou trientine :*

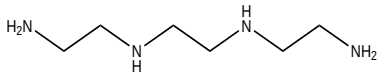


FIGURE 27 – Structure chimique de la trientine

Le traitement par la trientine est apparu en 1969. La trientine est une polyamine de faible poids moléculaire. Elle chélate le cuivre(II) par ces 4 atomes d'azote et forme un complexe stable de géométrie plan carré. Le complexe est éliminé par voie rénale. Elle diminue aussi l'absorption intestinale du cuivre. La trientine est moins bien absorbée que la D-Pen par voie intestinale [116]. Elle est aussi facilement métabolisée sous forme acétyltrienne qui est un moins bon chélateur [116]. La prise posologique est la même qu'avec la D-Pen. Le suivi de l'efficacité du traitement se fait aussi par un dosage du cuivre dans les urines. Les effets secondaires sont beaucoup moins importants qu'avec la D-Pen. Cependant en France, ce traitement est essentiellement utilisé lors d'intolérance à la D-pénicillamine. Les raisons principales sont, son conditionnement au frais, son injection intra-veineuse et son achat difficile en pharmacie hospitalière. De plus, la trientine est un chélateur plus faible que la D-Pen et la perte des symptômes neurologiques est plus lente.

- *Le zinc :*

Le zinc a été utilisé pour la première fois dans les années 60 en Hollande [126] [127]. Il est donné sous forme de sels (acétate ou sulfate de zinc...). En France, il est préconisé chez les patients pré-symptomatiques ou en complément des chélateurs. Le zinc agit sur deux mécanismes : il interfère avec l'absorption intestinale du cuivre et il induit la production de métallothionéines. Celles-ci vont alors séquestrer préférentiellement le cuivre libre et un peu de zinc. La dose journalière administrée au patient est de 45-250 mg/jour. Peu d'effets secondaires sont répertoriés, juste des problèmes gastriques en début du traitement.

D-Pénicillamine	Trientine	Zinc
Allergies cutanées	Colites, des Duodénites	Troubles gastro-intestinaux
Anorexies, Nausées	Rares complications immunologiques	Pancréatite biologique
Problèmes digestifs	Anémies dues à un déficit en cuivre	
Diminution du goût		
Complications rénales		
Complications immunologiques		
Complications hématologiques		
Complications cutanées		
(peau ridée, élastique, fragile...)		

Table 7 – Principaux effets secondaires des différents traitements actuels [119]

- *Le tétrathiomolybdate (ou TTM) :*

Le tétrathiomolybdate est préconisé en traitement initial chez les patients présentant des symptômes neurologiques, il ralentirait l'état de gravité initiale. C'est un agent de décorporation puissant. Il agit tout d'abord sur l'absorption intestinale du cuivre et lie aussi le cuivre dans le plasma. A faible dose il récupère le cuivre des métallothionéines, à forte dose il forme un complexe de cuivre insoluble [128]. Le tétrathiomolybdate reste un traitement expérimental mais est administré dans certains pays. Même s'il a été validé en tant que traitement potentiel (produit désigné comme un médicament orphelin, N° Orphanet : ORPHA137334) de la maladie de Wilson par l'agence Européenne des médicaments en avril 2008 [129], il n'est pas encore commercialisé en Europe. En France, ce traitement n'est pas administré en raison de sa toxicité [116].

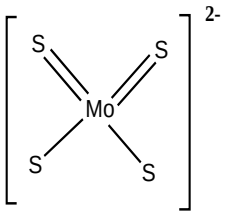


Figure 28 – Structure chimique du tétrathiomolybdate

Les traitements sont suivis à vie car il n'y a pas de guérison possible. Même pendant une grossesse, le traitement ne doit pas être interrompu. Bien souvent, les malades qui se portent mieux arrêtent leur traitement, mais un arrêt, même momentané, entraîne immédiatement une aggravation de la maladie qui peut être fulgurante. Une reprise du traitement est souvent inefficace. Lorsque la maladie est stabilisée après plusieurs années de traitement par chélateur, ce dernier peut être remplacé par des sels de zinc mieux tolérés. Notons aussi que certaines personnes résistent aux traitements.

En résumé, la maladie de Wilson est une maladie mal connue dont le diagnostic est souvent tardif. Les traitements actuels sont des chélateurs du cuivre peu sélectifs de ce dernier. Ils visent essentiellement à diminuer l'absorption du cuivre au niveau intestinal. Ils chélatent donc préférentiellement le cuivre circulant au degré d'oxydation +II. L'organe source du problème, le foie, n'est absolument pas visé par les chélateurs. Le traitement est inefficace si le diagnostic est réalisé trop tard et que le patient a une hépatite aigüe avec troubles neurologiques sévères. Actuellement, la seule solution dans ce cas-là est la greffe du foie.

Nous venons de voir que le cuivre intervient dans un grand nombre de maladies génétiques ou neurodégénératives. Le cuivre est un élément essentiel à l'organisme mais par son activité redox, à forte concentration, il peut engendrer du stress oxydant. Sa toxicité peut alors être diminuée en utilisant des chélateurs du cuivre tels que la D-pénicillamine.

3 Thiols et ions métalliques d^{10}, une veille histoire

3.1 Chélateurs et médecine

L'utilisation d'agents chélatants en médecine remonte aux années 50 après la seconde guerre mondiale avec l'utilisation du British Anti-Lewisite ou BAL, contre le produit chimique de guerre (2-chlorovinyldichloroarsenic) [130]. Notons que les premiers « médicaments » à base de complexes d'arsenic ont été développés, il y a une centaine d'années par Alfred Werner et Paul Ehrlich afin de soigner la Syphilis [131].

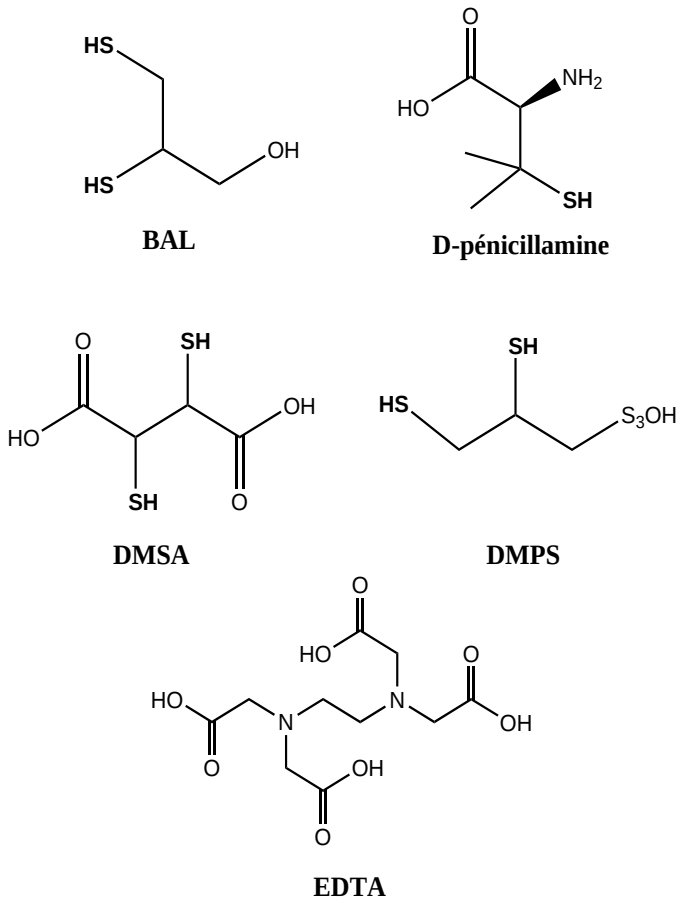


FIGURE 29 – Structure chimique d'agents chélatants

3.1.1 Le British Anti-Lewisite ou BAL

Le BAL possède deux fonctions thiol (Fig 29), qui lui permettent de complexer fortement l'arsenic (dans le cas du 2-chlorovinyldichloroarsenic). Il a été développé en 1939 à l'université d'Oxford par Peters and coll. [132]. A l'époque, les chercheurs pensaient déjà que l'arsenic réagissait avec les thiols des protéines de l'organisme. Ils ont donc élaboré un produit comportant des fonctions thiol. Des études réalisées entre l'arsenic et des protéines, comportant deux cystéines, ont guidé leur choix d'insérer deux thiolates dans la structure du BAL. En effet, selon eux, le complexe formé avec deux thiols était plus stable que celui formé par un seul thiol [133]. C'est le principe même de l'effet chélate. Le complexe formé est soluble et peut ainsi être éliminé par l'organisme. Il a ensuite été utilisé comme premier traitement dans la maladie de Wilson en 1951 par le neurologue Denny-Brow [134]. Enfin, il a été préconisé en cas d'intoxication liée au mercure et au plomb. Mais en raison de sa toxicité (élévation de la pression artérielle, tachycardie, nausées, vomissements, céphalées, sensations de brûlures de la bouche, de la gorge, du pénis, salivation, lacrymation, rhinorrhée et douleurs diverses) [130], et de son utilisation difficile par injection par voie musculaire, il a été remplacé par d'autres chélateurs tels que la D-pénicillamine

et le DMSA. Notons que les injections en intraveineuse du BAL sont difficiles et douloureuses, particulièrement pour les enfants. Aujourd'hui il est encore utilisé comme agent anti-Lewisite et dans certaines cliniques en cas d'empoisonnement au mercure.

3.1.2 La D-pénicillamine

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, c'est en 1956 que Walshe et Coll. relatent que, l'administration par voie orale de la D-pénicillamine, augmente l'excrétion urinaire du cuivre chez les patients atteints de la maladie de Wilson [120]. Dans les années 60, Aposhian et Coll. [135] rapportent une étude comparative, réalisée sur des rats, entre le BAL et la D-Pen lors d'une intoxication au mercure. Ils leur ont injecté, par voie intramusculaire, 3 mg/kg de mercure puis 20 mg/kg de BAL, 24 mg/kg de L/D-Pen ou 24 mg/kg de D-Pen. Avec le BAL, la mortalité était de 0%, 73% avec le mélange racémique de la pénicillamine et 33% avec l'isomère « D » de la pénicillamine. La première conclusion a été que l'isomère « D » était plus actif que le racémique, la deuxième que la D-Pen était tout de même moins efficace que le BAL. Cependant l'utilisation de la D-Pen par voie orale est plus facile vis-à-vis des patients. Avec les mêmes quantités de mercure et 96 mg/kg de D-Pen, par voie orale, la mortalité a été de 8%. En changeant la D-Pen par un dérivé, la *N*-acetyl-D,L-Pen, la motalité chutait à 0% pour 123 mg/kg de produit administré. La conclusion de cette étude est que la *N*-acetyl-D,L-pénicillamine semble être un traitement de choix pour soigner une intoxication au mercure par voie orale, surtout que cette dernière est moins toxique que la D-Pen. Clarkson et coll. [136] montrent, eux aussi, que la D-Pen et son dérivé la *N*-acetyl-D,L-pénicillamine réduisent la concentration de mercure dans le sang, ces études étant réalisées sur des personnes empoisonnées par du méthyle mercure. Cependant, Karagol et coll. reportent une inefficacité de la D-Pen face à deux cas d'empoisonnement au mercure [137].

3.1.3 L'acide meso-2,3-dimercaptosuccinic ou DMSA

Aussi appelé « succimer », ce composé dérivé du BAL l'a vite remplacé dans le traitement des intoxications au plomb et au mercure (Fig 29). Il a été approuvé comme agent chélatant, non toxique, pour l'intoxication au plomb, par la « Food and Drug Administration » en 1991 [138]. Il est capable de diminuer la concentration de plomb dans le sang chez l'homme. Sur un modèle animal (le rat), il a la capacité de diminuer la quantité de mercure situé dans le cerveau [139]. Notons que chez l'homme, le DMSA n'est pas capable d'aller chercher le mercure contenu dans le cerveau, seulement celui contenu dans les tissus [138]. Grâce à un faible poids moléculaire, le complexe formé avec le plomb ou le mercure est éliminé par le rein [140]. Il a l'avantage de pouvoir être administré par voie orale mais son absorption est incomplète. Dans le sang, il se lie facilement aux protéines par des ponts dissulfure. 90% du DMSA excrété par les urines, est lié à des cystéines. Ce dithiol a des

effets secondaires moins violents que le BAL : rougeurs de peau, problèmes gastriques et état grippal [140].

3.1.4 Le 2,3-dimercapto-1-propane ou DMPS

Dérivé lui aussi du BAL, le DMPS est un produit soluble dans l'eau (Fig 29). Il a été introduit en 1956 par Petrunkin en Union Soviétique pour traiter les intoxications liées au mercure [141] [142]. Il peut être administré par voie orale ou par intraveineuse [140]. Il a été utilisé en traitement de la maladie de Wilson [140], mais est surtout utilisé en cas d'intoxication au mercure. Tout comme le DMSA, le complexe formé est éliminé par les reins. Il est capable de détoxifier le mercure contenu dans les tissus. Cependant, chez l'homme, il n'atteint pas le mercure dans le cerveau et ne fait que réduire l'entrée du mercure par voie intestinale [138]. Après administration, un pic de mercure dans les urines est enregistré au bout de 6 heures [143]. Il y a une réduction globale de la toxicité du mercure, même chez une personne exposée régulièrement, car il augmente l'excrétion urinaire du métal [144].
Le métabolisme et la pharmacocinétique des deux composés, DMSA et DMPS, sont très bien connus notamment grâce aux nombreux travaux réalisés par Aposhian et Coll [143] [145] [146].

3.1.5 L'acide éthylène diamine tétra acétique ou EDTA

L'EDTA n'a pas de fonction thiol (Fig 29) mais c'est un chélateur de référence dans le domaine la chimie inorganique. Ce chélateur est apparu juste après le BAL. L'EDTA est incapable de pénétrer dans les cellules ; il est donc injecté par voie intraveineuse sous forme $CaNa_2EDTA$ [147]. L'EDTA est préconisé comme traitement en cas d'intoxication par le plomb [145] [148]. Le processus prend entre 1 à 3 heures. Le plomb est toxique pour le cœur, l'intestin, les os, les reins, les systèmes nerveux et reproductif. On l'a longtemps employé dans les peintures ou dans les canalisations. Le complexe formé avec le plomb est stable et relativement peu toxique, il est éliminé par les reins.

Chélateurs	Ions Métalliques
$CaNa_2EDTA$	Pb^{2+}
BAL	Hg^{2+}, As^{3+}
Meso-DMSA	Pb^{2+}, Hg^{2+}
DMPS	Hg^{2+}, $Cu^{2+/+}$
D-Pen	$Cu^{2+/+}$

Table 8 – Principales utilisations des chélateurs [145]

L'utilisation de chélateurs comme agents thérapeutiques n'est pas nouvelle et le choix des chélateurs utilisés respectent bien le théorie de Pearson (thiol et métaux mous).

Comme nous l'avons vu dans la partie 2.2.3, les métallochaperonnes à cuivre ont des cystéines dans le site de liaison du métal. Dans le cas d'intoxication au mercure ou au cadmium des protéines comportant le même type de site de liaison sont produites pour la détoxication [38]. La chimie de coordination de ces différents métaux avec des ligands comportant des thiols a donc suscité beaucoup de recherches, afin notamment de comprendre les mécanismes d'action des métaux avec ces différentes protéines, lors d'une intoxication.

3.2 Les complexes thiols-ions métalliques d^{10}

Dans le vivant, les protéines riches en cystéines ont un rôle important à la fois dans l'homéostasie de certains métaux d^{10} (zinc, cuivre) mais aussi dans la détoxication d'autres métaux (mercure, cadmium, plomb). Cette forte affinité entre les thiolates des cystéines et ces cations métalliques, ainsi que la géométrie des sites de fixation de ces ions au sein des protéines intéressent les scientifiques depuis longtemps. De nombreuses études de spectroscopies ont été réalisées sur les protéines elles mêmes ou sur des modèles peptidiques ou chimiques.

Dans cette partie, une vue d'ensemble des différentes caractéristiques et résultats obtenus sur les complexes thiolates-ions métalliques d^{10} sera présentée. La plupart des études ont été faites en utilisant les techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie UV-visible, le dichroïsme circulaire, la luminescence, la spectroscopie EXAFS, la diffraction des rayons X, la RMN ^{133}Cd et ^{199}Hg. Cette dernière technique est un outil très utilisé pour déterminer la coordination du métal dans les sites de liaisons des protéines [149]. En effet, l'environnement de coordination du métal peut être obtenu par corrélation entre le déplacement chimique mesuré et les tables de composés de structure connue [150]. Les deux techniques sont très utilisées bien que la RMN du ^{133}Cd soit moins sensible que celle du ^{199}Hg.

Notons que la chimie des complexes thiolate-ion métallique d^{10} suscite encore beaucoup d'intérêt actuellement, notamment dans le développement de ligands soufrés comme agents thérapeutiques (à base d'or contre les rhumatismes dus à l'arthrite [151]...), de nanoparticules [152] ou de ligands soufrés dans la détoxication de métaux [153].

3.2.1 Métallothionéines et modèles structuraux

Etudes en solutions : Nous avons vu précédemment que les métallothionéines étaient des protéines riches en cystéines qui avaient un rôle dans l'homéostasie du cuivre et du zinc mais aussi dans la détoxication du mercure et du cadmium. C'est par leurs fonctions thiolates qu'elles complexent ces cations métalliques sous forme de clusters. Nous avons aussi vu que les clusters étaient répartis sur deux domaines distincts à savoir le domaine α et le domaine β. De plus, selon le type de cations (divalents ou monovalents), la géométrie au sein du cluster n'est pas la même. Ces protéines ont beaucoup été étudiées en utilisant

des méthodes spectroscopies telles que l'UV-visible ou le dichroïsme circulaire qui ont permis de caractériser l'existence de clusters M_xS_y [154].
La table ci-dessous rappelle les types de clusters existant selon le domaine de la protéine et la géométrie du cation métallique au sein du cluster.

	Stœchiométrie	Géométrie	Domaine
Métaux divalents	clusters M_3Cys_9	Tétraédrique	situé dans le domaine β
	clusters M_4Cys_{11}	Tétraédrique	situé dans le domaine α
Cuivre(I)	clusters M_6Cys_{11}	Trigonale	situé dans le domaine α
	clusters M_6Cys_9	Trigonale	situé dans le domaine β

Table 9 – Métaux au sein des Métallothionéines

Beaucoup de travaux ont été rapportés sur ces différents clusters notamment par Vasak et coll. Il est possible d'observer par UV-visible des bandes à transfert de charge $S^- \rightarrow M^{2+/+}$ qui correspondent à un transfert d'électrons des orbitales p du ligand aux orbitales s du cation métallique. Ces bandes à transfert de charges du ligand vers le métal, notées LMCT, ont des énergies caractéristiques du métal impliqué [155]. Par des calculs de déconvolution, et en s'appuyant sur le concept de Jorgensen [156], cette équipe montre que plus la liaison métal-thiolate est forte, plus la bande LMCT se déplace vers les basses énergies [157].
Les études par dichroïsme circulaire montrent que les spectres se modifient en fonction de la géométrie du cation métallique au sein des clusters [157]. En effet, les signatures des bandes LMCT pour le cluster Cd_7-MT (où Cd(II) est tricoordiné) ne sont pas les mêmes que pour le cluster Cd_3-MT (où Cd(II) est tétracoordiné) [158]. Le spectre passe de deux bandes à une seule bande.
Ces travaux ont été réalisés sur les MT de type 1, 2 et 3. Les caractéristiques des clusters observées sur les MT-1,2 [159] sont les mêmes que pour celles des MT-3. Ces dernières forment avec les métaux divalents des clusters du type M_4^{II}-(MT-3) situés eux aussi sur le domaine α de la protéine où le cation divalent acquiert une géométrie tétraédrique [160] [161].

Types de clusters	Bande LMCT S $\rightarrow$ M^{II}, UV	Bandes caractéristiques, CD
Zn_7-MT	220 nm	(-) 226 nm ; (+) 250 nm(LMCT)
Cd_3-MT	243 nm $\epsilon = 5300\ M^{-1}\ cm^{-1}$ par Cys	(+) 220 nm ; (+) 240 nm(LMCT)
Cd_7-MT	256 nm	(+) 224 nm ; (+) 259 nm(LMCT), (-) 240 nm(LMCT)
Hg_7-MT	300 nm	LMCT :(+) 261 nm (-), 283 nm, (+) 300 nm

Table 10 – Ensemble des données CD et UV-visible concernant les MT et les cations divalents

Enfin, les résultats obtenus avec le cuivre, par cette même équipe, mettent en évidence la formation de clusters Cu_8-MT et Cu_{12}-MT pour les trois types de MT. Les signatures UV-visible et CD mettent en évidence des bandes de haute énergie correspondant à la bande à transfert de charge $S^- \rightarrow Cu^+$ et des bandes de basse énergie correspondant, à une interaction Cu-Cu d'un système polynucléaire [159]. Les résultats obtenus par luminescence à 77 K mettent aussi en évidence une signature différente selon le cluster de cuivre(I). Pour la même longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}), à basse température, le spectre d'émission est différent [159] : le cluster Cu_6(Cu_{12}-MT) présente une seule bande à 610 nm contrairement au cluster Cu_4 (Cu_8-MT) qui possède deux bandes à 425 et 610 nm. Cela s'explique par la distance entre les cuivres au sein du cluster qui est plus importante dans Cu_6 [162]. En effet, la barrière énergétique des orbitales « d-s »0.5mm) du cluster Cu_4 est plus haute que celle des orbitales « p » dans le cluster Cu_6. La bande à 425 nm est donc caractéristique d'une distance Cu-Cu courte [159]. Notons pour finir que dans les deux types de protéines (MT et GIF), le cluster de type Cu_4-MT est plus stable à l'air que le cluster Cu_6 [163] [164].

La bande autour de 600 nm observée en luminescence pour les clusters de cuivre(I)-MT a aussi été mise en évidence par Winge et coll. [165] lors d'une étude menée sur ACE1 (Type MT) et le cuivre(I). Les mesures faites à température ambiante, pour un $\lambda_{ex} = 310$ nm, donnent un $\lambda_{em} = 580$ nm. Winge et coll. soulignent que le cluster est quand même sensible aux interactions avec le solvant et à l'oxygène qui éteint (quench) la luminescence.

	Bande LMCT UV	Bande LMCT CD	luminescence λ_{em} T = 77K
MT type 1 et 2	262 nm ; $\epsilon = 5\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ par Cu lié 295 nm	(+)260 nm (-)283 nm, (+)308 nm (-)325 nm (+)357 nm	Cu_6 $\lambda_{em} = 610$ nm Cu_4 $\lambda_{em} = 610$ nm et 425 nm
MT type 3	260 nm ; $\epsilon = 5\ 500\ M^{-1}\ cm^{-1}$ par Cu lié 300 nm, 375 nm	(+)260 nm (-)285 nm (+)305 nm (-)323 nm (+)358 nm	Cu_6 $\lambda_{em} = 600$ nm Cu_4 $\lambda_{em} = 600$ nm et 420 nm

Table 11 – Caractéristiques spectroscopiques pour Cu-(MT-1,2) et Cu-(MT-3) [159] [163] [164]

Enfin, les travaux menés par Stillman et coll. portent surtout sur le déplacement du zinc(II), au sein du cluster Zn_7-MT, par un autre cation métallique. Les résultats montrent clairement le déplacement de l'ion zinc(II) d'un des deux domaines avec formation d'espèces bimétalliques, puis déplacement du zinc(II) du second domaine. Les bandes UV et CD caractéristiques du Zn_7-MT disparaissent et laissent la place aux bandes M_7-MT [166]. Enfin, d'autres études sur apoMT (MT sans métal), Zn_7-MT et Hg(II) par cette même équipe, mettent en évidence le déplacement total du zinc par le mercure. En excès de ce dernier ($Hg^{2+} = 11$), l'environnement de celui-ci, au sein des MT, passe de tetraédrique à trigonal [167].

Système initial	Mercure ajouté	Espèces formées	Bandes CD caractéristiques
Apo-MT2	7 Hg^{2+}	Hg_7-MT	261(+), 283(-), 303(+)
Apo-αMT2	4 Hg^{2+}	Hg_4-MT	261(+), 283(-), (+)300, (-)319
Zn_7-MT2	7 Hg^{2+}	Hg_7-MT	262(+), 282(-), 297(+)
Zn_7-MT2	11 Hg^{2+}	Hg_{11}-MT	300(+)
Zn_4-MT2	4 Hg^{2+}	Hg_4-MT	260(+), 282(-), (+)300, (-)320

TABLE 12 – Déplacement du zinc par Hg(II)) [167]

Nous retiendrons que ces protéines forment des clusters où les cations métalliques divalents ont un environnement tétraédrique et des clusters où les cations métalliques monovalents ont un environnement trigonal. Tous ces systèmes ont des signatures, en spectroscopies UV-visible et CD, caractéristiques.

Cristallisation de systèmes Cu_xS_y : La détermination de structure des complexes « soufre-Cu(I) » a énormément aidé à comprendre et à élucider l'environnement possible de ce cation métallique au sein des sites de fixation des métallothionéines. Parmi ces complexes, beaucoup de clusters de cuivre(I) et quelques systèmes mononucléaires ont été décrits.

• *Les clusters de cuivre(I)*

L'intérêt pour ce type de systèmes vient directement du rôle de ces clusters de cuivre au sein des protéines riches en cystéines. Des clusters de type Cu_4S_8, Cu_5S_7, Cu_5S_6 et Cu_8S_{12} ont été caractérisés.

La plupart des systèmes décrits met en évidence une géométrie trigonale du cuivre(I) au sein du cluster. La longueur des distances Cu-Cu est importante car elle influence les interactions entre les atomes de cuivre. Ces interactions peuvent stabiliser ou déstabiliser le système et créer alors des distorsions dans la géométrie globale du cluster.

En 1977, Coucouvanis et coll. décrivent la structure d'un cluster de cuivre(I) de corps Cu_8S_{12} [168]. La structure de deux composés: $[Cu_8(DED)_6]^{4-}$ et $[Cu_8(DTS)_6]^{4-}$ (où DED = dicarboethoxy-2,2-ethylenedithiolate, DTS = Dithiosquarate), a donc été réalisée. Il semble ici que le système à huit cuivres soit stabilisé par les interactions cuivre-cuivre. Au sein du système $[Cu_8(DTS)_6]^{4-}$, chaque atome de cuivre est coordiné par trois atomes de soufre permettant d'avoir une géométrie trigonale pour le cuivre (Figure 30). Le corps cuivre du système adopte une géométrie cubique. La distance Cu-Cu est, en moyenne, de 2.84 Å, ce qui indique une interaction possible entre les atomes de cuivre. De plus, bien que les distances Cu-Cu au sein du corps Cu_8 aient un effet favorable sur les interactions

Cu-Cu, une légère distorsion du système est quand même à noter.

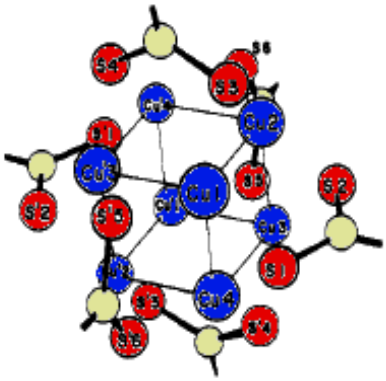


FIGURE 30 – Structure cristallographique de Cu_8S_{12} (en bleu atome de cuivre, en rouge atome de soufre) [168]

Cette même équipe a aussi synthétisé et caractérisé un cluster de type Cu_4S_6 [169]. Au sein du complexe $[Cu_4(SPh)_6](Ph_4P)_2$, la géométrie d'un atome de cuivre est trigonale déformée tendant vers un plan (Fig 31). La distance Cu-Cu est de 2.69 à 2.77 Å ce qui est légèrement supérieur à celle d'une géométrie trigonale idéale (2.64 Å). Dans le système $[Cu_4(SPh)_6](Ph_4P)_2$, il y a donc une distortion due à une expansion du tétraèdre formé par les cuivres. Cela indique une répulsion entre les atomes de cuivre au sein du système.

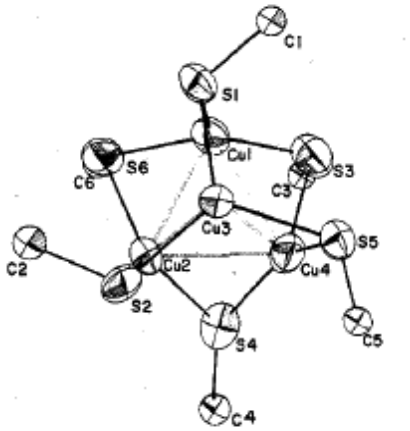


FIGURE 31 – Structure cristallographique de Cu_4S_6 [169]

• *Les complexes mononucléaires de cuivre(I)*

L'intérêt pour les complexes mononucléaires est arrivé après la découverte de la boucle de liaison MXCXXC chez les métallochaperonnes.

Coucouvanis et coll. [169] ont décrit la synthèse et la structure RX d'un des premiers complexes mononucléaires de type CuS_3. Dans le complexe $[Cu(SPh)_3]^{2-}(Ph_4P)_2$, l'atome

de cuivre(I) est tricoordiné (Fig 32). Cependant la géométrie n'est pas idéale, deux des liaisons Cu-S sont quasiment égales (2.27 Å) et plus courtes que la troisième. L'angle S-Cu-S, entre ces deux liaisons plus courtes, est par contre plus grand que les deux autres (135.4° contre 113° et 109°). Pour finir, ce composé a tendance à se décoordiner et former un complexe bicoordiné, linéaire à basse température. Cette décoordination pourrait s'expliquer par une interaction de $(Ph_4P)^+$ avec les cycles aromatiques.

Garner et coll. [170] ont donc décrit la même structure en utilisant un autre contre-ion : $[NEt_4]^+$. La géométrie trigonale du cuivre, au sein du système, est plus favorisée par ce contre-ion. Tous les angles S-Cu-S sont quasiment égaux (120°). La distance Cu-S est aussi plus courte et en accord avec d'autres types de Cu_3S ($\approx$ 2.25 Å). Les études par spectroscopie IR et Raman montre une géométrie D_{3h} (Fig 32).

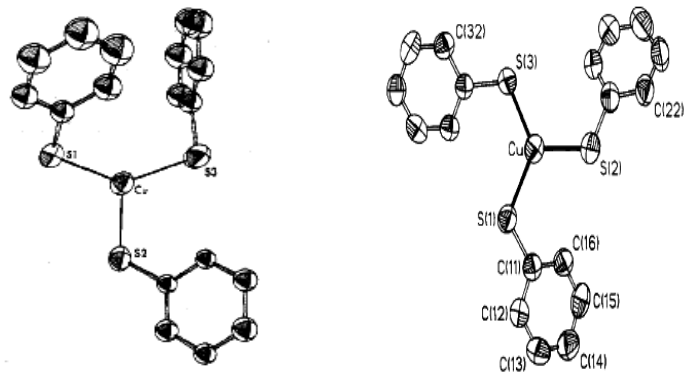


FIGURE 32 – Structure cristallographique de CuS_3 : avec le contre ion $(Ph_4P)_2$ (à gauche) [169], avec le contre ion $[NEt_4]^+$ [170](à droite)

Enfin, Fujisawa et coll. [171] ont synthétisé et caractérisé un complexe mononucléaire de cuivre(I) coordiné par des ligands thiolates aliphatiques très encombrés: $[NEt_4][Cu(SAd)_2]$ (avec AdS^- : anion thiolate d'adamantane). L'utilisation de ce type de ligands très encombrés est nécessaire pour stabiliser un système CuS_2. La caractérisation par diffraction des Rayons X, montre une géométrie linéaire du cuivre avec une distance Cu-S de 2.15 Å (Fig 33). Cette distance est plus courte que dans un complexe tri-coordiné. Le complexe présente aussi une géométrie de type C_2.

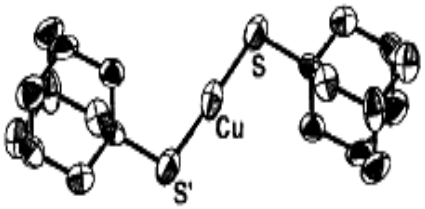


FIGURE 33 – Structure cristallographique de CuS_2 [171]

Ainsi, la cristallisation de clusters et de complexes mononucléaires où le cuivre adopte une géométrie trigonale est relativement bien décrite. Dans les clusters, la distance Cu-Cu permet ou non des interactions Cu-Cu au sein du système et donc une stabilisation ou d'éventuelles distorsions. La cristallisation de système où le cuivre adopte une géométrie linéaire nécessite l'utilisation de ligands très encombrés. Rappelons qu'au sein des métallothionéines, le cuivre(I) adopte majoritairement une géométrie trigonale.

3.2.2 Protéines « à doigt de Zinc »

10% des protéines du protéome humain sont des protéines à zinc et 8% possèdent un site dit à « doigt de zinc » de type $Zn(Cys)_{4-x}(His)_x$ avec x=0-2. Le zinc possède au sein de ces systèmes une géométrie tétraédrique. Ces sites sont présents dans de très nombreux facteurs de transcription qu'ils structurent pour permettre leur interaction avec l'ADN. Ils existent aussi dans de nombreuses enzymes, où ils jouent souvent un rôle structural ou un rôle fonctionnel lorsqu'ils constituent le site actif d'hydrolases et de deshydrogénases.

Implication des centres actifs de type zinc comme sites senseurs de H_2O_2 : Il a été montré que, pour des protéines dont l'activité est régulée par H_2O_2 (RsrA, Hsp33 [172] [173]), le rôle de ces sites à « doigt de zinc » est non négligeable. En effet, H_2O_2 agit sur les sites en oxydant les cystéines, ce qui libère le zinc et active la protéine [174]. La détection de H_2O_2 par des protéines possédant une paire de cystéines libres est bien connue [175]. Par contre peu de données sont rapportées concernant la réactivité de ces cystéines face à H_2O_2 si elles sont liées à un ion Zn^{2+}. L'étude de cette réactivité pourrait permettre de comprendre comment ces sites $Zn(Cys)_x(His)_y$, considérés jusqu'ici comme très robustes, peuvent servir à détecter H_2O_2 pour initier les mécanismes de défense cellulaires contre le stress oxydant. Ces sites de type « doigt de zinc » apparaissent donc comme des cibles potentielles de stress oxydant et de stress métallique.

Sénèque et coll. ont élaboré des peptides incorporant le motif $Zn(Cys)_x(His)_y$ pour mimer ces sites senseurs de H_2O_2 afin d'étudier la réactivité de ces modèles avec des oxydants biologiques. Des études de spectroscopie UV-visible ont été réalisées sur trois types de peptides, présentant un site de type $ZnCys_4$ (Fig 34). Ils observent une bande LMCT $S^- \rightarrow Zn^{2+}$ à 210 nm, en moyenne, et un coefficient d'extinction d'environ 21 000 M^{-1} cm^{-1} en moyenne. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues pour les clusters $ZnCys_4$ des MT. Les données sont rapportées Table 13 [176].

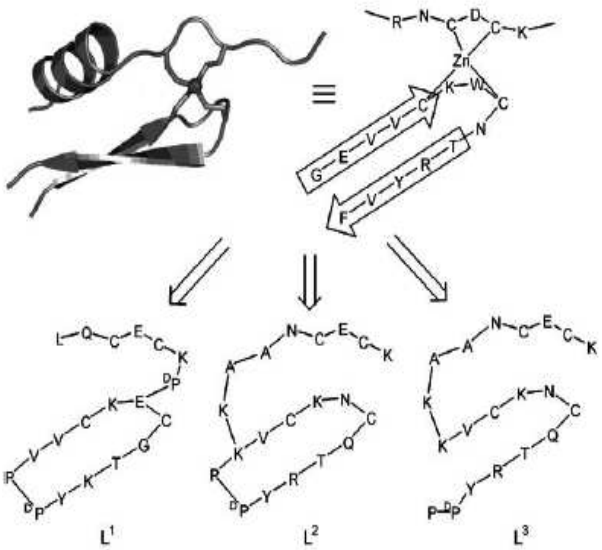


FIGURE 34 – Structure cristallographique du site $Zn(Cys)_4$ de *Thermotoga maritima* Hsp33 et représentation schématique du site (en haut) [177]. Modèles peptidiques proposés par Sénèque et coll. (en bas) [176]

Modèles Peptidiques	UV bande LMCT	Epsilon M^{-1} cm^{-1}
ZnL_1	213 nm	19 600
ZnL_2	204 nm	23 700
ZnL_3	211 nm	20 600

TABLE 13 – Résultats obtenus sur des mimes de « doigt de Zinc » [176]

L'activité de ces modèles vis à vis de H_2O_2 a été mesurée sur les trois peptides. Il en ressort que le motif le plus proche (ZnL_2) du site actif de Hsp33 s'oxyde à la même vitesse. Les deux autres peptides s'oxydent plus vite. Ces modèles mettent en évidence qu'un changement, même mineur, dans la structure du site peut influencer la réactivité avec H_2O_2.

Rôles de ces protéines lors d'une intoxication au plomb : Le plomb est un élément toxique pour l'organisme. L'affinité du plomb pour les protéines riches en cystéines et de centre actif zinc, est maintenant avérée [178]. Il semble donc que le plomb prenne la place du zinc, au sein de ces protéines, et acquiert une géométrie différente. Des mesures EXAFS [179] mettent en évidence la formation de complexes de type PbS_3 où le plomb adopte une géométrie trigonale.

Les travaux réalisés, par Godwin et coll., mettent en évidence la formation d'espèces de type PbS_3 au sein de protéines riches en soufre tels que GATA (facteur de transcription), ALAD (enzyme à zinc intervenant dans la biosynthèse des hèmes) ou HIV nucléocapside.

Les résultats obtenus (EXAFS, Spectroscopies UV-visible) mettent en avant la préférence du plomb, pour une géométrie trigonale dans les protéines soufrées et donc une coordination de type PbS_3 ou de type PbS_{5-8} [180] [181]. Dans ce cas là, le plomb éviterait donc un environnement à quatre voisins. De plus, le plomb se lie aux soufres avec une plus forte affinité que le zinc [178]. Les cystéines intervenant dans la complexation doivent être relativement éloignées l'une de l'autre, afin de stabiliser le système. Le plomb est donc complexé par trois cystéines sur quatre au sein de ces protéines soufrées. Les données spectroscopiques obtenues par mesures UV sont répertoriées Table 14. Elles correspondent à des transferts de charges des orbitales 3p(Cys) $\rightarrow$ 6p(Pb) et à des transitions intra atomique $6s^2$(Pb) $\rightarrow$ 6sp(Pb) [182].

λ des Bandes LMCT	ϵ M^{-1} cm−1
255 nm	16 000
325-330 nm	4000

Table 14 – Caractéristiques UV de système de type PbS_3 [181]

Protéines de type Fer-Soufre, modèle de site à « doigt de zinc » La Rubrédoxine est une protéine de la famille des ferrédoxines qui a un site actif de type fer-soufre (FeS_4) où le fer présente une géométrie tétraédrique. Ce type de protéine peut donc servir de modèle pour les protéines à « doigt de zinc » où le zinc présente lui aussi une géométrie tétraédrique. Comme le zinc(II) n'est pas un ion métallique facile à étudier d'un point de vue spectroscopique (on parle de spectroscopie silencieuse), il est souvent remplacé par d'autres cations métalliques présentant les mêmes propriétés de complexation et de coordination à savoir le cadmium(II) ou le cobalt(II).

Le site de la rubrédoxine a donc été analysé en présence de cadmium(II) afin d'étudier le centre de type $[Cd(Cys(S)_4]^{2-}$. Par RMN du ^{133}Cd, spectroscopie UV-visible et dichroïsme circulaire, Vasak et coll. mettent en évidence une géométrie tétraédrique du cadmium(II) au sein du site [183]. En effet, les données spectroscopiques sont comparables à celles obtenues avec les métallothionéines à savoir une bande LMCT en UV vers 245 nm avec $\epsilon = 26$ 000 M^{-1} cm^{-1} (soit 6500M^{-1} cm^{-1} par cystéine) et une bande LMCT en CD, qui coïncide à celle de l'UV, vers 235 nm. Le déplacement RMN du ^{133}Cd de ce système CdS_4 est de 723.6 ppm.

Le site de la rubrédoxine a aussi été étudié en présence de mercure(II): $[Hg(Cys(S)_4]^{2-}$. Les résultats obtenus par Vasak et coll. mettent là aussi en évidence une géométrie tétraédrique de l'ion métallique Hg(II) au sein du site (Table 15). En effet, ces valeurs sont comparables à celles obtenues pour les métallothionéines où le mercure possède un environnement tétraédrique.

Système	UV, bande LMCT	CD bandes caractéristiques
Hg-Rd	284 nm, ϵ = 20 000 M^{-1} cm^{-1} 257 nm, ϵ = 12 000 M^{-1} cm^{-1} 230 nm, ϵ = 22 000 M^{-1} cm^{-1}	(+)287, (-)258,(-)230
(Hg-MT)[a]	282 nm, ϵ = 17 000 M^{-1} cm^{-1} 251 nm, ϵ = 17 000 M^{-1} cm^{-1}	(+)280, (-)247
(Hg-SR_2)[b]	232 nm, ϵ = 4000 M^{-1} cm^{-1}	

TABLE 15 – Caractéristiques Hg-Rd [184],a : [167], b : [185]

L'intérêt du mercure et de son environnement au sein des protéines riches en soufre ne s'arrête pas au système HgS_4. En effet, le mercure adopte préférentiellement une géométrie linéaire de type HgS_2. Or, dans certaines protéines une autre géométrie, trigonale de type HgS_3 a pu être observée comme pour le cuivre(I) au sein des MT.

3.2.3 Les modèles de protéine MerR, site HgS_3

La biochimie du mercure est basée sur sa capacité à se lier fortement aux protéines riches en soufre. Sa forte toxicité est donc directement liée à sa forte affinité pour ces protéines, d'autant plus que la liaison Hg-thiolate est thermodynamiquement très stable. Le vivant a donc élaboré un moyen, basé sur l'affinité mercure/soufre, en réponse à une intoxication éventuelle. Il va complexer, séquestrer, le mercure par des protéines riches en cystéines. Par exemple, la résistance bactérienne envers le mercure est contrôlée par la protéine MerR. La protéine MerR est une protéine métallorégulatrice qui intervient en réponse à une intoxication au mercure. Cette protéine MerR a fait l'objet d'un grand nombre d'études afin de comprendre la géométrie du mercure au sein du site actif de cette protéine.

• Les travaux de O'Halloran et coll., sur des modèles de MerR ont permis de mettre en évidence un environnement trigonal du mercure au sein de cette protéine [186]. Les études de spectroscopie UV-Visible [186] montrent clairement l'apparition de bandes à transfert de charge qui n'existent pas dans les sites de type HgS_4 (un environnement tétraédrique du mercure). La comparaison des résultats obtenus par RMN du ^{199}Hg [187] avec des déplacements chimiques de modèles de mercure-thiolate possédant une géométrie trigonale connue, confirme un environnement trigonal du mercure(II) (Table 16).

Complexes de mercure	UV, bande LMCT	δ ppm, RMN du ^{199}Hg
$[Et_4N][Hg(SBu^t)_3]$	235 nm, ϵ = 24 000 M^{-1} cm^{-1} 260 nm, ϵ = 17 000 M^{-1} cm^{-1}	
$Hg(SEt)_2$	228 nm,ϵ = 4700 M^{-1} cm^{-1} 282 nm, ϵ = 740 M^{-1} cm^{-1}	- 985 ppm
$Hg(SPr^i)_2$	228 nm, ϵ = 3400 M^{-1} cm^{-1} 262 nm, ϵ = 650 M^{-1} cm^{-1}	- 816 ppm
Hg-MerR	240 nm, ϵ = 16 620 M^{-1} cm^{-1} 260 nm, ϵ = 11 150 M^{-1} cm^{-1} 290 nm, ϵ = 4120 M^{-1} cm^{-1}	-106/-109 ppm

TABLE 16 – Système de mercure HgS_2 et HgS_3 [186]

• Pecoraro et coll. ont mis au point des systèmes peptidiques capables de favoriser en solution aqueuse le mode de coordination trigonale du mercure connu pour la protéine MerR. Pour cela, ils utilisent un peptide appelé TRI de séquence $G(LKALEEK)_4G$ qui forment des hélices α qui s'enroulent entre elles en triple hélice (helical coiled coil peptides (Fig 35). Dans cette séquence, une leucine a été remplacée par une cystéine ou une pénicillamine en position 9, 12 ou 16 afin d'obtenir des triples hélices contenant trois donneurs soufrés pour coordonner le mercure [188].

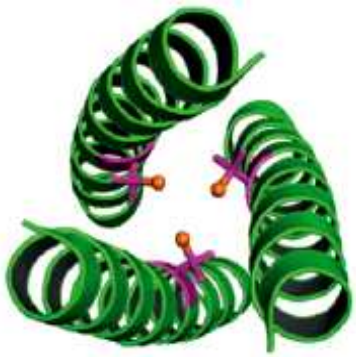


FIGURE 35 – Représentation de l'enroulement des hélices des trois peptides TRIL16X où la L-pénicillamine a substitué la leucine en position 16 [189]

Les mesures RMN du ^{199}Hg et de spectroscopie montrent que ces triples hélices peptidiques, encapsulent le mercure et le cadmium dans une géométrie trigonale. Notons que la stabilité de cette triple hélice favorise cette géométrie. Les bandes LMCT $S^- \rightarrow M^{2+}$ sont caractéristiques de cette géométrie. En effet, la bande LMCT à 247 nm est particulière au système HgS_3 et la bande LMCT à 235 nm est spécifique au système CdS_3. Cependant, des études par dosage pH-métrique mettent en évidence la formation, à bas pH, du complexe de mercure bicoordiné HgS_2. Ce complexe tend vers la forme tricoordinée à haut pH. La

formation du complexe HgS_3 dépend donc du pKa de la troisième fonction thiol. Plus ce pKa est bas, plus le complexe HgS_3 est favorisé [190] [191]. L'équilibre, de ces deux formes, s'écrit selon l'équation 9. Il a été montré récemment que la déprotonation de la troisième cystéine pour former le complexe HgS_3 avait lieu dans la triple hélice préformée (HgS_2SH) comme représentée sur la Figure 36 [192]. La présence de cette troisième cystéine libre près du mercure influence la valeur du déplacement chimique du système HgS_2 en RMN du ^{199}Hg (-908 ppm au lieu de -844 ppm) [192].

$$Hg^{II}(RS)_2 + RSH \rightleftharpoons Hg^{II}(RS)_3^- + H^+ \tag{9}$$

Le cadmium, quant à lui, forme essentiellement le complexe tricoordiné selon l'équation 10

$$Cd^{II} + (RS)_3^{3-} \rightarrow Cd^{II}(RS)_3^- \tag{10}$$

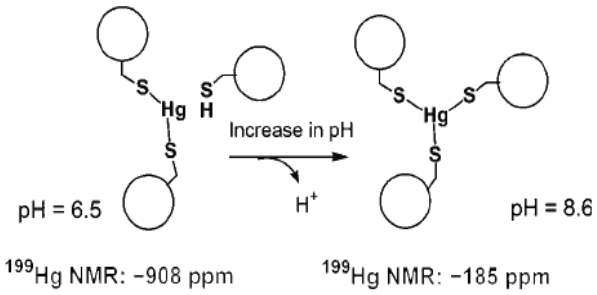


FIGURE 36 – Représentation de la coordination du mercure par la famille TRI [192]

Les données spectroscopiques obtenues avec les différents peptides TRI sont répertoriées dans la table 17. Ces données nous servirons de référence pour caractériser un système HgS_3 de géométrie trigonale par rapport à un système HgS_4 ou HgS_2.

Complexes	UV, Bande LMCT et ϵ en M^{-1} cm−1	Bande CD	δ ppm, RMN^{199}Hg
Hg-(TRIL16C)$_2^-$	240 nm, ϵ = 2700		-834
Hg-(TRIL16C)$_3^-$	247 nm, ϵ = 19 200 265 nm, ϵ = 11 900 295 nm, ϵ = 5800	248 (+), 268(+), 300(-)	-179, pH = 8.0
Hg-(TRIL12C)$_3^-$	230 nm,ϵ = 21 300 247 nm, ϵ = 15 000 297 nm, ϵ = 5500		
Hg-MerR^a	240 nm, ϵ = 16 620 260 nm, ϵ = 11 150 290 nm, ϵ = 4120		-106/-109 ppm
Ref,(CdS$_3^-$)	190-260 nm, ϵ = 15 000 à 26 000		570-660
Cd(TRIL16C)$_3^-$	232 nm, ϵ = 22 600	(+) 238, (-) 274	625
Cd(TRIL12C)$_3^-$	231 nm, ϵ = 20 600	(+) 239, (-) 260	619

TABLE 17 – Complexes TRIL16C et TRIL12C avec les métaux Cd et Hg [192] [193], ^{a} : [186]

L'environnement trigonal du mercure et du cadmium n'est pas très commun, mais pas impossible à obtenir. En effet, la détermination par diffraction de rayons X de structures de type HgS_3 ou CdS_3 a été réalisée pour des composés comportant des thiolates aliphatiques.

• Rodolfo et coll. [194] ont élaboré des complexes mononucléaires de mercure et de cadmium de géométrie trigonale. Les complexes [Ph_4P][Cd(S-2,4,6-i-$Pr_3C_6H_2$)$_3$] et [(n-Bu)$_4$N][Cd(S-2,4,6-i-$Pr_3C_6H_2$)$_3$] présentent un atome de cadmium de géométrie trigonale (Fig 37). Le premier système a une symétrie de type C_{3h} où chaque angle S-Cd-S vaut 120°. Le changement de contre ion, dans le deuxième système, entraîne une distortion de la symétrie de 120°. Les angles S-Cd-S dévient de la valeur de 120°.
Les complexes [(n-Pr)$_4$N][Hg(S-2,4,6-i-$Pr_3C_6H_2$)$_3$] et [Ph_4P][Hg(S-2,4,6-i-$Pr_3C_6H_2$)$_3$] mononucléaires où le mercure possède un environnement trigonal, présentent une géométrie de type Y (Fig 37). Les angles S-Hg-S sont différents et ont subi une distortion. Les distances Hg-S montrent, elles aussi, une distortion.
Cette étude souligne que la distance M-S est un bon indicateur du nombre de coordinations. En moyenne, les distances Cd-S et Hg-S des systèmes [Cd(SR)$_3$] et [Hg(SR)$_3$] sont très proches. Dans les systèmes [M(SR)$_4$], les distances Hg-S et Cd-S sont, elles aussi, similaires.

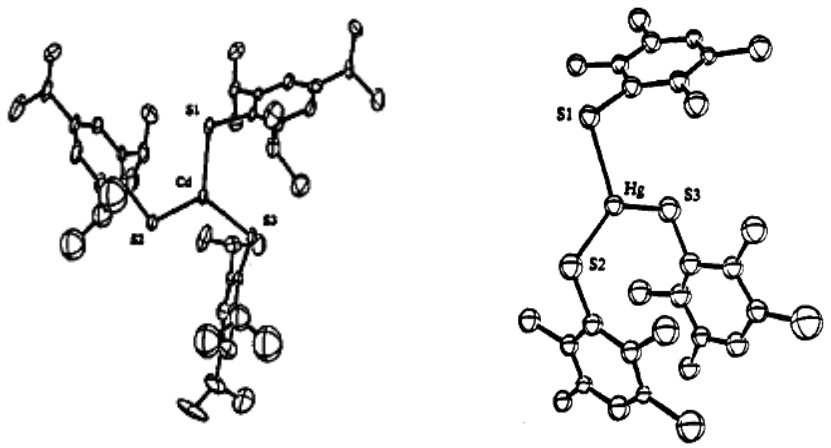


FIGURE 37 – Structure cristallographique de CdS_3 (à gauche) et HgS_3 (à droite) avec le sel P_4Ph [194]

3.2.4 Cas de la protéine APP

La protéine APP est la protéine précurseur du peptide amyloïde Aβ. Bien que la fonction de cette protéine reste peu connue, APP peut interagir avec les métaux et donc éventuellement avoir un rôle de métallochaperonne [195] [196]. Bush et coll. ont montré qu'elle était capable de lier l'ion métallique zinc(II) avec une affinité relativement forte et c'est par ces deux cystéines en position 186 et 187 qu'elle le fixe [197]. Il en est de même de protéines homologues APLP1 et 2 où des cystéines fixeraient le zinc dans le domaine de liaison du cation métallique. Toutes ces données semblent indiquer un rôle du zinc dans le métabolisme de APP.

• Afin d'étudier la nature de la liaison entre le cation métallique Zn(II) et la protéine APP, Faller et coll. ont synthétisé un peptide comportant 19 acides aminés et correspondant à la séquence de APP des acides aminés 170 à 188. Cette séquence comporte deux cystéines en position 186 et 187 et une en position 174 [198]. Ce peptide a été étudié en présence notamment de zinc(II) et cadmium(II) afin d'analyser son comportement. Les caractéristiques spectroscopiques répertoriées table 18 sont en accord avec celles obtenues pour les clusters $M^{II}Cys_4$ des MT. Ceci met en évidence un environnement tétraédrique des ions métalliques.

Métaux divalents	UV bande LMCT	CD bandes caractéristiques
Zn^{II}	220 nm, ϵ = 20 000 M^{-1} cm^{-1} avec 6000 M^{-1} cm^{-1} par Cys	
Cd^{II}	250 nm, ϵ = 16 000 M^{-1} cm^{-1} avec 5500 M^{-1} cm^{-1} par Cys	Deux bandes : (-) 222 nm et 264 nm

TABLE 18 – Résultats obtenus APP-M^{II} [198]

Les travaux indiquent donc que la liaison de métaux divalents, tels que le zinc ou le cadmium, induisent la dimérisation du peptide. Le dimère obtenu contient un cluster dinucléaire où les deux métaux divalents sont pontés par deux fonctions thiolates des cystéines (Fig 38).

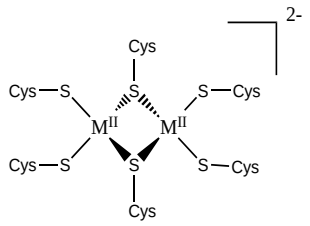


FIGURE 38 – Représentation du dimère entre APP et les cations métalliques divalents [198]

3.2.5 Modèles de métallochaperonnes

Comme nous l'avons vu section 1.2.2, les métallochaperonnes sont des transporteurs du cuivre(I) au sein des cellules. Elles fixent le cuivre par les fonctions thiols des cystéines contenues dans la boucle de liaison du métal (MXCXXC). Nous avons aussi vu que les métaux tels que le mercure, le cadmium et le plomb ont une affinité pour ce type de protéines riches en cystéines. L'élaboration de modèles de métallochaperonnes a donc un intérêt dans la décorporation et la dépollution (des sols, de l'eau...) de ces métaux, mais aussi un intérêt potentiel dans la conception de senseurs biologiques du zinc(II) ou du cuivre(I). Cependant peu de modèles sont rapportés dans la littérature.

Transporteur contenant la séquence MXCXXC : La protéine MerP intervient dans le mécanisme de détoxication du mercure(II) dans les bactéries. En effet, MerP, protéine périplasmique, joue un rôle dans la prise en charge et l'internalisation du métal au travers de la membrane interne de la bactérie. A l'image de la protéine Atx1 (analogue de Atox1 chez la levure), la protéine MerP possède une séquence consensus MxCxxC au niveau de

son site de liaison métallique.

Les travaux d'Opella et Steele [199], sur la protéine MerP, montrent une géométrie linéaire du mercure au sein de la protéine. En effet, le déplacement chimique obtenu par RMN du mercure est de -816 ppm valeur en accord avec les systèmes bicoordonnés caractérisés par O'Halloran et coll [186].

D'autres travaux, par RMN du ^{199}Hg, réalisés par la même équipe sur un mime de la boucle MXCXXC (peptide de séquence GMTCAAC [200]) mettent aussi en évidence la formation d'une espèce bicoordinée linéaire ($\delta \approx$ -800 ppm). Il n'y a pas d'observation de dimérisation du système pour les cations Cd(II) et Zn(II) qui préfèrent un environnement tétracoordiné.

Enfin, d'autres études ont été menées sur des modèles peptidiques de 10 acides aminés proposés par Delangle et coll. Ces peptides miment la boucle de liaison du métal MXCXXC des métallochaperonnes (Fig 39). La position et le choix de l'arginine (acide aminé chargé), permet de mimer le rôle de la Lys65 dans la boucle de liaison et de solubiliser le système. Par des études spectroscopiques, ces auteurs montrent que les peptides, cycliques ou linéaires, sont capables de complexer les métaux d^{10} sous forme de complexes monométalliques.

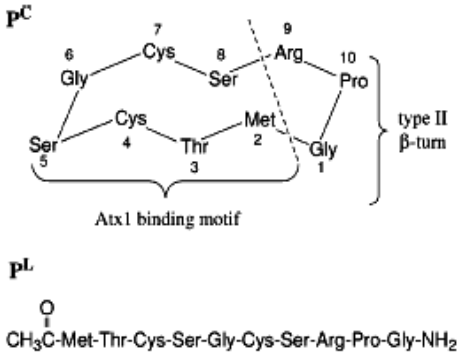


FIGURE 39 – Structure des modèles peptidiques, en haut : P^C, en bas :P^L [201]

Notons que dans le peptide cyclique, un coude de type β de motif XPGX a été positionné dans la séquence pour jouer un rôle dans la structuration du système. Non seulement, ce coude rigidifie le peptide, mais il rapproche aussi les deux cystéines pour une meilleure complexation. Ce coude et la cyclisation du peptide, permettent une pré-organisation du système, tout en limitant la contribution entropique défavorable, lors de la complexation du métal.

Les études physico-chimiques par UV-visible et RMN ^{199}Hg (pour P^C, δ = -937 ppm [202]) mettent en évidence la formation de systèmes monométalliques dicoordinés pour les métaux cuivre(I) et mercure(II) et tétracoordinés pour les métaux cadmium(II), plomb(II) (Table 19).

		P^C		P^L	
		λ	$\Delta\epsilon$ M^{-1} cm^{-1}	λ	$\Delta\epsilon$ M^{-1} cm^{-1}
1:1	HgP	220	12 500	220	12 450
		250	1300	250	1200
1:1	CdP	221	13 000	225	10 000
1:1	PbP	315	3100	315	3300
1:1	CuP	261	8800	261	8600
1:2	PbP_2	335	4000	340	5200
1:2	CdP_2	240	25 000	240	20 000

TABLE 19 – Bande LMCT $S^- \rightarrow M^{2+,+}$ [201]

Des mesures d'affinité ont été réalisées sur ces deux peptides modèles vis à vis des métaux d^{10} (Table 20). Ces mesures montrent une affinité décroissante de $Hg(II) > Cu(I) > Cd(II) > Pb(II) > Zn(II)$. Les affinités ont été calculées selon les équations 11 et 12.

$$M(II) + 2P = M(P)_2 \ \log \beta_{12} \tag{11}$$

$$M(II) + P = M(P)_2 \ \log \beta_{11} \tag{12}$$

M	$\log \beta_{pq}$	P^C	P^L
Pb(II)	$\log \beta_{11}$	8.0(1)	7.5(2)
	$\log \beta_{12}$	12.5(7)	11.6(1)
Cd(II)	$\log \beta_{11}$	9.2(1)	8.3(2)
	$\log \beta_{12}$	15.6(1)	14.8(6)
Zn(II)	$\log \beta_{11}$	6.8(2)	6.3(3)
	$\log \beta_{12}$	13.0(5)	12.2(1)
Hg(II)	$\log \beta_{11}$	> 18.6	> 18.4
Cu(I)	$\log \beta_{11}$	16.6(1)	16.4(1)

TABLE 20 – Constantes d'affinité à pH = 7.0 [202]

Ces modèles de métallochaperonnes montrent une très forte affinité pour le cuivre(I) et le mercure(II). L'affinité pour le cuivre(I) est du même ordre de grandeur que celle des métallochaperonnes [35]. Notons aussi qu'ils ont une forte sélectivité cuivre(I)/zinc(II), d'environ dix ordres de grandeur.

4 Problématique

4.1 Préambule

Dans ce chapitre, nous avons montré l'importance du cuivre dans de nombreux processus biologiques, mais aussi la nécessité de réguler sa concentration, puisqu'en cas d'excès il devient toxique (réaction de type Fenton). L'homéostasie du cuivre implique de multiples protéines dont le dysfonctionnement entraîne de graves conséquences notamment l'apparition de stress oxydant. Ceci est observé dans certaines maladies neurodégénératives et génétiques et l'utilisation de chélateurs, comme agents thérapeutiques, semble une bonne voie pour améliorer l'état des patients. Enfin, le rôle des protéines riches en cystéines dans le transport et la détoxication des métaux ou lors d'intoxication par des métaux, est très important. Pour cette raison, de nombreuses études de spectroscopies (diffraction des Rayons X, EXAFS, UV-visible, Dichroïsme circulaire, RMN...) ont été réalisées sur des modèles ou directement sur les protéines en question. Ces travaux ont permis de déterminer la géométrie et la coordination des métaux d^{10} au sein de ce type de protéines.

Revenons au cas des ATPases ATP7A et ATP7B. Dans les cellules, elles ont deux rôles : donner le cuivre aux protéines du Golgi qui en ont besoin et l'excréter quand ce dernier atteint une concentration toxique pour la cellule. Lors de la maladie de Wilson, le gène codant pour ATP7B est déficient, la protéine est donc inactive ou non fonctionnelle. Le cuivre(I) s'accumule donc dans les cellules du foie. Les traitements actuels pour soigner cette maladie agissent en amont. Ils tentent de limiter l'absorption du cuivre au niveau intestinal ou d'augmenter la production de métallothionéines qui vont séquestrer le métal. Les chélateurs actuels n'agissent donc pas sur le foie qui est pourtant le premier organe touché et souvent le point le plus critique pour sauver la vie du patient. Notons que ces chélateurs ne sont pas spécifiques du cuivre, ils peuvent aussi chélater le zinc (deux ordres de grandeur de différence entre les affinités).
Les modèles de métallochaperonnes décrits au laboratoire par Delangle et coll. miment et reproduisent la boucle de liaison du métal MXCXXC. Ils ont une très forte affinité pour le cuivre(I), du même ordre de grandeur que celles des métallochaperonnes. Leur sélectivité pour le cuivre(I) par rapport au zinc(II) en font des agents thérapeutiques potentiels de la maladie de Wilson. Pareillement, leur forte affinité pour le mercure(II) en font des agents potentiels de décorporation de ce métal.

Ces premiers résultats encourageants nous ont donc conduits à proposer de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I) qui ont été ensuite fonctionnalisés afin de cibler le foie pour les malades atteints de Wilson.

4.2 Perspectives de recherches

Pour la conception de ces chélateurs, nous nous sommes inspirés des molécules du vivant à savoir les métallochaperonnes et les métallothionéines qui ont, dans leur site de fixation du métal, des cystéines.

FIGURE 40 – à gauche : Structure de Atx1 (eqv. Atox1 dans la levure [38]), à droite : Structure chimique des méthallothionéines cluster Cu_7-MT (*Saccharomyces cerevisiae*) [203]

Le cuivre(I) au sein des métallochaperonnes est bicoordiné par les cystéines du site de fixation, et au sein des métallothionéines, il est tricoordiné. L'élaboration de systèmes comportant deux ou trois cystéines semble donc cohérente avec les sites de liaison identifiés dans le vivant.

Le premier organe touché, dans la maladie de Wilson, est le foie. Le cuivre(I) s'y accumule et pourtant aucun traitement actuel ne le cible. Voilà pourquoi nous proposons l'élaboration de systèmes capables de cibler cet organe. Cela permettrait de détoxifier le cuivre(I) dans les cellules hépatiques et donc d'aider les malades qui ont le foie très atteint (hépatique aigüe ou fulgurante). Le choix des récepteurs aux asialoglycoprotéines, comme cible, semble judicieux puisqu'ils sont situés à la surface des cellules hépatiques.
Les systèmes envisagés seront donc composés de deux parties (Fig 41), à savoir, une partie chélatante pour récupérer le métal, et une partie ciblante pour entrer dans les cellules hépatiques.

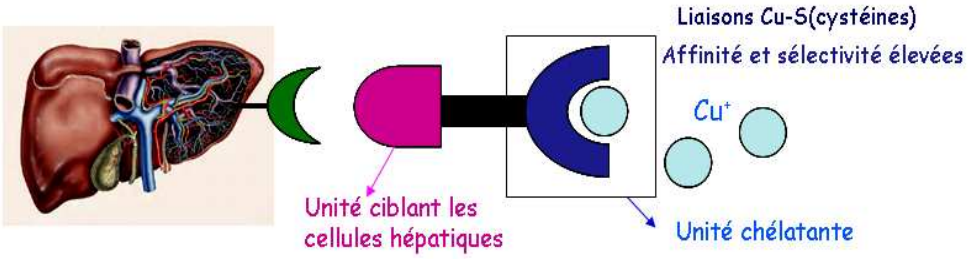
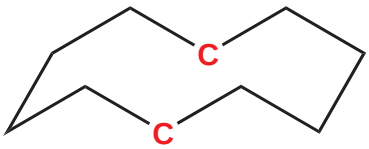


FIGURE 41 – Schématisation du système

Dans le chapitre suivant du manuscrit, nous présenterons l'élaboration de systèmes dérivés du peptide modèle d'Atx1, P^C, comportant deux cystéines. Les systèmes que nous avons choisis sont plus rigides que P^C et nous discuterons de l'effet de cette rigidification

sur la complexation de ces peptides vis-à-vis du cuivre(I) et des autres métaux d^{10} présentés dans ce chapitre.

Cyclodécapeptides à deux cystéines comme complexants du cuivre(I)



Troisième partie

Cyclodécapeptides à deux cystéines comme complexants du cuivre(I)

5 Préambule : Stratégie de conception

Un cyclodécapeptide, P^C, mimant la boucle de liaison du cuivre connue dans les métallochaperonnes, a été étudié au laboratoire [202] [201]. Ce composé possède une boucle de liaison flexible contenant deux cystéines dans la séquence MXCXXC, et un coude β de type II (XPGX) pour rigidifier le système. La comparaison de P^C avec son analogue linéaire P^L montre que l'insertion d'un coude β de type II entraine une certaine stabilisation des complexes formés. La formation de complexes monométalliques linéaires avec le cuivre(I) et le mercure(II) et de complexes de type 1:1 et 1:2 (M:L) pour les métaux zinc(II), plomb(II) et cadmium(II) a été observée [202]. Ce cyclodécapeptide, a montré de bons résultats vis à vis de la complexation du cuivre(I). La constante d'affinité de P^C pour ce cation métallique est proche de celle connue pour les métallochaperonnes. Il présente aussi une forte sélectivité par rapport au zinc, de dix ordres de grandeur [202]. Cela montre qu'une séquence d'acides aminés, comportant deux cystéines, présente une forte sélectivité Cu(I)/Zn(II) et une forte affinité pour Cu(I).
Ces résultats intéressants, nous ont conduits à envisager l'utilisation de peptides à deux cystéines comme chélateurs potentiels pour les maladies de type Wilson.
Comme évoqué précédemment, nous souhaitons élaborer un système comportant une partie chélatante et une partie ciblante. Pour ceci, une plate-forme comportant deux faces, l'une pour la chélation, l'autre pour le ciblage, semble judicieuse. Nous avons donc choisi d'utiliser un squelette peptidique, développé il y a quelques années par l'équipe de Mutter [204]. Cette structure peptidique est dérivée du modèle peptidique TASP (Template-Assembled Synthetic Peptide) [205] développé afin de mimer les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines naturelles [206] [207]. Par exemple, quatre hélices α ont été greffées sur

la plate-forme peptidique TASP pour modéliser les propriétés structurales de complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Cette plate-forme favorise alors les interactions possibles entre les quatre hélices.

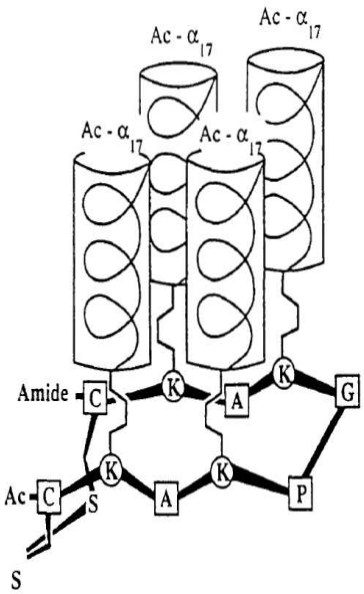


FIGURE 42 – Schématisation de la molécule TASP comportant quatre hélices α [207]

La structure RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template), dérivée du TASP, est une plate-forme rigide présentant deux faces indépendantes qui sont chimiquement modifiables pour greffer d'autres structures d'intérêt [208]. Grâce à ce squelette peptidique, il est possible d'obtenir un système comportant sur une face des ligands régiosélectifs d'un système biologique (ciblage) [209] [210] et sur l'autre face des unités fonctionnelles telles que des molécules d'intérêt biologique (composés cytotoxiques pour la thérapie cancéreuse [211] [212], vaccins [208]...) ou des « molécules sondes » pour l'imagerie [211] [213] (Fig 43).

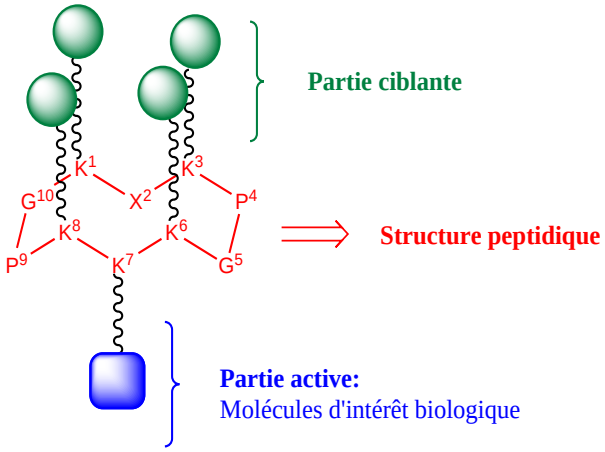


FIGURE 43 – Schématisation du RAFT

L'analyse structurale de cyclodécapeptides RAFT par des techniques de RMN en solution et par diffraction des rayons X ont permis de mettre en évidence la rigidité de ces systèmes [214] [215]. En effet, l'insertion de la séquence d'acides aminés XGPX permet la formation de deux coudes β de type II. La rigidité de ces deux coudes est accentuée par la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les acides aminés en position 3-6 et 1-8 (Fig 43). Tout ceci permet d'orienter les chaînes latérales des acides aminés, en position 2 et 7, dans la même direction de l'espace et celles en position 1, 3, 6 et 8 dans la direction opposée (Fig 43) [214].
En considérant cet arrangement, la position des cystéines du cyclodécapeptide P^C a donc été modifiée pour préférer les positions 2 et 7 pour pouvoir utiliser les positions 1, 3, 6 et 8 pour le ciblage cellulaire. Deux cyclodécapeptides ne comportant que la partie complexante (c'est à dire sans le système de ciblage), avec deux cystéines en position 2 et 7, ont été synthétisés afin de tester leur affinité et leur capacité de chélation vis à vis du cuivre(I) et des autres métaux d^{10}. En effet, le modèle RAFT est plus structuré et rigide que le modèle de chaperonne P^C précédemment élaboré : la présence des deux coudes β de type II contraint la conformation du squelette peptidique en feuillets β antiparallèles [214]. Cette rigidité peut être favorable ou défavorable à la complexation. L'orientation des deux cystéines va-t-elle favoriser, comme pour P^C, des complexes 1:1 pour le cuivre(I) et le mercure(II) et des complexes 1:1 et 1:2 pour les trois autres métaux ? Un tryptophane a été introduit dans la séquence peptidique, afin de pouvoir contrôler la concentration du peptide en solution, par absorption UV-visible à 280 nm ($\epsilon = 5690$ M^{-1} cm^{-1}). Exceptée la présence de deux cystéines en positions 2 et 7, des deux coudes β, et du tryptophane, les deux cyclodécapeptides sont différents. En effet, le peptide P^1 possède une face supérieure polaire (deux sérines et une arginine chargée > 0) tandis que P^2 est fortement chargé négativement (une aspartate et deux glutamates) apportant trois carboxylates (COO^-) à pH physiologique. La comparaison entre ces deux peptides permet d'évaluer l'influence des chaînes latérales sur la complexation (Fig 44).

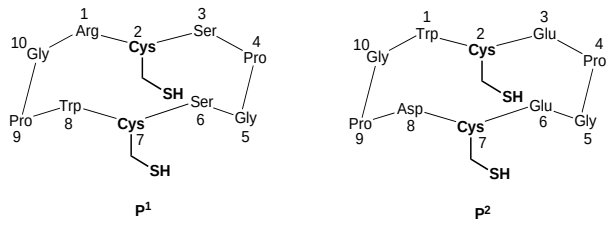


FIGURE 44 – Structure chimique des deux cyclodécapeptides P^1 et P^2.

6 Synthèse et caractérisation

6.1 Synthèse peptidique

La synthèse peptidique sur support solide a été introduite en 1963 par R.B. Merrifield [216]. Elle met en jeu un support constitué de petites billes d'un polymère (appelé résine) insoluble, inerte dans les conditions de la synthèse. En revanche, ces polymères ont la particularité de gonfler dans les solvants utilisés, ce qui assure une bonne diffusion des réactifs. Le premier acide aminé est fixé sur la résine par une liaison covalente. Le second acide aminé est alors ajouté en solution, souvent en large excès. Le produit de la réaction reste lié à la résine insoluble et est ainsi facilement séparé des excès de réactifs et des solvants par simple filtration et ainsi de suite. La liaison qui relie le peptide formé à la résine est alors rompue et le produit de la réaction récupéré dans le filtrat. La simplicité de cette méthode, qui facilite son automatisation, en a fait un outil précieux en chimie combinatoire classique comme en synthèse parallèle.

La synthèse, des cyclodécapeptides P^1 et P^2, a été réalisée dans des conditions classiques de synthèse peptidique en phase solide (SPPS) en utilisant la stratégie « Fmoc », c'est à dire que tous les acides aminés sont protégés en leur extrémité *N*-terminale par le groupement protecteur 9-fluorénylméthyloxycarbonyle (Fmoc). La stratégie « Fmoc »est la plus utilisée en SPPS depuis 25 ans [217]. Les raisons sont : la stabilité du groupement « Fmoc » en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) et sa déprotection en présence de pipéridine 20% dans la diméthylformamide (DMF) qui permet un suivit UV-visible de la synthèse peptidique (dosage de l'adduit dibenzofulvene-piperidine à 299 nm) [218].
Le couplage peptidique est effectué en présence de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), qui active la fonction acide carboxylique des acides aminés et facilite ainsi le couplage peptidique. Après chaque couplage d'un nouvel acide aminé, une étape d'acétylation est réalisée pour bloquer les fonctions amines qui n'auraient pas réagi. Cela permet d'arrêter toute chaîne peptidique parasite en croissance parallèle à celle souhaitée. La résine utilisée, lors de la synthèse, est la 2-chloro chlorotrityle [219]. Cette résine permet d'obtenir le peptide sous forme acide en son extrémité *C*-terminale [220] et permet de décrocher le peptide greffé dans des conditions douces à savoir TFA/DCM (v/v = 99/1) [221]. Ces conditions évitent la déprotection des chaînes latérales. Après avoir décroché le peptide, la cyclisation du peptide linéaire est réalisée, dans le dichlorométhane, en milieu homogène, à concentration diluée, afin d'éviter la formation d'oligomères. Les chaînes latérales sont ensuite déprotégées [222] et le cyclodécapeptide obtenu est purifié par HPLC préparative sur colonne RP-18. Les produits P^1 et P^2 ont été obtenus sous forme d'un solide blanc avec respectivement 19% et 53% de rendement.

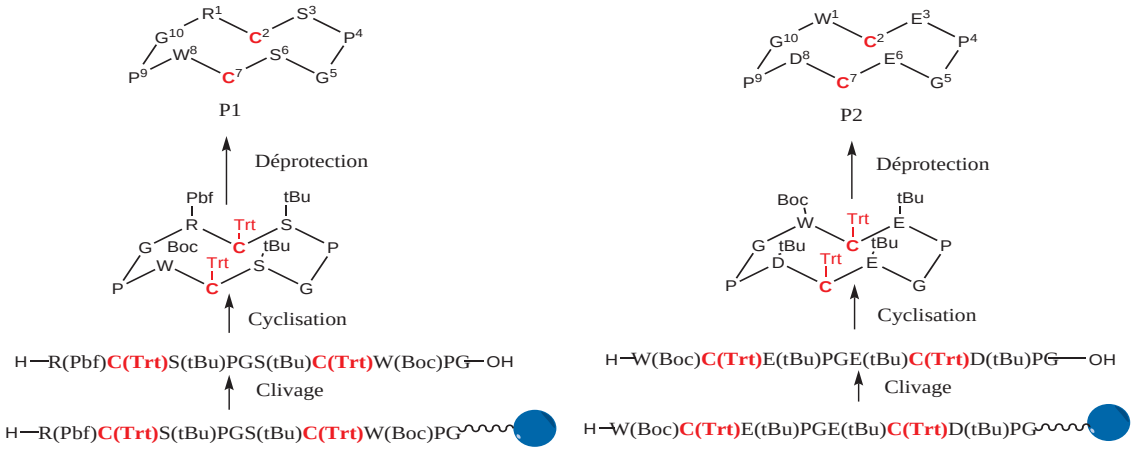


FIGURE 45 – Synthèse de P^1 et P^2

6.2 Préparation des solutions de peptides face à la sensibilité de ces derniers

Les peptides P^1 et P^2 comportent deux cystéines. Les fonctions thiols de ces dernières sont très sensibles à l'oxygène et s'oxydent facilement selon l'équation 13 :

$$2RSH + O_2 + 2H^+ + 2e^- = RS - SR + 2H_2O \tag{13}$$

Afin de palier au problème de l'oxydation des cystéines, nous avons travaillé en boîte à gants (BAG) sous atmosphère inerte. Toutes les solutions de peptides sont faites avec des solutions préalablement dégazées et préparées en BAG. Les manipulations ont été réalisées en BAG (dosages UV-visible), en cuves fermées maintenues sous atmosphère inerte ou en tube RMN hermétiques (fermés par une vanne young).
La concentration des solutions peptidiques a été déterminée en utilisant deux méthodes. La première méthode consiste à doser le tryptophane que l'on a inséré dans la séquence peptidique. Comme le tryptophane absorbe à 280 nm et a un coefficient d'extinction de 5690 M^{-1} cm^{-1}, par la loi de Beer Lambert, on peut remonter à la concentration en tryptophane qui est égale à celle en peptide. Or, nous venons de voir que les cyclodécapeptides sont sensibles à l'oxydation. Afin de vérifier que le peptide n'est pas oxydé, nous avons utilisé une deuxième méthode : la procédure d'Ellman [223] qui dose les thiols libres. On peut donc estimer de manière précise, la concentration en cystéines non oxydées. Pour ce faire, l'acide 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoïque (ou DTNB) est utilisé comme indicateur et comme réactif. Il va réagir avec les thiols libres selon la réaction suivante :

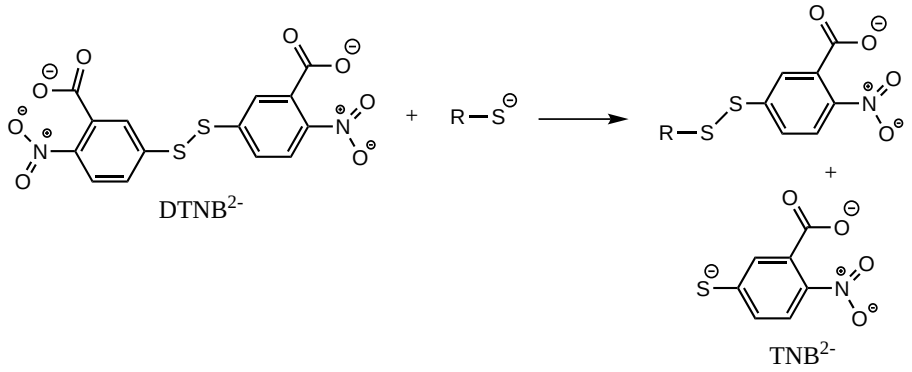


FIGURE 46 – Réaction entre le DTNB et un thiol

Le TNB^{2-} obtenu est de coloration jaune et absorbe dans le visible à 412 nm. Le coefficient d'extinction est de 14 150 M^{-1} cm^{-1}. On peut donc remonter à la concentration de TNB^{2-} en solution qui est égale à celle en thiols libres.
Ces deux techniques, nous permettent de connaître la concentration en peptide et de vérifier qu'il n'est pas oxydé.

6.3 Caractérisation par RMN

Les deux cyclodécapeptides ont été caractérisés par RMN du proton à 500 MHz. Les études RMN ont été réalisées dans l'eau légère (H_2O/D_2O)(v/v = 9/1) à 298 K en utilisant les méthodes de suppression du solvant, watergate [224] ou présaturation. Des spectres de RMN 2D de type COSY, TOCSY et ROESY ont été réalisés afin d'attribuer tous les protons. La séquence RMN COSY permet de visualiser les corrélations $^2J/^3J$ entre protons voisins. La séquence RMN TOCSY est une méthode qui permet de corréler les NH avec les $H_{\alpha,\beta,\gamma}$ d'un même acide aminé. Enfin, la séquence RMN ROESY nous renseigne sur les corrélations protons/protons dans l'espace. Cette expérience est une alternative à la séquence RMN NOESY pour mesurer des effets NOE (Nuclear Overhauser) quand $\omega\tau_c \approx 1$. L'intensité de ces corrélations est proportionnelle à la distance $(H\text{-}H)^6$ à travers l'espace. On peut ainsi obtenir les distances entre deux protons proches dans l'espace et obtenir la structure du cyclodécapeptide [225].

6.3.1 Spectre proton

Les spectres RMN, des deux cyclodécapeptides, mettent en évidence la présence de différentes formes isomères dont une prédomine à $\approx 70\%$ (Fig 47, zone des NH des acides aminés présence de pics parasites). Il y a donc un équilibre lent entre différentes conformations.

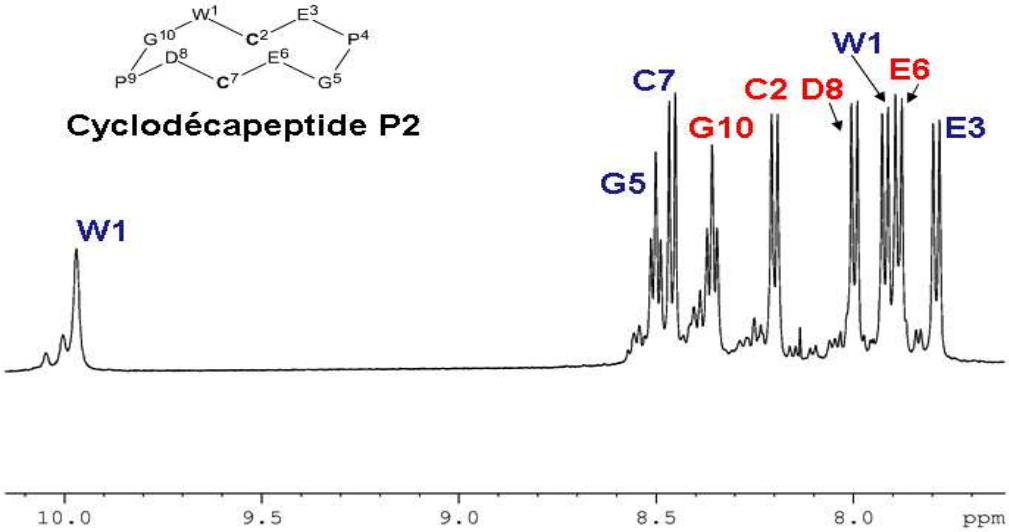


FIGURE 47 – Spectre RMN ^{1}H de $\mathbf{P}^2$, dans H_2O/ D_2O (v/v = 9/1), région des NH des acides aminés (7.7-10.3 ppm), à 298 K, 500 MHz

En effet, une étude en température, de 288 à 318 K, souligne une évolution des différentes formes minoritaires en fonction de cette dernière. De même, l'ajout progressif de mercure sur P^1, tend vers la formation d'un seul complexe (Fig 48). Les différentes conformations du peptide libre sont donc déplacées vers la formation d'un complexe unique de Hg^{2+}. Il est donc clair que les différentes espèces observées dans le spectre du peptide libre à 298 K correspondent à différentes conformations en équilibre lent à l'échelle de temps de la RMN.

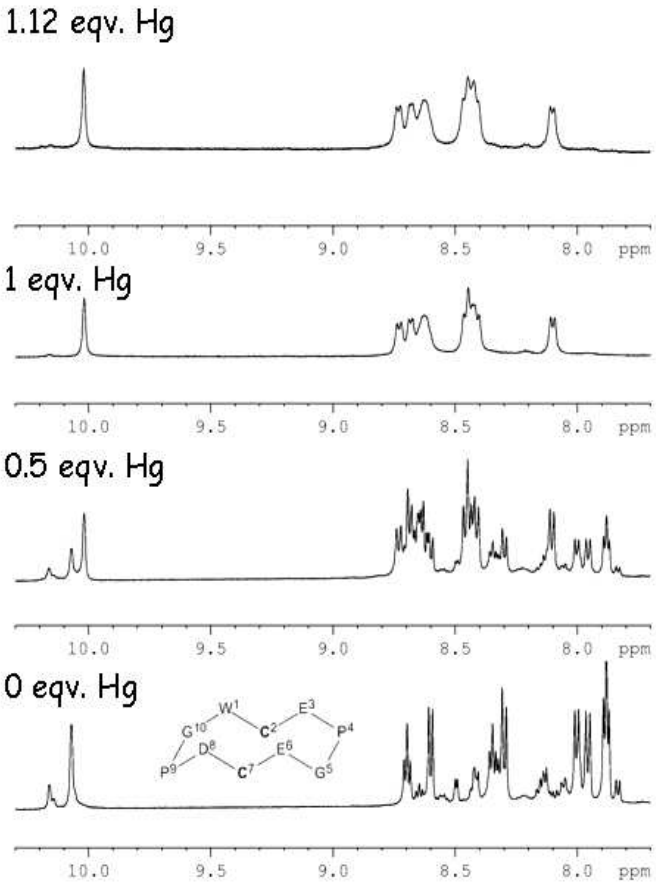


FIGURE 48 – Ajout de Hg^{2+} sur le cyclodécapeptide $\mathbf{P}^1$, H_2O/D_2O (v/v = 9/1), 298 K, 500 MHz

Les conformations minoritaires peuvent être attribuées à une isomérisation *cis*/*trans* de la liaison amide (Fig 49). Il existe en effet un équilibre connu *cis*/*trans* autour de cette liaison qui est lent et observable à l'échelle de temps de la RMN. La forme *trans* prédomine en raison de gènes stériques des chaînes latérales dans la forme *cis*.

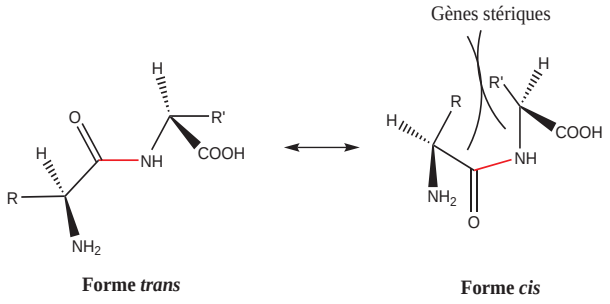


FIGURE 49 – Equilibre des deux formes *cis* et *trans* de la liaison amide au sein d'un dipeptide.

Il est connu que la proline peut favoriser la forme *cis* de la liaison amide. La présence de conformations *cis* minoritaires a d'ailleurs été proposée sur le modèle RAFT étudié par

RMN dans le DMSO d^6 [207]. Dans notre cas, cette hypothèse permettrait d'expliquer l'équilibre lent des conformations que l'on observe par RMN du proton.

6.3.2 Analyse de la conformation majoritaire par RMN 2D

La combinaison des différentes techniques, COSY, TOCSY et ROESY, a permis de différencier les acides aminés et d'attribuer l'ensemble des protons des deux peptides. Les déplacements chimiques de chaque proton sont donnés en partie expérimentale.

- *Liaisons trans au sein des deux cyclodécapeptides :*

Dans la conformation majoritaire de ces deux cyclodécapeptides, les liaisons amides entre les acides aminés X_3 et X_8 et la proline sont *trans* (Fig 50). Cette liaison *trans* est mise en évidence par une forte corrélation ROE entre les $H_{\delta 1,2}$ de la proline et les H_α des acides aminés en position 3 et 8. Les protons sont donc proches dans l'espace : distance $\leq$ 2.5 Å. Les distances sont calculées selon l'équation 14 (référence = 1.8 Å pour des protons géminés)(Table 21).

$$\frac{I^{H_1-H_2}}{I^{ref}} = \frac{r_{12}^6}{r_{ref}^6} \tag{14}$$

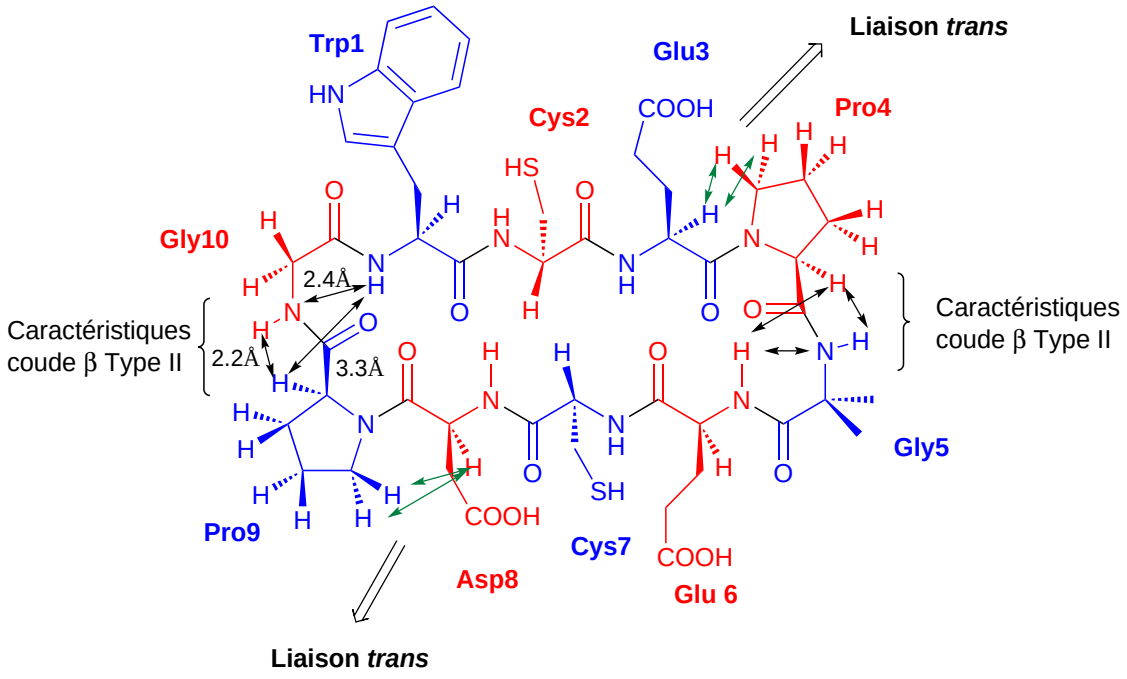


FIGURE 50 – Structure de P^2, schématisation des distances caractéristiques

- *Présence de deux coudes β de type II pour les deux peptides :*

Il a été montré que le motif XPGX dans ces cyclodécapeptides (P^C et autres modèles RAFT) donnait une structuration en coude β de type II [202] [215]. Cela se vérifie aisément

par des corrélations ROE fortes entre le NH(Gly) et le H_α(Pro), entre le NH(Gly) et le NH(Gly+1) et entre le NH(Gly+1) et H_α(Pro). Les distances entre ces protons sont relativement courtes (2.2 Å pour la première, 2.3 Å pour la deuxième et 3.3 Å pour la troisième). La figure 50 permet d'illustrer, sur le cyclodécapeptide P^2, les distances dont nous venons de parler. Ces corrélations sont bien présentes pour les deux peptides et les valeurs des distances entre le NH(Gly10) et (HαPro 9), de même qu'entre le NH(Gly5) et (HαPro 4) sont en accord avec ce que l'on attend, à savoir 2.2 Å, pour P^1 et P^2. La distance entre (HαPro 9) et le NH(X1) et entre (HαPro 4) et le NH(X6) sont quant à elles autour de 3.3 Å. Enfin, la troisième distance qui doit être autour de 2.4 Å est d'environ 2.8-2.9 Å pour P^1 et P^2. Nous pouvons donc conclure à la présence des deux coudes β au sein des deux squelettes peptidiques.

P^1			P^2		
H1	H2	d(H1,H2)Å	H1	H2	d(H1,H2)Å
Ser3 H_α	Pro4 $H_{\delta1}$	1.9	Glu3 H_α	Pro4 $H_{\delta1}$	2.1
Ser3 H_α	Pro4 $H_{\delta2}$	2.4	Glu3 H_α	Pro4 $H_{\delta2}$	2.5
Trp8 H_α	Pro9 $H_{\delta1}$	2.1	Asp8 H_α	Pro9 $H_{\delta1}$	2.2
Trp8 H_α	Pro9 $H_{\delta2}$	2.4	Asp8 H_α	Pro9 $H_{\delta2}$	2.4
Gly5 NH	Pro4 H_α	2.2	Gly5 NH	Pro4 H_α	2.2
Ser6 NH	Pro4 H_α	3.3	Glu6 NH	Pro4 H_α	3.3
Gly5 NH	Ser6 NH	2.8	Gly5 NH	Glu6 NH	2.8
Gly10 NH	Pro9 H_α	2.2	Gly10 NH	Pro9 H_α	2.2
Arg1 NH	Pro9 H_α	3.5	Trp1 NH	Pro9 H_α	3.3
Gly10 NH	Arg1 NH	2.8	Gly10 NH	Trp1 NH	2.9

TABLE 21 – Distances H-H courtes, mesurées par corrélations en ROESY pour les cyclodéapeptides P^1 et P^2 (erreur 15%)

- *Mesures des cœfficients de température : Présence de liaisons hydrogènes ?*

Il a été montré qu'il existe une corrélation directe entre l'évolution du déplacement chimique d'un NH, en fonction de la température, et l'implication de ce groupe dans une liaison hydrogène intramoléculaire [226] [227] [228] [229]. En effet, un NH impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire est moins labile qu'un NH libre, et s'échange plus difficilement avec le solvant. Il est donc moins sensible aux variations de température. Si on trace le déplacement chimique des NH en fonction de la température, on obtient une droite de coefficient directeur $\Delta\delta$ppm /ΔT, appelé « coefficient de température ». Il a été montré que pour un coefficient de température, en valeur absolue, inférieur à 3-4 ppb/°C, il existe une liaison hydrogène intramoléculaire et que pour les valeurs supérieures, le NH n'est pas lié par liaison hydrogène intramoléculaire [226] [230] [231] [232].
Des liaisons hydrogènes entre les acides aminés 6 et 3 et, 1 et 8 (Fig 50) ont été mises en évidence dans des RAFT en solution dans le DMSO d^6. La formation de ces liaisons

est favorisée par la présence des deux coudes β de type II. Ces liaisons hydrogènes intramoléculaires renforcent la rigidité du RAFT [214]. Les données obtenues pour les peptides P^1 et P^2 dans l'eau sont reportées table 22.

P^1		P^2	
	$\lvert\Delta\delta$ppm $/\Delta T\rvert$ (ppb/K)		$\lvert\Delta\delta$ppm $/\Delta T\rvert$ (ppb/K)
Gly5(NH)	8.6	Gly5(NH)	7.2
Cys2(NH)	7.8	Cys7(NH)	7.7
Gly10(NH)	8.6	Gly10(NH)	6.9
Cys7(NH)	9.0	Cys2(NH)	6.2
Trp8(NH)	6.5	Asp8(NH)	6.3
Arg1(NH)	4.8	Trp1(NH)	5.0
Ser(NH)	5.2	Glu6(NH)	3.5
Ser(NH)	4.9	Glu3(NH)	6.0

TABLE 22 – Coefficient de température des peptides P^1 et P^2, H_2O/D_2O (v/v = 9/1), 500 MHz, 278 à 318 K

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur l'existence de liaisons hydrogènes au sein de ces deux cyclodécapeptides (Table 22). Il semble donc que P^1 et P^2 soient des peptides moins rigides que ceux décrits par Dumy et coll. dans le DMSO [214] lesquels possèdent des groupements protecteurs très encombrants. Les peptides P^1 et P^2, bien qu'étant structurés dans l'eau par la présence des deux coudes β, ne montrent pas de liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes au sein de ces coudes.

Nous avons pu caractériser entièrement la forme majoritaire *trans* des deux cyclodécapeptides P^1 et P^2. Les formes minoritaires n'ont pu être caractérisées en raison de leur faible intensité par RMN proton.

7 Complexation et efficacité de ces peptides

Dans cette partie, nous allons discuter de l'influence de la position des deux cystéines sur l'affinité vis à vis des métaux d^{10}. Nous analyserons aussi le rôle de la rigidité du peptide sur la stabilité des complexes (présence des deux coudes). Enfin, nous discuterons l'influence des chaînes latérales de la face supérieure sur la formation des complexes.

7.1 Formation d'un complexe de type CuP

7.1.1 Stabilité du cuivre(I) en solution aqueuse

Toutes les études de complexation des différents chélateurs vis à vis du cuivre(I) ont été réalisées en solution aqueuse. Or, nous avons vu que le cuivre(I) se dismute dans l'eau et est sensible à l'oxygène. Pour éviter l'oxydation par O_2, nous avons préparé toutes les solutions en BAG. Les études spectroscopiques ont, elles aussi, été réalisées en boîte à gants ou sous atmosphère inerte.
Il existe différents moyens qui permettent de stabiliser le cuivre au degré d'oxydation +I en solution aqueuse. Une des méthodes consiste à préparer une solution mère de cuivre(I) dans une solution d'acide concentrée, mais cela peut perturber le pH au cours du dosage qui est réalisé à pH physiologique. Un autre moyen est d'utiliser un réducteur comme le glutathion (GSH). Ce dernier va maintenir le cuivre au degré d'oxydation +I en réduisant le cuivre(II) qui se forme. Or, le GSH est connu comme étant un chélateur du cuivre(I) dans les cellules, il le complexe par l'intermédiaire de ces fonctions thiols [233]. C'est donc un compétiteur fort vis à vis des cyclodécapeptides. La méthode que nous avons sélectionnée consiste à utiliser un ligand du cuivre(I) qui le complexe faiblement et le stabilise au degré +I. Un ligand connu possédant ces caractéristiques est l'acétonitrile [234]. En effet, ce ligand complexe le cuivre(I) sous forme $Cu(AcN)_2^+$ et $Cu(AcN)_3^+$ (espèces prépondérantes en solution pour $[AcN]_x = 2$ M). Les constantes globales de formation de ces espèces sont respectivement de $\log\beta = 4.02$ et 4.30 [234]. Ces constantes sont basses comparées à celles obtenues pour P^C : l'acétonitrile est donc un compétiteur très faible pour les cyclodécapeptides P^1 et P^2. Nous avons donc travaillé avec 10% en volume d'acétonitrile en plus du milieu tamponné pour toutes les manipulations.

7.1.2 Etudes spectroscopiques

Différentes techniques spectroscopiques ont été utilisées pour caractériser les complexes de Cu^+.
Pour les études spectroscopiques UV-visible et de dichroïsme circulaire, les solutions de peptide ont été préparées en BAG dans un mélange tampon phosphate 20 mM/Acn (v/v = 90/10), à pH = 7.4.

- *Spectroscopie UV-Visible :*

Nous avons vu, au cours de la première partie du manuscrit, que la bande à transfert de charge $S^- \rightarrow Cu^+$ est visible en spectroscopie UV-visible autour de 262 nm [159]. Il est donc possible de suivre l'évolution de cette bande en fonction des ajouts de cuivre(I) et de mesurer son cœfficient d'extinction molaire (ϵ).
Au cours des dosages, réalisés sur P^1 et P^2, nous observons la formation d'une bande à

263-264 nm qui correspond à la bande LMCT $S^- \rightarrow Cu^+$. La croissance de la bande LMCT à 263-264 nm est linéaire et a une rupture à 1 équivalent de cuivre(I) pour P^1 et P^2 (Fig 51). La mesure du cœfficient d'extinction molaire pour la bande LMCT à 263-264 nm est de 7620 et 7640 M^{-1} cm^{-1} pour P^1 et P^2. Il a été montré que la bande LMCT à 262 nm avait un cœfficient d'extinction molaire de $\approx$ 7000 M^{-1} cm^{-1} par Cu(I) lié [164].

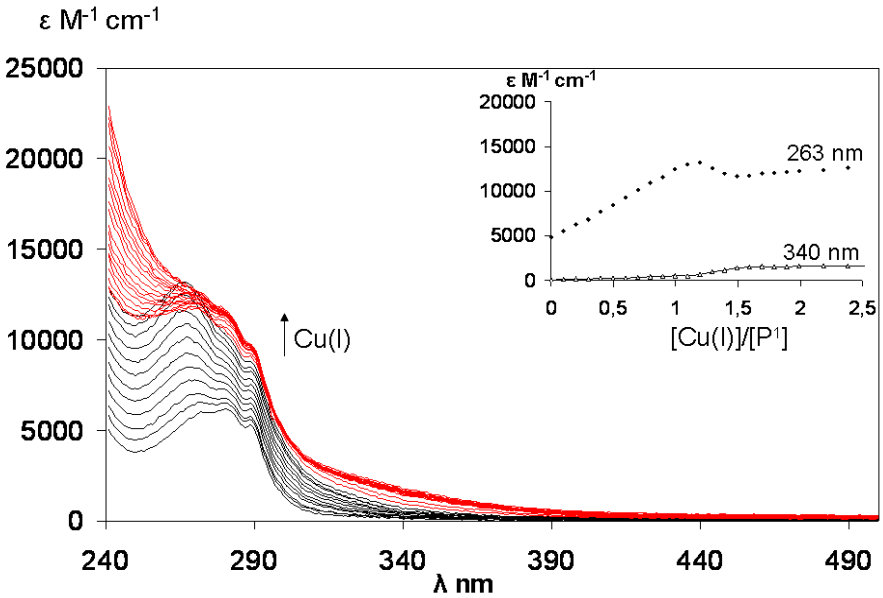


FIGURE 51 – Dosage par spectroscopie UV-visible de $\mathbf{P}^1$ par ajout de cuivre(I), pH 7.4, tampon phosphate 20 mM/acétonitrile (v/v = 9/1), 298 K

Une absorption significative à 340-350 nm n'apparait qu'après 1 équivalent de Cu^+. Il a été montré que cette bande correspondaient à des interactions Cu-Cu au sein d'un système polynucléaire [159] [163]. L'évolution de cette bande pour P^1 et P^2 va donc dans le sens de la formation d'un complexe 1:1 puisqu'elle est absente avant un équivalent de Cu^+ et commence à évoluer en excès de cuivre. Nous n'avons donc pas de formation de système polynucléaire entre 0 et 1 équivalent de cuivre(I).

- *Dichroïsme Circulaire (CD) :*

Les cyclodécapeptides comportent des acides aminés de configuration « L », la méthode spectroscopique de dichroïsme circulaire peut être utilisée afin de visualiser les caractéristiques de complexation du système CuP. En effet, cette technique est essentiellement utilisée en chimie de coordination pour établir des corrélations empiriques entre les données mesurées et la structure de l'environnement chiral d'un cation métallique. Le dichroïsme circulaire, défini comme la différence d'absorption entre les lumières polarisées circulaires gauche et droite (ΔA), est relié par la relation 15 à l'ellipticité (θ). La loi de Beer Lambert peut être utilisée pour calculer une différence entre les cœfficients d'extinc-

tion molaire ($\Delta\epsilon$ pour les deux lumières polarisées circulairement (relation 16)).

$$\Delta A = A_l - A_r = \frac{\theta[millideg]}{32982} \tag{15}$$

$$\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r = \frac{\Delta A}{Cl} \tag{16}$$

Le spectre dichroïque du cyclodécapeptides P^1 présente une bande de structure due au peptide à l'état libre qui sature à la concentration à laquelle nous travaillons (100 μM). Négative sans cuivre, elle évolue positivement et linéairement jusqu'à un équivalent d'ion métallique. Le spectre présente deux autres bandes à 262 nm et 288 nm caractéristiques de la formation d'un complexe de cuivre(I) : ce sont deux bandes LMCT $S^- \rightarrow Cu^+$ [159] [163]. La bande à 262 nm est positive et la bande à 288 nm est négative. Les deux progressent linéairement jusqu'à 1 eqv. de cuivre(I). La présence d'un point isodichroïque à 279 nm met en évidence la formation d'une seule espèce de 0 à 1 eqv. de cuivre en équilibre avec le peptide libre. Passé un équivalent d'ion métallique, les spectres évoluent différemment et les bandes sont plus faibles (Fig 52).

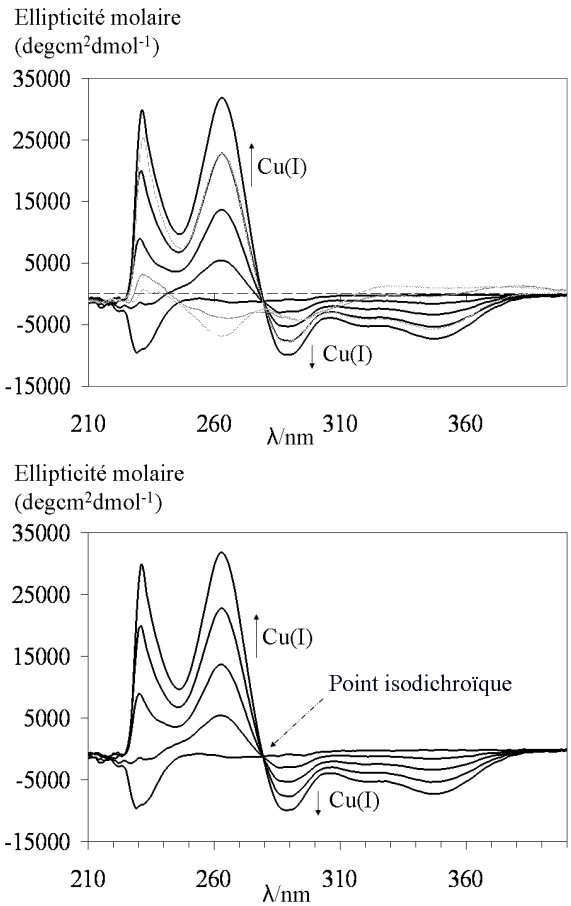


FIGURE 52 – Spectre de dichroïsme circulaire du dosage de P^1 par ajout de Cu^+, pH 7.4, tamp. phos. 20 mM-Acn (v/v = 9/1) ; De 0 à 2 eqv de Cu(I) (en haut) ; De 0 à 1 eqv. (en bas)

Le spectre de dichroïsme circulaire, réalisé sur P^2, présente lui aussi des bandes de structures à (+)212 et (+)229 nm et deux bandes LMCT à (+)262 et (-)289 nm qui évoluent linéairement jusqu'à un équivalent de cuivre(I). En excès d'ion métallique, le spectre change tout comme P^1.

Les résultats obtenues par les deux méthodes spectroscopiques vont dans le sens de la formation d'une espèce mononucléaire de type CuP pour les cyclodécapeptides P^1 et P^2. La présence d'un point isodichroïque à 279 nm observé pour P^1, nous informe que le peptide libre se transforme en une seule espèce de type CuP. Le comportement observé pour ces deux cyclodécapeptides est très similaire à celui de P^C [201]. En effet, le spectre UV-visible, de ce peptide, présente une bande LMCT à 261 nm croissante jusqu'à un équivalent de cuivre(I). Le coefficient d'extinction mesuré est de 8800 M^{-1} cm^{-1}, valeur similaire avec celles obtenues pour P^1 et P^2. La formation du complexe mononucléaire CuP^C a été confirmée par mesure du cœfficient de diffusion du complexe par RMN des gradients de champs pulsés: ce dernier est en accord avec un complexe de type 1:1. Cette technique n'a pu être utilisée pour les cyclodécapeptides P^1 et P^2, puisque aux concentrations nécessaires pour mesurer un coefficient de diffusion (de 1 à 2 mM), les complexes CuP^1 et CuP^2 précipitent. Cependant, les complexes CuP^1 et CuP^2 ont pu être mis en évidence par spectrométrie de masse.

- *Spectrométrie de masse (ES-MS) :*

Les solutions de peptides ont été préparées en milieu tampon acétate d'ammonium à pH 7.0, avec une concentration en peptide de 100 µM. Afin de minimiser au maximum le temps de contact avec l'oxygène, les complexes ont été préformés en boîte à gants en piluliers fermés et ont été analysés rapidement dès leur sortie de la BAG. Notons tout de même qu'une oxydation du peptide dans la source peut être observée.

Le complexe CuP^1 désorbe bien entre 0 et 1 eqv. de Cu(I) (1091.25, $[P^1+Cu-2H]^-$) (Fig 53). En excès d'ion métallique, d'autres espèces de plus hautes nucléarités sont détectées comme $[P^1+2Cu-3H]^-$ à 1155.17 et $[2\ P^1+4Cu-2H]^{2+}$ à 1157.2. Une tendance similaire est observée avec le peptide P^2. Cependant, la présence des trois acides carboxyliques sur une des faces du RAFT, entraîne la formation d'adduits sodium et potassium et rend le spectre de masse compliqué.

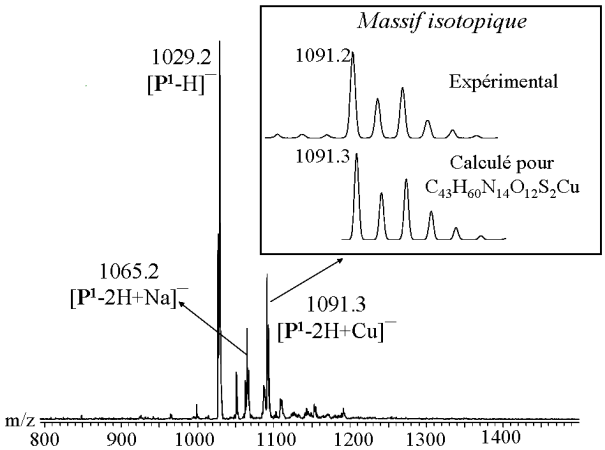


FIGURE 53 – Complexe CuP^1 observé en ES-MS en mode négatif pour un équivalent de Cu(I) dans $AcONH_4$ 20 mM, pH 7

Pour conclure, ces études spectroscopiques mettent en évidence la formation d'un complexe mononucléaire de type CuP entre 0 et 1 eqv. de cuivre(I). Comme on pouvait s'y attendre, les deux cyclodécapeptides P^1 et P^2 se comportent comme P^C vis à vis du cuivre et forme un complexe bicoordiné. Les caractéristiques spectroscopiques de ces complexes sont rassemblées dans la table 23.

	P^1	P^2	P^C
Données UV, λ nm	263	264	261
$\Delta\epsilon$ M^{-1} cm^{-1}	7620	7640	8800
Données CD λ nm	(+)262, (-)288	(+)262, (-)289	

TABLE 23 – Données spectroscopiques pour P^1, P^2 et P^C, $\Delta\epsilon = \epsilon(MP)$ - $\epsilon(P)$

7.1.3 Affinité des peptides P^1 et P^2 pour le cuivre(I)

Afin de déterminer l'affinité de ces peptides vis à vis du cuivre(I), nous avons utilisé un compétiteur dont l'affinité pour ce cation métallique est connue. Ce compétiteur est la bathocuproïne disulfonate (Na_2BCS) (Fig 54). Notons que l'affinité mesurée correspond à une constante apparente à pH = 7.4, $\log\beta_{11}^{pH=7.4}$.

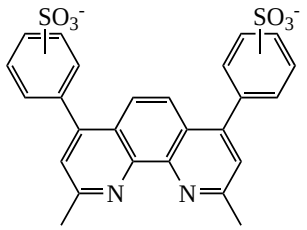


FIGURE 54 – Structure de la bathocuproïne disulfonate

Il a été démontré que ce composé forme avec le cuivre(I) un complexe stable de stœchiométrie 1:2, $Cu(BCS)_2^{3-}$ selon l'équation 17 [35]. Ce complexe absorbe dans le visible à 483 nm (coloration orangée) avec un coefficient d'extinction de 13 300 M^{-1} cm^{-1}. La constante d'affinité du BCS pour Cu(I) est log $\beta_{12} = 19.8$.

$$Cu^+ + 2BCS^{2-} = Cu(BCS)_2^{3-} \tag{17}$$

La compétition entre les cyclodécapeptides et le BCS, selon l'équation 18, est suivie par spectroscopie UV-visible et réalisée en BAG.

$$CuP + 2BCS^{2-} = P + Cu(BCS)_2^{3-} \tag{18}$$

Les échantillons ont été préparés en milieu phosphate 20 mM, pH 7.4, 10% AcN. Le complexe CuP est préformé ([P]≈ 50 μM, 0.8-0.9 eqv. de Cu(I)) et 2 eqv. de BCS sont ensuite ajoutés. L'absorbance est mesurée à 483 nm jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique. Le BCS est ensuite ajouté jusqu'au déplacement total du cuivre(I) du peptide vers le BCS. Il est possible d'évaluer le pourcentage de cuivre(I) que le BCS déplace au cours du dosage par la relation 19 :

$$\%Cu_{déplacé} = \frac{[Cu(BCS)_2^{3-}]}{[Cu]_0} \times 100 = \frac{\frac{A^{483nm}}{\epsilon l}}{[Cu]_0} \times 100 \tag{19}$$

Connaissant les concentrations initiales et au cours du dosage en peptide, en cuivre et en BCS, on peut donc déterminer la constante d'affinité du complexe CuP.
Ainsi, par la loi de Beer Lambert, on obtient la concentration en $Cu(BCS)_2^{3-}$. Celle du BCS est obtenu par la relation 20 :

$$[BCS] = [BCS]_0 - 2[Cu(BCS)_2^{3-}]) \tag{20}$$

Grâce à la constante d'affinité du complexe $Cu(BCS)_2^{3-}$, on peut donc remonter à la concentration en cuivre libre :

$$[Cu]_{libre} = 10^{19.8} \times \frac{[Cu(BCS)_2^{3-}]}{[BCS]^2} \tag{21}$$

Pour un complexe de stœchiométrie 1:1, la concentration en complexe CuP dans la solution est ensuite calculée :

$$[CuP] = [Cu]_0 - [Cu(BCS)_2^{3-}] - [Cu]_{libre} \tag{22}$$

et donc la concentration en peptide libre vaut :

$$[P]_{libre} = [P]_0 - [CuP]. \tag{23}$$

Pour finir, la constante d'affinité apparente β_{11} est donc égale à :

$$\beta_{11}^{pH=7.4} = \frac{[CuP]}{[Cu][P]} \tag{24}$$

Les constantes d'affinités apparentes obtenues sont répertoriées table 24.

	P^1	P^2	P^C
$\log \beta_{11}^{pH=7.4}$ CuP	16.7(1)	15.5(1)	17.4(1)

TABLE 24 – Constantes apparentes ($\log\beta_{app}^{pH=7,4}$), à pH 7.4, 298 K, tamp. phos. 20 mM/ Acn (v/v = 9/1)

Les deux cyclodécapeptides P^1 et P^2 ont des affinités, à pH = 7.4, globalement plus faible que celle obtenue avec P^C. Cette différence peut s'expliquer par la présence des deux coudes β de types II présents dans la structure. En effet, pour P^C, il n'y a qu'un seul coude β, et la boucle de liaison est flexible. Ainsi lors de la complexation du cation métallique, cette boucle plus souple peut s'adapter à la coordination. Par contre, dans les systèmes plus rigides (deux coudes β, deux cystéines orientées dans la même direction), la conformation particulière du RAFT impose un arrangement donné des deux cystéines qui semble moins favorable à la complexation du cuivre(I).
La différence que l'on observe entre P^1 et P^2 peut être interprétée à la présence des trois fonctions acides carboxyliques. A pH = 7.4, ces trois acides sont déprotonnés et donc chargés négativement. Il y a donc une répulsion de charge entre les trois groupes carboxylates qui peut modifier la structure du RAFT et ainsi déstabiliser le complexe.

Malgré une baisse de l'affinité due à la rigidité du système RAFT et aux positions 2 et 7 des cystéines, nous observons bien la formation du complexe CuP pour 1 eqv. de Cu(I). Ces chélateurs semblent donc intéressants pour être fonctionnalisés afin de pouvoir cibler les cellules hépatiques.

7.2 Complexes avec les ions divalents

7.2.1 Etudes spectroscopiques

Nous avons vu (partie 3.2.1) que les bandes LMCT $S^- \rightarrow M^{II}$ sont observables par spectroscopie UV-visible. On peut donc suivre l'évolution de ces bandes avec l'ajout du cation métallique [157].

Spectroscopie UV-visible :

- *Complexation du mercure(II) :*

Les dosages UV-visible réalisés par ajout du mercure(II), mettent en avant un comportement similaire pour les deux cyclodécapeptides P^1 et P^2. La bande LMCT observée à 210 nm croissent jusqu'à saturer à 1 eqv. de mercure(II). Les valeurs de cœfficients d'extinction molaire de la bande LMCT sont respectivement de 13 600 et 18 600 M^{-1} cm^{-1}.

Ces valeurs sont en accord avec celle mesurée pour le cyclodécapeptide P^C (12 500 M^{-1} cm^{-1}). Il a été démontré par RMN du ^{199}Hg et par mesure des cœfficients de diffusion par RMN en gradients de champs pulsés que le cyclodécapeptide P^C forme essentiellement un complexe mononucléaire de stœchiométrie 1:1 avec l'ion Hg^{2+}. Cependant, afin de vérifier si le mercure possède un environnement de type HgS_2 ou de type Hg_3, l'absorbance est mesurée à 295 nm : $\epsilon = 458$ et 375 M^{-1} cm^{-1} respectivement pour P^1 et P^2. Ces valeurs correspondent à un complexe de type HgS_2 en accord avec les données décrites sur les complexes $Hg(SEt)_2$ et $Hg(SPr^i)_2$ [186]. Toutes ces données vont dans le même sens, c'est à dire la formation d'un complexe HgP pour 1 eqv. d'ion métallique (Fig. 55).

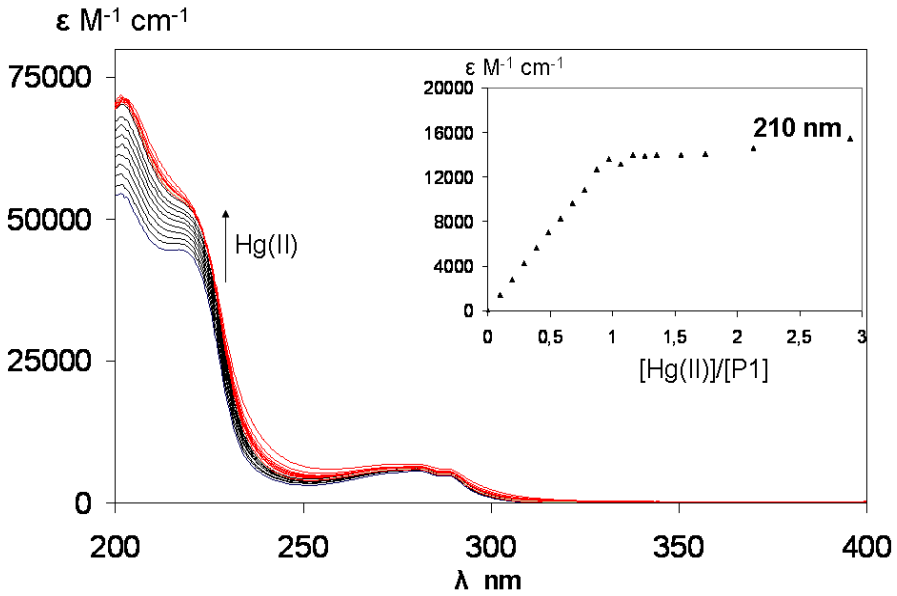


FIGURE 55 – Dosage par spectroscopie UV-visible de $\mathbf{P^1}$ par ajout de mercure(II), pH 7.4, tampon phosphate 20 mM, 298 K

Ces deux complexes ont été caractérisés en spectrométrie de masse $[P^1+Hg-H]^+ = 1231.5$ et $[P^2+Hg-3H]^- = 1272.3$ (Table 25, Fig 56).

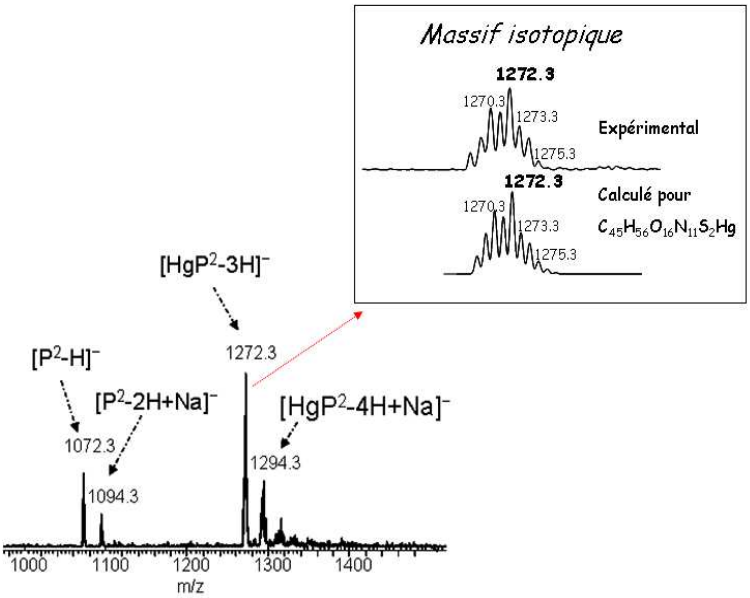


FIGURE 56 – Spectre ES-MS du complexe HgP^2, tamp. acétate d'ammonium 20 mM, pH = 7.0

- *Complexation du cadmium(II) :*

Les spectres UV-visible réalisés par l'ajout de l'ion métallique Cd(II), montrent des bandes LMCT respectivement à 230 et 220 nm pour P^1 et P^2. Cette bande, observée pour P^1, croit et sature à 0.5 eqv. de Cd^{2+} alors que pour P^2 cette bande présente une rupture molle à 1 eqv. de Cd^{2+} (Fig 57). La mesure des coefficients d'extinction molaire à 230 nm sont respectivement de 21 000 M^{-1} cm^{-1} (rupture à 0.5 eqv : ϵ^{230nm} = 10 500/0.5) et 10 000 M^{-1} cm^{-1} pour P^1 et P^2. Si on considère une valeur de ϵ = 6000 M^{-1} cm^{-1} par cystéines liées [198], on obtient deux cystéines liées au Cd(II) pour P^2 et quatre cystéines liées au Cd(II) pour P^1. Ces données démontrent la formation d'un complexe de type CdP pour P^2 et de type $Cd(P)_2$ pour P^1. La comparaison des coefficients d'extinction molaire obtenus avec ceux connus de P^C vont dans le même sens à savoir CdS_4 pour P^1 et CdS_2 pour P^2. La différence de comportement observée peut s'expliquer par la différence de charge sur la face supérieure des peptides P^1 et P^2. En effet, le premier possède une face supérieure hydrophile peu chargée et le second une face supérieur chargée nétgativement.
La présence de ces deux complexes a été mise en évidence par spectrométrie de masse : $[CdP^2\text{-}3H]^-$ = 1184.2 et $[Cd(P^1)_2\text{-}4H]^{2-}$ = 1085.3 (Table 25).

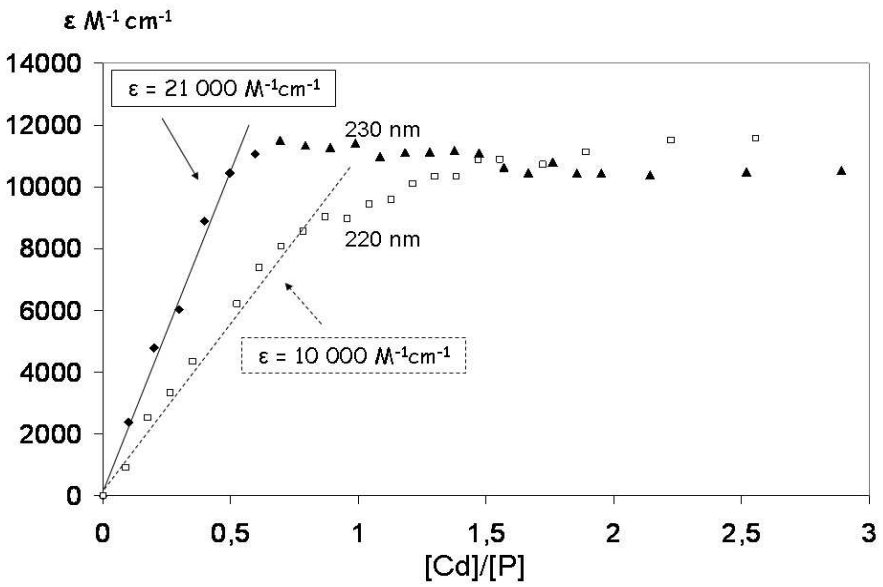


FIGURE 57 – Evolution de la bande LMCT $S^- \rightarrow Cd^{2+}$ lors du dosage de P^1 et P^2 par Cd(II) (0-3 eqv) en tampon phosphate 20 mM, pH = 7.4, 298 K (Bande à 230 nm P^1, bande à 220 nm P^2)

MP^1	m/z	MP^2	m/z
$[P^1+H]^+$	1031.8	$[P^2-H]^-$	1072.3
$[P^1+2H]^{2+}$	516.4	$[P^2-2H]^{2-}$	535.8
$[HgP^1-H]^+$	1231.5	$[HgP^2-3H]^-$	1272.3
$[HgP^1]^{2+}$	616.5	$[HgP^2-4H]^{2-}$	635.7
$[PbP^1-H]^+$	1237.5	$[PbP^2-3H]^-$	1278.2
$[PbP^1]^{2+}$	619.4	$[PbP^2-4H]^{2-}$	638.5
$[Pb(P^1)_2-3H]^-$	2265.1	-	-
$[Pb(P^1)_2-4H]^{2-}$	1235.5	-	-
$[Cd(P^1)_2-3H]^-$	2171.2	$[CdP^2-3H]^-$	1184.2
$[Cd(P^1)_2-4H]^{2-}$	1085.3	$[CdP^2-4H]^{2-}$	591.5
$[Zn(P^1)-H]^+$	1093.3	$[ZnP^2-3H]^-$	1134.1
$[Zn(P^1)-3H]^-$	1091.3	$[ZnP^2-4H]^{2-}$	566.5
$[Zn(P^1)]^{2+}$	547.5		

TABLE 25 – Ions détectés par spectrométrie de masse des complexes de P^1 et P^2 avec les cations divalents, tamp. acétate d'ammonium 20 mM, pH 7

- *Complexation du plomb(II) :*

Comme le plomb(II) précipite en tampon phosphate, les solutions ont été préparées en tampon Bis-Tris 20 mM à pH 7.0. Ce tampon est utilisé afin d'éviter l'hydrolyse du plomb(II) et la précipitation de l'espèce $Pb(OH)_2$ [180]. La concentration en peptide pour les dosages

au plomb(II) est de 90 μM car la bande LMCT $S^- \rightarrow Pb^{2+}$ est de faible intensité.
Les dosages UV-visible obtenus par ajout de Pb(II) sur P^2, mettent en évidence une bande LMCT située à 310 nm qui croit jusqu'à 1 eqv. Le coefficient d'extinction correspondant est de 3500 M^{-1} cm^{-1}. Cette bande LMCT et la valeur des cœfficients d'extinction molaire correspondent à ceux obtenus pour le complexe PbP^C. Elles sont très similaires aux données spectroscopiques concernant les complexes de plomb dans les protéines à doigt de zinc où le plomb est coordiné par deux cystéines et deux histidines [180]. Nous avons donc la formation d'un complexe 1:1 de type PbS_2.
En ce qui concerne les dosages UV-visible réalisés par ajout de Pb(II) sur P^1, nous observons une bande dont le maximum d'absorption évolue de 338 nm (en début de dosage) à 320 nm (en fin de dosage). Il y a donc formation de deux espèces. La valeur des cœfficients d'extinction molaire des deux bandes sont respectivement de 3000 et 4000 M^{-1} cm^{-1} pour 320 et 338 nm (Fig 58). Ces valeurs sont comparables à celle obtenue pour P^C. Comme dans le cas de P^2, la bande LMCT à 320 nm correspond à un complexe 1:1 de type PbS_2. Par contre, la bande à 338 nm est similaire à un système de type PbS_3-PbS_4 que l'on rencontre dans les protéines riches en cystéines [180] [178] [181]. Nous avons donc formation de deux complexes successifs de type PbS_2 et PbS_4 ou PbS_3. La présence de ces complexes a été mise en évidence par spectrométrie de masse (Table 25).

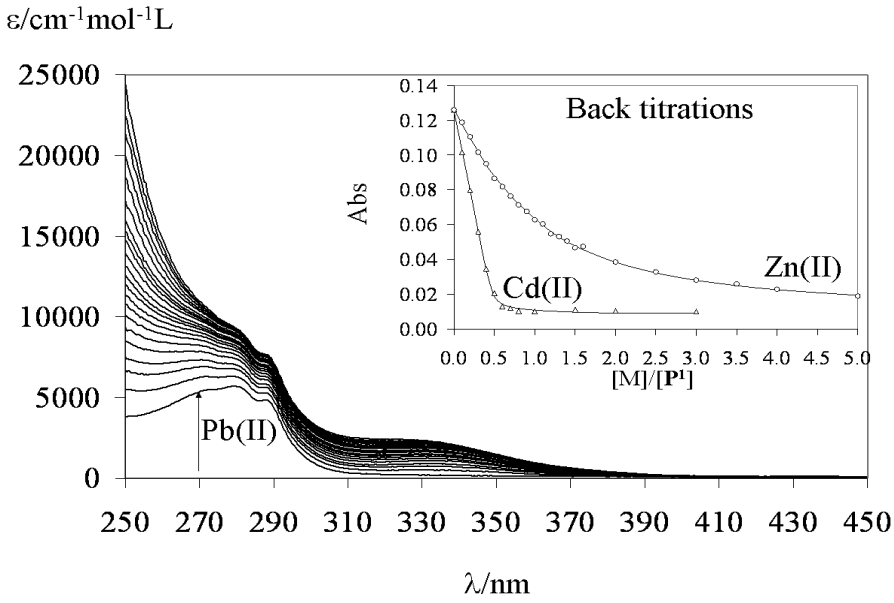


FIGURE 58 – Dosage UV de P^1 par Pb(II) (0-5 eqv) en tamp. Bis-Tris 20 mM, pH = 7 et dosage retour par Zn(II) et Cd(II) (en haut à droite), 298 K

L'ensemble des caractéristiques de spectroscopiques des complexes de P^1 et P^2 avec les ions divalents, sont reportées table 26.

		P^1		P^2		P^C	
		λ	$\Delta\epsilon$ M^{-1} cm^{-1}	λ	$\Delta\epsilon$ M^{-1} cm^{-1}	λ	$\Delta\epsilon$ M^{-1} cm^{-1}
1:1	HgP^a	210	13 600	210	18 600	220	12 500
		250	870	250	1500	250	1300
1:1	CdP^a	-	-	220	10 000	221	13 000
1:1	PbP^b	320	3000	310	3500	315	3100
1:2	$PbP_2{}^b$	338	4000	-	-	335	4000
1:2	$CdP_2{}^a$	230	21 000	-	-	240	25 000

TABLE 26 – Bandes LMCT caractéristiques $S^- \rightarrow M^{2+}$ pour P^1et P^2, ^{a}= tamp. phos. 20 mM, pH 7.4 ; ^{b} = tamp. Bis-Tris 20 mM pH 7. $\Delta\epsilon = \epsilon(MP) - \epsilon(P)$

Les résultats obtenus sont très similaires à ceux observés avec le peptide P^C avec cependant deux différences à noter : P^2 forme préférentiellement des systèmes MP où l'ion métallique acquiert une coordination de type MS_2 et P^1 a tendance à former des systèmes $M(P)_2$ où l'ion métallique possède un environnement de type MS_3-MS_4.

- *Analyse des bandes LMCT $S^- \rightarrow Pb^{2+}$ par le programme SPECFIT :*

Les constantes d'affinité apparentes à pH 7.4 des deux peptides vis à vis du plomb(II) ont été obtenues par analyse des dosages UV-visible de ces deux chélateurs par Pb^{2+} sous logiciel SPECFIT [235] [236] [237] [238]. Les données ont été traitées en prenant en compte toutes les espèces colorées. L'affinité connue du tampon Bis-Tris pour le plomb(II)($\log\beta_{11} = 4.32$ [239] [240] est alors prise en compte. Ceci a permis d'obtenir les constantes apparentes des complexes PbP ou PbP_2 (Table 27).
Ensuite, l'affinité de ces peptides pour le Cd(II) et le Zn(II) a été obtenue par dosage retour du complexe PbP préformé par les deux cations métalliques souhaités. On observe alors la bande LMCT $S^- \rightarrow Pb^{2+}$ à 320 nm qui décroit lors de l'ajout de cation métallique. Ces dosages retour confirment une rupture à 0.5 eqv lors de l'ajout de Cd(II) sur P^1 et une rupture à 1 eqv. (Fig 58) pour P^2. De la même manière, les données obtenues ont été traitées sous le logiciel SPECFIT en prenant en compte toutes les espèces colorées à savoir le complexe PbP formé, le complexe Pb(Bis-Tris) et selon le cas, le complexe Cd(Bis-Tris) ou Zn(Bis-Tris) dont les constantes sont elles aussi connues ($\log\beta_{11} = 2.47$ (Cd),$\log\beta_{11} = 2.38$ (Zn) [239] [240]). Nous obtenons ainsi les constantes apparentes $\log\beta$ à pH = 7.4 des complexes CdP, CdP_2 et ZnP (Table 27). Cette méthode a été précédemment décrite par Godwin et coll. afin d'évaluer l'affinité de la protéine GATA envers le plomb(II) et le zinc(II) [178].

- *Estimation de l'affinité des deux peptides pour le mercure(II)*

Afin d'estimer l'affinité du mercure(II) pour ces deux cyclodécapeptides, le complexe CuP a été préformé et dosé par l'ion Hg^{2+}. Nous observons alors par spectroscopie UV-visible

la décroissance de la bande LMCT $S^- \rightarrow Cu^+$. Nous suivons la réaction :

$$CuP + Hg = HgP + Cu \tag{25}$$

La constante apparente pour ce cation métallique n'est pas accessible directement, l'ajout de Hg^{2+} sur les complexes préformés de cuivre(I) permet de l'estimer. Nous observons, pour l'ajout d'un équivalent d'ion Hg^{2+}, une disparition totale de la bande LMCT $S^- \rightarrow Cu^+$. Par rapport aux données observées, si on estime que 3% du cuivre reste complexé, la constante apparente de HgP est supérieure à $\log\beta_{Cu} + 3$ (Table 27).

M	$\log\beta_{pq}$	P^1	P^2	${}^aP^C$
Pb(II)	$\log\beta_{11}$	7.4(2)	7.1(1)	8.0(1)
	$\log\beta_{12}$	11.9(5)	-	12.5(7)
Cd(II)	$\log\beta_{11}$	-	7.0(1)	9.2(1)
	$\log\beta_{12}$	15.0(2)	-	15.6(1)
Zn(II)	$\log\beta_{11}$	6.6(1)	5.9(1)	6.8(2)
Hg(II)	$\log\beta_{11}{}^b$	> 18.7	> 17.5	> 19.4
Cu(I)	$\log\beta_{11}{}^b$	16.7(1)	15.5(1)	17.4(1)

TABLE 27 – Constantes apparentes $\log\beta$ à pH = 7.0 pour les complexes avec P^1, P^2 et P^C ($^b = \log\beta$ mesurées à pH 7.4), ^{a} = [202]

Globalement les complexes formés avec P^1 et P^2 sont moins stables que ceux formés avec P^C. La position des cystéines en 2 et 7 dans la structure RAFT est donc moins favorable à la complexation. Cependant, la sélectivité pour le cuivre(I) par rapport au zinc(II) est conservée.
La différence observée entre P^1 et P^2 sur la nature des complexes formées peut être expliquée par la présence de trois fonctions acides déprotonnées à pH 7.4 qui rend P^2 négativement chargé. Ces trois charges négatives semblent favoriser la formation des complexes MP au détriment des complexes $M(P)_2$ qui sont trop chargés et donc moins stables (répulsions de charges trop importantes).

8 Conclusions et perspectives

Nous avons obtenu par synthèse peptidique deux cyclodécapeptides RAFT comportant deux coudes β de type II et deux cystéines en position 2 et 7. Ce modèle permet ainsi l'obtention d'une plate-forme peptidique possédant une partie ciblante et une partie « active » sur deux faces différentes. Ces systèmes sont plus rigides que le cyclodécapeptide P^C précédemment étudié. Cette rigidité influence la complexation vis à vis des différents métaux d^{10}. La stabilité des complexes entre le peptide et l'ion métallique est globalement plus faible avec P^1 et P^2 qu'avec P^C (Fig 59).

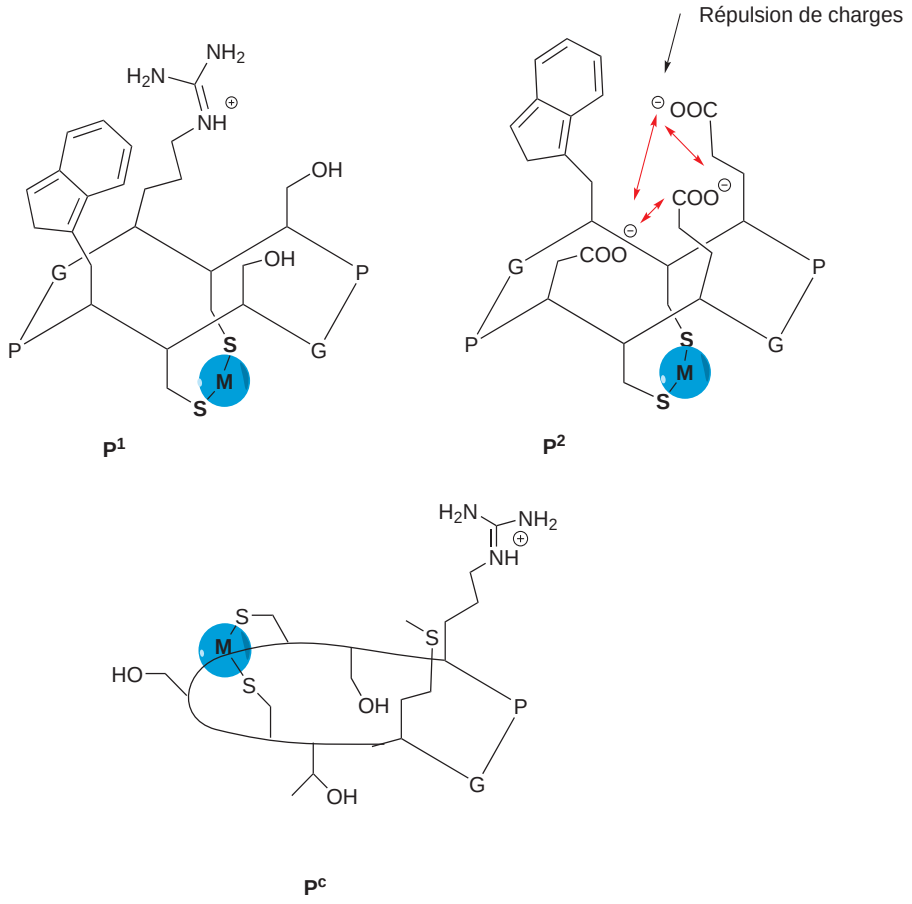


FIGURE 59 – Schématisation du rôle des chaines latérales des acides aminés lors de la complexation

La présence de trois acides carboxyliques dans la séquence peptidique de P^2 entraîne des répulsions de charges qui peuvent déformer le squelette peptidique et donc moins bien positionner les thiols pour la complexation. Cela peut expliquer une baisse de l'affinité pour les métaux d^{10} et favoriser essentiellement la formation de complexe de type MS_2 pour tous les métaux d^{10}. Le cas de P^1 est différent, il forme aussi bien des complexes 1 :1 dicoordinés (pour Cu(I), Hg(II), Zn(II), Pb(II)) que des complexes de stœchiométrie 1 :2 (pour Cd(II) et Pb(II)).

Malgré des constantes d'affinité plus faibles que celles observées avec le peptide P^C, nous avons tout de même maintenu une sélectivité pour le cuivre(I) par rapport au zinc(II) de dix ordres de grandeur. L'affinité vis à vis du cuivre(I) est bonne si on la compare à celle du glutathion, compétiteur éventuel intracellulaire (complexant de cuivre(I) dans les cellules). Ces cyclodécapeptides sont donc intéressants pour obtenir des complexants intracellulaire du Cu(I), et leur fonctionnalisation afin de pouvoir cibler les cellules hépatiques selon le modèle décrit figure 60.

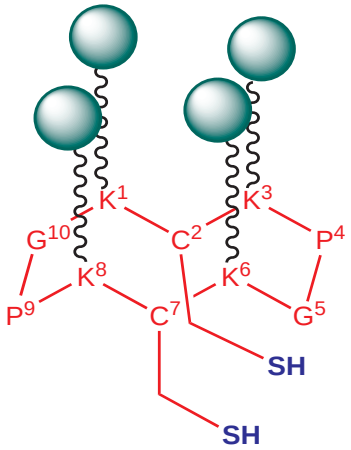
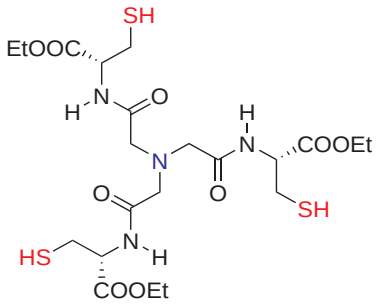


FIGURE 60 – Structure possible pour un système fonctionnalisé

Cette fonctionnalisation et l'intérêt d'un tel système pour la chélation du cuivre dans les cellules seront discutés dans le chapitre V du manuscrit.

Polyaminocarboxylates fonctionnalisés par trois ou quatre cystéines : synthèse et complexes métalliques



Quatrième partie

Polyaminocarboxylates fonctionnalisés par trois ou quatre cystéines : synthèse et complexes métalliques

9 Préambule : Vers des chélateurs du Cu(I) plus efficaces ?

Nous venons de voir dans la partie précédente que des plates-formes peptidiques portant deux cystéines permettent d'obtenir une affinité satisfaisante pour le cuivre(I) ($\log\beta_{11} \approx 16$, pH 7.4) et une bonne sélectivité Cu(I)/Zn(II) (dix ordres de grandeur). Au sein des métallochaperonnes, le cuivre(I) est coordiné par deux cystéines du site de fixation dans un arrangement S-Cu-S. Ces protéines possèdent une affinité élevée pour le cuivre(I) mais qui leur permet néanmoins de pouvoir transférer Cu^+ à leur protéine cible. Au sein des métallothionéines, l'environnement du cuivre(I) est différent. Le rôle de ces protéines est de séquestrer le cuivre(I) et elles possèdent donc une meilleure affinité que les métallochaperonnes. En effet, le cuivre(I) est complexé par trois cystéines dans un environnement CuS_3, ce qui lui confère une affinité plus forte. Si on s'en réfère aux protéines du vivant, augmenter le nombre de cystéines afin de complexer plus fort le cuivre(I) semble donc intéressant. De nouveaux chélateurs contenant plus de cystéines pour augmenter l'affinité pour le cuivre(I) ont donc été élaborés.
Si nous augmentons le nombre de cystéines, nous augmentons l'effet chélate. Rappelons que de nombreux ligands présentant plusieurs atomes donneurs susceptibles de former des liaisons avec un cation métallique, sont des ligands polydentes ou chélatants. Ceux-ci

forment des complexes métalliques plus stables par rapport à des ligands monodentes. Cet effet stabilisant est essentiellement d'origine entropique. Passer de deux cystéines à trois ou quatre devrait donc augmenter la stabilité du complexe formé avec le Cu^+.
Afin d'obtenir un système concourant, c'est à dire un système où les thiolates des cystéines convergent vers le cation métallique, nous avons décidé de greffer des cystéines sur une plate-forme chimique polyaminocarboxylates couramment utilisés en chimie de coordination. Ces systèmes sont des podands de faible poids moléculaire (Fig 61).

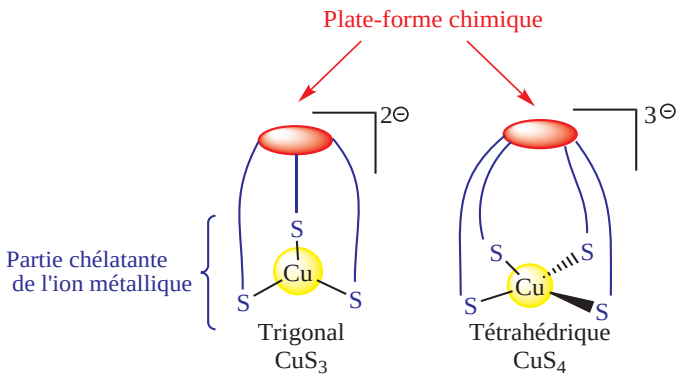


FIGURE 61 – Schématisation des systèmes envisagés

En effet, ces dernières années de nombreux ligands à base de polyaminocarboxylates en tant que sondes luminescentes [241], agents chélatants pour l'imagerie médicale [242] [243] ou chélateurs d'ion uranyle [244]... ont été développés. Ces ligands ont également été utilisés au sein de notre laboratoire comme plate-forme chimique. Des tétrapodes ou tripodes, possédant des architectures variées contenant des hétérocycles azotés [245], ont montré des propriétés de complexation intéressantes vis-à-vis des lanthanides ou des actinides (gadolinium pour l'IRM [245] [246] ou séparation actinides/lanthanides [247] [248]).
Les polyaminocarboxylates possèdent des fonctions acides carboxyliques qui peuvent réagir avec la fonction amine des cystéines pour former un lien amide. L'accès aux ligands envisagés semble donc aisé. La diversité de ces polyaminocarboxylates permet aussi d'obtenir des podands d'architectures chimiques extrêmement variés et de pouvoir étudier l'influence de cette plate-forme chimique sur la complexation de divers cations métalliques.
Nous avons donc envisagé la synthèse de tri et tétrapodes contenant trois ou quatre cystéines en utilisant les plates-formes polyaminocarboxylates : le NTA (acide nitrilotriacétique), le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique) et l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) (Fig 62).

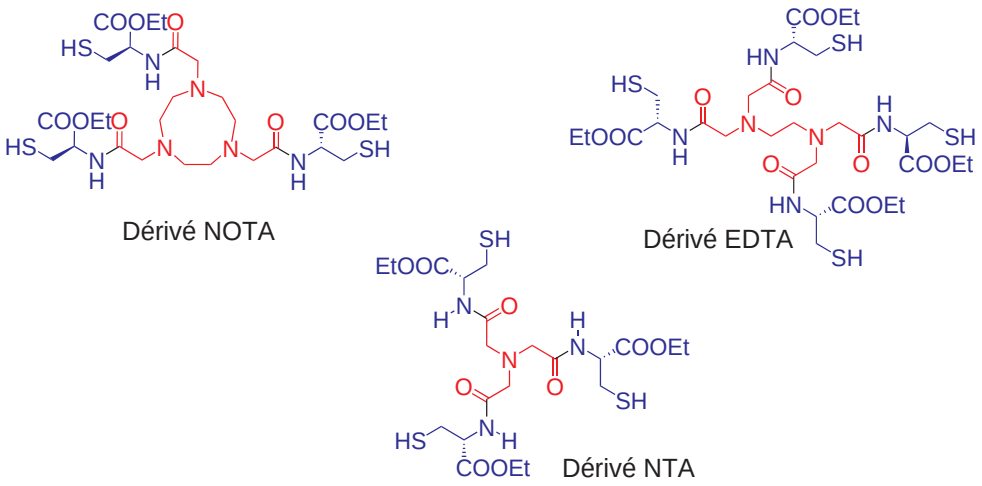


FIGURE 62 – Structure des trois familles de podands envisagés

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie du manuscrit a fait l'objet d'un dépôt de brevet : FR 09 01193 / US 12/403,806.

10 Synthèse et caractérisation des ligands

10.1 Synthèse des différents podands

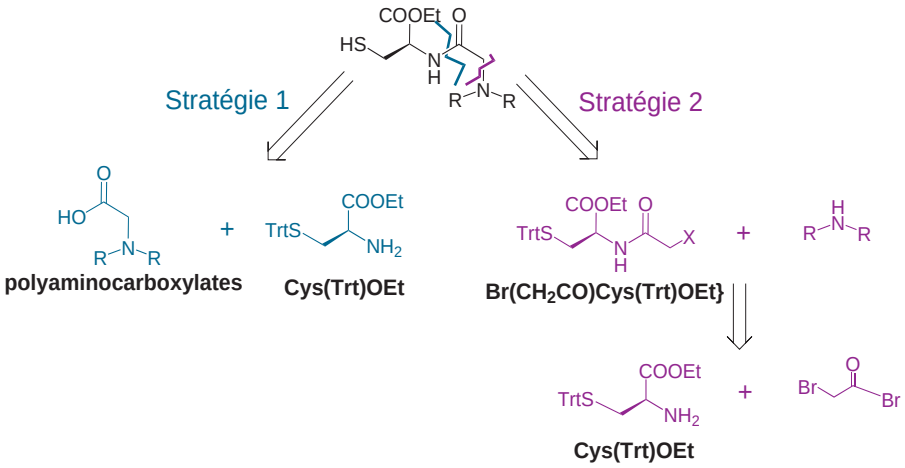


FIGURE 63 – Stratégies de synthèse

Les différents podands ont été obtenus selon deux stratégies de synthèse :

- La stratégie 1 : formation d'une liaison amide entre la fonction NH_2 de la cystéine et la fonction COOH de la plate-forme polyaminocarboxylate par couplage peptidique en milieu homogène suivi d'une déprotection des groupements trityles (cas du NTA et EDTA, Fig 63).

- La stratégie 2 : substitution nucléophile sur les amines (cas du NOTA et EDTA, Fig 63) par un dérivé halogéné. Le produit **Br(CH_2CO)Cys(Trt)OEt** est obtenu à partir de la cystéine et après létape de substitution nucléophile, les trityles sont déprotégés.

Pour les deux stratégies, afin d'éviter des réactions parasites notamment l'oxydation des fonctions thiols et la formation d'amides non désirées, nous sommes partis de la cystéine commerciale protégée par des groupement trityle au niveau de la fonction thiol et par un ester éthyliques sur la fonction acide carboxylique. Le groupement protecteur trityle est supprimé à la dernière étape de la synthèse dans des conditions classiques à savoir acide trifluoroacétique (TFA) et triéthylsilane (Et_3SiH) afin de pièger les trityles libérés. La purification du produit est réalisée juste après l'étape de déprotection des fonctions thiols par HPLC préparative sur phase inverse avec un éluant acide standard, afin d'éviter l'oxydation. Les produits sont ensuite stockés en BAG pour éviter toute oxydation. La fonction ester éthylique est quant à elle conservée.
Nous avons d'abord choisi d'introduire un ester éthylique comme protection de la fonction acide carboxylique de la cystéine (Fig 64). Cette protection est introduite lors d'une réaction d'estérification, décrite dans la littérature, utilisant des conditions douces (para-toluène sulfonate d'éthyle dans l'éthanol) évitant ainsi l'épimérisation du carbone asymétrique [249].

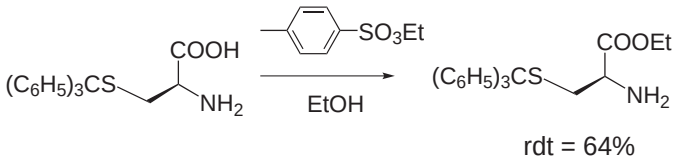


FIGURE 64 – Synthèse de la H-Cys(Trt)-OEt

10.1.1 Stratégie 1 : Couplage peptidique entre la Cys(Trt)OEt et le polyaminocarboxylate

L'étape clé de la stratégie 1 est le couplage peptidique en milieu homogène entre la cystéine convenablement protégée et le polyaminocarboxylate correspondant.

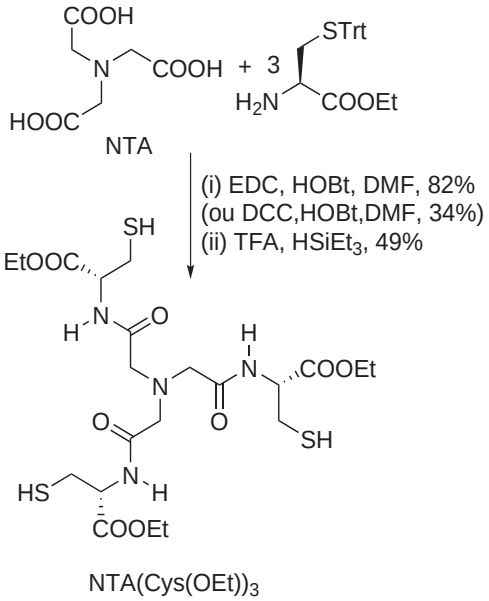


FIGURE 65 – Synthèse du NTA(Cys(OEt))$_3$

Après synthèse de la H-Cys(Trt)OEt, celle-ci est greffée sur la plate-forme polyaminocarboxylate par couplage peptidique en milieu homogène. De manière générale, les couplages peptidiques en milieu homogène se font dans la DMF en présence d'activateurs tels que la DCC (*N-N'*-dicyclohexylcarbodiimide) et le HOBt [250]. Le couplage peptidique est une substitution nucléophile d'une fonction amine primaire sur une fonction acide carboxylique. La fonction acide est activée par la DCC et forme un premier intermédiaire. Celui-ci est ensuite attaqué par le HOBt libérant alors une urée : la DCU (*N,N"*-dicyclohexylurée). L'intermédiaire 2, formé avec le HOBt, est plus réactif et réagit plus aisément avec l'amine primaire de la cystéine.

Les premières réactions de couplage réalisées sur le NTA et l'EDTA en présence de DCC ont permis d'obtenir les produits de couplages attendus cependant, les rendements obtenus après purification sont faibles, respectivement 34% et 21% pour le NTA et l'EDTA. Les produits obtenus après couplage sont relativement lipophyles puisqu'ils sont protégés par des groupements trityles et éthyles esters. Ils sont donc solubles en milieu organique. La DCU libérée au cours de la réaction est quant à elle soluble en milieu aqueux mais aussi partiellement en milieu organique. La séparation, sur colonne chromatographique sur silice, entre les produits souhaités et la DCU est alors difficile. Cela explique les rendements faibles après purification.

La DCC a donc été remplacée par l'EDC (1-éthyle-3-(3-diméthyl-amino-propyle)carbodiimide). Ce dernier joue le même rôle lors du couplage, mais l'EDU (éthyle-3-(3-diméthyl-amino-propyle)urée) formée au cours de la réaction est soluble essentiellement en milieu aqueux ou très polaire.

Cependant, seul le couplage entre le NTA et la H-Cys(Trt)OEt donne un bon rendement avec cette stratégie de synthèse (rdt = 82% sur l'étape de couplage des trois cystéines).

Bien que l'utilisation de l'EDC ait augmenté un peu le rendement lors du couplage sur l'EDTA, ce dernier reste faible (rdt = 35%). Notons aussi que cette stratégie n'a pas été appliquée sur le NOTA. En effet, ce dernier n'est commercial que depuis peu et sa synthèse est fastidieuse et relativement coûteuse [251] [252], nous avons donc choisi de limiter le nombre d'étapes au départ de ce produit et d'introduire le bras voulu via le produit **Br(CH_2CO)Cys(Trt)OEt**. La deuxième stratégie a donc été utilisée.

Le NTA(Cys(OEt))$_3$ a finalement été obtenu après une étape de déprotection des groupements trityles et purification sur colonne HPLC préparative avec un rendement global de 40% à partir du NTA (Fig 65).
Le produit a été caractérisé par ES-MS et RMN dans l'acétonitrile. Le spectre proton indique une symétrie C_3 (Fig 66). Les protons du CH_2 près de l'azote apical et les protons H_β présentent des signaux AB et ABX bien définis.

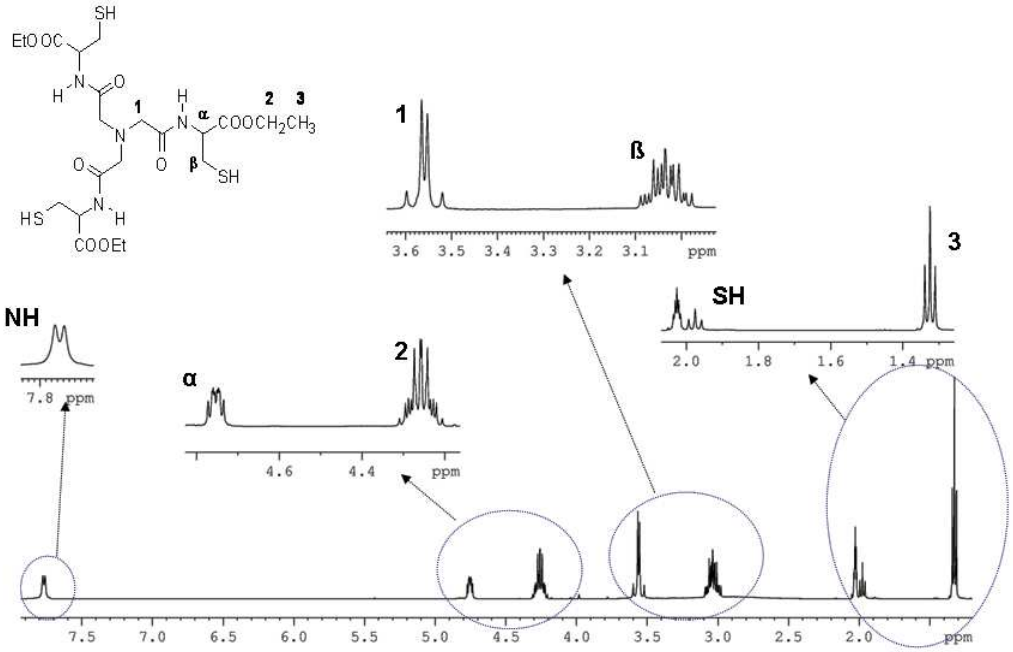


FIGURE 66 – Spectre proton du NTA(Cys(OEt))$_3$, 500 MHz, CD_3CN

10.1.2 Stratégie 2 : substitution nucléophile sur les polyamines

Cette stratégie de synthèse nécessite au préalable la synthèse du **Br(CH_2CO)Cys(Trt)OEt**. La synthèse de ce produit (X(CH_2CO)Cys(Trt)OEt) est décrite dans la littérature avec une H-Cys(Trt)OMe et un ω-bromo-chlorure d'acyle [253]. En milieu basique, l'amine primaire de la cystéine réagit par subtitution nucléophile sur le carbone du carbonyle et libère un bromure (Fig 67).

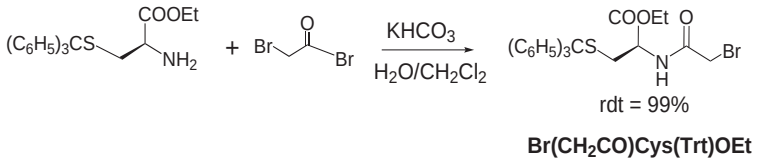


FIGURE 67 – Synthèse de $Br(CH_2CO)Cys(Trt)OEt$

Le dérivé bromé est obtenu avec un rendement brut de 99% et est utilisé sans purification. Ce dernier réagit ensuite avec les fonctions amines primaires ou secondaires de l'éthylène diamine ou du triazacyclononane, en milieu basique selon un mécanisme de substitution nucléophile (Fig 68)

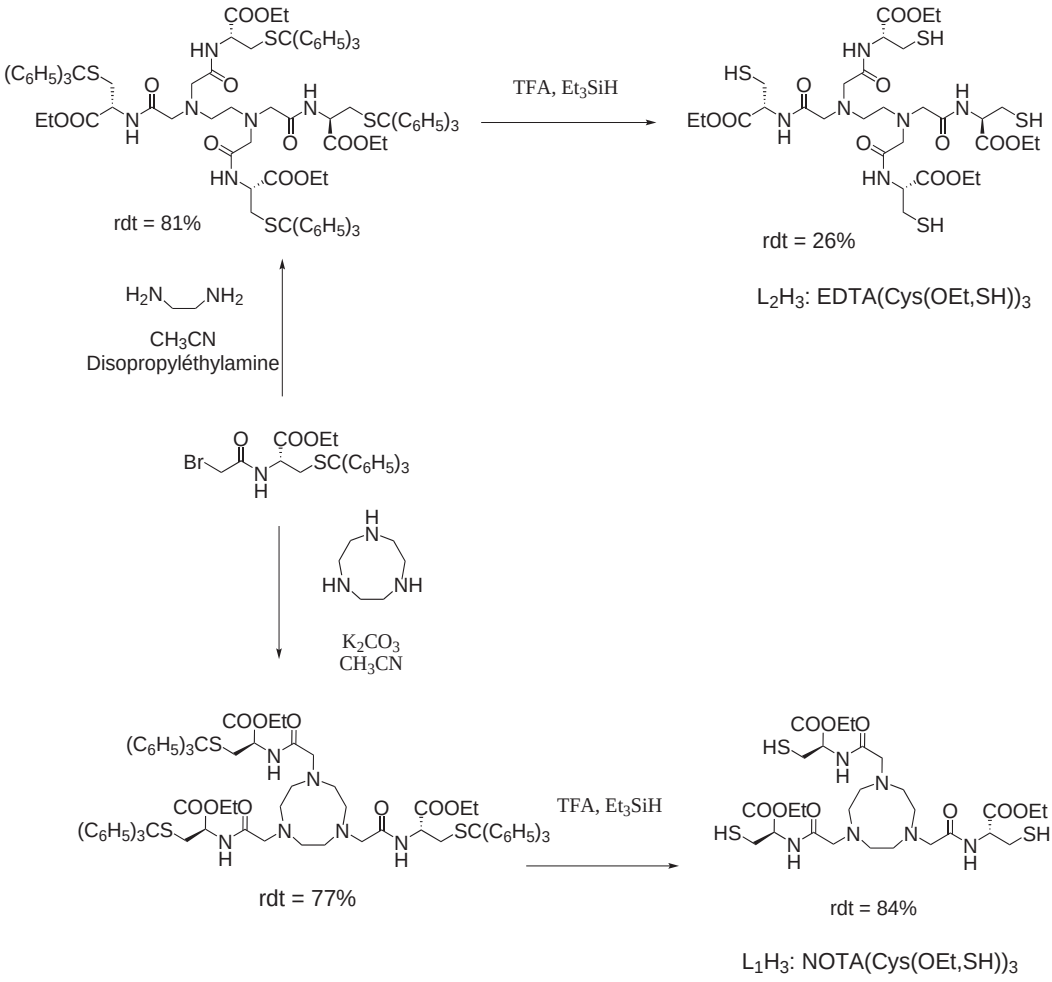


FIGURE 68 – Synthèse de $NOTA(Cys(OEt))_3$ et $EDTA(Cys(OEt))_4$

Le composé $NOTA(Cys(Trt)OEt)_3$ est obtenu, après purification sur colonne chromatographique, avec un rendement de 77%. Pour synthétiser le composé $EDTA(Cys(Trt)OEt)_4$, la base utilisée pour favoriser la substitution nucléophile de l'atome de brome est la diisopropyléthylamine. Cette dernière a permis d'obtenir le composé $EDTA(Cys(Trt)OEt)_4$ après purification sur colonne chromatographique de silice avec un rendement de 81%.

Les podands NOTA(Cys(OEt))$_3$ et EDTA(Cys(OEt))$_4$ ont été obtenus, après l'étape de déprotection des trityles et purification sur HPLC préparative, avec des rendements globaux de 65% pour le dérivé NOTA et 21% pour le dérivé EDTA, à partir des polyamines correspondants. Notons que les spectres protons de ces deux composés montrent une symétrie C_3 pour le NOTA(Cys(OEt)$_3$ et C_4 pour l'EDTA(Cys(OEt))$_4$, en effet par RMN ^{1}H les protons des bras sont chimiquement équivalents.

La synthèse de trois podands comportant le même résidu cystéine mais dérivé de trois plates-formes chimiques différentes a ainsi été réalisée par deux voies de synthèse différentes. L'influence de cette plate-forme chimique vis-à-vis de la complexation des ions métalliques d^{10} sera discutée plus loin.

10.2 Modification de fonctions

Afin de mettre en évidence l'influence de la fonction (C=O)X adjacente à la fonction thiol sur la complexation des ions métalliques, nous avons synthétisé les dérivés amide NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ et acide NTA(Cys(OH))$_3$. En effet, si ce tripode doit être fonctionnalisé pour cibler le foie, la fonction ester risque d'être hydrolysée *in-vivo* en acide carboxylique. Nous avons également envisagé la fonction amide car celle-ci devrait être stable *in-vivo*.

10.2.1 Synthèse de deux autres podands dérivés du NTA

La synthèse de ces deux nouveaux tripodes a été réalisée selon la stratégie 1. Le NTA(Cys(OH))$_3$ a été obtenu à partir du NTA(Cys(Trt)OEt)$_3$. Ce dernier a été hydrolysé dans des conditions douces, à savoir LiOH 1 M, pour éviter toute épimérisation des trois carbones asymétriques. Le NTA(Cys(Trt)OH)$_3$ a été obtenu avec un rendement de 86% sans purification. Après l'étape de déprotection des trityles et purification par HPLC préparative, le produit désiré a été obtenu avec un rendement global de 62% à partir du NTA.

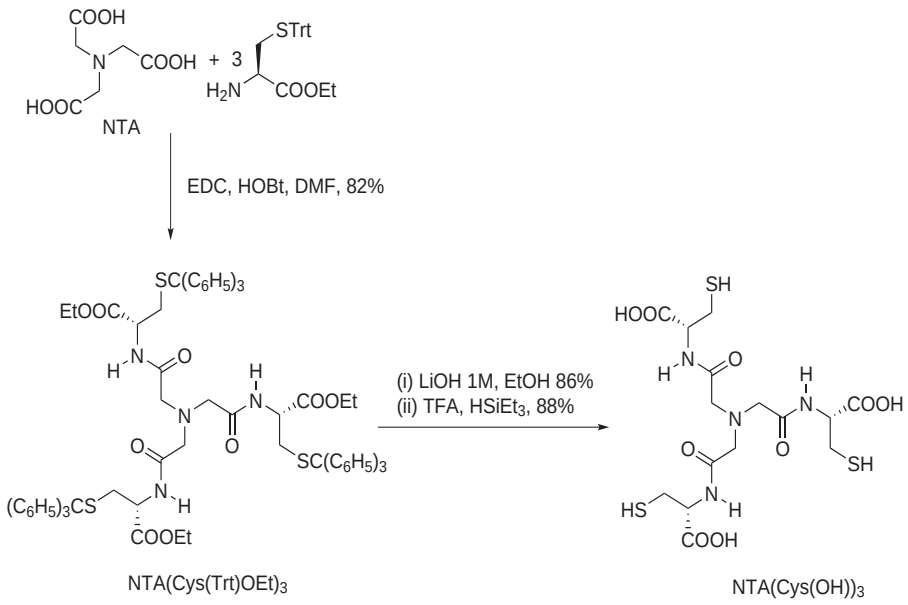


FIGURE 69 – Synthèse du NTA(Cys(OH))$_3$

La synthèse du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ a été réalisée selon le même schéma réactionnel que le NTA(Cys(OEt))$_3$. Nous sommes partis de la Cys(Trt)NH$_2$, commerciale. Le composé protégé par les trityles n'a pas été purifié et le produit voulu a été obtenu après purification avec un rendement global de 34%. Notons que les spectres protons de ces nouveaux tripodes montrent eux aussi une symétrie C$_3$ en solution.

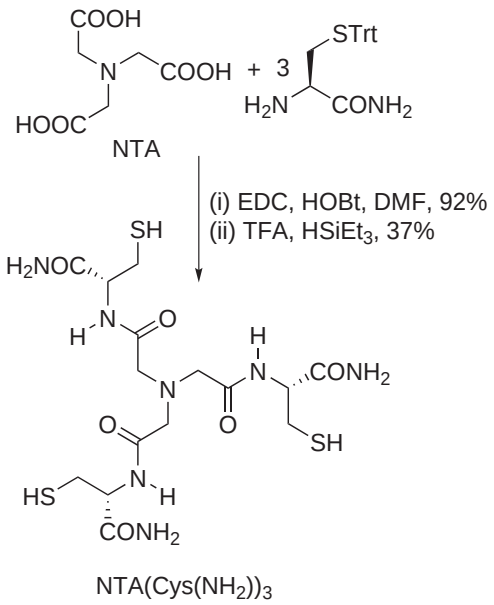


FIGURE 70 – Synthèse du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$

Sensibilité des produits à l'oxygène :

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, les thiols sont très sensibles à l'oxygène.

Nous avons donc là aussi travaillé en boîte à gants, en cuve et en tube RMN fermés hermétiquement pour éviter toute oxydation éventuelle durant les différentes études.

10.3 Détermination du pKa des différentes fonctions dans la famille NTA

Des dosages potentiométriques sur la famille NTA ont été réalisés afin de déterminer les valeurs des pKa des fonctions thiols et ainsi l'effet de la fonction adjacente : ester, amide, acide, sur ces dernières.
Les tripodes NTA(Cys(OEt))$_3$, et NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ possèdent quatre sites ayant des propriétés acido-basiques dans la gamme de pH étudiée ($2 < pH < 10.5$), à savoir les trois fonctions thiols et l'azote apical. A $pH < 7$, les trois fonctions thiols sont protonnées. Trois ou quatre constantes de protonation ont été déterminées par potentiométrie pour ces deux podands. Dans le cas du NTA(Cys(OH))$_3$, il existe trois fonctions acides carboxyliques à considérer, celles-ci sont déprotonnées pour $pH > 4$.
L'étude de potentiométrie a été réalisée de façon classique par dosage pH-métrique entre pH = 2 et pH = 10.5, en BAG. Une solution aqueuse de tripode de concentration connue (dosage par la méthode de Ellman [223]) et de force ionique constante (KCl 0.1 M) est dosée par une solution de KOH 0.1 M. Le pH est mesuré après chaque ajout de base. Un dosage retour par ajouts de HCl 0.1 M est effectué systématiquement. Le traitement des données des dosages aller et retour par le programme HYPERQUAD 2000 [254] a permis de déterminer les valeurs des pKa correspondant aux équilibres suivants (Cas du NTA(Cys(OH))$_3$) :

pKa_6	LH_6^{3+}	+	H_2O	=	LH_5^{2+}	+	H_3O^+
pKa_5	LH_5^{2+}	+	H_2O	=	LH_4^+	+	H_3O^+
pKa_4	LH_4^+	+	H_2O	=	LH_3	+	H_3O^+
pKa_3	LH_3	+	H_2O	=	LH_2^-	+	H_3O^+
pKa_2	LH_2^-	+	H_2O	=	LH^{2-}	+	H_3O^+
pKa_1	LH^{2-}	+	H_2O	=	L^{3-}	+	H_3O^+

Notons que le dérivé ester n'est pas suffisamment soluble dans l'eau, il est donc préalablement dissout dans un minimum d'acétonitrile (2%, v/v). La calibration de l'électrode pour le dosage du dérivé ester a été réalisée dans les mêmes conditions que le dosage.
Les valeurs des pKa sont rassemblées dans le tableau 28 pour les trois ligands.

	$NTA(Cys(OEt))_3$	$NTA(Cys(NH_2))_3$	$NTA(Cys(OH))_3$
pKa_1	9.4	10.2	10.6
pKa_2	9.0	9.2	10.0
pKa_3	8.1	8.5	9.2
pKa_4	< 2.8	2.8	3.8
pKa_5			3.3
pKa_6			2.8

TABLE 28 – Valeurs des pKa pour les différentes tripodes de la famille NTA

Dans le cas du $NTA(Cys(OH))_3$, les trois acidités les plus fortes sont attribuées aux fonctions acides carboxyliques. Les trois acidités les plus faibles sont attribuées aux fonctions thiols pour les trois tripodes.

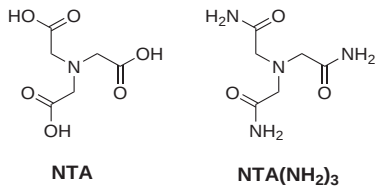


FIGURE 71 – Structure chimique du NTA (à gauche) et du $NTA(NH_2)_3$ (à droite)

La valeur des pKa des azotes apicaux est basse si on la compare à celle du NTA qui est de 9.73 (pKa_1) [255] (Fig 71). Cependant, Siddons et coll. reportent, pour le composé $NTA(NH_2)_3$, que la valeur du pKa de l'azote apical est de 2.6 (Fig 71) [256]. Le groupement amide a donc un effet électro-attracteur important sur l'azote ce qui abaisse la valeur du pKa. Il n'est donc pas étonnant d'obtenir un pKa pour cet azote de 2.8 pour le composé $NTA(Cys(NH_2))_3$. En ce qui concerne le $NTA(Cys(OEt))_3$, la valeur est plus basse et elle n'a pas pu être mesurée dans nos conditions expérimentales (Fig 72). Pour le $NTA(Cys(OH))_3$, les valeurs des pKa des trois fonctions acides sont situées dans la même gamme de pH, ce qui a pu gêner la mesure de la valeur du pKa de l'azote apical.

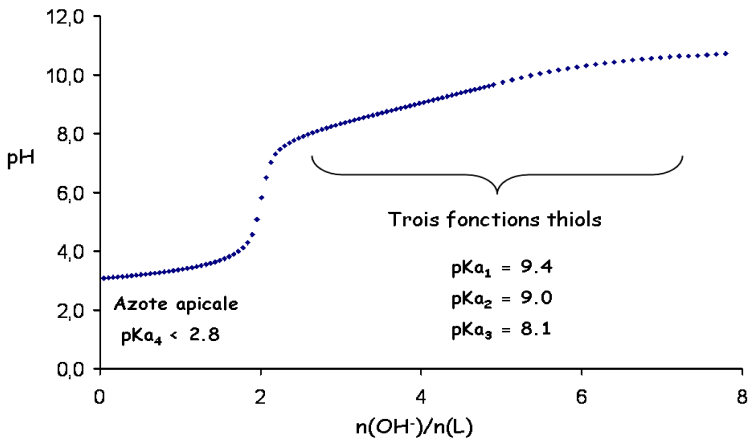


FIGURE 72 – Dosage potentiométrique du NTA(Cys(OEt))$_3$ par KOH 0.1 M + 2 eqv. de HCl (0.1 M) ajouté au début du dosage. ($3 < pH < 10.5$)

Les valeurs des pKa des acides carboxyliques du NTA(Cys(OH))$_3$ sont en accord avec les valeurs standards d'acides carboxyliques (pKa = 4-5). Les valeurs observées sont en accord avec celles décrites par Vogler et coll. sur le composé Ac-CysCys-OH pour lequel le pKa de l'acide carboxylique est de 3.06 [257].
Si on considère comme référence le pKa de la fonction thiol de la cystéine (pKa$_2$ = 8.14), les valeurs mesurées pour les trois tripodes sont bien plus fortes. Comme énoncé précédemment, la protonation de la fonction amine de la cystéine rend le thiol plus acide et donc abaisse sont pKa. Ceci n'est pas le cas dans les tripodes dérivés du NTA, les thiols sont donc moins acides. Nous observons aussi une différence importante entre les trois podands et donc une influence de la fonction ester, acide ou amide sur la valeur du pKa du thiol. Les valeurs des pKa obtenues pour les dérivés ester et acide sont en accord avec celles observées par Vogler et coll. sur leurs dipeptides (Table 29 [257]).

Peptides	SH(1)	SH(2)	autres
Ac-CysCys-OH	10.2(8)	8.74(2)	3.06(7)(OH)
Ac-CysCys-OEt	9.32(4)	8.36(4)	
Ac-CysCysGly-OEt	9.36(8)	8.38(3)	

TABLE 29 – Valeurs des pKa des peptides décrits par Vogler et coll. [257]

Les dipeptides cystéines acide et ester de la table 29 ont une différence de pKa$_1$ de une unité. Cette différence est aussi observée sur les tripodes NTA(Cys(OEt))$_3$ et NTA(Cys(OH))$_3$. Les fonctions carboxylates sont chargées négativement, de ce fait, le thiol possède une densité de charge importante et a donc un caractère plus basique que celui du dérivé ester. Si on considère le tripeptide Ac-CysCysGly-OEt comparable au tripode NTA(Cys(NH$_2$))$_3$, la différence des valeurs de pKa observés entre Ac-CysCys-OEt (dérivé ester) et Ac-CysCysGly-OEt ($\approx$ dérivé amide) ne se voit pas pour ces peptides reportés

par Vogler et coll. Par contre, dans le cas des tripodes, nous observons une différence de 0.8 unité entre le pKa_1 du $NTA(Cys(OEt))_3$ et du $NTA(Cys(NH_2))_3$. Le groupement Gly-OEt est donc plus électro-attacteur que la fonction amide du $NTA(Cys(NH_2))_3$ adjacente au thiol et, la fonction ester du $NTA(Cys(OEt))_3$, a donc un caractère plus électro-attacteur que l'amide du $NTA(Cys(NH_2))_3$. Le thiol possède ainsi une densité électronique plus faible et est donc plus acide.
Les fonctions ester, acide et amide adjacentes aux groupements thiols ont donc une influence sur la valeur des pKa de ces derniers. Les thiols se déprotonnent plus facilement dans le cas de l'ester.

En résumé, nous avons obtenus deux séries de podands. Les voies de synthèse mises en œuvre sont efficaces, reproductibles et peu coûteuses. Nous allons voir dans la suite le rôle de la plate-forme chimique sur la complexation des différents ions métalliques d^{10} puis celui de la fonction adjacente aux thiols dans les tripodes de la famille NTA sur la formation des complexes.

11 Complexation du cuivre(I)

11.1 Rôle de la plate-forme chimique

Le rôle de la plate-forme chimique a été étudié sur les trois podands dérivés de la cystéine ester. Les résultats décrits dans cette partie sur le tripode $NTA(Cys(OEt))_3$ ont fait l'objet d'une communication dans le *Journal of American Chemical Society* (publication, fin du manuscrit).

11.1.1 UV-visible

Nous suivons l'évolution de la bande LMCT vers 267 nm (orbitale p(Lig)→ orbitale s(Cu(I)) [159]). Les réactions observées sont rapides. Les dosages ont été réalisés en BAG en tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1). La concentration des podands a été déterminée par la méthode d'Ellman [223].

Les dosages réalisés sur cette première série de podands ($NTA(Cys(OEt))_3$, $NOTA(Cys(OEt))_3$, $EDTA(Cys(OEt))_4$) mettent en évidence la croissance d'une bande LMCT (267 nm) avec une rupture à 2 eqv. de cations métalliques pour les trois podands. Cela indique la formation d'une espèce de type $(Cu_2L)_x$. Les coefficients d'extinction à 267 nm sont respectivement de 13 000, 14 600 et 16 000 M^{-1} cm^{-1} pour les dérivés NTA, NOTA et EDTA. Si on considère un epsilon d'environ 5500/7000 M^{-1} cm^{-1} par cystéine [159] [164], la valeur est en accord avec la formation d'un complexe de type

$(Cu_2L)_x$.
L'apparition d'une autre bande vers les basses énergies indique la formation d'espèces polynucléaires. Cette bande à 300 nm se manifeste dès le début du dosage pour les podands NOTA(Cys(OEt))$_3$ et EDTA(Cys(OEt))$_4$. Par contre pour le tripode NTA(Cys(OEt))$_3$ cette bande apparait seulement après 1 eqv. de Cu(I). Cela indique que les espèces polynucléaires se forment en solution en excès de cuivre ($\geq 1 eqv.$) (Fig 73).

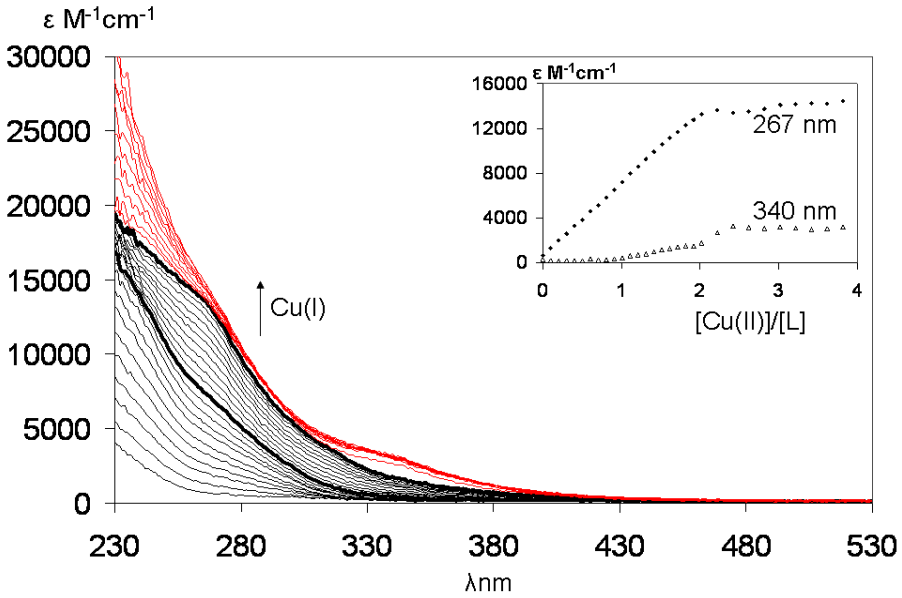


FIGURE 73 – Dosage UV-visible du NTA(Cys(OEt))$_3$ par Cu^+ (0-4 eqv.) dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Ligand] = 48 μM

En résumé, la rupture à 2 eqv. de Cu^+ pour les trois podands indique la formation d'une espèce de type $(Cu_2L)_x$, corroborée par les valeurs des coefficients d'extinction. L'absence ou la présence de bandes à basse énergie indique des comportements plus compliqués. A ce stade, la spectroscopie UV-visible ne nous permet pas de conclure sur le type d'espèces présentes en solution.

11.1.2 Dichroïsme circulaire

Les dosages ont été réalisés en cuves fermées hermétiquement dans les mêmes conditions que les dosages UV-visible (cf. 11.1.1).

Pour les trois podands, nous observons les bandes LMCT caractéristiques vers 260 et 280 nm [159] [163](Table 30). L'apparition d'une bande de plus basse énergie vers 340 nm est aussi observée. Cette bande est présente dès le début du dosage pour les podands NOTA(Cys(OEt))$_3$ et EDTA(Cys(OEt))$_4$, mais n'apparait qu'après 1 eqv. pour le tripode NTA(Cys(OEt))$_3$. Ces résultats confirment ceux obtenus en UV-visible.

Cependant, les spectres dichroïques des trois composés sont différents (Table 30). L'évolution des spectres des composés EDTA(Cys(OEt))$_4$ et NOTA(Cys(OEt))$_3$ est relativement confuse et indique la formation de plusieurs espèces polynucléaires en solution.

Les spectres dichroïques obtenus avec le tripode NTA(Cys(OEt))$_3$ mettent clairement en évidence la présence de deux complexes distincts entre 0-1 eqv. et 1-2 eqv. de Cu^+. En effet, la présence de trois points isodichroïques (228, 249 et 276 nm) entre 0 et 1 eqv de cation métallique, démontre la présence d'une espèce de type CuL en solution en équilibre avec le ligand libre (Fig 74). La présence de trois autres points isodichroïques entre 1 et 2 eqv. de cation métallique mais décalés vers les basses énergies (218, 252 et 325 nm), démontre que le premier complexe de type CuL se transforme en un seul autre complexe de type $(Cu_2L)_x$ (Fig 74 [258]).

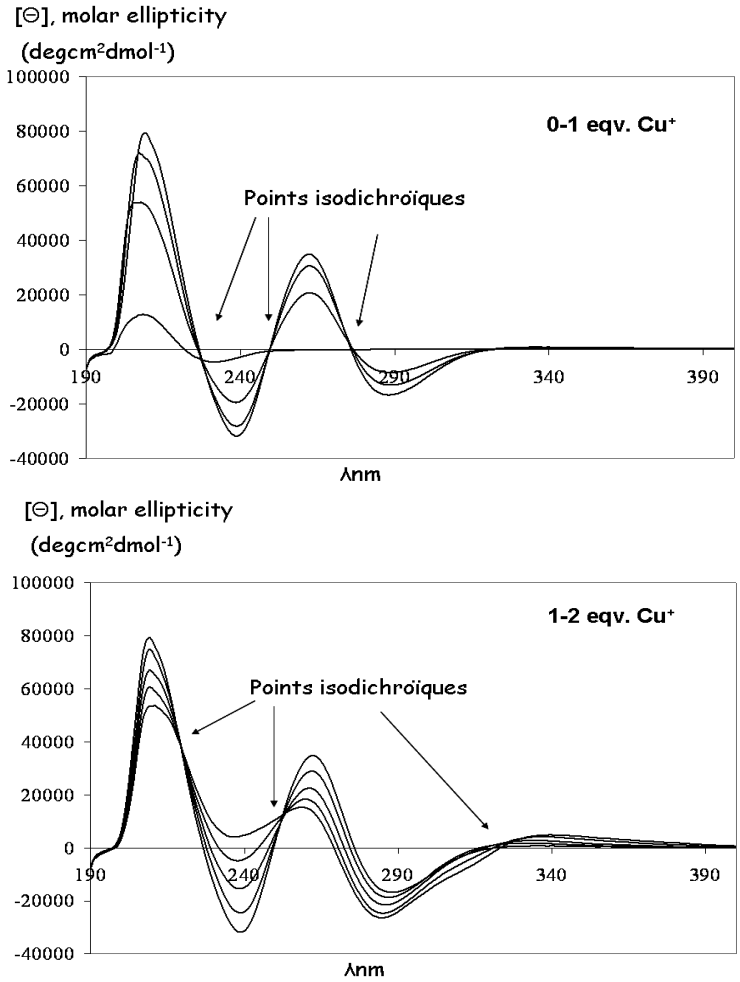


FIGURE 74 – Dosage par dichroïsme circulaire du NTA(Cys(OEt))$_3$ par Cu^+, 0-1 eqv. (en haut) et 1-2 eqv. (en bas), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Ligand] = 86 μM

Podands	Bandes UV et ϵ M^{-1} cm^{-1}	Bandes CD
NTA(Cys(OEt))$_3$	267 nm, ϵ = 13 000	268(+), 287(-) après 1 eqv. 340(+)
NOTA(Cys(OEt))$_3$	266 nm, ϵ = 14 600	275(+), 295(-), 347(+)
EDTA(Cys(OEt))$_4$	267 nm, ϵ = 16 000	267(-), 298(+), 345(-)

TABLE 30 – Données spectroscopiques des complexes formés avec Cu(I)

Pour résumer, les spectres de dichroïsme circulaire des complexes de Cu(I) avec les podands NOTA(Cys(OEt))$_3$ et EDTA(Cys(OEt))$_4$ mettent en évidence la formation de plusieurs espèces polynucléaires de cuivre(I). En revanche, les spectres obtenus avec le NTA(Cys(OEt))$_3$ démontre l'existence d'une espèce mononucléaire entre 0 et 1 eqv. de cuivre (absence totale de bande de basse énergie) qui se transforme en une autre espèce polynucléaire, en excès de Cu(I).

Si nous regroupons les données obtenues par UV-visible et dichroïsme circulaire, nous pouvons dire que les complexes de Cu(I) formés avec les deux podands NOTA(Cys(OEt))$_3$ et EDTA(Cys(OEt))$_4$ sont des complexes polynucléaires de type $(Cu_2L)_x$ non clairement définis [159] [163]. Pour le tripode NTA(Cys(OEt))$_3$, un complexe mononucléaire de type CuL est formé en défaut de cuivre(I) et se transforme en une espèce polynucléaire de type $(Cu_2L)_x$ en excès de cation métallique [258].

11.1.3 Affinité de ces podands pour le cuivre(I)

Les mesures d'affinités ont été réalisées comme décrites dans le chapitre précédent (cf 7.1.3). Nous avons utilisé le même compétiteur, le BCS [35] [201]. Les mesures ont été faites en BAG en tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), à pH 7.4.

Nous ne connaissons pas précisément quelles sont les espèces formées pour les podands NOTA(Cys(OEt))$_3$ et EDTA(Cys(OEt))$_4$, nous ne pouvons donc pas calculer de manière précise une constante apparente. Par contre, nous pouvons évaluer l'affinité du podand pour le Cu(I) en comparant la quantité de BCS nécessaire pour pouvoir déplacer 50% de cuivre. Plus précisement, les complexes de cuivre(I) (0.9 eqv. de Cu^+) ont été préformés, et nous regardons combien d'équivalent de BCS, par rapport au podand, sont nécessaires pour déplacer 50% de Cu(I) initialement complexé par le podand (Fig 75).

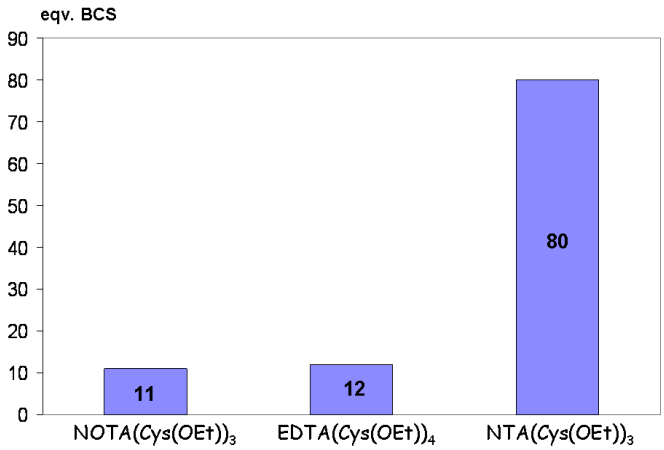


FIGURE 75 – Nombre d'équivalents de BCS nécessaire pour déplacer 50% de cuivre(I), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 298 K

Il faut huit fois plus de BCS pour déplacer 50% de cuivre(I) dans le cas du NTA(Cys(OEt))$_3$ que pour les deux autres podands. Il est donc évident que le tripode NTA(Cys(OEt))$_3$ possède une affinité pour le cuivre(I) beaucoup plus forte que les deux autres.

En résumé, la nature de la plate-forme polyaminocarboxylate a un rôle important dans la formation des complexes. Les deux podands dérivés des plates-formes NOTA et EDTA forment essentiellement en solution des espèces polynucléaires de cuivre(I) qui ne sont pas clairement définies et qui entraînent une affinité moins prononcée pour le cuivre(I). Par contre, le tripode NTA(Cys(OEt))$_3$ présente des propriétés intéressantes. Il montre non seulement une très bonne affinité pour le cuivre(I) comparée aux deux autres, mais aussi une capacité à former une espèce mononucléaire CuL. La plate-forme NTA possède un azote apical servant d'ancre chimique pour favoriser une convergence maximale des trois thiolates vers le Cu^+. Cette ancre paraît favoriser la formation du complexe mononucléaire.
La modification de la fonction adjacente au thiol va-t-elle jouer sur cette prédisposition, que semble avoir le NTA(Cys(OEt))$_3$, à former des complexes de type CuL ?

11.2 Famille NTA : influence de la fonction adjacente au thiol

11.2.1 UV-visible

Les dosages ont été réalisés comme décrits précédemment (cf. 11.1.1.). La bande LMCT à 267 nm croit et sature à 2 eqv. de cation Cu^+ pour les deux tripodes acide et amide. Nous avons donc formation de complexes de type $(Cu_2L)_x$ comme précédemment. Ceci est corroboré par la valeur des cœfficients d'extinction mesurés à 267 nm en accord avec la

formation d'espèces de type $(Cu_2L)_x$, respectivement de 13 800 et 12 200 M^{-1} cm^{-1} pour le $NTA(Cys(NH_2))_3$ et $NTA(Cys(OH))_3$ (5500/7000 M^{-1} cm^{-1} par cuivre lié [159] [164]). La bande à basse énergie à 340 nm, correspondant à des systèmes polynucléaires (interaction Cu-Cu), apparaît dès le début du dosage pour le tripode $NTA(Cys(OH))_3$. Par contre, elle n'émerge qu'après 1 eqv. de Cu^+ pour le tripode $NTA(Cys(NH_2))_3$. Notons que le dosage UV-visible du composé amide ressemble beaucoup à celui du tripode ester : rupture à 2 eqv. pour la bande LMCT à 267 nm, absence de bande à 340 nm avant 1 eqv. de cation métallique. Nous pouvons donc supposer un comportement similaire avec là aussi, formation d'une espèce mononucléaire à 1eqv. de Cu^+ (Fig 76).

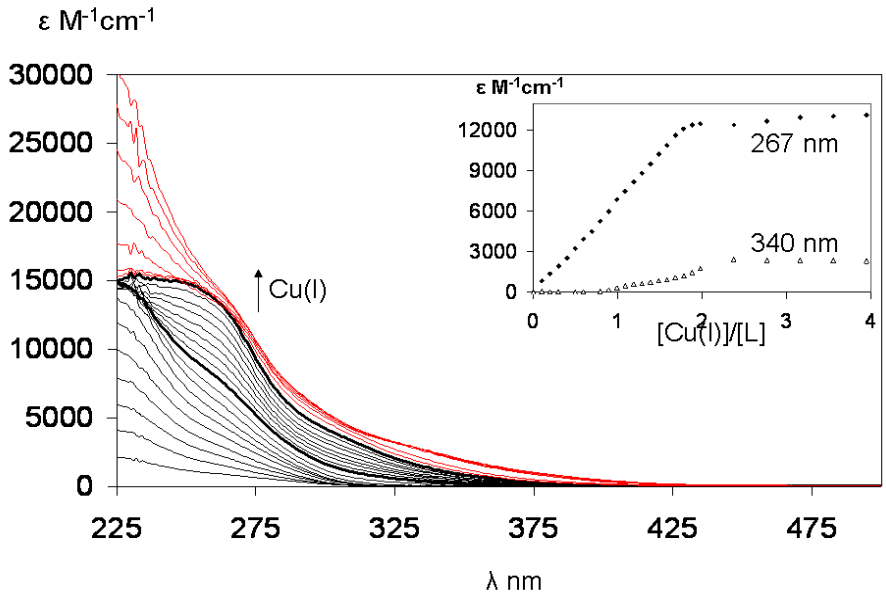


FIGURE 76 – Dosage du $NTA(Cys(NH_2))_3$ par ajouts de cuivre(I) (0-4 eqv.), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Lig] = 49 μM

Ceci n'est pas le cas du $NTA(Cys(OH))_3$ qui paraît se comporter comme les dérivés NOTA et EDTA avec formation d'espèces polynucléaires en solution dès les premiers ajouts de Cu^+.

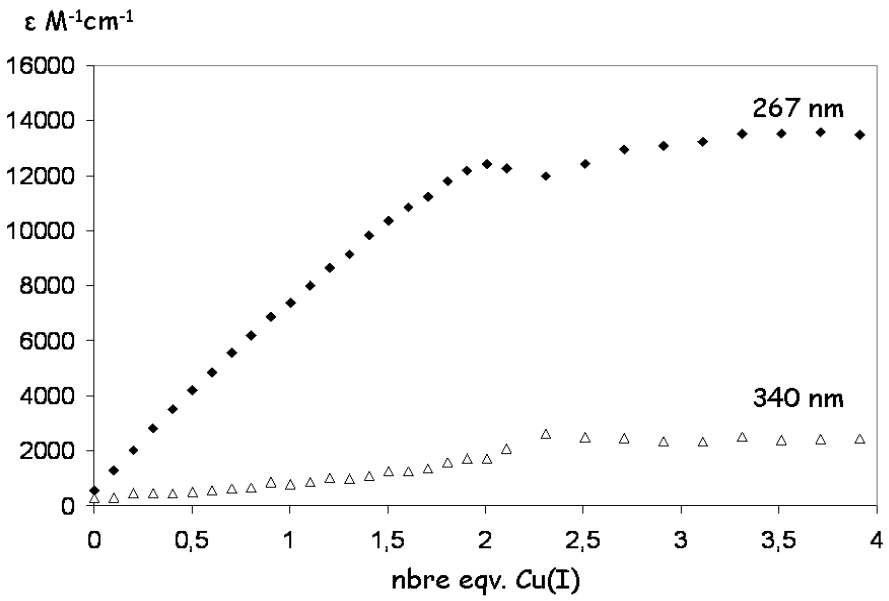


FIGURE 77 – Evolution des bandes à 267 nm et 340 nm du NTA(Cys(OH))$_3$ par ajouts de cuivre(I) (0-4 eqv.), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Lig] = 52 μM

Ces premiers résultats obtenus par spectroscopie UV-visible mettent donc en évidence, pour le dérivé amide, un comportement très similaire au NTA(Cys(OEt))$_3$ tandis que le NTA(Cys(OH))$_3$ semble plutôt former des complexes polynucléaires.

11.2.2 Dichroïsme circulaire

Les dosages par dichroïsme circulaire ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment (cf. 11.1.1).
Les bandes LMCT vers 256 et 280 nm sont observées pour les deux tripodes (Table 31). Pour le NTA(Cys(OH))$_3$, une bande de faible énergie à 340 nm est présente dès le début du dosage, ce qui confirme les résultats obtenus en UV-visible avec formation de systèmes polynucléaires dès les premiers ajouts de cuivre(I). Mais, le spectre dichroïque ne nous permet pas de donner la nucléarité des espèces.

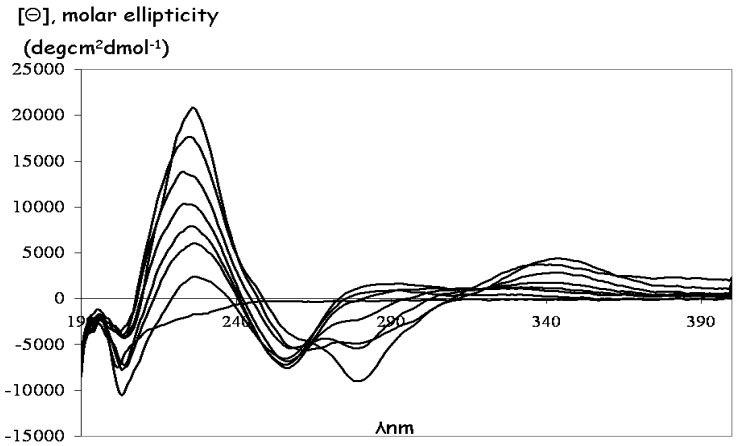


FIGURE 78 – Dosage du NTA(Cys(OH))$_3$ par ajout de cuivre(I) (0-2 eqv.), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Lig] = 91 μM

Les bandes du spectre du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ se modifient comme celles du NTA ester, elles croissent jusqu'à 1 eqv. de Cu^+ puis entre 1 et 2 eqv. de cation métallique. Comme dans les spectres UV-visible, nous notons l'apparition d'une bande de basse énergie qu'à partir de 1 eqv. de Cu(I). Des points isodichroïques sont également observés comme pour le NTA(Cys(OEt))$_3$ (233, 270 nm et 272, 303 nm, Fig 79). Nous pouvons donc affirmer que les deux dérivés ester et amide ont un comportement très proche : formation d'un complexe mononucléaire dans un premier temps qui se transforme en une espèce polynucléaire en excès de Cu(I).

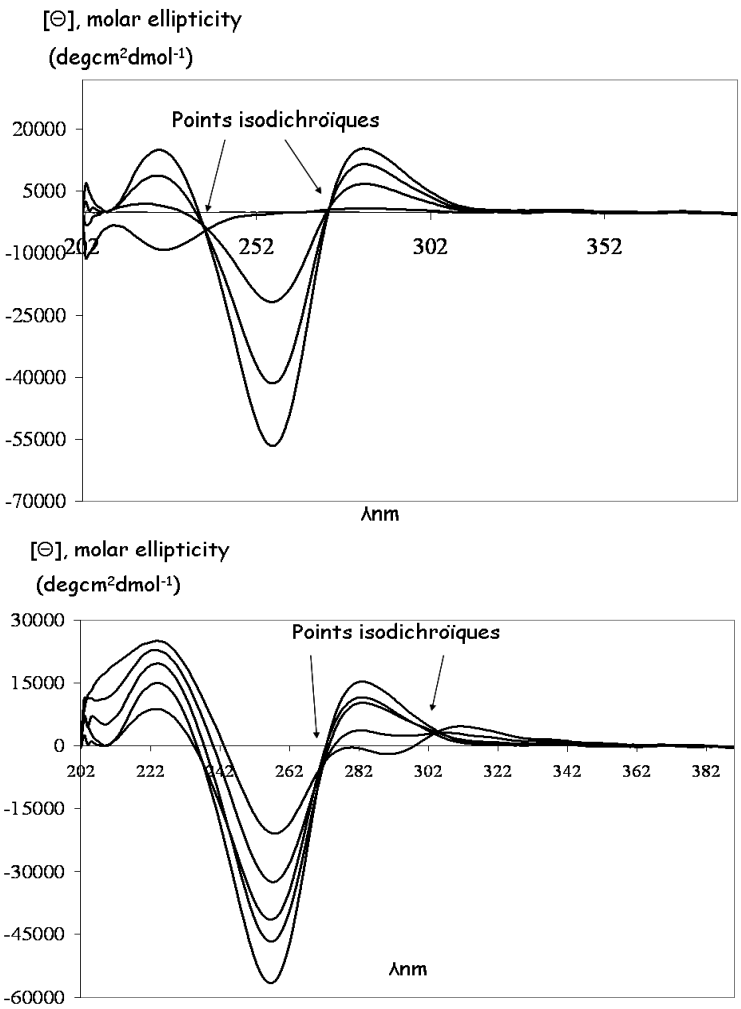


FIGURE 79 – Dosage du NTA(Cys(NH_2))$_3$ par ajout de cuivre(I), 0-1 eqv. Cu(I) (en haut), 1-2 eqv Cu(I) (en bas), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Lig] = 99 μM

En résumé, les dosages UV-visible et de dichroïsme circulaire soulignent la formation d'espèces polynucléaires dans le cas du dérivé acide. Contrairement à P^2, les trois fonctions acides carboxyliques ne favorisent pas la formation de complexe de stœchiométrie 1:1, mais celle de systèmes plus complexes.
Le dérivé amide a un comportement très similaire au dérivé ester. En effet, nous observons dans les deux cas la formation d'une espèce mononucléaire pour 1 eqv. de Cu^+ qui se transforme en une espèce polynucléaire en excès de cation métallique.

Podands	Bandes UV et ϵ M^{-1} cm^{-1}	Bandes CD
$NTA(Cys(OEt))_3$	267 nm, ϵ = 13 000	268(+), 287(-) après 1 eqv. 340(+)
$NTA(Cys(NH_2))_3$	266 nm, ϵ = 13 800	256(-), 282(+) après 1 eqv. 313(+), 341(+)
$NTA(Cys(OH))_3$	267 nm, ϵ = 12 200	256(-), 278(-), 343(+)

TABLE 31 – Données spectroscopiques des complexes formés avec Cu(I) pour la famille NTA

11.2.3 Analyse des spectres protons et mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé

Les mesures des cœfficients de diffusion ont été réalisées en tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1). Les solutions ont été préparées en BAG. Des aliquots d'une solution mère de Cu(I) ont été additionnés au ligand et le spectre RMN ^1H a été enregistré après chaque ajout.

Spectres protons : Rappelons que les spectres protons des tripodes dérivés du NTA ont chacun une symétrie C_3 dans laquelle les H_β de la cystéine et les protons du NCH_2 près de l'azote apical présentent des systèmes ABX et AB bien résolus.
Les spectres protons des $NTA(Cys(OEt))_3$ et du $NTA(Cys(NH_2))_3$ montrent clairement la formation du complexe de cuivre dès les premiers ajouts de cation métallique. En effet à 0.5 eqv. de Cu^+, nous avons cœxistence à 50% du ligand et du complexe de cuivre(I). La cœxistence, à 0.5 eqv. de cation métallique, de ces deux espèces, présentant chacune des résonances des protons très fines, met en évidence un équilibre lent entre le ligand libre et le complexe CuL (Fig 80). La complexation du cation métallique entraîne une forte modification des systèmes AB et ABX : ces protons sont différenciés très fortement dans les complexes CuL comme l'indique les différences de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) dans la table 32 [258]. Cela suggère que le complexe mononucléaire adopte une conformation rigide où les trois thiolates englobent le Cu^+. Notons que le spectre du complexe CuL possède la même symétrie C_3 que le ligand libre pour les deux tripodes.

Δppm	NCH_2-CO	$CH_2\beta$-SH
L^1 : $NTA(Cys(OEt))_3$	0.06	0.06
CuL^1	0.67	0.46
L^2 : $NTA(Cys(NH_2))_3$	0	0.09
CuL^2	0.59	0.49

TABLE 32 – Différences de déplacements chimiques observés pour les protons NCH_2-CO et $CH_2\beta$-SH au sein du ligand libre et du complexe de cuivre, tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz

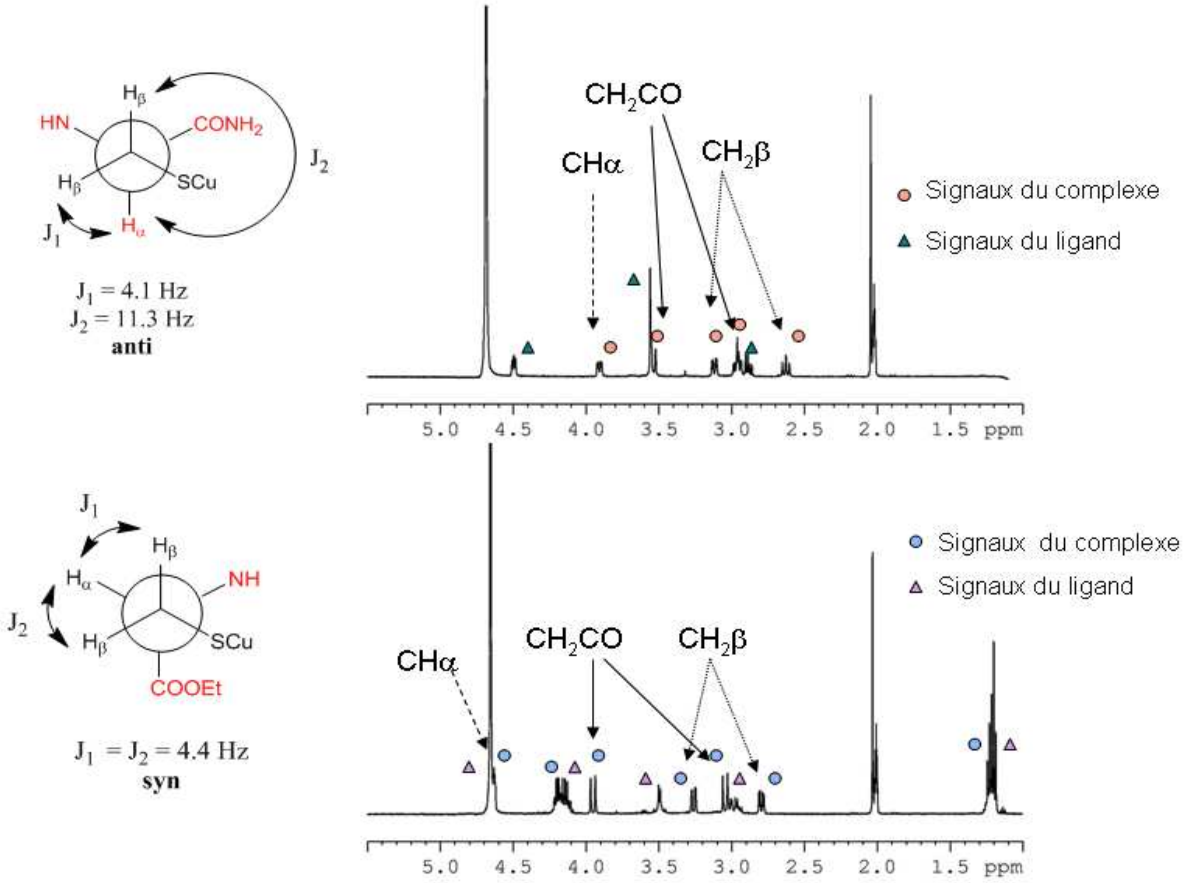


FIGURE 80 – Spectres protons du $NTA(Cys(NH_2))_3$ (en haut) + 0.5 eqv.de Cu^+ et du $NTA(Cys(OEt))_3$ + 0.5 eqv. de Cu^+ (en bas), dans tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz

Cependant, nous observons sur les spectres protons une légère différence dans la structure des deux complexes CuL. En effet, nous venons de voir que la complexation du cuivre(I) entraînait un éclatement des signaux du système ABX des deux protons H_β. La présence du cuivre relativement proche de ces deux protons n'a toutefois pas la même influence dans le cas du $NTA(Cys(NH_2))_3$ que dans celui du $NTA(Cys(OEt))_3$. En effet dans le cas du complexe $CuNTA(Cys(NH_2))_3$, nous observons un couplage ^3J entre le H_α

et un des H_β de 11 Hz au lieu de 4 Hz mesuré pour le ligand libre. Si on se réfère à la loi de Karplus (équation (26), A = 7 Hz, C = 5 Hz), nous sommes dans le cas où l'angle entre le H_α et un des H_β est de 180°, donc, ces deux H sont en position antipériplanaire (anti) (Fig 80).

$$^3J_{HH} = A + \cos\theta + C\cos 2\theta \tag{26}$$

Ce fort couplage n'est pas observé dans le complexe CuL du NTA(Cys(OEt))$_3$. De plus, le H_α, qui est en position *cis* de la fonction S-Cu, est fortement blindé dans le complexe Cu-NTA(Cys(NH_2))$_3$.

Notons que les spectres protons se modifient en excès de cation métallique pour les deux tripodes. L'apparition de signaux larges à 1 eqv. de Cu^+ souligne la formation d'une nouvelle espèce en solution au détriment du complexe mononucléaire. Cette nouvelle espèce possède, en solution, une dynamique interne rapide à l'échelle de temps de la RMN (Fig 81) qui a été attribuée à la formation d'un système polynucléaire (confirmée par la mesure des cœfficients de diffusion comme nous le verrons plus loin).

Dans le cas du NTA(Cys(OH))$_3$, des signaux larges et non résolus sont observés dès les premiers ajouts de cuivre(I) et indiquent la présence d'espèces polynucléaires en solution.

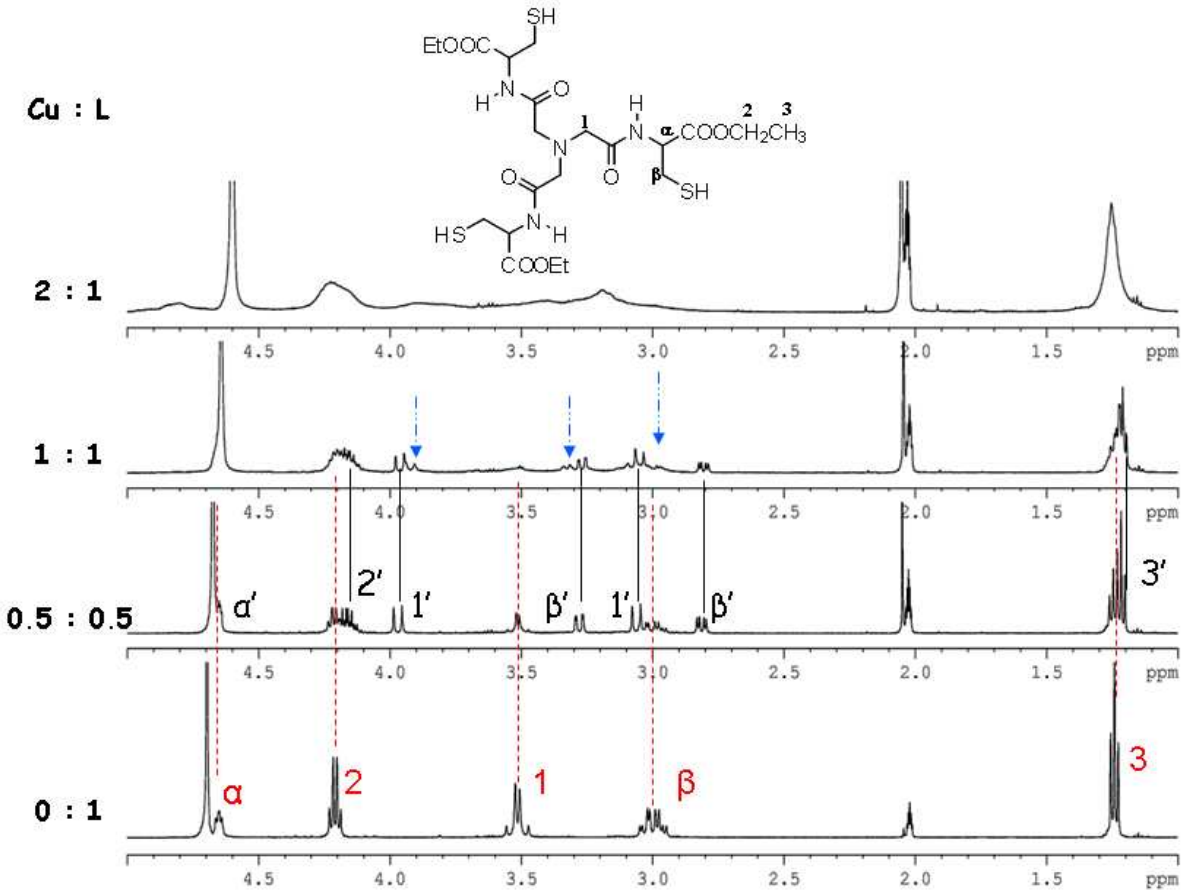


FIGURE 81 – Spectres protons du NTA(Cys(OEt))$_3$ avec 0, 0.5, 1 et 2 eqv.de Cu^+ dans tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz, 298 K

Méthode de mesure des cœfficients de diffusion : Afin d'obtenir des informations sur la molécularité des espèces en solution, nous avons mesuré les cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé. En effet, cette méthode est considérée comme un bon outil pour déterminer en solution la présence d'espèce monomoléculaire, bimoléculaire ou oligomérique [201] [259] [260] [261]. En effet, la constante de diffusion D peut être reliée au rayon hydrodynamique de la molécule par la relation de Stockes-Einstein (équation 27) où k est la constante de boltzmann, T la température absolue, η la viscosité et r_H le rayon hydrodynamique de l'espèce qui diffuse. On suppose que l'espèce diffusante est relativement sphérique et que cette sphère diffuse à la même vitesse que les autres particules que l'on examine.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H} \tag{27}$$

La détermination du cœfficient de diffusion D par RMN, pour des complexes et des ligands de même forme, est donc un moyen efficace pour déduire la masse moléculaire d'espèces inconnues (i, M_i) en solution en prenant comme référence une espèce connue mesurée dans les mêmes conditions (ref, M_{ref}) (équation 28).

$$\frac{D_i}{D_{ref}} = \sqrt[3]{\frac{M_{ref}}{M_i}} \tag{28}$$

Le cœfficient de diffusion D dépend de la forme et de la taille des espèces, plus l'espèce est grosse, plus elle diffuse lentement, plus le cœfficient de diffusion est petit.
Cette méthode a été validée sur les complexes de mercure(II) et cuivre(I) obtenus avec le peptide P^C [201].

Résultats et interprétations : Les cœfficients de diffusion ont été mesurés au cours des dosages des ligands par le cuivre(I). Les cœfficients de diffusion obtenus confirment la formation d'une espèce mononucléaire avant 1 eqv. de cuivre(I) pour les deux dérivés ester [258] et amide (cœfficient de diffusion très proche du ligand libre). Elle confirme aussi la formation d'une espèce polynucléaire après 1 eqv. de cation métallique pour les trois tripodes (Table 33). En effet, le coefficient de diffusion mesuré dans ce cas est plus petit que celui du ligand libre, signe que l'espèce diffusante est beaucoup plus grosse. Dans le cas du $NTA(Cys(OEt))_3$, la nucléarité de l'espèce polynucléaire présente après 1 eqv. de cuivre(I) a pu être déterminée. En effet, le cœfficient de diffusion $[D_{(Cu_2L)_x}] = 2.0(1) \times 10^{-10}$ m^2 s^{-1} indique la formation du complexe $(Cu_2L)_x$ avec x = 3. Ce type de cluster Cu_6S_9 est similaire à ceux rencontrés chez les MT sur leur domaine β [61] [52] où le cuivre(I) adopte une géométrie trigonale.

L^1 :NTA(Cys(OEt))$_3$			
	L^1	CuL^1	$(Cu_2L^1)_x$
D m^2 s^{-1}	$3.20(4)\times10^{-10}$	$3.02(4)\times10^{-10}$	$2.0(1)\times10^{-10}$
Masse théorique	585	645	2126 (x = 3)
Masse expérimentale		696(54)	2396(449)
L^2 :NTA(Cys(NH$_2$))$_3$			
	L^2	CuL^2	$(CuL^2)_x$
D m^2 s^{-1}	$3.40(4)\times10^{-10}$	$3.30(4)\times10^{-10}$	$1.86(1)\times10^{-10}$
Masse théorique	497	558	3108 (x = 5)
Masse expérimentale		543(39)	3035(597)
L^3 :NTA(Cys(OH))$_3$			
	L^3	CuL^3	$(CuL^3)_x$
D m^2 s^{-1}	$3.04(4)\times10^{-10}$		$2.0(1)\times10^{-10}$
Masse théorique	500		1874 (x = 3)
Masse expérimentale			1756(333)

TABLE 33 – Mesures des coefficients de diffusion pour les complexes de cuivre(I) avec les ligands NTA(Cys(NH$_2$))$_3$, NTA(Cys(OEt))$_3$, NTA(Cys(OH))$_3$, tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz. Les masses expérimentales sont obtenues par l'équation 28 en prenant comme référence le ligand seul

11.2.4 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a été réalisée en tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 7.0. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif. Les complexes sont préformés en BAG et analysés rapidement en ES-MS.

Les complexes mononucléaires (Cu(NTA(Cys(OEt))$_3$)) et Cu(NTA(Cys(NH$_2$)$_3$)) ont été mis en évidence par spectrométrie de masse. Comme observé en RMN, le complexe CuL désorbe dès les premiers ajouts de cuivre(I). Au cours du dosage, l'intensité du complexe augmente pour donner majoritairement le complexe mononucléaire à 1 eqv. de Cu^+.

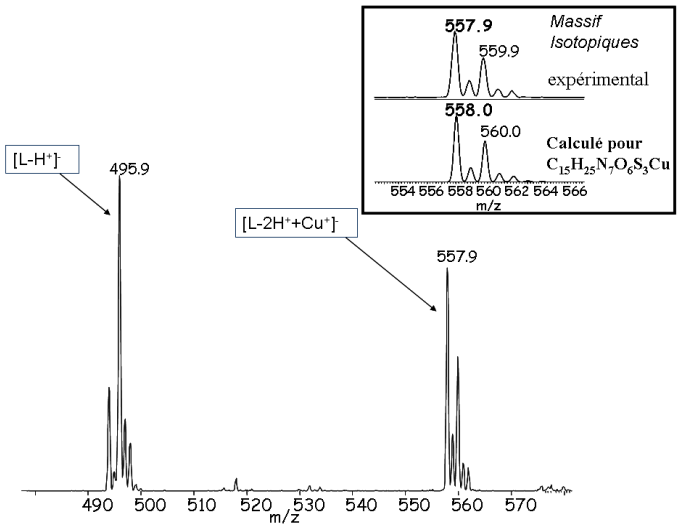


FIGURE 82 – Spectre de masse du NTA(Cys(NH_2))$_3$ + 0.75 eqv. de Cu^+, tamp. acétate d'ammonium, 298 K, pH 7, enregistré en mode négatif.

Dans le cas du NTA(Cys(OEt))$_3$, les spectres de masse enregistrés entre 1 et 2 eqv. soulignent la présence du cluster Cu_6S_9 (Fig 83).

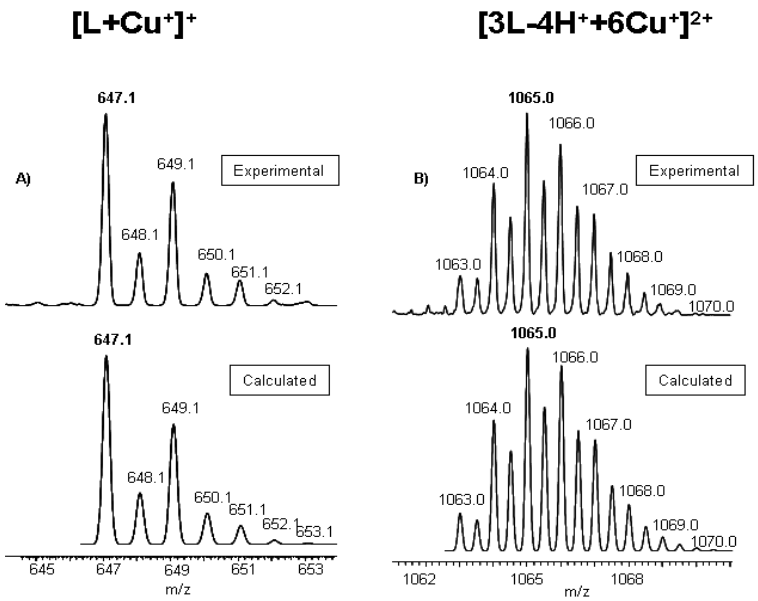


FIGURE 83 – NTA(Cys(OEt))$_3$ + 1 eqv. Cu^+ (A), NTA(Cys(OEt))$_3$ + 2 eqv. Cu^+ (B), tamp. acétate d'ammonuim, pH 7.0, mode positif, 298 K

Complexes	NTA(Cys(OEt))$_3$	NTA(Cys(NH$_2$))$_3$
[L+Cu$^+$]$^{2-}$	645	557.9
[3L-4H$^+$+6Cu$^+$]$^{2+}$	1065	

TABLE 34 – Complexes de cuivre(I) vus lors de dosages par ES-MS, tamp. acétate d'ammonium, pH = 7.0

Dans le cas des tripodes NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ et NTA(Cys(OH))$_3$, pour 2 eqv. de Cu$^+$, les spectres de masse mettent en évidence la formation de complexes polynucléaires comme observé en RMN proton.

11.2.5 Mise en évidence de liaisons hydrogènes intramoléculaires par RMN proton

Nous avons vu que les spectres protons des complexes Cu(NTA(Cys(OEt))$_3$) et Cu(NTA(Cys(NH$_2$))$_3$), étaient bien définis et que les signaux des méthylènes étaient très différenciés par rapport à ceux des ligands libres. Cela souligne une certaine rigidité des complexes mononucléaires formés. Cette rigidité peut-elle s'expliquer par la présence de liaisons hydrogènes dans la partie supérieure du complexe entre les fonctions amides de deux bras différents (NH$_{bras(i)}$ - - - O=C$_{bras(i+1)}$, Fig 85) ?
Pour vérifier cela, des études en température par RMN proton ont été réalisées. Comme énoncé partie 6.3.2, il est avéré que la mesure des déplacements chimiques des NH en fonction de la température est un bon outil pour déterminer si les NH en question sont exposés au solvant (interactions avec ce dernier) ou impliqués dans une liaison hydrogène intramoléculaire [226] [227] [228] [229].
Nous avons vu précédemment que les spectres RMN protons des complexes présentaient eux aussi une symétrie C$_3$ comme les ligands libres. Dans cette symétrie, les trois bras du tripode sont équivalents et un seul signal est donc obtenu pour les trois protons amide.

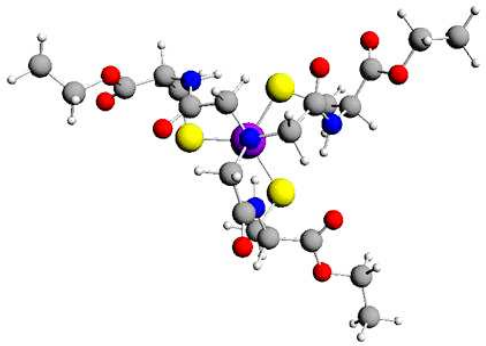


FIGURE 84 – Visualisation de la symétrie C$_3$ dans le cas du NTA(Cys(OEt))$_3$ pour le complexe CuL, S en jaune, Cu en violet, N en bleu

Les tubes RMN ont été préparés en BAG, dans tamp. phos. 20 mM $H_2O/D_2O/CD_3CN$ (v/v/v = 8/1/1). La méthode du watergate [224] a été utilisée pour atténuer le signal de H_2O.

Les mesures montrent clairement la présence de liaisons hydrogènes au sein des complexes de type CuL non présentes dans la structure du ligand à l'état libre (Table 35). En effet, il a été montré que pour un cœfficient de température, en valeur absolue, inférieur à 3-4 ppb/°C, il existe une liaison hydrogène intramoléculaire [226] [230] [231] [232]. La complexation du cation métallique favorise donc la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires. Par contre dans le cas du $NTA(Cys(NH_2))_3$, les NH_2 ne sont pas impliqués dans des liaisons hydrogènes intramoléculaires.

NH	$\lvert\frac{\Delta\delta ppm}{\Delta T}\rvert$, ppb/K
$NH(L^1)$	6.8
$NH(CuL^1)$	**0.8**
$NH(L^2)$	6.6
$NH(CuL^2)$	**0.1**
$NH_2(L^2)$	7.1
$NH_2(CuL^2)$	6.9
$NH_2(L^2)$	8.1
$NH_2(CuL^2)$	7.6

TABLE 35 – Cœfficients de température pour les ligands libres et les complexes CuL avec L^1 = $NTA(Cys(OEt))_3$ et L^2 = $NTA(Cys(NH_2))_3$, dans tamp. phos. 20 mM $H_2O/D_2O/CD_3CN$ (v/v/v = 8/1/1), pH = 7.4, 278-318 K

Des modélisations de la structure des complexes avec le logiciel chem3D ont été réalisées afin de voir si de telles liaisons hydrogènes étaient compatibles avec les structures. Pour cela, nous avons imposé au complexe une symétrie C_3, symétrie observée par RMN proton (Fig 80). Nous avons aussi imposé une géométrie trigonale plane de type CuS_3 au cuivre(I) : nous avons fixé les distances Cu-S = 2.25 Å et les angles S-Cu-S de 120° connus de la littérature [170].

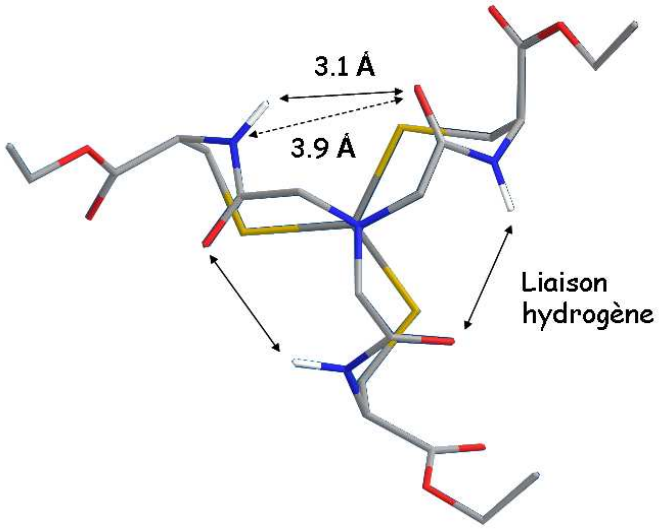


FIGURE 85 – Modélisation par le logiciel Chem3D du complexe Cu-NTA(Cys(OEt))$_3$ en imposant une symétrie C_3 et une coordination CuS_3. Visualisation des trois liaisons hydrogènes (en jaune atome S, en rouge atome O, en bleu atome N et en blanc atome H).

Par cette modélisation, nous voyons tout d'abord que le système adopte aisément un environnement trigonal pour le cuivre(I) tout en gardant une symétrie C_3 pour le ligand. Les distances $NH_{bras(i)}$- - -O=$C_{bras(i+1)}$ sont en accord avec l'existence de liaisons hydrogènes faibles (Fig 85) comme le montre les données de la table 36 [262] [263].

	Simulation Chem3D	Valeurs théoriques [262] [263]
dist(H- - -O=C)Å	3.1	2.2-3.2
dist(N(H)- - -O=C)Å	3.9	3.2-4.0
angles NH- - -O=C, °	137	90-150

TABLE 36 – Caractéristiques des liaisons hydrogènes

La symétrie C_3 du complexe en solution peut également n'être qu'une symétrie apparente moyenne entre des conformères de plus basse symétrie, dans lesquels seulement deux liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes seraient formées (rapprochement de deux bras du tripode).

11.2.6 Affinité des tripodes pour le cuivre(I)

Les mesures d'affinité ont été réalisées, comme énoncé précédemment (cf 11.1.3), en utilisant un compétiteur le BCS [35] [201]. Les complexes de cuivre(I) (0.9 eqv. de Cu^+) ont été préformés et du BCS a été ajouté. Le suivi UV-visible a été réalisé en BAG en tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v= 9/1), pH 7.4.

Les espèces polynucléaires qui se forment dans le cas du NTA(Cys(OH))$_3$ ne sont pas précisément connues et les constantes d'affinités ne peuvent donc être calculées. Une comparaison du nombre d'équivalents de BCS qu'il faut ajouter au complexe de cuivre(I) pour pouvoir déplacer 50% de ce dernier permet néanmoins de comparer qualitativement les trois ligands.

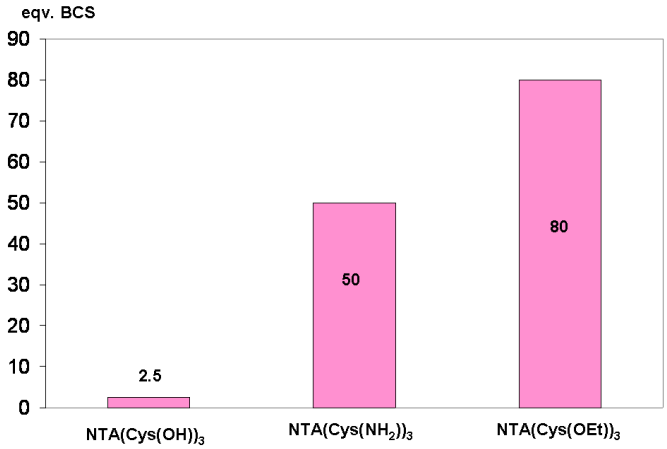


FIGURE 86 – Nombre d'équivalents de BCS, par rapport aux ligands, nécessaire pour déplacer 50% de cuivre(I), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4

Les deux tripodes NTA(Cys(OEt))$_3$ et NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ présentent une affinité largement supérieure à celle du NTA(Cys(OH))$_3$ pour le cuivre(I) (Fig 86). Ce dernier a aussi une affinité plus basse que les dérivés NOTA et EDTA (dans les mêmes conditions, 10 eqv. de BCS nécessaires). Cette différence d'affinité peut s'expliquer par la présence des trois fonctions carboxyliques. En effet, comme nous l'avons vu pour P^2, ces fonctions à pH 7.4 sont déprotonnées et chargées négativement. Il peut donc y avoir des répulsions de charges entre les trois carboxylates, qui déstabilisent ainsi les complexes de cuivre(I).
Les deux tripodes dérivés ester et amide ont par contre des affinités similaires. En effet, pour le NTA(Cys(OEt))$_3$, il faut ajouter 80 eqv. de BCS sur le complexe CuL pour pouvoir déplacer 50% de cation métallique et il en faut 50 eqv. dans le cas du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$. Nous avons démontré qu'à 0.9 eqv. de Cu$^+$, ces tripodes forment un complexe mononucléaire CuL, les constantes d'affinité apparentes logβ_{11} à pH = 7.4 peuvent donc être calculées selon l'équation 29 :

$$CuL + 2BCS^{2-} = L + Cu(BCS)_2^{3-} \tag{29}$$

Les constantes apparentes logβ_{11} à pH = 7.4 pour les deux tripodes amide et ester sont très proches, respectivement de 18.8 et 19.2 (Table 37) même s'il semble que le dérivé amide ait une affinité légèrement plus basse à pH = 7.4. Par contre, si on compare ces deux constantes apparentes avec celle obtenue pour P^C [201], il est clair que ces deux chélateurs ont une affinité nettement supérieure aux cyclodécapeptides modèles de la boucle de liaison des métallochaperonnes du vivant comme Atox1. L'environnement CuS$_3$ permet

donc d'obtenir des complexes nettement plus stables. De plus, la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires au sein du complexe CuL contribue également à sa stabilité.

CuL	NTA(Cys(OEt))$_3$	NTA(Cys(NH$_2$))$_3$	P^C (mime d'Atx1)
log $\beta^{app}_{pH7.4}$	19.2	18.8	17.4
log β_{110}	23.6*	24.5*	20.1**

TABLE 37 – Constantes apparentes logβ_{11} pour les complexes CuL à pH = 7.4, et constantes logβ_{110} calculées à partir des valeurs des pKa mesurés*, (**, calculée avec des valeurs de pKa classiques de cystéines dans des peptides à savoir 9 et 8.5)

11.2.7 Comparaison aux chélateurs connus

Nous avons élaboré des chélateurs possédant une très forte affinité pour le cuivre(I) comparé à P^C. Mais qu'en est-il si on les compare aux chélateurs connus, à savoir la D-Pen et le BAL ?
Dans la littérature, peu de données sont rapportées sur les affinités de ces chélateurs pour le cuivre (base de données de Smith et Martell [264]). Des études de spectroscopie UV-visible et de masse, sur ces chélateurs commerciaux, ont été réalisées au laboratoire et mettent en évidence un comportement compliqué de ces ligands par la formation de plusieurs espèces polynucléaires avec le cuivre(I).
Afin d'évaluer l'affinité de ces chélateurs pour l'ion Cu$^+$, nous avons réalisé par UV-visible des compétitions en présence de BCS (Figure 87).

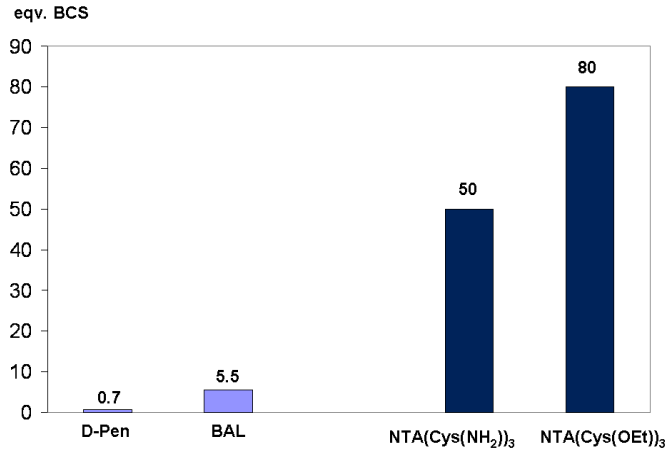


FIGURE 87 – Nombre d'équivalents de BCS, par rapport au ligand, nécessaires pour déplacer 50% de cuivre(I), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4

Les deux tripodes montrent là aussi une très forte affinité (dans le cas du dérivé ester, 16 fois plus d'eqv. de BCS par rapport au BAL et 80 fois plus par rapport à la D-Pen) pour le cuivre(I) comparée aux chélateurs commerciaux connus et utilisés pour la maladie de Wilson.

11.3 Conclusion sur la complexation de ces cinq podands vis-à-vis du cuivre(I)

Dans cette partie, nous avons vu que les deux podands NOTA(Cys(OEt))$_3$ et EDTA(Cys(OEt))$_4$ ont un comportement compliqué vis-à-vis du cuivre(I) et forment des espèces polynucléaires en solution. Leur affinité pour ce cation métallique n'est pas très forte.
Le tripode NTA(Cys(OEt))$_3$ possède, quant à lui, une prédisposition à former un complexe mononucléaire avant 1 eqv. de cuivre(I) et un complexe polynucléaire $(Cu_2L)_x$ avec x = 3 en excés de Cu^+. Cette prédisposition à former un complexe mononucléaire CuL a aussi été observée dans le cas du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$. Des études complémentaires par RMN permettent de suggérer que cette capacité à former une espèce mononucléaire CuL, vient de la parfaite adaptation du ligand à la coordination trigonale du cuivre(I). La structure du complexe est en effet stabilisée par un réseau de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les NH et les CO situés dans la partie supérieure du complexe mononucléaire. La stabilité d'un tel complexe entraîne une forte affinité pour le cuivre(I), plus forte que celle obtenue pour P^C. La présence de carboxylates sur le NTA(Cys(OH))$_3$, qui semble induire comme pour P^2 une instabilité des complexes (répulsion de charge), et la formation de complexes en solution non définis, entraînent une affinité plus faible pour le cation métallique souhaité.
En résumé, nous avons donc élaboré de nouveaux chélateurs capables de former en proportion stœchiométrique un complexe CuL présentant une affinité pour Cu^+ largement supérieure à celle des chélateurs connus de ce cation comme le BAL ou la D-Pen.

12 Complexation du mercure(II)

Nous avons vu (cf. 3.2.3) que le mercure(II) appréciait dans certains cas un environnement trigonal HgS_3. Voyons si les tripodes synthétisés peuvent favoriser cet environnement comme les peptides TRI développés par Pecoraro et coll [188].

12.1 Famille NTA

Nous venons de voir que les deux tripodes NTA(Cys(OEt))$_3$ et NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ formaient des complexes mononucléaires avec le cuivre(I) où celui-ci adopte une géométrie trigonale. Ces complexes bénéficient dans leur partie supérieure d'un réseau de liaisons hydrogènes intramoléculaires qui contribuent à la stabilité. Comme le cuivre(I) et le mercure(II) ont des propriétés similaires, nous pouvons espérer obtenir les mêmes résultats avec le cation Hg^{2+}.

12.1.1 Spectroscopie UV-visible

Les dosages UV-visible ont été faits en BAG en tamp. phos. 20 mM, pH = 7.4.

Nous avons vu dans le chapitre II que les complexes de type HgS_3 possèdent une bande LMCT caractéristique autour de 247 nm [190] [191]. Les dosages réalisés sur les trois tripodes dérivés du NTA montrent clairement une bande à 243 nm. Deux autres bandes sont à noter, une vers 290 nm et une plus ou moins prononcée à 223 nm. Ces trois bandes croissent jusqu'à 1 eqv. de cation métallique. Ces bandes sont aussi observées dans le cas des peptides TRI [193] et dans le cas de MerR [186]. De plus, les coefficients d'extinction molaire mesurés pour ces trois bandes LMCT dans le cas des trois tripodes sont en accord avec les valeurs décrites dans la littérature pour des systèmes HgS_3 (Table 38). Les deux tripodes $NTA(Cys(OEt))_3$ et $NTA(Cys(NH_2))_3$ présentent des valeurs de cœfficients d'extinction molaire relativement proches, le $NTA(Cys(OH))_3$ a, quant à lui, des valeurs un peu plus faibles surtout pour la bande LMCT à 243 nm.

Systèmes	Bandes LMCT (nm)	coefficient d'extinction (M^{-1} cm^{-1})
Hg-$NTA(Cys(OEt))_3$	223	16 800
	243	15 400
	290	5730
Hg-$NTA(Cys(NH_2))_3$	223	16 780
	243	15 670
	290	6250
Hg-$NTA(Cys(OH))_3$	223	16 490
	243	11 690
	290	4760
^{a}Hg-$(TRIL12C)_3{}^-$	230	21 300
	247	15 000
	297	5500

TABLE 38 – Caractéristiques UV-visible des systèmes HgL pour les trois tripodes, à pH = 7.4, tamp. phos. 20 mM,^{a} [193]

En excès de mercure(II), nous observons la disparition des bandes à 243 et 290 nm caractéristiques de l'environnement HgS_3. Une seconde rupture a ainsi lieu à 1.5 eqv. Cette évolution est caractéristique du passage de l'environnement HgS_3 à HgS_2 en excès de mercure(II) (complexes de type $(Hg_3L_2)_x$ en solution qui ont tendance à précipiter).

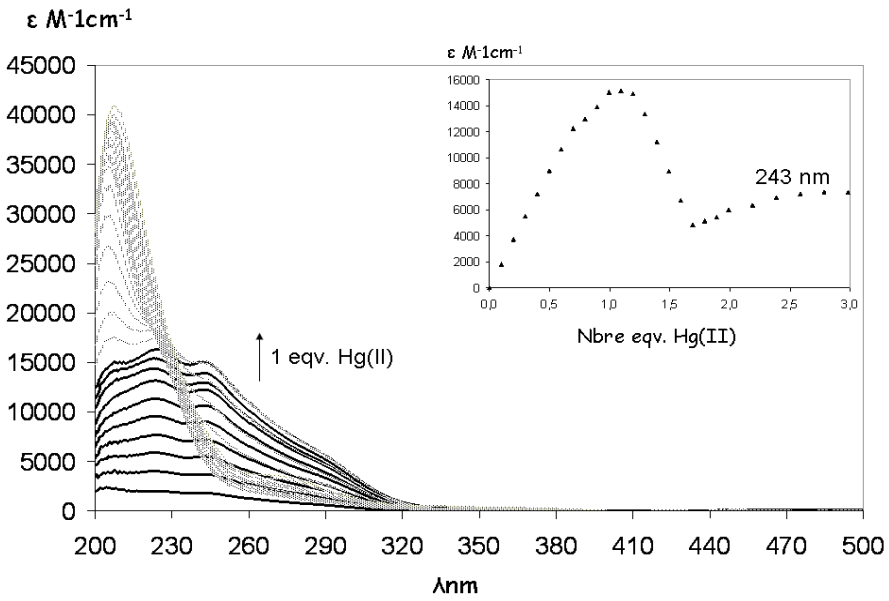


FIGURE 88 – Dosage UV-visible du NTA(Cys(OEt))$_3$ par Hg(II), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Lig] = 35 μM

En résumé, la présence de la bande LMCT à 243 nm avec un ϵ^{243nm} autour 15 000 M^{-1} cm^{-1} indique la formation de complexes HgS_3. Il semble donc qu'un complexe mononucléaire soit formé en proportion stœchiométrique pour les trois tripodes. En excès de cation métallique, une évolution vers un environnement bicoordiné HgS_2 dans des complexes $(Hg_3L_2)_x$ est observée.

12.1.2 Analyse des spectres protons et mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé

Les échantillons ont été préparés en BAG, en tampon phosphate D_2O 20 mM/CD_3CN (v/v = 9/1), pH 7.4. Les mesures ont été faites à 500 MHz.

L'analyse des spectres protons confirme la formation d'espèces mononucléaires HgL pour les tripodes NTA(Cys(OEt))$_3$ et NTA(Cys(NH_2))$_3$. En effet, celle-ci révèle un spectre proton différent de celui du ligand libre et parfaitement défini pour 1 eqv. de cation métallique (Fig 89). Les deux spectres des complexes HgL présentent une symétrie C_3 et montrent eux aussi un éclatement des signaux des systèmes ABX et AB des protons H_β et CH_2 près de l'azote apical (Table 39). Il semblerait que les complexes HgL possèdent une rigidité similaire à celle des complexes CuL.

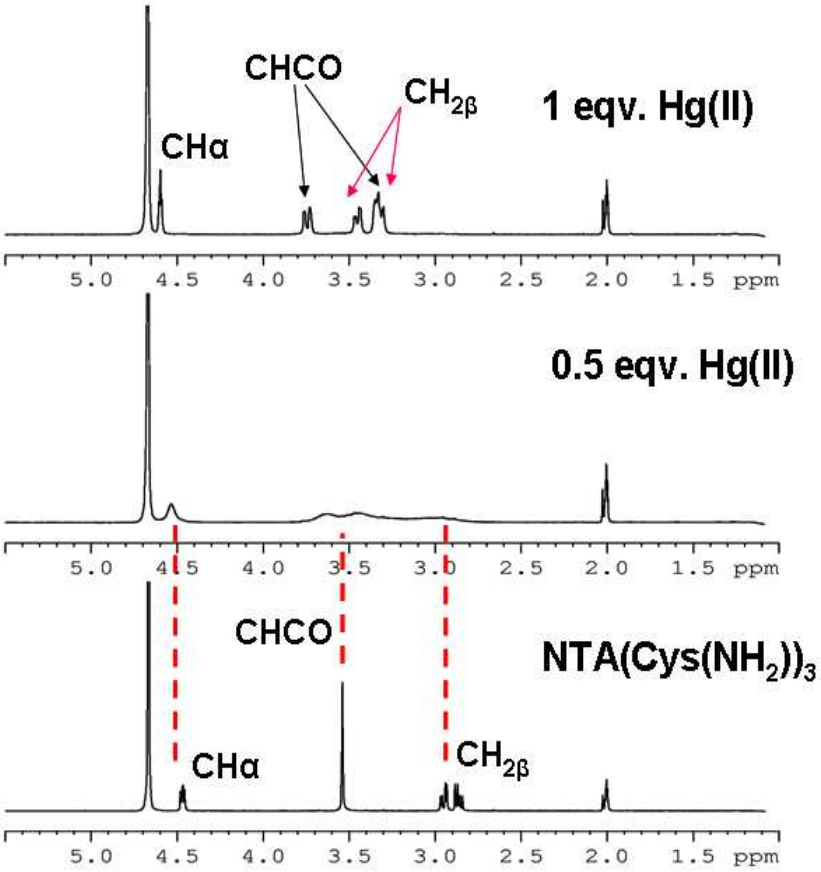


FIGURE 89 – Comparaison des spectres du NTA(Cys(NH_2))$_3$ et du complexe Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$, dans tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz, 298 K

Δppm	NCH_2-CO	$CH_2\beta$-SH
L^1 : NTA(Cys(OEt))$_3$	0.06	0.06
HgL^1	0.65	0.53
L^2 : NTA(Cys(NH_2))$_3$	0	0.09
HgL^2	0.43	0.15

TABLE 39 – Différence de déplacements chimiques observée pour les protons NCH_2-CO et $CH_2\beta$-SH au sein du ligand libre et du complexe de mercure, tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz

Cependant, l'éclatement des signaux des H_β est moins prononcé dans le cas du complexe Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$.
Notons aussi que Hg^{2+} semble être plus labile au sein du complexe Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$ que dans le complexe Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ pour lequel un équilibre lent entre la forme libre du ligand et la forme complexée est observé. Cet équilibre lent est mis en évidence par la cœxistence des deux espèces à 0.5 eqv. Cela n'est pas observé pour le ligand

NTA(Cys(NH_2))$_3$ dont le spectre très large ne s'affine qu'à 1 eqv. de cation Hg^{2+}. Nous avons dans ce cas un équilibre rapide entre la forme libre et la forme complexée. Par ailleurs, même si l'équilibre est lent dans le cas du ligand NTA(Cys(OEt))$_3$, il est cependant plus rapide que celui observé entre le ligand libre et le complexe CuL. En effet, à 0.5 eqv. le spectre du complexe mononucléaire HgL est moins fin que celui du complexe CuL ; la même tendance est observée dans le cas du NTA(Cys(NH_2))$_3$.
Les spectres protons enregistrés lors des ajouts de cation Hg^{2+} sur le ligand NTA(Cys(OH))$_3$ montrent une dynamique rapide en solution, avec présence de signaux larges non affinés à 1eqv. de Hg(II).

Afin de vérifier la molécularité des espèces en solution, nous avons réalisé des mesures de cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé [259] [260] [201] [258].
La mesure des cœfficients de diffusion montre clairement la formation de complexes mononucléaires avec les trois tripodes dérivés du NTA (Table 40).

	L^1 :NTA(Cys(OEt))$_3$		L^2 :NTA(Cys(NH_2))$_3$		L^3 :NTA(Cys(OH))$_3$	
	L^1	HgL^1	L^2	HgL^2	L^3	HgL^3
D $\times 10^{-10}$(m^2 s^{-1})	3.20(4)	2.75(4)	3.41(4)	2.98(4)	3.0(4)	2.60(4)
Masse théorique	585	782	497	695	500	698
Masse expérimentale		922(75)		738(56)		768(66)

Table 40 – Mesures des cœfficients de diffusion pour les complexes Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$, Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ et Hg-NTA(Cys(OH))$_3$, tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz, 298 K

En excès de mercure(II) et à la concentration nécessaire à l'aquisition des spectres (1-2 mM), les espèces en solutions précipitent et le milieu se trouble légèrement, une analyse est donc difficile par RMN proton.

12.1.3 Complexes HgL visualisés par ES-MS

Les échantillons ont été préparés en tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH = 7.0.

Les spectres de masse confirment la formation d'espèces mononucléaires dans le cas des trois tripodes dérivés du NTA (Table 41, Fig 90).

Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$		Hg-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$	Hg-NTA(Cys(OH))$_3$	
(-)ESMS	(+)ESMS	(-)ESMS	(-)ESMS	(+)ESMS
783	785	696.0	699	701

TABLE 41 – Complexes Hg-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$, Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ et Hg-NTA(Cys(OH))$_3$, enregistrés par ES-MS, tamp. acétate d'ammonium 20 mM, pH = 7.0, 298 K

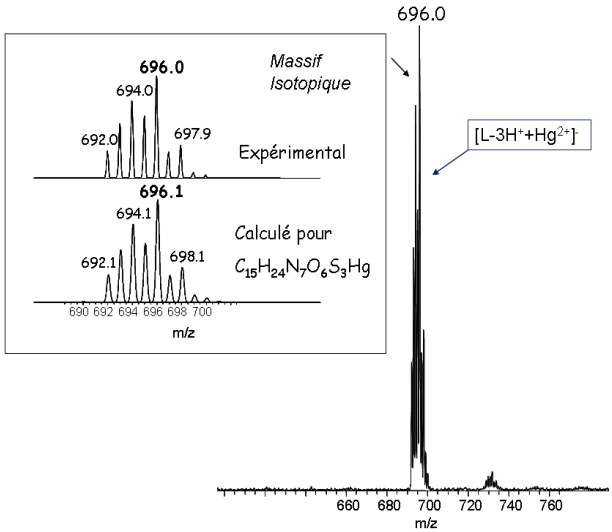


FIGURE 90 – Spectre de masse du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ + 1 eqv. de Hg^{2+}, tamp. acétate d'ammonium, 298 K, pH 7, enregistré en mode négatif

En excès de mercure, la formation de complexes multinucléaires est observée.
En conclusion de ces trois parties, nous avons formation d'une espèce mononucléaire HgL dans le cas des trois tripodes. Au sein de ce complexe, le mercure semble bien adopter une géométrie trigonale (bande à 247 nm avec $\epsilon \approx 15\ 000$ M^{-1} cm^{-1}). Les spectres protons soulignent, dans le cas des dérivés ester et amide, une rigidité apparente du complexe mononucléaire (éclatement de certains signaux). Voyons si cette rigidité est due à la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires.

12.1.4 Mise en évidence de liaisons hydrogènes intramoléculaires par RMN proton

Les mesures ont été faites en utilisant la méthode de suppression de solvant watergate, à 500 MHz. Les échantillons ont été préparés en BAG en tamp. phos. 20 mM $H_2O/D_2O/CD_3CN$ (v/v/v = 8/1/1), pH = 7.4

La détermination des cœfficients de température souligne l'existence de liaisons

hydrogènes intramoléculaires impliquant les protons NH des amides dans la partie supérieure des complexes mononucléaires de Hg(II) (Table 42).

NH/NH_2	$\lvert\frac{\Delta\delta ppm}{\Delta T}\rvert$, ppb/K
NH(L^1)	7.1
NH(HgL^1)	**1.9**
NH(L^2)	6.4
NH(HgL^2)	**0.1**
NH_2(L^2)	6.7
NH_2(HgL^2)	5.9
NH_2(L^2)	6.8
NH_2(HgL^2)	4.8

TABLE 42 – Cœfficients de température pour les ligands libres et les complexes HgL avec L^1 = NTA(Cys(OEt))$_3$ et L^2 = NTA(Cys(NH_2))$_3$, dans $H_2O/D_2O/CD_3CN$ (v/v/v = 8/1/1), pH = 7.1-7.2, 500 MHz, 278-318 K

Notons que le cœfficient de température du NH dans le complexe Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$ est plus faible que celui dans le complexe du NTA(Cys(OEt))$_3$. Cependant nous ne pouvons conclure sur la force de la liaison hydrogène.
En résumé, nous formons des complexes mononucléaires où le mercure acquiert une géométrie trigonale et où la complexation de ce cation métallique favorise la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires (dans le cas des dérivés ester et amide). Nous allons donc évaluer la stabilité de ces complexes vis-à-vis du pH.

12.1.5 Formation de complexes HgS_2-HgS_3 détermination du pKa de la troisième cystéine

Il a été démontré que les complexes de type HgS_3 évoluent vers la formation de complexe HgS_2 quand le pH diminue. En effet, l'environnement linéaire bicoordiné est largement préféré par Hg^{2+}. La formation d'un complexe où le mercure possède un environnement trigonal dépend du pKa de la troisième cystéine. En effet, cette valeur de pKa pousse la réaction vers la formation du complexe de type HgS_3. Plus cette valeur est basse, plus le complexe HgS_3 est privilégié (Fig 91, équation 30) [190] [265].

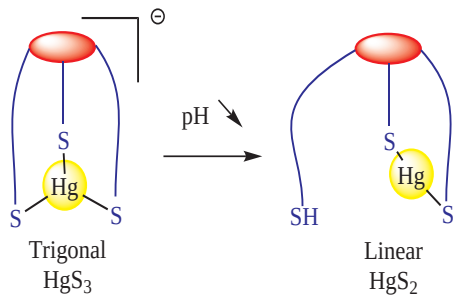


FIGURE 91 – Schématisation du passage de HgS_3 à HgS_2 selon le pH

Les mesures ont été réalisées en BAG. Les échantillons ont été préparés dans H_2O.

Le complexe de mercure est préformé et des ajouts de HCl sont réalisés suivi d'un retour par ajouts de KOH. Le pH est mesuré après chaque ajout de base ou d'acide et la formation de la bande LMCT $S^- \rightarrow Hg^{2+}$ à 243 nm, caractéristique du complexe HgS_3, est suivi par UV-visible (Fig 92). Les données sont ensuite traitées par le logiciel SPECFIT, en considérant toutes les espèces colorées, selon l'équation 30 :

$$[HgS_2RSH] = [HgS_3R] + H^+ \tag{30}$$

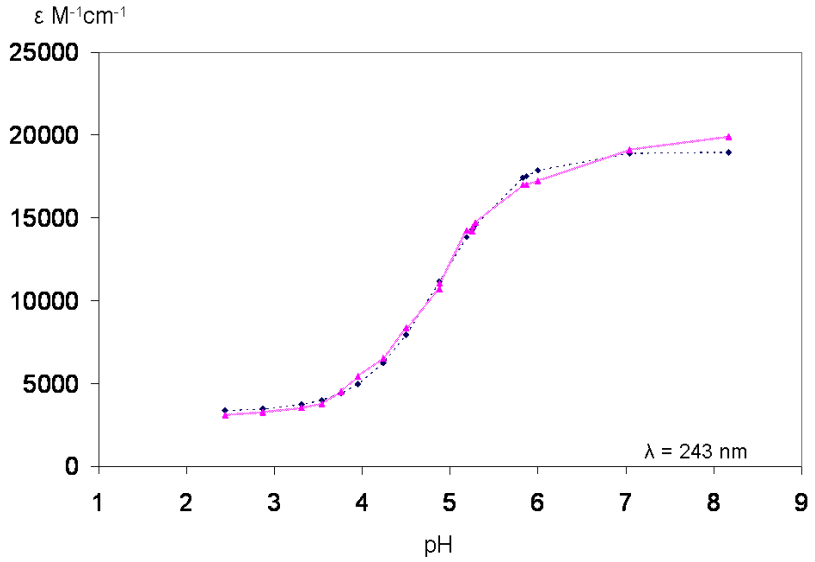


FIGURE 92 – Evolution de la bande LMCT à 243 nm en fonction du pH, pour le complexe Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ dans H_2O, $2.4 < pH < 8.2$, [Ligand] = 45 μM, courbe expérimentale en bleu (linaire parsemée), courbe théorique en rose et pointillées

Les valeurs de pKa de la troisième cystéine, dans le complexe de mercure, sont répertoriées table 43. Comme observé par Farrer et coll. [190], le cation métallique mercure(II) influence la valeur de pKa de ce thiol. En effet, cette valeur est plus basse que la valeur (pKa_3) de ce même thiol dans le ligand libre.

Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$	Hg-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$	Hg-NTA(Cys(OH))$_3$
4.9	6.8	8.0

TABLE 43 – Valeur du pKa de la troisième cystéine au sein des complexes Hg-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$, Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ et Hg-NTA(Cys(OH))$_3$, dans H_2O, $2.4 < pH < 10.5$

La valeur du pKa du complexe Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ est nettement plus basse que celles des deux autres complexes HgL. Ce complexe est donc beaucoup plus stable et se forme plus facilement car le thiol a tendance à perdre un proton aisément. Nous pouvons aussi remarquer que les pKa sont dans le même ordre que les pKa$_3$ des ligands libres. En effet, le complexe Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ possède la valeur la plus basse. Cela s'explique par la présence du groupement ester qui est plus électro-attracteur. Bien que le mercure influence la valeur du pKa de la troisième cystéine, son acidité reste en accord avec celle du ligand libre.
Connaissant le pKa de cette troisième cystéine au sein du complexe de mercure, nous avons réalisé des mesures de RMN ^{199}Hg en fonction du pH afin de bien visualiser la présence des espèces de type HgS_2 et HgS_3.

12.1.6 Confirmation de la coordination du Hg^{2+} par RMN ^{199}Hg

Nous avons vu dans la partie 3.2 du manuscrit que la RMN ^{199}Hg est un outil très utile pour déterminer la coordination du métal dans les sites de liaisons des protéines [149]. Nous avons obtenu l'environnement de coordination du métal par corrélation entre le déplacement chimique des complexes souhaités avec les tables de composés décrits [187] [199] [192]. Connaissant les pKa des trois complexes de mercure, les échantillons ont été préparés au pH adéquat afin de former essentiellement l'espèce voulue. Les complexes Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ et Hg-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ n'ont pu être étudiés à pH faible car ils précipitent pour pH < pKa et à la concentration nécessaire à l'aquisition des spectres (3 mM). Cependant, les résultats obtenus confirment la formation d'espèce de type HgS_3 en milieu basique (pH > pKa) et de type HgS_2 en milieu acide (dans le cas du dérivé acide). En effet, nous obtenons pour les dérivés NTA ester et amide des déplacements chimiques respectivement de -255 ppm et -273 ppm à pH élevé (Fig 93).

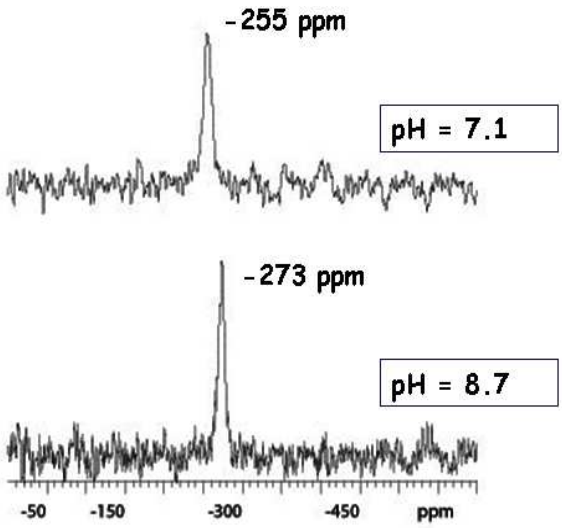


FIGURE 93 – Déplacement chimique du ^{199}Hg dans les complexes Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ (en haut, pH = 7.1 [Hg] = 1.81 mM, $H_2O/AcN/D_2O$ (v/v/v = 8/1/1) et Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$ (en bas, pH = 8.7, [Hg] = 1.98 mM, H_2O/D_2O (v/v = 9/1)), 71.6 MHz

Il a été montré par Utschig et coll. que le déplacement chimique du mercure dans un environnement de type HgS_2 était de -800 à -950 ppm et celui pour un système HgS_3 de -90 à -150 ppm [187](δ(MerP) = -816 ppm [199], δ(MerR) = -106/-109 ppm [187]). Cette valeur a été affinée ensuite par Iranzo et coll. qui obtiennent pour leur système TRILXC des valeurs de déplacements chimiques de -179 à -320 ppm (pour (Hg-TRILXC)$_3$) et de -830 à -950 ppm (pour (Hg-TRILXC)$_2$) [192] [266].
Les valeurs obtenues pour les complexes Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ et Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$ sont donc en accord avec une coordination de type HgS_3 comme observé par spectroscopie UV-visible (Table 44).

Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$	Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$	^{a}Hg(TRIL19C)$_3^-$	^{b}Hg(-MerR)
-255	-273	-316	-106/-109

TABLE 44 – Valeurs des déplacements chimiques par RMN de ^{199}Hg des complexes Hg-NTA(Cys(NH_2))$_3$ (pH = 8.7, H_2O/D_2O (v/v = 9/1)), Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ (pH = 7.1) et comparaison à des systèmes de référence, ^{a} = [192] , ^{b} = [187]

Le complexe Hg-NTA(Cys(OH))$_3$ a été caractérisé à la fois en milieu acide et basique. Les valeurs obtenues correspondent aux deux types de coordination attendue à savoir HgS_2 à bas pH et HgS_3 à pH élevé. Cependant nous observons la présence de deux signaux à pH élevé tous deux dans la gamme des déplacements chimiques caractéristiques d'un environnement HgS_3 (Fig 94). A pH 9.37, les trois acides carboxyliques sont déprotonnés et peuvent donc participer à la coordination du mercure. Les deux déplacements chimiques observés correspondent donc probablement à des environnement HgS_3 du métal avec par-

ticipation ou non d'un carboxylate (COO^-).

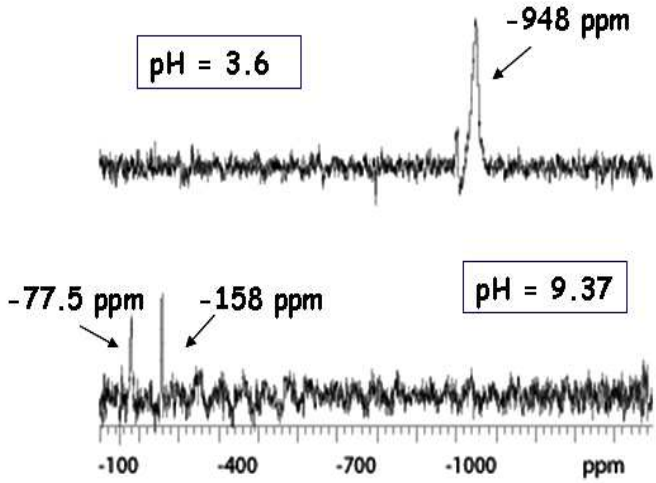


FIGURE 94 – Déplacements chimiques par RMN^{199}Hg du complexe Hg-NTA(Cys(OH))$_3$ (en haut, pH = 3.6 [Hg] = 1.83 mM, en bas, pH = 9.37, [Hg] = 1.9 mM), H_2O/D_2O (v/v = 9/1), 71.6 MHz

12.1.7 Affinité de ces tripodes pour le mercure(II)

L'affinité des tripodes dérivés du NTA pour le mercure a été évaluée en utilisant un compétiteur dont l'affinité pour le mercure(II) est connue, à savoir l'EDTA. La constante d'affinité apparente à pH = 7.4 du complexe Hg(EDTA) est logβ(HgEDTA) = 18.7 [264]. Afin de calculer la constante apparente des trois complexes mononucléaires souhaités, ces derniers ont été préformés (0.9 eqv de Hg^{2+}) et des aliquots d'EDTA ont été ajoutés. La bande LMCT $S^- \rightarrow Hg^{2+}$ à 290 nm caractéristique du complexe ne diminue pas ou peu (pour le dérivé acide) après ajout de 60 eqv. d'EDTA. La constante d'affinité apparente de ces complexes a été évaluée en considérant moins de 5% de mercure déplacé pour les dérivés ester et amide et 10% de Hg^{2+} déplacé pour le dérivé acide. Les données sont répertoriées table 45.

Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$	Hg-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$	Hg-NTA(Cys(OH))$_3$
> 22.7	> 22.6	> 22.1

TABLE 45 – Constantes apparentes log$\beta_{11}^{pH=7.4}$ des complexes Hg-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$ et Hg-NTA(Cys(OH))$_3$, 298 K, tampon phosphate 20 mM (10% en volume d'AcN pour le dérivé ester), pH 7.4

12.1.8 Conclusion Famille NTA et complexation Hg^{2+}

En résumé, nous formons des complexes mononucléaires HgL pour les trois ligands pour 1 eqv. de Hg^{2+}. Au sein de ces complexes, nous retrouvons des résultats similaires à ceux observés avec les peptides TRI décrits par Pecoraro et coll. à savoir, une coordination pour Hg^{2+} de type HgS_2 en milieu acide et une coordination de type HgS_3 en milieu basique. Le pH de formation de ce dernier dépend de la capacité de la troisième cystéine du tripode à se déprotonner (pKa). La valeur de ce pKa est influencée à la fois par le mercure qui est tout proche de la fonction thiol et par la fonction adjacente du thiol (ici ester, amide, acide carboxylique).
Les complexes formés, offrant un environnement HgS_3 au mercure, sont très stables. La formation d'un complexe mononucléaire, rigidifié par cette architecture podante, est stabilisée par la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires dans le cas des tripodes NTA dérivés ester et amide (aussi observée pour les dérivés ester et amide pour le cuivre(I)).
En excès de cation métallique, les données observées indiquent l'évolution de ce complexe mononucléaire vers des espèces $(Hg_3L_2)_x$ dans lequel le mercure(II) est bicoordiné (HgS_2). En effet, contrairement aux triples hélices Hg(TRILXC) décrites par Pecoraro et coll., dans lesquelles le mercure(II) est très protégé par les hélices peptidiques, les complexes Hg-NTA(Cys(X))$_3$ restent très ouverts et évoluent en excès de Hg(II).

12.2 Complexation du mercure(II) par le ligand NOTA(Cys(OEt))$_3$

12.2.1 Spectroscopie UV-visible

Les mesures de spectroscopie UV-visible mettent aussi en évidence la formation d'un complexe HgS_3 par la présence de la bande LMCT à 247 nm. Deux autres bandes LMCT sont présentes à 212 et 290 nm. Les cœfficients d'extinction molaire mesurés pour ces trois bandes sont cohérents avec ceux trouvés pour les tripodes dérivés du NTA (Table 46).

Systèmes	Bandes LMCT (nm)	coefficient d'extinction molaire (M^{-1} cm^{-1})
Hg-NOTA(Cys(OEt))$_3$	212	15 740
	243	13 920
	290	2550
Hg-NTA(Cys(OEt))$_3$	223	16 800
	243	15 400
	290	5730

Table 46 – Caractéristiques UV-visible du complexe Hg-NOTA(Cys(OEt))$_3$ à pH = 7.4, tamp. phos. 20 mM

Seul le cœfficient à 290 nm est plus faible que la valeur attendue. Les trois bandes à 290 et 243 nm ont une rupture à 1 eqv. de cation métallique. Le tripode NOTA(Cys(OEt))$_3$ semble former un complexe mononucléaire de type HgS_3 en proportion stœchiométrique et des complexes plus compliqués de type $(Hg_3L_2)_x$, en excès de Hg^{2+}, dans lequel le mercure(II) est bicoordiné (HgS_2).

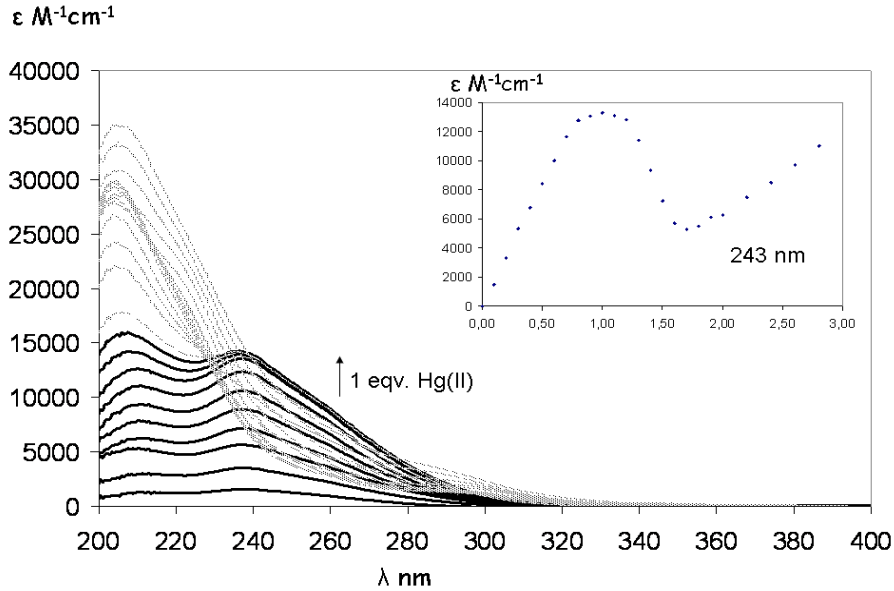


FIGURE 95 – Dosage UV-visible du NOTA(Cys(OEt))$_3$ par Hg(II), dans tamp. phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH = 7.4, [Lig] = 35 μM

12.2.2 Mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradients de champ pulsé et analyse des spectres protons

Les échantillons RMN ont été faits en tampon phosphate 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1) à pH 7.4, 298 K, 500 MHz.

Le spectre proton, observé par RMN, est fin et bien résolu et indique la formation d'un complexe HgL à 1 eqv. de Hg^{2+} (Fig 96). Notons qu'avant un équivalent de cation métallique, les spectres protons présentent des signaux larges, signe d'un équilibre rapide entre la forme libre du ligand et la forme complexée (labilité de Hg^{2+}).

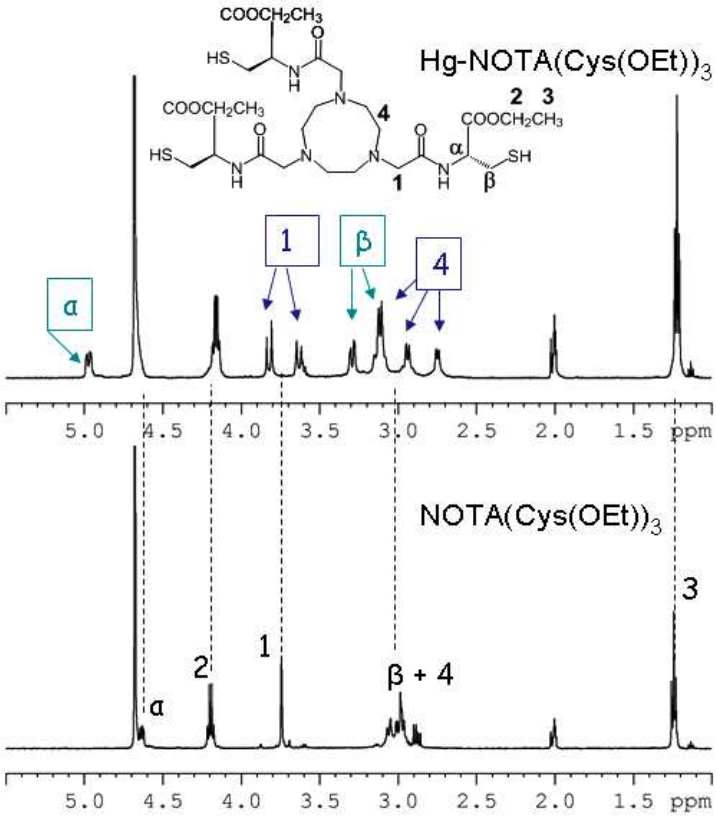


FIGURE 96 – Spectre RMN ^{1}H du ligand NOTA(Cys(OEt))$_3$ (en bas) et celui du complexe HgL correspondant (1 eqv. de Hg(II)), dans tamp. phos. 20 mM/CD_3CN (v/v = 9/1), pH 7.4, 500 MHz

Les mesures de cœfficients de diffusion confirment l'existence d'une espèce mononucléaire HgL à 1 eqv. de Hg^{2+} (D(L) = 3.02(4)$\times 10^{-10}$ m^2 s^{-1}, M(L) = 697 ; D(HgL) = 2.96(4)$\times 10^{-10}$m^2 s^{-1}, M(HgL$_{exp}$) = 740(59), M(HgL$_{cal}$) = 897).

12.2.3 Formation du complexe HgL visualisé par ES-MS

Les complexes ont été préformés en BAG et préparés en tampon acétate d'ammonium/AcN (v/v = 9/1), pH 7.0

Ce complexe mononucléaire a aussi été mis en évidence par spectrométrie de masse, il désorbe à 1 eqv. de Hg^{2+}, $[L\text{-}3H^+ + Hg^{2+}]^-$ = 895.2, $[L\text{-}H^+ + Hg^{2+}]^+$ = 897.3 (Fig 97).

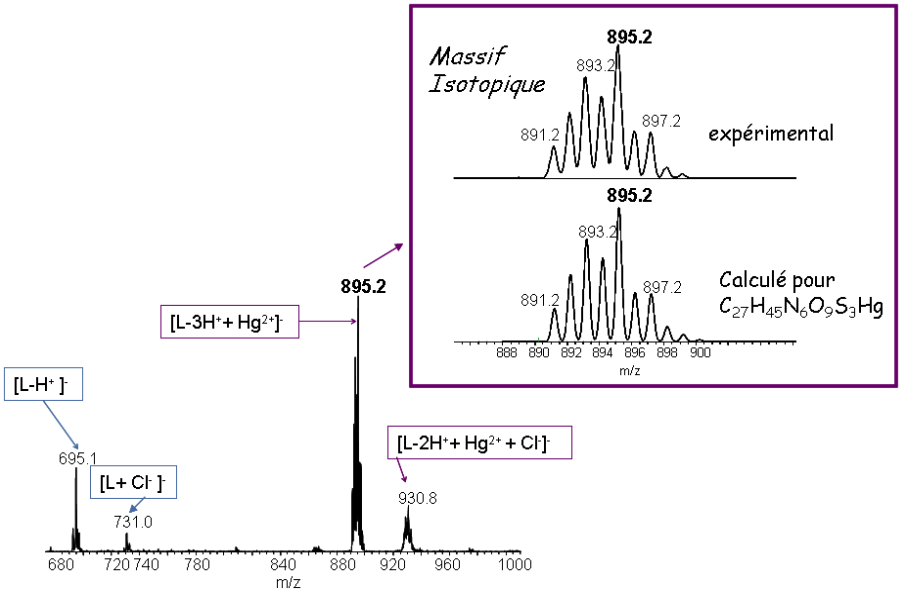


FIGURE 97 – Spectre de masse du complexe Hg-NOTA(Cys(OEt))$_3$ (1 eqv. de Hg(II)), dans tamp. acétate d'ammonium 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH 7.0, 298 K, mode négatif

En résumé, le tripode NOTA(Cys(OEt))$_3$ se comporte comme la famille des NTA et forme un complexe mononucléaire de mercure(II) pour un eqv. de ce dernier qui est visible par RMN proton. Il semble que le mercure possède, au sein du complexe, un environnement trigonal de type HgS_3 (bande LMCT à 243 nm cohérente).

13 Complexes des tripodes avec les métaux divalents, Pb^{2+}, Cd^{2+} et Zn^{2+}

13.1 Complexes de type $(ML)_x$ pour la famille NTA

13.1.1 Spectroscopie UV-visible

Les solutions ont été préparées en tampon phosphate 20 mM pH 7.4 pour les dosages avec Cd^{2+} et Zn^{2+}, de l'acétonitrile à 10% en volume a été ajouté pour le dérivé ester. Les solutions pour les dosages avec Pb^{2+} ont été préparées en tampon Bis-Tris 20 mM, pH 7.0 pour les mêmes raisons évoquées au chapitre II.

- **Dosage UV-visible par le Zn^{2+}**

Les dosages UV-visible réalisés sur les trois tripodes par ajouts de zinc(II), montrent l'apparition d'une bande LMCT à 210 nm qui croit et sature à 1 eqv. de Zn^{2+} (Fig 98). Le cœfficient d'extinction molaire pour les trois tripodes varie autour de 17 000-22 000 M^{-1} cm^{-1} (Table 47). Très peu de données existent sur la valeur des cœfficients d'extinction molaire de la bande LMCT $S^- \rightarrow Zn^{2+}$ en fonction de la coordination du zinc(II) et dans notre cas, on peut se demander si le Zn^{2+} adopte un environnement de type ZnS_3 ou de type ZnS_4.
Quelques exemples sont cependant décrits notamment sur des complexes peptidiques de type ZnS_2X_2 où ϵ^{220nm} varie entre 5200-6300 M^{-1} cm^{-1} [267] [268], et sur des complexes peptidiques de type ZnS_4 où ϵ^{220nm} = 17 000-20 000 M^{-1} cm^{-1} [268] [176] [269]. Ciuculescu et coll. proposent la formation d'un dimère pour la protéine APP en présence de zinc(II) (APP-Zn ($[S_3Zn]_2$, ϵ^{220nm} = 20 000 M^{-1} cm^{-1} et considèrent 6 000 M^{-1} cm^{-1} par cystéines liées au zinc(II) [198]).
Par comparaison entre les valeurs connues et celles mesurées lors des dosages UV-visible, nous pouvons supposer la formation d'une espèce de type $(ZnL)_x$, correspondant à une espèce mononucléaire avec une coordination ZnS_3 ou à une espèce binucléaire (formation d'un dimère comme observé pour APP-Zn) avec une coordination ZnS_4 ou encore à un équilibre entre les deux formes (Fig 99).

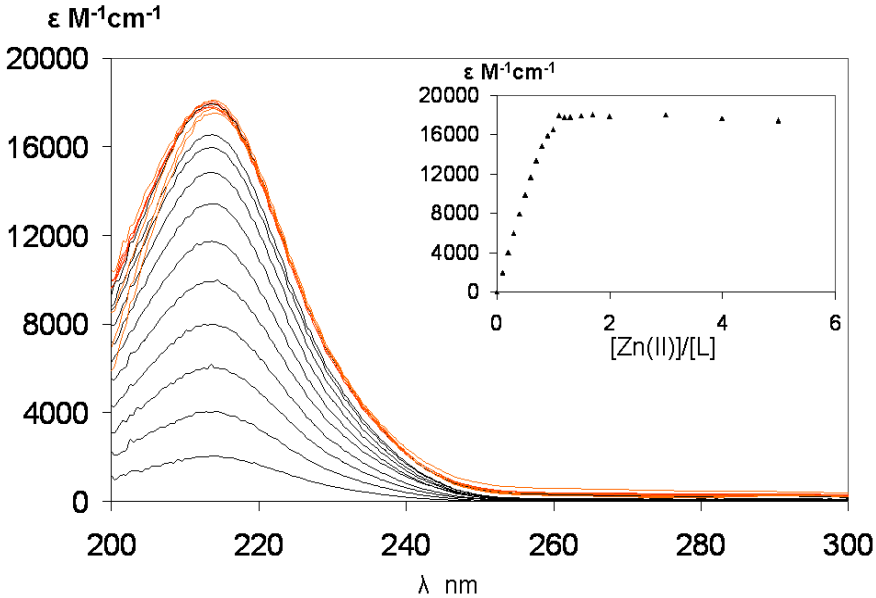


FIGURE 98 – Dosage UV-visible du $NTA(Cys(OH))_3$ par Zn^{2+}, dans tamp. phos. 20 mM, pH 7.4, [L] = 34 μM, 298 K

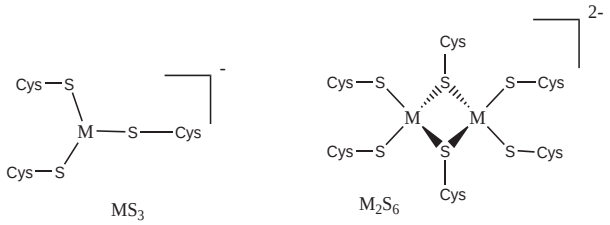


FIGURE 99 – Complexe envisagés : monomère ZnS_3 et le dimère Zn_2S_6

- **Dosage UV-visible par le Cd^{2+}**

Le Cd^{2+} et le Zn^{2+} possèdent des propriétés très similaires, la question de la coordination du Cd^{2+} au sein des tripode NTA est donc la même, coordination de type CdS_3 ou CdS_4 ? Les dosages UV-visible réalisés sur les trois tripodes en présence de Cd^{2+} mettent en évidence l'apparition d'une seule bande LMCT $S^- \rightarrow Cd^{2+}$ à 230 nm qui croit et sature à 1 eqv. de cation Cd(II) (Fig 100). Les cœfficients d'extinction molaire mesurés à cette longueur d'onde sont autour de 20 000-22 000 M^{-1} cm^{-1}. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés pour les complexes $Cd(P^1)_2$ et $Cd(P^C)_2$ [201] où l'ion métallique est entouré par quatre fonctions thiols ($Cd(P^2)$, ϵ^{220nm} = 10 000 M^{-1} cm^{-1}). Cependant, Matzapetakis et coll. décrivent avec leurs peptides TRI un environnement trigonal du cadmium(II) et trouvent un ϵ^{230nm} autour de 20 600 - 22 600 M^{-1} cm^{-1} [193]. A nouveau, les dosages UV-visible ne nous permettent pas de conclure sur la coordination du cadmium(II) au sein des complexes formés de type $(CdL)_x$.

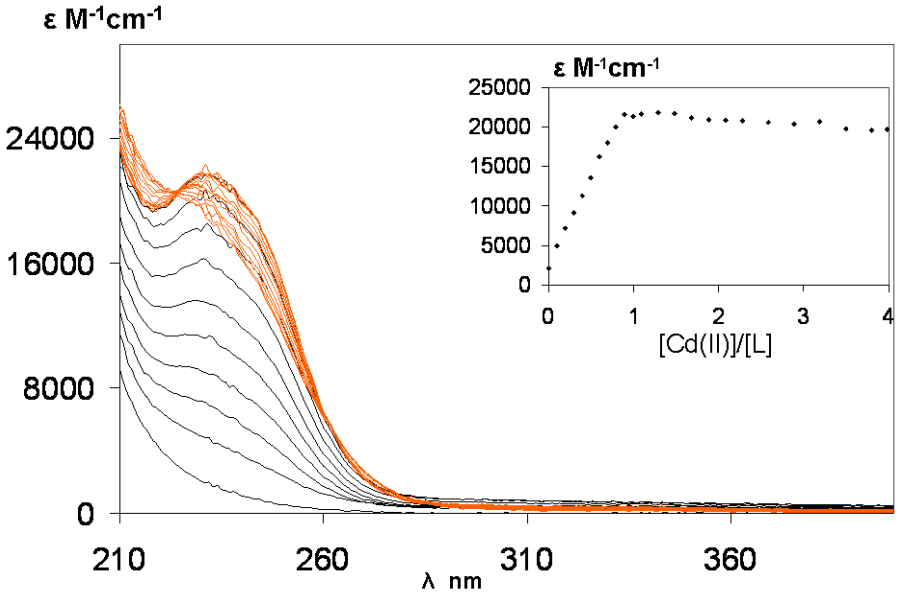


FIGURE 100 – Dosage UV-visible du $NTA(Cys(NH_2))_3$ par Cd^{2+}, dans tamp. phos. 20 mM, pH 7.4, [L] = 34 μM, 298 K

- **Dichroïsme circulaire avec le Cd^{2+}**

Le spectre dichroïque du cadmium(II) possédant un environnement trigonal diffère de celui où il adopte une géométrie tétraédrique, nous avons donc réalisé un dosage du $NTA(Cys(NH_2))_3$ par Cd^{2+}. Nous observons l'apparition d'une seule bande LMCT à 248 nm(-) qui croit jusqu'à 1 eqv. de Cd^{2+}, celle à 220 nm est présente sur le ligand libre (avec une très faible intensité). Si nous comparons nos résultats avec la littérature, il est reporté que dans le cas où le cadmium présente une coordination trigonale, le spectre présente deux bandes LMCT $S^- \rightarrow Cd^{2+}$ vers 240 et vers 260-270 nm [193] [158]. Par contre, si la coordination est tétraédrique, le spectre dichroïque présente une bande LMCT vers 240 nm [158] [183]. Au vu de ces résultats, le Cd^{2+}, dans le cas du $NTA(Cys(NH_2))_3$, est donc dans un environnement tétrahédrique et le complexe est sous forme d'un dimère (CdL_2) comme observé dans le cas de la protéine APP [198] qui possède aussi trois cystéines (Fig 101).

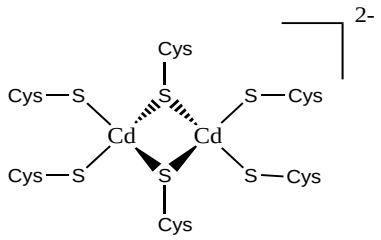


FIGURE 101 – Schématisation du dimère $(CdS_3)_2$ [198]

Notons aussi la présence d'un point isodichroïque entre 0-1 eqv. de Cd^{2+}, ce qui souligne la présence d'une espèce de type CdL en équilibre en solution avec le ligand libre.

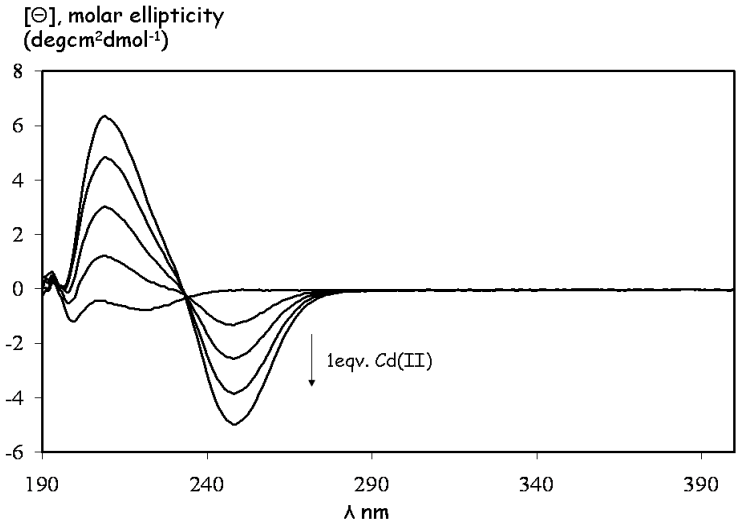


FIGURE 102 – Dosage dichroïque du $NTA(Cys(NH_2))_3$ par Cd^{2+} (0-1 eqv.), dans tamp. phos. 20 mM, pH 7.4, [L] = 50 μM, 298 K

Le cadmium(II) et le zinc(II) adoptent en général un environnement tétraédrique. Les tripodes de la famille NTA possèdent trois fonctions thiols, il est donc tout à fait possible de former en solution des dimères afin de favoriser une coordination MS_4 pour ces deux cations métalliques. Cette hypothèse semble vérifiée dans le cas du complexe Cd-NTA(Cys(NH_2))$_3$.

Complexes	Bandes LMCT (nm)	coefficient d'extinction molaire (M^{-1} cm^{-1})
(Zn-NTA(Cys(OEt))$_3$)$_x$	210	21 542
(Zn-NTA(Cys(NH_2))$_3$)$_x$	210	22 622
(Zn-NTA(Cys(OH))$_3$)$_x$	210	17 250
(Cd-NTA(Cys(OEt))$_3$)$_x$	230	20 000
(Cd-NTA(Cys(NH_2))$_3$)$_x$	230	21 960
(Cd-NTA(Cys(OH))$_3$)$_x$	227	21 470

TABLE 47 – Caractéristiques UV-visible des complexes de cadmium(II) et zinc(II) à pH = 7.4, tamp. phos. 20 mM (10% en vol. AcN pour le dérivé ester), 298 K

- **Dosage UV-visible par le Pb^{2+}**

Les dosages UV-visible des tripodes NTA(Cys(NH_2))$_3$ et NTA(Cys(OEt))$_3$ soulignent la présence de bandes LMCT à 350 nm et 260 nm qui croissent et saturent à 1eqv. de Pb^{2+} (Fig 103). Nous avons vu dans les chapitres précédents que la bande LMCT à 350 nm était caractéristique d'un système de type PbS_3 [180] [178] [181]. Les cœfficients d'extinction molaire déterminés pour ces deux complexes sont respectivement de 4900 et 5500 M^{-1} cm^{-1} pour les complexes de plomb(II) avec le NTA(Cys(NH_2))$_3$ et NTA(Cys(OEt))$_3$. Il semble donc que nous formions exclusivement des complexes mononucléaires de type PbS_3.

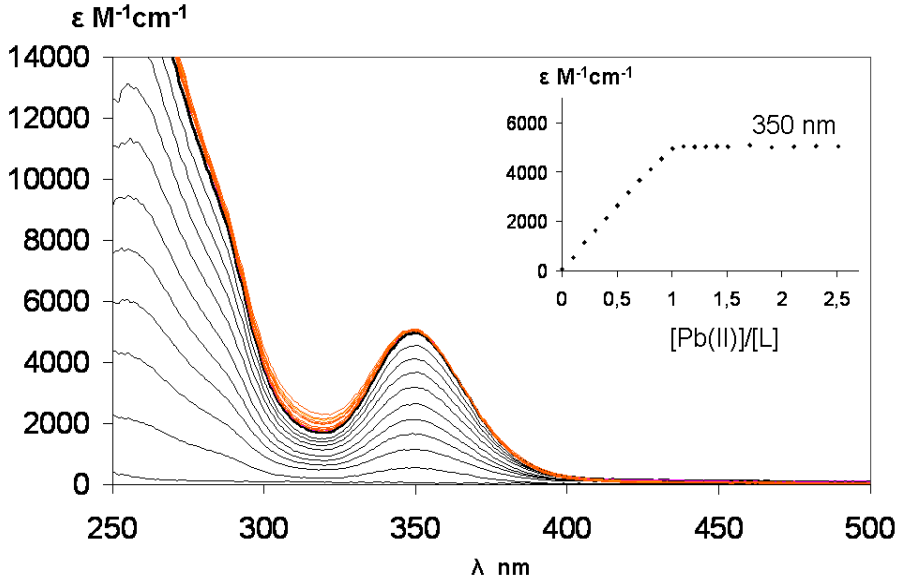


FIGURE 103 – Dosage UV-visible du NTA(Cys(NH_2))$_3$ par Pb^{2+} (0-3eqv.), dans tamp. Bis-Tris 20 mM, pH 7.0, [L] = 67 μM, 298 K

Les dosages UV-visible du NTA(Cys(OH))$_3$ par Pb^{2+} mettent en évidence la formation d'une espèce mononucléaire de type PbS_3 avec apparition de la bande LMCT caractéristique à 350 nm. En excès de Pb^{2+}, la bande se décale à 313 nm, ce qui souligne la formation d'une nouvelle espèce où Pb^{2+} adopte un environnement différent (Fig 104).

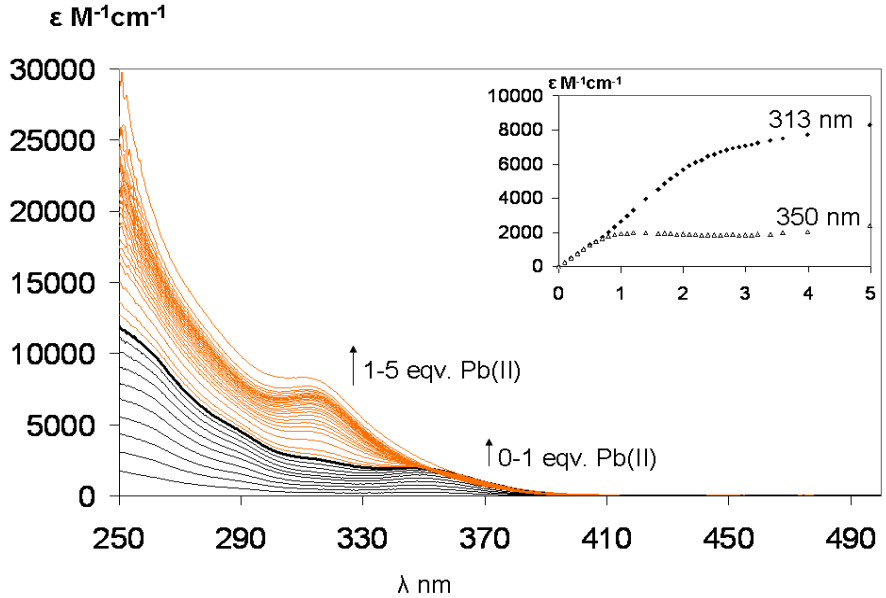


FIGURE 104 – Dosage UV-visible du NTA(Cys(OH))$_3$ par Pb^{2+} (0-5 eqv.), dans tamp. Bis-Tris 20 mM, pH 7.0, [L] = 66 μM, 298 K

Les simulations sous le logiciel SPECFIT confirment la formation d'une espèce de type PbL pour 1 eqv. de Pb^{2+}. En excès de plomb(II), les simulations sont cohérentes avec la formation de nouvelles espèces Pb_2L et Pb_3L. La présence des fonctions carboxylates peut en effet induire un mode de coordination différent comme montré figure 105.

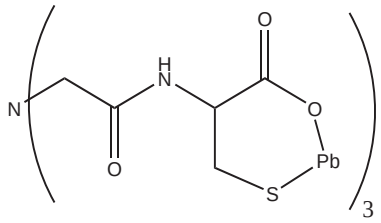


FIGURE 105 – Coordination de Pb^{2+} en excès au sein du tripode $NTA(Cys(OH))_3$

En résumé, les données UV-visible semblent indiquer la formation d'une espèce mononucléaire où le plomb possède une coordination de type PbS_3 pour les trois tripodes. Dans le cas du $NTA(Cys(OH))_3$ et en excès de Pb^{2+}, des espèces de type Pb_2L et Pb_3L se forme successivement.

Complexes	Bandes LMCT (nm)	cœfficient d'extinction molaire (M^{-1} cm^{-1})
Pb-$NTA(Cys(OEt))_3$	350	5500
Pb-$NTA(Cys(NH_2))_3$	350	4900
Pb-$NTA(Cys(OH))_3$	350	5000

TABLE 48 – Caractéristiques UV-visible des complexes de plomb(II), tamp. Bis-Tris 20 mM, pH 7.0 (10% en vol. AcN pour le dérivé ester), 298 K

13.1.2 Analyse des spectres protons à 1 eqv. de cations métalliques et mesure des cœfficients de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé

Les échantillons ont été préparés en tampon phosphate 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH 7.4, 298 K. Les mesures ont été faites à 500 MHz

Les résultats obtenus avec le tripode $NTA(Cys(OH))_3$ ne seront pas présentés dans cette partie, car peu concluants (dynamique en solution très rapide).
Les spectres protons à 1 eqv. de cations métalliques pour les deux tripodes $NTA(Cys(NH_2))_3$ et $NTA(Cys(OEt))_3$ mettent en évidence la formation d'un complexe de symétrie C_3 (Fig 106). Ces spectres montrent les signaux des protons des complexes bien résolus. Comme pour les complexes mononucléaires du mercure(II) et du cuivre(I), les signaux des CH_2 près de l'azote apical et les H_β sont éclatés par rapport à ceux du ligand libre (Table 49). Cela souligne une certaine rigidité des complexes formés.

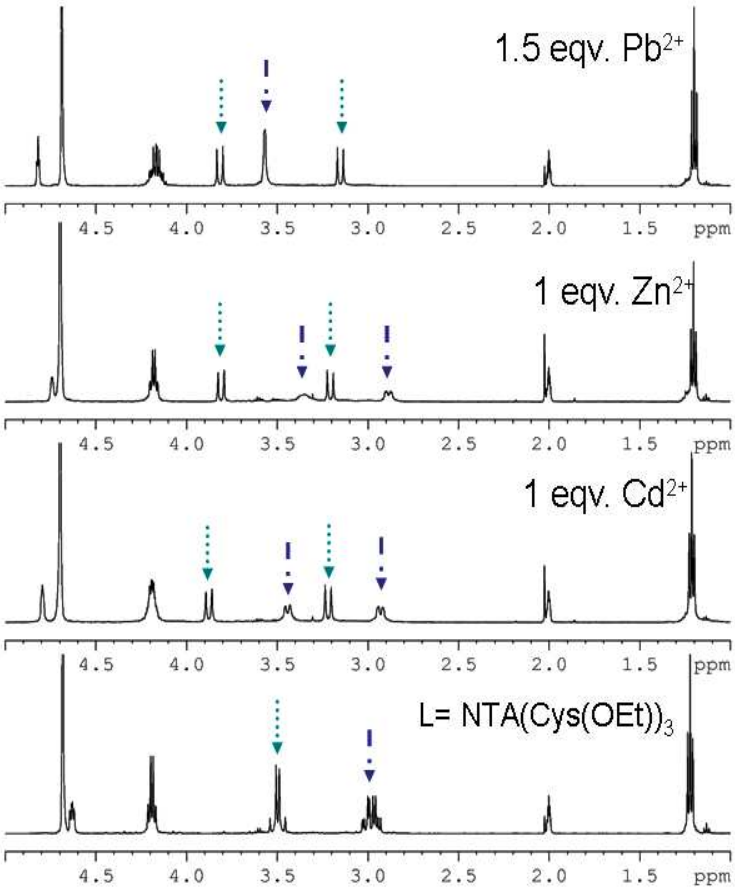


FIGURE 106 – Spectre RMN des complexes de Pb^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+} avec le $NTA(Cys(OEt))_3$ à 1 eqv. de cations pour Cd^{2+} et Zn^{2+}, à 1.5 eqv de Pb^{2+}, 298 K, 500 MHz, tamp phos 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH 7.4

Δppm	NCH_2-CO	$CH_2\beta$-SH
L^1 : $NTA(Cys(OEt))_3$	0.06	0.06
$(ZnL^1)_x$	1.2	0.46
$(CdL^1)_x$	0.66	0.51
PbL^1	0.65	0.0045
L^2 : $NTA(Cys(NH_2))_3$	0	0.09
$(ZnL^2)_x$	0.45	0.07
$(CdL^2)_2$	0.61	0.14
PbL^2	0.18	0.17

TABLE 49 – Différence de déplacements chimiques observée pour les pics de protons NCH_2-CO et $CH_2\beta$-SH au sein du ligand libre et des complexes de zinc(II), plomb(II) et cadmium(II), tamp. phos. 20 mM D_2O/CD_3CN (v/v = 9/1), pH = 7.4, 500 MHz, 298 K

Afin de déterminer la molécularité des espèces en solution, nous avons réalisé des mesures de cœfficients de diffusion sur les complexes.

Ces mesures confirment la formation d'un complexe mononucléaire de type PbS_3 pour les deux tripodes. Elles confirment aussi la formation d'un dimère pour les complexe de cadmium(II) dans le cas du $NTA(Cys(NH_2))_3$ (D(L) = 3.40(4) × 10^{-10} m^2 s^{-1}, D(CdL) = 2.53(1) × $10^{-10}m^2$ s^{-1}, D(CdL)<<D(L)) et dans le cas du $NTA(Cys(OEt))_3$ (D(L) = 3.20(4) × 10^{-10} m^2 s^{-1}, D(CdL) = 2.40(1) × 10^{-10} m^2 s^{-1}, D(CdL)<<D(L)). Le cœfficient de diffusion est plus petit que celui du ligand libre, l'espèce diffusante est donc plus volumineuse. Pour les complexes de zinc(II), les valeurs des cœfficients de diffusion sont intermédiaires entre celles attendues pour un monomère et un dimère. Il existe donc probablement un équilibre entre ces deux formes (Fig 99, Table 50).

Complexes	$NTA(Cys(OEt))_3$ D(L) = 3.20(4)×10^{-10} m^2 s^{-1}			$NTA(Cys(NH_2))_3$ D(L) = 3.40(4)×10^{-10} m^2 s^{-1}		
	Cœfficients de diffusion	Masse		Cœfficients de diffusion	Masse	
		M_{exp}	M_{th}		M_{exp}	M_{th}
$(CdL)_2$	2.40(1)×10^{-10}	1388(225)	1387	2.53(1)×10^{-10}	1206(185)	1214
$(ZnL)_x$	2.80(1)×10^{-10}	873(126)	647, (x=1) 1294, (x=2)	2.91(4)×10^{-10}	793(61)	560,(x=1) 1120, (x=2)
PbL	3.18(4)×10^{-10}	596(45)	789	3.20(4)×10^{-10}	596(43)	702

TABLE 50 – Cœfficients de diffusion des complexes ML pour les tripodes $NTA(Cys(OEt))_3$ et $NTA(Cys(NH_2))_3$, 298 K, 500 MHz

Les mesures des cœfficients de diffusion et les spectres RMN protons confirment la formation en solution des complexes PbL, $(ZnL)_x$ (avec un équilibre entre x = 1 et x = 2) et Cd_2L_2 pour les deux tripodes. Il est intéressant de noter que le complexe dimérique Cd_2L_2 présente un spectre proton fin interprétable comme un complexe CdL de symétrie C_3. Cette symétrie indique que le dimère présente une dynamique interne important avec échange de ligand intra ou intermoléculaire (avec le ligand libre).

13.1.3 Spectrométrie de masse

Les échantillons ont été préparés en tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 7.0, 298 K (avec 10% en vol. d'acétonitrile pour le dérivé ester)

Les spectres de masse confirment les résultats précédents. Les espèces PbL, ZnL et CdL désorbent bien pour les trois tripodes.

Complexes	NTA(Cys(OEt))$_3$		NTA(Cys(NH$_2$))$_3$	NTA(Cys(OH))$_3$	
	(-)ESMS	(+)ESMS	(-)ESMS	(-)ESMS	(+)ESMS
ZnL	645	647	558	561	563
CdL	695	697	608	611	613
(CdL)$_2$	1388		1214.8		
PbL	789	791	702	705	707

TABLE 51 – Complexes des ions Pb^{2+}, Zn^{2+} et Cd^{2+} avec les ligands NTA(Cys(NH$_2$))$_3$, NTA(Cys(OEt))$_3$ et NTA(Cys(OH))$_3$, enregistrés par ES-MS, tamp. acétate d'ammonium 20 mM, pH = 7.0, 298 K

Notons qu'à 1 eqv. de Cd^{2+}, le complexe (Cd-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$)$_2$ désorbe lui aussi confirmant ainsi la formation du dimère.

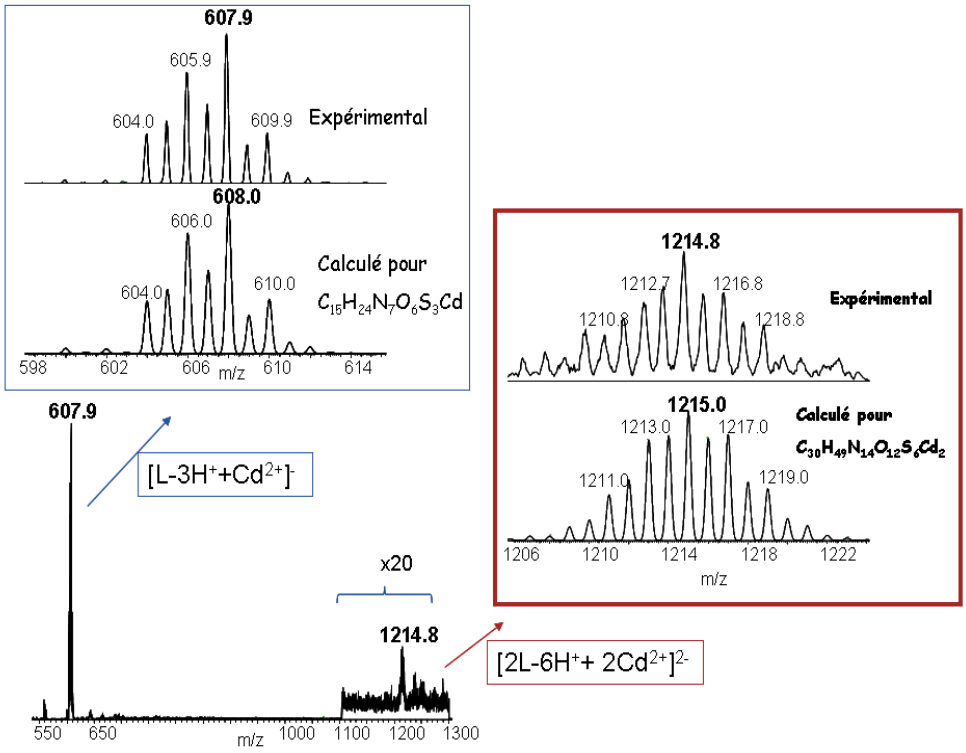


FIGURE 107 – Spectre de masse des complexes Cd-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ et [Cd-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$]$_2$, dans tamp. acétate d'ammonium 20 mM, pH 7.0, 298 K, mode négatif

13.1.4 Affinité des tripodes de la famille NTA pour les divalents

Les constantes apparentes ont été calculées en considérant la formation de complexes mononucléaires dans le cas des trois cations divalents (Cd^{2+}, Zn^{2+} et Pb^{2+}) pour les deux tripodes NTA(Cys(NH$_2$))$_3$, NTA(Cys(OEt))$_3$. Cela permet de comparer l'affinité des différents complexes entre eux.

Les données des dosages UV-visible des deux ligands par le Pb^{2+} ont été traitées par le programme SPECFIT en tenant compte de toutes les espèces colorées à savoir, Pb(Bis-Tris) et PbL.
Les affinités des complexes CdL et ZnL ont été obtenues comme décrit au chapitre 2. Le complexe PbL a été préformé et des aliquots de Cd^{2+} ou Zn^{2+} ont été ajoutés. Les données ont été analysées sous SPECFIT en considérant les complexes Pb(Bis-Tris), PbL et selon le cas, CdL et Cd(Bis-Tris) ou ZnL et Zn(Bis-Tris). Les constantes d'affinité apparentes obtenues à pH 7.0 sont reportées Table 52.

Complexes	$NTA(Cys(OEt))_3$		$NTA(Cys(NH_2))_3$		P^C	
	$\log\beta^{app}_{pH7.0}$	$\log\beta_{110}$	$\log\beta^{app}_{pH7.0}$	$\log\beta_{110}$	$\log\beta^{app}_{pH7.0}$	$\log\beta_{110}$
PbL	8.9	14.4	9.3	16.2	8.0	11.5
CdL	10.6	16.1	10.9	17.8	9.2	12.7
ZnL	9.1	14.6	9.8	16.7	6.8	10.3
CuL^a	19.2	23.6	18.8	24.5	17.4	20.1
Sélectivité Cu^I/Zn^{II}	9.0		7.8		9.8	

TABLE 52 – Constantes apparentes $\log\beta^{app}_{pH=7.0}$ et constantes réelles $\log\beta_{110}$ des complexes mononucléaires, tampon Bis-Tris 20 mM, pH 7.0 (10% en vol. AcN pour le dérivé ester), 298 K ; ^{a} : tampon phosphate 20 mM pH 7.4

Les constantes d'affinité sont globalement un peu plus fortes pour le $NTA(Cys(NH_2))_3$. Nous avons vu dans ce chapitre, que les fonctions thiols étaient influencées par la fonction adjacente. Cette différence d'affinité entre le dérivé ester et amide peut donc s'appliquer par la différence de densité électronique des fonctions thiols due à cette fonction voisine. Les thiols du $NTA(Cys(NH_2))_3$ ont une densité électronique plus élevée que ceux du $NTA(Cys(OEt))_3$ car le groupement COOEt est plus électroattracteur que le groupement $CONH_2$. Cela entraine donc une affinité un peu plus forte pour les cations divalents Pb^{2+}, Zn^{2+} et Cd^{2+}.
Notons également que la sélectivité pour le cuivre(I) par rapport au zinc(II) est préservée : environ 8-9 ordres de grandeur. Cette sélectivité est un peu plus basse que celle obtenue avec les peptides à deux cystéines mais néanmoins élevée.

En résumé, les tripodes $NTA(Cys(NH_2))_3$ et $NTA(Cys(OEt))_3$ forment des complexes de type $(ML)_x$ pour les trois cations métalliques avec x = 1 pour le cation Pb^{2+} et x = 2 pour Cd^{2+} et un équilibre entre les deux formes pour Zn^{2+}. Les affinités pour ces ions métalliques correspondent aux valeurs attendues (valeurs plus fortes que pour P^C) et la sélectivité cuivre(I)/zinc(II) est maintenue bien que légèrement plus faible que pour les cyclodécapeptides.

13.2 Originalité du NOTA, complexation au niveau du cycle azoté, études par spectroscopie UV-visible

Les dosages UV-visible ont été réalisés dans les mêmes conditions que ceux de la famille NTA avec 10% d'acétonitrile afin de solubiliser le podand.

Ces dosages mettent en valeur l'originalité du dérivé NOTA par la présence d'un deuxième site de liaison au niveau du triazacyclononane où le cation est coordiné par trois azotes et trois oxygènes (site N_3O_3). Cette coordination au sein du cycle azoté renforcée par les atomes d'oxygène est connue de la littérature. Des dérivés NOTA amides (Fig 108) sont en effet décrits avec des constantes d'affinité apparentes à pH 7.0 variant de 7.3 à 8.6 pour le Zn^{2+}, de 2.9 à 6.7 pour Cd^{2+} et de 8.3 à 10.4 pour Cu^{2+} [270].

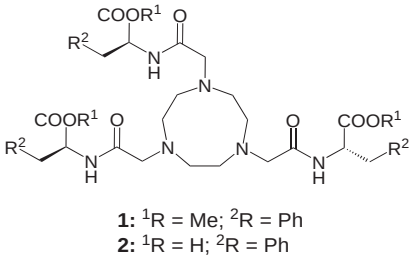


FIGURE 108 – Dérivés NOTA amides décrits par Plush et coll. [270]

Cas du plomb(II) : Les dosages du NOTA(Cys(OEt))$_3$ par le plomb(II) montrent l'apparition dès les premiers ajouts d'une bande LMCT à 350 nm qui correspond à une coordination PbS_3. L'analyse des données par le programme SPECFIT avec la formation d'un seul complexe PbL ne permet pas d'interpréter correctement les données expérimentales. Il est nécessaire de considérer la formation d'un deuxième complexe Pb_2L. Cet autre cation vient se fixer au niveau du cycle azoté et des oxygènes des carbonyles ce qui perturbe légèrement les caractéristiqus de la bande LMCT $S^- \rightarrow Pb^{2+}$.

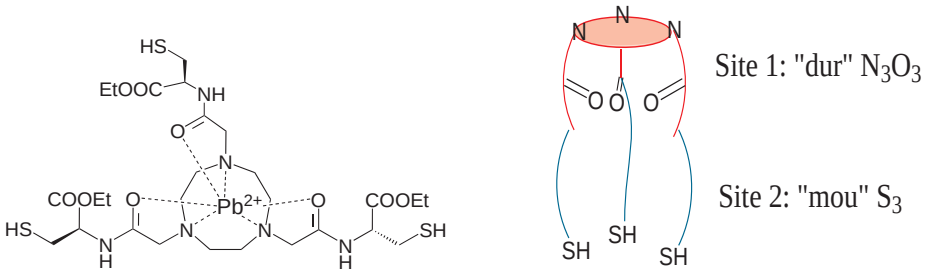


FIGURE 109 – Site de fixation 1 au sein du cycle azoté (à gauche), site de fixation 1 (en rouge) et 2 (en vert) (à droite)

Au cours du dosage UV-visible, la bande LMCT à 341 nm croit et sature à 1 eqv. de Pb^{2+} (ϵ^{341nm} = 3700 M^{-1} cm^{-1}). La fixation du deuxième cation Pb^{2+} influence peu la bande LMCT à 341 nm (ϵ^{341nm} = 4500 M^{-1} cm^{-1}). Ainsi, le premier plomb vient se fixer au sein des trois thiolates (site de fixation 2) et le deuxième plomb se fixe ensuite au niveau du cycle azoté (site de fixation 1). L'analyse par le programme SPECFIT permet de déterminer les constantes d'affinité de ces deux sites qui sont $\log\beta_{11} = 10$ et $\log\beta_{21} = 18$.

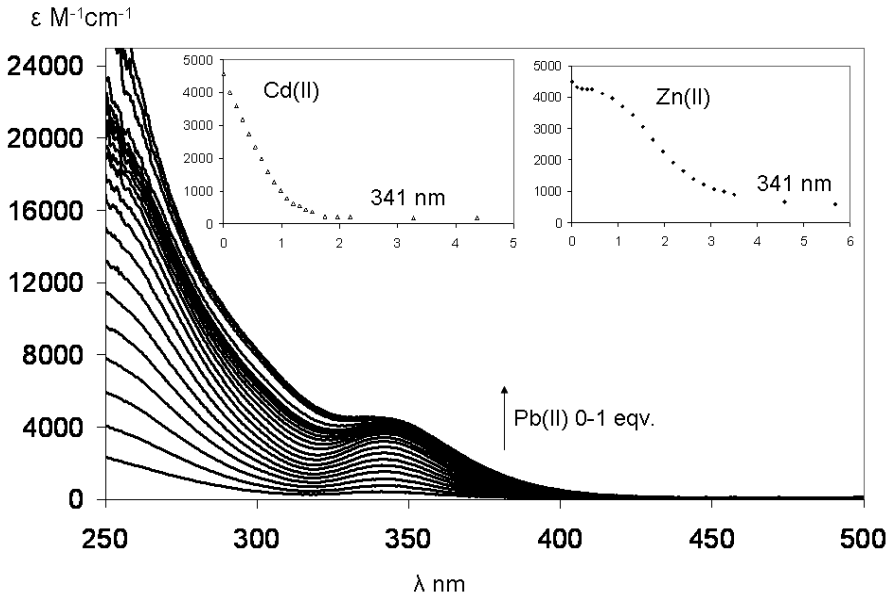


FIGURE 110 – Dosage UV du NOTA(Cys(OEt))$_3$ par Pb^{2+}, tamp. Bis-Tris 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH 7.0, 298K, dosage retour par Cd^{2+} (en haut à gauche) et par Zn^{2+} (en haut à gauche).

Afin d'étudier la complexation de Cd^{2+} et Zn^{2+} avec le tripode NOTA(Cys(OEt))$_3$, des dosages par ajouts de l'un des deux cations sur le complexe préformé Pb_2L ont été réalisés

Cas du cadmium(II) : Les dosages par ajouts de Cd^{2+} sur le complexe Pb_2L montrent une disparition de la bande LMCT à 341 nm ($S^- \rightarrow Pb^{2+}$) dès les premiers ajouts. Une rupture de la bande LMCT à 1 eqv. de Cd^{2+} est ainsi observée (Fig 110). L'analyse des données par le programme SPECFIT confirme que le cadmium prend la place du plomb dans le site de fixation 2 (au sein des trois thiolates) et un deuxième cadmium prend la place du deuxième plomb dans le site de fixation 1 (cycle azoté et trois oxygènes). Comme la fixation du deuxième cadmium dans le site 1 n'est pas visible en spectroscopie UV-visible, la constante d'affinité n'a pu être déterminée pour le deuxième cation Cd^{2+}. La constante d'affinité pour le complexe bimétallique (CdPbL) $\log\beta_{111}$ vaut 17.6.

Cas du zinc(II) : Les dosages par ajouts de Zn^{2+} sur le complexe Pb_2L mettent en évidence un comportement différent de Cd^{2+} et de Pb^{2+}. En effet, la bande LMCT à 341 nm ne disparait qu'à partir de 1 eqv. de Zn^{2+} (Fig 110). Cela suppose que Zn^{2+} substitue Pb^{2+} qui est fixé sur le premier site de fixation. L'ajout d'un deuxième cation substitue le deuxième Pb^{2+} du deuxième site de fixation (les trois thiolates). Le traitement des données par le programme SPECFIT confirme cela. Les constantes d'affinité ont pu être calculées entièrement $\log\beta_{111} = 18.1$ et $\log\beta_{21} = 17$.
Un schéma récapitulatif concernant cette coordination par les deux sites de fixation est décrit Fig 111.

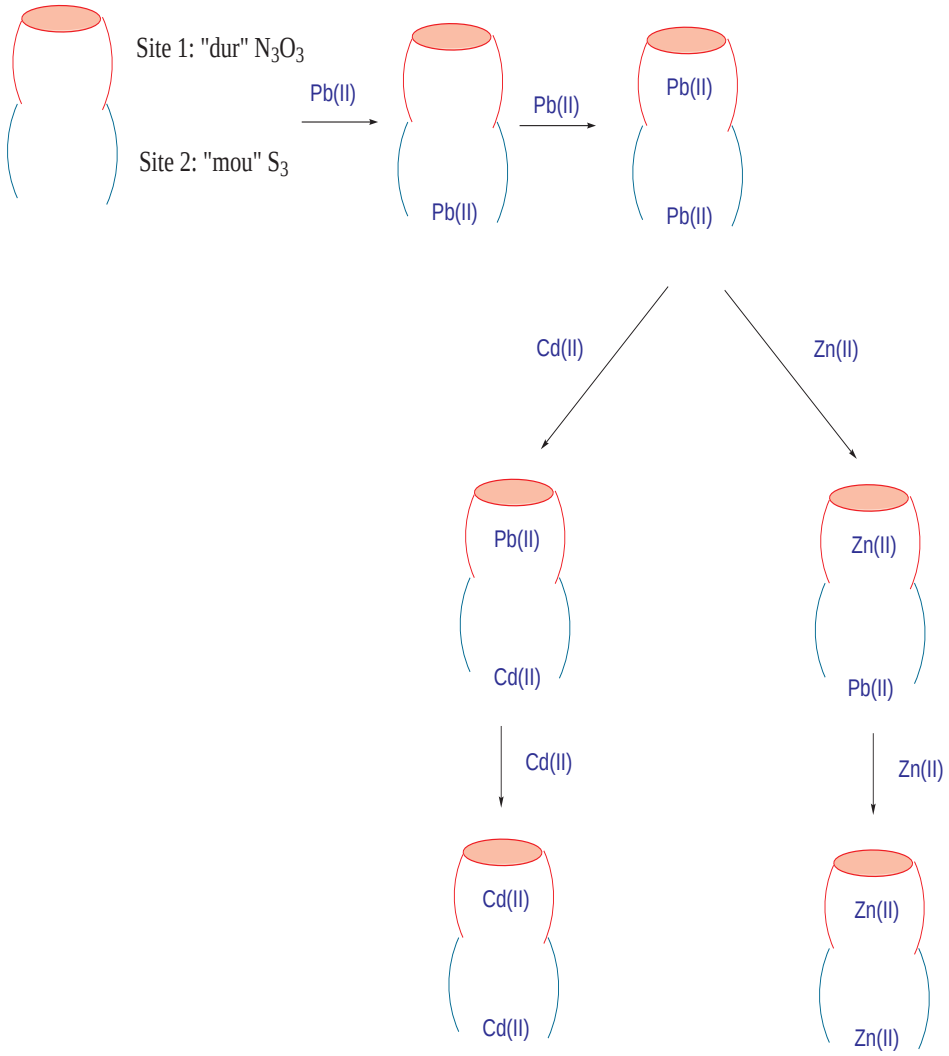


FIGURE 111 – Schématisation du dosage du complexe Pb_2-NOTA(Cys(OEt))$_3$, par Cd^{2+} et Zn^{2+} : Site 1 en rouge, Site 2 en vert.

Les constantes d'affinité obtenues sont en accord avec celles décrites sur des dérivés NOTA par Plush et coll [270]. La coordination d'un cation divalent au sein du cycle azoté et des trois oxygènes des carbonyles permet de fixer deux cations divalents et former des systèmes M_2L. On notera que au sein du dérivé NOTA, Pb^{2+} préfère le site « mou » comme

Cd^{2+} alors que Zn^{2+} se coordonne plus facilement au site « dur ».

14 Conclusions et perspectives

Nous avons élaboré des chélateurs possédant une meilleure affinité pour le cuivre(I) que les cyclodécapeptides P^C, P^1 et P^2. Les tripodes $NTA(Cys(OEt))_3$ et $NTA(Cys(NH_2))_3$ forment des complexes mononucléaires avec Cu^+ et Hg^{2+} dont la stabilité est renforcée par la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les deux cations métalliques possèdent une coordination trigonale au sein des complexes mononucléaires. Ces deux tripodes forment aussi des complexes mononucléaires avec Pb^{2+} et un complexe $(CdL)_2$ où le cadmium(II) est entouré par quatre thiolates. Les affinités pour ces autres cations métalliques sont un peu plus fortes que celle obtenues avec les cyclodécapeptides mais la sélectivité entre Zn^{2+} et Cu^+ est conservée. Ces tripodes ont donc un intérêt comme agents chélatants du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson. Nous avons donc fonctionnalisé le tripode $NTA(Cys(NH_2))_3$ afin de cibler les cellules hépatiques : la fonction ester est hydrolysée en acide carboxylique dans les cellules, et le $NTA(Cys(OH))_3$ a une affinité pour le cuivre(I) beaucoup moins forte que son analogue amide. Cette fonctionnalisation va être discutée dans la partie suivante du manuscrit notamment la position de la partie ciblante et son greffage au tripode.

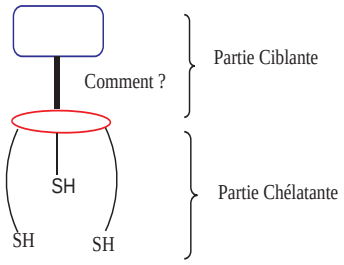


FIGURE 112 – Schématisation du vecteur dérivé du $NTA(Cys(NH_2))_3$

Vectorisation des chélateurs vers les hépatocytes

Cinquième partie

Vectorisation des chélateurs vers les hépatocytes

15 Optimisation et conception des vecteurs

15.1 Vers un ciblage efficace

15.1.1 Les récepteurs aux asialoglycoprotéines

Pour cibler le foie, il est possible d'utiliser les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP-R). En effet, ces récepteurs sont exclusivement exprimés sur les cellules hépatiques. Il existe 100 000 - 500 000 sites par cellule répartis à leur surface de manière aléatoire mais absents de la membrane apicale près des canalicules biliaires [271]. Les ASGP-R interviennent dans l'homéostasie des glycoprotéines contenues dans le sérum. Ces récepteurs reconnaissent seulement le résidu terminal sucre des glycoprotéines et après reconnaissance, le ligand pénètre dans la cellule par endocytose. La séparation ligand-récepteur dépend du pH qui doit être acide, le récepteur est alors recyclé vers la surface de la cellule [272].

Structure des ASGP-R : Les récepteurs aux asialoglycoprotéines sont des lectines Ca^{2+} dépendantes (C-type lectin), ces récepteurs ont donc dans leurs sites des ions calcium(II). Ces cations vont directement interagir avec les résidus sucres des ligands. De manière générale, les récepteurs sont constitués de sous-unités appelées H1 et H2 qui se composent d'un domaine de liaison riche en glycine reconnaissant des sucres et de trois ions calcium (Fig. 113) [273].

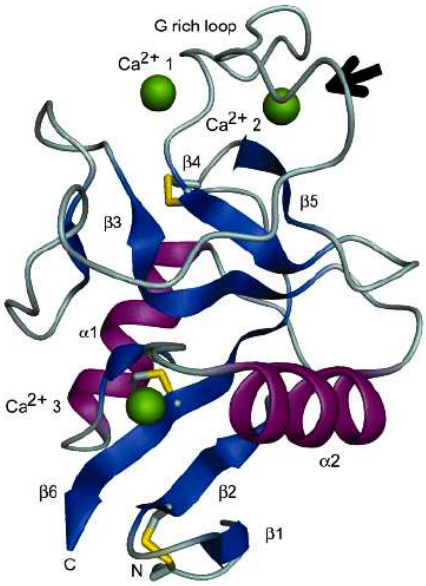


FIGURE 113 – Structure de la sous-unité H1 des ASGP-R (La flèche indique le site de reconnaissance des sucres) [273]

Les ASGP-R sont constitués de deux sous-unités H1 et d'une sous-unité H2 [271]. Les trois sous-unités sont rassemblées sous forme d'un paquet, sorte de « bouquet de fleurs » (Fig 114) dont la configuration est relativement rigide.

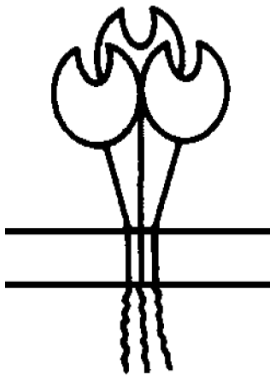


FIGURE 114 – Schématisation des ASGP-R [274]

15.1.2 Reconnaissance des résidus galactose (Gal) et *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) :

Il a été démontré que les ASGP-R reconnaissent préférentiellement les résidus sucres galactose et *N*-acétylgalactosamine. En effet, les groupement OH en position 3 et 4 des sucres doivent être respectivement en positions équatoriale et axiale pour interagir au

mieux avec l'ion Ca^{2+} [275] [276] [277]. Il a été démontré que les résidus GalNAc ont plus d'affinité pour les ASGP-R que les résidus Gal ($\approx$ 10-50 fois plus grande [278]) puisque la face α du sucre peut se lier au tryptophane 243 (liaison avec l'indole) par interactions hydrophobes [275] [277]. Par contre, la position anomérique et le OH en position 6 n'interviennent pas dans la liaison avec les sites de reconnaissance, ils sont exposés au solvant [278] [275] [277].

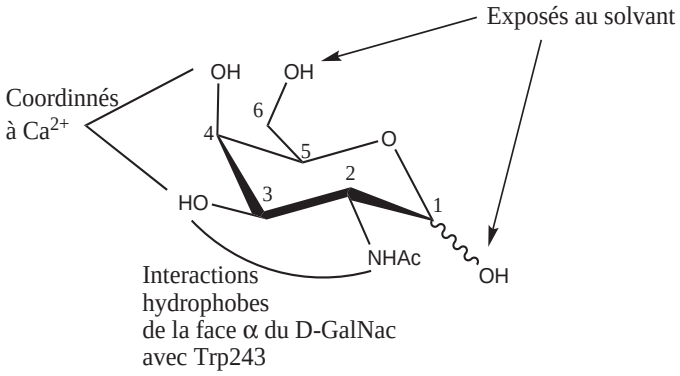


FIGURE 115 – Schématisation des interactions d'un résidu GalNAc avec le site de reconnaissance des ASGP-R [277]

15.1.3 Interactions multivalentes : l'effet cluster

Définition Il a été démontré que l'affinité pour les ASGP-R augmentait avec le nombre de résidus sucres. C'est à dire que l'affinité augmente pour un ligand portant quatre sucres par rapport à un ligand portant trois sucres... : tétra-> tri-$\geq$ bi-$\geq$ mono- fonctionnalisé [278] [279]. Cette effet est appelé *l'effet cluster*. Les valeurs $[I]_{50}$ (Inhibition à 50%) sont d'environ 10^{-3}, 10^{-6}, 5×10^{-9} et 10^{-9} M (mono-$\leq$bi-$\leq$tri-<tetra-) [278]. Cet effet cluster ou interactions multivalentes, qui correspond à des effets coopératifs, est extrêmement connu dans les processus biologiques. Il intervient dans de nombreux phénomènes de reconnaissance cellulaire tel que l'adhésion de bactéries ou virus sur les cellules hôtes (Fig 116) [280].

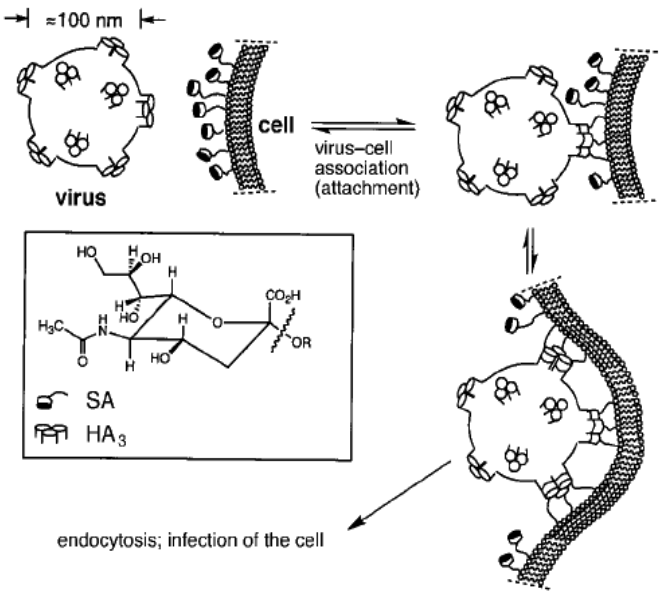


FIGURE 116 – Interaction du virus de la grippe avec une cellule hôte par des interactions multivalentes [280]

Afin de favoriser cet *effet cluster*, des systèmes comportant plusieurs ligands sucres ont donc été conçus. De manière générale, les différents ligands sucres sont reliés par un lien (ou espaceur) à une plate-forme chimique ou à un point d'ancrage .

Facteurs thermodynamiques : Une nomenclature pour ces interactions multivalentes a été définie et des facteurs thermodynamiques influençant ces interactions ont été déterminés [280] [281]. Les interactions multivalentes peuvent être décrites en terme d'énergie libre d'association ΔG_N^{poly} et par une constante d'association K_N^{poly}. L'énergie libre d'association est définie selon l'équation 31.

$$\Delta G_N^{poly} = \Delta H_N^{poly} - T\Delta S_N^{poly} \tag{31}$$

En terme enthalpique, il a été montré que la géométrie du système multivalent devait être parfaitement adapté. C'est à dire que les distances entre les ligands devaient correspondre exactement aux distances existantes entre les différents sites de reconnaissance. De plus, l'espaceur reliant les différents ligands ne doit pas être trop rigide. En terme entropique, il ne faut pas créer de surcoût d'énergie entropique généré lors du positionnement des autres ligands N+1, l'espaceur ne doit pas être trop flexible [280].

Optimisation du ciblage : Les études menées sur les ASGP-R ont montré non seulement que le nombre et l'orientation spatiale des ligands étaient déterminants pour une meilleure affinité [282] mais aussi que les distances optimales entre les résidus étaient situées entre 15 et 31 Å [275] [282]. En effet, si les résidus sucres sont trop proches les

uns des autres, l'effet cluster ne peut être généré [279]. Des études, réalisées avec des ligands carbohydrates synthétiques sur des ASGP-R d'hépatocytes de poulet (proches de ceux des mammifères), ont montré que pour obtenir une affinité optimisée, les trois résidus sucres devaient être situés sur un triangle de côtés 15, 20 et 25 Å [283] [276]. Un modèle présentant l'arrangement spatial optimum est décrit figure 117.

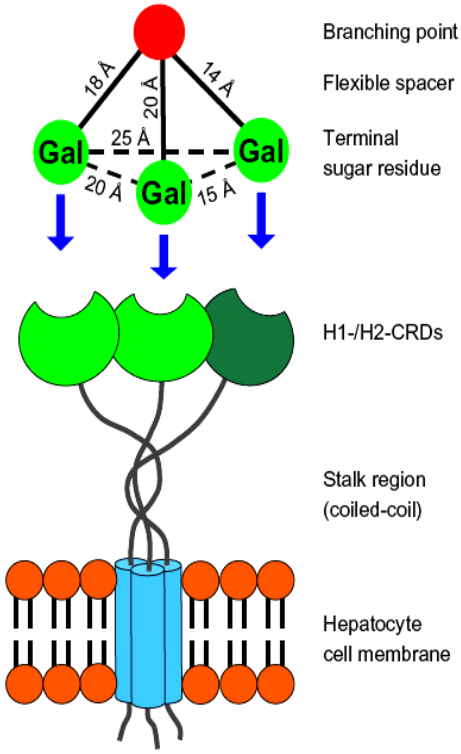


FIGURE 117 – Schématisation selon le modèle décrit : distances 15, 20 et 25 Å [284]

L'absence d'espaceur entre le résidu sucre et le point d'ancrage ou la plate-forme de connexion entraîne une non internalisation du ligand par les ASGP-R [284] [285]. Il a aussi été déterminé que les trois sous-unités composant un récepteur ASGP étaient relativement rigides [274], il faut donc utiliser un lien relativement flexible pour relier les résidus sucres [279]. Notons que la différence d'affinité entre un ligand trivalent et tétravalent n'est pas très importante (5×10^{-9} et 10^{-9} M). Il n'y a que trois domaines de reconnaissance sur un récepteur ASGP. La fixation de trois résidus sucres est suffisante pour une reconnaissance efficace [280].

15.2 Conception des chélateurs vectorisés

Comme nous l'avons vu, nous disposons de chélateurs efficaces. Les plates-formes utilisées pour lier à la fois la partie chélatante et la partie ciblante doivent être optimiser afin d'obtenir au final un vecteur capable d'entrer dans les cellules hépatiques par les ASGP-R pour pouvoir complexer le cuivre intracellulaire. Nous avons donc cherché des plate-formes

capables de répondre à ce critère, dérivées ou non de modèles connus.

15.2.1 Plate-forme peptidique de type RAFT

L'élaboration de glycoclusters capables d'être reconnus par interactions multivalentes avec les récepteurs aux ASGP a un intérêt biologique certain [286]. Nous avons vu dans le chapitre III que le cyclodécapeptide RAFT avait comme intérêt de présenter deux faces : une pouvant être utilisée pour le ciblage et une pour fixer des molécules d'intérêts biologiques [208]. Par un lien chimique adéquat, il est donc possible de fixer quatre ligands des récepteurs visés sur une des faces. Afin d'élaborer notre premier vecteur, nous avons donc choisi le modèle RAFT qui permet ainsi l'élaboration de glycopeptides, intéressants pour étudier les interactions multivalentes carbohydrate-protéines ou pour le ciblage cellulaire [287] [288].
En effet, il a été démontré que le RAFT était adapté pour le ciblage des cellules cancéreuses exprimant des intégrines $\alpha v\beta_3$-$\alpha v\beta_5$ [209] [211] [213] [212] ou surexprimant de nouvelles structures osidiques à leur surface, appelées antigènes associés aux tumeurs (Tumor-Associated Carbohydrate Antigens ou TACA) [289] [290] [291]. La structure RAFT a aussi montré un intérêt dans le ciblage des récepteurs des lectines de type C [210] [292].
La reconnaissance de ces modèles par les récepteurs des lectines de type C a été évaluée en utilisant des supports solides sur lesquels sont fixés des ligands de type RAFT fonctionnalisés par un ou plusieurs sucres [293] [294]. Ces études ont montré qu'il y a une reconnaissance par interactions multivalentes entre quatre résidus sucres présents sur un modèle RAFT et des récepteurs des lectines de type C (Lectins PNA (Peanut Agglutinin) et Concanavalin A) [210] [295].

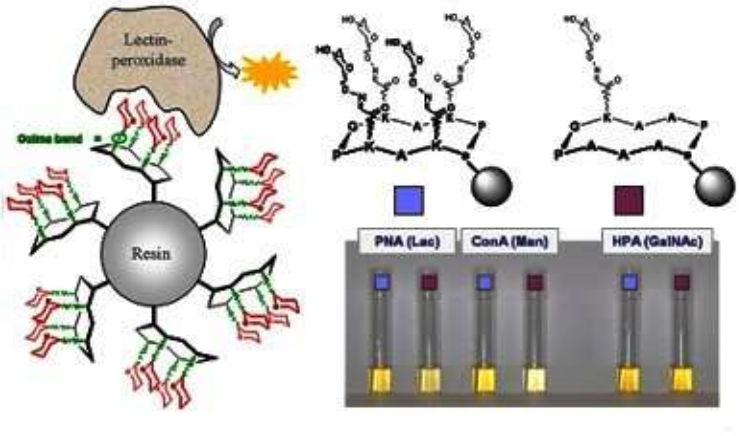


FIGURE 118 – Stratégie générale concernant l'évaluation biologique sur support solide entre un glycopeptide mulivalent et des lectines [210]

D'autres études plus récentes sur la capacité d'un tel système à lier des lectines de type C comme la concanavaline A (Con A) ont montré que le modèle RAFT, portant

quatre résidus sucres sur une des faces, interagissait par liaisons multivalentes ou par effets de proximités locales ou statistiques dus à une forte concentration proche du site de reconnaissance [296] [297]. En effet, la distance entre deux sites dans Con A est de 65 Å et la distance entre deux résidus sucres au sein du cyclodécapeptide est d'environ 7 Å si les deux bras sont parallèles entre eux et d'environ 22-25 Å si les deux bras sont écartés à 180° l'un de l'autre (Fig 119). Il est donc difficile pour un RAFT de lier en même temps les deux sites de Con A.
Par contre, rappelons qu'au sein des ASGP-R les distances sont de 15, 20 et 25 Å, le modèle RAFT rentre donc dans la gamme de ces distances. Il semble donc adapté au ciblage des ASGP-R.

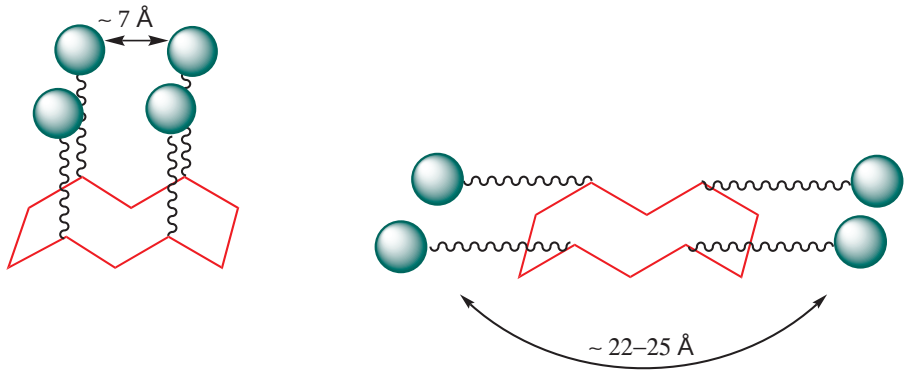


FIGURE 119 – Schématisation des distances existantes au sein du modèle RAFT

La stabilité de cette plate-forme peptidique a aussi été évaluée *in-vivo*. Un fluorophore cyanine 5 (Cy5) a été greffé sur la face inférieure de la plate-forme RAFT. Ce fluorophore est relié par un pont disulfure à une molécule qui éteint sa fluorescence (Quencher). Sur la face supérieure sont greffés des peptides RGD afin de cibler les cellules cancéreuses exprimant des intégrines $\alpha v\beta_3$ (Fig 120). Le principe est simple : une fois le RAFT reconnu par sa cible, comme le milieu intracellulaire est réducteur, le pont disulfure reliant Cy5 et la molécule « interrupteur » se rompt en libérant ainsi la fluorescence de Cy5 (Fig 120). Cela démontre que le système RAFT(cRGD)$_4$-Cy5 a bien atteint sa cible, a été reconnu, et se trouve dans la cellule cancéreuse. Des injections en intraveineuse de ce système sur des souris montrent que la luminescence apparait après 5 h. La molécule a donc mis 5 h à atteindre sa cible, le pont disulfure est stable *in vivo* et Cy5 est toujours accroché sur la plate-forme RAFT. Donc, cette dernière semble, elle aussi, stable *in vivo* au moins pendant 5 h [298].

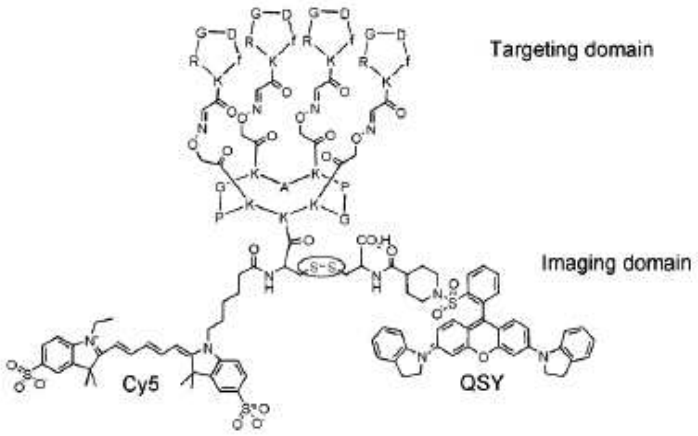


FIGURE 120 – Molécule utilisée pour cibler les cellules cancéreuses [298]

15.2.2 Structure tripode

Nous avons vu précédemment (15.1.1) que les ASGP-R étaient constitués de trois sous-unités. Le modèle optimum pour une très bonne affinité des sites doit être composé de trois résidus sucres ($[I]_{50} = 10^{-9}$) dans une géométrie triangulaire (Fig 117) [278]. Plusieurs études, concernant l'affinité de ligands trivalents possédant une géométrie triangulaire envers les ASGP-R, ont confirmé que cette géométrie était adaptée au ciblage des ASGP-R et que la distance entre le résidu sucre et le point d'ancrage était très importante (distance de l'espaceur entre le point d'ancrage et les résidus sucres) [285] [299] [300] [301] [302] [284]. Ces modèles possèdent un point d'ancrage comme le 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS) et des espaceurs, par exemple polyéthylène glycol (PEG) ou polyamide (Fig 121) [284].

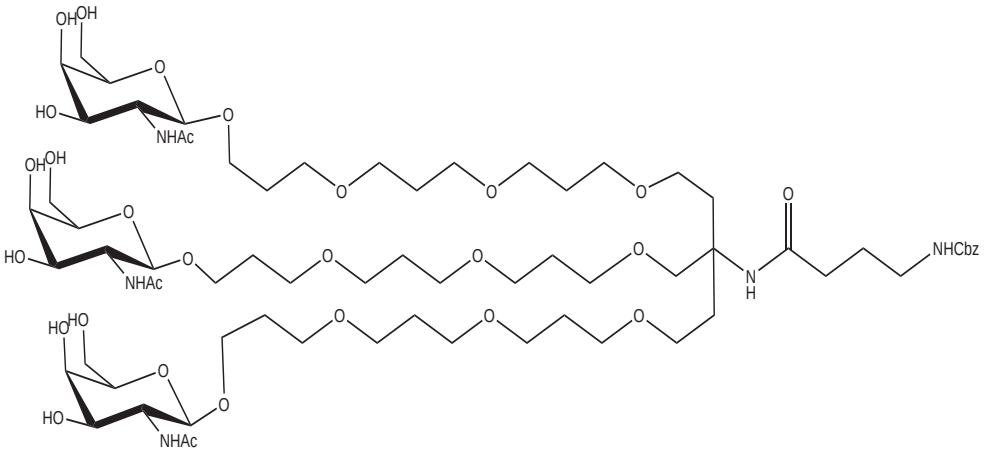


FIGURE 121 – Ligand trivalent possédant un point d'ancrage TRIS, une longueur de bras de 20 Å, trois résidus GalNAc et un bras polyéthylène glycol [284]

Si on regarde la géométrie des tripodes dérivés du NTA, ils satisfont à la géométrie triangulaire nécessaire pour un bon ciblage des ASGP-R. En effet, l'azote apical sert de point d'ancrage au triangle et les trois bras dérivés de la cystéine peuvent servir d'amorce pour introduire les unités GalNac via un espaceur de longueur adaptée et ajustée pour obtenir une distance située entre 15 et 25 Å. Nous avons choisi comme lien chimique, reliant le tripode à l'espaceur, un pont disulfure. La formation de ce lien va donc se faire via les trois fonctions thiols du tripode (Fig 122). L'espaceur utilisé, en plus d'avoir une longueur adaptée, doit être stable *in vivo* et relativement flexible.

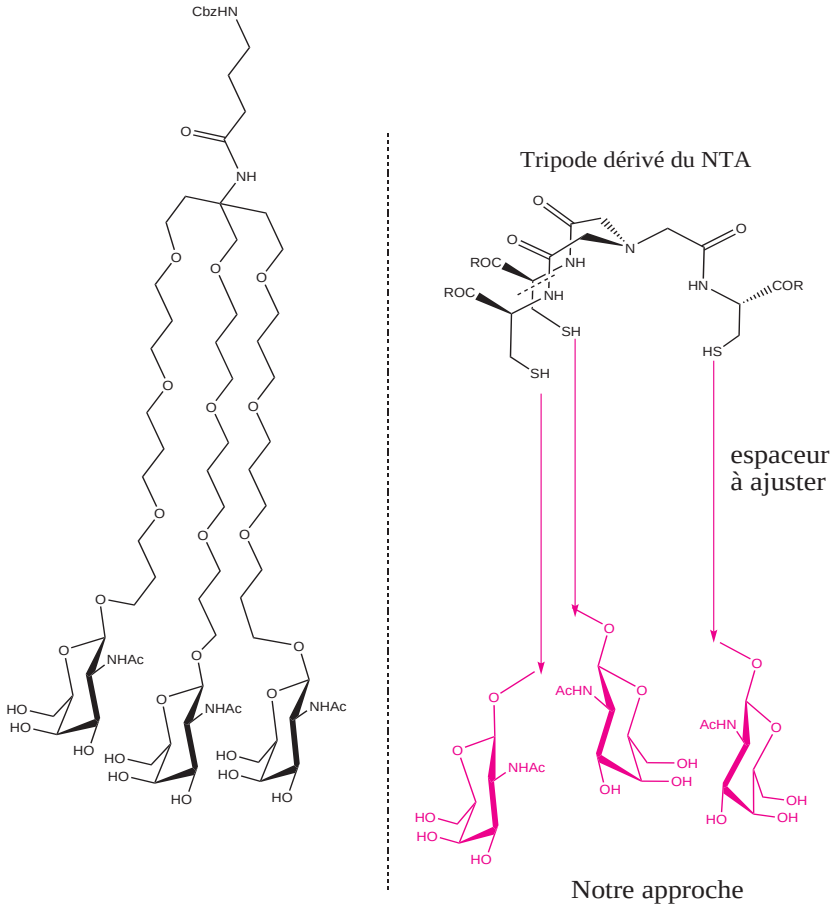


FIGURE 122 – Ligand trivalent possédant un point d'ancrage TRIS (à gauche [284]), tripode dérivé du NTA auquel il faut rajouter une longueur de bras nécessaire au ciblage (à droite)

Le choix du tripode utilisé pour la conception du deuxième vecteur est le $NTA(Cys(NH_2))_3$. En effet, nous avons vu durant la quatrième partie que ce dérivé est plus stable *in vivo* que le dérivé ester et de plus, il présente une très bonne affinité pour le cuivre(I) comparée au dérivé acide.

15.2.3 Vecteurs prodrogues

Nous avons vu dans la partie 6.2 du manuscrit que le cuivre(II) est préalablement réduit en cuivre(I) juste avant d'être reconnu par la protéine Ctr1. Afin d'être certain de ne complexer que le cuivre(I) intracellulaire, les vecteurs élaborés possèdent une activité complexante exclusivement dans les cellules ciblées. Pour cela, il suffit de masquer les fonctions thiols par un groupement qui va se rompre dans les cellules ciblées.
Le milieu intracellulaire présente un caractère réducteur dû notamment à la présence de molécules comme le glutathion à une concentration de 1 mM. Nous avons vu dans la deuxième partie du manuscrit que les cystéines sont sensibles à l'oxydation et forment un pont disulfure, qui est coupé en présence de réducteur. Ainsi, nous avons protégé les fonctions thiols en formant des ponts disulfures qui vont se rompre une fois le vecteur entré dans la cellule. Le vecteur sera donc non complexant (les fonctions thiols sont masquées) tant qu'il n'aura pas atteint sa cible (Fig 123). Une fois la cible atteinte et qu'il sera entré dans la cellule, il va être réduit par le glutathion et les fonctions thiols vont être libérées. Elles vont donc pouvoir complexer le cuivre(I) intracellulaire.

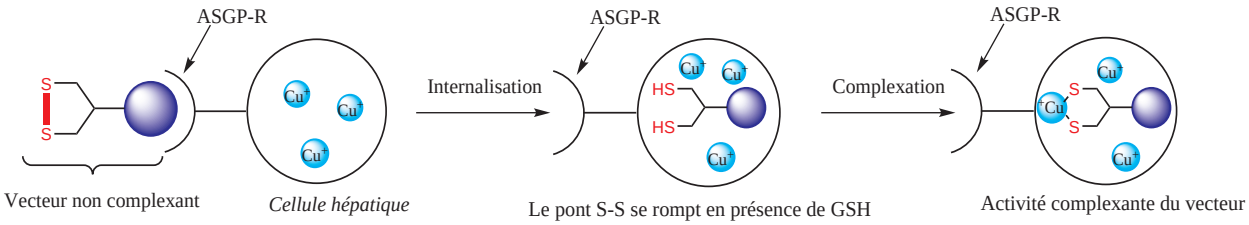


FIGURE 123 – Prodrogue dont la forme active (ici complexante) est libérée dans les cellules visées.

15.3 Introduction d'un fluorophore

Afin de visualiser les molécules dans les cellules, nous les avons fonctionnalisées par un fluorophore. La couleur choisie ne doit pas interférer avec le vert, correspondant à la gamme des longueurs d'ondes de la fluorescéine isothiocyanate (FITC), souvent utilisée par les biologistes pour les marquages cellulaires.

15.3.1 Choix de la couleur

Il faut choisir une gamme de longueurs d'ondes d'émission qui n'interfère pas avec celle de FITC. D'après la figure 124, une longueur d'onde d'émission autour de 580 nm convient. Nous avons donc opté pour une couleur rouge.

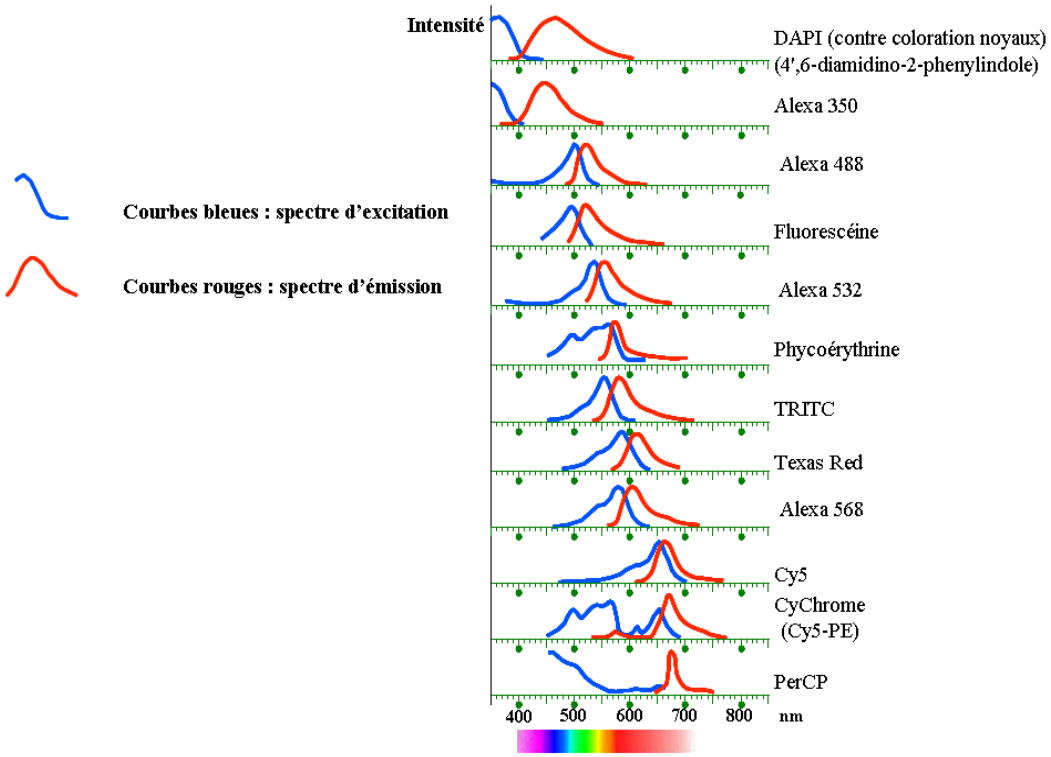


FIGURE 124 – Spectres d'absorption et d'émission de différents fluorophores existants [303]

De plus, pour visualiser les cellules, nous utilisons un microscope optique AXIO VERT 200M comportant une lampe (dispositif de fluorescence) NHBO à vapeur de mercure à arc court. Cette lampe permet de visualiser un large spectre de longueurs d'ondes. Mais pour visualiser une seule couleur, on utilise un filtre de couleur correspondant. Il faut donc que le fluorophore rentre dans la gamme des longueurs d'ondes sélectionnée par le filtre. Le filtre rouge du microscope optique correspond à la gamme d'utilisation de l'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine (TRITC, rouge) soit à celle de la rhodamine et les filtres sont 545/25 et 605/70.

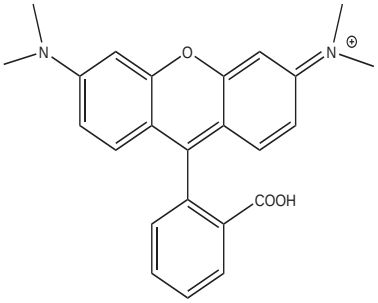


FIGURE 125 – Squelette de base des dérivés de la tétraméthylrhodamine

15.3.2 Fonctionnalisation par le fluorophore

Nous avons opté pour l'utilisation d'une fonction amine afin de greffer le fluorophore. Les fluorophores commerciaux qui réagissent avec cette fonction sont généralement vendus sous forme d'ester activé (N-hydroxysuccinimide), d'isothiocyanate, d'acide carboxylique ou de chlorure de sulfonyle (Table 53). Le tableau 53 résume les propriétés de trois fluorophores dérivés de la rhodamine. Notons que le couplage des fluorophores est délicat car ce sont des produits sensibles à la lumière, au pH et à la température. L'ajout du fluorophore se fera donc en dernière étape de synthèse selon les conditions énoncées par les fournisseurs à savoir dans la DMF à pH 7-9.

	NHS-Rhodamine	TRITC	Texas Red-Chlorure de sulfonyle
Autres noms	5/6-carboxy-tétraméthyl-rhodamine succinimidyl ester, TAMRA SE	5(6)-tétraméthylrhodamine isothiocyanate mixed isomer, TRITC, TMR	sulforhodamine 101 sulfonyl chloride, Texas Red-X, T1905,T353
Masse moléculaire	527.5	443.5 (sans Cl^-	625.15
λ d'excitation	552 nm	544 nm	596 nm
λ d'émission	575 nm	572 nm	615 nm
Cœfficients d'extinction	> 80000 M^{-1} cm^{-1}	> 80000 M^{-1} cm^{-1}	≈ 80000 M^{-1} cm^{-1}
Solubilité	dans DMF et DMSO	dans DMF et DMSO	dans DMF et DCM
Réactivité	NHS ester réagit avec amine primaire à pH 7-9	isothiocyanate réagit avec amine primaire à pH 7-9	Chlorure de sulfonyle réagit avec amine primaire à pH 7-9
Conservation	dessicateur, -20°C, à l'abri de l'humidité	dessicateur, -20°C, à l'abri de l'humidité	dessicateur, -20°C, à l'abri de l'humidité

Table 53 – Propriétés de trois fluorophores dérivés de la rhodamine [304]

15.4 Conclusion

Les récepteurs aux asialoglycoprotéines sont des récepteurs présents exclusivement sur les cellules hépatiques, et permettent donc de cibler efficacement le foie. Ces récepteurs reconnaissent sélectivement les résidus sucres galactose et N-acétylgalactosamine avec une préférence pour ce dernier. L'utilisation de ligands tri- ou tétravalents permet d'augmenter l'affinité pour ces récepteurs par effets coopératifs. Les plates-formes envisagées lors de l'élaboration des parties chélatantes, à savoir le cyclodécapeptide RAFT et les tripodes, sont adaptés aux ciblages des ASGP-R. Afin d'obtenir des vecteurs ayant une activité complexante exclusivement dans les cellules ciblées, nous avons masqué la fonction com-

plexante en formant un ou des ponts disulfures. Ces ponts se romptent en milieu réducteur, dans les cellules, libérant ainsi l'activité complexante des vecteurs. Nous obtenons donc des vecteurs de type prodrogues. Enfin, un fluorophore de couleur rouge, dérivé de la rhodamine a été ajouté sur les deux types de vecteurs afin de pouvoir les suivre au cours des tests cellulaires.
Nous allons maintenant voir comment nous avons conçu et synthétisé les deux vecteurs envisagés.

16 Synthèse du premier vecteur issu des cyclodécapeptides P^1 et P^2

16.1 Conception de Vect1 et Vect1-TRITC, stratégie de synthèse

16.1.1 Introduction des sucres

Pour obtenir ce premier vecteur, nous sommes partis d'un cyclodécapeptide qui comporte deux cystéines au sein de sa séquence en position 2 et 7 ainsi que deux coudes β de type II (Fig 126).

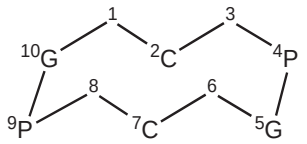


FIGURE 126 – Schématisation de la partie cyclodécapeptide

Les deux fonctions thiols des cystéines sont orientées sur une même face, les sucres vont donc être insérés sur l'autre face. Pour cela, nous avons utilisé les positions 1, 3, 6 et 8 afin de greffer quatre résidus sucres par un lien chimique oxime. Cette chimie a déjà été utilisée pour introduire des sucres sur des cyclodécapeptides [305].
Le lien oxime, développé par Rose et coll. pour la synthèse de protéines artificielles [306], est extrêmement utilisé pour la préparation de peptides conjugués [307] et est connu pour être stable *in vivo* [308]. Il résulte de la réaction entre une fonction aldéhyde et une fonction oxyamine [309]. Foillard et coll. ont mis au point une nouvelle voie de formation du lien oxime par l'oxydation d'une sérine et couplage de l'aldéhyde résultant avec une oxyamine afin d'obtenir un lien oxime avec un meilleur rendement [310] [305] (Fig 127). Les sérines nécessaires pour la formation de ce lien, sont introduits grâce à un dipeptide Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*-Bu)]-OH [310], préparé en solution homogène puis incorporé dans la séquence du cyclodécapeptide aux positions 1, 3, 6 et 8 souhaitées (face supérieure).

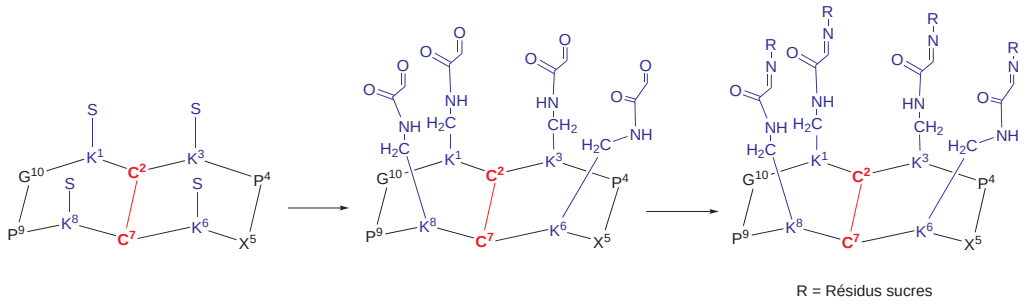


FIGURE 127 – Oxydation des sérines en aldéhyde (première étape) et formation du lien oxime (deuxième étape)

16.1.2 Greffage du fluorophore

Le greffage du fluorophore a été réalisé par l'intermédaire d'une fonction amine. Cette amine a été introduite via une cinquième lysine insérée en position 5 dans la séquence peptidique, c'est à dire dans un des coudes β (Fig 128). Afin de conserver la structure du coude, une lysine non naturelle de type D (au lieu de L) a été insérée à la place de la glycine en position 5. L'utilisation de la lysine et de cette position permet d'éloigner le fluorophore des unités complexante et de ciblage et de la greffer à la fin de la synthèse peptidique.

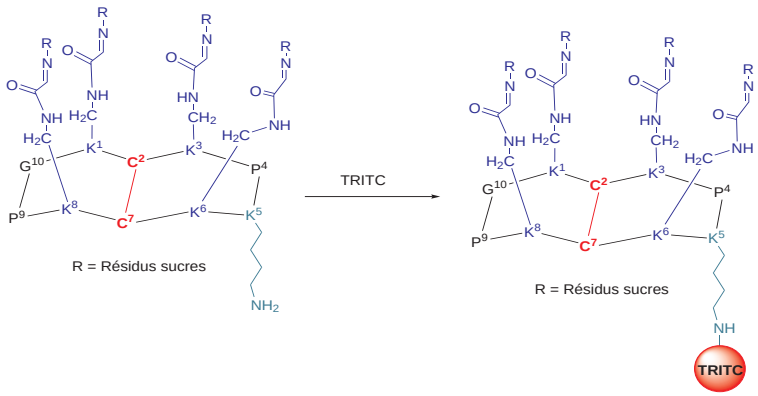


FIGURE 128 – Lysine non naturelle en position 5 pour greffage d'un fluorophore

Le fluorophore choisi est le dérivé rouge de FITC à savoir, TRITC. L'avantage de ce fluorophore est qu'il est relativement peu coûteux. Le couplage se fait entre la fonction amine de la lysine et la fonction isothiocyanate du fluorophore. Le greffage du fluorophore est réalisé en dernière étape en raison de sa sensibilité ; cela permet aussi d'obtenir la molécule non marquée.

16.1.3 *N*-acétylgalactosamine comme résidu sucre

Nous avons choisi le sucre présentant la meilleure affinité pour les ASGP-R à savoir la *N*-acétylgalactosamine. La position anomérique du sucre n'influence pas l'affinité entre le résidu sucre et les ASGP-R. Par contre, cette position anomérique est importante pour la synthèse car c'est par elle que le sucre est greffé sur la plate-forme par couplage avec les fonction aldehyde. La synthèse du lien oxime sur un dérivé α *N*-acétylgalactosamine a été décrite [210]. Nous avons donc, pour ce premier vecteur, opté pour le choix de cet anomère (Fig 129). Notons que la plupart des résultats de la littérature sur la reconnaissance ASGP-R et des glycoligands synthétiques est plutôt décrite avec des anomères β. Cependant, le greffage de quatre résidus sucres sur une plateforme RAFT pour cibler des lectines de type C est quant à lui décrit sur des anomères α. Cela va donc nous permettre de vérifier que la position anomérique n'intervient pas dans la reconnaissance ligand-récepteur.

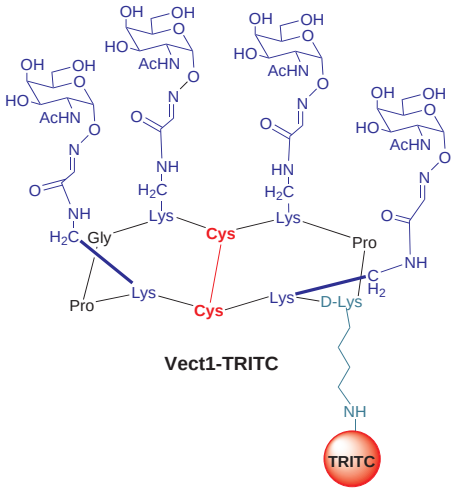


FIGURE 129 – Structure du premier vecteur

16.2 Synthèse et discussion

16.2.1 Synthèse du dipeptide Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]-OH :

La synthèse de ce dipeptide a été réalisée en milieu homogène selon un protocole déjà décrit [310]. L'acide aminé Boc-Ser(*t*Bu)-OH réagit avec le *N*-hydroxysuccinimide afin de former l'ester activé Boc-Ser(*t*Bu)-NHS avec un rendement de 85%. Cet ester activé réagit ensuite avec l'amine primaire de la chaîne latérale de l'acide aminé Fmoc(Lys)-OH en présence de base pour donner le dipeptide souhaité avec un rendement global de 54% (Fig 130).

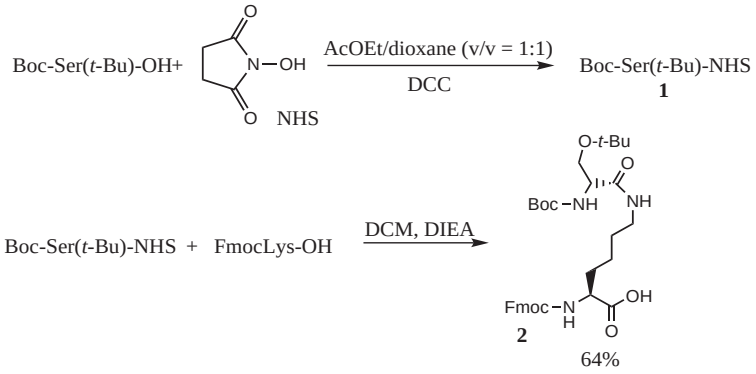


FIGURE 130 – Synthèse de l'ester activé Boc-Ser(t-Bu)-NHS et du dipeptide Fmoc-Lys[Boc-Ser(t-Bu)]-OH

16.2.2 Synthèse de la plate-forme cyclodécapeptide

La synthèse du décapeptide a été réalisée par synthèse peptidique sur support solide en utilisant la stratégie Fmoc. La résine utilisée lors de la synthèse peptidique est la même que celle employée pour le synthèse des peptides P^1 et P^2 à savoir la résine 2-chlorochlorotrityle. Les avantages de cette résine ont été décrits au cours de la partie 6.1. Le dipeptide Fmoc-Lys[Boc-Ser(t-Bu)]-OH a donc été ajouté quatre fois au cours de la synthèse. En raison de son encombrement, le couplage de l'acide aminé suivant a été difficile et le rendement final, du décapeptide comportant les acides aminés protégés sur leurs chaînes latérales, est donc abaissé par rapport aux valeurs théoriques (rdt = 64%).
Le clivages des groupements trityles des cystéines et la formation du pont disulfure ont été réalisés *in-situ* en ajoutant de l'iode le tout sur support solide afin d'obtenir le produit **4** (Fig 131). L'avantage est que l'iode en excès est facilement éliminé par rinçage. Notons que la formation de ce pont disulfure permet d'obtenir une pré-cyclisation du peptide.
Le décapeptide a ensuite été clivé de la résine dans des conditions douces et il a été cyclisé en milieu homogène dilué pour éviter la formation d'oligomères (Fig 131). Ensuite, les chaînes latérales ont été déprotégées en présence de TFA concentré afin d'obtenir le produit **6** avec un rendement global de 33% (Fig 131).

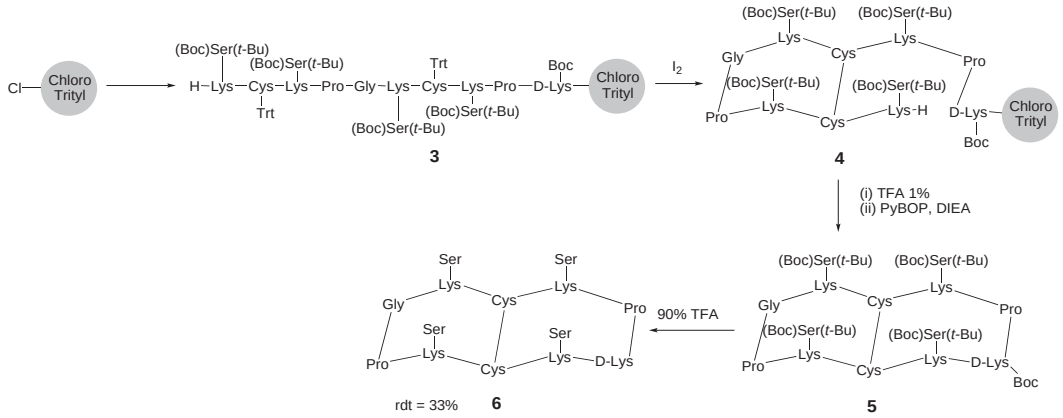


FIGURE 131 – Schéma de synthèse des précurseurs 3 à 6

16.2.3 Oxydation des sérines

L'oxydation des sérines a été réalisée selon un protocole décrit en présence de $NaIO_4$ comme oxydant [311] [310]. Le traitement du cyclodécapeptides **6** par $NaIO_4$ permet d'obtenir le produit d'oxydation **7** avec un rendement sur cette étape de 15%. Nous obtenons majoritairement (à plus de 40%) un produit secondaire qui correspond à l'oxydation du pont disulfure (S-S=O). La nature de ce produit a été confirmée par spectrométrie de masse puisque nous avons une augmentation de la masse attendue de 16. L'utilisation de $NaIO_4$, comme oxydant, est connu pour former des thiosulfinates et des thiosulfonates à partir d'un disulfure [312] [313], mais une sélectivité pouvait néanmoins être attendue [314]. La quantité de produit **7** obtenue est suffisante pour la suite de la synthèse. Pour obtenir ce premier vecteur en quantité plus importante, une optimisation de la réaction en changeant, soit la nature du lien chimique (lien oxime), soit en formant le pont dissulfure après oxydation des sérines en utilisant un groupement protécteur des cystéines stable sous TFA concentré, serait néanmoins nécessaire .

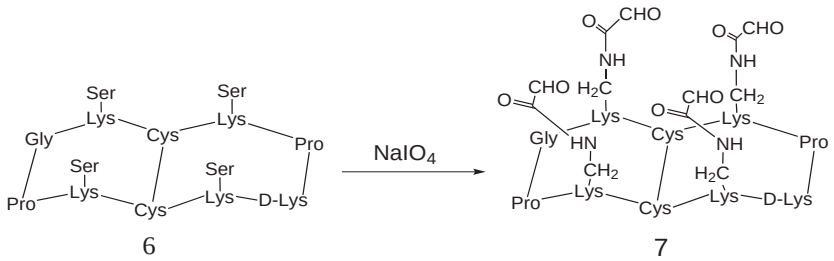


FIGURE 132 – Oxydation des sérines

16.2.4 Introduction des résidus sucres via un lien oxime

Synthèse du résidu sucre α-GalNac-ONH$_2$: Le résidu sucre GalNac-ONH$_2$ a été synthétisé indépendamment en parallèle selon un protocole déjà décrit en 9 étapes (Fig

133) [210].

A partir du galactose commercial, préalablement protégé par des acétyles sur tous les hydroxyles du sucre, le dérivé bromé **9** est obtenu après réaction avec HBr. La formation du D-Galactal **10** par traitement avec Zn, permet ensuite d'obtenir le composé **11** par réaction avec l'azoture de sodium en présence de nitrate de cérium et d'ammonium. La fonction nitrate située sur le carbone anomérique est ensuite transformée en hydroxyle **12**, puis en dérivé fluoré **13** par traitement successif au $NaNO_2$ puis (DAST) du diméthyl amino-sulfure trifluorure. Le couplage glycosidique entre le dérivé **13** et la *N*-hydroxyphtalimide en présence de BF_3Et_2O permet d'obtenir sélectivement le composé **14** de forme α. En effet, la présence du groupe azoture en position 2 et de BF_3Et_2O favorise la formation de l'anomère α. Les formes α et β sont séparées par colonne chromatographique de silice. Le groupement azoture situé en position 2 du sucre **14** est ensuite réduit par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon et d'anhydride acétique pour obtenir le groupement NHAc souhaité en posotion 2 (produit **15**). Enfin, l'oxyamine **16** est obtenu après désacétylation des groupements hydroxyles et réaction de la méthylhydrazine, le résidu sucre de configuration α est obtenu au départ de D-Galactose avec un rendement global de 2% sur 9 étapes. Il possède en position anomérique un groupement oxyamine ($-ONH_2$) qui va pouvoir réagir avec les fonctions aldéhydes du cyclodécapeptide **7** (Fig 132).

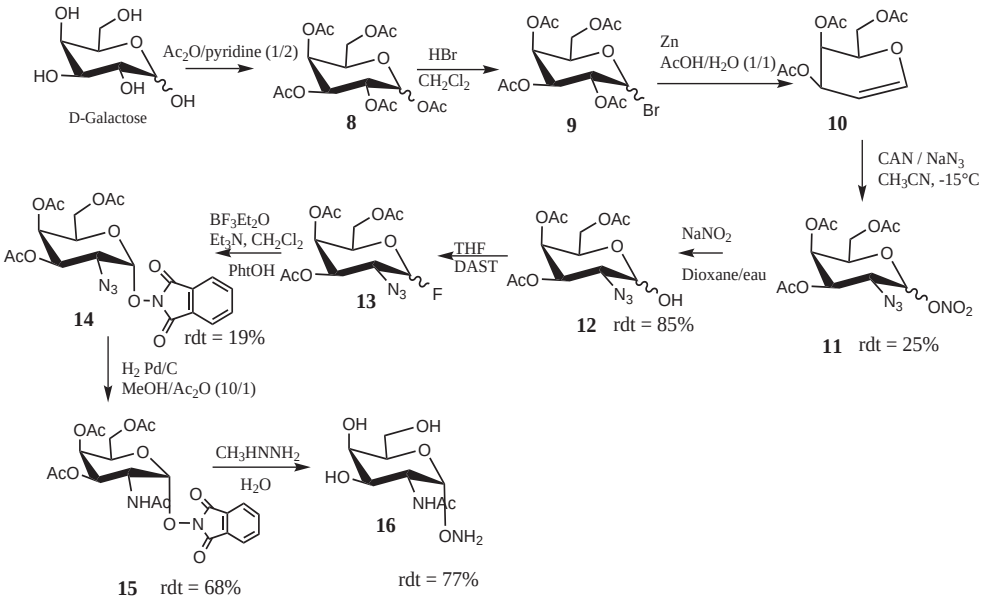


FIGURE 133 – Schéma de synthèse de l'amino-sucre nécessaire à la formation du lien oxime

Couplage de quatre résidus sucres sur le cyclodécapeptide 7 : Les résidus sucres **16** réagissent avec les fonctions aldéhydes du cyclodécapeptide **7** dans un mélange H_2O/AcOH (v/v = 9/1) afin de former un lien oxime et obtenir après purification sur colonne préparative HPLC, le cyclodécapeptide **Vect1** (premier vecteur, Fig 134) avec

un rendement global de 2.5% à partir de la synthèse peptidique (14 étapes). Ce vecteur présente une unité chélatante protégée sous forme d'un disulfure et une unité de ciblage (quatre résidus GalNAc). Ce premier vecteur (Vect1) non marqué est nécessaire pour réaliser les mesures de complexation du cuivre(I) *in vitro*. En effet, comme ces mesures vont être réalisées par spectroscopie UV-visible, la présence d'un fluorophore perturberait donc les mesures.

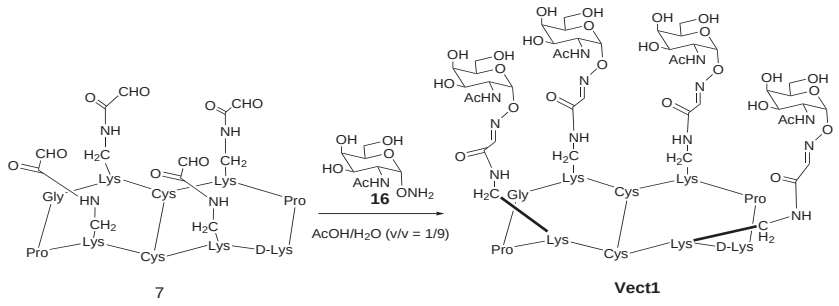


FIGURE 134 – Synthèse du cylodécapeptide **Vect1**, (vecteur 1 non marqué)

16.2.5 Greffage du fluorophore tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC)

Afin de suivre le premier vecteur au cours des études cellulaires, nous avons greffé un fluorophore de couleur rouge dérivé de la rhodamine à savoir TRITC. Le greffage a été réalisé entre l'amine de la lysine située dans le coude β et la fonction isothiocyanate du fluorophore (Fig 135). Les fluorophores sont, en général, des molécules sensibles à la lumière, au pH et à la température. La réaction se fait donc à l'abri de la lumière, à pH basique (8-9) et à température ambiante. Le fluorophore est mis en excès et après réaction, le milieu réactionnel est passé sur colonne préparative HPLC en présence de TFA. L'excès de TRITC se dégrade sur colonne et la purification du produit **Vect1-TRITC** est très difficile. Nous obtenons donc après purification le produit souhaité pur avec un rendement faible de 8% sur cette étape.

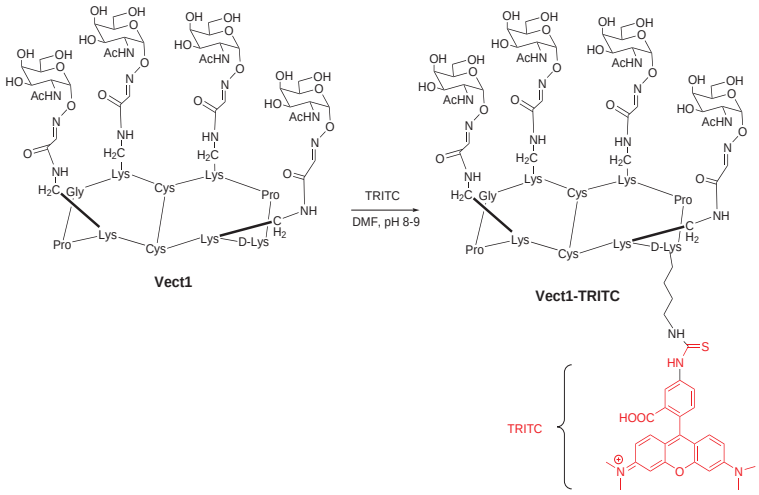


FIGURE 135 – Synthèse du premier vecteur fluorescent dans le rouge : **Vect1-TRITC**

16.3 Conclusion sur cette synthèse

Nous avons obtenu deux premiers vecteurs (Vect1 et Vect1-TRITC) basés sur un modèle RAFT. Nous nous sommes inspirés pour réaliser cette synthèse, de protocoles connus qui nous ont permis d'obtenir ces premiers vecteurs rapidement. L'étape de pré-cyclisation du peptide sur support solide par formation du pont disulfure confère un caractère novateur à la synthèse.

La synthèse du vecteur non marqué, **Vect1**, comporte une étape limitante qui sont l'oxydation des sérines. Cette étape peut être optimisée en changeant la nature du lien chimique reliant les sucres à la plate-forme RAFT ou en oxydant les sérines avant la formation du pont disulfure.

La synthèse du vecteur marqué, **Vect1-TRITC**, possède quant à lui une étape limitante en plus qui est le couplage du fluorophore. Cette étape de couplage est très difficile à réaliser puisque le fluorophore est un produit sensible. Nous pourrions cependant optimiser la purification en supprimant le TFA de l'éluant qui doit favoriser sa dégradation. Notons aussi que le lien isothiocarbamate est un lien chimique peu stable. On peut donc envisager de changer le lien chimique entre l'amine et le fluorophore en prenant, par exemple, un ester activé pour former une liaison amide.

qsCependant, les quantités de produits marqué et non marqué obtenues sont suffisantes pour réaliser les expériences *in vitro* et les tests cellulaires.

17 Synthèse du deuxième vecteur issu du tripode NTA(Cys(NH_2))$_3$

17.1 Conception de Vect2

17.1.1 Plate-forme chimique issue du NTA

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.2., l'élaboration du deuxième vecteur est basée sur une structure tétraèdrique en utilisant l'azote apical du NTA comme point d'ancrage et les thiols des trois cystéines qui vont servir d'amorce afin d'introduire les trois résidus GalNAc (Fig 117 et Fig 122) [284]. Afin d'ajuster la distance entre les sucres et l'azote apicale, il faut choisir un espaceur de longueur adaptée mais également stable, flexible et biocompatible [315]. Nous avons donc opté pour un espaceur triéthylène glycol. En effet, les polyéthylènes glycols (PEG) sont très utilisés pour la vectorisation de médicament en greffant des chaînes PEG sur des liposomes et obtenir ainsi des vecteurs furtifs [316]. Ils sont aussi très employés en tant que polymères pour encapsuler des médicaments et les rendre inactifs et donc moins toxiques (polymeric prodrug) [317]. De plus, les PEG sont connus pour être biodégradable, et pour posséder une immunogénécité et une antigénécité très basses [315].

Dans les modèles décrits dans la littérature, nous avons vu (1.1.3) que la distance optimale entre le résidu sucre et l'azote apical doit être d'environ 20 Å. Nous avons estimé la distance entre l'azote apical et la fonction thiol d'environ 7-8 Å, le bras PEG doit donc être d'environ 11-12 Å. Le produit commercial 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol a été choisi comme produit de départ. Le résidu sucre a donc été greffé sur le bras 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol par couplage glycosidique. Afin de protéger la fonction thiol et de libérer le chélateur NTA(Cys(NH_2))$_3$, nous avons choisi un lien disulfure entre l'autre extrémité de l'espaceur et les fonctions thiols du tripode. Ainsi, une fois la molécule reconnue par les ASGP-R, elle entrera dans la cellule. Les trois ponts disulfure se cliveront et le tripode NTA(Cys(NH_2))$_3$ sera libéré (Fig 136). Les sucres et l'espaceur seront quant à eux libres et vont être détruits par la cellule.

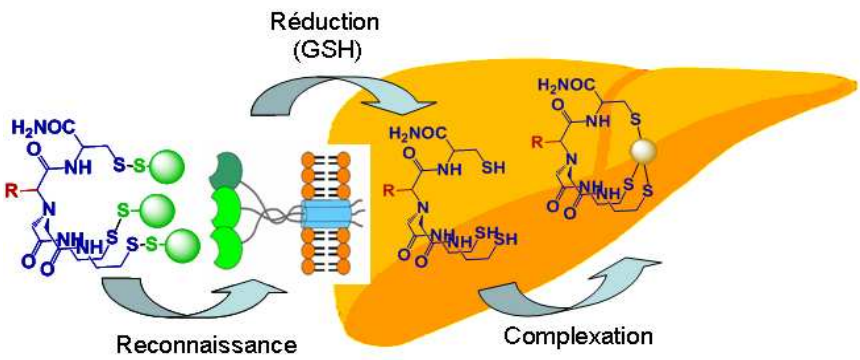


FIGURE 136 – Schématisation du caractère prodrogue du vecteur 2

17.1.2 Greffage du fluorophore

Nous avons choisi d'introduire le fluorophore sur le vecteur, par l'intermédiaire d'une fonction amine. Pour cela, nous avons remplacé un des bras acétate du tripode NTA par une lysine en utilisant le N_α-N_α-Bis(carboxyméthyle)-L-lysine (NTA(Lys)) commercial comme produit de départ. Notons que cette plate-forme chimique (NTA(Lys)) est asymétrique (plus de symétrie C_3).
Vu les problèmes rencontrés au cours de l'étape de couplage du fluorophore TRITC sur **Vect1** et du mauvais rendement obtenu après purification, nous avons décidé de changer de fluorophore. Il faut cependant garder la couleur rouge nécessaire et donc l'emploi d'un fluorophore dérivé de la rhodamine. Le lien chimique formé lors de la réaction entre l'amine et l'isothiocyanate de TRITC n'étant pas très stable chimiquement, nous avons opté pour la formation d'un lien amide entre l'amine et le fluorophore en partant d'un fluorophore dérivé ester activé (NHS). Ce fluorophore commercial se nomme Rhodamine-NHS ou carboxy-tétraméthylrhodamine succinimidyle ester ou TAMRA. La structure chimique est la même que TRITC mais la liaison formée entre l'amine et le fluorophore est donc différente et plus stable.

17.1.3 Formule du deuxième vecteur

Comme dans le cas du premier vecteur, nous avons besoin d'un vecteur non marqué pour réaliser des tests *in-vitro* par spectroscopie UV-visible en présence de BCS. La partie chélatante dans ce deuxième vecteur est le **NTA(Cys(NH$_2$))$_3$** (Fig 136), c'est lui qui va complexer le cuivre(I) intracellulaire. Nous avons donc synthétisé les deux vecteurs, **Vect2-TAMRA** marqué et **Vect2** non marqué, ce dernier est quand à lui symétrique et a été synthétisé à partir du tripode **NTA(Cys(NH$_2$))$_3$** (Fig 137).

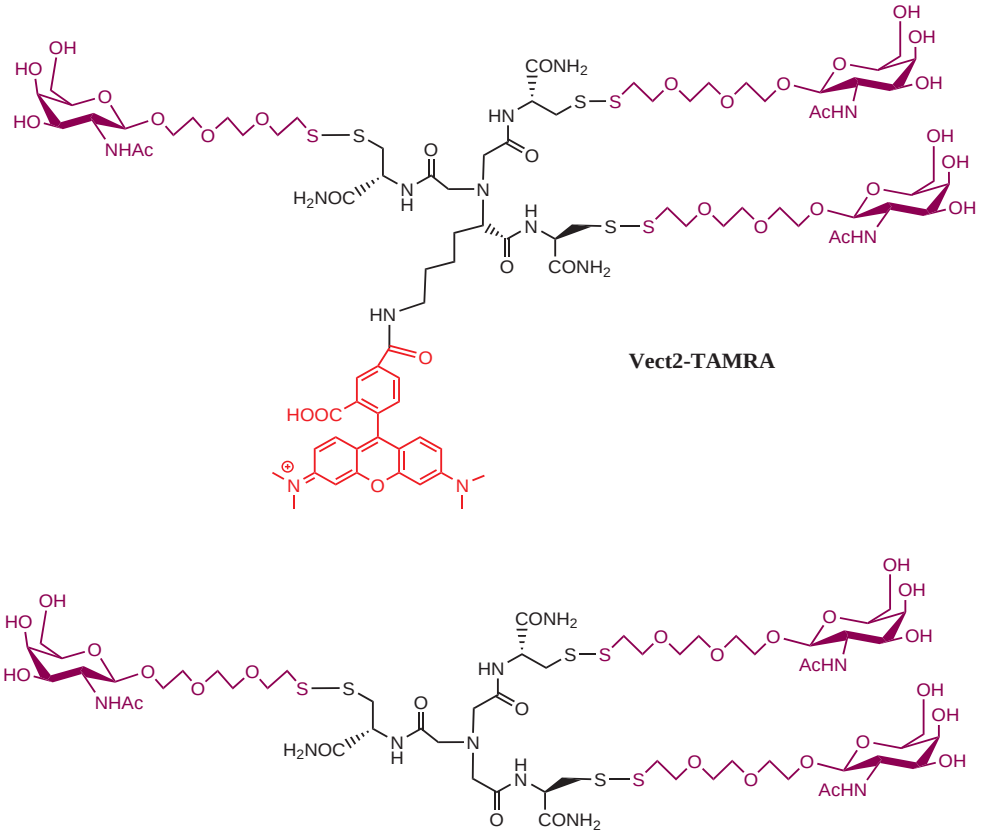


FIGURE 137 – Structure de Vect2-TAMRA (en haut) et Vect2 (en bas)

17.2 Synthèses et discussions

Pour accéder aux vecteurs **Vect2** et **Vect2-TAMRA**, nous avons envisagé la formation des ponts disulfures entre le même intermédiaire **24** contenant le résidu GalNac et les tripodes **NTA(Cys(NH$_2$))$_3$** pour **Vect2** et **A** pour **Vect2-TAMRA** (Fig 138).

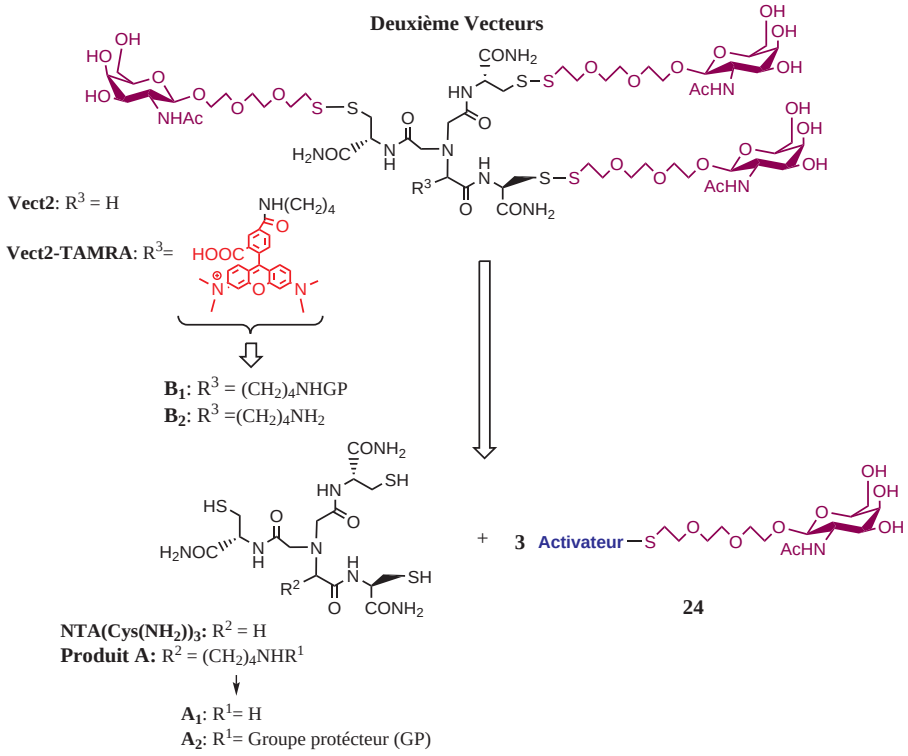


FIGURE 138 – Rétrosynthèse des deuxièmes vecteurs : la partie « bras + sucre » (en violet) et la partie tripode (en noir) ont été synthétisées indépendamment.

La synthèse des produits intermédiaires **24**, $\mathbf{A}_1$, $\mathbf{A}_2$, $\mathbf{B}_1$ et $\mathbf{B}_2$ et des deux vecteurs **Vect2** et **Vect2-TAMRA** va maintenant être développée.

17.2.1 Synthèse de l'intermédaire 24 contenant le résidu GalNac

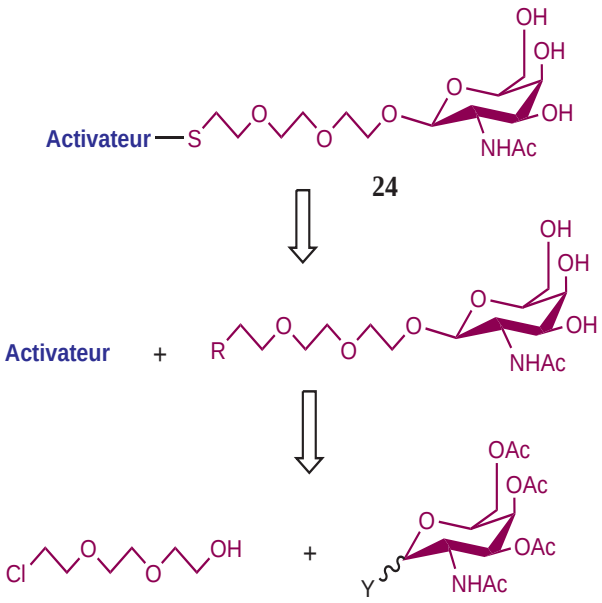


FIGURE 139 – Rétrosynthèse du produit **24**

Pour accéder à l'intermédiaire **24**, nous avons choisi de partir du sucre GalNac protégé et de réaliser un couplage glycosidique entre ce sucre et l'espaceur (l'alcool commercial 2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol). Une fois le couplage réalisé, l'autre extrémité de l'espaceur a été modifié afin d'obtenir un thiol activé et faciliter ainsi la formation d'un pont disulfure intermoléculaire.

Couplage glycosidique, définition : Le couplage glycosidique est un couplage entre un sucre donneur et un accepteur (autre sucre ou alcool). Cette réaction est catalysée par un promoteur. Le sucre donneur doit posséder un groupe partant en position anomérique et ses hydroxyles doivent être protégés (Fig 139). L'accepteur doit avoir au moins une fonction hydroxyle libre. Le promoteur active le donneur. Dans notre cas, l'accepteur est le 2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol et le donneur potentiel est le sucre commercial *N*-acétylgalactosamine entièrement acétylé.
Le couplage glycosidique est une réaction largement utilisé notamment pour la synthèse de glycoligands. Il existent de nombreuses conditions décrites dans la littérature [318] [319] [320].
Nous avons utilisé différentes conditions pour réaliser cette réaction entre le 2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol et le GalNac entièrement acétylé. Ce dernier est obtenu dans des conditions classiques à savoir l'anhydride acétique et de la pyridine [321] [322]. La forme α est obtenue majoritairement avec un rendement de 95%.

Choix du donneur : Afin de faciliter la réaction de glycosylation, le groupement OAc de la position anomérique a été substituée par un halogène pour avoir un meilleur groupe partant.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé le dérivé bromé **17** à partir du sucre entièrement acétylé. Le rendement obtenu pour former le produit **17** est inférieur à 9% [323]. En effet, le composé trop réactif se dégrade très rapidement au contact de l'eau et de l'oxygène et redonne un hydroxyle en position anomérique.
Nous avons donc décidé de synthétiser le dérivé chloré **18**, moins réactif donc moins sensible à l'eau et à l'oxygène. La synthèse a été réalisée selon un protocole décrit à partir du GalNac commercial. Le traitement de ce dernier par le chlorure d'acyle permet de réaliser simultanément la protection des hydroxyles et la substitution du OAc en position anomérique par un chlore [324] [325]. Cette réaction permet d'obtenir le produit **18** avec un rendemment de 19%. En effet, ce produit est légérement plus stable que le dérivé bromé **17** mais pas suffisament car il redonne l'alcool en position anomérique. Malgré tout, nous avons obtenu assez de produit pour tester le couplage glycosidique.

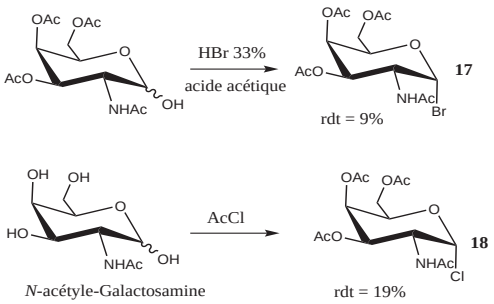


FIGURE 140 – Synthèse des sucres dérivé chloré et bromé en position anomérique

Avec un halogène en position anomérique, le promoteur de choix est le triflate d'argent AgOTf. L'argent capte l'halogène de la position anomèrique, AgOTf étant un acide de lewis (Fig 141). L'inconvénient de ce sel est que la réaction doit être faite à l'abri de la lumière. Le traitement du dérivé chloré **18** par le triflate d'agent, réalisée selon un protocole décrit [325], conduit à un mélange des deux anomères avec un rendement de 40%. Ces deux anomères sont présent en proportion 50-50 et leur séparation sur colonne chromatographique s'est avérée impossible en raison de la présence de produits parasites issus de la polymérisation de l'alcool. Nous avons donc changé de stratégie.

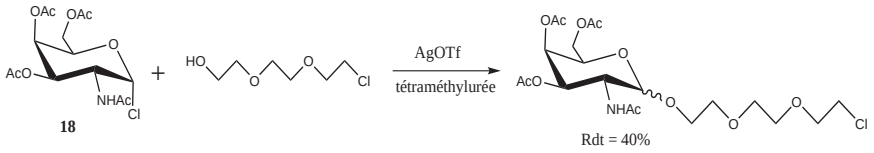


FIGURE 141 – Couplage glycosidique en présence du promoteur AgOTf

L'autre voie de synthèse est de garder en position anomérique le groupement OAc et de réaliser le couplage glycosidique avec un autre promoteur.
Le couplage a donc été réalisé en présence de $BF_3.Et_2O$. Dans notre cas, lors du traitement du GalNac tout acétylé par $BF_3.OEt_2$, selon le protocole décrit sur le galactose entièrement acétylé [326] [327] aucune réaction n'a été observée. Cela peut s'expliquer par le faible caractère nucléofuge du groupement OAc et que $BF_3.Et_2O$ n'est pas un promoteur adapté dans ce cas là.

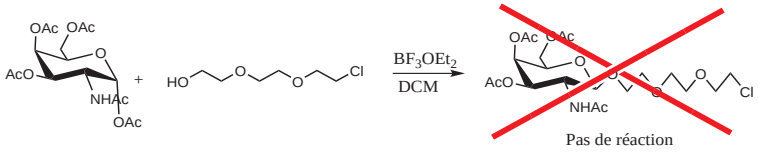


FIGURE 142 – Couplage glycosidique en présence du promoteur BF_3Et_2O

Une autre méthode consiste à former un intermédiaire oxazoline (Fig 143). L'obtention de cet intermédaire oxazoline est décrite avec le sucre *N*-acétylgalactosamine entièrement protégé par des acétyles [321] [328] (Fig 143, produit **19**). L'utilisation de cet intermédaire lors de la glycosylation permet de former sélectivement l'anomère β. Nous avons donc synthétisé cette oxazoline **20** par réaction du GalNac entièrement acétylé **19** avec le TMSOTf. Cet intermédiaire (Fig 143, produit **20**) réagit ensuite avec l'alcool 2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol en présence de TMSOTf. Cette réaction conduit à un mélange des deux formes anomériques dont la forme β est majoritaire et isolée par colonne chromatographique avec un rendement global de 55% à partir du produit **19**. Notons que la forme α est difficilement purifiable car elle est éluée en même temps que l'alcool en excès (Fig 143).

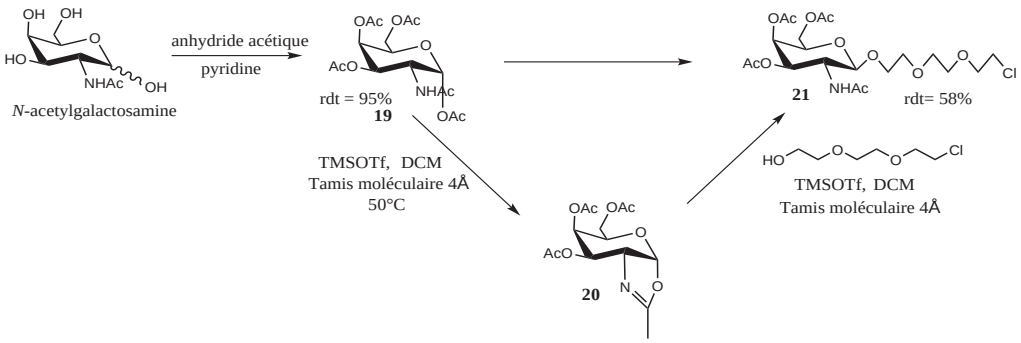


FIGURE 143 – Couplage glycosidique en présence du promoteur TMSOTf, via la formation de l'ozaxoline : Formation du produit **21**.

Obtention d'un thiol activé pour former le pont disulfure : Afin de former de manière régiosélective le pont disulfure dissymétrique par réaction intermoléculaire, il faut faire réagir une fonction thiol avec un thiol activé [329]. Il existe différents moyens de former

un thiol activé, notamment par l'emploi de dérivés de type thiosulfonates (NaS_2O_2R) très utilisés pour la synthèse de ligands glycomimétiques [330] [331] [332] [333] ou par l'emploi de dérivés de type radical 2-pyridyl-sulfanyle qui correspond à une activation par échange de disulfure, c'est la méthode la plus commune [334] [335] [336] [337] [338] [339].

a) Activation par NaS_2O_2Ph : Les composés de type thiosulfonates réagissent avec des dérivés halogénés selon un mécanisme de substitution nucléophile. NaS_2O_2Ph a donc été employé pour former un thiol activé à partir du produit **21** qui possède un chlore au bout de la chaîne triéthylène glycol.
Le NaS_2O_2Ph n'est pas commercial mais sa synthèse est décrite [330] à partir du benzènesulfinate de sodium et du soufre. Cette réaction nous a permis d'obtenir NaS_2O_2Ph avec un rendement de 58% après recristallisation (Fig 144).
La substitution nucléophile entre NaS_2O_2Ph et le produit **21** a été réalisée selon un protocole décrit, mais aucune réaction n'a été observée (Fig 144) [330]. La plupart des réactions décrites sont faites soit sur un sucre halogéné en position anomèrique donc beaucoup plus réactif que le chlore qui est situé en bout de chaîne du produit **21**, soit sur un dérivé bromé et celui-ci est un meilleur groupe partant que le chlore [330] [331] [332] [333] [340]. Nous avons donc décidé d'utiliser l'autre méthode qui consiste à faire réagir un dérivé de type radical 2-pyridyle-sulfanyle (PYS) sur un thiol libre pour l'activer.

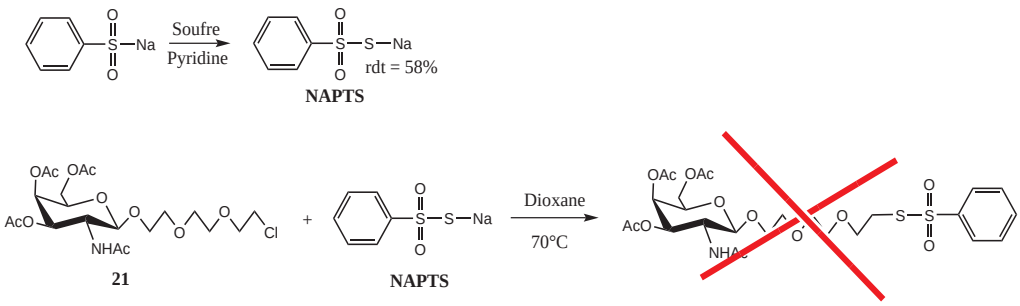


FIGURE 144 – Schéma de synthèse

b) Activation par l'aldrithiol : Cette réaction consiste à transférer un thiol sur un autre. Le produit **21** doit donc être transformé au préalable en thiol libre. La formation d'un thiol à partir d'un dérivé chloré est décrite dans la littérature sur le bras 2[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthanol [341]. Cette réaction passe par la formation d'un intermédiaire de type thiourée. L'inconvénient est que la coupure du thiourée formée est réalisée en présence de NaOH très concentré à reflux. Plusieurs problèmes se posent donc :

- Il faut pouvoir cliver la thiourée en thiol sans déprotéger le NHAc du sucre.
- La réaction doit se faire à l'abri de l'oxygène pour ne pas oxyder le thiol formé.

Il est possible de déprotéger sélectivement le thiourée par du bisulfite ($Na_2S_2O_5$) sans déprotéger les groupes acétyles [330] [342] [343], mais le thiol formé est apolaire et le

purifier sur colonne chromatographique de silice est risqué (possible oxydation du thiol). L'utilisation de la soude permet la déprotection simultanée des groupements OAc. Par contre, le produit résultant est polaire, mais il ne présente aucun groupement permettant un suivi UV-visible lors d'une purification par HPLC préparative. Nous avons donc choisi de ne pas purifier le thiol formé **23**.
Les quatre étapes (Fig 145) : formation et coupure du thiourée, déprotection des hydroxyles et activation du thiol ont donc été réalisées *in-situ* à l'abri de l'oxygène (flux d'argon continu) avec des solvants dégazés.

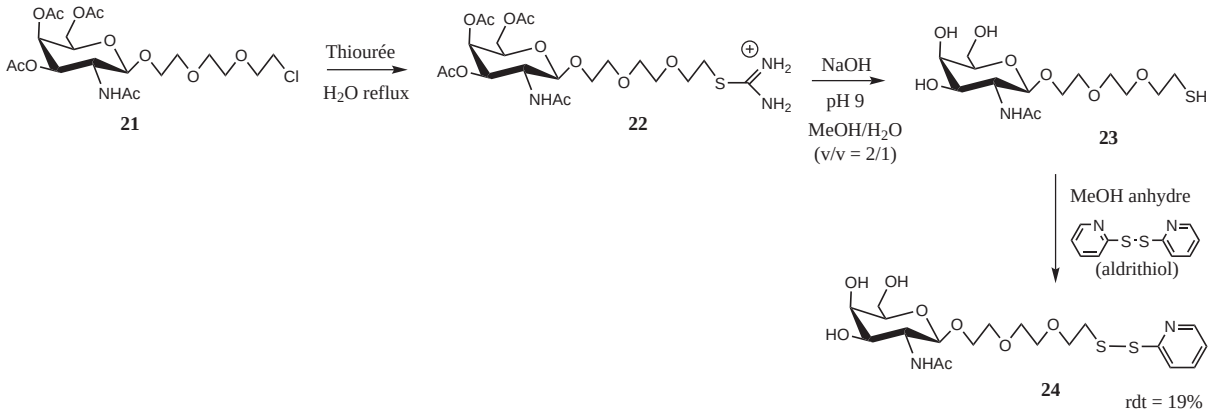


FIGURE 145 – Synthèse du produit **24**

Après formation de l'intermédaire thiourée **22**, la coupure en thiol et la déprotection est réalisée par traitement à la soude. Afin de ne pas déprotéger le NHAc lors de cette étape, le pH est contrôlé tout au long de la réaction et maintenu à pH 9, pH pour lequel seul les OAc se déprotégent [344] (pH doit être supérieur à 10-12 pour déprotéger NHAc [345]). La réaction a été suivie par RMN ^{1}H. Les OAc se déprotègent au bout de 2h, la coupure de la thiourée est plus longue. Nous observons aussi la formation de deux sous produits en quantité variable qui correspondent à l'acétylation du thiol libre (produit **25**)(confirmé par spectrométrie de masse, $[M+H^+]_{th} = 412.2$; $[M+H^+]_{exp} = 412.3$) et si le montage n'est pas assez étanche, il y a oxydation du thiol (produit **26**) (confirmé par spectrométrie de masse,$[M+H^+]_{th} = 737.3$; $[M+H^+]_{exp} = 737.2$), (Fig 146).

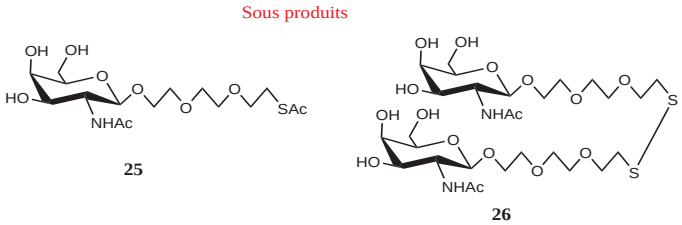


FIGURE 146 – Produits secondaires obtenus au cours de la formation du produit **24**

Enfin, l'activation du thiol libre (produit **23**, Fig 145) est réalisée par addition

d'aldrithiol (PYS-PYS) [337]. La réaction est suivie par HPLC analytique. Quand celle-ci est terminée, le produit est immédiatement purifié par HPLC préparative sans TFA. Le produit **24** n'est pas stable. Nous avons observé une dégradation de ce produit **24** à l'oxygène. Il doit donc être utilisé rapidement après purification. Le rendement global pour ces 4 étapes est de 19% (Fig 145).

Notons que l'étape limitante de cette synthèse est la formation du thiol. Un moyen d'éviter la formation du produit acétylé sur le thiol serait de mettre un réactif permettant de piéger les acétyles libres (scavenger). Pour éviter la formation du produit dû à l'oxydation, il faudrait réaliser un montage plus étanche.

17.2.2 Partie tripode, synthèse des produits $\mathbf{A_1}$ et $\mathbf{A_2}$

La synthèse du tripode $\mathbf{NTA(Cys(NH_2))_3}$ nécessaire pour l'obtention de **Vect2** a été décrite dans la partie 10.2.1 du manuscrit. Nous allons donc présenter dans cette partie la synthèse des tripodes $\mathbf{A_1}$ et $\mathbf{A_2}$ précurseurs de **Vect2-TAMRA**.
Nous sommes partis du produit commercial N_α-N_α-Bis(carboxyméthyle)-L-lysine (NTA(Lys)). Avant de coupler la Cys(Trt)NH_2, elle aussi commerciale, la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine doit être protégée afin d'éviter que le NTA(Lys) réagisse sur lui même au cours de la réaction de couplage. Nous avons utilisé deux stratégies concernant la protection de cette fonction amine nécessaire à l'insertion d'un fluorophore. La première stratégie consiste à protéger la fonction amine par un groupement orthogonal aux groupement trityles qui protègent les cystéines. La seconde est l'emploi d'un groupement protecteur qui se déprotège en même temps que les trityles.

Synthèse du produit $\mathbf{A_1}$:

a) Protection du $\mathbf{NH_2}$ de la lysine par le groupement Dde : Le greffage du fluorophore se fait en toute dernière étape, la fonction amine de la lysine va donc être déprotégée au dernier moment. Nous avons donc choisi d'utiliser un groupement protecteur orthogonal aux Trt (des fonctions thiols). Afin qu'il résiste au TFA, le groupement protecteur *N*-2-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthylamine (Dde) a été choisi. Ce groupement se déprotége en présence d'hydrazine 2%. L'étape de déprotection du Dde intervient après la formation du pont disulfure. Il a été montré qu'un pont disulfure est stable à ces conditions mais le temps de réaction doit être inférieur à 10 min [346] [347]. Notons aussi que le groupement protecteur S-S*t*Bu est stable à l'hydrazine (catalogue Novabiochem page 4.1).
Même si le Dde est largement utilisé, peu de protocoles détaillés concernant les conditions de protection d'une fonction amine par ce groupement sont répertoriés. Nous avons réalisé

cette réaction, traitement de la NTA(Lys) par l'acétyldimedone, en utilisant deux solvants différents. La première réaction a été éffectué dans la DMF à 60 °C et en présence de base (DIEA) [348]. La deuxième a été faite dans l'éthanol à reflux (90 °C) et en présence de DIEA [349] [350] [351]. En présence d'éthanol, on observe l'estérification des acides carboxyliques du NTA. Le produit **27** voulu a donc été obtenu, avec la réaction faite dans la DMF, avec 76% de rendement.

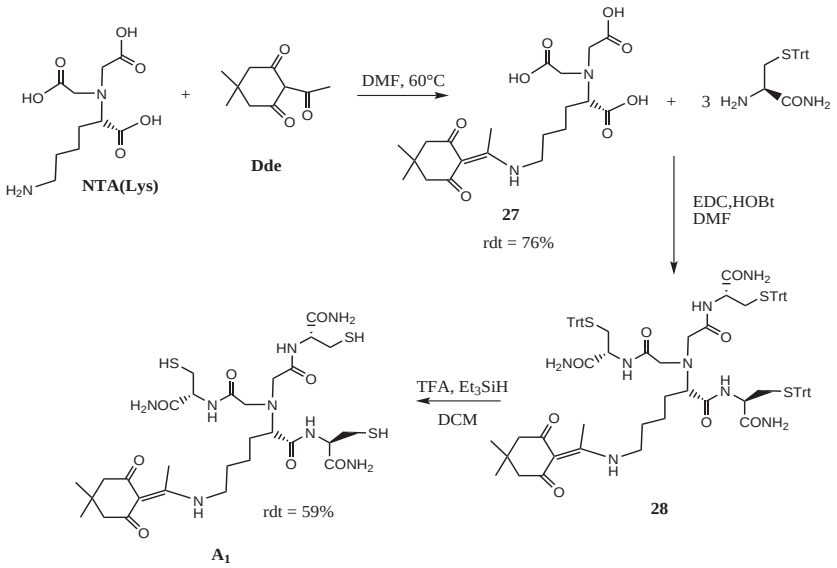


FIGURE 147 – Synthèse du produit **A1**

b) Couplage de la Cys(Trt)NH_2 et déprotection des Trt : Le couplage a été réalisé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour obtenir le tripode **NTA(Cys(NH_2))$_3$** en présence d'agents de couplage qui sont EDC et HOBt. Le produit **28** désiré a été obtenu sans être purifié. La déprotection a eu lieu en présence de TFA et le produit $\mathbf{A}_1$ (ou **NTA[Lys(Dde)(Cys(NH_2))$_3$]**) a été obtenu après purification sur colonne HPLC préparative avec un rendement global de 45% (Fig 147).

Synthèse du produit $\mathbf{A}_2$: Comme la formation du pont disulfure est sélective, la protèction de l'amine n'est pas forcément nécessaire. Nous avons donc décidé de protéger la lysine par le groupement protecteur *t*-Butyl carbamate (Boc) afin qu'il soit déprotégé en même temps que les trois trityles. Cela permet alors de gagner une étape.

Le produit N_α-N_α-Bis(carboxymethyl)-L-lysine a donc été protégé par traitement avec le di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc_2O). Le produit **29** a été obtenu sans purification avec un rendement de 64% (Fig 148). Le couplage entre le produit **29** et la **Cys(Trt)NH_2** a été réalisé dans les mêmes conditions que pour le produit $\mathbf{A}_1$ (Fig 148). Le produit **30** a été obtenu sans purification avec un rendement global de 61% à partir du NTA(Lys).

Enfin, le produit $\mathbf{A}_2$ (ou (NTA[Lys(Cys(NH_2))$_3$])) a été obtenu après purification sur HPLC préparative avec un rendement de 72% sur cette étape (Fig 148).

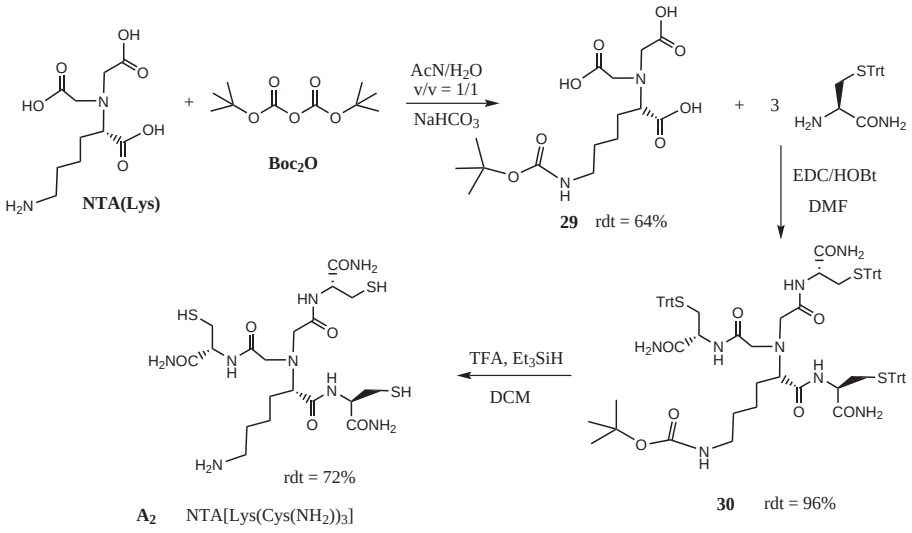


FIGURE 148 – Synthèse du produit $\mathbf{A}_2$

L'intermédiaire $\mathbf{A}_2$, possédant trois fonctions thiols et une fonction amine libre a donc été synthétisé au départ de la NTA(Lys) commerciale en trois étapes avec un rendement global de 44% .

17.2.3 Formation des trois liaisons disulfure

A ce stade, nous disposons des produits nécessaires à la formation des ponts disulfures et à la synthèse de nos deux vecteurs. La réaction a été réalisée dans la DMF et suivie par HPLC analytique. Une fois la réaction terminée, le brut a été purifié sur colonne HPLC préparative sans TFA. La séparation par HPLC préparative entre le produit formé et le produit **24** en excès est difficile. Elle a dû être optimisée, notamment en changeant la colonne HPLC (diminution de la granulométrie), ce qui nous a permis d'injecter de plus faibles quantités et d'avoir une séparation en HPLC préparative semblable à celle en analytique.

Synthèse de Vect2 : Afin d'obtenir **Vect2**, nous avons fait réagir le tripode **NTA(Cys(NH_2))$_3$** et le produit **24**. **Vect2** a été obtenu après purification sur colonne HPLC préparative avec un rendement de 35% (Fig 149). Ce produit a été caractérisé par spéctrométrie de masse et RMN proton où le spectre montre une symétrie C_3 attendue.

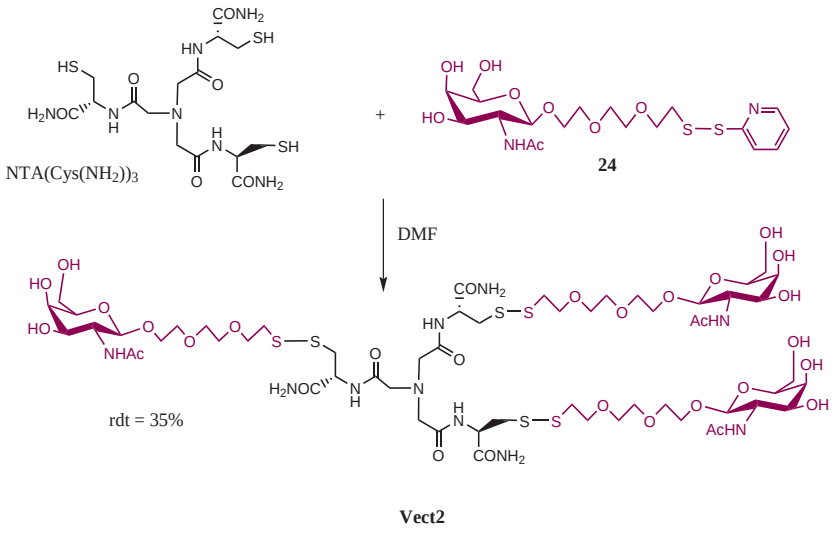


FIGURE 149 – Synthèse du vecteur non marqué : Vect2

Synthèse des produits B_1 et B_2 : La synthèse du produit $\mathbf{B}_1$ a été réalisée entre le produit **24** et le produit $\mathbf{A}_1$ dans les même conditions que **Vect2**. Le produit $\mathbf{B}_1$ a été obtenu après purification sur colonne HPLC préparative avec un rendement de 34% (Fig 150).

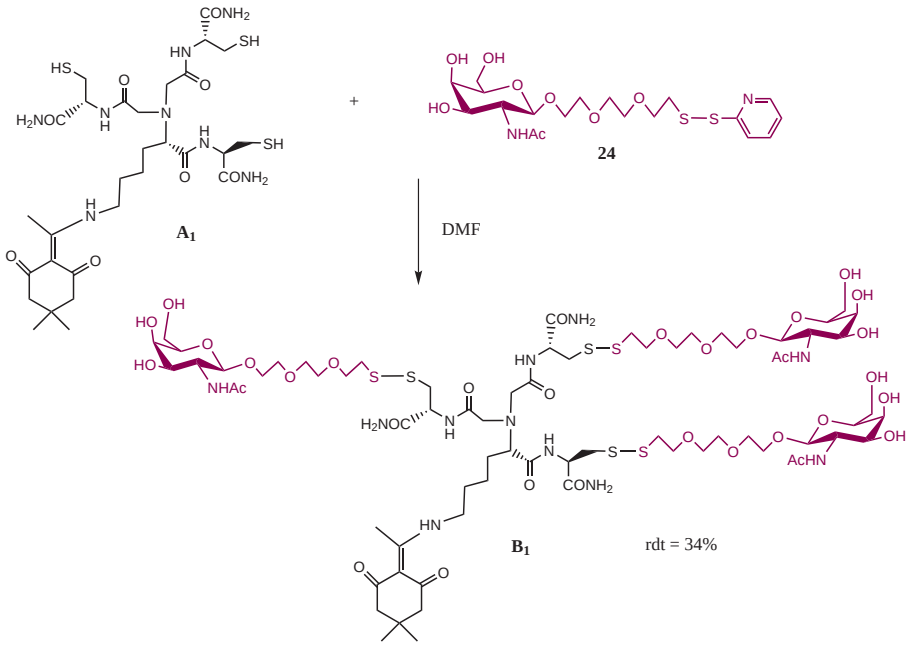


FIGURE 150 – Synthèse du produit $\mathbf{B}_1$

La synthèse du produit $\mathbf{B}_2$ a été réalisée entre le produit **24** et le produit $\mathbf{A}_2$ dans les même conditions que **Vect2**. Le produit $\mathbf{B}_2$ a été obtenu après purification sur colonne HPLC préparative avec un rendement de 20% (Fig 151).

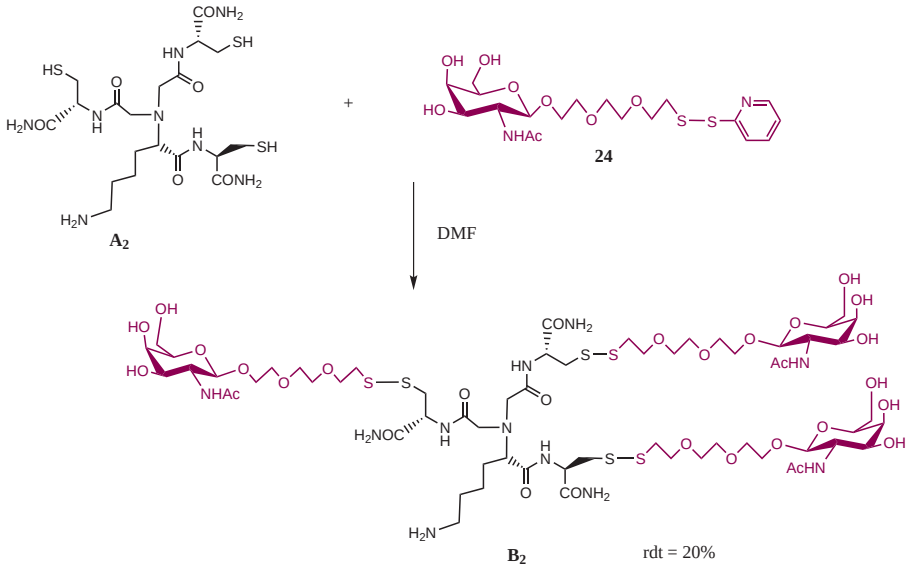


FIGURE 151 – Synthèse du produit $\mathbf{B}_2$

Le produit $\mathbf{B}_2$ est obtenu avec un rendement un peu plus faible que $\mathbf{B}_1$, mais l'amine de la lysine est déjà déprotégée. Cette stratégie permet de gagner une étape.

17.2.4 Couplage du fluorophore

Pour marquer ce deuxième vecteur, nous avons utilisé TAMRA connu aussi sous le nom de rhodamine-NHS. TAMRA est plus stable et moins sensible au pH que TRITC.

Déprotection du groupement Dde : Avant de coupler le fluorophore TAMRA sur le produit $\mathbf{B}_1$, rappelons que celui si est protégé par le groupement Dde sur la fonction amine. Pour la déprotection, nous avons fait réagir le produit $\mathbf{B}_1$ avec de l'hydrazine à 2% pendant 10 min. Ensuite, le produit a été précipité dans l'éther et centrifugé [346] [347]. Au vu de la faible quantité de produit de départ, le composé déprotégé n'a pas été purifié et il a été utilisé tel quel lors du couplage avec TAMRA. Ce couplage a été effectué à pH basique 8-9 dans la DMF à l'abri de la lumière et suivi par HPLC analytique. Le milieu réactionnel a été purifié sur colonne HPLC préparative sans TFA. La purification a été une nouvelle fois difficile. En effet, même sans TFA, le fluorophore en excès se dégrade, il semble même qu'il s'accroche sur la colonne. Nous obtenons, un mélange de deux produits avec un rendement de 35% (Fig 152).

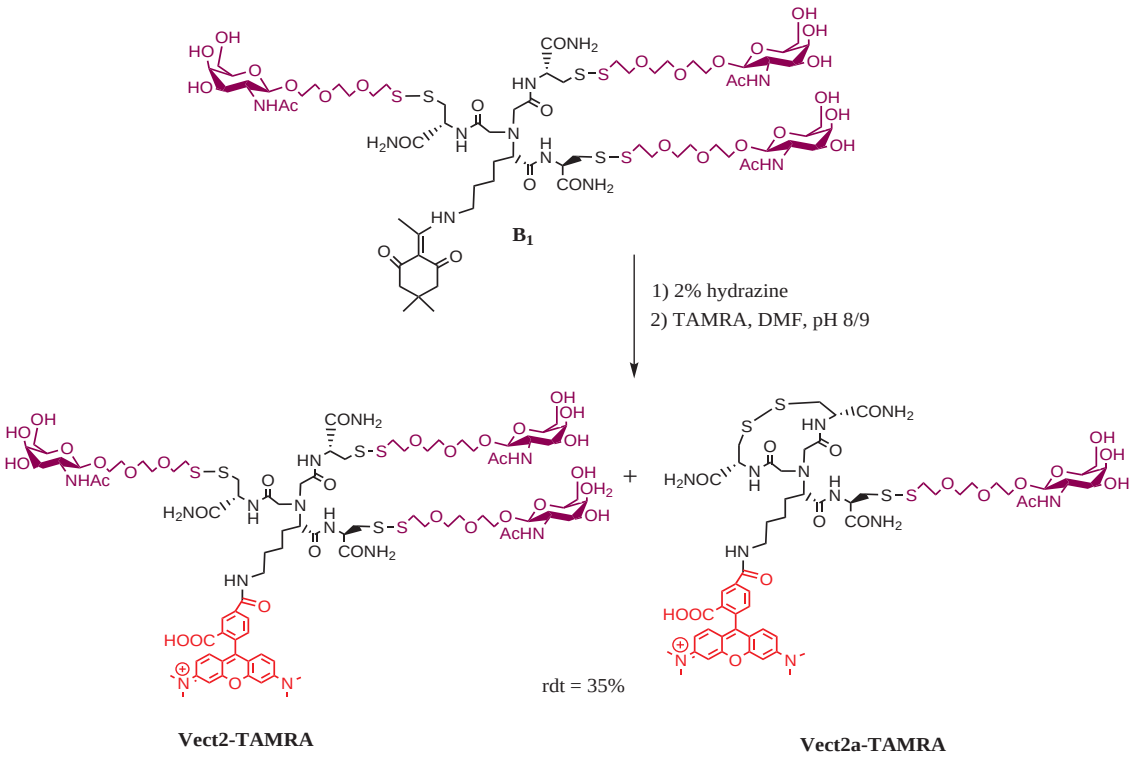


FIGURE 152 – Synthèse de Vect2-TAMRA à partir du produit $\mathbf{B_2}$

Ce mélange correspond au produit souhaité, **Vect2-TAMRA**, accompagné d'un produit contenant un seul sucre, **Vect2a-TAMRA** (Fig 152). Par spectrométrie de masse et HPLC analytique, il semble que le produit possédant un seul sucre soit majoritaire. Cependant, il est difficile de définir exactement la quantité exacte car la spectrométrie de masse n'est pas une technique quantitative et nous observons un pic large difficilement intégrable par HPLC analytique.

Lors de la réaction de formation du disulfure, entre le produit $\mathbf{A_1}$ et le produit **24**, le produit souhaité $\mathbf{B_1}$ a été observé seul par ES-MS et par RMN ^{1}H. Ainsi, le sous-produit comportant un seul sucre (Vect2a-TAMRA, Fig 152) s'est formé au cours de la déprotection du Dde. Même avec un temps de réaction court, les 2% d'hydrazine ont clivé les ponts disulfures formés au niveau des deux bras symétriques de la molécule pour promouvoir la formation d'un disulfure intramoléculaire (Fig 152).

Formation du pont disulfure et couplage du fluorophore à partir du produit $\mathbf{B_2}$: Le couplage du fluorophore sur l'intermédiaire B_2 a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment. Le milieu réactionnel a été purifié sur colonne HPLC préparative. La purification est là aussi très difficile, le fluorophore et le produit attendu s'accrochent sur la colonne. Malgré tout, on obtient le produit souhaité **Vect2-TAMRA** avec un rendement de 16% (sur cette étape) (Fig 153).

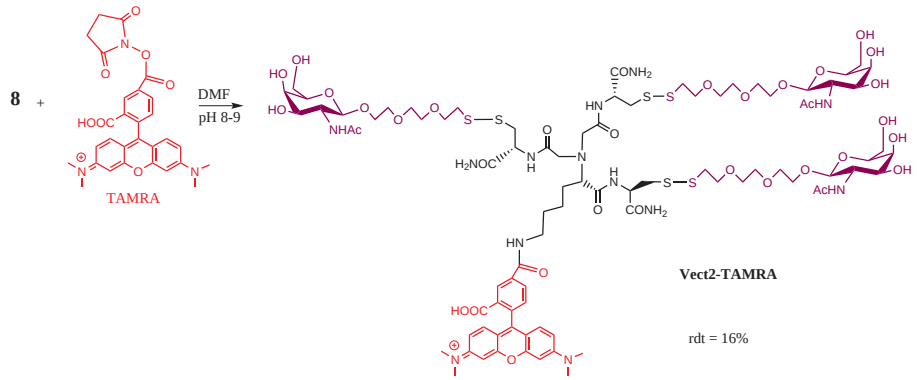


FIGURE 153 – Synthèse du deuxième vecteur marqué : Vect2-TAMRA

En résumé, il n'est donc pas nécessaire de protéger la fonction amine de la lysine pour réaliser le couplage entre la partie tripode et le produit **24**. La stratégie Boc est donc la stratégie la plus adéquate dans ce cas. En plus, elle permet de réduire le nombre d'étape.

17.3 Conclusion sur ce paragraphe

Nous avons obtenu les deux vecteurs : **Vect2** non marqué et **Vect2-TAMRA** marqué. Concernant **Vect2**, la formation des ponts disulfures entre le tripode **NTA(Cys(NH$_2$))$_3$** et le produit **24**, indépendamment synthétisés, est efficace. Le rendement global de cette synthèse à partir du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ est de 12% .

L'intermédiaire **24** a quant à lui été obtenu en 7 étapes avec un rendement global de 19% tout à fait convenable (rdt moyen $\approx$ 66%). Dans cette synthèse, l'étape limitante est la formation du thiol en bout de chaîne car deux sous produits se forment au cours de la réaction. De plus, au cours de la synthèse du produit **24** (dérivé PYS) à partir du produit **21** (dérivé chloré), les produits formés sont très sensibles. Cependant, nous obtenons le produit **24** en quantité suffisante et avec un bon rendement.

La synthèse de **Vect2-TAMRA** a nécessité l'emploi d'un autre tripode **A$_2$** qui a été obtenu après trois étapes en employant les mêmes conditions que lors de la synthèse des tripodes dérivés du NTA. Ensuite, le fluorophore TAMRA, a été utilisé car moins sensible au pH et plus stable que TRITC. Cependant, la purification du produit final est là aussi limitante. En effet, le fluorophore en excès s'accroche sur la colonne ainsi que **Vect2-TAMRA**. Nous avons essayé d'optimiser au mieux cette dernière purification en améliorant notamment l'étape de purification du produit **B$_2$**, mais les fluorophores dérivés de la rhodamine ne semblent pas apprécier la phase inverse RP18 de la colonne HPLC préparative. **Vect2-TAMRA** a été obtenu avec un rendement global à partir de **A2** de 1.4% mais en quantité suffisante pour effectuer des premiers tests cellulaires.

18 Complexation du cuivre(I) par les deux vecteurs *in vitro* et dans les cellules

Afin d'évaluer l'activité complexante de ces vecteurs pour le cuivre(I), des mesures *in vitro* par spectroscopie UV-visible. Des tests cellulaires ont été réalisés afin de valider la reconnaissance par les ASGP-R, l'internalisation des vecteurs dans les cellules et la complexation du cuivre intracellulaire.

18.1 Mesures de la complexation des vecteurs par spectroscopie UV-visible

Pour évaluer l'affinité de ces deux vecteurs pour le cuivre(I), la bathocuproïne disulfonate (BCS) a été utilisée comme compétiteur. Un suivi par spectroscopie UV-visible de la formation du complexe $Cu(BCS)_2{}^{3-}$ a été effectué en présence des vecteurs selon la méthode présentée dans les parties II et III.
Rappelons que les vecteurs présentent tous les deux un ou plusieurs ponts disulfures qui masquent les fonctions thiols et donc l'activité complexante. Les fonctions thiols seront « libérées » quand les ponts disulfures seront réduits, une fois dans la cellule, par le glutathion (GSH) qui se trouve à une concentration d'environ 1 mM [352].

18.1.1 Mesures et résultats

L'absence de complexation par les deux vecteurs a été mise en évidence par ajout de 0.9 eqv. de cuivre(I) sur les vecteurs puis de 2 eqv. de BCS. Dans ce cas, le cuivre est totalement complexé par BCS et les vecteurs ne présentent donc aucune capacité à complexer Cu^+ (Fig 154).
Le GSH est un réducteur mais il est aussi un compétiteur puisqu'il possède une affinité pour le cuivre(I) [233]. Afin d'évaluer cette affinité, 1 mM de GSH ont été mis dans une cuve UV en présence de cuivre(I) afin de préformer les complexes GSH(Cu) et 2 eqv. de BCS ont été ajoutés. Le pourcentage de cuivre(I) déplacé par le BCS est de 90% (Fig 154). Le GSH ne garde donc que 10% du Cu^+, c'est donc un compétiteur faible pour $(Vect1)_{red}$ et $(Vect2)_{red}$.

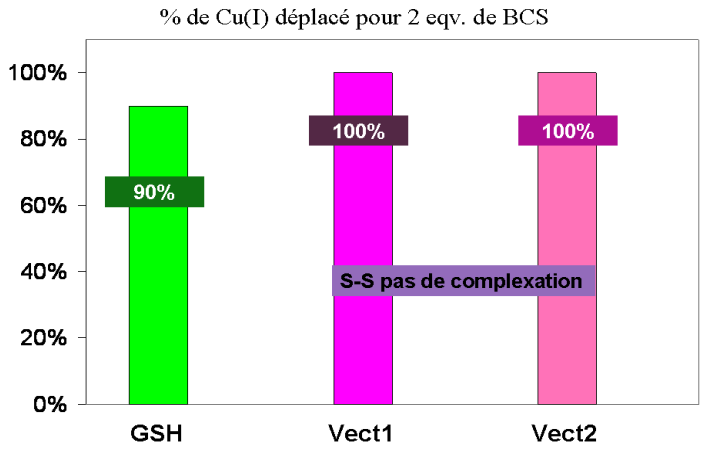


FIGURE 154 – Pourcentage de cuivre(I) déplacé par 2 eqv. de BCS, tampon phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH 7.4, 298 K

Pour mesurer l'affinité des vecteurs une fois les thiols libérés en milieu réducteur, Vect1 et Vect2 ont été mis en présence de GSH 1 mM. Ensuite, 0.9 eqv. de cuivre(I) a été ajouté afin de préformer le complexe et 2 eqv de BCS ont été additionnés. Nous observons que le BCS déplace 40% du cuivre(I) du complexe $(\text{Vect1})_{red}$-Cu et déplace 8% de cuivre(I) du complexe $(\text{Vect2})_{red}$-Cu (Fig 155).

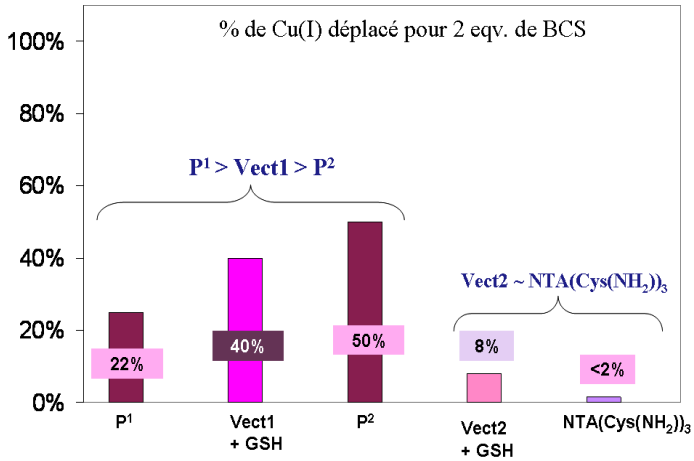


FIGURE 155 – Pourcentage de cuivre(I) déplacé par 2 eqv. de BCS, tampon phos. 20 mM/AcN (v/v = 9/1), pH 7.4, 298 K

18.1.2 Conclusions

Les deux vecteurs sont bien réduits par 1 mM de GSH. L'affinité pour le Cu^+ de **Vect2** est supérieure à celle de **Vect1**. L'affinité de **Vect1** est comparable à celle des cyclodécapeptides modèles $\mathbf{P}^1$ et $\mathbf{P}^2$ qui présentent une affinité un peu plus faible que $\mathbf{P}^C$ (Fig 155). Rappelons que $\mathbf{P}^C$ est un modèle de la boucle de liaison MXCXXC des

métallochaperonnes. **Vect1** a-t-il une affinité suffisante pour complexer le cuivre(I) intracellulaire ?
La comparaison de l'affinité de **Vect2** avec le tripode **NTA(Cys(NH$_2$))$_3$** montre qu'elles sont quasiment identiques. La réduction des trois ponts disulfures redonne bien le tripode attendu (Fig 155). **Vect 2** a donc une affinité plus grande que celle de $\mathbf{P}^C$. L'affinité de **Vect2** est-elle suffisante ou trop importante pour complexer le cuivre(I) intracellulaire ? Ne peut-il pas entrer en compétition avec des métallochaperonnes et leur prendre le cuivre(I) ? Afin de répondre à ces questions, nous avons évalué la complexation de ces deux vecteurs dans les cellules.

18.2 Tests cellulaires : Internalisation et évaluation de la complexation du cuivre(I) intracellulaire

Les tests cellulaires d'internalisation et d'évaluation de la complexation du cuivre intracellulaire ont été réalisés sur des lignées cellulaires issues d'hépatocytes.

18.2.1 Types cellulaires utilisés

Pour évaluer au mieux l'internalisation et la complexation du cuivre(I) dans les cellules, il a fallu choisir des modèles cellulaires qui se rapprochent le plus possible des hépatocytes, qui sont les cellules ciblées. Nous avons utilisé trois types de cellules : les cellules HepG2 et les cellules WIF-B9 et Can 10.

Hépatocytes (définition générale) : Le foie humain correspond à 5% du poids d'une personne, il est composé de 60% d'hépatocytes qui produisent 90% des protéines hépatiques qui sont responsables de la plupart des fonctions principales du foie. Environ cent gènes sont exprimés dans les hépatocytes. Comme toutes cellules épithéliales, les hépatocytes doivent être polarisés pour être fonctionnels. Leur polarité est très complexe comparée à celle de la plupart des cellules épithéliales qui sont dites de formes simples (Fig 156) [353]. Les hépatocytes sont des cellules polarisées qui forment un épithélium, c'est-à-dire un tissu séparant le milieu interne du milieu externe.

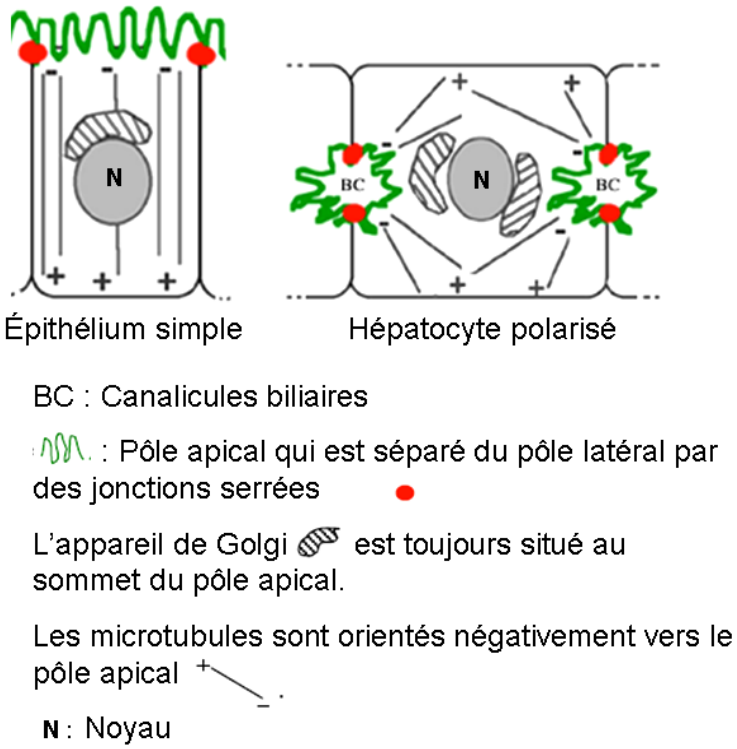


FIGURE 156 – Schématisation de cellules de polarisation simple (à gauche) et d'hépatocytes (à droite) [353]

Dans le foie, les hépatocytes sont disposés en travée de 10 à 20 cellules séparés entre eux par des capillaires sinusoïdes ou par des canalicules biliaires (Fig 157). Elles sont côte à côte mais aussi face à face.

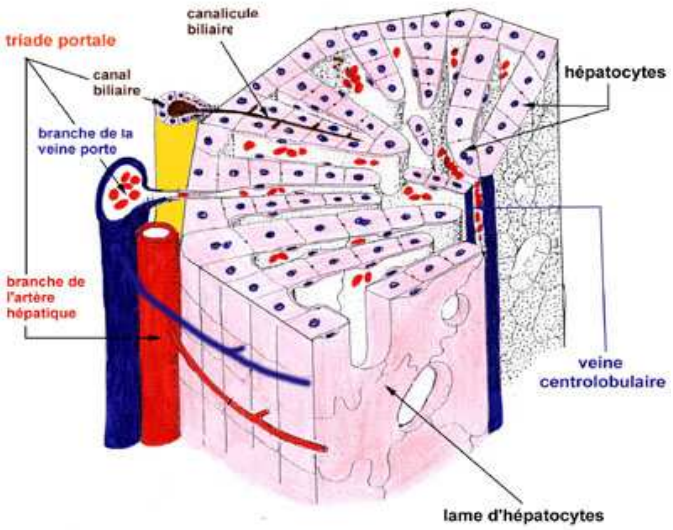


FIGURE 157 – Schématisation de l'organisation en travé des cellules [354].

Elles sont donc disposées en travée monocellulaire et séparées par des capillaires sinusoïdes qui véhiculent le sang. Ceci forme le mileu interne du foie, le milieu externe est quant à lui représenté par un réseau de canalicules biliaires qui forment la partie initiale des voies biliaires (Fig 157). La membrane plasmique des hépatocytes est divisée en trois domaines : la membrane sinusoïdale (ou pôle basal) en contact avec les capillaires sinusoïdes, le pôle latéral en contact avec un hépatocyte adjacent (c'est par ce pôle qu'elles communiquent entre elles) et le pôle apical en contact avec le canalicule biliaire (Fig 158). Ce dernier est formé par plusieurs cellules. Les canalicules biliaires sont entourés par les jonctions serrées (Fig 157), ensemble de protéines de la membrane plasmique assurant la cohésion du tissu en associant les cellules entre elles. Les jonctions serrées séparent le pôle apical (ou canaliculaire) du reste de la membrane plasmique [353]. Les xénobiotiques entrent dans la cellule par le pôle sinusoïdale (arrivent de la circulation sanguine) et sont excrêtés soit par ce même pôle soit par le pôle apical vers les canalicules biliaires.

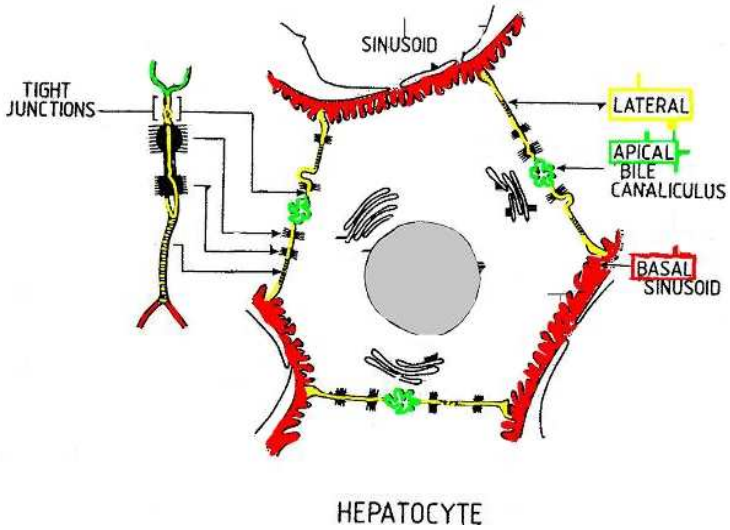


FIGURE 158 – Schématisation d'un hépatocyte, visualisation des différents pôles [355]

Notons que les protéines existantes au niveau des différents pôles sont différentes, par exemple, on retrouvera au niveau du pôle apical des hépatocytes, des transporteurs appelés transporteurs ABC qui ont notamment pour rôle d'excréter des xénobiotiques vers les canalicules biliaires [353].

Cellules HepG2 : Les cellules HepG2 sont très utilisées comme modèle de cellules polarisées du foie cependant elles possèdent une polarité faible et ne forment pas de canalicules. Ce sont des cellules d'hépatoblastomes humains c'est-à-dire des cellules d'origine cancéreuse. Elles ont gardé plusieurs fonctions des cellules du foie humain telles que la synthèse de l'albumine, des lipoprotéines et elles expriment les ASGP-R.

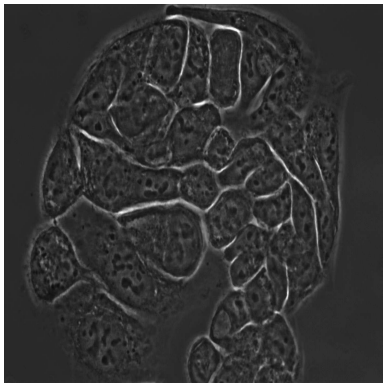


FIGURE 159 – Image de cellules HepG2 réalisée au microscope optique et fixées (grossissement×63)

Cellules WIF-B9 : Les cellules WIF-B9 sont une lignée cellulaire plus proche des hépatocytes que les cellules HepG2. Ce sont des cellules fortement polarisées c'est-à-dire qu'elles forment des canalicules biliaires [356]. L'intérêt de ces cellules est de pouvoir étudier l'entrée d'une molécule mais aussi son excrétion vers les canalicules biliaires. Elles sont hybridées rat-homme, le parent de la lignée cellulaire est FAO, cellules d'un hépatome de rat peu polarisées et donc ne formant pas de canalicules (Fig 160). FAO a fusionné avec les cellules W138 qui viennent d'un fibroblaste humain. La lignée cellulaire obtenue de cette fusion sont les cellules WIF12 qui forment plus de canalicules que FAO [357]. Enfin les cellules WIF-B et WIF-B9 sont des sous clones de WIF12 qui poussent en agrégat.

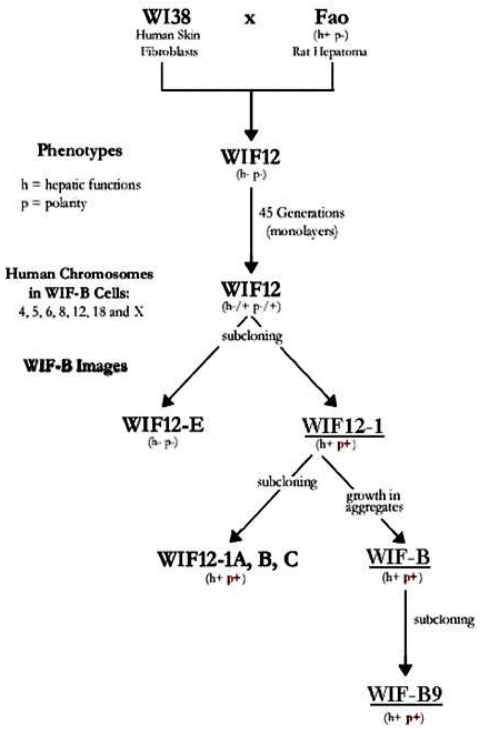


FIGURE 160 – Généalogie des cellules WIF-B9 [358]

Le temps de génération des cellules WIF-B9 est de 2.5 jours minimum. Elles passent par la forme simple épithélium avant de former des canalicules. Les cellules WIF-B9 sont intéressantes pour étudier le trafic intracellulaire, elles expriment notamment les deux protéines ATPase : ATP7A et ATP7B qui ont un rôle dans l'homéostasie du cuivre (cf. Partie II).

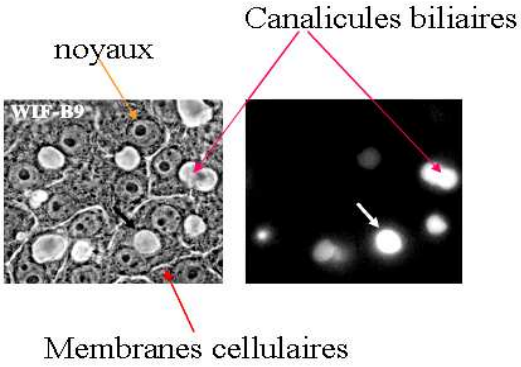


FIGURE 161 – Cellules WIF-B9 [353]

Cellules Can 10 : Les cellules Can 10 sont des cellules polarisées, reconstituant des canalicules biliaires, tout comme WIF-B9. Elles sont issues de la lignée cellulaire FAO et donc purement du rat. Les cellules Can 10 sont dues à une culture cellulaire sphéroïde de FAO qui induit la polarité complexe. Ce type de culture permet un meilleur contact entre cellules. Elles forment des canalicules biliaires sous forme de tuyauterie (10 à 20 cellules regroupées) tout comme les hépatocytes humains dans le foie (Fig 162). Le temps de génération de ces cellules est de 30 h minimum.
L'intérêt principal de ces cellules est qu'elles forment des canalicules, mais elles sont également de bons outils pour étudier les jonctions serrées [353], le transport du cuivre par la protéine ATP7B du rat et le transport biliaire (expriment plus de transporteurs que WIF-B9).

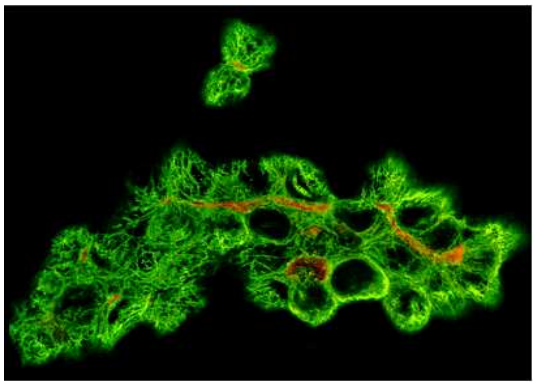


FIGURE 162 – Cellules Can 10, en rouge marqueur fluorescence de la protéine radixine (protéine qui permet le marquage de la membrane apicale, canalicules biliaires en rouge sous forme de tuyauterie formées par plusieurs cellules Can 10) ; marquée en vert, la protéine α tubuline qui se situe dans le réseaux cytoplasmique de la cellule [353].

Pour résumer, les cellules HepG2 représentent le modèle le plus courant d'hépatocytes humains. Elles sont peu polarisées et ne forment pas de canalicules mais en raison de leur culture accessible et courante, ces cellules ont été choisies pour des premiers tests cellulaires. Les cellules WIF-B9 et Can 10 reconstituent remarquablement des épithéliums polarisés et sont stables en 5-6 jours. Elles forment ainsi un réseau de canalicules très bien défini. Ces cellules sont utilisées pour étudier le trafic cellulaire et notamment les réponses en cas de fortes concentrations en cuivre. Malgré leur intérêt certain (modèles cellulaires le plus proche des hépatocytes humains), leur culture cellulaire n'est pas usuelle et elles sont relativement fragiles.

18.2.2 Internalisation des vecteurs et cinétique d'entrée

Afin de voir si les deux vecteurs sont reconnus par les ASGP-R, une cinétique d'entrée des vecteurs sur les trois types cellulaires a été réalisée à différents temps. Pour cela, nous suivons le devenir des vecteurs dans chaque type cellulaire grâce au fluorophore rouge greffé.
Les cellules ont été laissées en culture le temps nécessaire à une croissance optimale. Les cellules poussent sur des lamelles de verre dans des puits. Un puits contenant un blanc (cellules seules) a été réalisé à chaque fois pour s'assurer de la bonne viabilité des cellules. Dans les autres puits ont été ajoutés les vecteurs à la concentration extracellulaire de 0.2 μM et de 2 μM. Après un temps d'incubation variable, les cellules ont été lavées et fixées afin de pouvoir observer la fluorescence du vecteur par microscopie à fluorescence.

Résultats, cellules HepG2 Après observation de larges champs cellulaires, les images des cellules HepG2 montrent qu'aux deux concentrations et pour les deux vecteurs, ces derniers sont incorporés dans les cellules au bout de 2 h d'incubation. La fluorescence est

cependant plus intense à 2 μM (Fig 163). Notons que les points rouges visibles sont très précis, ils semblent donc qu'au bout de deux heures, les vecteurs soient encore dans les endosomes qui ont permis leur entrée.

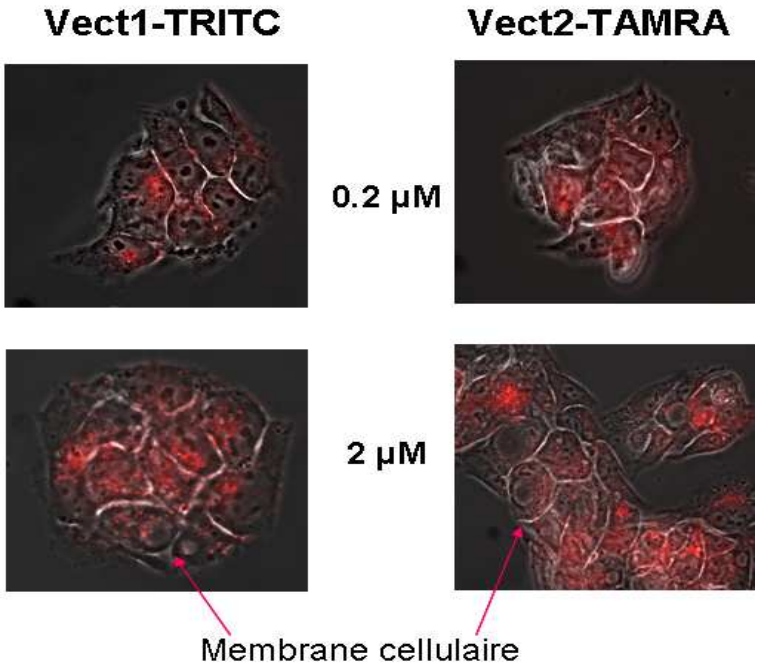


FIGURE 163 – Cellules HepG2 : visualisation des deux vecteurs à 0.2 et 2 μM au bout de 2 h. Les deux vecteurs sont marqués par une fluorescence rouge. Images de microscopie de fluorescence (grossissement x 63).

Avec le temps, la fluorescence augmente et est plus diffuse, les endosomes ont donc libérés les vecteurs. En effet, au bout de 7 h, il semble que l'intensité est accrue, les cellules sont plus chargées en vecteurs. Au bout de 26 h, la fluorescence se voit dans la cellule entière (entièrement rouge).

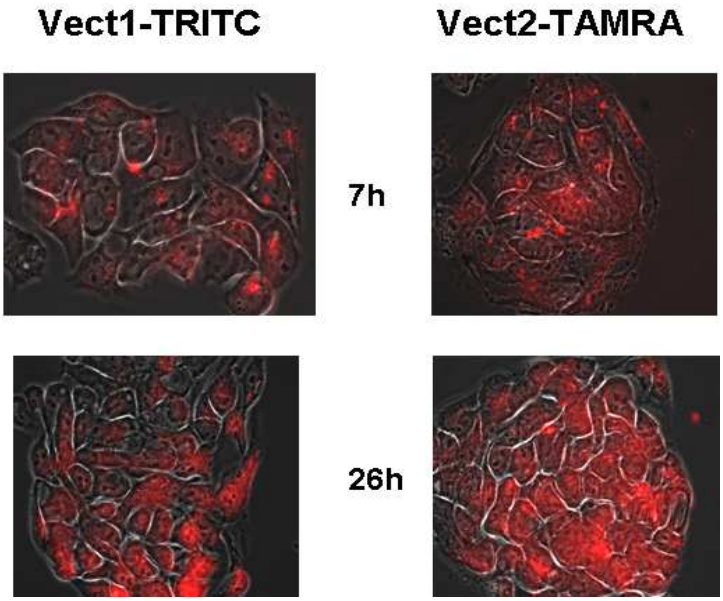


FIGURE 164 – Cellules HepG2 : visualisation des deux vecteurs à 2 μM au bout de 7 h et 26 h. Les deux vecteurs sont marqués par une fluorescence rouge. Images de microscopie de fluorescence (grossissement $\times$ 63).

Les vecteurs **Vect1-TRITC** et **Vect2-TAMRA** sont bien reconnus par les ASGP-R des cellules HepG2, les géométries des deux plates-formes utilisées sont donc bien adaptées au ciblage de ces récepteurs.

Résultats, cellules WIF-B9 et Can 10 :

Internalisation de Vect1 : Le principe est le même sauf que les cellules sont ensemencées puis utilisées 6 à 8 jours après afin d'obtenir les canalicules. Après 2 h d'incubation à 0.2 μM, **Vect1-TRITC** est incorporé dans les cellules (Fig 165). Au bout de 24 h, certains canalicules biliaires sont fluorescents, cela indique que **Vect1-TRITC** a traversé la cellule et a été excrété par voie biliaire. Au bout de 48 h, ce sont tous les canalicules biliaires qui sont fluorescents (Fig 165). Les même résultats sont obtenus avec les cellules Can 10 et WIF-B9.

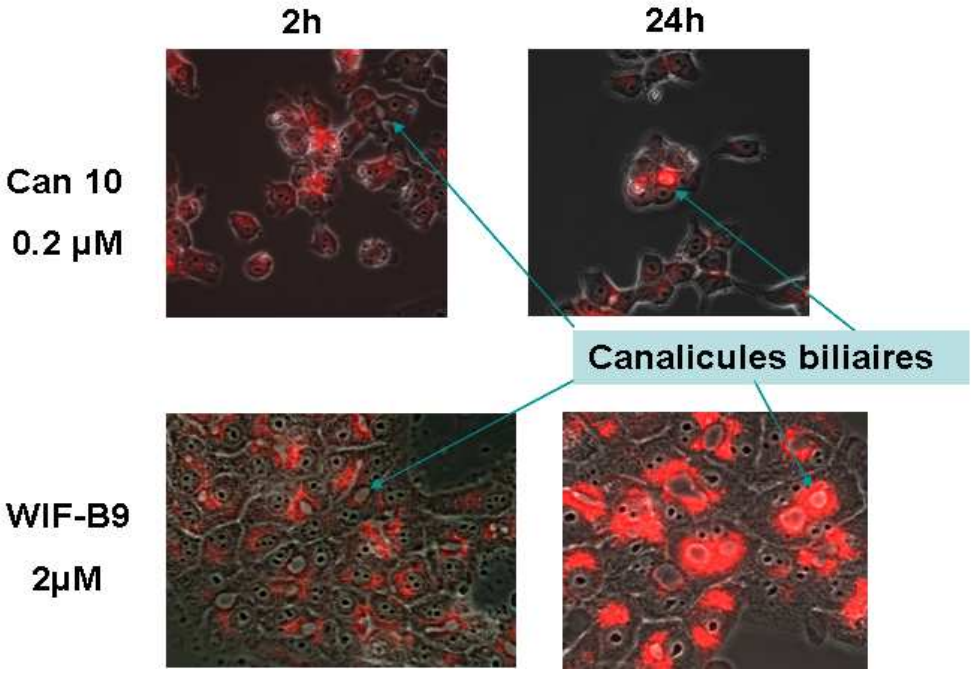


FIGURE 165 – Entrée de Vect1-TRITC (0.2 μM) dans les cellules Can 10 (photos d'en haut), dans les cellules WIF-B9 (2 μM, photos d'en bas) Images de microscopie de fluorescence (grossissement $\times$ 63).

Notons cependant que la fluorescence rouge observée dans les canalicules biliaires dès 24 h n'assure pas que la molécule soit entière. En effet, la molécule a pu être dégradée durant son trajet.
On peut se demander si ces vecteurs pourraient effectivement être excrétés par les canalicules biliaires. Il existe au niveau de la membrane apicale des protéines transporteurs appelées transporteurs ABC ou transporteurs à ATP Binding Cassette. Ces protéines ABC assurent une fonction de transport au travers des membranes cellulaires, d'une très grande variété de substrats (acides aminés, lipides, ions, sucres, drogues (xénobiotiques...). Certains transporteurs ABC ont donc des fonctions physiologiques essentielles comme l'excrétion de toxines du foie et sont responsables de certaines résistances de microorganismes aux antibiotiques et induisent des phénotypes de résistance des cellules tumorales à des drogues anticancéreuses utilisées en chimiothérapie. On peut donc supposer que l'un de ces transporteurs puisse prendre en charge le vecteur.

Internalisation de Vect2 : Les résultats préliminaires obtenus avec **Vect2-TAMRA**, montrent qu'il est incorporé dans les cellules WIF-B9 et Can 10 au bout de 2 h d'incubation à 0.2 et 2 μM. Au bout de 24 h, la fluorescence semble elle aussi située dans les canalicules biliaires (Fig 166).

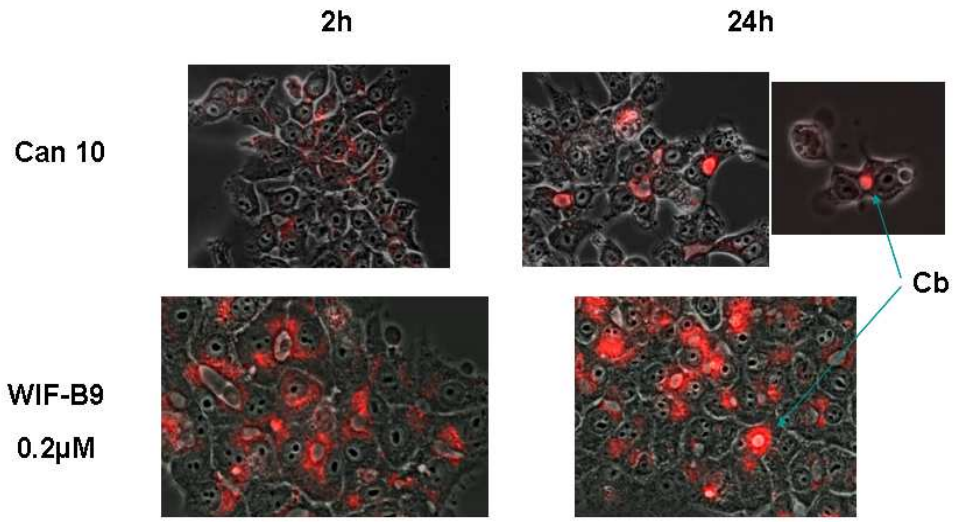


FIGURE 166 – Entrée de Vect2-TAMRA dans les cellules Can 10 (photos d'en haut à 2 μM pour 2 h et 0.2 μM pour 24h), et dans les cellules WIF-B9 (0.2 μM, photos d'en bas) Images de microscopie de fluorescence (grossissement $\times$ 63).

18.2.3 Utilisation d'une sonde biologique de la concentration en cuivre intracellulaire pour évaluer la complexation

Afin de visualiser la complexation du cuivre intracellulaire par les deux vecteurs, nous avons utilisé une sonde biologique de la concentration de cuivre(I). C'est un moyen qualitatif pour savoir s'il y a ou non complexation par les vecteurs. La sonde biologique utilisée est la protéine ATP7B, protéine présente dans la cellule.

Déplacement de ATP7B en fonction de la concentration en cuivre(I) : Quand la concentration en cuivre intracellulaire atteint un niveau potentiellement toxique pour la cellule, la protéine ATP7B se déplace de l'appareil de Golgi vers la membrane apicale de la cellule (c'est-à-dire la membrane qui entoure les canalicules) pour excréter le cuivre en excès dans les canalicules biliaires [359] [360]. Elle se déplace dans des vésicules cytoplasmiques. Le déplacement d'ATP7B est donc une bonne sonde biologique de la concentration intracellulaire du cuivre(I).
Le déplacement de la protéine ATP7B induit par 20 μM du cuivre(I) extracellulaire a été montré sur les cellules WIF-B9 [360]. Ces expériences ont donc été répétées sur les cellules WIF-B9 pour rechercher la concentration minimum en cuivre nécessaire pour visualiser son déplacement et pour savoir si dans nos conditions expérimentales cela était observable. Pour cela, ATP7B a été marquée par un fluorophore vert. ATP7B est reconnue par un anticorps primaire anti-ATP7B qui a été produit par un lapin et cet anticorps est lui-même détecté par un anticorps secondaire (anti lapin) fluorescent dans le vert (Alexa 488) (Fig 167). Le déplacement d'ATP7B a été visualisé par microscopie confocale.

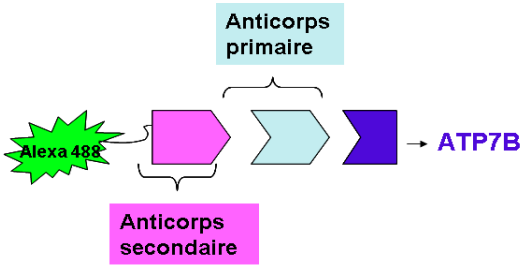


FIGURE 167 – Schématisation du principe du marquage de ATP7B

En condition basale en cuivre (cuivre $\approx$ 0.01 μM du milieu cellulaire), les études montrent que ATP7B se situe dans l'appareil de Golgi entre le noyaux (N) et les canalicules biliaires (étoiles) (Fig 168, en haut). Par contre, en concentration anormale de cuivre (1 μM) et après 2 h d'incubation, ATP7B ne se trouve plus dans l'appareil de Golgi, elle s'est déplacée et se situe à la membrane apicale autour des canalicules biliaires. On peut voir qu'elle entoure les canalicules biliaires (Fig 168, en bas).

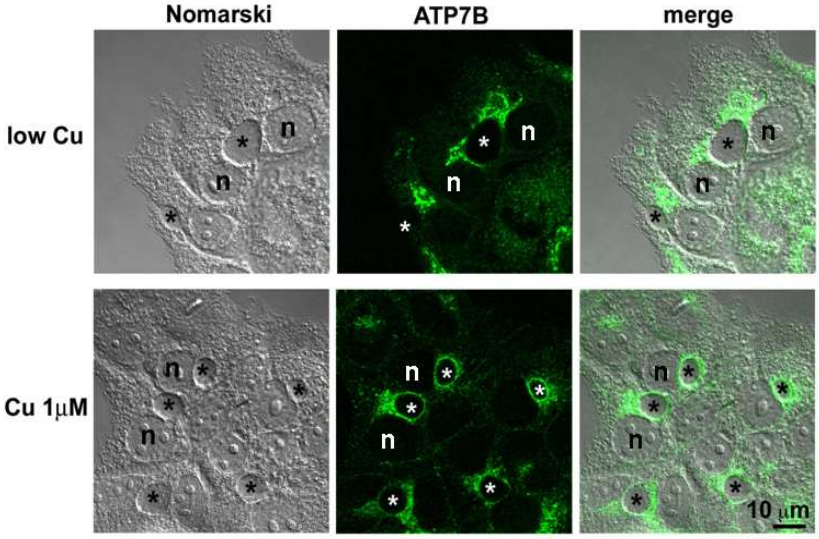


FIGURE 168 – Localisation d'ATP7B (immunofluorescence due au fluorophore Alexa 488) dans les cellules WIF-B9 en conditions basales (en haut) et conditions anormales 1 μM cuivre (en bas). Les étoiles marquent les canalicules biliaires et **n** marque les noyaux. Images de microscopie de fluorescence et de contraste de phase superposées (grossissement x 63).

Ces expériences, réalisées sur les cellules WIF-B9, démontrent clairement qu'il est possible de voir le déplacement de la protéine ATP7B entre les conditions basales (cuivre $\approx$ 0.01 μM) et un excès de cuivre (1 μM). Ce déplacement peut donc être utilisé comme une sonde biologique de la concentration intracellulaire de cuivre.

Complexation du cuivre intracellulaire par Vect1 : Pour visualiser la position d'ATP7B en excès de cuivre et en présence de **Vect1**, une sonde fluorescent de la protéine ZO-1, protéine des jonctions serrées qui délimite la membrane apicale, a été ajouté pour bien visualiser les canalicules. ATP7B est toujours marquée par une fluorescence verte et le premier vecteur n'est pas marqué (**Vect1**). Les cellules en excès de cuivre (1 μM incubées 2 h) ont été ensuite incubées pendant 3 h avec **Vect1** (10 μM). Un contrôle a été réalisé en absence de **Vect1** (cellules avec 1 μM de cuivre incubées 5 h). La visualisation des cellules par microscopie à fluorescence (5 h après ajout de cuivre) montrent un déplacement de ATP7B aux canalicules biliaires (proximité de la fluorescence de ZO-1 et d'ATP7B) en absence de **Vect1**, tandis que les cellules incubées avec **Vect1** pendant 3 h ne montre pas de déplacement d'ATP7B. En effet, en présence de **Vect1**, nous voyons deux localisations distinctes, ATP7B se trouve dans l'appareil de Golgi entre les canalicules et les noyaux (Fig 169).

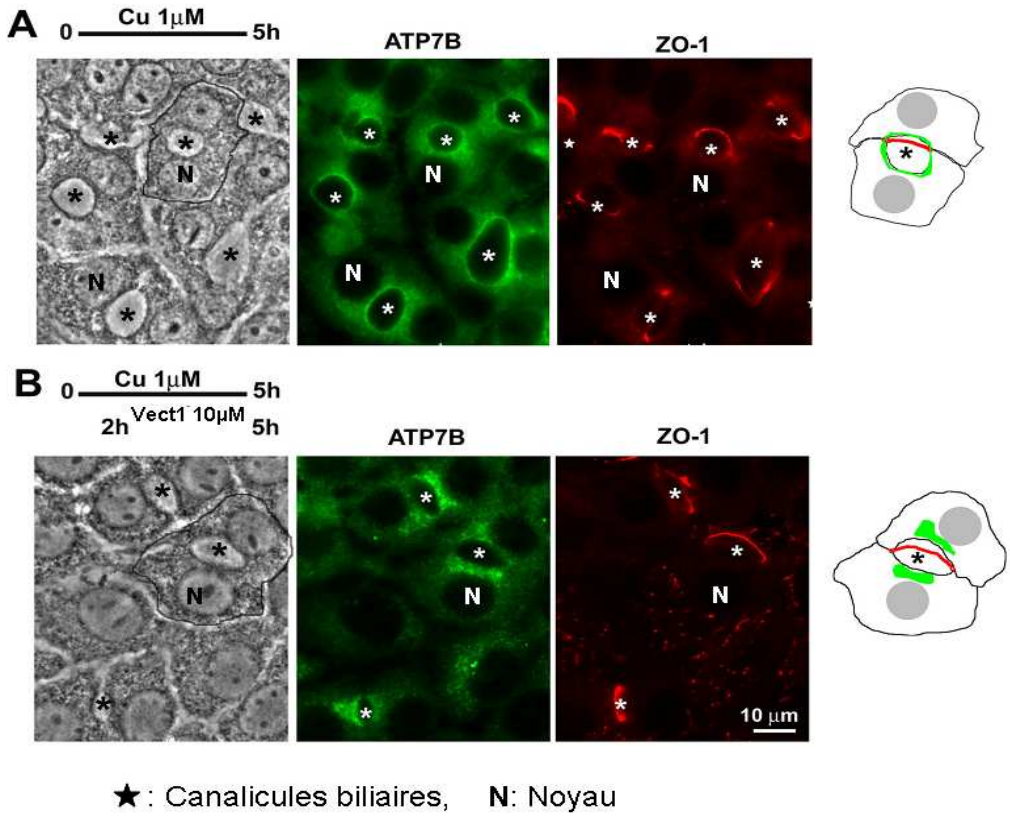


FIGURE 169 – Position de ATP7B en présence de 1 μM de cuivre (incubation 5h), en absence (A) ou en présence (B) de 10 μM de **Vect1** (incubation 2h Cu sans Vect1 + 3h avec Vect1). A gauche, image par contraste de phase (Nomarski) ; au centre, fluorescence de ATP7B ; à droite, fluorescence de ZO-1, pour visualiser les canalicules. Images de microscopie (grossissement x 63).

L'incubation avec **Vect1** inhibe donc le déplacement de ATP7B vers la membrane apicale, ce qui démontre que l'augmentation de la concentration intracellulaire de cuivre

n'a pas lieu. ATP7B n'excrète donc pas le cuivre en excès puisqu'il est complexé par Vect1. Bien que ce vecteur présente une affinité un peu plus basse que $\mathbf{P}^C$ (modèle de métallochaperonne), c'est un chélateur intracellulaire du cuivre.

Les études concernant le déplacement de la protéine ATP7B en présence de **Vect2** sont en cours de réalisation sur le cellules WIF-B9.

18.3 Conclusion de ce chapitre

Les deux vecteurs présentent bien *in vitro* des affinités comparables à leurs modèles « nus » de la partie chélatante qui sont respectivement $\mathbf{P}^1$, $\mathbf{P}^2$ et le $\mathbf{NTA(Cys(NH_2))_3}$.
Les deux vecteurs (**Vect1-TRITC** et **Vect2-TAMRA**), élaborés selon deux stratégies différentes (deux plates-formes, ligands tri et tétravalents), sont tous deux reconnus par les ASGP-R et sont incorporés par les cellules au bout de 2 h à la même concentration.
Bien que **Vect1** ait une affinité plus basse que $\mathbf{P}^C$, modèle des métallochaperonnes, il est un chélateur efficace du cuivre intracellulaire. Rappelons que le cuivre(I) en excès a tendance à se complexer au glutathion. C'est donc lui qui va être en compétition avec **Vect1** et non les métallochaperonnes.

19 Conclusion générale de cette partie

Deux vecteurs, de structures chimiques différentes, ont été synthétisés selon deux stratégies. Les synthèses multi-étapes de **Vect1** et du produit **24** (thiol activé) nécessaire à la synthèse de **Vect2** présentent chacune une étape limitante : l'oxydation des sérines pour **Vect1** et la formation du thiol pour l'intermédiaire **24**.
Dans le cas du premier vecteur, l'oxydation des sérines pourrait être améliorée ou le lien chimique reliant les résidus sucres à la plateforme chimique pourrait être changé.
Dans le cas du produit **24**, la formation du thiol pourrait s'optimiser en ajoutant une molécule (scavenger) qui capte les OAc libérés lors de la déprotection afin qu'ils ne puissent réagir à nouveau.
De plus, dans tous les cas, la purification des vecteurs marqués est délicate. Ces vecteurs présentent tous les deux des résidus sucres N-acétylgalactosamine, de configuration α dans une structure tétravalente pour **Vect1** et de configuration β dans une structure trivalente pour **Vect2**. Malgré ces différences, les études cellulaires sur des modèles d'hépatocytes ont montré que les deux vecteurs sont reconnus pas les ASGP-R à la même concentration et sont incorporés au bout de 2 h d'incubation.
Les affinités de ces deux vecteurs pour le cuivre(I) *in vitro* évaluées en présence de BCS comme compétiteur et de GSH comme réducteur (compétiteur faible), sont comparables aux modèles « nus » préalablement décrits au partie I et III.

Les résultats cellulaires sur les études de complexation de Vect1 en utilisant une sonde biologique de la concentration cellulaire en cuivre (localisation d'ATP7B) montre que **Vect1**, malgré une affinité plus faible que $\mathbf{P}^C$, est un chélateur intracellulaire du cuivre(I).
Il serait intéressant de refaire ces études en utilisant une autre sonde biologique de la concentration intracellulaire du cuivre(I). En excès de cuivre(I), la cellule produit des métallothionéines pour séquestrer le cuivre en excès. La production des MT commence au bout de 4 h de contact avec 200 μM dans les cellules HepG2 [361]. Le dosage des ARNm de MT produits par la cellule en excès de cuivre, en absence et présence des vecteurs, pourrait aussi être une bonne sonde biologique de la complexation du cuivre « libre » intracellulaire.
Il serait aussi important d'étudier l'excrétion des complexes Vect1-Cu et Vect2-Cu. Nous avons vu que des études préliminaires pour**Vect1** montrent une fluorescence accrue dans les canalicules biliaires après 24 h et plus. Rien ne démontre actuellement que Vect1 soit entier dans les canalicules, ni qu'il soit reconnu par les transporteurs ABC et excrété. Des mesures par cartographie mesurant la fluorescence X du cuivre [362] [363] pourraient nous renseigner sur la présence ou non de cuivre dans les canalicules. L'idée étant de voir si, en absence et présence des vecteurs, on observe une augmentation de la concentration du cuivre dans les canalicules par cette technique.
Nous avons donc atteint les objectifs fixés qui étaient d'élaborer de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I), possédant un caractère prodrogue et une sélectivité Cu^+/Zn^{2+} élevée (10 ordres de grandeurs) et capables de cibler les hépatocytes pour complexer uniquement le cuivre intracellulaire.

Conclusion

Sixième partie

Conclusion

Le cuivre est un élément essentiel à l'organisme puisqu'il intervient comme cofacteur dans un grand nombre de processus biologiques. Mais en excès, il est toxique, c'est pourquoi sa concentration est finement régulée par de nombreuses protéines dans les organismes vivants. La maladie de Wilson est une maladie génétique due à un dysfonctionnement de la protéine ATP7B. Cette protéine intervient dans l'homéostasie du cuivre(I), principalement au niveau du foie. Les conséquences de cette maladie sont une accumulation du cuivre dans les cellules hépatiques, puis dans le cerveau et les yeux. Les traitements actuels sont peu sélectifs du cuivre et ne visent pas le foie qui est le premier organe touché.
Les objectifs de cette thèse étaient, dans un premier temps, d'élaborer de nouveaux chélateurs qui soient sélectifs du cuivre(I), le degré d'oxydation du cuivre intracellulaire et qui présentent une forte affinité pour ce cation métallique. Dans un second temps, la fonctionnalisation de ces chélateurs était nécessaire pour cibler le foie et ainsi complexer le cuivre intracellulaire en excès.

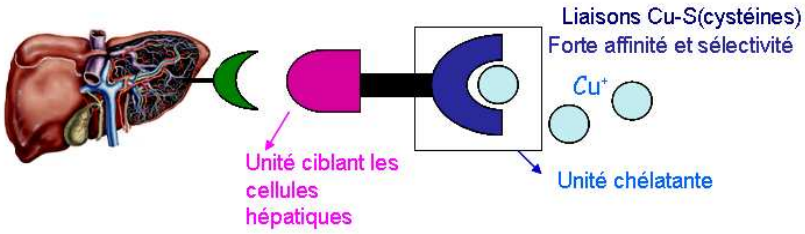


Figure 170 – Représentation schématique des molécules bifonctionnelles (ciblage + chélation) obtenues au cours de ce travail

Nous avons synthétisé deux familles de chélateurs : des plates-formes cyclopeptidiques et des podands dérivés de plates-formes chimiques polyaminocarboxylates.
Les études de complexation du cuivre(I) réalisées *in-vitro* sur la première famille de

chélateurs montrent que les cyclodécapeptides $\mathbf{P}^1$ et $\mathbf{P}^2$ complexent le cuivre sous forme de complexes mononucléaires de type CuS_2 qui présentent une bonne affinité ($\log\beta \approx 16$) et une forte sélectivité Cu^+/Zn^{2+} (10 ordres de grandeurs). L'affinité pour le cuivre(I) est cependant un peu plus faible que celle observée avec des peptides modèles de métallochaperonnes à cuivre.
La deuxième famille de chélateurs, en particulier les dérivés de l'acide nitrilotriacétique (**NTA**) possèdent une très forte affinité ($\log\beta \approx 19$) pour le Cu(I) et une bonne sélectivité Cu(I)/Zn(II) (8-9 ordres de grandeurs). De plus, ils complexent le Cu(I) sous forme de complexes mononucléaires de type CuS_3 qui possèdent des liaisons hydrogènes intramoléculaires stabilisant le système. L'ancre **NTA** permet de complexer le Cu(I) dans un environnement trigonal similaire aux métallothionéines. Ces tripodes possèdent également une très forte affinité pour l'ion toxique Hg(II). Les complexes que forment les ligands $\mathbf{NTA(Cys(NH_2))_3}$ et $\mathbf{NTA(Cys(OEt))_3}$ avec Hg(II) sont similaires à ceux observés pour Cu(I) et sont eux aussi stabilisés par la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ces tripodes ont donc un intérêt potentiel comme agent de décorporation de Hg(II).

Dans un second temps, ces deux familles de chélateurs sélectifs du Cu(I) ont été fonctionnalisées par des sucres de type *N*-acétylgalactosamine (GalNac) pour cibler le foie et plus particulièrement les récepteurs aux asialoglycoprotéines.
La stratégie de synthèse des premiers vecteurs, **Vect1** et son analogue fluorescent **Vect1-TRITC**, est d'utiliser la plate-forme peptidique (RAFT) pour greffer quatre sucres sur une face et de disposer, sur l'autre face, l'unité chélatante à deux cystéines. La synthèse de ces deux vecteurs a été réalisée par synthèse peptidique sur support solide et l'insertion des quatre résidus sucres à été réalisée de manière chimiosélective par la formation d'un lien oxime selon des modes opératoires connus. Malgré une étape limitante, l'oxydation des sérines, qui conduit aussi à une oxydation du pont disulfure, les produits ont été obtenus en quantité suffisante pour les tests cellulaires.
La stratégie de synthèse des deux autres vecteurs **Vect2** et **Vect2-TAMRA** est totalement différente. En effet, les sucres permettant le ciblage des récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP-R, situés sur les cellules du foie) ont été greffés directement sur les trois fonctions thiols du tripode par l'intermédaire de ponts disulfures. Une fois le vecteur internalisé par la cellule, le glutathion présent va réduire les ponts disulfures et libérer le tripode. La synthèse de l'intermédiaire **24** (thiol activé), permettant l'introduction de trois résidus sucres par la formation de ponts disulfures, a nécessité l'optimisation de plusieurs étapes délicates. **Vect2** a été obtenu avec un rendement global de 12% et malgré l'étape limitante du couplage du fluorophore TAMRA, **Vect2-TAMRA** a été obtenu en quantité suffisante pour les tests cellulaires.
Les fonctions thiols des vecteurs **Vect1** et **Vect2** ont été protégées sous forme de ponts disulfure et sont donc stables en présence d'oxygène. Ces vecteurs possèdent une activité

complexante essentiellement dans les cellules ciblées car la présence des ponts disulfures ne permet de complexer le cuivre qu'une fois l'internalisation faite dans le milieu réducteur des cellules hépatiques. Ils peuvent donc être considérés comme des prodrogues qui sont activées par réduction dans les cellules ciblées.
Les tests cellulaires ont été réalisés sur différentes lignées cellulaires : HepG2, WIF-B9 et Can 10. Les cellules WIF-B9 et Can 10 forment des canalicules comme les hépatocytes humains.
Les tests d'internalisation des vecteurs **Vect1-TRITC** et **Vect2-TAMRA** dans les différentes lignées cellulaires montrent qu'ils sont incorporés au bout de 2 h d'incubation. Les vecteurs sont donc bien reconnus par les ASGP-R. Enfin, la complexation du cuivre(I) intracellulaire par **Vect1** a été déterminée en utilisant un senseur biologique de la concentration en cuivre(I) : le déplacement de la protéine ATP7B de l'appareil de Golgi vers le pôle apical en excès de cuivre(I). Ces tests montrent qu'en excès de cuivre(I), le déplacement d'ATP7B est inhibé en présence de **Vect1**. Ainsi, **Vect1** est bien un chélateur du cuivre(I) intracellulaire. Notons que les tests cellulaires concernant le déplacement d'ATP7B en présence de **Vect2** sont en cours. On peut se demander si ce chélateur beaucoup plus petit que Vect1 ne sera pas détruit par la cellule. En effet, il perd ses sucres après internalisation dans les cellules en milieu réducteur (MW = 497 g/mol contre $\approx$ 1000 g/mol pour Vect1).

Nous avons donc obtenu un premier vecteur qui cible les hépatocytes et complexe le cuivre(I) intracellulaire.
Cependant, on peut se demander où se place l'affinité de ces vecteurs pour le Cu(I) comparé à celle des molécules et protéines qui interviennent dans l'homéostasie du Cu(I). L'affinité de ces dernières est très contreversée dans la littérature, néanmoins, ce qui est avéré est que le GSH présente une affinité plus faible pour le Cu(I) que les métallochaperonnes qui ont elles même une affinité plus basse que les métallothionéines. Si on compare l'affinité de **Vect1** et **Vect2** par rapport à P^C (modèle de métallochaperonne), **Vect1** présente une affinité plus basse que les métallochaperonnes, il va donc être en compétition avec le GSH (Fig 171). **Vect2**, quant à lui, présente une affinité supérieure aux métallochaperonnes voir égale aux MT, il va donc lui aussi pouvoir récupérer le cuivre(I) complexé au GSH, et pourquoi pas récupérer le cuivre(I) aux métallochaperonnes ou MT (Fig 171). Cependant, pour les malades gravement atteints de la maladie de Wilson, **Vect2** peut être un bon candidat dans un premier temps, puisque il faut détoxifier le plus possible de cuivre(I) des hépatocytes. Pour finir, notons que l'échange de cuivre(I) entre une métallochaperonne et sa molécule cible est rapide et passe par un intermédiaire trivalent, il serait donc intéressant d'étudier la cinétique d'échange du cuivre(I) entre les complexes mononucléaires et les ligands libres pour les deux familles de chélateurs.

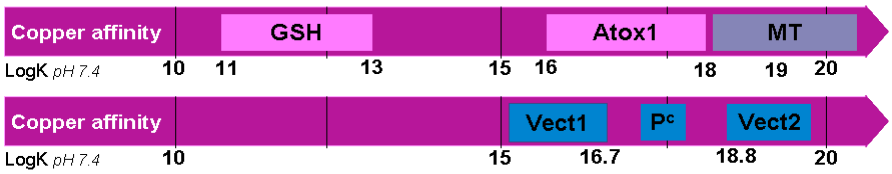
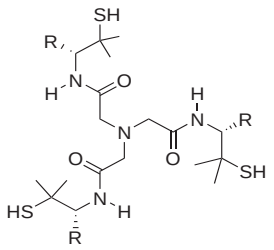


FIGURE 171 – Echelle d'affinité pour le Cu(I)

Un autre senseur biologique de la concentration intracellulaire en cuivre(I) sera utilisé sur les cellules : le dosage de la production de métallothionéines en excès de cuivre(I). En effet, il a été montré dans les cellules HepG2 que la production de métallothionéines augmente après 4h de contact avec 200 μM de cuivre (surexpression des gènes des MT) et qu'elle diminue quand la concentration en cuivre(I) revient à un niveau normal [361].
Dans de prochains travaux, il sera important de savoir si les vecteurs sont excrétés par les canalicules biliaires et s'ils entraînent le cuivre(I) avec eux. Pour cela, une cartographie par fluorescence X sera réalisée [362]. En effet, la microscopie par fluorescence X est une technique de microanalyse qui cartographie de manière quantitative la distribution d'éléments. Elle est la seule technique qui soit compatible avec des échantillons biologiques tels que des cellules ou des tissus cellulaires. La microscopie par fluorescence X permet d'avoir une sensibilité importante concernant des quantités très faibles de cations métalliques et d'avoir une résolution spatiale atteignant le submicron. Enfin, cette technique permet d'obtenir des informations sur la distribution, le degré d'oxydation et l'environnement de coordination de cations métalliques [363]. Elle nous permettrait donc de quantifier le cuivre(I) contenu dans les canalicules en absence et présence de vecteurs.
Enfin, si nous observons effectivement une destruction du deuxième vecteur par la cellule avant d'atteindre son but et empêchant donc la chélation de Cu(I), d'autres types de vecteurs seront envisagés. L'idée est d'obtenir des vecteurs qui soient moins reconnus par les enzymes et donc un peu moins biomimétiques. En effet, la cystéine utilisée est un acide aminé naturel présent dans les protéines. Elle est donc reconnue par certaines enzymes. L'utilisation de la D-pénicillamine à la place de la cystéine peut donc être intéressante puisqu'elle devrait être moins reconnue par les enzymes du fait de la présence de deux groupement méthyles en position β.
Enfin, nous pouvons aussi persister avec la plate-forme RAFT. En effet, Vect1 ne semble pas détruit par la cellule, le cyclodécapeptide semble donc plus résistant aux enzymes. Il est donc possible d'envisager le greffage d'un tripode sur une des faces de la plate-forme RAFT (Fig 172). Le lien chimique reliant le tripode à la plate-forme pourra être labile ou non.



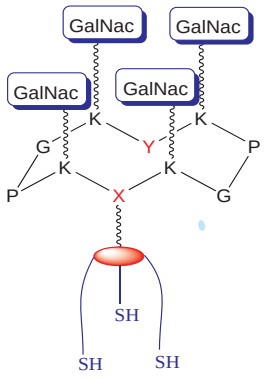


FIGURE 172 – Autres chélateurs éventuels

Partie Expérimentale

Septième partie

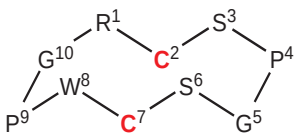
Partie Expérimentale

20 Cyclodecapeptides Synthesis

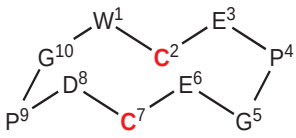
20.1 General Details

All chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich or Acros and used without further purification. Protected amino acids were obtained from Advanced ChemTech, Bachem Biochimie and France Novabiochem. 2-chlorotrityl chloride resin and PyBOP(Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidine phophonium hexafluorophosphate) were purchased from France Novabiochem. Mass spectra were acquired with an Esquire 3000 Bruker or with a LXQ type THERMO SCIENTIFIC spectrometer both equipped with a electrospray ionization (ESI) source or with a MALDI-TOF mass spectrometer BRUKER.

20.2 Synthesis of the cyclodecapeptide P^1 and P^2



P1



P2

n° 173 – Cyclodecapeptides P^1 and P^2

The linear precursors with protected side-chains HArg(Pbf)-Cys(Trt)-Ser(^{t}Bu)-Pro-Gly-Ser(^{t}Bu)Cys(Trt)-Trp(Boc)Pro-Gly-OH and H-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Glu(^{t}Bu)-Pro-Gly-Glu(^{t}Bu)-Cys(Trt)-Asp(^{t}Bu)-Pro-GlyOH were assembled manually by solid-phase peptide

synthesis on 2-chlorotrityl chloride resin (substitution 0.5 mmol/g, 500 mg) using Fmoc chemistry. Couplings were performed with N-α-Fmoc-protected amino acids (2 eqv.), PyBOP (2 eqv.) and DIEA (6 eqv.) in DMF (10 mL) for 30 minutes. After each coupling, the resin was treated with DMF/pyridine/Ac_2O (v/v/v = 7/2/1) to acetylate unreacted amino groups (2×5 mL ; 2×5 min). Fmoc deprotection was achieved with DMF/piperidine (v/v = 4/1) (3×10 mL ; 3×5 minutes). The yield of each peptide coupling was monitored by UV-vis spectroscopy (ϵ_{300} = 7800 L mol^{-1} cm^{-1} for the piperidine adduct dibenzofulvene-piperidine adduct). The peptide was cleaved from the resin by treatment with 15 mL CH_2Cl_2/TFA (v/v = 99/1) (2×3 min). The cleavage was performed very quickly, and the solution was flushed into 15 mL of Methanol/Pyridine solution (v/v = 8/2). After concentration, the residue was precipitated several times in cold diethyl ether to obtain a white powder. The linear precursor was then reacted in CH_2Cl_2 (0.5 mM) with PyBOP (3 eqv.) and DIEA (4 eqv.). The cyclic peptide formation was followed by analytical HPLC and the reaction was completed after 10 minutes. CH_2Cl_2 was then evaporated. The oily residue was precipitated with CH_2Cl_2/Et_2O to yield the cyclic peptide as a powder. The side-chain protections were removed by treatment with a solution of 1.4 g DTT in TFA/TIS/H_2O/ (v/v/v/v = 95/2.5/2.5) (peptide concentration = 10 mM). After stirring for 2 hours, the solution was evaporated under reduce pressure to yield yellow oil which was precipitated several times with cold Et_2O. The solid residue was dissolved in water/acetonitrile, filtered on PTFE 0.45 μm and purified by preparative RP-HPLC (Merck Purospher®, 250×40 mm, 10 μm C18 particles, solvent A = H_2O/TFA (v/v=99.925/0.075), solvent B = CH_3CN/H_2O/TFA (v/v/v = 90/10/0.1), gradient 5 to 45% of B in 30 minutes, flow rate 75 mL/min) to yield $\mathbf{P}^1$ as a white powder (52 mg, 19% overall yield), or $\mathbf{P}^2$ as a white powder (144 mg, 53% overall yield).
Analytical RP-HPLC were performed using analytical column (Merck Purospher® STAR endcapped, 4.6×250 mm, 5 μm C18 particules) at 1 mL/min with UV monitoring at 214 nm.
$\mathbf{P}^1$: Analytical RP-HPLC ; Purity : 96%, Rt = 15.7 min (gradient 5 to 60% of B in 30 min).
MALDI-TOF mass spectrometry : calculated for $C_{43}H_{62}N_{14}O_{12}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1031.41, exp = $[M+H^+]^+$ =1031.45
$\mathbf{P}^2$: Analytical HPLC ; Purity : 98%, Rt = 23.6 min (gradient 5 to 45% of B in 30 min).
MALDI-TOF mass spectrometry : calculated for $C_{45}H_{59}N_{11}O_{16}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1074.36, exp = $[M+H^+]^+$ 1074.65

20.3 ^{1}H NMR characterization

All the NMR experiments were recorded on a 500 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a BBI probe with triple axis gradient field. ^{1}H NMR spectra were recorded with 12 ppm windows and 32 k data points in the time domain. 2D ^{1}H NMR spectra

were recorded at 298 K in H_2O/D_2O (v/v = 9/1) using Watergate or presaturation solvent suppression. 2D spectra were acquired in phase-sensitive mode with TPPI for quadrature detection in the indirect dimension, using 2048×256 (TOCSY) or 2048×512 (ROESY) matrices over a 6000 Hz spectral width. TOCSY experiments were performed using a MLEV-17 spin-lock sequence with a mixing time of 70 ms. Off-resonance ROESY experiments were recorded with a mixing time of 300 ms (4050 Hz spin-lock). H-H distances were obtained by integrating the cross peaks in the Roesy spectrum and taking Gly Hα1/Hα2 and well-resolved X Hβ1/Hβ2 (1.80 Å) cross correlations as references for distance calibration.

^{1}H NMR (H_2O/D_2O 9/1 v/v, 500 MHz, 298 K) : δ =

Peptide $\mathbf{P}^1$

Residue	HN	Hα	Hβ	Others
Arg1	7.95	4.41	1.83 - 1.74	H(γ) : 1.51 ; H(δ) :3.01 ; H(ϵ) :6.98 - 6.4
Cys2	8.59	4.50	2.86	
Ser3	7.88	4.73	3.77	
Pro4		4.28	2.20 - 2.02	H(γ) :1.85 ; H(δ) :3.75 - 3.58
Gly5	8.69	4.02 - 3.74		
Ser6	7.87	4.38	3.77	
Cys7	8.30	4.48	2.66	
Trp8	8.00	4.96	3.19 - 2.99	$H_{\epsilon 1}$:10.07, $H_{\delta 1}$:7.14, $H_{\epsilon 3}$:7.58 $H_{\zeta 3}$:7.08, $H_{\eta 2}$:7.14, $H_{\zeta 2}$:7.40
Pro9		4.28	2.20 - 2.02	H(γ) : 1.85 ; H(δ) :3.75 - 3.40
Gly 10	8.34	3.94 - 3.69		

Table 54 – ^{1}H NMR, P^1

Peptide $\mathbf{P}^2$

Residue	HN	Hα	Hβ	Others
Trp1	7.92	4.62	3.22-3.12	$H_{\epsilon 1}$:9.97, $H_{\delta 1}$:7.11, $H_{\epsilon 3}$:7.53 $H_{\zeta 3}$:7.04, $H_{\eta 2}$:7.12, $H_{\zeta 2}$:7.37
Cys2	8.20	4.32	2.75	
Glu3	7.79	4.67	1.99-1.68	H(γ) :2.33
Pro4		4.29	2.20 - 2.00	H(γ) :1.91 - 1.83 ; H(δ) :3.71 - 3.61
Gly5	8.51	4.03-3.69		
Glu6	7.88	4.41	2.04-1.88	H(γ) :2.28
Cys7	8.46	4.41	2.79	
Asp8	8.00	4.89	2.67-2.44	
Pro9		4.29	2.20 - 2.00	H(γ) :1.91 - 1.83 ; H(δ) :3.71 - 3.61
Gly 10	8.36	3.93-3.70		

Table 55 – ^{1}H NMR, P^2

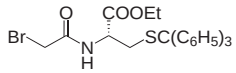
21 Podands synthesis

21.1 General Details

Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Acros, Fluka and Alfa Aesar and used without further purification. 1,4,7-triazacyclononane tris-HCl was purchased from CheMatech. Cys(Trt)OEt was synthesized according to a published procedure [249]. All water solutions were prepared from ultrapure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore MilliQ reverse-osmosis cartridge system (resistivity 18 MΩ cm). Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merck). Flash chromatography was performed on silica gel 60 (40-63 μm, Merck). Analytical and preparative HPLC was performed with a VWR system fitted with a purosphere RP18 column (L = 250 mm, $\oslash$ = 4.6 mm and p = 5 μm for analytical column ; L = 250 mm, $\oslash$ = 50 mm and p = 10 μm for preparative column). Flow rates of 1 mL/min and 75 mL/min were used for analytical and preparative column respectively. Elution conditions were as follows : from water/TFA (99.925/0.075 ; A) to CH_3CN/water /TFA (90/10/0.1 ; B). ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Mercury Varian 400 spectrometer and on a Brucker 500 spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm with the solvent as the internal reference. Mass spectra were acquired with a Finigan LCQ-ion trap equipped with an electrospray source. Elemental analyses were performed by the Service Central d'Analyse (Solaize, France).

21.2 (Trt)compounds synthesis

Ethyl 2-(2-bromoacetamido)-3-(tritylthio)propanoate :



$C_{26}H_{26}BrNO_3S$
MW: 512.46

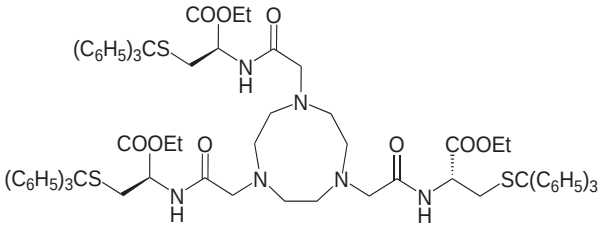
n° 174 – Br(CH_2CO)Cys(Trt)OEt

Adapted from the procedure described by Geiwiz and al. [253]

At 0°C, a solution of bromoacetyl bromide (0.25 mL, 2.69 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) was added dropwise to a mixture of *(R)*-Cys(Trt)OEt (0.996 g, 2.54 mmol) in CH_2Cl_2 (10mL) and 10% $KHCO_3$ aqueous solution (10 mL). The reaction mixture was stirred at 0°C for 1 hour. After decantation, the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3×16 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuo. The crude product **Br(CH_2CO)Cys(Trt)OEt** (1.29 g, 99%), a light yellow solid, was used without further purification.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.29 (t, J = 3.6, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.62 and 2.74 (ABX, J_{AX}= 4.8, J_{BX} = 6.0, J_{AB} = 12.4, 2H, C$\underline{H_2}$SCTr) ; 3.86 (s, 2H, BrC$\underline{H_2}$CO) ; 4.23 (q, J = 7.0, 2H, C$\underline{H_2}$CH$_3$) ; 4.56 (dt, J = 2.4, 7.2, 1H, C$\underline{H}$) ; 6.95 (d, J = 8.0, 1H, N$\underline{H}$) ; 7.24-7.35 (m, 10H, SC(C$_6\underline{H_5}$)$_3$) ; 7.43 (d, J = 7.6, 5H, SC(C$_6\underline{H_5}$)$_3$).

(2)-NOTA(Cys(Trt)OEt)$_3$:



$C_{84}H_{90}N_6O_9S_3$
MW: 1423.84

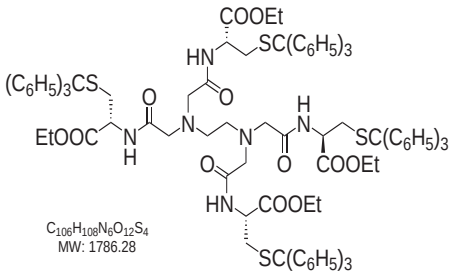
n° 175 – NOTA(Cys(Trt)OEt)$_3$

1,4,7-triazacyclononane trihydrochloride (0.423 g, 1.77 mmol) and potassium carbonate (1.56 g, 11.31 mmol) were successively added to a solution of crude compound **Br(CH_2CO)Cys(Trt)OEt** (2.90 g, 5.66 mmol) in anhydrous acetonitrile (60 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature, overnight, under argon. After evaporation of the solvent, the residue was partitioned between ethyl acetate (180 mL) and water (100 mL). The organic layer was washed with water (2×70 mL)

and brine (1×70 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (2.66 g) was purified via column chromatography on silica gel (40 mL, CH_2Cl_2/EtOH : gradient from 100/0 to 96/4) to give the compound NOTA(Cys(Trt)OEt)$_3$, (1.99 g, 77%) as a white powder.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.21 (t, J = 7.0 , 9H, C$\underline{H_3}$) ; 2.58 and 2.67 (ABX, J_{AX} = 4.9, J_{BX} = 5.5, J_{AB} = 12.1, 6H, C$\underline{H_2}$S) ; 2.82 (s, 12H, N-C$\underline{H_2}$-C$\underline{H_2}$-N) ; 3.11 (s, 6H, C$\underline{H_2}$CO) ; 4.14 (q, J = 7.0, 6H, C$\underline{H_2}$-CH$_3$) ; 4.32-4.37 (m, 3H, C$\underline{H}$), 7.17-7.27 (m, 30H, SC(C$_6\underline{H_5}$)$_3$) ; 7.33 (d, J = 7.4, 15H, SC(C$_6\underline{H_5}$)$_3$) ; 7.50 (d, J = 8.2, 3H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 14.41 ($\underline{C}$H$_3$) ; 34.20 ($\underline{C}$H$_2$SC) ; 51.10 ($\underline{C}$H) ; 57.12 and 61.98 (N-$\underline{C}$H$_2$-$\underline{C}$H$_2$-N) ; 63.01 ($\underline{C}$H$_2$CH$_3$) ; 66.93 ($\underline{C}$H$_2$CO), 127.15, 128.25, 129.71 (($\underline{C_6}$H$_5$)$_3$) ; 144.53 ($\underline{C}$(C$_6$H$_5$)$_3$), 171.08 /170.57 (2*$\underline{C}$O)
ES-MS mass spectrometry, m/z :calculated for $C_{84}H_{90}N_6O_9S_3$, $[M+H^+]^+$ = 1423.19, exp : $[M+H^+]^+$ = 1423.42
Elemental analysis calcd (%) for $C_{84}H_{90}N_6O_9S_3$, H_2O(1441.85 g/mol) : C, 69.97 ; H, 6.43 ; N, 5.83 ; S, 6.67 ; found : C, 69.75 ; H, 6.36 ; N, 5.77 ; S, 7.02.

EDTA(Cys(Trt)OEt)$_4$:



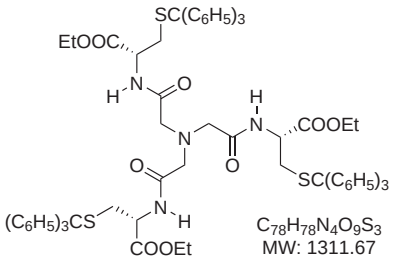
n° 176 – EDTA(Cys(Trt)OEt)$_4$

EDTA (0.04 μL, 0.607 mmol) and diisopropylethylamine (0.441 μL, 2.58 mmol) were successively added to a solution of crude compound **Br(CH$_2$CO)Cys(Trt)OEt** (1.29 g, 2.53 mmol) in anhydrous acetonitrile (35 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature, overnight, under argon. After evaporation of the solvent, the residue was partitioned between ethyl acetate (170 mL) and water (100 mL). The organic layer was washed with water (2×70 mL) and brine (1×70 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (1.13 g) was purified via column chromatography on silica gel (60 mL, CH_2Cl_2/EtOH : gradient from 100/0 to 95/5) to give the compound EDTA(Cys(Trt)OEt)$_4$, (0.877, 81%) as a white powder.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.12 (t, J = 7.6, 12H,C$\underline{H_3}$) ; 2.49 and 2.70 (ABX, J_{AX} = 4.5, J_{BX} = 7.8, J_{AB} = 12.4, 8H, C$\underline{H_2}$SH) ; 2.75 (s, 4H, N-C$\underline{H_2}$-C$\underline{H_2}$-N) ; 3.18 and 3.24 (AB, J_{AB} = 15.8, 8H, C$\underline{H_2}$CO) ; 3.95 and 4.04 (ABX3, J_{AX3} = J_{BX3} = 7.2,

J_{AB} = 10.5, 8H, $C\underline{H_2}$-CH_3) ; 4.40 (dt, J = 4.3, J = 7.8, 4H, $C\underline{H}$) ; 7.12-7.24 (m, 40H, $SC(C_6\underline{H_5})_3$) ; 7.32 (d, J = 7.4, 20H, $SC(C_6\underline{H_5})_3$) ; 7.58 (d, J = 8.6, 4H, $N\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 14.30 ($\underline{C}H_3$) ; 33.76 ($\underline{C}H_2SH$) ; 51.85 ($\underline{C}H$) ; 58.07 (N-$\underline{C}H_2$-$\underline{C}H_2$-N) ; 61.98 ($\underline{C}H_2CO$), 67.23 ($\underline{C}H_2CH_3$) ; 127.06, 128.22, 129.78 ($(\underline{C_6}H_5)_3$) ; 144.62 ($\underline{C}(C_6H_5)_3$) ; 171.09/171.22 (2*$\underline{C}O$).
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{106}H_{108}N_6O_{12}S_4$, $[M+H^+]^+$ = , exp $[M+H^+]^+$ = 1786.2
Elemental analysis calcd (%) for $C_{106}H_{108}N_6O_{12}S_4$, H_2O (1804.2g/mol) : C, 70.56 ; H, 6.14 ; N, 4.66 ; found : C, 70.48 ; H, 6.09 ; N, 4.64.

NTA(Cys(Trt)OEt)$_3$:



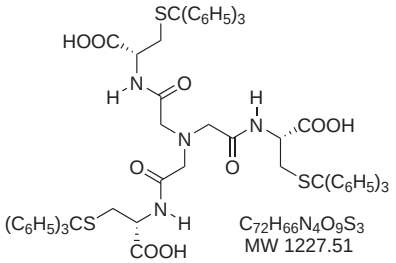
n° 177 – NTA(Cys(Trt)OEt)$_3$

Nitrilotriacetic acid (0.196 g, 1.03 mmol) was added to a solution of Cys(Trt)OEt (1.20 g, 3.06 mmol) in DMF (20 mL). Then the mixture was cooled at 0°C and *N*-ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (0.587 g, 3.06 mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.414 g, 3.06 mmol) were successively added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours under argon. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL). The organic layer was washed with water (2×50 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (50 mL) and brine (2×50 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (1.391 g) was purified via column chromatography on silica gel (100 mL, CH_2Cl_2/ Ethyl Acetate, 80/20) to give the compound NTA(Cys(Trt)OEt)$_3$ (1.103 g, 82%) as a white powder.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.05 (t, J = 7.0, 9H, $C\underline{H_3}$) ; 2.39 and 2.68 (ABX, J_{BX} = 4.1, J_{AX} = 8.0, J_{AB} = 12.7, 6H, $C\underline{H_2}S$) ; 3.17 and 3.29 (AB, J_{AB} = 15.0, 6H, $C\underline{H_2}CO$) ; 3.84 and 3.96 (ABX3, J_{ABX3} = 7.0, J_{BX3} = 7.0, J_{AB} = 10.9, 6H, $C\underline{H_2}CH_3$) ; 4.34 (dt, J = 4.0, 8.2, 3H, $C\underline{H}$) ; 7.13-7.17 (m, 30H, $SC(C_6\underline{H_5})_3$), 7.22 (d, J = 7.4, 15H, $SC(C_6\underline{H_5})_3$) ; 7.56 (d, J = 8.6, 3H, $N\underline{H}$)
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 14.39 ($\underline{C}H_3$) ; 33.69 ($\underline{C}H_2S$) ; 52.11 ($\underline{C}H$) ; 57.97 ($\underline{C}H_2CO$), 62.21 ($\underline{C}H_2CH_3$) ; 127.16, 128.32, 129.90 ($C(\underline{C_6}H_5)_3$) ; 144.70 ($\underline{C}(C_6H_5)_3$), 171.66 /170.70 (2*$\underline{C}O$).

ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{78}H_{78}N_4O_9S_3$, $[M+H^+]^+$ = 1311.1, exp $[M+H^+]^+$ = 1310.8
Elemental analysis calcd (%) for $C_{78}H_{78}N_4O_9S_3$, $2H_2O$ (1336.67g/mol) : C, 69.51 ; H, 6.13 ; N, 4.16 ; found : C, 69.42 ; H, 6.05 ; N, 3.9.

NTA(Cys(Trt)OH)$_3$:

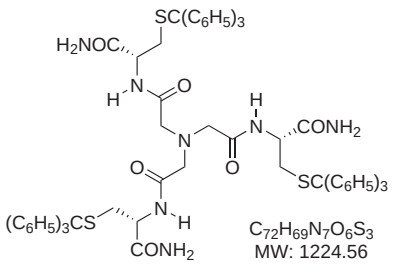


n° 178 – NTA(Cys(Trt)OH)$_3$

Compound **NTA(Cys(Trt)OEt)$_3$** (0.444, 0.339 mmol) was dissolved in ethanol (8 mL) and LiOH 1M (1.35 mL, 1.35 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Then, the reaction mixture was evaporated and the residue was dissolved in water (6 mL) and HCl 1M was added until pH = 4/5. After, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (6×20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.360 mg, 86%) was used without further purification.

^{1}H NMR (DMSO-d$_6$, 400 MHz, 298 K) : δ = 2.37-2.46 (m, 6H, C$\underline{H_2}$SC) ; 3.32 (s, 6H, C$\underline{H_2}$CO) ; 4.17-4.21 (m, 3H, C$\underline{H}$) ; 7.20-7.37 (m, 45H, C(C$_6\underline{H_5}$)$_3$) ; 8.46 (d, J = 7.4, 3H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 34.03 ($\underline{C}H_2S$) ; 52.34 ($\underline{C}H$) ; 60.68 ($\underline{C}H_2CO$), 127.67, 128.77, 130.00 (C($\underline{C_6}H_5$)$_3$) ; 145.16 ($\underline{C}$(C$_6$H$_5$)$_3$), 172.02 and 171.61 (2*$\underline{C}$O).
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{72}H_{66}N_4O_9S_3Na$ $[M+Na^+]^+$ = 1249.4, exp $[M+Na^+]^+$ = 1249.2

NTA(Cys(Trt)NH$_2$)$_3$:



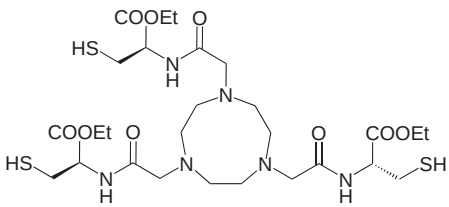
n° 179 – NTA(Cys(Trt)NH$_2$)$_3$

Nitrilotriacetic acid (0.068 g, 0.357 mmol) was added to a solution of Cys(Trt)NH_2 (0.401 g, 1.10 mmol) in DMF (10 mL). Then the mixture was cooled at 0°C and *N*-ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (0.212 g, 1.10 mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.150 g, 1.11 mmol) were successively added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours under argon. After evaporation of the solvent, the residue was washed with water (25 mL) and filtrated. Then the solid was dissolved in dichloromethane (100 mL) and the organic layer was washed with water (3×50 mL) and brine (1×50 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give the compound NTA(Cys(Trt)NH_2)$_3$ (0.404 g, 92%) as a white powder.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 2.37-2.44 (m, 6H, C$\underline{H_2}$S) ; 3.14 and 3.19 (AB, J_{AB} = 16.4, 6H, C$\underline{H_2}$CO) ; 4.00-4.06 (m, 3H, C$\underline{H}$) ; 5.70 (s, 3H, N$\underline{H_2}$) ; 6.24 (s, 3H, N$\underline{H_2}$) ; 7.16-7.32 (m, 45H, SC($C_6\underline{H_5}$)$_3$) ; 7.85 (d, J = 7.2, 3H, N$\underline{H}$)
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 38.89 ($\underline{C}H_2SH$) ; 57.78 ($\underline{C}H$) ; 63.18 ($\underline{C}H_2CO$) ; 132.37, 133.56, 134.89 (C($\underline{C_6}H_5$)$_3$) ; 150.03 ($\underline{C}$(C_6H_5)$_3$), 176.15 and 178.074 (2*$\underline{C}$O).
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{72}H_{69}N_7O_6S_3$ $[M+H^+]^+$ = 1224.4, exp $[M+H^+]^+$ = 1223.8

21.3 (SH)compounds synthesis

NOTA(Cys(OEt))$_3$:



$C_{27}H_{48}N_6O_9S_3$
MW: 696.90

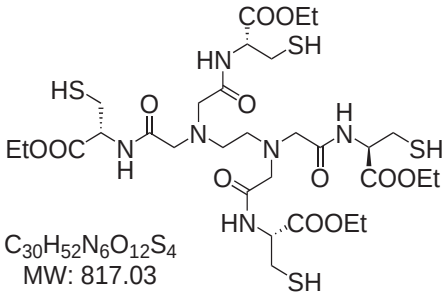
n° 180 – NOTA(Cys(OEt))$_3$

Trifluoroacetic acid (1.25 ml, 16.85 mmol) and triethylsilane (0.325 mL, 2.02 mmol) were successively added to a solution of NOTA(Cys(Trt)OEt)$_3$ (0.480 g, 0.337 mmol) in CH_2Cl_2 (17 mL) under argon. After stirring for 30 minutes at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.703 g) was purified via preparative HPLC (H_2O/TFA :AcN/TFA/H_2O) and give the compound NOTA(Cys(OEt))$_3$ (0.199 g, 84 %) as a colourless oily solid.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.26 (t, J = 7.3, 9H, C$\underline{H_3}$) ; 2.85-3.06

(m, 18H, $C\underline{H_2}SH$ and N-$C\underline{H_2}$-$C\underline{H_2}$-N) ; 3.68 (s, 6H, $C\underline{H_2}CO$) ; 4.13-4.24 (m, 6H, $C\underline{H_2}$-CH_3) ; 4.67 (td, J = 4.4, J = 7.3, 3H, C$\underline{H}$), 7.45 (d, J = 8.1, 3H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 14.99 ($\underline{C}H_3$) ; 27.31 ($\underline{C}H_2SH$) ; 50.41 and 51.33 (N-$\underline{C}H_2$-$\underline{C}H_2$-N) ; 56.29 ($\underline{C}H$) ; 58.93 ($\underline{C}H_2CO$), 63.13 ($\underline{C}H_2CH_3$) ; 170.49/171.38 (2*$\underline{C}O$).
Analytical HPLC Purity : 95%, Rt = 13.5 min ; gradient from 80:20 to 0:100, A:B in 15 min to stay at 100% B, detection λ = 214 nm.
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{27}H_{48}N_6O_6S_3$ $[M+H^+]^+$ = 697.26, exp $[M+H^+]^+$ = 697.6

EDTA(Cys(OEt))$_4$:

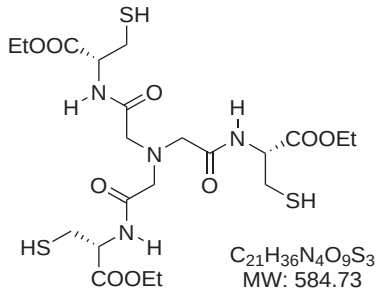


n° 181 – EDTA(Cys(OEt))$_4$

Trifluoroacetic acid (1.82 ml, 24.55 mmol) and triethylsilane (0.470 mL, 2.946 mmol) were successively added to a solution of EDTA(Cys(Trt)OEt)$_4$ (0.877 g, 0.491 mmol) in CH_2Cl_2 (22 mL), under argon. After stirring for 1 hour at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (1.04 g) was purified via preparative HPLC (H_2O/TFA:AcN/TFA/H_2O) and give the compound EDTA(Cys(OEt))$_4$ (0.106 g, 26%.) as a colourless oily solid.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.27 (t, J = 6.6, 12H,$C\underline{H_3}$) ; 2.90-3.04(m, 8H, $C\underline{H_2}SH$) ; 3.11 (s, 8H, $C\underline{H_2}CO$) ; 3.70 (s, 4H, N-$C\underline{H_2}$-$C\underline{H_2}$-N) ; 4.14-4.25 (m, 8H, $C\underline{H_2}$-CH_3) ; 4.67-4.72 (m, 4H, C$\underline{H}$), 7.60 (d, J = 7.3, 4H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 14.99 ($\underline{C}H_3$) ; 27.31 ($\underline{C}H_2SH$) ; 53.98 (N-$\underline{C}H_2$-$\underline{C}H_2$-N) ; 56.12 ($\underline{C}H$) ; 58.36 ($\underline{C}H_2CO$), 63.17 ($\underline{C}H_2CH_3$) ; 169.812/171.19 (2*$\underline{C}O$).
Analytical HPLC Purity : 94%, Rt = 13.3 min ; gradient from 70:30 to 0:100, A:B in 15 min to stay at 100% B, detection λ = 214 nm.
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{30}H_{52}N_6O_{12}S_4$ $[M-H^+]^-$ = 815.25, exp $[M-H^+]^-$ = 815.0

NTA(Cys(OEt))$_3$:

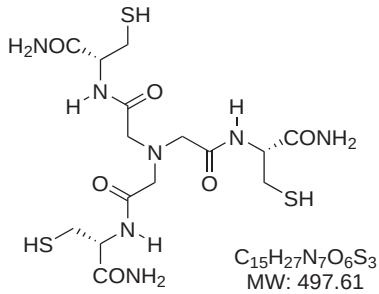


n° 182 – NTA(Cys(OEt))$_3$

Trifluoroacetic acid (1.81 mL, 24.4 mmol) and triethylsilane (0.47 mL, 2.9 mmol) were successively added to a solution of NTA(Cys(Trt)OEt)$_3$ (0.640 g, 0.49 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL), under argon. After stirring for 30 minutes at room temperature, the mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.627 mg) was purified via preparative HPLC (H_2O/TFA:AcN/TFA/H_2O) and give the compound NTA(Cys(OEt))$_3$, (0.110 g, 49%) as a white oily solid.

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.25 (t, J = 7.1, 9H, C$\underline{H_3}$) ; 1.97 (t, J = 8.8, 3H, S$\underline{H}$) ; 2.95 and 3.00 (ABXY, J_{AX} = 4.6, J_{BX} = 6.1, J_{BY}= 9.0, J_{AY} = 9.3, J_{AB} = 14.0, 6H, C$\underline{H_2}$SH) ; 3.48 and 3.52 (AB, J_{AB} = 16.3, 6H, C$\underline{H_2}$CO) ; 4.18 and 4.22 (ABX3 ; J_{AX3} = 7.1, J_{BX3} = 7.1, J_{AB} = 10.8, 6H, C$\underline{H_2}$-CH$_3$) ; 4.70 (ddd, J = 4.7, 6.2, 8.0, 3H, C$\underline{H}$) ; 7.71 (d, J = 8.0, 3H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 14.97 ($\underline{C}H_3$) ; 27.40 ($\underline{C}H_2SH$) ; 55.81 ($\underline{C}H$) ; 59.75 ($\underline{C}H_2CO$) ; 63.02 ($\underline{C}H_2CH_3$) ; 171.61 and 172.02 (2*$\underline{C}O$).
Analytical HPLC Purity : 96%, Rt = 7.6 min ; gradient from 50:50 to 0:100, A:B in 15 min to stay at 100% B, detection λ = 214 nm.
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{21}H_{36}N_4O_9S_3$ $[M+H^+]^+$ = 585.16, exp $[M+H^+]^+$ = 585.0

(10)-NTA(Cys(NH$_2$))$_3$:

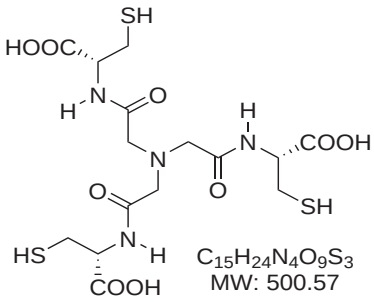


n° 183 – NTA(Cys(ONH$_2$))$_3$

Trifluoroacetic acid (1.4 mL, 17.84 mmol) and triethylsilane (0.54 mL, 2.14 mmol) were successively added to a solution of NTA(Cys(Trt)NH_2)$_3$ (0.437 g, 0.357 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) under argon. After stirring for 50 minutes at room temperature, the mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.600 g) was purified via preparative HPLC (H_2O/TFA:AcN/TFA/H_2O) and give the compound NTA(Cys(NH_2))$_3$, (0.065 g, 37%) as a white solid.

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 2.87 (ABX, J_{AX} = 4.9, J_{BX} = 7.5, J_{AB} = 14.2, 6H, 3×C$\underline{H_2}$SH) ; 3.55 (s, 6H, 3×C$\underline{H_2}$CO) ; 4.45 (dd, J = 7.5, 3H, 3×C$\underline{H}$).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 28.18 ($\underline{C}H_2SH$) ; 57.93 ($\underline{C}H$) ; 60.85 ($\underline{C}H_2CO$) ; 175.98 and 177.04 (2*$\underline{C}O$).
Analytical HPLC Purity : 96%, Rt = 10.2 min ; gradient from 100:0 to 50:50, A:B in 14 min, detection λ = 214 nm.
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{15}H_{27}N_7O_6S_3$ $[M+H^+]^+$ = 498.12, exp $[M+H^+]^+$ = 498.1.

(11)-NTA(Cys(OH))$_3$:



n° 184 – NTA(Cys(OH))$_3$

Trifluoroacetic acid (1.77 mL, 23.8 mmol) and triethylsilane (0.456 mL, 2.85 mmol) were successively added to a solution of NTA(Cys(Trt)OH)$_3$ (0.584 g, 0.476 mmol) in CH_2Cl_2 (21 mL), under argon. After stirring for 30 minutes at room temperature, the mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (744.5 mg) was purified via preparative HPLC (H_2O/TFA:AcN/TFA/H_2O) and give the compound NTA(Cys(OH))$_3$ (m = 0.209 g, 88%) as a white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz, 298 K) : δ = 3.07 and 3.01 (ABX, J_{AX} = 4.3, J_{BX}= 6.8, J_{AB} = 14.5, 6H, C$\underline{H_2}$SH) ; 3.81-3.90 (m, 6H, C$\underline{H_2}$CO) ; 4.72 (t, J = 5.9, 3H, C$\underline{H}$).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 27.86 ($\underline{C}H_2SH$) ; 57.38 ($\underline{C}H$) ; 60.07 ($\underline{C}H_2CO$), 173.46 ($\underline{C}OOH$) ;. 175.77 ($\underline{C}O$).
Analytical HPLC Purity : 96%, Rt = 12.5 min ; gradient from 95:5 to 0:100, A:B in 15 min, detection λ = 214 nm.

ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{15}H_{24}N_4O_9S_3$ $[M\text{-}H^+]^-$ = 499.57, exp $[M\text{-}H^+]^-$ = 499.0.

22 Vector1 synthesis

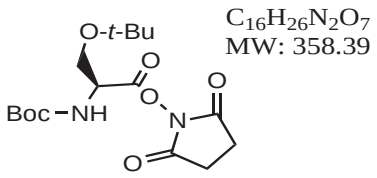
22.1 General Details

All chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France) and were used without further purification. Thin layer chromatography was performed on 0.2 mm silica 60 coated aluminium foils with F-254 indicator (Merck) and detected under UV light and developed with aqueous sulfuric acid (100 mL, H_2SO_4-H_2O 15%). Mass spectra were obtained by electron spray ionization (ES-MS) on a VG Platform II in the positive mode or with a Finigan LCQ-ion trap equipped with an electrospray source and by a Finigan LCQ-ion trap equipped with an electrospray source. For the synthesis of peptides, protected amino acids were obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voivins-Le-Bretonneux, France) and France Biochem S. A. (Meudon, France). 2-Chlorotrityl Chloride Resin and PyBOP were purchased from France Biochem. Analytical and preparative RP-HPLC analyses were performed using a Waters system, equipped with a UV detector (λ = 214 and 250 nm). HPLC analyses were performed on a Macherey-Nagel Nucleosil 120 Å 3 mm C18 particles (30×4.6 mm) using a gradient from solvent A (water/TFA (v/v = 99.9/0.1)) to solvent B (acetonitrile/water/TFA (v/v/v = 90/10/0.1)) at a flow rate of 1.3 mL/min. RP-HPLC preprative was performed on a Delta-Pack 100 Å 15 mm C18 particles (200×2.5 mm) using the same gradient at a flow rate of 22 mL/min.

22.2 Dipeptide (Fmoc-Lys[Boc-Ser(^{t}Bu)]-OH) synthesis

Adapted from the procedure described by Foillard and al. [310]

Boc[Ser(^{t}Bu)]-NHS



$C_{16}H_{26}N_2O_7$
MW: 358.39

1

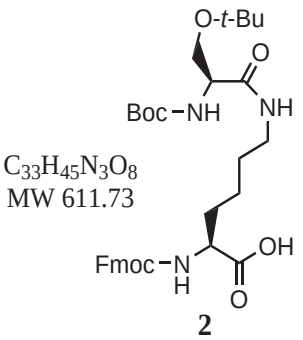
n° 185 – Compound 1 : Fmoc-Lys[Boc-Ser(^{t}Bu)]-OH

To a solution of Boc[Ser(^{t}Bu)]-OH (6.40 g, 0.023 mmol) in ethyl acetate/dioxane

(230 mL , v/v = 1/1) was added *N*-hydroxysuccinimide (2.70 g, 0.024 mmol). At 0°C, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (5.03 g, 0.024 mmol) was added. The reaction mixture was stirred during 3 hours at room temperature. Then the reaction was filtrated, to removed the DCU which was formed during the reaction and evaporated. The residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL). The organic layer was washed with 5% aqueous $NaHCO_3$ solution (2×160 mL), water (2×140 mL), brine (2×140 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. A solid was obtained (6.97, 85%) and used without further purification.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz, 298 K) : δ = 1.20 (9H, s, $C\underline{H_3}$) ; 1.46 (9H, s, $C\underline{H_3}$) ; 2.82 (4H, s, 2×$C\underline{H_{2NHS}}$) ; 3.66 (1H, m, $C\underline{H_{2\beta}}$) ; 3.92 (1H, m, $C\underline{H_{2\beta}}$), 4.78 (1H, d, J = 9.0, $C\underline{H_\alpha}$) ; 5.41 (1H, d, J = 9.0).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{16}H_{26}N_2O_7$: $[M+H^+]^+$ = 359.2 ; exp $[M+H^+]^+$ = 360.3.

Compound 2 :(Fmoc-Lys[Boc-Ser(^{t}Bu)]-OH)



n° 186 – Fmoc-Lys[Boc-Ser(^{t}Bu)]-OH

A suspension of Boc[Ser(^{t}Bu)]-NHS (6.97 g, 0.019 mol) in CH_2Cl_2 (75 mL) was added drop wise to a solution of Fmoc-(L)Lys-OH (10.90 g, 0.029 mmol) and DIPEA (15.6 mL, 0.089 mmol) in CH_2Cl_2 (130 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The residue was evaporated and dissolved in ethyl acetate (400 mL). The organic layer was washed with 10% aqueous citric acid solution (1×70 mL), water (2×100 mL), brine (1×100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified via column chromatography on silica gel (1% acetic acid/ethyl acetate) and precipitated in diethyl ether to give Fmoc-Lys[Boc-Ser(^{t}Bu)]-OH as a white solid (7.83 g, 65%).

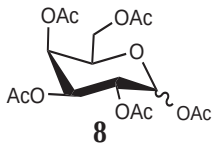
^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz, 298 K) : δ = 1.09 (9H, s, 3×CH_3) ; 1.32-1.47 (14H, m) ; 1.65 (1H, m) ; 1.84 (1H, m) ; 3.05-3.20 (2H, m) ; 3.36 (1H, m) ; 3.63 (1H, m) ; 4.06-4.34 (5H, m) ; 5.62 (1H, broad s) ; 6.25 (1H, broad d) ; 6.84 (1H, broad s) ; 7.18-7.33 (4H, m) ;

7.55 (2H, d, J = 7.5) ; 7.68 (2H, d, J = 7.5).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{33}H_{45}N_3O_8$: $[M+H^+]^+$ = 612.3 ; exp $[M+H^+]^+$ = 612.2.

22.3 Sugar synthesis

Compound 8 : Per*O*AcGal :

From the procedure described by Wu and al. [321] and Chaplin and al. [322]



Chemical Formula: $C_{16}H_{22}O_{11}$
MW: 390.34

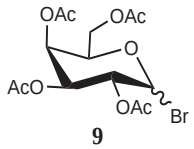
n° 187 – **Compound 8**

A solution of D-Galactose (10.07 g, 0.055 mol) in Ac_2O/pyridine (210 mL, v/v = 2/1) was stirred during 5 hours at room temperature (the solution becomes colorless when the reaction is finished). The mixture was evaporated and the residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL). The organic layer was washed with 10% aqueous citric acid, solution (3×70 mL), 5% aqueous $NaHCO_3$ solution (1×50 mL) and water (1×60 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product **8** (m = 19.94 g, 93%) was used without purification (α/β = 2/1).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) : δ = 1.98-2.15 (10s, 15H, 5×OCOC$\underline{H_{3\alpha}}$, 5×OCOC$\underline{H_{3\beta}}$) ; 4.04-4.18 (m, 2H, H-6$_\alpha$, H-5$_\beta$, H-6$_\beta$), 4.34 (t large, 1H, $^3J_{5\alpha 6\alpha}$ = 5.6, H-5$_\alpha$), 5.07 (dd, $^3J_{2\beta,3\beta}$ = 10.2, H-3$_\beta$), 5.29-5.35 (m, 2H, H-2$_\alpha$, H-3$_\alpha$, H-2$_\beta$), 5.42 (dd,$^3J_{4\beta,5\beta}$= 1.1,$^3J_{3\beta,4\beta}$= 3.4, H-4$_\beta$), 5.49 (d large, 1H, $^3J_{3\alpha,4\alpha}$ = 2.8, H-4$_\alpha$), 5.69 (d, $^3J_{1\beta,2\beta}$ = 8.3, H-1$_\beta$), 6.37 (d, 1H, $^3J_{1\alpha,2\alpha}$ = 1.7, H-1$_\alpha$).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) : δ = 20.9 (OCO$\underline{C}H_3$), 21.0 (OCO$\underline{C}H_3$), 21.2 (OCO$\underline{C}H_3$), 21.3 (OCO$\underline{C}H_3$), 61.4 (C-6$_\beta$), 61.6 (C-6$_\alpha$), 66.8 (C-2$_\alpha$ ou C-3$_\alpha$), 67.2 (C-4$_\beta$), 67.7 (C-2$_\alpha$ ou C-3$_\alpha$), 67.8 (C-4$_\alpha$), 68.2 (C-2$_\beta$), 69.2 (C-5$_\alpha$), 71.2 (C-3$_\beta$), 72.1 (C-5$_\beta$), 90.1 (C-1$_\alpha$), 92.6 (C-1$_\beta$), 169.3 ($\underline{C}$=O), 170.3 ($\underline{C}$=O),170.5 ($\underline{C}$=O), 170.7 ($\underline{C}$=O).

Compound 9 : Br-Tetra*O*Ac-Gal

Adapted from the procedure described by Lemieux and al. [364]



9

Chemical Formula: $C_{14}H_{19}BrO_9$
MW: 411.20

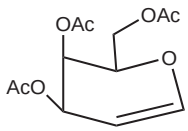
n° 188 – **Compound 9**

To a solution of compound **8** (19.94 g, 0.051 mol) in CH_2Cl_2 (65 mL) at 0°C, HBr (30% in acetic acid glacial, 37 mL) was added carefully and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then CH_2Cl_2 (300 mL) was added and the organic layer was washed with iced water, washed with saturated $NaHCO_3$ solution (3×60 mL) and evaporated under vacuum at room temperature. The crude product **9** was used without purification (m = 8.96 g, 43%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz, 298 K) : δ = 1.99, 2.03, 2.09, 2.13 (4s, 12H, 4×OCOC$\underline{H_3}$) ; 4.07-4.21 (m, 2H, H-6) ; 4.46 (t large, 1H, $^3J_{5,6}$ = 6.5, H-5) ; 5.03 (dd, $^3J_{3,5}$ = 3.5, $^3J_{2,3}$ = 10.6, 1H, H-2) ; 5.38 (dd, 1H, $^3J_{3,4}$ = 3.2, $^3J_{2,3}$ = 10.6, H-3) ; 5.49 (dd, 1H, $^3J_{3,4}$ = 3.2, $^3J_{4,5}$ = 1.0, H-4) ; 6.67 (d, 1H, $^3J_{1,2}$ = 3.9, H-1).

Compound 10 : D-galactal :

Adapted form the procedure described by Kozikowski and al. [364]



10

Chemical Formula: $C_{12}H_{16}O_7$
MW: 272.25

n° 189 – **Compound 10**

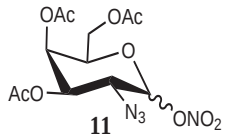
At -10°C, a solution of compound **9** (8.96 g, 0.022 mol) in AcOH (10 mL) was added dropwise to a solution of Zn (68.2 g, 1.040 mol) in AcOH/H_2O (240 mL, v/v = 1/1). The reaction was stirred between -10°C / 0°C for 1 hour. Then the reaction mixture was diluted in CH_2Cl_2 (300 mL) and the organic layer was washed with iced water (3×100 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (3×70 mL) and brine (1×70 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified by column chromatography on silica gel (600 mL ; CH_2Cl_2 / Ethyl acetate, v/v = 95/5) to

give sugar **10** as a white oil (m = 5.25 g, 88%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) : δ = 0.98, 2.04, 2.08 (3s, 9H, 3×OCOC$\underline{H}_3$) ; 4.14-4.31 (m, 3H, H-5, H-6) ; 4.69 (ddd, 1H, $^4J_{2,4}$ = 1.6, $^3J_{2,3}$ = 2.6, $^3J_{3,6}$ = 6.3, H-2) ; 5.39 (td, 1H, $^3J_{3,4}$ = $^3J_{4,5}$ = 4.6 , $^4J_{2,4}$ = 1.6, H-4) ; 5.50-5.53 (m, 1H, H-3) ; 6.42 (dd, 1H, $^4J_{1,3}$ = 1.8, $^3J_{1,2}$= 6.3, H-1).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) : δ = 20.9 (OCO$\underline{C}$H$_3$) ; 21.1 (OCO$\underline{C}$H$_3$) ; 21.1 (OCO$\underline{C}$H$_3$) ; 62.3 (C-6) ; 64.1, 64.3 (C-3, C-4) ; 73.2 (C-5) ; 99.2 (C-2) ; 145.8 (C-1) ; 170.4 ($\underline{C}$=O) ; 170.6 ($\underline{C}$=O) ; 170.9 ($\underline{C}$=O).

Compound 11 : Tri(*O*Ac)-GalN$_3$-ONO$_2$

Adapted from the procedure described by Lemieux and al. [365]



Chemical Formula: $C_{12}H_{16}N_4O_{10}$
MW: 376.28

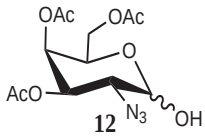
n° 190 – **Compound 11**

At -20°C, NaN_3 (9.75 g, 0.150 mol) and ammonium cerium(IV) nitrate (CAN : 82.26 g, 0.150 mol) were added carefully to a solution of D-Galactal (m = 5.25 g, 19.3 mmol) in acetonitrile (260 mL). The reaction was stirred between -15°C/-20°C during 2 h and stored overnight in the freezer. Then, diethyl ether (200 mL) was added and the organic layer was washed with iced water (3×100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified via column chromatography on silica gel (300 mL ; CH_2Cl_2 /ethyl acetate, v/v = 90/10) to give the compound **11** (5.27 g, 72%) as a oil.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz, 298 K) : δ = 1.97-2.17 (6s, 18H, 6×OCOC$\underline{H}_3$) ; 3.79 (dd, H-2$_\beta$) ; 4.03-4.16 (m, 6H, H-2$_\alpha$, H-5$_\beta$, H6$_{\alpha,\beta}$; 4.34 (t large, 1H, $^3J_{5\alpha,6\alpha}$= 7.2, H-5$_\alpha$) ; 4.94 (dd, 1H, $^3J_{2\beta,3\beta}$= 10.3, H-3$_\beta$) ; 5.22 (dd, 1H, $^3J_{2\alpha,3\alpha}$= 11.0, H-3$_\alpha$) ; 5.36 (d large, 1H, $^3J_{3\beta,4\beta}$= 3.4, H-4$_\beta$) ; 5.47 (dd, 1H, $^3J_{4\alpha,5\alpha}$= 1.4, $^3J_{3\alpha,4\alpha}$= 3.4, H-4$_\alpha$) ; 5.55 (d, 1H, $^3J_{1\beta,2\beta}$= 8.9, H-1$_\beta$) ; 6.31 (d, 1H, $^3J_{1\alpha,2\alpha}$ = 4.1, H-1$_\alpha$).

Compound 12 : Tri(*O*Ac)-Gal-N_3-OH

Adapted from the procedure described by Grundle and al. [366]



Chemical Formula: $C_{12}H_{17}N_3O_8$
MW: 331.28

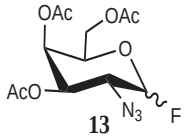
n° 191 – **Compound 12**

To a solution of compound **11** (5.27 g, 14.0 mmol) in dioxane/water (80 mL, v/v = 1/1), $NaNO_2$ (1.93 g, 28.0 mmol) was added and the reaction mixture was stirred between 70-75°C during 5 hours. Then $NaNO_2$ (0.290 mg, 4.20 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 70-75°C during 1h30. Dioxane was evaporated and ethyl acetate (300 mL) was added. After decantation, the organic layer was washed with water (1×70 mL) and brine (1×70 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography on silica gel (300 mL ; CH_2Cl_2-ethyl acetate, v/v = 10/1) to give the compound **12** (3.98 g, 85%) as a white solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) : δ = 2.05-2.08(6s, 6$OCOCH_3$) ; 3.04 (s, 1H, OH) ;

Compound 13 : Tri(*O*Ac)Gal-N_3-F

Adapted from the procedure described by Rosenbrook and al. [367] and by Posner and al. [368]



Chemical Formula: $C_{12}H_{16}FN_3O_7$
MW: 333.27

n° 192 – **Compound 13**

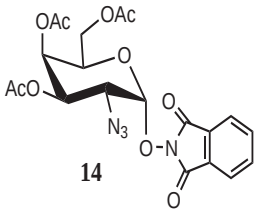
Compound **12** (3.98 g, 12.0 mmol) was dissolved in THF (107 mL) under argon. The solution was cooled at -30°C and diethylaminosulfur trifluoride (DAST : 2.5 mL, 0.018 mol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 2h30. After addition of MeOH (15 mL), the reaction mixture was concentrated and the resulting residue was dissolved in CH_2Cl_2 (300 mL). The organic layer was washed with a saturated $NaHCO_3$ solution(1×100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure The

crude product **13** was used without purification.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz, 298 K) : δ = 2.01-2.13 (6s, 6×OCOC$\underline{H_3}$) ; 3.68-3.78 (m, 1H, H-2$_\alpha$) ; 3.78 (ddd, $^3J_{1\beta,2\beta}$ = 7.5, $^3J_{2\beta,3\beta}$ = 10.9, $^3J_{2\beta,F}$ = 12.7, H-2$_\beta$) ; 3.96 (t large, $^3J_{5\beta,6\beta}$= 6.3, H-5$_\beta$) ; 4.06-4.17 (m, H-6$_{\alpha,\beta}$) ; 4.36 (td, $^3J_{4\alpha,5\alpha}$ = 1.2, $^3J_{5\alpha,6\alpha}$= 6.4, H-5$_\alpha$) ; 4.83 (ddd, $^3J_{3\beta,4\beta}$ = 3.3, $^4J_{4\beta,F}$ = 0.8, $^3J_{2\beta,3\beta}$ = 10.9, H-3$_\beta$) ; 5.09 (dd, $^3J_{1\beta,2\beta}$ = 7.5, $^2J_{1\beta,F}$ = 51.8, H-1$_\beta$) ; 5.32 (td, $^3J_{4\beta,5\beta}$ = 1.1, $^3J_{3\beta,4\beta}$ = 3.3, H-4$_\beta$) ; 5.34-5.36 (m, H-3$_\alpha$) ; 5.48 (dd, $^3J_{4\alpha,5\alpha}$ = 1.2, $^3J_{3\alpha,4\alpha}$ = 3.2, H-4$_\alpha$) ; 5.71 (dd, $^3J_{1\alpha,2\alpha}$ = 2.6, $^2J_{1\alpha,F}$ = 52.2, H-1$_\alpha$).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) : δ = 20.8 (OCO$\underline{C}$H$_3$) ; 20.9 (OCO$\underline{C}$H$_3$) ; 21.0 (OCO$\underline{C}$H$_3$) ; 57.8 (d, $J_{C-2\alpha,F}$= 24, C-2$_\alpha$) ; 61.2 (d, $J_{C-2\beta,F}$ = 22, C-2$_\beta$) ; 61.5 (C-6$_\beta$) ; 61.8 (C-6$_\alpha$) ; 66.3 (C-4$_\beta$) ; 67.2 (C-4$_\alpha$) ; 68.5 (C-3$_\alpha$) ; 69.5 (C-5$_\alpha$) ; 71.0 (d, $J_{C-3\beta,F}$= 11, C-3$_\beta$) ; 71.6 (C-5$_\beta$) ; 106.2 (d, $J_{C-1\alpha,F}$ = 224, C-1$_\alpha$) ; 108.3 (d, $J_{C-1\beta,F}$ = 217, C-1$_\beta$) ; 170.0 ($\underline{C}$=O) ; 169.6 ($\underline{C}$=O) ; 170.2 ($\underline{C}$=O) ; 170.3 ($\underline{C}$=O) ; 170.7 ($\underline{C}$=O).

Compound 14 : Tri(*O*Ac)Gal-N$_3$-α-OPht

Adapted from the procedure described by Renaudet and al. [210]



Chemical Formula: $C_{20}H_{20}N_4O_{10}$
MW: 476,39

n° 193 – **Compound 14**

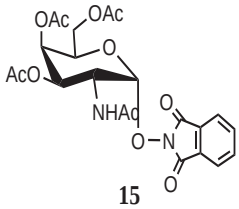
To a solution of *N*-hydroxyphtalimide (2.05 g, 12.0 mmol) in CH_2Cl_2 (180 mL), triethylamine (1.6 mL, 12.0 mmol), compound **13** (n = 12.0 mmol) and BF_3Et_2O (7.6 mL, 0.060 mol) were successively added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Then CH_2Cl_2 (100 mL) was added and the organic layer was washed by 10% aqueous citric acid (1×70 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (1×70 mL) and water (1×70 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified by column chromatography on silica gel (400 mL ; CH_2Cl_2 /ethyl acetate, v/v = 20/80) to give the compound **14** (α-anomer, 1.10 g, 19%) as a white solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) : δ = 2.02, 2.06, 2.14 (3s, 9H, 3×OCOC$\underline{H_3}$) ; 3.92-3.97 (m, 2H, H-2, H-6b) ; 4.23 (dd, 1H, ^3J = 6.4, 11.3, H-6a) ; 5.17 (br t, 1H, $^3J_{5-6}$ = 6.4, H-5) ; 5.47 (dd, 1H, ^3J = 3.6, 11.3 ,H-3) ; 5.57 (br d, 2H, ^3J = 3.6 , H-1, H-4) ; 7.55-7.75 (m, 4H, $\underline{\text{Har.}}$).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) : δ = 21.1 (OCO$\underline{C}$H$_3$) ; 57.0 (C-2), 61.6 (C-6), 67.7

(C-3), 68.2 (C-4), 69.2 (C-5), 103.5 (C-1), 124.2 (CHar.), 129.1 (Car.), 135.2 (CHar.), 163.3 (C=OPht), 169.9 (C=OAc), 170.3 (C=OAc), 170.8 (C=OAc).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{20}H_{19}N_4O_{10}Na$: $[M+Na^+]^+$ = 498.09 ; exp $[M+Na^+]^+$ = 497.96.

Compound 15 : Tri(*O*Ac)GalNAc-α-OPht

Adapted from the procedure described by Renaudet and al. [210]



Chemical Formula: $C_{22}H_{24}N_2O_{11}$
MW: 492.43

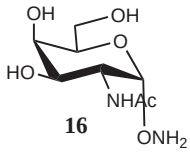
n° 194 – **Compound 15**

Compound **14** (1.10 g, 2.30 mmol) was dissolved in MeOH/Ac_2O (25 mL, v/v = 10/1,) and Pd/C (10%, 0.236 g) was added. The reaction was stirred at room temperature under an atmosphere of hydrogen during 30 min. The catalyst was removed by filtration under celite and washed with methanol. The ethyl acetate to give the compound **15** (0.735 g, 65%) as a white solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) : δ = 2.04, 2.09, 2.12, 2.18 (4s, 12H, 3×OCOCH_3, NHCOCH_3) ; 4.00 (dd, $^3J_{5-6}$ = 6.4, $^3J_{6a-6b}$ = 11.3, 1H, H-6b) ; 4.30 (dd, 1H, $^3J_{5-6}$ = 6.4, $^3J_{6a-6b}$ = 11.3, H-6a) ; 4.80 (ddd, 1H, $^3J_{2-NH}$= 9.6, $^3J_{1-2}$ = 3.4, $^3J_{2-3}$ = 11.3, H-2) ; 5.08 (t large, 1H, $^3J_{5-6}$ = 6.4, H-5) ; 5.34 (dd, 1H, $^3J_{3-4}$ = 3.0, $^3J_{2-3}$ = 11.3, H-3) ; 5.38 (d, 1H, $^3J_{1-2}$ = 3.4, H-1) ; 5.54 (d, 1H, $^3J_{3-4}$ = 3.0, H-4) ; 6.07 (d, 1H, $^3J_{2-NH}$= 9.6, NH) ; 7.86-7.77 (m, 4H, Har.).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) : δ = 21.1 (OCOCH_3) ; 47.7 (C-2), 61.9, 67.7, 69.5, 71.5 (C-3, C-4, C-5, C-6), 105.4 (C-1), 124.2 (CHar.), 129.1 (Car.), 135.2 (CHar.), 171.2 (C=O).

Compound 16 : GalNac-α-ONH$_2$

Adapted from the procedure described by Renaudet and al. [210]



Chemical Formula: $C_8H_{16}N_2O_6$
MW: 236.22

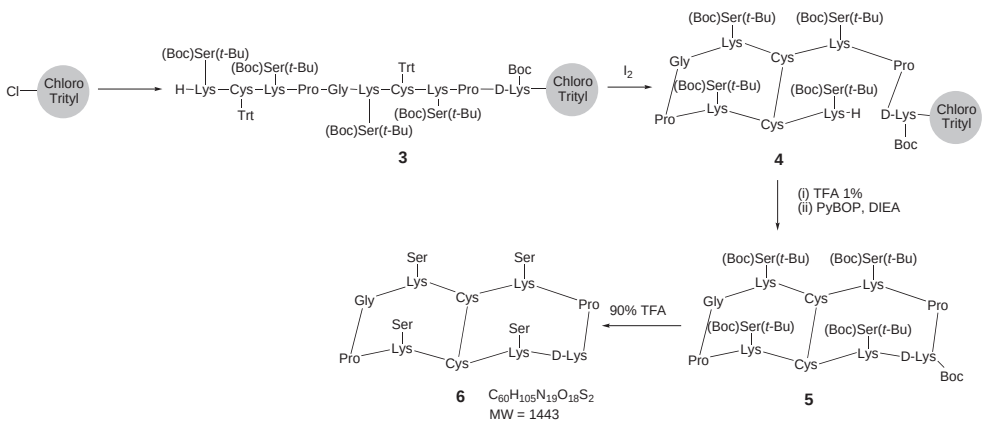
n° 195 – **Compound 16**

To a solution of compound **15** (0.735 g, 1.493 mmol) in ethanol (7 mL), methylhydrazine (3 mL, 0.057 mol) was added. The reaction was stirred at room temperature overnight. The mixture was evaporated and the compound was precipitated in CH_2Cl_2 (2-3 mL) and methanol (10-15 mL) to give the compound **16** (0.270 g, 76%) as a white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz, 298 K) : δ = 2.08 (s, 3H, NHCOC$\underline{H_3}$) ; 3.76-3.89 (m, 3H, H-3, H-6) ; 4.24 (dd, 1H, $^3J_{1,2}$= 4.1, $^3J_{2,NH}$ = 11.3, H-2) ; 3.99-4.03 (m, 2H, H-4, H-5) ; 4.99 (d, 1H, $^3J_{1,2}$= 4.1, H-1).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) : δ = 22.3 (HNCO$\underline{C}$H$_3$) ; 49.6 (C-2) ; 61.5 (C-6), 68.0 (C-3) ; 68.8, 71.4 (C-4, C-5) ; 101.0 (C-1) ; 175.0 (HN$\underline{C}$OCH$_3$).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_8H_{17}N_2O_6$: $[M+H^+]^+$ = 237.10 ; exp $[M+H^+]^+$ = 237.0.

22.4 Synthesis of peptide scafold

Peptide 6 :



n° 196 – Synthesis of peptide **6**

The linear precursor with protected side-chains **3** was assembled manually by solid-

phase peptide synthesis on 2-chlorotrityl chloride resin (substitution 0.4 mmol/g, 0.507 g, 0.202 mmol) using Fmoc chemistry [217]. The resin was swollen with CH_2Cl_2 (10 mL, 1×10 min) and DMF (10 mL, 1×10 min). Couplings were performed with N-α-Fmoc-protected amino acids or Fmoc-Lys[BocSer(tBu)]-OH (2.5 eq., 0.5 mmol), PyBOP (2.5 eq., 0.5 mmol) and DIEA (pH ≈ 8-9) in DMF (10 mL) for 30 min. After washing with DMF (10 mL, 4×1 min) and CH_2Cl_2 (10 mL, 2×1 min), the completeness of the coupling reaction was controlled by Kaiser or TNBS tests [369]. N-α-Fmoc protecting groups were removed by treatment with a DMF/piperidine solution (v/v = 4/1, 10 mL, 3× 0 min). After washing with DMF (10 mL, 6 × 1 min), the completeness of deprotection was verified by the UV absorption of piperidine washings at 299 nm. After the last coupling reaction, on-resin **3** was obtained (0.13 mmol, yield = 64 %).

The resin (0.13 mmol) was swollen with CH_2Cl_2 (10 mL, 1×10 min) and DMF (10 mL, 1×10 min). Iodine (0.660 g, 2.60 mmol) and DMF (10 mL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 1.5 hours. After filtration, the resin was washed with DMF (10 mL, 6×5 min), DMF / Water (v/v = 1/1, 10 mL, 2×5 min), DMF (10 mL, 1 × 5 min) and CH_2Cl_2 (10 mL, 3×5 min).

The peptide was then cleaved from the resin by treatment with CH_2Cl_2/TFA (v/v = 99/1, 10 mL, 10×2 min). The filtrate was recovered and DIEA (1 mL) was added to avoid deprotection during the evaporation. After concentration, the residue was precipitated in diethyl ether. The linear precursor was then reacted in DMF (≈ 0.5 mM) with PyBOP (0.074 g, 0.14 mmol) and DIEA (0.08 mL, 0.39 mmol) for 2 hours. DMF was evaporated under reduced pressure. The oily residue was precipitated with CH_2Cl_2/Et_2O to yield the cyclic peptide **5** as a powder.

Removal of side-chain protecting groups was performed in TFA/H_2O (v/v = 90/10, 20 mL). After stirring for 2 hours, the solution was evaporated to yield a yellow oil which was precipitated with Et_2O to obtain the deprotected peptide **6** as a white solid (0.097 g, 0.067 mmol, 33%).

Analytical HPLC Purity : 83%, Rt = 6.13 min (Linear gradient : 95/5 to 60/40 A/B in 15 min).

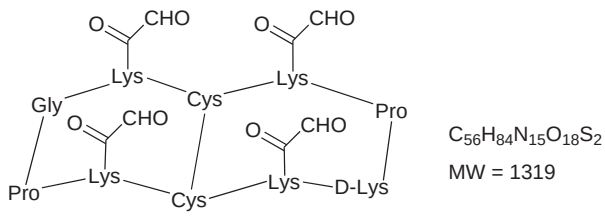
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{60}H_{105}N_{19}O_{18}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1444.74, exp : $[M+H^+]^+$ = 1444.58, $[M+2H^+]^{2+}$ = 722.92, $[M+3H^+]^{3+}$ = 482.33.

^{1}H NMR (H_2O/D_2O, v/v = 9/1, 500 MHz, 298 K) :

Residue	HN	Hα	Hβ	Others
Lys **1 3 6 8**	8.18	4.23	1.7	H(γ) : 1.40 ; H(δ) : 1.40 ; H(ϵ) : 3.1 ; NH(ς) : 8.30
	8.07	4.56	1.74	
	8.00	4.56	1.74	
	7.99	4.25	1.70	
Cys **2 7**	8.64	4.89	3.25 - 2.98	
	8.56	4.87	3.20 - 2.89	
Pro **4 9**	-	4.20	2.19 - 2.05	H(γ) : 1.90 - 1.80 ; H(δ) : 3.73-3.51
D-Lys **5**	8.53	4.24	1.91	H(γ) : 1.36 ; H(δ) : 1.60 ; H(ϵ) : 3.0
Gly **10**	8.54	4.12 - 3.64		
Ser (x 4)	-	3.98 - 3.89 - 3.81		

TABLE 56 – ^{1}H NMR, P^4

Peptide 7 :

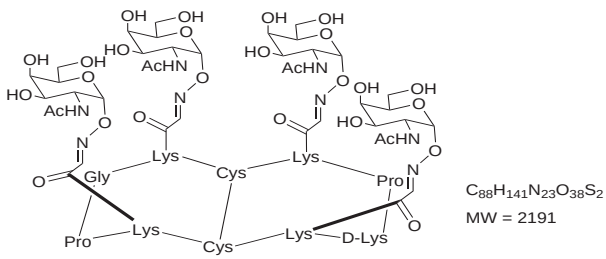


7

n° 197 – peptide **7**

To a solution of compound **6** (0.064 g, 0.044 mmol) in water (8 mL), sodium periodate (0.380 g, 1.77 mmol) was added. After stirring for 15 min, the reaction mixture was injected in RP-HPLC (Rt = 14 min, linear gradient : 95/5 to 60/40 A:B in 15 min), to yield **7** as a white powder (0.009 g, 0.0068 mmol, 15%) after lyophilization.
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{56}H_{85}N_{15}O_{18}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1320.57, exp : $[M+H^+]^+$ = 1320.5.

Vect1 :

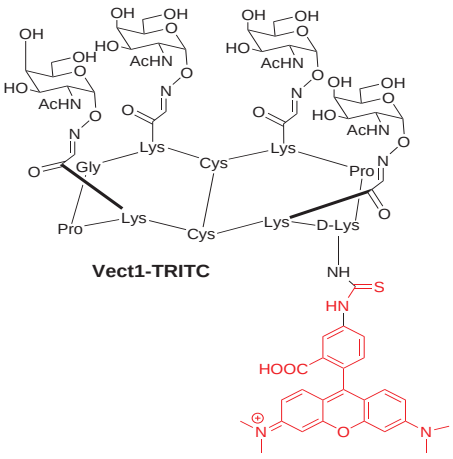


Vect1

n° 198 – **Vect1**

To a solution of compound **7** (0.025 g, 0.019 mmol) in AcOH/water (4 mL, v/v = 1/9), O-α-D-galactopyranosyl oxyamine **i** was added (0.045 g, 0.192 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature during 1 hour. Then, the mixture was injected in RP-HPLC (Rt = 14-16 min, linear gradient : 95/5 to 60/40 A:B in 15 min) to yield **Vect1** as a white powder (0.021 g, 0.0096 mmol, 50 %) after lyophilization.
Analytical HPLC Purity : 95%, Rt = 9.25 min (linear gradient : 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min).
ES-MS mass spectrometry, m/z : calculated for $C_{88}H_{141}N_{23}O_{38}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 2192.92, exp : $[M+H^+]^+$ = 2193.5.

Vect1-TRITC :



n° 199 – **Vect1-TRITC**

To a solution of compound **Vect1** (0.012 g, 0.0055 mmol) in DMF (2 mL), TRITC (0.003 g, 0.0067 mmol) was added with few drops of DIEA (pH ≈ 8-9). The reaction mixture was stirred at room temperature during 2 hours and injected in RP-HPLC (Rt = 19 min, linear gradient : 95/5 to 60/40 A:B in 15 min) to yield **Vect1-TRITC** as a white powder (0.0012 g, 0.00046 mmol, 8%) after lyophilization.
Analytical HPLC Purity : 90%, Rt = 14.4 min (linear gradient : 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min).
ES-MS mass spectrometry, m/z :calculated for $C_{113}H_{163}N_{26}O_{41}S_3^+$, $[M]^+$ = 2637.1, exp : $[M]^+$ = 2636.6, $[M^++H^+]^{2+}$ = 1318.9.

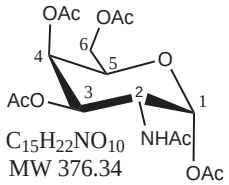
23 Vector 2 synthesis

23.1 General Details

Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Acros, Alfa Aesar. All water solutions were prepared from ultrapure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse-osmosis using Millipore MilliQ reverse-osmosis cartridge system (resistivity 18 M Ωcm). Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merck). Flash chromatography was performed on silica gel 60 (40-63 μm, Merck). Analytical and preparative HPLC was performed with a VWR system fitted with a purosphere RP18 column (L = 250 mm, ⊘= 4.6 mm and p = 5 μm for analytical column ; L = 250 mm, ⊘ = 50 mm and p = 10 μm for preparative column). Flow rates of 1 mL/min and 75 mL/min were used for analytical and preparative column respectively. Gradient elution conditions were as follows : from water/TFA (99.925/0.075 ; A) to CH_3CN/water /TFA (90/10/0.1 ; B).). ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Mercury Varian 400 spectrometer and on a Brucker 500 spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm with the solvent as the internal reference. Mass spectra were acquired with a Finigan LCQ-ion trap equipped with an electrospray source. Elemental analyses were performed by the Service Central d'Analyse (Solaize, France).

23.2 Sugar + spacer

Compound 19 : Tetra*O*Ac-GalNac

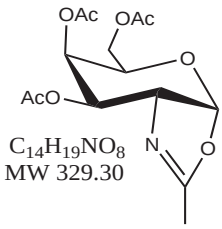


n° 200 – Product **19**

From the procedure described by Wu and al. [321] and Chaplin and al. [322]
N-acetyl-D-galactosamine (1.08 g, 4.87 mmol) was dissolved in acetic anhydride (4.1 mL) and anhydrous pyridine (6.3 mL). The reaction mixture was stirred overnight under argon. Then, acetic anhydride and pyridine were evaporated and the residue was dissolved in ethyl acetate (200 mL). The organic layer was washed with 10% citric acid aqueous solution (3×100 mL), saturated $NaHCO_3$ aqueous solution (1×100 mL) and water (1×100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product **1** (1.80 g, 95%) was used without purification.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.95 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.04 (s, 6H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 2.18 (s, 6H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 4.07, 4.12 (ABX, J_{BX} = 6.6 , J_{AX}= 6.9, J_{AB} = 11.2, 2H, H-6) ; 4.21-4.23 (m, 1H, H-5) ; 4.74 (ddd, J = 3.6, 9.2, 11.5, 1H, H-2) ; 5.23 (dd, J = 3.2, 11.5, 1H, H-3) ; 5.37 (d, J = 9.2, 1H, N$\underline{H}$) ; 5.43 (d, J = 2.1 ,1H, H-4) ; 6.22 (d, J = 3.6, 1H, H-1).
^{1}H NMR (Pyr d_6, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.88 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 1.92 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.04 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.06 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.10 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 4.35, 4.43 (ABX, J_{AX} = 6.5 , J_{BX} = 6.6, J_{AB} = 11.2, 2H, H-6) ; 4.66-4.68 (m, 1H, H-5) ; 5.38 (ddd, J = 3.4, 3.6, 8.6, 1H, H-2) ; 5.78 (dd, J = 3.2, 11.8, 1H, H-3) ; 5.94 (m, 1H, H-4) ; 6.09 (d, J = 3.5 ,1H, H-1) ; 9.26 (d, J = 8.5, 1H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, 298 K) : δ = 21.00 (2×$\underline{C}H_3$) ; 21.28 (2×$\underline{C}H_3$) ; 23.53 ($\underline{C}H_3$) ; 47.33 (C-2) ; 61.60 (C-6) ; 67.01 (C-4) ; 68.15 (C-3) ; 68.87 (C-5) ; 91.69 (C-1) ; 169.07 ($\underline{C}$O) ; 170.30 ($\underline{C}$O) ; 170.522 ($\underline{C}$O) ; 170.68 ($\underline{C}$O) ; 171.53 ($\underline{C}$O).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{16}H_{23}NO_{10}$: $[M+Na^+]^+$ = 412.3 ; exp $[M+Na^+]^+$ = 412.2.

Compound 20



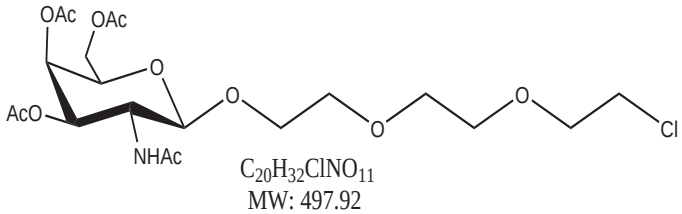
n° 201 – Compound **20**

Adapted from the procedure described by Wu and al. [321] and by Westerlind and al. [328]
To a solution of **19** (1.8 g, 4.63 mmol)in anhydrous DCM (21 mL), molecular sieves 4 Åand TMSOTf (2.85 mL, 15.74 mmol) were added at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred overnight at 50°C. Then at 0°C, Et_3N (1.2 mL, 16.33 mmol) was added. The reaction mixture was diluted with DCM (200 mL) and washed with $NaHCO_3$ saturated aqueous solution (1×100 mL) and water (1×100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product **20** (2.1 g, Qtt) was used without purification.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K) : δ = 2.06 (s, 3H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 2.07 (s, 6H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 2.12 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 3.98-4.02 (m, 1H, H-2) ; 4.11, 4.20 (ABX, J_{AX} = 5.8, J_{BX} = 7.0, J_{AB} = 11.2, 2H, H-6) ; 4.23-4.27 (m, 1H, H-5) ; 4.91 (dd, J = 3.3, 7.4, 1H, H-3) ; 5.46 (t, J = 3.0, 1H, H-4) ; 5.99 (d, J = 6.8, 1H, H-1).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, 298 K) : δ = 20.73- 21.01 (3×CO$\underline{C}H_3$and $\underline{C}H_3$) ; 61.73 (C-6) ; 63.73 (C-2) ; 65.46 (C-4) ; 69.70 (C-5) ; 72.00 (C-3) ; 101.68 (C-1) ; 169.87-170.32(N$\underline{C}$O

and 3×$\underline{C}$O).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{14}H_{19}NO_8$: $[M+H^+]^+$ = 330.3 ; exp $[M+H^+]^+$ = 330.2.

Compound 21

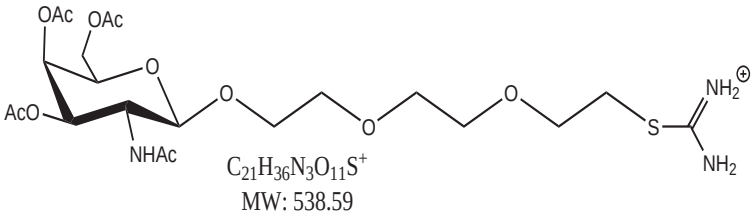


n° 202 – Compound **21**

Adapted from the procedure described by Wu and al. [321] and by Westerlind and al. [328]
To a solution of the crude product **20** (1.09 g, 3.08 mmol) in anhydrous DCM (17 mL), molecular sieves 4 Å and 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol (0.69 ml, 4.75 mmol) were added at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred during 30 minutes. Then, TMSOTf (0.310 ml, 1.713 mmol) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, at 0°C, Et_3N (0.310 mL, 2.224 mmol) was added. The mixture was filtered, diluted in DCM (150 mL) and the organic layer was washed with saturated $NaHCO_3$ aqueous solution (1×100 mL) and water (1×100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product **21** (1.55 g) was purification by column chromatography on silica gel (v = 150 mL, AcOEt/acetic acid/EtOH : 8/0.2/0.2) to give the product (0.890 g, 58%).

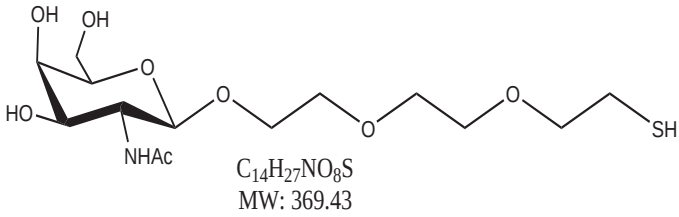
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.99 (s, 6H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 2.05 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.16 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 3.63-3.91 (m, 13H, C$\underline{H_2}$ and H-5) ; 4.12, 4.17 (ABX, J_{AX} = 6.5, J_{BX} = 6.9, J_{AB} = 11.2, 2H, H-6) ; 4.27 (ddd, J = 2.0, 9.1, 11.1, 1H, H-2) ; 4.80 (d, J = 8.6, 1H, N$\underline{H}$) ; 5.00 (dd, J = 3.4, 11.2, 1H, H-3), 5.32-5.33 (m, 1H, H-4) ; 6.22 (d, J = 9.4, 1H, H-1).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, 298 K) : δ = 21.02 (CO$\underline{C}H_3$) ; 23.70 (NH$\underline{C}H_3$) ; 43.28 ($\underline{C}H_2Cl$) ; 50.93 (C$\underline{H}$, C-2) ; 61.96 (C-6) ; 67.05 (C-4) ; 68.00 ($\underline{C}H_2$) ; 70.66, 70.97, 71.04, 71.69, 72.25 (4×$\underline{C}H_2$, C-3 and C-5) ; 102.80 (C-1) ; 170.76, 170.85, 170.91, 171.01 (4×$\underline{C}$O).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{20}H_{32}ClNO_{11}$: $[M+Na^+]^+$ = 520.2 ; exp $[M+Na^+]^+$ = 520.3

Synthesis of compound 24



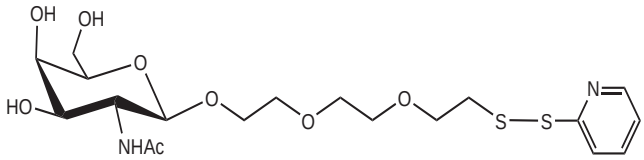
n° 203 – Compound **22**

Adapted from the procedure described by Woehrle and al. [341]
To a solution of **21** (0.413 g, 0.829 mmol) in water (6 mL), was added thiourea (0.139 g, 1.820 mmol). The reaction mixture was stirred 24h at reflux 110°C under argon.
^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz, 298 K, portion of reaction mixture) : δ = 2.00 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.02 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.10 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.23 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 3.37 (t, J = 4.9, 2H, C$\underline{H_2}$S) ; 3.72-4.25 (m, 15 H, H-2, H-4, H-5, H-6, 5×C$\underline{H_2}$) ; 5.11 (d, J = 2.7, J = 11.1, 1H, H-3) ; 5.41 (m, 1H, H-1).



n° 204 – Compound **23**

After dilution of the previous mixture (compound **22**) (0.829 mmol) in MeOH (14 mL), NaOH 1M was added until pH 9.6 under argon. To maintain a pH at 9.6 during the reaction, an electrode was used (reference : Ag/AgCl in KCL 3 mol.L^{-1}). The pH was controlled every hours and NaOH 1M was added if pH < 9.6. The reaction was stirred at room temperature for 9 hours. Then, the pH was adjusted at 7 by adding HCl 1M and the reaction mixture was concentrated. The crude product was used without further purification.
^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 2.04 (s, 3H, NHCOC$\underline{H_3}$) ; 2.62 (t, J = 7.0, 2H, C$\underline{H_2}$-SH) ; 3.52-3.93 (m, 15H, 5×C$\underline{H_2}$ and H-2, H-3, H-4, H-6) ; 3.96-4.00 (m, 1H, H-5) ; 4.44 (d, J = 8.5, 1H, H-1).



$C_{19}H_{30}N_2O_8S_2$
MW: 478.58

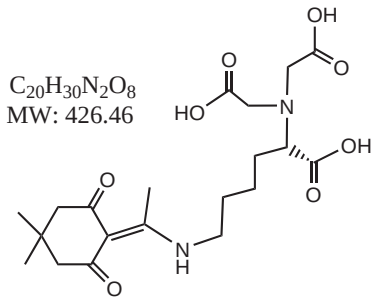
n° 205 – Compound **24**

Adapted from the procedure described by Jones and al. [337]
To a solution of product **23** (0.829 mmol) in anhydrous MeOH (22 mL), aldrithiol (0.552 g, 2.5 mmol) was added. The reaction was stirred 1 hour at room temperature under argon and was followed by analytical HPLC. Then, the reaction mixture was concentrated and purified on RP-HPLC (water-acetonitrile). The product **24** was obtained as a white solid (0.075 g, 19%). This product is sensitive to oxygen so it is used as soon as it is purified.

^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.92 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.97 (t, J = 6.1, 2H, C$\underline{H_2}$SS) ; 3.40-3.83 (m, 14H, 5×OC$\underline{H_2}$, 2×H-6, 2×C$\underline{H}$HO) ; 3.83-3.93 (m, 2H, H-2, C$\underline{H}$OH) ; 4.39 (d, J = 8.5, 1H, H-1) ; 7.17 (dd, J = 4.7 and 8.4, 1H, H_{pyr}) ; 7.78 (td, J = 1.4 and 8.4, 1H, H_{pyr}) ; 7.87 (d, J = 8.4, 1H, H_{pyr}) ; 8.33 (d, J = 4.7, 1H, H_{pyr}).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 24.43 ($\underline{C}H_3$) ; 41.20 ($\underline{C}H_2$S-S) ; 55.68 (C-2) ; 63.88, 71.02, 71.11, 72.78, 72.97, 74.94, 78.12 (5×O$\underline{C}H_2$, C-3, C-4, C-5, C-6) ; 104.50 ($\underline{C}$H, C-1) ; 122.56, 123.59, 123.74, 140.83 (4×$\underline{C}$Hpyr) ; 163.10 ($\underline{C}$pyr) ; 175.49 ($\underline{C}$ONH).
Analytical HPLC Purity : 99%, Rt = 18.4 min (gradient : 100% water during 6 min and from 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50-50).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{19}H_{30}N_2O_8S_2$: $[M+H^+]^+$ = 479.1 ; exp $[M+H^+]^+$ = 479.3.

23.3 Tripodal part

Compound 27 : NTA(Lys(Dde))



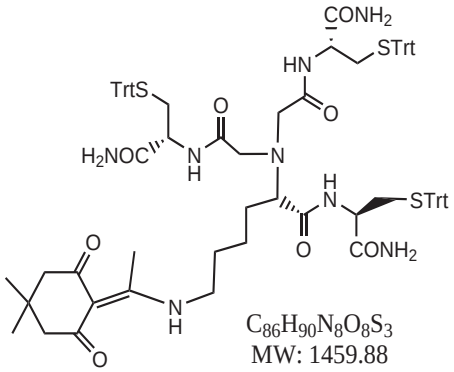
$C_{20}H_{30}N_2O_8$
MW: 426.46

n° 206 – Compound 27

Adapted from the procedure described by Nash and al. [348]
N_α,N_α-Bis(Carboxymethyl)-L-Lysine Hydrate (0.100 g, 0.383 mmol) and 2-acetyldimedone (0.077 g, 0.420 mmol) were dissolved in DMF (8 mL). The mixture was refluxed and *N,N*-diisopropylethylamine (0.073 mL, 0.419 mmol) was added slowly. After stirring for 38 hours under argon (reflux), DMF was evaporated and the resulting product was dissolved in saturated $NaHCO_3$ aqueous solution and extracted with ethyl acetate (8×50 mL). Then the aqueous layer was acidified by adding 5% $KHSO_4$ aqueous solution until pH 1.5. The aqueous layer was extracted by ethyl acetate. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.126 g, 76%) was used without further purification.

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.01 (s, 6H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 1.57-1.70 (m, 2H, C$\underline{H_2}$) ; 1.74-1.79 (m, 2H, C$\underline{H_2}$) ; 1.89-2.02 (m, 2H, C$\underline{H_2}$) ; 2.42 (s, 4H, C$\underline{H_2}$) ; 2.49 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 3.56 (t, J = 6.8, 2H, C$\underline{H_2}$) ; 3.99 (m, 5H, C$\underline{H}$ and 2×C$\underline{H_2}$CO).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 20.59 ($\underline{C}H_3$(Dde)) ; 29.27 ($\underline{C}H_2$(Lys)) ; 29.68 (2×$\underline{C}H_3$(Dde)) ; 30.49 ($\underline{C}H_2$(Lys)) ; 32.38 ($\underline{C}H_2$(Lys)) ; 45.84 ($\underline{C}H_2$(Lys)) ; 54.21 (2×$\underline{C}H_2$(Dde)) ; 57.67 (CH_α and 2×CH_2CO) ; 70.63, 109.80 (2×$\underline{C}$quat$_{Dde}$) ; 172.85, 177.71 (3×$\underline{C}$O) ; 203.73 (2×CO (Dde)).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{20}H_{30}N_2O_8$: $[M\text{-}H^+]^-$ = 425.2 ; exp $[M\text{-}H^+]^-$ = 425.8.

Compound 28 : NTA[Lys(Dde)(Cys(Trt)NH$_2$)$_3$]



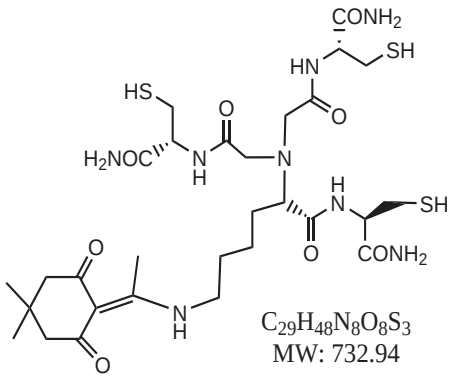
n° 207 – Compound 28

To a solution of **27** (0.099 g, 0.232 mmol) in anhydrous DMF (7 mL), Cys(Trt)NH_2 (0.258 g, 0.711 mmol) was added. The solution was cooled to 0°C and then EDC (0.136 g, 0.710 mmol) and HOBt (0.096 g, 0.710 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 24 hours under argon. Then, DMF was evaporated and H_2O (10 mL) was added. After stirring for 1 hour, the suspension mixture was filtrated and the obtained solid was dissolved in dichloromethane (50 mL). The organic layer was

washed with water (3×25 mL), brine (1×25 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.353 g, Qtt) was used without further purification.

^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.02 (s, 6H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 1.25-1.63 (m, 6 H, 3×C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 2.34 (s, 4H, 2×C$\underline{H_{2Dde}}$) ; 2.46 (s, 3H, C$\underline{H_3}$) ; 2.49 and 2.80 (ABX, J_{AX} = 5.0, J_{BX} =5.2, J_{AB} = 13.6, 4H, 2×C$\underline{H_2}$-S) ; 2.58 and 2.73 (ABX, J_{AX} = 4.4, J_{BX} = 5.4, J_{AB} = 13.6, 2H, C$\underline{H_2}$-S) ; 3.15 (AB, J_{AB} = 15.6, 4H, 2×C$\underline{H_2}$CO) ; 3.23-3.26 (m, 3H, NC$\underline{H}$CO, C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 3.69-3.73 (m, 1H, C$\underline{H_\alpha}$) ; 3.81-386 (m, 2H, 2×C$\underline{H_\alpha}$) ; 5.52 (s, 2H, CON$\underline{H_2}$) ; 5.67 (s, 2H, CON$\underline{H_2}$) ; 5.74 (s, 2H, CON$\underline{H_2}$) ; 7.18-7.39 (m, 47H, $\underline{H}$aro, 2×NH) ; 7.45 (d, J = 7.6, 1H, N$\underline{H}$) ; 7.65 (d, J = 8.0, 1H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 18.34 ($\underline{C}H_3$(Dde)) ; 23.99 ($\underline{C}H_2$(Lys)) ; 28.67, 28.96 (2×$\underline{C}H_3$(Dde)) ; 30.47 (2×$\underline{C}H_2$(Lys)) ; 33.35, 33.66 (3×$\underline{C}H_2$S) ; 43.51 ($\underline{C}H_2$(Lys)) ; 52.91, 53.07 ($\underline{C}H_2$(Dde)) ; 55.92 (2×$\underline{C}H_2$CO) ; 64.92 ($\underline{C}$HCO) ; 66.21 ($\underline{C}H_\alpha$) ; 67.80 (2×$\underline{C}H_\alpha$) ; 108.26 ($\underline{C}_{Dde}$) ; 127.32, 128.46, 129.99 (3×C[($\underline{C}_6H_5)_3$]) ; 144.68 (3×$\underline{C}(C_6H_5)_3$) ; 171.43, 172.27, 172.57, 172.83, 173.88 (3×$\underline{C}$O, 3×$\underline{C}$ONH$_2$).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{86}H_{90}N_8O_8S_3$: $[M+Na^+]^+$ = 1481.6 ; exp $[M+Na^+]^+$ = 1481.3.

Compound A_1, (NTA[Lys(Dde)(Cys(NH$_2$))$_3$])



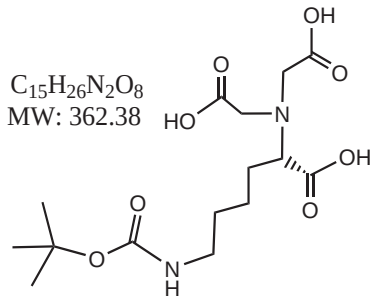
n° 208 – Compound $\mathbf{A_1}$

To a solution of crude product **28** (0.283 g, 0.194 mmol) in anhydrous DCM (9 mL), TFA (0.72 mL, 9.70mmol) and Et_3SiH (0.2 mL, 1.25 mmol) were added. The reaction mixture was stirred during 1 hour. Then, DCM was evaporated. The resulting crude (0.360 g) was purified on RP-HPLC (H_2O/TFA (A), AcN/TFA/H_2O(B)) to give the product $\mathbf{A_1}$ (0.084 g, 59%) as white solid .

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.02 (s, 6H, 2×C$\underline{H_3}$(Dde)) ; 1.41-1.55 (m, 2H, C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 1.71-1.82 (m, 4H, 2×C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 2.41 (s, 4 H, 2×C$\underline{H_2}$(Dde)) ; 2.48 (s, 3H,

$C\underline{H_3}$(Dde)) ; 2.85-2.91 and 2.98-3.02 (m, 4H, 2×$C\underline{H_2}S$) ; 2.95 (AB, J_{AB} = 7.3, 2H, $C\underline{H_2}S$) ; 3.50-3.54 (m, 3H, NC$\underline{H}$CO and $C\underline{H_2}$(Lys)) ; 5.50 (AB, J_{AB} = 17.1, 4 H, 2×$C\underline{H_2}CO$) ; 4.49 (dd, J = 5.2, J = 7.9, 1H, $C\underline{H_\alpha}$) ; 4.54 (dd, J = 4.9, J = 7.2, 2H, 2×$C\underline{H_\alpha}$).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 21.73 ($\underline{C}H_3$(Dde)) ; 24.04, 24.26 (3×$\underline{C}H_2$(Lys)) ; 25.72 (2×$\underline{C}H_3$(Dde)) ; 27.45 ($\underline{C}H_2S$) ; 28.38 (2×$\underline{C}H_2S$) ; 41.96 ($\underline{C}H_2$(Lys)) ; 50.26 (2×$\underline{C}H_2$(Dde)) ; 53.79, 54.03 (2×$\underline{C}H_2CO$, $\underline{C}HCO$) ; 64.00, 65.75 (3×$\underline{C}H_\alpha$) ; 107.03 ($\underline{C}_{Dde}$) ; 172.36, 172.51, 172.78, 172.88, 173.35, 173.64 (3×$\underline{C}ONH_2$, 3×$\underline{C}O$) ; 199.66 (2×$\underline{C}O$).
Analytical HPLC Purity : 93%, Rt = 16.8 min (linear gradient : From 100% A to 50/50 A/B in 16 min and 10 min at 50/50).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{29}H_{48}N_8O_8S_3$: $[M+H^+]^+$ = 733.3, $[M+Na^+]^+$ = 755.3 ; exp $[M+H^+]^+$ = 733.3, $[M+Na^+]^+$ = 755.5.

Compound 29 : NTA[Lys(Boc)]



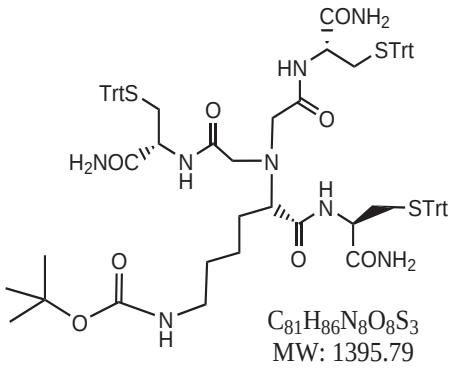
n° 209 – Compound 29

N_α,N_α-Bis(Carboxymethyl)-L-Lysine Hydrate (0.100 g, 0.383 mmol) was dissolved in acetonitrile/water (3 mL, v/v = 1/1). Then at 0°C, Di-tert-butyl dicarbonate (0.251 g, 1.15 mmol) and $NaHCO_3$ (0.165 μ, 1.96 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature during 24 hours. After evaporation of the solvents, the resulting product was dissolved in water (15 mL) and extracted with ethyl ether (6×10 mL) and ethyl acetate (6×10 mL). Then the aqueous layer was acidified by 5% $KHSO_4$ aqueous solution until pH 2.0. The aqueous layer was extracted by ethyl acetate (6×10 mL) and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.157 g, 64%) was used without further purification.

^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz, 298 K) : δ = 1.44 (s, 9H, 3×$C\underline{H_3}$) ; 1.47-1.58 (m, 4H, 2×$C\underline{H_2}$(Lys)) ; 1.83-2.02 (m, 2H, $C\underline{H_2}$(Lys)) ; 3.11 (t, J = 6.0, 2H, $C\underline{H_2}$(Lys)) ; 3.97-4.01 (m, 3H, C$\underline{H}$CO, 2×$C\underline{H_2}COOH$).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 25.88 (3×$\underline{C}H_3$(Boc)) ; 29.40, 30.61, 32.50 (3×$\underline{C}H_2$(Lys)) ; 41.88 (NH$\underline{C}H_2$) ; 57.86 (2×$\underline{C}(CH_3)_3$) ; 58.23 ($\underline{C}H_2COOH$) ; 70.77 ($\underline{C}HCOOH$) ; 173.07, 174.98 ($\underline{C}O$).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{15}H_{26}N_2O_8$: $[M-H^+]^-$ = 361.2 ; exp $[M-H^+]^-$

= 361.3.

Compound 30 : NTA[Lys(Boc)(Cys(Trt)NH$_2$)$_3$]

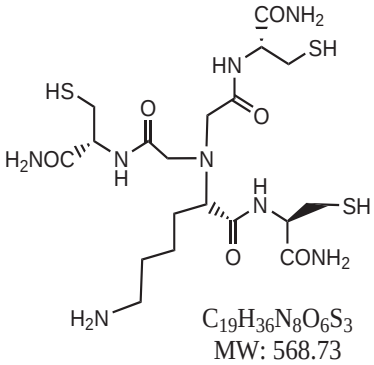


n° 210 – Compound 30

To a solution of **29** (0.157 g, 0.433 mmol) in anhydrous DMF (12 mL), Cys(Trt)NH$_2$ (0.485 g, 1.338 mmol) was added. The solution was cooled to 0°C and then EDC (0.254 g, 1.64 mmol) and HOBt (0.180 g, 1.33 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under argon. Then, DMF was evaporated and H_2O (10 mL) was added. After stirring for 1 hour, the suspension mixture was filtrated and the obtained solid was dissolved in dichloromethane (50 mL). The organic layer was washed with water (3×25 mL), brine (1×25 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product (0.584 g, 96%) was used without further purification.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.22-1.36 (m, 6H, 3×C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 1.43 (s, 9 H, 3×C$\underline{H_3}$(Boc)) ; 2.33-3.06 (m, 9 H, C$\underline{H}$CO, C$\underline{H_2}$(Lys), 3×C$\underline{H_2}$S) ; 3.02-3.22 (m, 4H, 2×C$\underline{H_2}$CO) ; 5.15 (s, 2H, N$\underline{H_2}$) ; 5.39 (s, 2H, N$\underline{H_2}$) ; 5.66(s, 2H, N$\underline{H_2}$) ; 7.19-7.41(m, 46H, $\underline{H_{Trt}}$, N$\underline{H}$) ; 7.63 (d, J = 8.4, 1H, N$\underline{H}$) ; 8.00 (m, 1H, N$\underline{H}$).
^{13}C NMR (CD_3CN, 100 MHz, 298 K) : δ = 24.14, 24.44 (3×$\underline{C}$H$_3$(Boc)) ; 28.57 (3×$\underline{C}$H$_2$(Lys)) ; 34.22 (3×$\underline{C}$H$_2$S) ; 52.96 ($\underline{C}$H$_2$(Lys)) ; 53.16 (2×$\underline{C}$H$_2$CO) ; 56.59 (C$\underline{C}$HCO) ; 67.47 (3×$\underline{C}$H$_\alpha$) ; 127.85, 129.05, 130.41 (3×C($\underline{C}_6$H$_5$)) ; 145.54 (3×$\underline{C}$(C$_6$H$_5$)) ; 172.20, 172.74, 173.03 (7×CO).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{81}H_{86}N_8O_8S_3$: [M-H$^+$]$^-$ = 1393.6 ; exp [M-H$^+$]$^-$ = 1393.2.

Compound A_2 : (NTA[Lys(Cys(NH_2))$_3$])



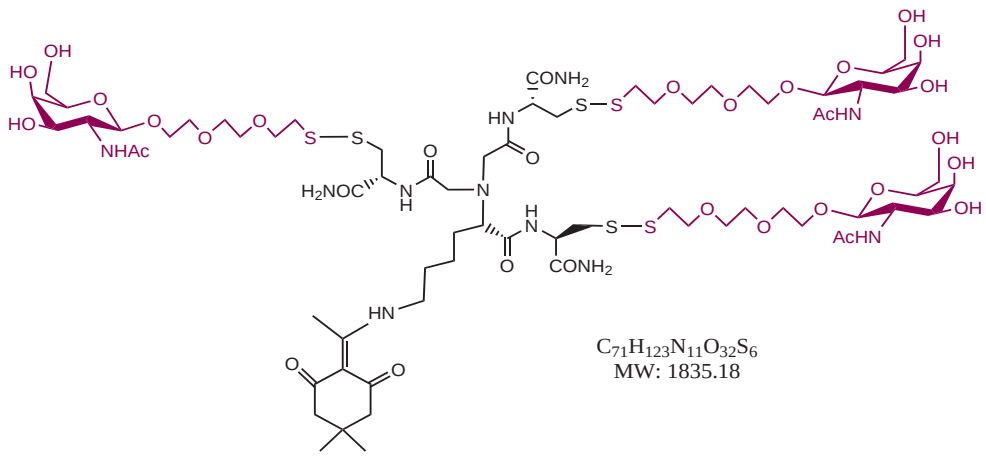
n° 211 – Compound $\mathbf{A}_2$

To a solution of crude product **30** (0.577 g, 0.414 mmol) in anhydrous DCM (3.5 mL), TFA (3.1 mL, 41.4 mmol) and Et_3SiH (0.412 mL, 2.53 mmol) were added. The reaction mixture was stired during one hour. After evaporation, the resulting crude was purified on RP-HPLC (A:H_2O/TFA, B:AcN/TFA/H_2O) to give the product $\mathbf{A}_2$ (0.171 g, 72%) as white solid.

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.31-1.50 (m, 2H, C$\underline{H_2}$(lys)) ; 1.64-1.77 (m, 4H, 2×C$\underline{H_2}$(lys)) ; 2.83-3.99 (m, 8H, 3×C$\underline{H_2}\beta$ and C$\underline{H_2}$N) ; 3.53 (dd, J = 6.8 and 8.1, 1H, C$\underline{H}$CO) ; 3.53 and 3.66 (AB, J_{AB} = 17.2, 4H, 2×C$\underline{H_2}$CO) ; 4.47 (dd, JJ = 5.3 and 8.1, 1H, C$\underline{H_\alpha}$) ; 4.51 (dd, J = 5.0 and 7.2, 2H, 2×C$\underline{H_\alpha}$).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 25.67($\underline{C}H_2$) ; 28.27 ($\underline{C}H_2\beta$) ; 28.51 (2×$\underline{C}H_2\beta$) ; 29.56($\underline{C}H_2$) ; 31.52 ($\underline{C}H_2$) ; 42.19 ($\underline{C}H_2$N) ; 58.06 (2×$\underline{C}H_2$CO) ; 58.29(2×$\underline{C}H_\alpha$) ; 58.39 ($\underline{C}H_\alpha$) ; 68.06 ($\underline{C}$HCO) ; 176.84, 177.21, 177.64 ($\underline{C}$O).
Analytical HPLC Purity : 96%, Rt = 10.1 min (linear gradient : from 100% A to 50/50 A/B in 14 min and 10 min at 50/50).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{19}H_{36}N_8O_6S_3$: $[M+H^+]^+$ = 569.2 ; exp $[M+H^+]^+$ = 569.3.

23.4 Coupling reaction

Product B_1

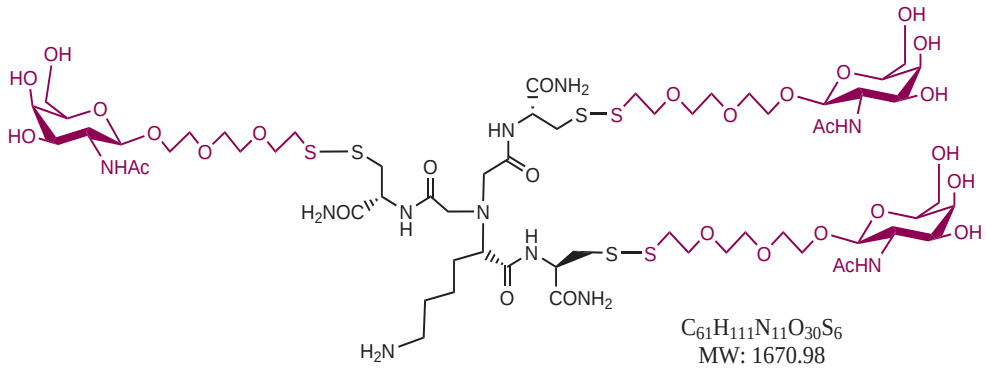


n° 212 – Product $\mathbf{B_1}$

To a solution of product $\mathbf{A_1}$ (0.033 g, 0.045 mmol) in DMF (5 mL), was added dropwise a solution of compound **24** (0.073 g, 0.153 mmol) in DMF (8 mL). The reaction mixture was stirred for 3 hours. After evaporation, the crude residue was purified on RP-HPLC (H_2O/acetonitrile) to give the product (m = 0.028 g, 34%) as a white solid.

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.01 (s, 6 H, 2×C$\underline{H_3}$) ; 1.4-1.5 (m, 2H, C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 1.71-1.77 (m, 4 H, 2×C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 2.04 (s, 9H, 3×NHCOC$\underline{H_3}$) ; 2.40-2.50 (m, 5H, 2×CH_2CO, CHCO) ; 2.41 (s, 4H, 2×C$\underline{H_2}$(Dde)) ; 2.48 (s, 3H, C$\underline{H_3}$(Dde)) ; 2.95 (t, J = 6.0, 6H, 3×C$\underline{H_2}$SS) ; 2.99-3.00 (m, 4 H, 2×C$\underline{H_2}$SS) ; 3.23-3.29 (m, 2H, C$\underline{H_2}$SS) ; 3.50-3.56 (m, 2H, C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 3.66-3.70 (m, 24 H, C$\underline{H_2}$) ; 3.72-3.84 (m, 15H, C$\underline{H_2}$, 6×H-6, 3×H-3) ; 3.90 (dd, J = 8.6, 3H, 3×H-2) ; 3.92-3.93 (m, 3H, 3×H-4) ; 3.99-4.03 (m, 3H, 3×H-5) ; 4.50 (d, J = 8.5, 2H, 2×H-1) ; 4.49 (d, J = 8.5, 1H, H-1) ; 4.67-4.75 (m, 3H, C$\underline{H_\alpha}$).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 24.04 (3×NHCO$\underline{C}H_3$) ; 40.14 (3×$\underline{C}H_2$S-S) ; 54.20-81.25 (2×$\underline{C}H_2$CO, 4×$\underline{C}H_2$(Lys), 3×C-6, 3×C-5, 3×C-2, 3×C-3, 3×C-4, 15×$\underline{C}H_2$, $\underline{C}$HCO, 2×$\underline{C}H_2$S, 2×$\underline{C}H_2$(Dde)) ; 103.90 (3×C-1) ; 174.00-175.33 ($\underline{C}OCH_2$, $\underline{C}$ONH).
Analytical HPLC Purity : 64%, Rt = 14.8 min (linear gradient : from 100% water to 50/50 H_2O/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50/50).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{71}H_{123}N_{11}O_{32}S_6$: $[M+Na^+]^+$ = 1858.2 ; exp $[M+Na^+]^+$ = 1857.8.

Compound B_2

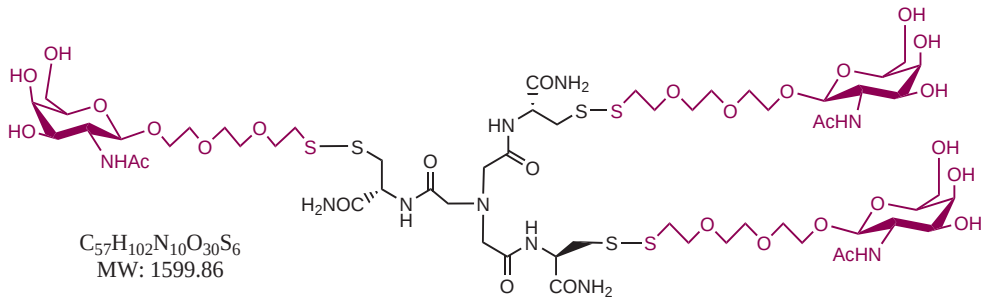


n° 213 – Compound $\mathbf{B_2}$

To a solution of product $\mathbf{A_2}$ (21.8 mg, 0.038 mmol) in DMF (5 mL), was added dropwise a solution of product **24** (62.3 mg, 0.13 mmol) in DMF (6 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours. After concentrated, the crude residue was purified on RP-HPLC (H_2O/acetonitrile) to give the product (m = 0.0128 g, 20%) as a white solid.

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 1.32-1.47 (m, 2H, C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 1.57-1.76 (m, 4H, 2×C$\underline{H_2}$(Lys)) ; 1.97 (s, 9H, 3×NHCOC$\underline{H_3}$) ; 2.80-3.00 (m, 8H, 3×C$\underline{H_2}$SS and C$\underline{H_2}$N) ; 3.10-3.25 (m, 3H, C$\underline{H_2}\beta$) ; 3.37-3.50 (m, 3H, C$\underline{H_2}\beta$) ; 3.54-3.79 (m, 44H, 15×C$\underline{H_2}$O, 6×H-6, 3×H-3, 2×C$\underline{H_2}$CO and C$\underline{H}$CO) ; 3.79-3.87 (m, 6H, H-4, H-2) ; 3.90-3.97 (m, 3H, H-5) ; 4.43 (d, J = 8.6, 3H, H-1) ; 4.59-4.79 (m, 3H, CH_α).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 25.31 ($\underline{C}H_3$, $\underline{C}H_2$(lys)) ; 30.48 (3×$\underline{C}H_2$) ; 40.20 (3×$\underline{C}H_2$SS) ; 42.26 ($\underline{C}H_2$N) ; 42.48 ($\underline{C}H_2\beta$) ; 55.43 ($\underline{C}H_\alpha$, C-2) ; 64.01 ($\underline{C}H_2$CO) ; 67.31 ($\underline{C}$HCO) ; 70.80, 71.52,71.95, 72.74, 74.17, 78.09 (C-3, C-4, C-5, C-6, O$\underline{C}H_2$) ; 104.46 (C1) ; 178 ($\underline{C}$O).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{61}H_{111}N_{11}O_{30}S_6$: $[M+H^+]^+$ = 1670.6 ; exp $[M+H^+]^+$ = 1670.5.

Vect2

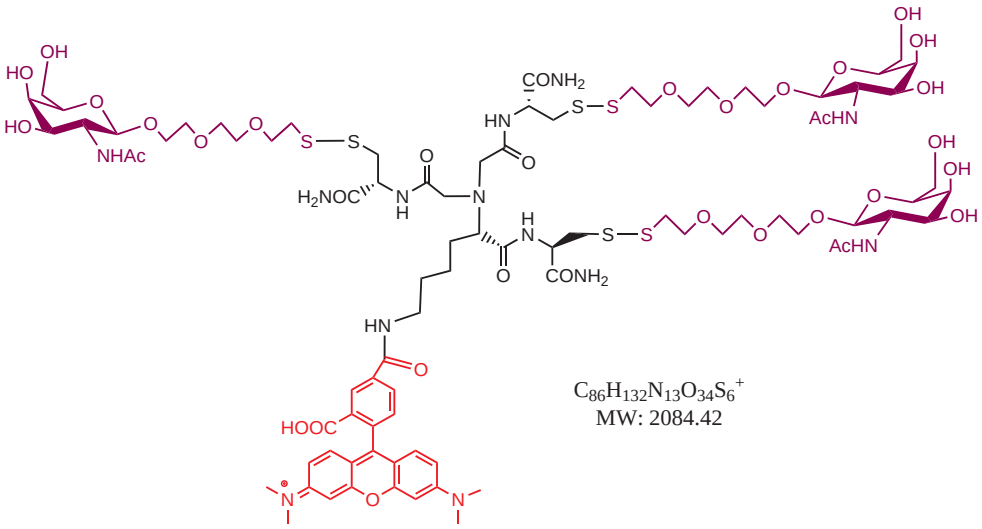


n° 214 – Vect2

To a solution of NTA(Cys(NH_2))$_3$ (13.7 mg, 0.027 mmol) in DMF (5 mL) was added a solution of product **24** (45 mg, 0.094 mmol) in DMF (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 hours. After concentrated, the crude residue was purified on RP-HPLC (H_2O/Acetonitrile) to give the product as a white solid (m = 0.0157 g, 35%).

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz, 298 K) : δ = 2.03 (s, 9H, 3×NHCOC$\underline{H_3}$), 2.94 (t, J = 6.2, 6H, 3×C$\underline{H_2}$SS) ; 3.01 and 3.28 (ABX, J_{AX} = 4.5, J_{BX} = 9.5, J_{AB} = 14.0, 6H, 3×C$\underline{H_2}\beta$) ; 3.54 (s, 6H, 3×C$\underline{H_2}$CO) ; 3.62-3.85 (m, 39H, 15×OC$\underline{H_2}$ and 3×H-3, 3×H-6) ; 3.88 (m, 3H, 3×H-2) ; 3.90 (m, 3H, 3×H-4) ; 3.96-4.03 (m, 3H, 3×H-5) ; 4.49 (d, J = 8.4, 3H, H-1) ; 4.72(dd, J = 4 and 9.7, 3H, C$\underline{H_\alpha}$).
^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz, 298 K) : δ = 24.97 (3×NHO$\underline{C}H_3$) ; 39.92 (3×$\underline{C}H_2$S-S) ; 41.74 ($\underline{C}H_2\beta$) ; 55.14 (C-2 and $\underline{C}H_\alpha$) ; 63.70 ($\underline{C}H_2$CO) ;70.56 (C4) ; 71.10, 71.58, 72.13, 72.21, 72.38, 72.48, 73.86, 77.86 (C-3, C-5, C-6, O$\underline{C}H_2$) ; 104.26 (C-1) ; 177.45, 178.38, 178.57($\underline{C}$O).
Analytical HPLC Purity : 96%, Rt = 11.5 min (linear gradient : from 100% water to 50/50 H_2O/acetonitrile in 16 min and 5 min at 50/50).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{57}H_{102}N_{10}O_{30}S_6$: $[M+Na^+]^+$ = 1621.5 ; exp $[M+Na^+]^+$ = 1621.8.

Vect2-TAMARA



n° 215 – Vect2-TAMARA

To a solution of product $\mathbf{B_2}$ (11.4 mg, 0.0068 mmol) in DMF (0.8 mL), a solution of TAMRA (8.1 mg, 0.0154 mmol) in DMF (0.7 mL) and DIPEA (0.002 mL, 0.0111 mmol) were succesively added. The reaction mixture was stirred for 4 hours. After concentrated, the crude residue was purified on RP-HPLC (H_2O/acetonitrile) to give the product (m = 0.0023 g, 16%) as a pink solid .

Analytical HPLC Purity : 80%, Rt = 12.4 min (linear gradient : From 100% water to 50/50 H_2O/acetonitrile in 16 min and to stay 5 min at 50/50).
ES-MS spectroscopy m/z : calculated for $C_{86}H_{133}N_{13}O_{34}S_6^+$: $[M+H^++Na^+]^{2+}$ = 1053.8 ; exp $[M+H^++Na^+]^{2+}$ = 1053.6.

24 Physicochemical characterization methods

UV Titrations, Potentiometry, pH titration of HgL were performed in a glove box.

24.1 Solutions

24.1.1 Metallic cation solutions

(1)-Copper solutions :
Cu(I) solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ in deoxygenated acetonitrile. The final concentration ($\approx$ 3 mM) was determined by adding an excess of sodium bathocuproine disulfonate (Na_2BCS). The absorbance of a 3 mL solution containing 2.10^{-4} M Na_2BCS in phosphate buffer 20 mM, pH 7.4 is measured at 483 nm : A^0. Aliquot of Cu(I) ($\approx$ 25 μL (or x)) is added and the absorbance is measured at 483 nm : A^1. The Cu concentration can then be calculated, knowing the extinction cœfficient of $Cu(BCS)_2^{3-}$, ϵ = 13 300 $M^{-1}cm^{-1}$ at 483 nm, according to equation 32.

$$[Cu] = \frac{(3+x)}{x} \times \frac{(A^1 - A^0 \times 3)/(3+x)}{13300 \times l} \tag{32}$$

x(mL)
[Cu] ($molL^{-1}$)
l = path (cm)

(2)-Divalent cation solutions :
Zn(II), Cd(II), Hg(II) solutions ($\approx$ 3 mM) were prepared by dissolving the appropriate salt $ZnCl_2$, $HgCl_2$, $CdCl_2$ in deoxygenated water. Pb(II) solutions ($\approx$ 3 mM) were similarly prepared in Bis-Tris buffer 20 mM, pH 7. These solutions were titrated by a 5 mM $EDTAH_2Na_2$ solution in presence of a colorimetric indicator according to equation 33 :

$$M^{2+} + EDTAH_2Na_2 = [EDTAM]^{2-} + 2Na^+ + 2H^+ \tag{33}$$

24.1.2 Ligand solutions

Since the cysteine residues in the chelator are susceptible to air oxidation, all the solutions were prepared in a glove box under argon atmophere. Fresh solutions of the ligand

were prepared before each experiment, using deoxygenated Milli-QR water (Millipore, resistivity 18 MΩ.cm) containing 20 mM of the appropriate buffer. 10% of acetonitrile (vol) were added to disolve all podands with ester functions and for all copper and ^{1}H NMR titrations (AcN as internal reference). The final concentration of the ligand solution was determined by measuring the cysteine free thiol concentration following the Ellman's procedure [223]. This procedure uses 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as an indicator : each free thiol group present in the peptide yields 1 equivalent of TNB^{2-} according to equation 34 (ϵ^{412nm} (TNB^{2-}) = 14 150 M^{-1} cm^{-1}, cf. Chapter 2).

$$DTNB^{2-} + RS^{-} \rightarrow RS - TNB^{-} + TNB^{2-} \tag{34}$$

3 mL of phosphate buffer, 100 mM, pH 7.4 were transferred in UV cell and 200 μL of DNTB were added A^0, λ_{412nm}) then 100 μL (or x) of the ligand solution were added ((A^1, λ_{412nm}). The concentration was determined according to equation 36 :

$$[L] = \frac{[SH]}{n} \times \frac{3.2 + x}{x} \tag{35}$$

n = number of thiols in the ligand

$$[SH] = \frac{((A^1 - A^0) \times 3.2/(3.2 + x)}{14150 \times l} \tag{36}$$

x (mL)
l path(cm)
[SH] (mol.L^{-1})

Peptides that incorporate a tryptophan residue absorbe at 280 nm (ϵ = 5690 L.mol^{-1}.cm^{-1}). Spectra of the peptide solution were recorded from 200 to 700 nm and the peptide concentration was obtained with the Beer Lambert law, according to equation 37.

$$c = \frac{A}{\epsilon \times l \times c} \tag{37}$$

ϵ = 5690 L mol^{-1} cm $^{-1}$
l = path (cm)
A = absorbance at 280 nm

24.1.3 Bathocuproin disulfonate solution

BCS solutions (≈ 10 mM) were prepared by dissolving the appropriate amount of BCS in deoxygenated phosphate buffer 20 mM, pH 7.4. x mL of the solutions BCS were added to 2.5 mL of phosphate buffer 20 mM, pH 7.4. This solution was then titrated by adding 0.05 eqv. of a Cu(I) solution (3 mM). The plot (absorption(483 nm) = f(eqv. Cu^+)) gives two

straight lines and the intersection point (Veq.) indicates the total formation of $Cu(BCS)_2^{3-}$. The BCS concentration was then calculated according to equation 38 :

$$[BCS] = \frac{2 \times Veq. \times [Cu]}{2.5 + Veq} \times \frac{x + 2.5}{x} \tag{38}$$

x, Veq. (mL)

24.2 Spectroscopic titrations

24.2.1 UV titrations

The UV-visible spectra were recorded with a Varian Cary50 spectrophotometer equipped with optical fibers connected to an external cell holder in the glove box. 2 mL of the ligand solution (≈50 μM for Cu(I) titrations, ≈30 μM for Hg(II), Zn(II) and Cd(II) titrations, ≈90 μM for Pb(II) titrations) were transferred in a UV cell (1 cm path) and aliquots corresponding to 0.1 equivalent of the metal solution were then added.
The buffer was phosphate (20 mM, pH 7.4) for all the titrations except for Pb(II) for which Bis-Tris (20 mM, pH 7) was used to prevent Pb(II) hydrolysis and the precipitation of $Pb(OH)_2$ [180].

24.2.2 CD titrations

The circular dichroism spectra were acquired with an Applied Photophysics Chirascan spectrometer. 2.5 mL of the ligand solution (≈ 100 μM in phosphate buffer, 20 mM, pH 7.4/AcN (v/v = 9/1) were transferred in a UV cell (1 cm path) and aliquots corresponding to 0.25 equivalents of the Cu(I) solution in acetonitrile were then added. The same procedure was used with Cd(II) expect that the ligand solutions were prepared in phosphate buffer, 20 mM, pH 7.4 and Cd(II) solution was prepared in deoxygenated Milli-QR water (Millipore, resistivity 18 MΩ.cm).

24.3 ES-MS titrations

Mass spectra were acquired on a LXQ-linear ion trap (THERMO Scientific, San Jose, USA) equipped with an electrospray source. Electrospray full scan spectra in the range m/z = 150 -2000 amu or 2000-3000 amu were obtained by infusion through a fused silica tubing at 2-10 SL/min. The solutions were analyzed both in positive and negative modes. The LXQ calibration (m/z = 50-2000) was achieved according to the standard calibration procedure from the S5/11 manufacturer (mixture of caffeine, MRFA and Ultramark 1621). An ES-Tuning Mix solution (Agilent) was used to calibrate the spectrometer between 2000 and 3000 amu. The temperature of the heated capillary for the LXQ was set in a range of

80-120°C, the ion-spray voltage was in the range 4-6 kV and the injection time was 5-200 ms. The ligand solution (100 μM) was prepared in ammonium acetate buffer (20 mM, pH 7) and aliquots corresponding to 0.5 equivalent of the metal solution (in acetonitrile for Cu(I) or water for others metals) were then added. All complexes were prepared in the glove box before ES-MS analysis.

24.4 NMR experiments

24.4.1 ^{1}H NMR titrations

The NMR experiments were recorded on a 500 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a 5 mm BBI probe with triple axis gradient field. The ligand solution ($\approx$ 1-2 mM) was prepared in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4, D_2O) and CD_3CN (90/10, v/v) and aliquots corresponding to 0.5 equivalent of metal solution in CD_3CN for Cu^+ or D_2O for other metals were then added to the ligand sample tube. Young tubes were used to maintain an argon atmospher.

24.4.2 Diffusion cœfficient measurements

Diffusion cœfficient measurements were performed using the bipolar stimulated spin echo sequence [370]. Before each diffusion cœfficient measurement, the 90° pulse was calibrated. Diffusion coefficients were obtained using equation 39.

$$I(\delta, \Delta, g) = I_0 \exp[-\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2}) D] \tag{39}$$

I(δ, Δ, g) and I_0 are the intensities in the presence of gradient pulses of strength g and in absence of gradient pulses respectively. The length of the gradient pulse is δ, Δ is the diffusion delay and g is the gyromagnetic ratio (for protons, $\gamma_H = 26.7520 \times 10^7$ rad.T^{-1}.s^{-1}). The values of Δ and δ used in the diffusion coefficient measurements were 100 ms and 2 ms respectively. In the experiments g was incremented from 2.95 to 47.2 G.cm^{-1}.
The diffusion coefficient is then the slope of the line obtained by plotting ln(I/I$_0$) against :

$$q^2 \times (\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2}) \tag{40}$$

where q = $\gamma.\delta.g$; τ = pulse separation delay (s)

The mass of the complexes (M_C) in solution were calculated according to equation 41 ; from the diffusion cœfficient of the ligand (D_L) and the complex (D_C), with M_L the mass of the ligand.

$$\frac{D_L}{D_C} = \sqrt[3]{\frac{M_C}{M_L}} \tag{41}$$

The uncertainties of the complex mass values (ΔM_C) were calculated according to equation 42, ΔD_L and ΔD_C being the uncertainties of the measured diffusion cœfficient of the free ligand and the complex, respectively.

$$\frac{\Delta M_C}{M_C} = 3 \times \frac{\Delta D_L}{D_L} + 3 \times \frac{\Delta D_C}{D_C} \tag{42}$$

24.4.3 Temperature cœfficient measurement

The NMR experiments were recorded on a 500 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a 5 mm BBI probe with a triple-axis gradient field. ^{1}H NMR spectra were recorded with 12 ppm windows. ^{1}H NMR spectra of the ML complexes ([ligand] $\approx$ 1 mM, 0.9 eqv. metals) were recorded from 278 K to 318 K in H_2O/ D_2O (v/v = 9/1) using Watergate [224] solvent suppresion, pH $\approx$ 7.0, and 10% CD_3CN as internal reference. The slope of the line δNH = f(T(K)) gave the temperature cœfficient.

24.4.4 ^{199}Hg NMR

The spectra were recorded on a Varian Mercury Spectrometer at 71.6 MHz. The samples ([ligand] = 3 mM, 0.8 eqv. Hg(II), in H_2O/D_2O (v/v = 9/1)) were prepared with 91% enriched $^{199}Hg^{2+}$. The pH were adjusted with HCl or KOH 0.1 M. The spectra were collected in 12 hours with $\approx 10^8$ scans, a 13 μs 90° pulse, a sweep wide of 100000 Hz, an acquisition time of 20 ms and a relaxation delay of 5 ms. A 50 Hz line broadening was applied during the processing prior to Fourier Transformation [192] [202]. Chemical shifts are referenced to $Hg(OAc)_2$ (-2389 ppm [371]).

24.5 Apparent affinity constants

24.5.1 Copper(I) affinity

The apparent stability constants at pH 7.4 of Cu(I) complexes, were measured by UV-visible titrations in presence of bathocuproine disulfonate (BCS) as a competitor. The complexes were prepared by adding 0.5 or 0.9 equivalents of the Cu(I) solution in acetonitrile to the ligand solution (2 mL, [ligand] $\approx$ 50 μM) in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4)/acetonitrile (v/v = 9/1). The mixture was stirred for 10 min to ensure the formation of the complex, which was checked by recording the absorption at 267 nm (LMCT band). Aliquots of a BCS solution (10 mM in phosphate buffer, 20 mM, pH 7.4) were then added to the Cu(I) complexes. The mixture was stirred until stabilization of the absorbance at 483 nm. The UV/vis spectra were recorded (250-600 nm) and show the formation of the orange $Cu(BCS)_2$ complex according to equation 18.
The stability of the absorbance was controlled before the addition of any other BCS solution

aliquot. Aliquots of BCS were added until a complete displacement of copper(I) according to equation 43.

$$CuL + 2BCS^{2-} = L + Cu(BCS)_2^{3-} \tag{43}$$

The apparent affinity constant of the mononuclear complex CuL was determined by calculating the concentrations of the species in solution :

$$[BCS] = [BCS]_0 - 2[Cu(BCS)_2^{3-}] \tag{44}$$

$$[Cu]_{free} = 10^{19.8} \times \frac{[Cu(BCS)_2^{3-}]}{[BCS]^2} \tag{45}$$

$$[CuL] = [Cu]_0 - [Cu(BCS)_2^{3-}] - [Cu]_{free} \tag{46}$$

$$[L]_{free} = [L]_0 - [CuL]. \tag{47}$$

$$\beta_{11}^{pH=7.4} = \frac{[CuL]}{[Cu][L]} \tag{48}$$

$[BCS]_0, [Cu]_0, [L]_0$= initial concentrations
[L] = ligand concentrations
$\log\beta(\mathrm{Cu(BCS)}_2^{3-}) = 19.8$

24.5.2 Mercury(II) affinity

With peptides : The CuP complex was formed by addition of 0.9 equivalent of Cu(I) to 2 mL solution of peptides ($\approx$ 30 μM) in phosphate buffer 20 mM pH 7.4 and AcN (90/10, v/v). Aliquots of 0.1 equivalents of Hg(II) were added to the complex CuP and the evolution of the LMCT band at 267 nm ($S^- \rightarrow Cu^+$)was followed by UV-visible spectroscopy (equation 49).

$$CuP + Hg = HgP + Cu \tag{49}$$

The LMCT band at 267 nm disappeared at 1 eqv. Hg(II). The ratio of the two stability constants is given by equation 50 :

$$\frac{\beta_{Hg}}{\beta_{Cu}} = \frac{[HgP]}{[Hg][P]} \times \frac{[Cu][P]}{[CuP]} = \frac{[HgP]}{[Hg]} \times \frac{[Cu]}{[CuP]} \tag{50}$$

We considered more than 97% of copper is displaced by Hg in these experiment which gives :

$$\frac{\beta_{Hg}}{\beta_{Cu}} > \frac{97}{3} \times \frac{97}{3} = 1000 \tag{51}$$

$$\log \beta_{Hg} > \log \beta_{Cu} + 3 \tag{52}$$

With Podands : The HgL complex was formed by addition of 0.9 equivalent of Hg(II) to 2 mL solution of the ligand in phosphate buffer 20 mM pH 7.4 ([Ligand] $\approx$ 30 μM). The evolution of the thiolate to Hg(II) LMCT band at 290 nm was then followed upon titration with aliquots of a 5 mM Na_2EDTA solution. These data were simulated with less than 5% (for $NTA(Cys(NH_2))_3$ and $NTA(Cys(OEt))_3$) and 10% ($NTA(Cys(OH))_3$) of Hg(II) displaced from the ligand at the end of the titration. The apparent stability constant of the HgEDTA complex at pH 7.4 is logβ (HgEDTA) = 18.7 [264].

24.5.3 Lead (II) affinity

2 mL of a ligand solution ($\approx$ 90 μM) were transfered in a UV cell (1 cm path) and aliquots corresponding to 0.1 equivalent of Pb^{2+} solution were then added. The apparent stability constants at pH 7 of the Pb(II) complex was measured by fitting the titrations of L by Pb(II) in the buffer Bis-Tris (20 mM, pH 7) by using the computer program SPECFIT [235] [237] [238]. The affinity of Bis-tris for Pb(II) was included in the fit (logβ_{11} = 4.32). All absorbing species were detected and the data were satisfactorily fitted with an apparent stability constant at pH 7 [239] [240].

24.5.4 Cadmium(II) and zinc(II) affinity

2 mL of ligand solution (90 μM, Bis-Tris buffer 20 mM, pH 7.0) were transfered in a UV cell and 3 equivalents of Pb(II) were added. After stirring to ensure the formation of the PbL complex, aliquots of 0.1 eqv. of Cd(II) or Zn(II) were added in Bis-Tris (20 mM, pH 7.0). The experiments were performed until no signal of the Pb(II) complex could be observed (Cd) or less than 10% (Zn). The apparent stability constants at pH 7 of the Cd(II) and Zn(II) complexes were measured by fitting the disappearance of the lead complex absorbance. The affinities of the metal ions for Bis-Tris are known and were included as parameters in the fit (log β_{11}= 2.47 (Cd), 2.38 (Zn) [239] [240]). The apparent stability constant of PbL was also included as a parameter in the fit of the back titrations. The fit was done by using the computer program SPECFIT.

24.6 Potentiometry

24.6.1 Materials

A potentiometer type 751 GPD titrino Metrohm was used with an automatic burette of 5 mL. A thermostated bath was used to maintain the sample at 298 K. The pH was measured by a Metrohm electrode (reference : Ag/AgCl in KCL 3 mol.L^{-1}). All units (KOH and HCl) were degazed before going into the glove box.
The ionic strenght is maintain with at 0.1 mol.L^{-1} (KCl). All solutions were prepared in

deoxygenated Milli-Q water (Millipore, resistivity 18 MΩ.cm). The solutions of HCl (0.1 mol.L^{-1}) and KOH (0.1 mol.L^{-1}) were prepared by diluting commercial solutions (Titrisol Merck).
The ligand solutions were prepared at 0.5 mM in KCl 0.1 mol.L^{-1} excepted for NTA(Cys(OEt))$_3$ which was prepared in KCl 0.1 mol.L^{-1}/AcN (v/v = 98/2). The initial concentration of the ligand solution was determined by measuring the cysteine free thiol concentration following the Ellman's procedure. All experiments were performed in a glove box.

24.6.2 Electrode calibration

The electrode was calibrated before each titration. During titration the electrode does not measure directly a pH but an electromotive force E (mV). The relation between pH and E is given by equation 53 :

$$E_{exp} = E^0 - f \times \frac{(1000 \times RT \times \ln 10)}{F} \times pH \tag{53}$$

R = 8.314 J.K^{-1}. mol^{-1} Ideal gas constant
T = 298 K
F = 96500 C. mol^{-1} Faraday constant
E and E^0 in mV

The calibration was performed by titrating a HCl solution by aliquots of KOH and gives E^0 and f which depend on the electrode. The electrode is stable if E^0 and f values are repeatable 2 or 3 times.

24.6.3 Titration

Continuous potentiometric titrations with 0.1 mol.L^{-1} KOH were conducted in 22 mL aqueous solutions containing about 5×10^{-4} mol.L^{-1} of the tripodes and 0.1 molL^{-1} KCl as background electrolyte. Back titrations with 0.1 molL^{-1} HCl were performed after each experiment to check whether equilibration had been achieved. In a typical experiment, ≈ 200 points (5 μL increment) were measured with a 2-3 min delay between the measurements. Experimental data were refined using the computer program Hyperquad 2000 [254]. All equilibrium constants are expressed as concentration ratios and not activities. The ionic product of water at 25°C and 0.1 molL^{-1} ionic strength is pKw = 13.78 [264]. Initial concentrations of ligands and protons are fixed. pH measured were calculated by using E^0 and f determined during calibration.

24.7 pH titration of HgL

The pH titration of HgL complexes was followed with a Varian Cary50 spectrophotometer equipped with optical fibers connected to an external cell holder in the glove box. 2 mL of the ligand solution in water (≈30 μM) were transfered in a UV cell (1 cm path) and 0.9 eqv of $HgCl_2$ was added to form a the HgL complex. The complex was titrated from pH 2 to pH 10 by adding small aliquots from 0.1 M to 1 M solutions of potassium hydroxide and monitoring the pH using a microelectrode (Metler Toledo, InLAB® 423, electrolyte 9811, Ag/AgCl) with a 702 SM Titrino Metrohm. Reverse titrations (pH 10 to pH 2) were performed by adding small aliquots from 0.1 M to 1 M solutions of hydrochloric acid [190]. All titrations were fitted by using the computer program SPECFIT. All absorbing species were detected and the data were satisfactorily fitted using the apparent stability constants $\log\beta_{110}$ at pH 7.4 estimated at 30.

25 Biological experiments

25.1 Cell culture

HepG2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS), 20 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, 100 g/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin. WIF-B9 and Can 10 cells were grown in Coon's modified F12 medium (Sigma) supplemented with HAT (10^{-5} M hypoxanthine, 4×10^{-8} M aminopterin, 1.6×10^{-4} M thymidine), 5% FBS (Invitrogen), 2 mM glutamine, and an antibiotic and antifungal solution containing 100 μg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μg/ml amphotericine B. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% (HepG2) or 7% (WIF-B9 and Can 10) CO_2 They were plated at 2×10^4 cells/cm^2 on plastic tissue culture dishes (Falcon) or on round (16 mm in diameter) or square (22 mm×22 mm) autoclaved glass cover slips (Esco) in 6, or 12-well plates and used 7 days later. The culture medium was renewed every 2 to 3 days.

25.2 Localization of ATP7B by immunofluorescence

Cells on glass cover slips were rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with methanol for 4 min at 20°C. They were then rehydrated in PBS and incubated at 37°C for 45 min, either with a rabbit primary antibody anti-ATP7B (1/200 diluted), or with this ATP7B antibody and a rat monoclonal antibody anti-ZO1 (undiluted). After 3 rinses with PBS, the cells were incubated for 15 minutes at 37°C with a goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 488 (1/500 ; Molecular Probes) or with a mixture of this latter antibody and a goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa

566 (1/500 ; Molecular Probes). Cells were then washed three times in PBS and the cover slips were mounted on glass slides with a drop of mounting medium (Sigma) and sealed using nail polish. The cells were analyzed using a Zeiss fluorescence Axioskop microscope. Confocal analysis was performed with a Zeiss LSM 510 microscope and series of xy sections were taken in 0.3 m steps. The rabbit primary antibody anti-ATP7B was from I. Sandoval (CIBEREHD, Madrid, Spain) and the rat primary monoclonal antibody anti-ZO-1 was from B. Stevenson (University of Alberta, Edmonton, Canada).

25.3 Experimental Procedures

25.3.1 Uptake of Vect1-TRITC

The uptake of **Vect1-TRITC** by HepG2, WIF-B9 and Can 10 cells was explored using a concentration range of 2 to 0.2 μM. **Vect1-TRITC** was added in the medium and at regular intervals, cells on cover slips were rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS), fixed with 4% formaldehyde for 20 min and viewed on Zeiss fluorescence microscopes (Axioskop or AxioVert 200M). The 2 μM concentration was also left for up to 4 days without damaging neither HepG2 nor WIF-B9 and Can 10 cells.

25.3.2 Trafficking of ATP7B

Trafficking of ATP7B has been shown before in various cells under extreme conditions, such as addition of 200μM BCS or 20-200 μM copper in the culture medium. Since we wanted to avoid the use of high concentrations of **Vect1**, we had to find conditions inducing ATP7B trafficking at lower concentrations of copper and within a few hours to avoid cellular responses involving protein synthesis. No ATP7B trafficking could be detected after 2 hours in 0, 0.1 and 0.3 μM copper added to the medium. Trafficking was clear after 2 hours in the presence of 1 μM copper. Starting from this observation, two concentrations of **Vect1** were tested for their ability to reverse the trafficking of ATP7B. There was a clear cut answer after 3 hours in the presence of 10 μM **Vect1**, whereas 2 μM was not enough (data not shown).

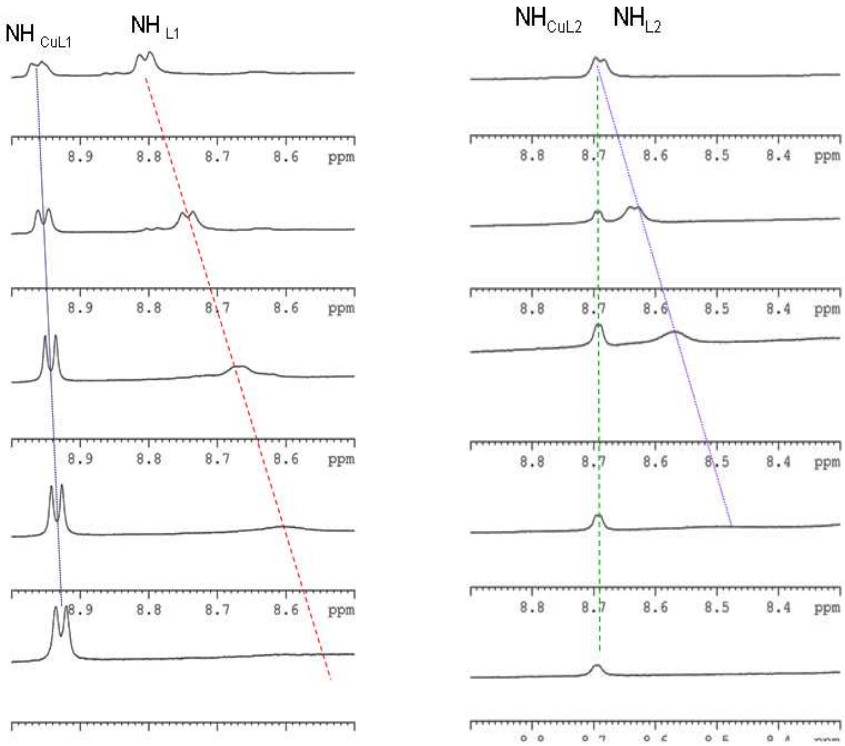
Annexes

Huitième partie

Annexes

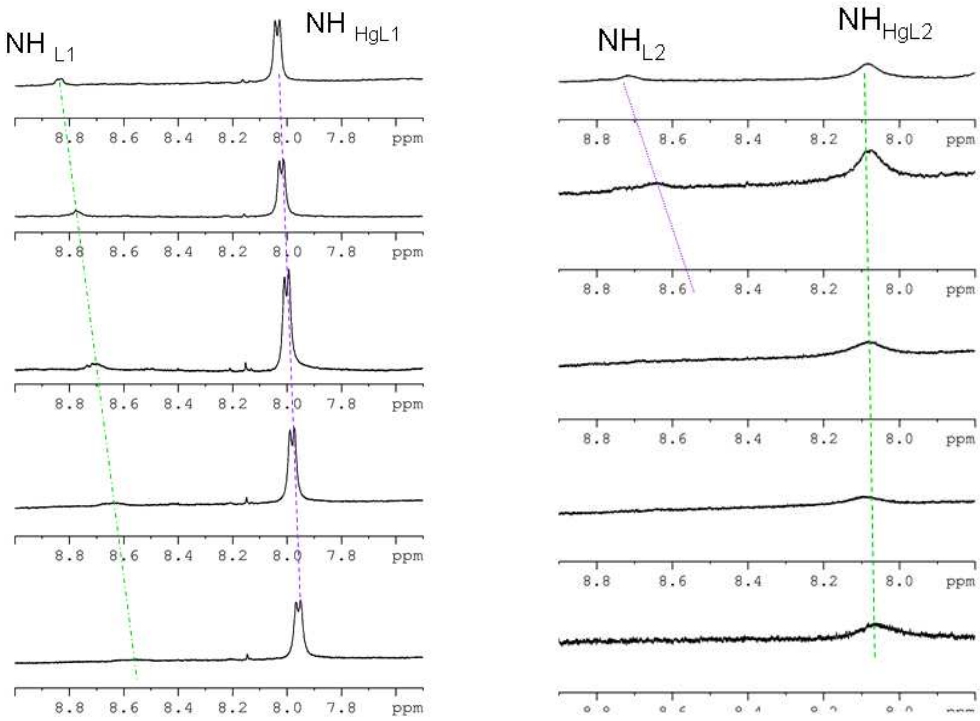
26 Figures : déplacement chimiques des NH en fonction de la température

26.1 Complexes du cuivre(I)



n° 216 – Déplacements chimiques des NH pour les ligands libres et des complexes CuL à 0.5 eqv de Cu(I), cas du NTA(Cys(OEt))$_3$ (L^1, à gauche), et du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ (L^2, à droite), dans tamp. phos. 20 mM $H_2O/D_2O/CD_3CN$ (v/v/v = 8/1/1), pH = 7.4, 500 MHz

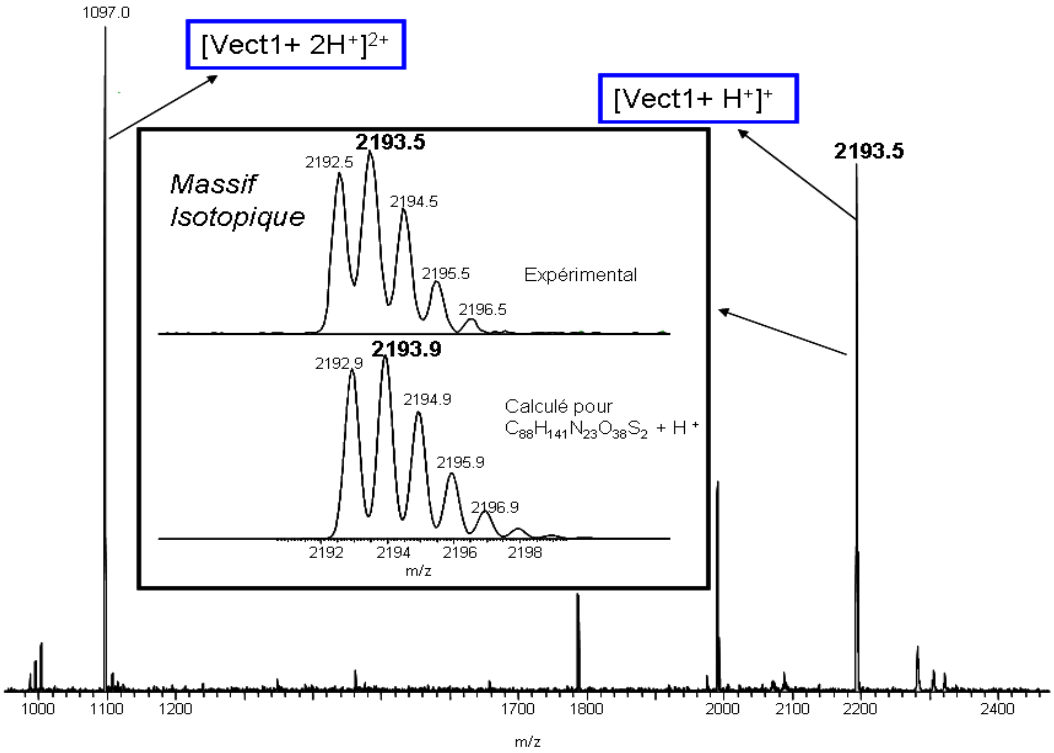
26.2 Complexes du mercure(II)



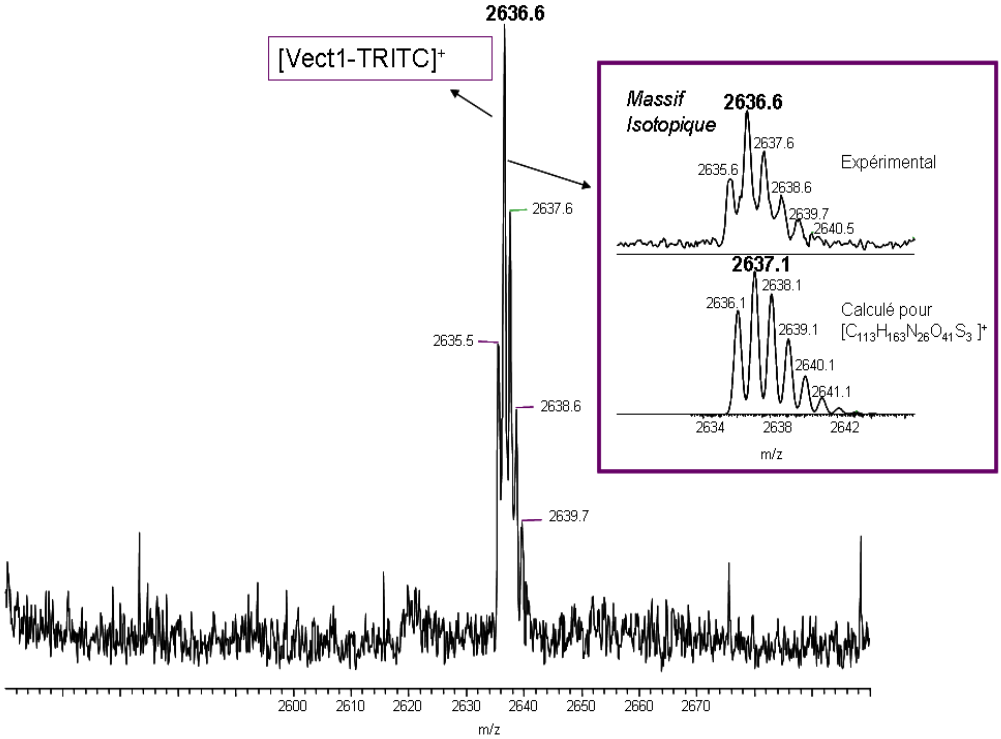
n° 217 – Déplacements chimiques des NH pour les ligands libres et des complexes HgL à 1 eqv de Hg(II), cas du NTA(Cys(OEt))$_3$ (L^1, à gauche), et du NTA(Cys(NH$_2$))$_3$ (L^2, à droite), dans tamp. phos. 20 mM $H_2O/D_2O/CD_3CN$ (v/v/v = 8/1/1), pH = 7.4, 500 MHz

27 Spectres de masse des différents vecteurs

27.1 Vecteur 1

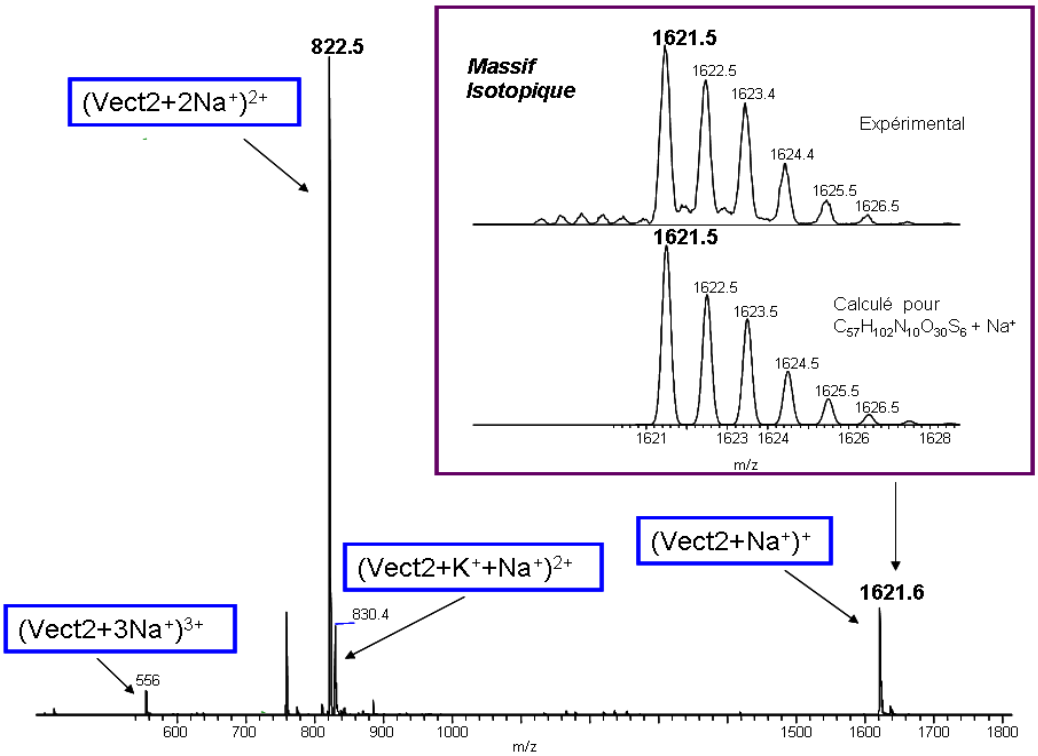


n° 218 – Spectre de masse de Vect1, mode positif ionisation électrospray

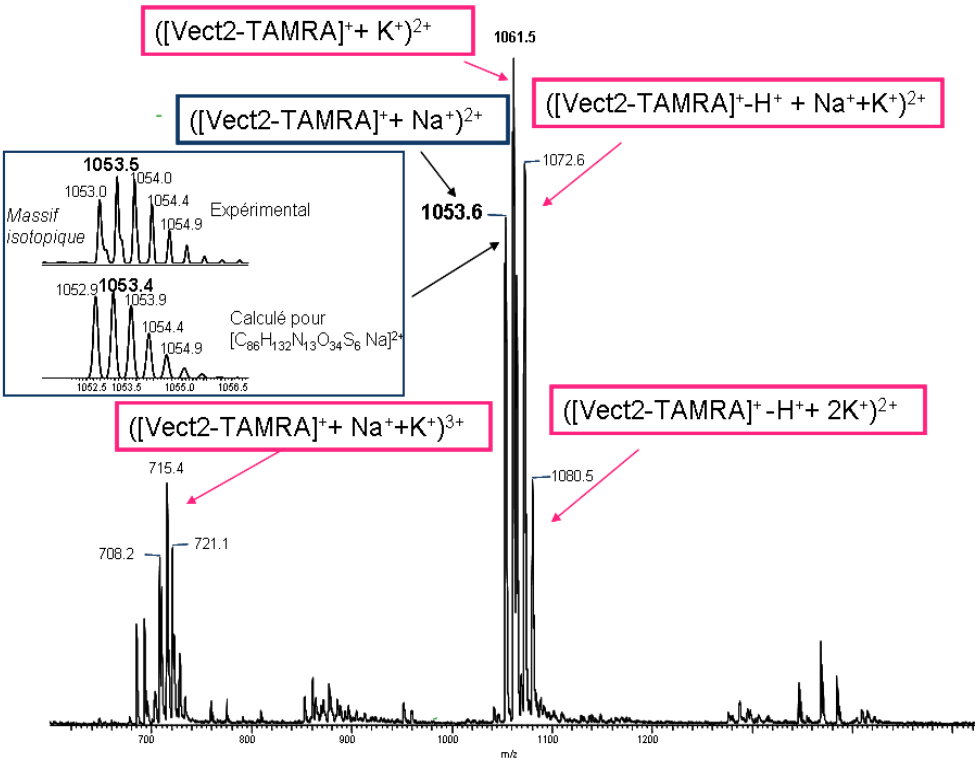


n° 219 – Spectre de masse de Vect1-TRITC, mode positif ionisation électrospray

27.2 Vecteur 2



n° 220 – Spectre de masse de Vect2, mode positif ionisation électrospray



n° 221 – Spectre de masse de Vect2-TAMRA, mode positif ionisation électrospray

28 Calcul des constantes d'affinité

Une constante d'équilibre K, relative à une équation donnée, est le quotient des activités des espèces présentes en solution à l'équilibre. Cette constante est indépendante de la pression et des concentrations. Elle dépend toutefois de la température.

$$aA + bB = cC + dD \qquad K = \frac{[a_C^c \times a_D^d]}{a_A^a \times a_B^b} = \frac{\gamma_C^c \times \gamma_D^d}{\gamma_A^a \times \gamma_B^b} \frac{[C]^c \times [D]^d}{[A]^a \times [B]^b} \tag{54}$$

En travaillant en présence d'un électrolyte inerte chimiquement et en fort excès, la force ionique est maintenue constante. Le rapport des cœfficients d'activités (γ_i) est considéré comme invariant. La constante d'équilibre s'exprime donc en fonction des eules concentrations des espèces :

$$K = \frac{[C]^c \times [D]^d}{[A]^a \times [B]^b} \tag{55}$$

Les équilibres de complexation peuvent s'écrire de nombreuses façons. Les conventions utilisées sont donc développées dans cette annexe. Pour des raisons de clarté, les charges du ligand L et du métal M ont été omises ; L correspond ainsi à la forme totalement déprotonée du ligand.

Il existe principalement deux types de constantes : les constantes globales et les constantes successives de formation qui sont reliées entre elles. Les constantes globales de formation sont notées β et les constantes successives K.

28.1 Constantes de formation des complexes

La constante globale de formation du complexe MLH en présence de métal s'écrit comme détaillé ci-dessous. Les indices m,l et h de la constante β représentent respectivement le nombre de métaux, de ligands et de protons mis en jeu lors de la formation du complexe.

$$\beta_{mlh} : mM + lL + hH = M_m L_l H_h \qquad \beta_{mlh} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h} \tag{56}$$

Les constantes de formation globales des complexes ML et M_2L ne faisant pas intervenir de protons s'écrivent donc :

$$\beta_{110} : M + L = ML \qquad \beta_{110} = \frac{[ML]}{[M][L]} \tag{57}$$

$$\beta_{210} : 2M + L = M_2L \qquad \beta_{210} = \frac{[M_2L]}{[M]^2[L]} \tag{58}$$

Il est possible d'écrire des constantes successives de formation. Ainsi K_2 relatif à l'équilibre ci-dessous s'écrit :

$$K_2 : ML + M = M_2L \qquad K_2 = \frac{[M_2L]}{[ML][M]} \qquad K_2 = \frac{\beta_{210}}{\beta_{110}} \tag{59}$$

28.2 Constantes de protonation

Nous avons vu au chapitre 3 la définition des constantes de protonation. Il faut noter que les constantes de protonation ne sont que le cas particulier des constantes de formation définies ci dessus pour lequelles m = 0. Les constantes globales de protonation β_{01h} sont donc définies comme suit pour un ligand L présentant par exemple trois sites de protonation.

$$\beta_{011} : L + H = LH \qquad \beta_1 = \frac{[LH]}{[L][H]} = K_1^H \tag{60}$$

$$\beta_{012} : L + 2H = LH_2 \qquad \beta_2 = \frac{[LH_2]}{[L][H]^2} = K_1^H \times K_2^H \tag{61}$$

$$\beta_{013} : L + 3H = LH_3 \qquad \beta_3 = \frac{[LH_3]}{[L][H]^3} = K_1^H \times K_2^H \times K_3^H \tag{62}$$

avec

$$K_1^H = \frac{1}{K_{a1}} \tag{63}$$

$$\log K_1^H = pKa \tag{64}$$

Les constantes d'acidité successives sont définies comme suit :

$$K_{a1} : LH = L + H \qquad K_{a1} = \frac{[L][H]}{[LH]} \tag{65}$$

$$K_{a2} : LH_2 = LH + H \qquad K_{a2} = \frac{[LH][H]}{[LH_2]} \tag{66}$$

$$K_{a3} : LH_3 = LH_2 + H \qquad K_{a3} = \frac{[LH_2][H]}{[LH_3]} \tag{67}$$

Les constantes sont reliées entre elles par les relations suivantes :

$$log\beta_{011} = pK_{a1} \tag{68}$$

$$log\beta_{012} = pK_{a1} + pK_{a2} \tag{69}$$

$$log\beta_{013} = pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} \tag{70}$$

28.3 Cas particulier

On peut calculer une constante apparentes à pH donné à partir de la constante globale de formation du complexe ML et des constantes de protonation du ligand libre par la relation suvante :

$$\beta^{pH} = \beta \times \alpha_H \tag{71}$$

avec

$$\alpha_H^{-1} = 1 + \frac{[H]}{K_{a1}} + \frac{[H]^2}{K_{a1} \times K_{a2}} + \frac{[H]^3}{K_{a1} \times K_{a2} \times K_{a3}} = 1 + \sum_i [H]^i \times \beta_{0Li} \tag{72}$$

Publication

J|A|C|S COMMUNICATIONS

Published on Web 05/04/2009

A Cysteine-Based Tripodal Chelator with a High Affinity and Selectivity for Copper(I)

Anaïs M. Pujol, Christelle Gateau, Colette Lebrun, and Pascale Delangle*

CEA, Inac, Service de Chimie Inorganique et Biologique (UMR_E 3 CEA UJF), F-38054 Grenoble, France

Received March 5, 2009; E-mail: pascale.delangle@cea.fr

Metal overload plays an important role in several diseases and intoxications.[1] Among these metals, copper (Cu) is an essential element which is used as a cofactor in many redox proteins, which are involved in several vital processes. Free Cu can also promote Fenton-like reactions and thus is very toxic even at low concentrations. Therefore, the intracellular Cu concentration needs to be rigorously controlled to ensure that it is provided only to the essential enzymes and does not accumulate to toxic levels.[2] For instance, Wilson's disease is one of the major genetic disorders of Cu metabolism in humans. Failure of the copper transport in hepatocytes results in cytosolic Cu accumulation with associated cellular injury.[3,4] Cu is also involved in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and is suspected to cause amyloid β precipitation and toxicity.[5,6] Therefore, as chelation therapy[1,4,5] is currently used or proposed for treating these disorders, it is of major interest to develop molecules able to efficiently and selectively bind Cu. Biological molecules that traffic or sequester Cu in cells are good models for designing efficient Cu chelators. As the cytoplasm of most eukaryotic cells is a reducing environment, the predominant oxidation state of Cu in cells is Cu(I). Many intracellular Cu transporters contain a conserved N-terminal MxCxxC sequence that binds metal ions with two cysteines.[7] In a previous report, we demonstrated that this sequence is highly selective for Cu(I) over the essential ion Zn(II) that could compete in cells.[8,9] Metallothioneins (MTs) are other proteins able to complex Cu. Indeed, when Cu is in excess of physiological requirements, cells induce the biosynthesis of these small cysteine-rich proteins, which form Cu(I) clusters.[10]

We decided to take advantage of the high affinity of cysteine sulfur donors for Cu(I) evidenced in living organisms to design efficient and selective copper chelators. For that purpose, several cysteines were attached with peptide bonds to nonbiological scaffolds to obtain pseudopeptide ligands.[11] Polyaminocarboxylate spacers are attractive because they provide a series of chemical scaffolds with a range of carboxylic acid numbers that can be easily functionalized with cysteines. In this communication, we present a C_3-symmetric ligand anchored on a nitrilotriacetic acid (NTA) moiety extended by three converging metal-binding cysteine chains. We demonstrate that this tripodal ligand has a high affinity and selectivity for Cu(I).

The tris(cysteine) pseudopeptide ligand LH_3 was synthesized by coupling the triacid NTA with the free amine function of an O,S-protected derivative of cysteine, HCys(Trt)OEt, in presence of classical peptide-synthesis coupling reagents, followed by deprotection of the thiol groups under acidic conditions [see the Supporting Information (SI) for detailed experimental procedures]. Binding of Cu(I) was investigated by UV spectroscopy at pH 7.4. Addition of aliquots of Cu(I) to the ligand solution resulted in the appearance of a band centered at 262 nm that linearly increased with increasing Cu(I) concentration up to 2 equiv (Figure 1). This band is characteristic of ligand-to-metal charge-transfer (LMCT)

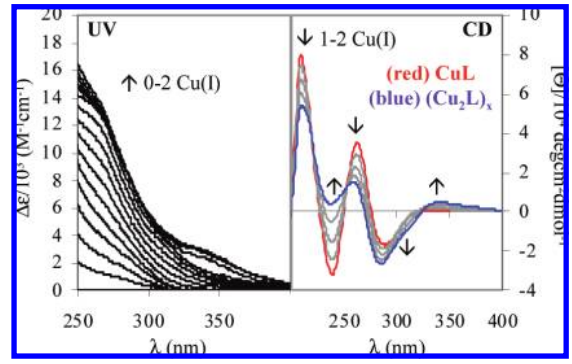
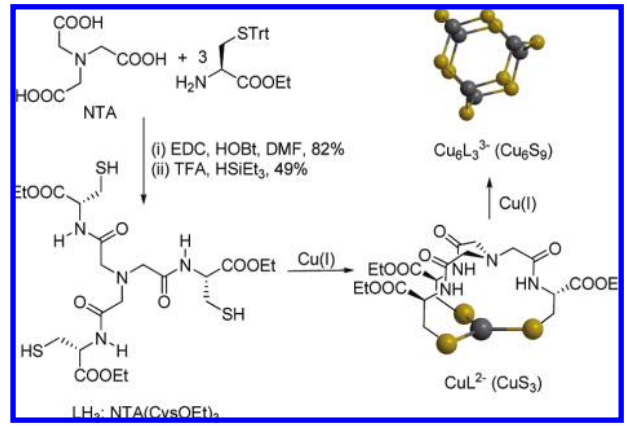


Figure 1. UV and CD titrations of L (~50 μM) with Cu(I) at pH 7.4 [9:1 (v/v) 20 mM phosphate buffer/CH_3CN].

transitions of the thiolate−Cu(I) bonds in a $(Cu_2L)_x$ complex. The extinction coefficient of this LMCT band is 13 000 M^{-1} cm^{-1}, which is compatible with the values of ~7000 M^{-1} cm^{-1} per bound Cu found in MTs.[12] The examination of the shoulder at 340 nm indicated a more complicated behavior, namely, the formation of the two complexes represented in Scheme 1, which were investigated with complementary experimental methods.

Scheme 1



The C_3-symmetric mononuclear complex CuL is evidenced in the ^{1}H NMR spectra of L with less than 1 equiv of Cu(I) (Figure S2 in the SI). In this complex, the β-protons of the cysteines and the apical NCH_2 protons give well-resolved AB doublets having large chemical shift differences with respect to the free ligand ($\Delta\delta$ = 0.05 and 0.04 ppm for L, 0.47 and 0.91 ppm for CuL), suggesting that the ligand adopts a rigid conformation with the three thiolate arms wrapped around the metal ion. The exchange between the free ligand and this complex is very slow, as evidenced by the absence of exchange correlation in the 2D exchange spectroscopy (EXSY) spectrum. The diffusion coefficients were measured by

10.1021/ja901700a CCC: $40.75 © 2009 American Chemical Society

pulsed-gradient spin-echo (PGSE) NMR spectroscopy to infer the species molecularity in solution.[13] In 9:1 (v/v) water (pD 7.4)/acetonitrile mixtures, the diffusion coefficients are $D(\mathrm{L}) = 3.20(4) \times 10^{-10}$ m^2 s^{-1} and $D(\mathrm{CuL}) = 3.02(4) \times 10^{-10}$ m^2 s^{-1}. This leads to $M(\mathrm{CuL}) \approx 696(54)$ g mol^{-1}, which compares reasonably well with the value of 645 g mol^{-1} calculated for CuL. This confirms that the species formed with excess or 1 equiv of ligand is the mononuclear complex CuL with C_3 symmetry in which the three sulfur atoms are coordinated to the Cu(I) ion. This complex is also evidenced by electrospray mass spectrometry (ES-MS), which shows an intense peak at m/z 647 corresponding to $[\mathrm{CuLH_3}]^+$. Intense dichroic bands develop in the CD spectrum of CuL with positive and negative maxima at (+) 209, (−) 238, (+) 262, and (−) 288 nm; the two latter bands are attributed to thiolate−Cu LMCT transitions.[12] The coordination geometry of Cu(I) in CuL was observed in the solid state with monodentate sulfur ligands providing mononuclear complexes with a $\mathrm{CuS_3}$ geometry, which are known to co-oligomerize with excess Cu(I) to form $(\mathrm{Cu_2S_3})_x$ clusters.[14]

In excess Cu(I), all of the spectroscopic features changed dramatically, indicating the formation of a Cu(I) cluster. The LMCT transitions in the CD spectrum [(+) 259 and (−) 284 nm] were shifted to higher energy, and weak lower-energy bands with maxima at (−) 310 and (+) 340 nm appeared. These two latter bands were detected as tails in the absorption spectrum and are attributed to cluster-centered transitions.[12] Three isodichroic points were detected at 218, 252, and 325 nm in going from 1 to 2 equiv of Cu(I), demonstrating that the mononuclear complex CuL was transformed into only one cluster complex, $(\mathrm{Cu_2L})_x$. ES-MS spectra recorded with excess Cu(I) indicated the $x = 3$ cluster species $[\mathrm{Cu_6L_3H_5}]^{2+}$ with the expected isotopic signature (Figure S3 in the SI). In contrast to CuL, this cluster exhibited broad resonances in its ^{1}H NMR spectrum that may be characteristic of intramolecular dynamics associated with exchange of the sulfur ligands from one Cu ion to another in this polynuclear complex. The diffusion coefficient, $D[(\mathrm{Cu_2L})_x] = 2.0(1) \times 10^{-10}$ m^2 s^{-1}, confirmed the trimeric nature of this complex, giving $M[(\mathrm{Cu_2L})_x] \approx 2200(400)$ g mol^{-1} and therefore $x = 3$. The polymetallic complex $\mathrm{Cu_6L_3}$ can be associated with a $\mathrm{Cu_6S_9}$ core, as described in some MTs, where each Cu(I) adopts a nearly trigonal planar coordination with exclusively bridging thiolates.[15]

The apparent stability constants of the two Cu(I) complexes at pH 7.4 were measured using UV−vis titrations in the presence of bathocuproine disulfonate (BCS), which forms an orange complex, $[\mathrm{Cu(bcs)_2}]^{3-}$, of known stability.[16] The first Cu(I) ion is very tightly bound as demonstrated by the large value of β_{11} for eq 1 [$\log\beta_{11} = 19.2(1)$]. The complexation of a second Cu(I) ion according to eq 2 is also very efficient [$\log K_2 = 20.7(3)$].

$$\mathrm{Cu(I)} + \mathrm{L} \rightleftarrows \mathrm{CuL} \quad (1)$$

$$\mathrm{CuL} + \mathrm{Cu(I)} \rightleftarrows \frac{1}{3}\mathrm{Cu_6L_3} \quad (2)$$

The apparent affinity constant of the mononuclear complex CuL is significantly larger (by 1.8 orders of magnitude) than that of a model peptide of the copper chaperone Atx1, $\mathrm{P^C}$, which affords only two cysteines (see Table 1).[8] The large stability of the CuL complex reflects the good complementarity of this tripodal ligand architecture, which provides three converging metal-binding thiolates and Cu(I) coordination.

To evaluate the selectivity of L for Cu(I), the complexes with Pb(II), Cd(II), Zn(II), and Hg(II) were studied as previously reported.[8] UV titrations demonstrated the formation of $\mathrm{ML^-}$ complexes, which were also the only ions detected in the ES-MS spectra. The LMCT absorption bands were consistent with metal ions coordinated by three thiolates.[17] The apparent stability constants of the mononuclear complexes ML at pH 7.4, reported in Table 1, are also significantly enhanced in comparison to the corresponding $\mathrm{P^C}$ complexes.[8] Furthermore, the selectivity for Cu(I) over Zn(II), a potential competitor in cells, is still very high ($\sim 10^9$).

Table 1. Apparent Affinity Constants ($\log\beta_{11}^{\mathrm{app}}$, where β_{11}=[ML]/[M][L]) for the Mononuclear Complexes of L and $\mathrm{P^C}$ at pH 7.4 and 298 K

	Ca(II)	Pb(II)	Zn(II)	Cd(II)	Cu(I)	Hg(II)
L	<4.2	10.1(1)	10.3(2)	11.8(3)	**19.2(1)**	>22.7
$\mathrm{P^C}$ [a]	–	8.8(1)	7.6(2)	10.0(1)	**17.4(1)**	>19.4

[a] $\mathrm{P^C}$ is a cyclodecapeptide modeling the binding loop of the copper chaperone Atx1: c(GMTCSGCSRP).[8]

In conclusion, we have developed a cysteine-based ligand that very efficiently chelates Cu(I) (the oxidation state present in cells) with a higher affinity than the MxCxxC sequence found in Cu transporters. This chelator is based on a tripodal pseudopeptide scaffold extended by three converging cysteines and mimics the selectivity of metallothioneins and other cysteine-rich proteins for the soft cations Cu(I) and Hg(II) over other divalent ions. This ligand providing three soft sulfur donors has a very high affinity for Cu(I) in either a mononuclear complex or the $\mathrm{Cu_6L_3}$ cluster.

Acknowledgment. Financial support from the Cluster de recherche Chimie de la Région Rhône-Alpes is duly acknowledged. We thank Grégory Baral-Baron and Yves Chenavier for performing some of the titration experiments.

Supporting Information Available: Synthesis of L, physicochemical procedures, and NMR titration and ES-MS data. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

References

(1) Andersen, O. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2683.
(2) Rosenzweig, A. C. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 119. Puig, S.; Thiele, D. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 171. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 1583.
(3) Tao, T. Y.; Gitlin, J. A. *Hepatology* **2003**, *37*, 1241.
(4) Sarkar, B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2535.
(5) Bush, A. I. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 207.
(6) Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1995. Donnelly, P. S.; Xiao, Z. G.; Wedd, A. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 128.
(7) Rosenzweig, A. C.; O'Halloran, T. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 140. Opella, S. J.; DeSilva, T. M.; Veglia, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *6*, 217. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Molteni, E.; Huffman, D. L.; O'Halloran, T. V. *Genome Res.* **2002**, *12*, 255.
(8) Rousselot-Pailley, P.; Sénèque, O.; Lebrun, C.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 5510.
(9) Sénèque, O.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P. *Chem. Commun.* **2004**, 770.
(10) Koch, K. A.; Pena, M. M. O.; Thiele, D. J. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 549. Stillman, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 461.
(11) Gelinsky, M.; Vogler, R.; Vahrenkamp, H. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2560.
(12) Pountney, D. L.; Schauwecker, I.; Zarn, J.; Vasak, M. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9699. Faller, P.; Vasak, M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13341.
(13) Waldeck, A. R.; Kuchel, P. W.; Lennon, A. J.; Chapman, B. E. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *30*, 39.
(14) Coucouvanis, D.; Murphy, C. N.; Kanodia, S. K. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 2993. Zeevi, S.; Tshuva, E. Y. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 5369.
(15) Nielson, K. B.; Atkin, C. L.; Winge, D. R. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 5342. Presta, A.; Green, A. R.; Zelazowski, A.; Stillman, M. J. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *227*, 226.
(16) Xiao, Z.; Loughlin, F.; George, G. N.; Howlett, G. J.; Wedd, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3081.
(17) Matzapetakis, M.; Farrer, B. T.; Weng, T.-C.; Hemmingsen, L.; Penner-Hahn, J. E.; Pecoraro, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8042. Magyar, J. S.; Weng, T.-C.; Stern, C. M.; Dye, D. F.; Rous, B. W.; Payne, J. C.; Bridgewater, B.; Mijovilovich, A. M.; Parkin, G.; Zaleski, J. M.; Penner-Hahn, J. E.; Godwin, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9495.

JA901700A

J|A|C|S ARTICLES

Published on Web 12/14/2010

Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide

Anaïs M. Pujol,[†] Martine Cuillel,[‡] Olivier Renaudet,[§] Colette Lebrun,[†] Peggy Charbonnier,[‡] Doris Cassio,[||] Christelle Gateau,[†] Pascal Dumy,[§] Elisabeth Mintz,[‡] and Pascale Delangle*,[†]

INAC, Service de Chimie Inorganique et Biologique (UMR_E 3 CEA UJF, FRE CNRS 3200), Commissariat à l'Energie Atomique, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex, France; iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (UMR 5249 CEA CNRS UJF), Commissariat à l'Energie Atomique, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex, France; Département de Chimie Moléculaire (UMR 5250 CNRS UJF), Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble cedex, France; and INSERM, UMR-S757, Université Paris-Sud, Orsay, 91405, France

Received July 13, 2010; E-mail: pascale.delangle@cea.fr.

Abstract: Metal overload plays an important role in several diseases or intoxications, like in Wilson's disease, a major genetic disorder of copper metabolism in humans. To efficiently and selectively decrease copper concentration in the liver that is highly damaged, chelators should be targeted at the hepatocytes. In the present work, we synthesized a molecule able to both lower intracellular copper, namely Cu(I), and target hepatocytes, combining within the same structure a chelating unit and a carbohydrate recognition element. A cyclodecapeptide scaffold displaying a controlled conformation with two independent faces was chosen to introduce both units. One face displays a cluster of carbohydrates to ensure an efficient recognition of the asialoglycoprotein receptors, expressed on the surface of hepatocytes. The second face is devoted to metal ion complexation thanks to the thiolate functions of two cysteine side-chains. To obtain a chelator that is active only once inside the cells, the two thiol functions were oxidized in a disulfide bridge to afford the glycopeptide **P**^{3}. Two simple cyclodecapeptides modeling the reduced and complexing form of **P**^{3} in cells proved a high affinity for Cu(I) and a high selectivity with respect to Zn(II). As expected, **P**^{3} becomes an efficient Cu(I) chelator in the presence of glutathione that mimics the intracellular reducing environment. Finally, cellular uptake and ability to lower intracellular copper were demonstrated in hepatic cell lines, in particular in WIF-B9, making **P**^{3} a good candidate to fight copper overload in the liver.

1. Introduction

Metal overload plays an important role in several diseases or intoxications.[1] Among these metals, copper (Cu) is an essential element which is used as a cofactor in many redox proteins, involved in several vital processes. Free Cu can also promote Fenton-like reactions and would thus be very toxic even at low concentration. Therefore, intracellular Cu concentration needs to be rigorously controlled so that it is only provided to the essential enzymes but does not accumulate to toxic levels.[2] For instance, Wilson's disease is one of the major genetic disorder of Cu metabolism in humans. Impairment of the copper transport in hepatocytes, results in cytosolic Cu accumulation with associated cellular injury.[3,4] Cu is also involved in neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease and suspected to cause Aβ precipitation and toxicity.[5,6] Therefore, as chelation therapy[1,4,5] is currently used or proposed for treating these disorders, it is of major interest to develop molecules able to efficiently and selectively bind Cu.

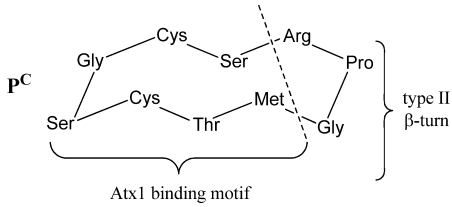
In particular, copper chelators are used to treat metal overload for patients suffering from copper homeostasis disorders like Wilson's disease.[7] In this disease, copper is accumulated in different parts of the patient's organism like the liver, the central nervous system, and the eyes.[8] Current treatments are aimed at lowering dietary copper uptake and not at fighting intracellular copper accumulation.[1,9] To efficiently and selectively decrease the copper concentration in the liver, an organ highly damaged in this disease, chelators should be targeted at the hepatocytes. In cells, excess copper is in the +I oxidation state.[3] In the present work, we designed a molecule able to both lower intracellular copper, namely Cu(I), and target hepatocytes, combining within

[†] INAC, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Commissariat à l'Energie Atomique.
[‡] iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Commissariat à l'Energie Atomique.
[§] Département de Chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier.
[||] INSERM, UMR-S757, Université Paris-Sud.

(1) Andersen, O. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2683–2710.
(2) Rosenzweig, A. C. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 119–128. Puig, S.; Thiele, D. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 171–180. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 1583–1593.
(3) Tao, T. Y.; Gitlin, J. A. *Hepatology* **2003**, *37*, 1241–1247.
(4) Sarkar, B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2535–2544.
(5) Bush, A. I. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 207–214.
(6) Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1995–2044. Donnelly, P. S.; Xiao, Z. G.; Wedd, A. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 128–133. Faller, P.; Hureau, C. *Dalton Trans.* **2009**, 1080–1094.
(7) Das, S. K.; Ray, K. *Nat. Clin. Pract. Neuro.* **2006**, *2*, 482–493.
(8) Gitlin, J. D. *Gastroenterology* **2003**, *125*, 1868–1877.
(9) Brewer, G. J.; Askari, F. K. *J. Hepatol.* **2005**, *42*, S13–S21.

10.1021/ja106206z © 2011 American Chemical Society

Scheme 1. Sequence of the Model Peptide $\mathbf{P^C}$



the same structure a chelating unit and a carbohydrate recognition element.

To design an efficient and selective copper chelating unit, we decided to take advantage of the high affinity of cysteine sulfur donors for Cu(I) evidenced in proteins trafficking or sequestering Cu in cells. As the cytoplasm of most cells is a reducing environment, the predominant oxidation state of Cu in cells is Cu(I). For instance, metallothioneins (MT) are small cysteine-rich proteins whose synthesis is induced when Cu is in excess of physiological requirements. They are sequestering Cu by forming Cu(I) clusters.[10] Many intracellular Cu transporters such as the yeast metallochaperone Atx1 contain the consensus MxCxxC sequence that binds soft metal ions with two cysteines.[11,12] A model peptide $\mathbf{P^C}$, incorporating the Atx1 binding sequence (MTCSGC, Scheme 1) was found highly selective for Cu(I) with respect to Zn(II), another essential metal ion found in cells.[13,14] In addition, we have also recently demonstrated that a tripodal pseudopeptide scaffold extended by three converging cysteines, mimics the selectivity of metallothioneins or other cysteine-rich proteins for the soft cations Cu(I) and Hg(II) with respect to other divalent ions.[15] Cysteine-based peptides or pseudopeptides appear to be efficient Cu(I) complexing molecules and we selected a peptide sequence with two cysteines to design the chelating unit.

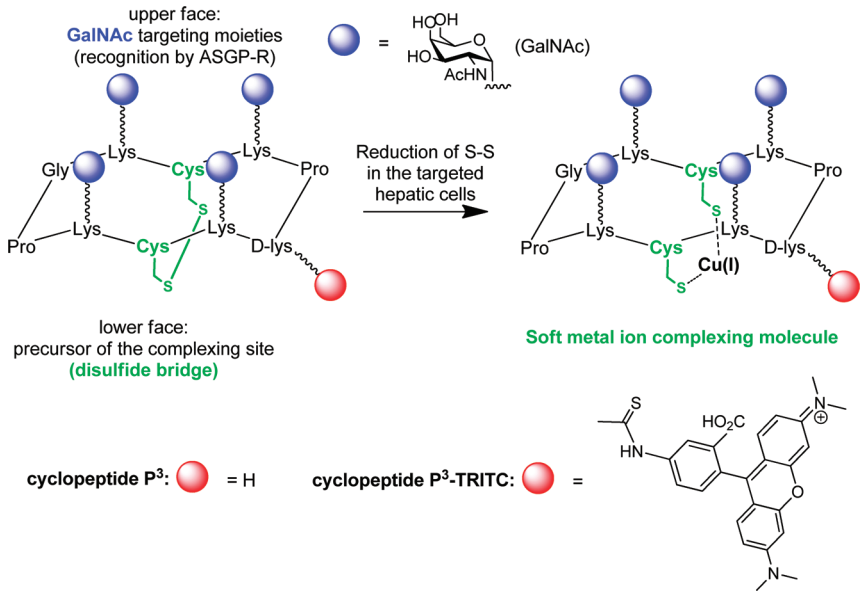
A well-known strategy for targeting hepatocytes[16] is to use ligands of the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) which is uniquely expressed on the surface of these cells.[17] Indeed, ASGP-R is a human hepatic lectin, which recognizes terminal galactose (Gal) and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) with a higher affinity for GalNAc than for Gal.[18] The affinity of ligands for this receptor is strongly dependent on the valency and the display of sugar residues.[19] While the affinity between lectin and monosaccharides is weak ($K_D \approx 0.1-1$ mM), sugar-protein interactions can be greatly enhanced by multivalent events commonly known as the "cluster glycoside effect".[20] The efficiency of such targeting units has been demonstrated for gene or drug delivery to cultured cells or to animals.[21]

In the present work, we chose a decapeptide scaffold with two independent faces to form regioselectively addressable functionalized templates (RAFTs).[22] Such cyclodecapeptides incorporate two prolylglycine sequences as β-turn inducers to constrain the backbone conformation into an antiparallel β sheet.[23,24] They display a controlled conformation that has been exploited successfully for diverse applications such as the design of nanovectors, synthetic vaccines, and protein mimics.[22] In addition, we have demonstrated that clusters of carbohydrates grafted at the surface of the cyclodecapeptide scaffold ensure the specific recognition with a significantly enhanced affinity for lectins through multivalent interactions in solution[25] and on solid support.[26,27] Moreover, cyclodecapeptides displaying less than four sugars or unspecific sugar units clearly show negligible binding ability for the targeted lectins.[26,27] Therefore, four αGalNac units were chemioselectively grafted on the upper face of this cyclodecapeptide which is then devoted to ASGP-R recognition and targeting. It has been estimated by molecular modeling that the distance between two sugar units is in the 15−25 Å range, which is similar to the distance between two binding sites in ASGP-R.[18,19] We thus expect that our vector binds to the ASGP-R through an efficient intramolecular mechanism (chelate effect).[28,29] Another advantage of such cyclopeptide scaffolds is the spatial separation between targeting and "drug-delivery" domains.[22,30] The lower face was used for soft metal ion complexation thanks to the thiol functions of two cysteines in the cyclopeptide sequence (Scheme 2). These thiol functions have been oxidized in a disulfide bridge to afford $\mathbf{P^3}$, which is stable in the presence of oxygen and most importantly which is not an efficient chelator before entering the hepatic cells: therefore, $\mathbf{P^3}$ can be considered as a prodrug activated in the reductive medium of the targeted cells (Scheme 2). Finally, one glycine among the β-turns, has been replaced by a D-lysine to introduce an organic fluorophore (TRITC) and to visualize the uptake of the compound in hepatic cell lines.

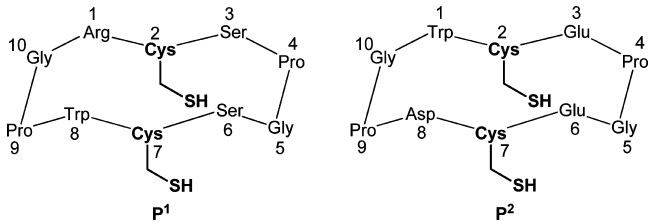
In this work, to assess the metal complexation properties of the reduced and active form of the targeting chelator $\mathbf{P^3}$ in cells, we first investigated two simple cyclodecapeptides devoid of the targeting units. These model peptides bear two cysteines in positions 2 and 7 mimicking the complexing unit of $\mathbf{P^3}$ in cells. As these cyclodecapeptides proved a high affinity for Cu(I) as well as a high selectivity with respect to Zn(II), the cyclopeptides bearing the targeting sugar units $\mathbf{P^3}$ and $\mathbf{P^3}$-TRITC represented

(10) Koch, K. A.; Pena, M. M. O.; Thiele, D. J. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 549–560. Stillman, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 461–511.
(11) Rosenzweig, A. C.; O'Halloran, T. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 140–147. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Molteni, E.; Huffman, D. L.; O'Halloran, T. V. *Genome Res.* **2002**, *12*, 255–271.
(12) Opella, S. J.; DeSilva, T. M.; Veglia, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *6*, 217–223.
(13) Rousselot-Pailley, P.; Sénèque, O.; Lebrun, C.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 5510–5520.
(14) Sénèque, O.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P. *Chem. Commun.* **2004**, 770–771.
(15) Pujol, A. M.; Gateau, C.; Lebrun, C.; Delangle, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6928–6929.
(16) Wu, J.; Nantz, M. H.; Zern, M. A. *Front. Biosci.* **2002**, *7*, d717–725.
(17) Ashwell, G.; Harford, J. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 531–554. Spiess, M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10009–10018.
(18) Baenziger, J. U.; Maynard, Y. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 4607–4613.
(19) Lee, Y. C.; Townsend, R. R.; Hardy, M. R.; Lonngren, J.; Arnarp, J.; Haraldsson, M.; Lonn, H. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199–202.
(20) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327.
(21) Kim, E. M.; Jeong, H. J.; Park, I. K.; Cho, C. S.; Moon, H. B.; Yu, D. Y.; Bom, H. S.; Sohn, M. H.; Oh, I. J. *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 557–567. Cai, G.; Jiang, M.; Zhang, B.; Zhou, Y.; Zhang, L.; Lei, J.; Gu, X.; Cao, G.; Jin, J.; Zhang, R. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 440–443. Yang, W.; Mou, T.; Peng, C.; Wu, Z.; Zhang, X.; Li, F.; Ma, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7510–7516.
(22) Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 224–240.
(23) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297–308.
(24) Peluso, S.; Rückle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432–437. Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Sénèque, O.; Cisnetti, F.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Delangle, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7083–7093.
(25) Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243–246.
(26) Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359–1362.
(27) Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2628–2636.
(28) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578.
(29) Wilczewski, M.; Van der Heyden, A.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1114–1122.
(30) Renaudet, O. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, *5*, 274–286.

Scheme 2. General Structure of Cu(I) Chelators Designed to Target Hepatocytes



Scheme 3. Formula of the Cyclodecapeptides **P**[1] and **P**[2] Which Bear Two Coordinating Cysteines in Positions 2 and 7[a]



[a] Only the side-chains of cysteines have been represented.

in Scheme 2 were next synthesized. In vitro complexation studies with **P**[3] demonstrated that this molecule binds Cu(I) only in a reducing medium, mimicking the intracellular compartment. Finally, cellular uptake and ability to lower intracellular copper were demonstrated in hepatic cell lines, making **P**[3] a good candidate to fight copper overload in the liver.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis and Characterization of the Model Chelating Peptides P[1] and P[2]. The two cyclodecapeptides **P**[1] and **P**[2] (Scheme 3) bearing two cysteines in positions 2 and 7 and modeling the reduced and active form of the targeting chelator **P**[3] in cells were first synthesized to evaluate their complexing ability for Cu(I) and divalent metal ions. A tryptophane residue was inserted in position 1 or 8 of the two model peptides to determine precisely the peptide concentration by measuring the absorbance of the indole moiety at 280 nm. In **P**[1], three polar residues (2 serines and one arginine) mimic the hydrophilicity of the sugar moieties on the upper face of **P**[3]. Aspartic and glutamic acids were inserted in the sequence of **P**[2] to provide a second model peptide with a negatively charged upper face bearing three carboxylate groups at physiological pH. This less realistic model of **P**[3] was designed to evaluate the influence of the upper face on the complexation properties of the two cysteines side-chains located at the lower face.

Classical solid-phase synthesis using Fmoc strategy was used to synthesize **P**[1] and **P**[2]. The 10-mer-protected precursors were assembled on the resin and cyclized in dichloromethane after cleavage from the resin. The side chains were subsequently deprotected. **P**[1] and **P**[2] are sensitive to air oxidation and were therefore stored and manipulated under argon in a glovebox.

Several isomers were detected in the NMR spectra of the two peptides, the major one representing ~70% of the total peptide concentration at 298 K. The evolution of the proportions of the different species as a function of temperature confirms that the latter are conformers in equilibrium at the NMR time scale. The two major species were fully assigned from a combination of COSY, TOCSY, and ROESY spectra following standard assignment procedures (see Tables S1 and S2 in the Supporting Information).[31]

In the major conformers of the two peptides, the trans conformation of the peptide bonds with prolines are evidenced by the presence of the short contacts (X3 Hα, Pro4 Hδ) and (X8 Hα, Pro9 Hδ). The XPGX motifs show the characteristic features of type II β-turn structures:[32] a cis relationship between Gly5 NH and Pro4 Hα (2.2 Å) and between Gly10 NH and Pro9 Hα (2.2 Å). Strong ROE cross peaks are also detected between X6 NH and Pro4 Hα (3.3 Å) or X1 NH and Pro10 Hα (3.3−3.5 Å). Finally, a short contact is detected between X6 NH and Gly5 NH or X1 NH and Gly10 NH (2.8−2.9 Å). These distances are reported in Table S4 of the Supporting Information.

The resonances of the minor conformers are not very intense which prevents their full characterization. As proposed by several authors,[23,33] they may correspond to isomerization of X-Pro bonds into cis isomer. Nevertheless, the two compounds **P**[1] and **P**[2] are good models of cyclodecapeptides bearing two cysteines in position 2 and 7 to coordinate soft metal ions.

2.2. Copper(I) Binding by the Model Peptides P[1] and P[2]. Binding of Cu(I) with the two model peptides **P**[1] and **P**[1] was investigated by UV and CD spectroscopy. It is known that Cu(I) disproportionates in Cu(0) and Cu(II) in water. Therefore, the experiments with this cation were conducted in the presence of acetonitrile which associates with Cu(I) and overcomes the

(31) Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
(32) Wüthrich, K.; Billeter, M.; Braun, W. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 715–740.
(33) Peng, Z.-H. *Biopolymers* **1999**, *49*, 565–574.

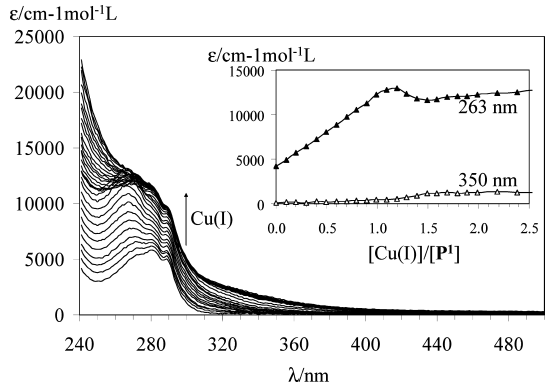


Figure 1. UV titration of $\mathbf{P}^1$ (65 μM) with Cu(I) at pH 7.4 (20 mM phosphate buffer/CH_3CN (v/v = 9/1)) at 298 K.

disproportionation reaction.[34] Binding of Cu(I) to the peptides was first monitored by UV spectroscopy. The addition of aliquots of tetrakis(acetonitrile) copper(I) hexafluorophosphate dissolved in acetonitrile over a peptide solution in a 9/1 (v/v) mixture of phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) and acetonitrile results in the appearance of a band centered at 263 nm that linearly increases with increasing Cu(I) concentration up to 1 equiv. This band is characteristic of charge-transfer transitions (LMCT) of the thiolate−Cu(I) bonds.[35] The extinction coefficient of this LMCT bands are 7620 and 7640 $M^{-1}cm^{-1}$ for Cu$\mathbf{P}^1$ and Cu$\mathbf{P}^2$ complexes, respectively. These values are compatible with the value found in MT of ∼7000/Cu bound.[36] In excess of Cu(I) other transitions appear, in particular at lower energy (350 nm), which may be attributed to the formation of often-encountered Cu(I)-thiolate clusters.[35,37] Typical absorption spectra of Cu(I) into a solution of $\mathbf{P}^1$ at pH 7.4 are illustrated in Figure 1.

The formation of a unique complex from 0 to 1 Cu equiv was confirmed by CD titrations. Indeed, intense dichroic bands develop in the CD spectrum of Cu$\mathbf{P}^1$ with positive and negative maxima at (+) 263 nm and (−) 289 nm that are attributed to thiolate−Cu LMCT transitions.[36] An isodichroic point is detected at 279 nm from 0 to 1 Cu(I) equiv demonstrating that the free peptide is transformed in only one complex.

These data are similar to what we observed with $\mathbf{P}^{\mathbf{C}}$ (Scheme 1), the model peptide of the yeast copper chaperone binding loop.[13] In this case, the monomolecular nature of the Cu**P** complexes could be demonstrated by investigating diffusion coefficients by Pulse Field Gradient NMR, and relating them to the volume of the species. Unfortunately, the copper complexes of $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$ were too insoluble in the concentration range of ^{1}H NMR (1 mM) to allow us to obtain reliable diffusion data for them. Nevertheless, the mononuclear complex Cu$\mathbf{P}^1$ (1091.25, $[\mathbf{P}^1$+Cu-2H$]^-$) is nicely evidenced in the (−)ESI-MS spectra, as illustrated in Figure 2. In excess of Cu(I), higher nuclearity complexes are detected like $[\mathbf{P}^1$+2Cu-3H$]^-$ at 1155.17 and $[2\mathbf{P}^1$+4Cu-2H$]^{2+}$ at 1157.2. The same tendency is observed with $\mathbf{P}^2$ even though the ESI-MS spectra are complicated by the formation of many sodium and potassium adducts due to the presence of three carboxylate functions in the free ligand.

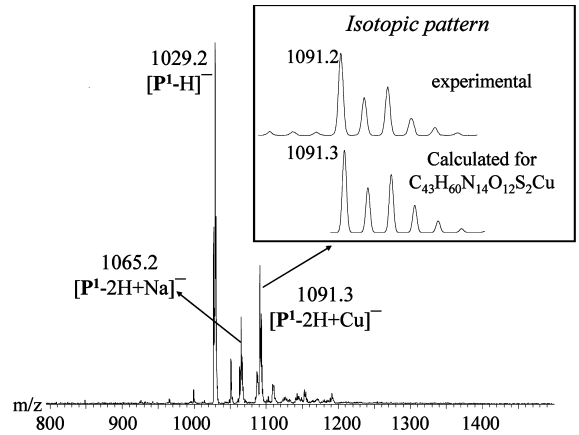


Figure 2. (−) ESI mass spectrum of a solution containing $\mathbf{P}^1$ (50 μM) and 1.0 equiv Cu(I) in $AcONH_4$ buffer (20 mM, pH 7).

To determine the conditional stability constants of the two Cu(I) peptide complexes (Cu**P**) at physiological pH, UV−visible titrations were performed in presence of a chelator of known affinity. Bathocuproine disulfonate (Na_2BCS) has been demonstrated to form a stable 1:2 complex, $Cu(BCS)_2^{3-}$, according to eq 1 with a constant, $\log\beta_{12} = 19.8$.[37]

$$Cu^+ + 2\,BCS^{2-} = Cu(BCS)_2^{3-} \qquad (1)$$

The complex $Cu(BCS)_2^{3-}$ exhibits an absorption band in the visible region with its maximum at 483 nm (ϵ = 13300 $M^{-1}cm^{-1}$). Titrations of the peptides $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$ preloaded with 0.8−0.9 equiv of Cu(I), with aliquots of the competitor (BCS^{2-}) solution shows the appearance of the absorption band of $Cu(BCS)_2^{3-}$ that corresponds to the transfer of the metal cation from the peptide to BCS^{2-}. These spectroscopic data were fitted according to eq 2 with the following conditional affinity constants: $\log\beta_{11}(\mathbf{P}^1) = 16.7(1)$ and $\log\beta_{11}(\mathbf{P}^2) = 15.5(1)$.

$$Cu\mathbf{P} + 2\,BCS^{2-} = \mathbf{P} + Cu(BCS)_2^{3-} \qquad (2)$$

It appears clearly that $\mathbf{P}^2$ is a less efficient copper complexing agent than $\mathbf{P}^1$ (or $\mathbf{P}^{\mathbf{C}}$). This difference can be attributed to the presence of the three negatively charged carboxylate functions which induce a charge repulsion with the CuS_2^- copper center. Unlike $\mathbf{P}^2$, $\mathbf{P}^1$ bears three neutral amino acids (1 Trp and 2 Ser) and a positively charged amino acid (Arg). The values of the affinity constants determined for the copper complexes of $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$ are somewhat lower than those reported for the model peptide of Atx1 (17.4 at pH 7.4)[13,14] or for the whole Atx1 protein.[37,38]

2.3. Divalent Metal Ion Complexes of $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$. Peptide sequences with two cysteines are known to efficiently complex soft or borderline divalent metal ions like Hg(II), Cd(II), Pb(II), and Zn(II).[12,39] In particular, the affinity for Zn(II) which is a potential competitor of Cu(I) in cells is an important parameter. Therefore, the complexes of the two model peptides $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$

(34) Kamau, P.; Jordan, R. B. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3879–3883.
(35) Fujisawa, K.; Imai, S.; Kitajima, N.; Moro-oka, Y. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 168–169.
(36) Pountney, D. L.; Schauwecker, I.; Zarn, J.; Vasak, M. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9699–9705. Faller, P.; Vasak, M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13341–13348.
(37) Xiao, Z.; Loughlin, F.; George, G. N.; Howlett, G. J.; Wedd, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3081–3090.
(38) Miras, R.; Morin, I.; Jacquin, O.; Cuillel, M.; Guillain, F.; Mintz, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 195–205.
(39) Rossy, E.; Seneque, O.; Lascoux, D.; Lemaire, D.; Crouzy, S.; Delangle, P.; Coves, J. *FEBS Lett.* **2004**, *575*, 86–90. Pufahl, R. A.; Singer, C. P.; Peariso, K. L.; Lin, S.-J.; Schmidt, P. J.; Fahrni, C. J.; Culotta, V. C.; Penner-Hahn, J. E.; O'Halloran, T. V. *Science* **1997**, *278*, 853–856. DiDonato, M.; Zhang, J.; Que, L, Jr.; Sarkar, B. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13409–13414. Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Su, X. C.; Miras, R.; Bal, N.; Mintz, E.; Catty, P.; Shokes, J. E.; Scott, R. A. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 638–650.

Table 1. LMCT Band Characteristics for Hg(II), Cd(II), Pb(II), and Cu(I) Complexes with $\mathbf{P^1}$ and $\mathbf{P^2}$, with $\Delta\epsilon = \epsilon(\mathrm{MP}) - \epsilon(\mathrm{P})$

	$\mathbf{P^1}$		$\mathbf{P^2}$	
	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Hg$\mathbf{P}^a$	210	13 600	210	18 600
	250	870	250	1 500
Cd$\mathbf{P}^a$			220	10 000
Cd($\mathbf{P}$)$_2{}^a$	230	21 000		
Pb$\mathbf{P}^b$	320	3 000	310	3500
Pb($\mathbf{P}$)$_2{}^b$	338	4 000		
Cu($\mathbf{P}$)^a	263	7 620	263	7 640

[a] Phosphate buffer 20 mM, pH 7.4. [b] Bis-Tris buffer 20 mM, pH 7.

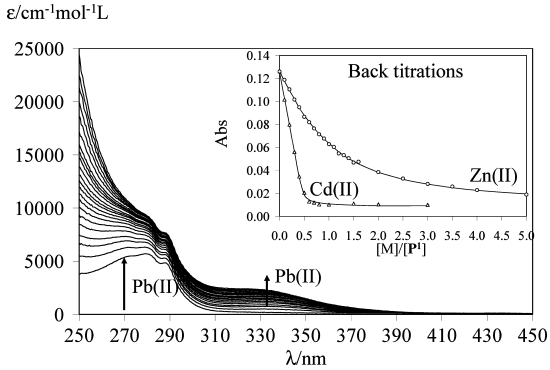


Figure 3. UV titration of $\mathbf{P^1}$ (65 μM) with lead chloride at pH 7.0 (20 mM Bis-Tris). Spectra correspond to samples with 0−5 equiv of Pb(II) per $\mathbf{P^1}$. Inset: absorbances at 330 nm during the back-titrations of Pb$\mathbf{P^1}$ ([$\mathbf{P^1}$] = 55 μM; [Pb] = 165 μM) with $CdCl_2$ (triangles) and $ZnCl_2$ (circles). The calculated lines were generated in specfit.

with divalent metal ions were also investigated by ESI-MS and UV spectroscopy. The UV titrations show the expected LMCT bands,[40,41] whose characteristics are reported in Table 1. Figure 3 illustrates the typical absorption spectra for the titration of Pb(II) into a solution of $\mathbf{P^1}$ at pH 7. Two successive complexes are detected in this titration as observed earlier with $\mathbf{P^C}$,[13] whereas only the ML complex is detected in a similar titration with $\mathbf{P^2}$. The ESI-MS spectra show systematically the presence of the unique ML complex with $\mathbf{P^2}$ whereas both species ML and ML_2 are seen with $\mathbf{P^1}$ (Table S5 of the Supporting Information). The stability constants have been measured as previously described with model peptides of the yeast copper chaperone Atx1, in Bis-Tris buffer, by analyzing the direct titration of the peptide with Pb(II) and the competition titration starting from the lead complex for Cd(II) and Zn(II).[13,40] For instance, it can be seen in the inset of Figure 3 that only 0.5 equiv of Cd(II) are needed to displace Pb(II) from the complex Pb$\mathbf{P^1}$, confirming the formation of the species Cd($\mathbf{P^1}$)$_2$ species.

Data collected in Table 2 show rather similar results to those obtained previously with the peptide $\mathbf{P^C}$, which mimics Atx1 binding loop.[13,14] The selectivity, Hg(II) > Cu(I) ≫ Cd(II) ≈ Pb(II) > Zn(II) is common for thiol-rich ligands. The metal complexes of $\mathbf{P^1}$ and $\mathbf{P^2}$ are systematically less stable than those of $\mathbf{P^C}$, indicating that the more rigid cyclodecapeptide scaffold of $\mathbf{P^1}$ and $\mathbf{P^2}$ with two cysteines in positions 2 and 7 has a lower affinity for metal ions than the flexible binding loop of $\mathbf{P^C}$, which can easily adapt to different coordination geometry.[14] Perhaps the most striking feature is that $\mathbf{P^1}$ tends to form ML_2 complexes,

Table 2. Apparent Equilibrium Constants ($\log\beta_{pq}$) at pH 7 and 298 K, in 20 mM Bis-Tris, $\beta_{pq} = [M_pP_q]/[M]^p[P]^q$

M	$\log\beta_{pq}$	$\mathbf{P^1}$	$\mathbf{P^2}$	$\mathbf{P^C}$
Pb(II)	$\log\beta_{11}$	7.4(2)	7.1(1)	8.0(1)
	$\log\beta_{12}$	11.9(5)		12.5(7)
Cd(II)	$\log\beta_{11}$		7.0(1)	9.2(1)
	$\log\beta_{12}$	15.0(2)		15.6(1)
Zn(II)	$\log\beta_{11}$	6.6(1)	5.9(1)	6.8(2)
Hg(II)	$\log\beta_{11}$	>19.7^a	>18.5^a	>18.6
Cu(I)	$\log\beta_{11}$	16.7(1)^a	15.5(1)^a	16.6(1)

[a] At pH 7.4 in 20 mM phosphate buffer.

whether $\mathbf{P^2}$ forms only ML complexes. These two observations could be the result of the negative charge (3^-) of the "upper" face of the cyclodecapeptide $\mathbf{P^2}$ due to the three carboxylate functions, which may induce electrostatic repulsions in the metal complexes and in particular in the species M($\mathbf{P^2}$)$_2$. Moreover, $\mathbf{P^2}$ has a lower affinity than $\mathbf{P^1}$.

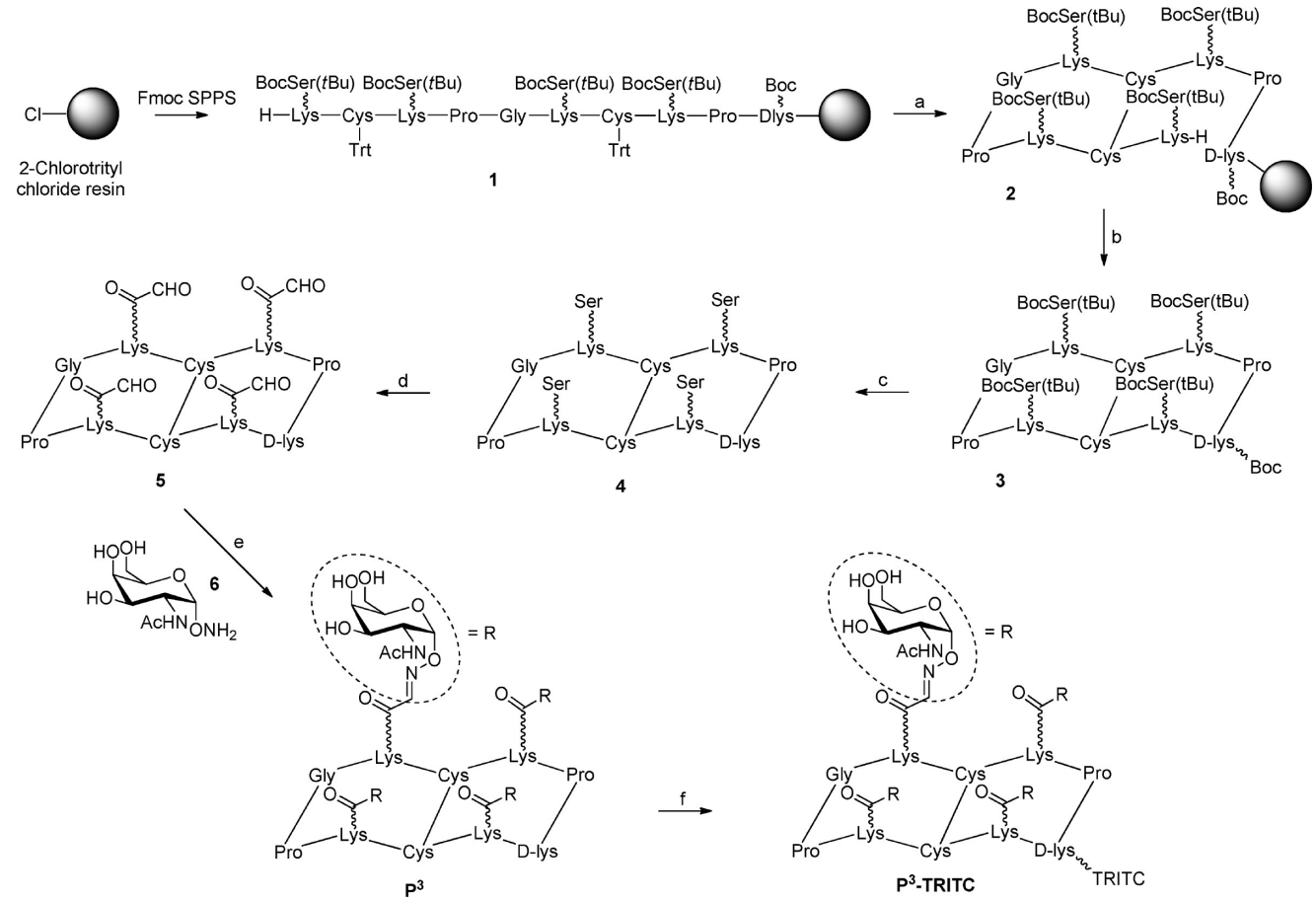
These experiments have clearly demonstrated that the two cyclodecapeptides $\mathbf{P^1}$ and $\mathbf{P^2}$ bearing two cysteines oriented on one face of the scaffold are efficient binders of soft ions Cu(I) and Hg(II) with a high selectivity with respect to Zn(II), an essential metal ion for the cell. This design allowed us to use the second face of the peptide scaffold to introduce ligands of the ASGP-R to target the Cu(I) complexing peptides at the hepatocytes. $\mathbf{P^3}$, the resulting molecule, is expected to enter hepatocytes and once in the cells to bind Cu(I) without perturbing Zn(II) homeostasis. $\mathbf{P^3}$ should also be an efficient chelator of intracellular Hg(II) if the cells were exposed to mercury.

2.4. Synthesis of the Targeted Peptides $\mathbf{P^3}$ and $\mathbf{P^3}$-TRITC. The syntheses of $\mathbf{P^3}$ and $\mathbf{P^3}$-TRITC are described in Scheme 4. Classical solid-phase peptide synthesis using the Fmoc strategy was used to assemble the linear intermediate **1** on a 2-chlorotrityl chloride resin, starting from commercial Fmoc protected amino acids and the Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]−OH building block, which was obtained from Boc-Ser(*t*Bu)−OSu and Fmoc-Lys-OH as previously described.[42] The on-resin linear peptide **1** was then oxidized with iodine to afford the disulfide compound **2**, which was then cleaved from the resin in mild acidic conditions and subsequently cyclized in DMF to afford the protected cyclodecapeptide **3**. After deprotection of the lysine side-chains by acidolysis, **4** was obtained with a 33% overall yield from **1**.

The incorporation of carbohydrate recognition motifs was performed following an oxime-based strategy from the aminooxylated sugars.[27] Although sodium periodate is known to oxidize thioethers[43] and disulfide bridges,[44] the selective oxidation of serines in the presence of disulfide bridges has recently been described.[45] Following this procedure, we have treated **4** with sodium periodate to afford the cyclodecapeptide **5** which presents four glyoxyaldehyde functions with a 15% yield. However, the thiosulfinate byproduct was evidenced by mass spectrometry (M(**4**) + 16) and isolated in nearly 40%, even working with stoichiometric amounts of sodium periodate (4 equiv.) and short reaction times (15 min). Then the oxime conjugation of **5** with an excess of O-α-D-*N*-acetylgalactopyranosyl oxyamine (αGalNAcONH$_2$, **6**),[27] afforded the desired compound $\mathbf{P^3}$. Finally, tetramethylrhodamine isothiocyanate

(40) Payne, J. C.; terHorst, M. A.; Godwin, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6850–6855.
(41) Matzapetakis, M.; Farrer, B. T.; Weng, T.-C.; Hemmingsen, L.; Penner-Hahn, J. E.; Pecoraro, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8042–8054.
(42) Fouillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983–991.
(43) Hiskey, R. G.; Harpold, M. A. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3191–3194.
(44) Juaristi, E.; Cruz-Sanchez, J. S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3334–3338.
(45) Avrutina, O.; Schmoldt, H. U.; Gabrijelcic-Geiger, D.; Wentzel, A.; Frauendorf, H.; Sommerhoff, C. P.; Diederichsen, U.; Kolmar, H. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 33–37.

Scheme 4. Syntheses of the Derivatives **P**[3] and **P**[3]-TRITC[a]



[a] Reagents and conditions: (a) I_2, DMF; (b) i: TFA/CH_2Cl_2 1%; ii; PyBOP, DIEA, DMF; (c) TFA/TIS/H_2O (95:2.5:2.5); (d) $NaIO_4$, H_2O; (e) **6**, 10% AcOH aq.; and (f) TRITC, DIEA, DMF.

(TRITC) was coupled to the D-Lys side chain of **P**[3] to give the red-fluorescent compound **P**[3]-TRITC.

2.5. Copper Complexation by P[3]. The ability of **P**[3] to complex copper was evaluated using BCS as a Cu(I) chelator as described in Section 2.2. Indeed, the absorption of the orange complex $Cu(BCS)_2^{3-}$ gives the amount of copper bound to BCS and therefore, the more intense is this band, the lower is the affinity of the peptide for Cu(I).

As expected, **P**[3] does not bind to Cu(I) as it contains a disulfide bridge and no free thiolate functions: as seen in Figure 4, in that case 100% of Cu is bound to BCS. To mimic the reducing intracellular medium, 1 mM of glutathione (GSH) was introduced into the sample.[46] This induced a decrease of the $Cu(BCS)_2$ complex absorption to 40% of the total Cu, which can be interpreted by the reduction of the disulfide bridge of **P**[3] by GSH to afford $\mathbf{P}^3_{SH\text{-}SH}$ that contains two thiolate functions and is therefore able to complex Cu(I). Interestingly, as seen in Figure 4, $\mathbf{P}^3_{SH\text{-}SH}$ binds Cu(I) with an affinity which is between those measured with the two peptides **P**[1] and **P**[2] mimicking $\mathbf{P}^3_{SH\text{-}SH}$ binding site. As GSH is known to complex Cu(I),[47] copper uptake by 1 mM GSH in the absence of peptide was evaluated.

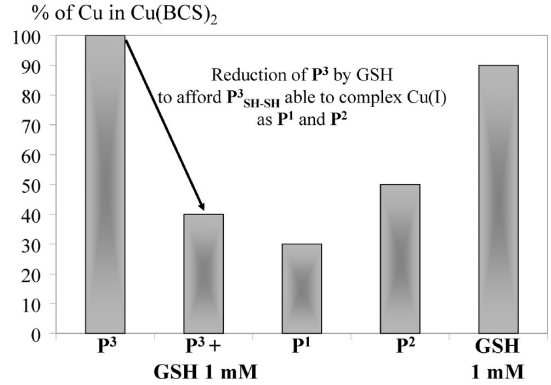


Figure 4. Percentage of Cu in the complex $Cu(BCS)_2$ for samples containing [Cu] = 0.9[**P**], [**P**] = 50 μM, and [BCS] = 2[Cu] in 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 at 298 K.

This induced a decrease of the $Cu(BCS)_2$ complex absorption to only 90% of the total Cu, therefore insignificant in comparison with the effect of reduced **P**[3].

These experiments demonstrate that **P**[3] is not a copper complexing agent. However, once reduced by GSH, **P**[3] becomes an efficient Cu(I) chelator. A similar activation of **P**[3] is therefore expected to occur in the cells.

2.6. P[3] and P[3]-TRITC in Hepatic Cell Lines. Hepatocytes are polarized cells, displaying apical poles in contact with the outer medium, basal poles in contact with the inner medium, and lateral poles in contact with adjacent cells. In the liver, the outer

(46) Meister, A.; Anderson, M. E. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711–760.

(47) Österberg, R.; Ligaarden, R.; Persson, D. *J. Inorg. Biochem.* **1979**, *10*, 341–355. Corazza, A.; Harvey, I.; Sadler, P. J. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 697–705. Poger, D.; Fillaux, C.; Miras, R.; Crouzy, S.; Delangle, P.; Mintz, E.; Den Auwer, C.; Ferrand, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1239–1248.

medium is represented by a complex net of bile canaliculi formed by the union of apical poles of adjacent hepatocytes, sealed by tight junctions, and in which bile is collected. The inner medium is blood. ASGP-R is embedded in the basal (also called sinusoidal) membrane. Transport of molecules across the cell is an typical characteristic of hepatocytes. It is performed by a number of carrier proteins localized either at the sinusoidal or at the canalicular membrane. Unfortunately, this uneven distribution which ensures vectorial transport across hepatocytes is not easy to maintain in primary cultures (the bile acid uptake toward canaliculus decreases and disappears in 1−4 days).[48]

To study the ability of our chelators to bind Cu(I) inside cells, we used different hepatic cell lines. We first checked that **P**^{3}-TRITC would enter HepG2 cells, the most commonly used human hepatic cell line. Since HepG2 cells are poorly polarized, we also followed the chelator entry in WIF-B9 cells, which are able to reconstitute remarkably stable and polarized epithelia with functional bile canaliculi within 7−10 days.[49]

As recalled in the introduction, cells cannot cope with excesses of copper. When hepatocytes are subjected to high copper concentrations in the outer medium such as 20−200 μM, their first reaction is to pump copper out of the intracellular medium. To achieve this, ATP7B, their copper pump is recruited by moving toward the canalicular membrane to transfer copper into the bile. Although copper-induced ATP7B trafficking has been observed in both HepG2 and WIF-B9 cells,[50,51] the latter were preferred for their well-defined canalicular membrane. Indeed, WIF-B9 cells allowed us to use ATP7B intracellular localization changes to witness changes in the intracellular copper concentration.[51]

2.6.1. Entry of P^3-TRITC in Hepatic Cell Lines. The cells were kept in culture for the time needed to reconstitute an epithelium. For comparison, we have observed the kinetics of **P**^{3}-TRITC uptake by HepG2 and WIF-B9 cells. The molecule was visualized inside the cells by the red fluorescence signal of tetramethylrhodamine. As shown in Figure 5, HepG2 cells in contact with 0.2 μM **P**^{3}-TRITC for 2 h have incorporated some of the fluorescence dye. The longer the incubation, the more dye was incorporated, suggesting that the cells were progressively loaded with **P**^{3}-TRITC, although the presence of non-fluorescent cells was noticed even after 24 h of incubation, as expected from their low expression of ASPG-R.[52] A stronger fluorescent signal was observed in WIF-B9 cells after 2 h of incubation. This signal increased with time and after 24 h, all cells have accumulated **P**^{1}-TRITC. Moreover, the dye was concentrated around the bile canaliculi and fluorescence was detected in some canalicular spaces. Therefore, the **P**^{3}-TRITC molecule is able to get inside the cells within 2 h, to accumulate, and even to reach the bile canaliculus within a few hours.

2.6.2. Copper Complexation in Hepatic Cells. In the present study, we used the trafficking of ATP7B as a sensor of intracellular copper concentration changes. ATP7B belongs to the P-type ATPase family of cation-transporting membrane proteins which use ATP hydrolysis to transport ions across the membrane against their electrochemical gradient. ATP7B changes its localization in response to changes in intracellular Cu: under low-Cu conditions ATP7B plays its housekeeping role in the trans-Golgi network, close to the nucleus; under high-Cu conditions, ATP7B plays its detoxification role in the membrane of small cytoplasmic vesicles close to the canalicular membrane.[3] These vesicles are thought to be filled with Cu that is eventually thrown out of the cell into the canaliculus. Therefore, thanks to the well-defined canalicular membrane of WIF-B9 cells, ATP7B localization can be seen as an indicator of intracellular copper.

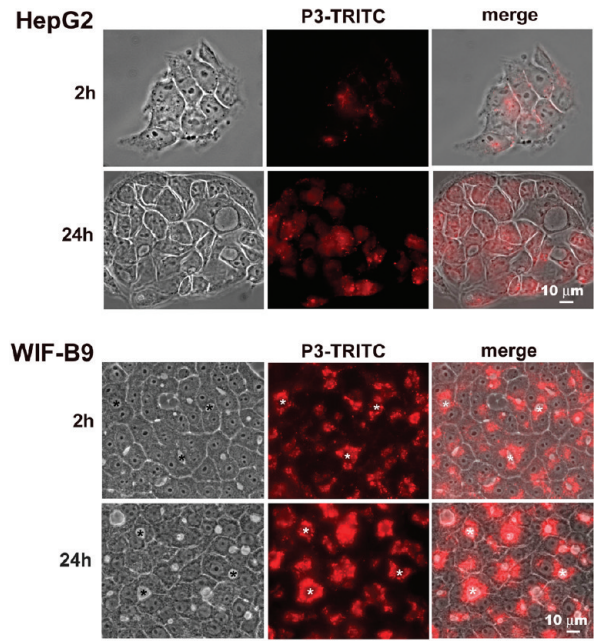


Figure 5. **P**^{3}-TRITC (0.2 μM) uptake by HepG2 and WIF-B9 cells. In the phase contrast image (left panels), the light gray spaces between adjacent WIF-B9 cells correspond to bile canaliculi, some of which are indicated by an asterisk.

First of all, we determined the lowest copper concentration that would induce a clear trafficking of the endogenous ATP7B. A typical example is shown in Figure 6, where ATP7B (in green) was localized in cells incubated with the basal copper concentration found in the culture medium (Cu $\approx$ 0.01 μM) and in cells incubated for 2 h in the culture medium supplemented with 1 μM Cu. In low-Cu, ATP7B is present in the trans-Golgi network near the nucleus; in high-Cu, ATP7B is mainly localized in a continuous crown around the canaliculus to excrete the excess of copper, as expected.[51] This experiment demonstrates that the localization of ATP7B is a sensor of intracellular copper and can therefore be used to assess the ability of **P**^{3} to lower intracellular copper.

Therefore, the next step was to test the effect of **P**^{3} on ATP7B intracellular localization. To achieve this, WIF-B9 cells were incubated with 1 μM Cu for 2 h, followed by the addition of 10 μM **P**^{3} to the culture medium for 3 h (Figure 7B), or no chelator for control (Figure 7A). In these experiments, ATP7B (in green) was localized together with ZO-1 (in red), a protein which belongs to the tight-junctions that associate apical poles of adjacent hepatocytes and seal the bile canaliculi formed

(48) Kukongviriyapan, V.; Stacey, N. H. *J. Cell. Physiol.* **1989**, *140*, 491–497.
(49) Ihrke, G.; Neufeld, E. B.; Meads, T.; Shanks, M. R.; Cassio, D.; Laurent, M.; Schroer, T. A.; Pagano, R. E.; Hubbard, A. L. *J. Cell. Biol.* **1993**, *123*, 1761–1775. Shanks, M. R.; Cassio, D.; Lecoq, O.; Hubbard, A. L. *J. Cell Sci.* **1994**, *107*, 813–825. Decaens, C.; Durand, M.; Grosse, B.; Cassio, D. *Biol. Cell* **2008**, *100*, 387–398.
(50) Roelofsen, H.; Wolters, H.; Van Luyn, M. J.; Miura, N.; Kuipers, F.; Vonk, R. J. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 782–793.
(51) Guo, Y.; Nyasae, L.; Braiterman, L. T.; Hubbard, A. L. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *289*, G904–G916.
(52) Collins, J. C.; Paietta, E.; Green, R.; Morell, A. G.; Stockert, R. J. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11280–11283.

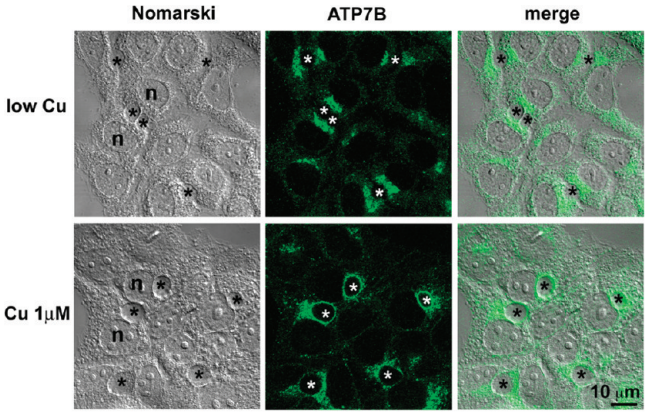


Figure 6. ATP7B localization in WIF-B9 cells—effect of copper concentration. ATP7B localization was detected by indirect immunofluorescence and imaged by confocal microscopy. WIF-B9 cells were kept in the basal culture medium (upper panel) or supplemented with 1 μM copper (lower panel) for 2 h. In each panel are presented from left to right, the Nomarski image, one confocal section taken in the middle of the cell layer, and the merge image. Bile canaliculi were indicated by asterisks; n: nucleus.

between cells.[53] ZO-1 was confined as dots or lines closing the bile canaliculi. In the control experiment (Figure 7A), most of the fluorescence signal localizing ATP7B was encircling bile canaliculi, as expected in high-Cu condition (Figure 6, lower panel). The diffusion around the canaliculi can be attributed to ATP7B molecules that were not yet at the canalicular membrane. In the presence of 10 μM **P**^{3} (Figure 7B), the distribution of ATP7B was different and became asymmetrical. ATP7B was no more present as continuous crowns around the bile canaliculi closed by ZO-1, but was now localized in a larger compartment reminiscent of the trans-Golgi network, situated near the nucleus, as in cells cultured in low Cu concentration (Figure 6, upper panel). To evaluate a possible role of the glycopeptide that would be independent of its affinity for copper, the experiment in high-Cu was repeated with **P**^{3}**-Ala,** a low affinity glycopeptide similar to **P**^{3} except for substituting alanines for the two cysteines (see SI Scheme S1). In this experiment, ATP7B localization (Figure 7C) was the same as that obtained without any glycopeptide (Figure 7A), indicating that the glycopeptide does not interfere with ATP7B trafficking. Therefore, these experiments provide evidence that the effect of **P**^{3} (Figure 7B) is due to its two cysteine residues which provide the high affinity for Cu(I).

To summarize, ATP7B intracellular localization indicates the disappearance of excess intracellular copper in the presence of **P**^{3}, thereby demonstrating its ability to lower intracellular copper. As we demonstrated that **P**^{3} is able to efficiently chelate Cu(I) in vitro in presence of GSH (Figure 4), these cell studies suggest that **P**^{3} acts as an intracellular copper chelator.

3. Conclusions

In the present work, we designed a molecule able to both complex intracellular copper, namely Cu(I), and target hepatocytes, combining a chelating unit with a carbohydrate recognition element within the same structure. A cyclodecapeptide scaffold displaying a controlled conformation with two independent faces was chosen to introduce the chelating and the recognition units. One face displays a cluster of carbohydrates to ensure an efficient recognition of ASGP-R, which are expressed on the surface of hepatocytes. The second face is devoted to metal ion complexation and a peptide sequence with two cysteines was selected to design the Cu(I) chelating unit. Indeed, cysteine-based peptides or pseudopeptides, inspired from some natural Cu(I) binding proteins appeared to be efficient Cu(I) complexing molecules. Another challenge was to obtain a chelator that would be activated by its entry inside the cells, in other words that would not be spoiled before reaching its final destination. To achieve this, the two thiol functions were oxidized in a disulfide bridge to afford the glycopeptide **P**^{3}, which is stable in the presence of oxygen and most importantly which is not an efficient chelator before entering the hepatic cells.

We demonstrated that the cyclodecapeptide scaffold bearing two cysteine side-chains on the same face are efficient binders of soft ions Cu(I) and Hg(II) with a high selectivity with respect to Zn(II). As expected **P**^{3} bearing hidden thiol functions oxidized in a disulfide bridge, is not a copper chelating agent, whereas once reduced by glutathione mimicking the intracellular reducing environment, **P**^{3} becomes an efficient Cu(I) chelator. The uptake of a fluorescent analogue of **P**^{3} by various hepatic cell lines proved the efficiency of the targeting unit. WIF-B9 cells which reconstitute polarized epithelia have offered a sensitive test to prove the intracellular copper lowering efficiency of **P**^{3} by monitoring the trafficking of the copper ATPase ATP7B. The glycocyclopeptide **P**^{3} can thus be considered as a prodrug activated in the reductive medium of the targeted cells to chelate excess Cu(I).

The redox properties of copper make it a toxic element for the cell when its homeostasis is disturbed. Therefore, the development of intracellular copper chelators such as **P**^{3} is of major interest to fight intracellular copper accumulation for patients suffering from Wilson's disease. The selectivity of **P**^{3} for Cu(I) with respect to Zn(II) is an important achievement as it allows to bind Cu(I) without perturbing Zn(II) homeostasis. Provided that a specific targeting unit can be defined, this strategy can be extended to many other cell types. In addition, since **P**^{3} has a high affinity for the toxic ion Hg(II), it could also be used as a mercury chelator.

4. Experimental Section

4.1. Peptide Synthesis. 4.1.1. Abbreviations. Ac_2O, acetic anhydride; DMF, *N*,*N*-dimethylformamide; DIEA, *N*,*N*-diisopropylethylamine; DTT, dithiothreitol; Et_2O, diethylether; Fmoc, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl; PyBOP, (benzotriazole-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate; TFA, trifluoroacetic acid; TIS, triisopropylsilane; TRITC, tetramethylrhodamine isocyanate.

4.1.2. General Details. All chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich or Acros and used without further purification. Protected amino acids were obtained from Advanced ChemTech, Bachem Biochimie, and France Biochem. 2-Chlorotrityl Chloride Resin and PyBOP were purchased from France Biochem. Mass spectra were acquired with an Esquire 3000 Bruker or with a LXQ type THERMO SCIENTIFIC spectrometer both equipped with a electrospray ionization (ESI) source or with a MALDI-TOF mass spectrometer BRUKER. The building blocks Fmoc-Lys[BocSer(tBu)]—OH and O-α-D-galactopyranosyl oxyamine (αGalNAcONH$_2$, **6**) were synthezised as previously described.[27,42] The low affinity glycopeptides **P**^{3}**-Ala** was synthesized as previously described.[25]

4.1.3. P^1 and P^2 Synthesis. The linear precursors with protected side-chains HArg(Pbf)-Cys(Trt)-Ser(*t*Bu)-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)Cys(Trt)-Trp(Boc)Pro-Gly-OH and H-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Glu(*t*Bu)-Pro-Gly-Glu(*t*Bu)-Cys(Trt)-Asp(*t*Bu)-Pro-Gly-OH were assembled manually by solid-phase peptide synthesis on 2-Chlorotrityl Chloride Resin (substitution 0.5 mmol/g, 500 mg) using Fmoc chemistry. Couplings were performed with *N*-α-Fmoc-protected amino acids (2 equiv), PyBOP (2 equiv), and DIEA (6 equiv) in DMF for 30 min. After each coupling, the resin was treated with DMF/pyridine/Ac_2O ($v/v/v$ = 7/2/1) to acetylate unreacted amino groups (2 × 5 min). Fmoc deprotection

(53) Decaens, C.; Rodriguez, P.; Bouchaud, C.; Cassio, D. *J. Cell Sci.* **1996**, *109*, 1623–1635.

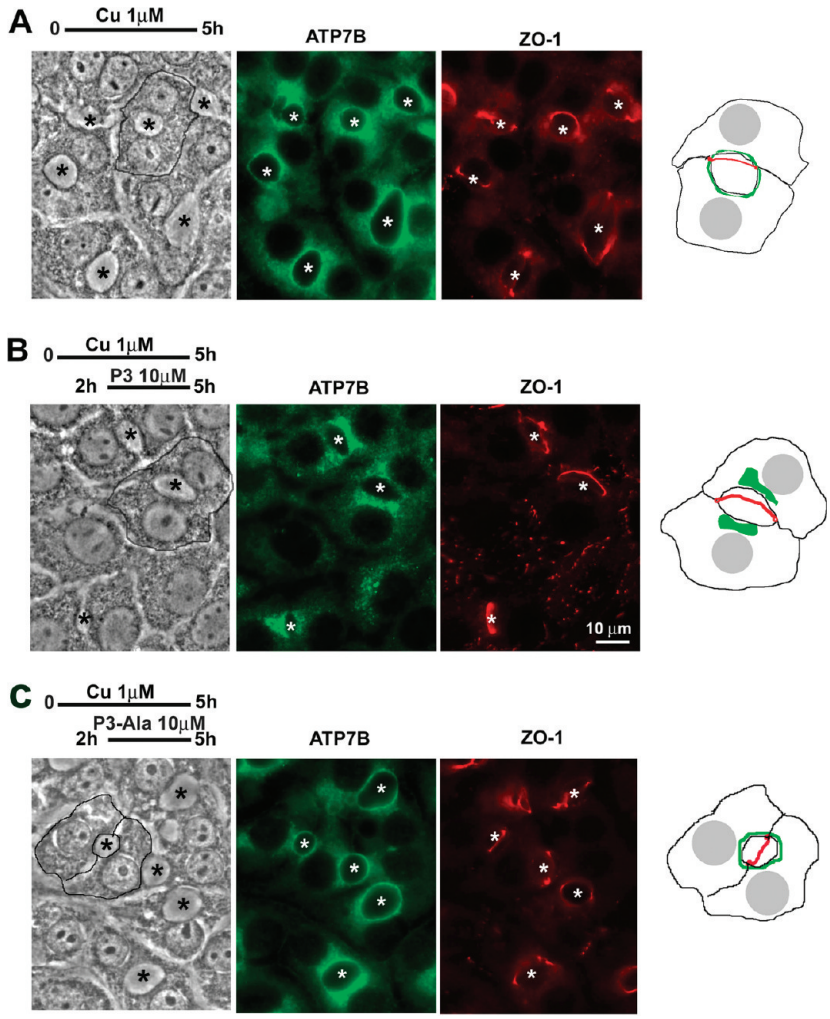


Figure 7. ATP7B localization in WIF-B9 cells—effect of **P**^{3}. ATP7B and ZO-1 were localized by indirect immunofluorescence. WIF-B9 cells were kept in the presence of 1 μM Cu for 5 h (A,B,C) and 10 μM **P**^{3} (B) or **P**^{3}**-Ala** (C) was added after 2 h and for a 3 h-period. The phase contrast images (left panels) allow direct visualization of the bile canaliculi indicated by asterisks. The localization of ZO-1 allows the visualization of tight junctions sealing bile canaliculi and gives a better view of the geometry of these structures. ATP7B is differently distributed in B, compared to A and C, as schematized in the right panels showing one doublet of WIF-B9 cells forming one bile canaliculus (the doublet schematized is underlined by a thin black line on the corresponding phase contrast image).

was achieved with DMF/piperidine ($v/v = 4/1$) (3 × 5 min). The yield of each peptide coupling was monitored by UV−vis spectroscopy (ε_{300}= 7800 L mol^{-1} cm^{-1} for the piperidine adduct dibenzofulvene). The peptide was cleaved from the resin by treatment with 15 mL CH_2Cl_2/TFA ($v/v = 99/1$) (2 × 3 min). The cleavage was performed very quickly, and the solution was flushed into 15 mL of Methanol/Pyridine solution ($v/v = 8/2$). After concentration, the residue was precipitated several times in cold Et_2O to obtain a white powder. The linear precursor was then reacted in CH_2Cl_2 (0.5 mM) with PyBOP (3 equiv) and DIEA (4 equiv). The cyclic peptide formation was followed by analytical HPLC and the reaction was completed after 10 min. CH_2Cl_2 was then evaporated. The oily residue was precipitated with CH_2Cl_2/Et_2O to yield the cyclic peptide as a powder. The side-chain protections were removed by treatment with a solution of 1.4 g DTT in TFA/TIS/H_2O/ ($v/v/v/v = 95/2.5/2.5$) (peptide concentration = 10 mM). After stirring for 2 h, the solution was evaporated under reduced pressure to yield yellow oil which was precipitated several times with cold Et_2O. The solid residue was dissolved in water/acetonitrile, filtered on PTFE 0.45 μm and purified by preparative RP-HPLC (Merck Purospher, 250 × 40 mm, 10 μm C18 particles, solvent $A = H_2O$/TFA ($v/v = 99.925/0.075$), solvent B = CH_3CN/H_2O/TFA ($v/v/v = 90/10/0.1$), gradient 5 to 45% of B in 30 min, flow rate 75 mL/min) to yield **P**^{1} as a white powder (52 mg, 19% overall yield), or **P**^{2} as a white powder (144 mg, 53% overall yield). Analytical RP-HPLC were performed using analytical column (Merck Purospher-STAR end-capped, 4.6 × 250 mm, 5 μm C18 particules) at 1 mL/min with UV monitoring at 214 nm. **P**^{1}**:** Analytical HPLC Purity: 96%, Rt = 15.7 min (gradient 5 to 60% of B in 30 min). MALDI-TOF mass spectrometry: calculated for $C_{43}H_{62}N_{14}O_{12}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1031.41, exp = $[M+H^+]^+$ =1031.45. **P**^{2}: Analytical HPLC Purity: 98%, Rt = 23.6 min (gradient 5 to 45% of B in 30 min). MALDI-TOF mass spectrometry: calculated for $C_{45}H_{59}N_{11}O_{16}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1074.36, exp = $[M+H^+]^+$ 1074.65.

4.1.4. P^3 and P^3-TRITC Synthesis. Analytical and preparative RP-HPLC analyses were performed using a Waters system, equipped with a UV detector (λ = 214 and 250 nm). HPLC analyses were performed on a Macherey-Nagel Nucleosil 120 Å 3 mm C18 particles (30 × 4.6 mm) using a gradient from solvent A (water/TFA ($v/v = 99.9/0.1$)) to solvent B (acetonitrile/water/TFA ($v/v/v$ = 90/10/0.1)) at a flow rate of 1.3 mL/min. RP-HPLC was performed on a Delta-Pack 100 Å 15 mm C18 particles (200 × 2.5 mm) using the same gradient at a flow rate of 22 mL/min.

Synthesis of 4. The linear precursor with protected side-chains **1** was assembled manually by solid-phase peptide synthesis on 2-Chlorotrityl Chloride Resin (substitution 0.4 mmol/g, 0.507 g, 0.202 mmol) using Fmoc chemistry.[54] The resin was swollen with CH_2Cl_2 (10 mL, 1 × 10 min) and DMF (10 mL, 1 × 10 min). Couplings were performed with N-α-Fmoc-protected amino acids

(54) Sheppard, R. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 545–552.

or Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]−OH (2.5 equiv, 0.5 mmol), PyBOP (2.5 equiv, 0.5 mmol) and DIEA (pH ≈ 8−9) in DMF (10 mL) for 30 min. After washing with DMF (10 mL, 4 × 1 min) and CH_2Cl_2 (10 mL, 2 × 1 min), the completeness of the coupling reaction was controlled by Kaiser or TNBS tests. *N*-α-Fmoc protecting groups were removed by treatment with a DMF/piperidine solution (*v*/*v* = 4/1, 10 mL, 3 × 10 min). After washing with DMF (10 mL, 6 × 1 min), the completeness of deprotection was verified by the UV absorption of piperidine washings at 299 nm. After the last coupling reaction, on-resin **1** was obtained (0.13 mmol, yield = 64%). The resin (0.13 mmol) was swollen with CH_2Cl_2 (10 mL, 1 × 10 min) and DMF (10 mL, 1 × 10 min). Iodine (0.660 g, 2.60 mmol) and DMF (10 mL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 1.5 h. After filtration, the resin was washed with DMF (10 mL, 6 × 5 min), DMF/Water v/*v* = 1/1 (10 mL, 2 × 5 min), DMF (10 mL, 1 × 5 min) and CH_2Cl_2 (10 mL, 3 × 5 min). The peptide was then cleaved from the resin by treatment with CH_2Cl_2/TFA (*v*/*v* = 99/1, 10 mL, 10 × 2 min). The filtrate was recovered and DIEA (1 mL) was added to avoid deprotection during the evaporation. After concentration, the residue was precipitated in Et_2O. The linear precursor was then reacted in DMF (∼0.5 mM) with PyBOP (0.074 g, 0.14 mmol) and DIEA (0.08 mL, 0.39 mmol) for 2 h. DMF was evaporated under reduced pressure. The oily residue was precipitated with CH_2Cl_2/Et_2O to yield the cyclic peptide **3** as a powder. Removal of side-chain protecting groups was performed in TFA/H_2O/ (*v*/*v* = 90/10, 20 mL). After stirring for 2 h, the solution was evaporated to yield a yellow oil which was precipitated with Et_2O to obtain the deprotected peptide **4** as a white solid (0.097 g, 0.067 mmol, 33%). Analytical HPLC Purity: 83%, *Rt* = 6.13 min (Linear gradient: 95/5 to 60/40 A/B in 15 min). ESI-MS calculated for $C_{60}H_{105}N_{19}O_{18}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1444.74, exp: $[M+H^+]^+$ = 1444.58, $[M+2H^+]^{2+}$ = 722.92, $[M+3H^+]^{3+}$ = 482.33.

Synthesis of 5. To a solution of compound **4** (0.064 g, 0.044 mmol) in water (8 mL), sodium periodate (0.380 g, 1.77 mmol) was added. After 15 min, the reaction mixture was injected in RP-HPLC (*Rt* = 14 min, linear gradient: 95/5 to 60/40 A/B in 15 min), to yield **5** as a white powder (0.009 g, 0.0068 mmol,15%) after lyophilization. ESI-MS calculated for $C_{56}H_{85}N_{15}O_{18}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 1320.57, exp: $[M+H^+]^+$ = 1320.5.

Synthesis of P^3. To a solution of compound **5** (0.025 g, 0.019 mmol) in AcOH/water (4 mL, v/*v* = 1/9), O-α-D-galactopyranosyl oxyamine (**6**) was added (0.045 g, 0.192 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature during 1 h. Then, the mixture was injected in RP-HPLC (*Rt* = 14−16 min, linear gradient: 95/5 to 60/40 A/B in 15 min) to yield $\mathbf{P^3}$ as a white powder (0.021 g, 0.0096 mmol, 50%) after lyophilization. Analytical HPLC Purity: 95%, *Rt* = 9.25 min (linear gradient: 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min). ESI-MS: calculated for $C_{88}H_{141}N_{23}O_{38}S_2$, $[M+H^+]^+$ = 2192.92, exp: $[M+H^+]^+$ = 2193.5.

Synthesis of P^3-TRITC. TRITC (0.003 g, 0.0067 mmol) and a few drops of DIEA (pH ≈ 8−9) were added to a solution of compound $\mathbf{P^3}$ (0.012 g, 0.0055 mmol) in DMF (2 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature during 2 h and injected in RP-HPLC (*Rt* = 19 min, linear gradient: 95/5 to 60/40 A:B in 15 min) to yield $\mathbf{P^3}$-TRITC as a pink powder (0.0012 g, 0.00046 mmol, 8%) after lyophilization. Analytical HPLC Purity: 90%, *Rt* = 14.4 min (linear gradient: 100% water to 50/50 water/acetonitrile in 16 min). ESI-MS: calculated for $C_{113}H_{163}N_{26}O_{41}S_3^+$, $[M]^+$ = 2637.1, exp: $[M]^+$ = 2636.6, $[M^++H^+]^{2+}$ = 1318.9.

Peptides $\mathbf{P^1}$, $\mathbf{P^2}$, and **4** were characterized by ^{1}H NMR and the corresponding chemical shift tables are Tables S1, S2, and S3, respectively, of the SI. The NMR experiments were recorded on a 500 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a BBI probe with triple axis gradient field. ^{1}H NMR spectra were recorded with 12 ppm windows and 32 k data points in the time domain. 2D ^{1}H NMR spectra were recorded at 298 K in H_2O/D_2O (*v*/*v* = 9/1) using Watergate[55] or presaturation solvent suppression. 2D spectra were acquired in phase-sensitive mode with TPPI for quadrature detection in the indirect dimension, using 2048 × 256 (TOCSY) or 2048 × 512 (ROESY) matrices over a 6000 Hz spectral width. TOCSY experiments were performed using a MLEV-17 spin-lock sequence with a mixing time of 70 ms. Off-resonance ROESY[56] experiments were recorded with a mixing time of 300 ms (4050 Hz spin-lock). H−H distances were obtained by integrating the cross peaks in the Roesy spectrum and taking Gly Hα1/Hα2 and well-resolved X Hβ1/Hβ2 (1.80 Å) cross correlations as references for distance calibration.

4.2. Physico-Chemical Studies. 4.2.1. Solution Preparation. Since the cysteine residues are susceptible to air oxidation, all the solutions were prepared in a glovebox under argon atmosphere. Fresh solutions of the ligand were prepared before each experiment in the appropriate buffer (20 mM) and acetonitrile (*v*/*v* = 9/1) using deoxygenated Milli-Q water (Millipore). The final concentration of the ligand solution was determined by measuring the cysteine free thiol concentration following the Ellman's procedure.[57] This procedure uses 5,5′-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as an indicator: each free thiol group present in the peptide yields 1 equiv of TNB^{2-} ($\epsilon^{412\ nm}$ (TNB^{2-}) = 14 150 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$).

Cu(I) solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ in deoxygenated acetonitrile. The final concentration was determined by adding an excess of sodium bathocuproine disulfonate (Na_2BCS) and measuring the absorbance of $Cu(BCS)_2^{3-}$ (λ_{max} = 483 nm, ϵ = 13 300 $M^{-1}cm^{-1}$). The other metal solutions were prepared from the corresponding salt ($CdCl_2$, $HgCl_2$, $PbCl_2$ or $ZnCl_2$) in deoxygenated water or in the appropriate buffer and titrated by 5 mM volumetric EDTA (Fisher Chemicals) in presence of a colorimetric indicator.

4.2.2. UV Titrations. The UV−visible spectra were recorded with a Varian Cary50 spectrophotometer equipped with optical fibers connected to an external cell holder in the glovebox. Two milliliters of the ligand solution (∼50 μM) were transferred in a UV cell (1 cm path) and aliquots corresponding to 0.1 equiv of the metal solution were then added. The buffer was phosphate (20 mM, pH 7.4) for all of the titrations except for Pb(II), for which Bis-Tris (20 mM, pH 7) was used to prevent Pb(II) hydrolysis and the precipitation of $Pb(OH)_2$.[40]

4.2.3. CD Titrations. The circular dichroism spectra were acquired with an Applied Photophysics Chirascan spectrometer. 2.5 mL of the ligand solution (∼50 μM in phosphate buffer, 20 mM, pH 7.4) were transferred in a UV cell (1 cm path) and aliquots corresponding to 0.25 equiv of the Cu(I) solution in acetonitrile were then added. CD spectra are reported in molar ellipticity ([Θ] in units of $degcm^2dmol^{-1}$). $[\Theta] = \theta_{obs}/(10lc)$, where θ_{obs} is the observed ellipticity in millidegrees, *l* the optical path length of the cell in centimeters, *c* the peptide concentration in moles per liter.

4.2.4. ESI-MS Titrations. Mass spectra were acquired on a LXQ-linear ion trap (THERMO Scientific, San Jose, USA) equipped with an electrospray source. Electrospray full scan spectra in the range *m*/*z* = 150 −2000 amu were obtained by infusion through a fused silica tubing at 2−10 μL/min. The solutions were analyzed in the negative and positive modes. The LXQ calibration (*m*/*z* = 50−2000) was achieved according to the standard calibration procedure from the manufacturer (mixture of caffeine, MRFA and Ultramark 1621). The temperature of the heated capillary for the LXQ was set to 180−200 °C, the ion-spray voltage was in the range 2−4 kV and the injection time was 10−100 ms. The ligand solution (100 μM) was prepared in ammonium acetate buffer (20 mM, pH 7)/acetonitrile (*v*/*v* = 9/1) and aliquots of the metal solution were then added.

(55) Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–665.
(56) Desvaux, H.; Berthault, P.; Birlirakis, N.; Goldman, M.; Piotto, M. *J. Magn. Reson. A* **1995**, *113*, 47–52.
(57) Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 49–60.

4.2.5. Apparent Affinity Constant Determination. Cu(I). The apparent stability constants at pH 7.4 of the two Cu(I) complexes, were measured by UV−visible titrations in presence of bathocuproine disulfonate (BCS) as a competitor. The complexes were prepared by adding 0.8−0.9 equiv of the Cu(I) solution in acetonitrile to the ligand solution in Phosphate buffer (20 mM pH 7.4)/acetonitrile ($v/v = 9/1$). The mixture was stirred for 10 min to ensure the formation of the complex, which was checked by recording the absorption at 262 nm. Aliquots of a BCS solution (10 mM in phosphate buffer, 20 mM, pH 7.4) were then added to the Cu(I) complexes. The UV/vis spectra were recorded and show the formation of the orange $Cu(BCS)_2$ complex. The stability of the absorbance was controlled before the addition of any other aliquots. The data were analyzed according to the formation of a Cu**P** complex, with the characteristics of the complex $Cu(BCS)_2$ fixed to the values: $\epsilon = 13\,300$ mol^{-1}Lcm^{-1} at 483 nm and $\log\beta_{12} = 19.8$.

Pb(II). The apparent stability constant at pH 7 of the Pb(II) complex was measured by fitting the titrations of $\mathbf{P}^i$ by Pb(II) in the buffer Bis-Tris (20 mM, pH 7). The affinity of Bis-Tris for Pb(II) was included in the fit ($\log\beta_{11} = 4.32$).[58] Two absorbing species were detected with $\mathbf{P}^1$ (Pb$\mathbf{P}^1$ and Pb$(\mathbf{P}^1)_2$), whereas only one absorbing species was detected with $\mathbf{P}^2$ (Pb$\mathbf{P}^2$).

Cd(II) and Zn(II). The apparent stability constants at pH 7 of the Cd(II) and Zn(II) complexes were measured by fitting the disappearance of the lead complex absorbance by addition of aliquots of these metal ions in Bis-Tris (20 mM, pH 7). During these back-titrations, aliquots of Cd(II) or Zn(II) solutions in Bis-Tris 20 mM were added to the UV cell containing the lead complex in Bis-Tris 20 mM pH 7, made of 1 ligand equiv and 3 Pb(II) equiv. The affinities of these metal ions for Bis-Tris are known and were included as parameters in the fit ($\log \beta_{11}$= 2.47 (Cd), 2.38 (Zn)).[58] The apparent stability constant of PbL was also included as a parameter in the fit of the back-titrations.

Hg(II). The back-titration of the Cu(I) complexes of $\mathbf{P}^1$and $\mathbf{P}^2$ with a Hg(II) solution shows the total disappearance of the S−Cu LMCT band for 1 equiv of added Hg(II). The data were simulated with more than 97% of Cu(I) displaced from the ligand at the end of the titration.

4.3. Cell Studies. 4.3.1. General Culture Conditions. HepG2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS), 20 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, 100 μg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin. WIF-B9 cells were grown in Coon's modified F12 medium (Sigma) supplemented with HAT (10^{-5} M hypoxanthine, 4×10^{-8} M aminopterin, 1.6×10^{-4} M thymidine), 5% FBS (Invitrogen), 2 mM glutamine, and an antibiotic and antifungal solution containing 100 μg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, and 0.25 μg/mL amphotericine B. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% (HepG2) or 7% (WIF-B9) CO_2. They were plated at 2×10^4 cells/cm^2 on plastic tissue culture dishes (Falcon) or on round (16 mm in diameter) or square (22 ×22 mm) autoclaved glass coverslips (Esco) in 6, or 12-well plates and used 7−9 days later. The culture medium was renewed every 2 to 3 days.

4.3.2. Localization of ATP7B by Immunofluorescence. Cells on glass coverslips were rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with methanol for 4 min at −20 °C. They were then rehydrated in PBS and incubated at 37 °C for 45 min, either with a rabbit primary antibody anti-ATP7B (1/200 diluted), or with this ATP7B antibody and a rat monoclonal antibody anti-ZO1 (undiluted). After 3 rinses with PBS, the cells were incubated for 15 min at 37 °C with a goat antirabbit antibody conjugated with Alexa 488 (1/500; Molecular Probes) or with a mixture of this latter antibody and a goat antirat antibody conjugated with Alexa 566 (1/500; Molecular Probes). Cells were then washed three times in PBS and the coverslips were mounted on glass slides with a drop of mounting medium (Sigma) and sealed using nail polish. The cells were analyzed using a Zeiss fluorescence Axioskop microscope. Confocal analysis was performed with a Zeiss LSM 510 microscope and series of *xy* sections were taken in 0.3 μm steps. The rabbit primary antibody anti-ATP7B was from I. Sandoval (CIBEREHD, Madrid, Spain) and was directed against the NH_2-terminal 655 residues of human ATP7B.[59] The rat primary monoclonal antibody anti-ZO-1 was from B. Stevenson (University of Alberta, Edmonton, Canada).

4.3.3. Uptake of $\mathbf{P}^3$-TRITC. The uptake of $\mathbf{P}^3$-TRITC by HepG2 and WIF-B9 cells was explored using a concentration range of 2 to 0.2 μM. $\mathbf{P}^3$-TRITC was added in the medium and at regular intervals, cells on coverslips were rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS), fixed with 4% formaldehyde for 20 min and viewed on Zeiss fluorescence microscopes (Axioskop or AxioVert 200M). The 2 μM concentration was also left for up to 4 days without damaging neither HepG2 nor WIF-B9 cells.

4.3.4. Trafficking of ATP7B. Trafficking of ATP7B has been shown before in various cell lines under extreme conditions, such as addition of 200 μM BCS or 20−200 μM copper in the culture medium.[51] Since we wanted to avoid the use of high concentrations of $\mathbf{P}^3$, we had to find conditions inducing ATP7B trafficking at lower concentrations of copper and within a few hours to avoid cellular responses involving protein synthesis. No ATP7B trafficking could be detected after 2 h in 0, 0.1, and 0.3 μM copper added to the medium. Trafficking was clear after 2 h in the presence of 1 μM copper. Starting from this observation, two concentrations of $\mathbf{P}^3$ were tested for their ability to reverse the trafficking of ATP7B. As shown in Figure 7, there was a clear-cut answer after 3 h in the presence of 10 μM $\mathbf{P}^3$, whereas 2 μM was not enough (data not shown). A control experiment with the low affinity glycopeptides $\mathbf{P}^3$**-Ala** 10 μM was performed to demonstrate that the ability of $\mathbf{P}^3$ to reverse the trafficking of ATP7B was due to the presence of the two cysteine residues.

Acknowledgment. We thank Michel Ferrand for very fruitful discussions at the beginning of this project. We are grateful to Ignacio Sandoval (CIBEREHD, Madrid, Spain) for his generous gift of a polyclonal antibody anti-ATP7B. We thank Valérie Nicolas (IFR 141, Plateforme d'Imagerie Cellulaire, Chatenay Malabry, France) for help with confocal analysis and Yves Chenavier for performing some of the titration experiments. We thank the "Université Joseph Fourier" (UJF-Grenoble), the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS), and the NanoBio program for the access to the facilities of the Synthesis platform. Financial support from the "Cluster de Recherche Chimie de la Région Rhône-Alpes" is duly acknowledged.

Supporting Information Available: Peptides $\mathbf{P}^1$, $\mathbf{P}^2$, and **4** 500 MHz ^{1}H NMR characterization, short proton−proton distances in the turn regions of $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$, ESI-MS of divalent metal ion complexes of $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$, UV titrations of $\mathbf{P}^1$ and $\mathbf{P}^2$ with divalent metal ions, formula of $\mathbf{P}^3$**-Ala**. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

JA106206Z

(58) Scheller, K. H.; Abel, T. H.; Polanyi, P. E.; Wenk, P. K.; Fischer, B. E.; Sigel, H. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *107*, 455–466. Magyar, J. S.; Godwin, H. A. *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 39–54.

(59) Hernandez, S.; Tsuchiya, Y.; Garcia-Ruiz, J. P.; Lalioti, V.; Nielsen, S.; Cassio, D.; Sandoval, I. V. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 1215–1223.

Références

Références

[1] P.R. Guengerich. Thematic Series : Metals in Biology. *J. Biol. Chem.*, 284 :709, 2009.

[2] J. Fontecilla-Camps. Des enzymes complexes pour des réactions simples : le métabolisme des gaz et l'origine de la vie. cours collège de France : http ://www.college-de-france.fr/default/EN/all/chi_pro/index.htm, 2010.

[3] P. ; Maquart F.X. ; Le Peuch C. ; Bellon G. ; Monboisse J.-C. Randoux, A. ; Gillery. *Biochimie Dynamique*. De Boeck & Larcier, 1997.

[4] J.M. Lippard, S.J. ; Berg. *Principle of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, 1994.

[5] R.G. Pearson. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 85 :3533–3539, 1963.

[6] J. Pearson, R.G. ; Songstad. Application of the Principle of Hard and Soft Acids and Bases to Organic Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, 89 :1827–1836, 1967.

[7] B. Kaim, W. ; Schwederski. *Bioinorganic chemistry : Inorganic Elements in the Chemistry of Life*. Wiley & son, 1994.

[8] http ://metallo.scripps.edu/PROMISE/CUMAIN.html.

[9] Frieden,E. ; Osaki,S. ; Kobayashi,H. Copper Proteins and Oxygen :Correlations between structure and function of the copper oxidases. *Journal General Physiology*, pages 213–252, 1965.

[10] http ://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/etp6t11.html.

[11] Xue,Y. ; Okvist,M. ; Hansson,O. ; Young,S. Crystal Structure of Spinach plastocyanine at 1.7 Å resolution. *Prot. Sci.*, 7 :2099–2105, 1998.

[12] Decker,H. ; Schweikardt,T. ;Tuczek, F. The First Crystal Structure of Tyrosinase : All questions answered ? *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45 :4546–4550, 2006.

[13] Solomon,E.I. ; Augustine,A.J. ; Yoon,J. O_2 Reduction to H_2O by the Multicopper Oxidases. *Dalton Transactions*, pages 3921–3932, 2008.

[14] Iwata,S. ; Ostermeier,C. ; Ludwig,B. ; Michel,H. Structure at 2.8 Å Resolution of Cytochrome c Oxidase from Paracoccus Denitrificans. *Nature*, 376 :660–669, 1995.

[15] Lamb,A.L. ; Torres,A.S. ; O'Halloran,T.V. ; Rosenzweig,A.C. Heterodimeric Structure of Superoxide Dismutase in Complex with its Metallochaperone. *Nat. Stru. Biol.*, 8 :751–755, 2001.

[16] Rasmussen,T. ; Berks,B.C, ; Sanders-Loehr,J. ; Dooley,D.M. ; Zumft,W.G. ; Thomson,A.J. The Catalytic Center in Nitrous Oxide Reductase, CuZ, is a Copper-Sulfide Cluster. *Biochemistry*, 39 :12753–12756, 2000.

[17] Organisation mondiale de la santé. Trace elements in human nutrition. *WHO Technical Report Series*, 532 :70, 1973.

[18] Schroeder,H.A. ; Nason,A.P. ; Tipton,I.H. ; Balassa,J.J. Essential Trace Elements in Man. *Copper. J. Chronic Dis.*, 19 :1007, 1966.

[19] Linder,M.C. ; Hazegh-Azam, M. Copper Biochemistry ans Molecular Biology. *Am. J. Cli. Nutr.*, 63 :797S–811S, 1996.

[20] Pena, M.M.O ; Lee,J. ; Thiele,D.J. A Delicate Balance : Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution. *J. Nutr.*, 129 :1251–1260, 1999.

[21] Zhou,B. ; Gitschier,J. hCTr1 : A Human Gene for Copper Uptake identified by Complementation in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 :7481–7486, 1997.

[22] Lutsenko,S. ; Barnes,N.L. ; Bartee,M.Y. ; Dmitriev,O.Y. Function and Regulation of Human Coppe-Transporting ATPases. *Physiol. Rev.*, 87 :1011–1046, 2007.

[23] Arredondo,M. ; Munoz,P. ; Mura,C.V. ; Nunez,M.T. DMT1, a Physiologically relevant apical Cu^+ transporter of intestinal Cells. *Am. J. Physiol. Cell*, 284 :C1525–C1530, 2003.

[24] Nose,Y. ; Rees,E.M. ; Thiele,D.J. Structure of the Ctr1 Copper Trans′PORE′ter reveals Novel Architecture. *Trends in Biochemical Sciences*, 31 :604–607, 2006.

[25] Puig,S. ; Thiele,D.J. Molecular Mechanisms of Copper Uptake and Distribution. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 :171–180, 2002.

[26] Wintz,H. ; Vulpe,C. Intracellular Trafficking : Plant Copper Chaperones. *Biochem. Soc. Trans.*, 30 :732–735, 2002.

[27] Nyasae,L. ; Bustos,R. ; Braiterman,L. ; Eipper,B. ; Hubbard,A. Dynamics of Endogenous ATP7A (Menkes Protein) in Intestinal Epithelial Cells : Copper-Dependent Redistribution between two Intracellular Sites. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292 :1181–1194, 2007.

[28] Yamaguchi,Y. ; Heiny,M.E. ; Suzuki,M. ; Gitlin,J.D. . Biochemical Characterization and Intracellular Localization Menkes Disease Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 :14030–14035, 1996.

[29] Lönnerdal,B. Intestinal Regulation of Copper Homeostasis : a Developmental Perspective. *Am. J. Cli. Nutr.*, 88 :846S–850S, 2008.

[30] Rae,T.D. ; Schmidt,P.J. ; Pufahl,R.A. ; Culotta,V.C. ; O′Halloran,T.V. Undetectable Intracellular Free Copper : The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Science*, 284 :805–808, 1999.

[31] Cater,M.A. ; Forbes,J. ; La Fontaine,S. ; Cox,D. ; Mercer,J.F.B. Intracellular Trafficking of the Human Wilson Protein : the Role of the Six N-terminal Metal-Binding Sites. *Biochem. J.*, 380 :805–813, 2004.

[32] Schaefer,M. ; Hopkins,R.G. ; Failla,M.L. ; Gitlin,J.D. Hepatocyte-Specific Localization and Copper-Dependent Trafficking of the Wilson′s Disease Protein in the Liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 276 :639–645, 1999.

[33] Fatemi,N. ; Sarkar,B. Molecular Mechanism of Copper Transport in Wilson′s Disease. *Environmental Health Perspectives*, 110 :695–698, 2002.

[34] Wijmenga,C. ; Klomp,L.W.J. Molecular Regulation of Copper Excretion in the Liver. *Proc. Nutr. Soc.*, 63 :31–39, 2004.

[35] Xiao,Z. ; Loughlin,F. ; George,G.N. ; Howlett,G.J. ; Wedd,A.G. C-Terminal Domain of the Membrane Copper Transporter Ctr1 from Saccharomyces Cerevisiae Binds Four Cu(I) Ions as a Cuprous-Thiolate Polynuclear Cluster : Sub-femtomolar Cu(I) Affinity of Three Proteins Involved in Copper Trafficking. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 :3081–3090, 2004.

[36] Hussain,F. ; Wittung-Stafsheda,P. Impact of Cofactor on Stability of Bacterial (CopZ) and Human (Atox1) Copper Chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774 :1316–1326, 2007.

[37] Strausak,D. ; Mercer,J.F.B. ; Dieter,H.H. ; Stremmel,W. ; Multhaup,G. Copper in Disorders with Neurological Symptoms : Alzheimer, Menkes and Wilson diseases. *Brain Res. Bulletin*, 55 :175–185, 2001.

[38] Arnesano,F. ; Banci,L. ; Bertini,I. ; Ciofi-Baffoni,S. ; Molteni,E. ; Huffman,D.L. ; O′Halloran,T.V. Metallochaperones and Metal-Transporting ATPases : A Comparative Analysis of Sequences and Structures. *Genome Res.*, 12 :255–271, 2002.

[39] Larin,D. ; Mekios,C. ; Kamna,D. ; Ross,B. ; Yang,A.S. ; Gilliam, C. T. Characterization of the Interaction Between the Wilson and Menkes Disease Proteins and the Cytoplasmic Copper Chaperone, HAH1p. *J. Biol. Chem.*, 274 :28497–28504, 1999.

[40] Achila,D. ; Banci,L. ; Bertini,I. ; Bunce,J. ; Ciofi-Baffoni,S. ; Huffman,D.L. Structure of Human Wilson Protein Domains 5 and 6 and their Interplay with Domain 4 and the Copper Chaperone HAH1 in Copper Uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 :5729–5734, 2006.

[41] Banci,L. ; Bertini,I. ; Cantini,F. ; Rosenzweig,A.C. ; Yatsunyk,L.A. Metal Binding Domains 3 and 4 of the Wilson Disease Protein : Solution Structure and Interaction with the Copper(I) Chaperone HAH1. *BioChem.*, 47 :7423–7429, 2008.

[42] Lutsenko,S. ; Tsivkovskii,R. ; Walker,J.M. Metallochaperone Atox1 Transfers Copper to the NH_2-terminal Domain of the Wilson Disease Protein and Regulates Its Catalytic Activity. *J. Biol. Chem.*, 277 :27953–27959, 2002.

[43] Banci,L. ; Bertini,I. ; Cantini,F. ; Massagni,C. ; Migliardi,M. ; Rosato,A. An NMR study of the Interaction of the N-terminal Cytoplasmic Tail of the Wilson Disease Protein with Copper(I)-HAH1. *J. Biol. Chem.*, 284 :9354–9360, 2009.

[44] Strausak,D. ; Howie,M.K. ; Firth,S.D. ; Schlicksupp,A. ; Pipkorn,R. ; Multhaup,G. Kinetic Analysis of the Interaction of the Copper Chaperone Atox1 with the Metal Binding Sites of the Menkes Protein. *J. Biol. Chem.*, 278 :20821–20827, 2003.

[45] Wernimont,A.K. ; Huffman,D.L. ; Lamb,A.L. ; O'Halloran,T.V. ; Rosenzweig,A.C. Structural Basis for Copper Transfer by the Metallochaperone for the Menkes-Wilson Disease Proteins. *Nat. Struct. Biol*, 7 :766–771, 2000.

[46] Hussain,F. ; Rodriguez-Granillo,A. ; Wittung-Stafshede,P. Lysine-60 in Copper Chaperone Atox1 Plays an Essential Role in Adduct Formation with a Target Wilson Disease Domain. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 :16371–16373, 2009.

[47] Banci,L. ; Bertini,I. ; Ciofi-Baffoni,S. ; Kozyreva,T. ; Zovo,K. ; Palumaa,P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*, 465 :645–650, 2010.

[48] Rodriguez-Granillo,A. ; Crespo,A. ; Estrin, D.A. ; Wittung-Stafshede, P. Copper-Transfer Mechanism from the Human Chaperone Atox1 to a Metal-Binding Domain of Wilson Disease Protein. *J. Phy. Chem. B*, 114 :3698–3706, 2010.

[49] J.H.R. Kägi. *Metallothioneines III.* Suzuki,K.T. ; Kimura,M. ; Imura,N. Eds ; Birkhäuser, Basel, 1993.

[50] Uchida,Y. ; Takio,K. ; Titani,K. ; Ichada,Y. ;Tomonaga, M. The Growth Inhibitory Factor that is Deficient in the Alzheimer Disease Brain is a 68 Amino Acid Metallothionein-Like Protein. *Neuron.*, 7 :337–347, 1991.

[51] Quaife,C.J. ; Findley,S.D. ; Erickson,J.C. ; Froelick,G.J. ; Kelly,E.J. ; Zambrowicz,B.P. ; Palmiter,R.D. Induction of a New Metallothionein Isoform (MT-IV) Occurs During Differentiation of Stratified Squamous Epithelia. *Biochem.*, 23 :7250–7259, 1994.

[52] Stillman,M.J. Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.*, 144 :461–511, 1995.

[53] D. Engel, D.W. ; Brouwer. *Metallothionein and Metallothionein-Like Proteins : Physiological Importance.* Gilles,R. ed. ; Vol 5 ; Springer-Verlag, 1989.

[54] Otvos,J.D. ; Armitage,I.M. Structure of the Metal Clusters in Rabbit Liver Metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 :7094–7098, 1980.

[55] Braun,W. ; Vasak,M. ; Robbins,A.H. ; Stout,C.D. ; Wagner,G. ; Kagi,J.H.R. ; Wüthrich,K. Comparison of the NMR Solution Structure and the X-Ray Crystal Structure of Rat Metallothionein-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :10124–10128, 1992.

[56] Narula,S.S. ; Mehra,R.K. ; Winge,D.R. ; Armitage,I.M. Establishment of the Metal-to-Cysteine Connectivities in Silver-Substituted Yeast Metallothionein. *J. Am. Chem. Soc.*, 113 :9354–9358, 1991.

[57] Pickering,I. ; Dameron,C.T. ; George,G. ; Dance,I. ; Winge,D.R. X-Ray Absorption Spectroscopy of Cuprous-Thiolate Multinuclear Clusters. *J. Am. Chem. Soc.*, 115 :9498–9505, 1993.

[58] Gui,A.R. ; Green,M. ; Kasrai,M.G. ; Bancroft,J. ; Stillman,M.J. Sulfur K-Edge EXAFS Studies of Cadmium-, Zinc-, Copper-, and Silver-Rabbit Liver Metallothioneins. *Inorg. Chem.*, 35 :6520–6529, 1996.

[59] Nielson,K.B. ; Atkin,C.L. ; Winge,D.R. Distinct Metal-Binding Configuration in Metallothioneines. *J. Biol. Chem.*, 260 :5342–5350, 1985.

[60] Vasak,M. Advances in Metallothionein Structure and Functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 19 :13–17, 2005.

[61] Presta, A. ; Green, A. R. ; Zelazowski,A. ; Stillman,M.J. Copper Binding to Rabbit Liver Metallothionein : Formation of a Continum of Copper(I)-Thiolate Stoichiometric Species. *Eur. J. Biochem.*, 227 :226–240, 1995.

[62] Mercer,J.F.B. The Molecular Basis of Copper-Transport Diseases. *Trends Mol. Med.*, 7 :64–69, 2001.

[63] Distad,B.J. ; Meekins,G.D. ; Liou,L.L. ; Weiss,M.D. ; Carter,G.T. ; Miller,R.G. Drug Therapy in Amytrophic Lateral Sclerosis. *Phys. Med. Rehabil. Clin.*, 19 :633, 2008.

[64] Rosen,D.R. ; Siddique,T. ; Patterson,D. ; Figlewicz, D.A. ; Sapp,P. ; Hentati,A. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362 :59–62, 1993.

[65] Orrell, R.W. Amyotrophic Lateral Sclerosis : Copper/Zinc Superoxide Dismutase(SOD1) Gene Mutations. *Neuromuscul. Disord.*, 10 :63–68, 2000.

[66] Valdmanis,P.N. ; Rouleau,G.A. Genetics of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology*, 70 :144, 2008.

[67] Bruijn,L.I. ; Houseweart,M.K. ; Kato,S. ; Anderson,K.L. ; Anderson,S.D ; Ohama,E. ; Reaume,A.G. ; Scott,R.W. ; Cleveland,D.W. Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild Type SOD1. *Science*, 281 :1851, 1998.

[68] Smith,A.P. ; Lee,N.M. Role of Zinc in ALS. *Amyotrophic Lateral Scler.*, 8 :131, 2007.

[69] Hottinger,A.F. ; Fine,E.G. ; Gurney,M.E. ; Zurn,A.D. ; Aebischer,P. The Copper Chelator D-Penicillamine Delays onset of Disease and Extends Survival in a Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Eur. J. Neurosci.*, 9 :1548, 1997.

[70] Azzouz,M. ; Poindron,P. ; Guettier,S. ; Leclerc,N. ; Andres,C. ; Warter,J.-M. ; Borg,J. Prevention of Mutant SOD1 Motoneurodegeneration by Copper Chelators *in-vitro*. *J. Neurobiol.*, 42 :49, 2000.

[71] Rachidi,W. ; Riondel,J. ; McMahon,H.M. ; Favier,A. La protéine à Prion et le cuivre : un lien mystérieux. *Pathologie Biologie*, 53 :244–250, 2005.

[72] Stewart,L.A. ; Rydzewska,L.H.M. ; Keogh,G.F. ; Knight,R.S.G. Systematic Review of Therapeutic Interventions in Human Prion Disease. *Neurology*, 70 :1272, 2008.

[73] Sales,N. ; Rodolfo,K. ; Hassig,R. ; Faucheux,B. ; Di Giamberardino,L. ; Moya,K.L. Cellular Prion Protein localization in Rodent and Primate Brain. *Eur. J. Neurosci.*, 10 :2464–2471, 1998.

[74] Brown,D.R. ; Qin,K. ; Herms,J.W. ; Madlung,A. ; Manson,J. ; Strome,R. The Cellular Prion Protein Binds Copper *in vivo*. *Nature*, 390 :684–687, 1997.

[75] Hureau,C. ; Mathé,C. ; Faller,P. ; Mattioli,T.A. ; Dorlet,P. Folding of the Prion Peptide GGGTHSQW around the Copper(II) Ion : identifying the Oxygen Donor Ligand at neutral pH and Probing the Proximity of the Tryptophan Residue to the Copper Ion. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13 :1055–1064, 2008.

[76] Brown,D.R. ; Wong,B.S. ; Hafiz,F. ; Clive,C. ; Haswell,S.J. ; Jones,I.M. Normal Prion Protein has an Activity like that of Superoxide Dimutase. *Biochem. J.*, 344 :1–5, 1999.

[77] Viles,J.H. ; Cohen,F.E. ; Prusiner,S.B. ; Goodin,D.B. ; Wright,P.E. ; Dyson,H.J. Copper Binding to the Prion Protein : Structural Implications of Four Identical Cooperative Binding Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 :2042–2047, 1999.

[78] Miura,T. ; Hori-i,A. ; Takeuchi,H. Metal-Dependent Alpha-Helix Formation promoted by the Glycine-Rich Octapeptide region of Prion Protein. *FEBS Lett.*, 396 :248–252, 1996.

[79] Sigurdsson,E.M. ; Brown,D.R. ; Alim,M.A. ; Scholtzova,T. ; Carp,R. ; Meeker,H.C. ; Prelli,F. ; Frangione,B. ; Wisniewski,T. Copper Chelation Delays the Onset of Prion Disease. *J. Biol. Chem.*, 278 :46199, 2003.

[80] ADAM. . http :/adam.about.com/encyclopedia/Creutzfeldt-Jacob-disease.htm.

[81] Ferri,C.P. ; Prince,M. ; Brayne,C. ; Brodaty,H. ; Fratiglioni,L. ; Ganguli,M. ; Hall,K. ; Hasegawa,K. ; Hendrie,H. ; Huang,Y. ; Jorm,A. ; Mathers,C. ; Menezes,P.R. ; Rimmer,E. ; Scazufca,M. Global Prevalence of Dementia a Delphi Consensus Study. *Lancet*, 306 :2112, 2005.

[82] Alhzeimer,A. On a Pelicular Disease of the Cerebral Cortex. *Allg. Z. Psychiatr. Ihre Grenzgeb*, 64 :146, 1907.

[83] authors Unknown. Uber Einem Eigenartigen Schweren Erkrankungs Proezbeta der Hirnrinde. *Nurologisches Central Blatt*, 23 :1129–1136, 1902.

[84] Leslie,R.A. Imaging Alzheimer disease in vivo : not so 'implaque-cible' anymore. *Trends Neurosi.*, 25 :232, 2002.

[85] Torreilles, F. ; Touchan, J. Pathogenic Theories and Intrathecal Analysis of the Sporadic Form of Alzheimer disease. *Prog. Neurobiol*, 66 :181, 2002.

[86] AFP/HO/Frédy-Monfort/sainte-Anne/Archives. IRM. http ://www.ladepeche.fr/articles/2007/11/08/184070-L-imagerie-du-cerveau-au-service-de-la-maladie-d-Alzheimer.html, 2007.

[87] NASA : Nicholas,M. ; Short,Sr. IRM. http ://rst.gsfc.nasa.gov/Intro/Part2_26c.html.

[88] Glenner,G.G. ; Wong,C.W. Alzheimer Disease : Initial Report of the Purification and Characterization of Novel Cerebrovascular Amyloid Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120 :885–890, 1984.

[89] Kang,J. ; Lemaire,H.G. ; Unterbeck,A. ; Salbaum,J.M. ; Masters,C.L. ; Grzeschik,K.H. ; Multhaup,G. ; Beyreuther,K. ; Muller-Hill,B. The Precursor of Alzheimer Disease Amyloid A4 Protein resembles a Cell-Surface Receptor. *Nature*, 325 :733–736, 1987.

[90] Faller, P. ; Hureau,C. Bioinorganic Chemistry of Copper and Zinc ions Coordinated to Amyloid-Beta Peptide. *Dalton Trans.*, pages 1080–1094, 2009.

[91] Haass,C. ; Schlossmacher,M.G. ; Hung,A.Y. ; Vigo-Pelfrey,C. ; Mellon,A. ; Ostaszewski,B.L. ; Lieberburg,I. ; Koo,E.H. ; Schenk,D. ; Teplow,D.B. ; Selkoe,D.J. Amyloid Beta-Protein is produced by Cultured Cells during Normal Metabolism. *Nature*, 359 :322–325, 1992.

[92] Hardy,J. ; Selkoe,D.J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer Disease : Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297 :353–356, 2002.

[93] Gaggelli,E. ; Kozlowski H. ; Valensin,D. ; Valensin,G. Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer, Prion, and Parkinson Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis). *Chem. Rev.*, 106 :1995–2044, 2006.

[94] Bush,A.I. ; Pettingell,W.H. ; Multhaup,G. ; Paradis,M.D. ; Vonsattel,J.P. ; Gusella,J.F. ; Beyreuther,K. ; Masters,C. L. ; Tanzi,R.E. Rapid Induction of Alzheimer A Beta Amyloid Formation by Zinc. *Science*, 265 :1464–1467, 1994.

[95] Lovell,M.A. ; Robertson,J.D. ; Teesdale,W.J. ; Campbell,J.L ; Markesbery,W.R. Copper, Iron and Zinc in Alzheimer Disease Senile Plaques. *J. Neurol. Sci.*, 158 :47–52, 1998.

[96] Smith,M.A. ; Harris,P.L. ; Sayre,L.M. ; Perry,G. Iron Accumulation in Alzheimer Disease is a Source of Redox-Generated Free Radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 :9866–9868, 1997.

[97] Scott,L.E. ; Orvig, C. Medicinal Inorganic Chemistry Approaches to Passivation and Removal of Aberrant Metal Ions in Disease. *Chem. Rev.*, 109 :4885–4910, 2009.

[98] Cherny,R.A. ; Atwood,C.S. ; Xilinas,M.E. ; Gray,D.N. ; Jones,W.D. ; McLean,C.A. ; Barnham,K.J. ; Volitakis,I. ; Fraser,F.W. ; Kim,.S. ; Huang,X. ; Goldstein,L.E. ; Moir,R.D. ; Lim,J.T. ; Beyreuther,K. ; Zheng,H. ; Tanzi,R.E. ; Masters,C.L. ; Bush,A.I. Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits Beta-Amyloid Accumulation in Alzheimer Disease Transgenic Mice. *Neuron.*, 30 :665–676, 2001.

[99] Ritchie,C.W. ; Bush,A.I. ; Mackinnon,A., Macfarlane,S. ; Mastwyk,M. ; Macgregor,L. ; Kiers,L. ; Cherny,R.A. ; Li,Q.-X. ; Tammer,A. ; Carrington,D. ; Mavros,C. ; Volitakis,I. ; Xilinas,M. ; Ames,D. ; Davis,S. ; Beyreuther,K. ; Tanzi,R.E. ; Masters,C.L. Metal-protein attenuation with Iodochlorohydroxyquin (Clioquinol) Targeting Aβ Amyloid Deposition and Toxicity in Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.*, 60 :1685–1691, 2003.

[100] Mercer,J.R.B. ; Livingston,J. ; Hall,B. ; Paynter,J.A. ; Begy,C. ; Chandrasekharappa,S. ; Lockhart,P. ; Grimes,A. ; Bhave,M. ; Siemieniak,D. ; Glover,T.W. Isolation of a Partial Candidate Gene for Menkes Disease by Positional Cloning. *Nature Genet.*, 3 :20–25, 1993.

[101] Chelly,F. ; Tumer,Z. ; Tonneson,T. ; Ishikawa-Brush,Y. ; Tommerup,N. ; Horn,N. ; Monaco,A.P. Isolation of a Candidate Gene for Menkes Disease that encodes a Potential Heavy Metal Binding Protein. *Nature Genet.*, 3 :14–19, 1993.

[102] Vulpe,C. ; Levinson,B. ; Whitney,S. ; Packman,S. ; Gitschier,J. Isolation of a Candidate Gene for Menkes Disease and Evidence that it encodes a Copper-Transporting ATPase. *Nature Genet.*, 3 :7–13, 1993.

[103] Horn,N. Menkes X-linked Disease : Prenatal Diagnosis of Hemizygous Males and Heterozygous Females. *Prenat. Diagn.*, 1 :107–120, 1981.

[104] Gu,Y.H. ;Kodama,H. ; Sato,E. ; Mochizuki,D. ; Yanagawa,Y. ; Takayanagi,M. ; Sato,K. ; Ogawa,A. ; Ushijima,H. ; Lee,C.C. Prenatal Diagnosis of Menkes Disease by Genetic Analysis and Copper Measurement. *Brain Dev.*, 24 :715–718, 2002.

[105] Gerdes,A.M. ; Tonnesen,T. ; Pergament,E. ; Sander,C. ; Baerlocher,K.E. ; Wartha,R. ; Guttler,F. ; Horn,N. Variability in Clinical Expression of Menkes Syndrome. *Eur. J. Pediatr.*, 148 :132–135, 1988.

[106] Sarkar,B. Early Copper Histidine Therapy in Classic Menkes Disease. *Ann. Neurol.*, 41 :134, 1997.

[107] Barnea,A. ; Katz,B.M. Uptake of ^{67}Copper Complexed to 3H-Histidine by Brain Hypothalamic Slices : Evidence that Dissociation of the Complex is not the only Factor determining ^{67}Copper Uptake. *J. Inorg. Biochem.*, 40 :81–93, 1990.

[108] Kreuder,J. ; Otten,A. ; Fuder,H. ; Tumer,Z.. Tonnesen,T. ; Horn,N.. Dralle,D. Clinical and Biochemical Consequences of Copper-Histidine Therapy in Menkes Disease. *Eur. J. Pediatr.*, 152 :828–832, 1993.

[109] . Menkes. http ://wiki.medpedia.com/Menkes_Disease.

[110] Kitzberger,R. ; Madl,C. ; Ferenci,P. Wilson Disease. *Metabolic Brain Disease*, 20 :295–302, 2005.

[111] Wilson,S.A.K. Progressive Lenticular Degeneration : a Familial Nervous Disease Associated with Cirrhosis of the Liver. *Brain*, 34 :20–509, 1912.

[112] Bull,P.C. ; Thomas,G.R. ; Rommens,J.M. ; Forbes,J.R, Cox,D.W. The Wilson Disease Gene is a Putative Copper Transporting P-type ATPase similar to the Menkes Gene. *Nat. Genet.*, 5 :327–337, 1993.

[113] Tanzi,R.E. ; Petrukhin,K. ; Chernov,I.. Pellequer,J.L. ; Wasco,W. ; Ross,B. The Wilson Disease Gene is a Copper Transporting ATPase with Homology to the Menkes Disease Gene. *Nat. Genet.*, 5 :344–350, 1993.

[114] Yamaguchi,Y. ; Heiny,M.E. ; Gitlin,J.D. Isolation and Characterization of a Human Liver cDNA as a candidate Gene for Wilson Disease. *Biochem. Biophy. Res. Commun.*, 197 :271–277, 1993.

[115] Cox,D. ; Kenney, S. ; Davies,L. ; Bugbee,D. Wilson data base. http ://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp.

[116] Roberts,E.A. ; Schilsky,M.L. Diagnosis and Treatment of Wilson Disease : An Update. *Hepatology*, 47 :2089–2110, 2008.

[117] Encyclopédie orphanet Grand public. La maladie de Wilson. http ://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Wilson-FRfrPub134v01.pdf, 2008.

[118] J-.C. Duclos-Vallée. La greffe Hépatique, Etat des lieux. In *Résumés des communication du premier colloque national pour la maladie de Wilson*, Paris, Mars 2007.

[119] F. Woimant. Traitement de la maladie de Wilson. In *Résumés des communication du premier colloque national pour la maladie de Wilson*, Paris, Mars 2007.

[120] Walshe,J.M. New Oral Therapy. *Lancet*, pages 25–26, 1956.

[121] Perrett,D. The Metabolism and Pharmacology of D-Penicillamine in Man. *J. Rheumatol. Suppl.*, 7 :41–50, 1981.

[122] Wiesner,R.H. ; Dicksin,E.R. ; Carlson,G.L. ; McPhaul,L.W. ; Go,V.L.W. The pharmacokinetics of D-Penicillamine in Man. *Lancet*, 8(Suppl 7) :51–55, 1987.

[123] Bergstrom,R.F. ; Kay,D.R. ; Harkcom,T.M. ; Wagner,J.G. Penicillamine Kinetics in Normal Subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 30 :404–413, 1981.

[124] Brewer,G.J. ; Terry,C.A. ; Aisen,A.M. ; Hill,G.M. Worsening of Neurologic Syndrome in Patients with Wilson Disease with Initial Penicillamine Therapy. *Arch. Neurol.*, 44 :490–493, 1987.

[125] Walshe,J.M. ; Yealland,M. Chelation Treatment of Neurological Wilson Disease. *Q. J. Med.*, 86 :197–204, 1993.

[126] Hoogenraad,T.U. ; Koevoet,R. ; De Ruyter Korver,E.G. Oral Zinc Sulphate as long-term Treatment in Wilson Disease(Hepatolenticular degeneration). *Eur. Neurol.*, 18 :205–211, 1979.

[127] Hoogenraad,T.U. ; Van Hattum,J. ; Van der Hamer,C.J. Management of Wilson Disease with Zinc Sulphate. *J. Neurol. Sci.*, 77 :137–146, 1987.

[128] Ogra,Y. ; Suzuki,K.T. Targeting of Tetrathiomolybdate on the Copper Accumulating in the Liver of LEC rats. *J. Inorg. Biochem.*, 70 :49–55, 1998.

[129] European Medicines Agency Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use. Public Summary of Positive Opinion for Orphan Designation of Ammonium Tetrathiomolybdate for the Treatment of Wilson′s Disease. http ://www.ema.europa.eu/pdfs/human/comp/opinion/8216108en.pdf ; Doc.Ref. :EMEA/COMP/82161/2008 , 2008.

[130] Chemical Corps Association. *The Chemical Warfare Service in World War II.* New York, NY : Reinhold Publishing, 1948.

[131] Andersen,O. Principles and Recent Developments in Chelation Treatment of Metal Intoxication. *Chem. Rev.*, 99 :2683–2710, 1999.

[132] Peters,R.A. ; Stocken,L.A. ; Thompson,R.H.S. British anti-Lewisite (BAL). *Nature*, 156 :616, 1945.

[133] Vilensky,J.A. ; Redman,K. British Anti-Lewisite (Dimercaprol) : An Amazing History. *Ann. Emerg. Med.*, 41 :378–383, 2003.

[134] Denny-Brown,D. ; Porter,H. The Effect of BAL (2,3-Dimercaptopropanol) on Hepatolenticular Degeneration (Wilson Disease). *N. Engl. J. Med.*, 245 :917–927, 1951.

[135] H.V. Aposhian. *Metal-Binding in Medecine.* (Seven,M.J. ; Johnson,L.AJ.B. as editors) Lippincott Company, 1960.

[136] Clarkson,T.W. ; Magos,L. ; Cox,C. ; Greenwood,M.R. ; Amin-Zaki,L. ; Majeed,M.A. Tests of Efficacy of Antidotes for Removal of Methylmercury in Human Poisoning during the Irak Outbreak. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218 :74–83, 1981.

[137] Karagol,U. ; Deda,G. ; Kukner,S. ; Ince,E. ; Onal,M.Z. Pain Relief by Carbamazepine in Mercury Poisoning. *Eur. J. Pediatr.*, 157 :260–261, 1998.

[138] Guzzi,G-.P. ; La Porta,C.A.M. Molecular Mechanisms Triggered by Mercuric. *Toxicology*, 244 :1–12, 2008.

[139] Aaseth,J. ; Frieheim,E.A. Treatment of Methyl Mercury Poisoning in Mice with 2,3-Dimercaptosuccinic Acid and other Complexing Thiols. *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 42 :248–252, 1978.

[140] Rooney,J.P.K. The Role of Thiols, Dithiols, Nutritional Factors and Interacting Ligands in the Toxicology of Mercury. *Toxicology*, 234 :145–156, 2007.

[141] Petrunkin,V.E. . *Ukr. Khem. Zh.*, 22 :603–607, 1956.

[142] Petrunkin,V.E. . *Rudy Nauch. Konf. Kiev.*, pages 7–18, 1957.

[143] Aposhian,H.V. ; Bruce,D.C. ; Alter,W. ; Dart,R.C. ; Hurlbut,K.M. ; Aposhian,M.M. Urinary Mercury after Administrtion of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid : Correlation with Dental Amalgam Score. *FASEB J.*, 6 :2472–2476, 1992.

[144] Andersen,O. ; Molecular,A.J. Mechanisms of In-Vivo Metal Chelation : Implications for Clinical Treatment of Metal Intoxications. *Environ. Health Perspect.*, 110(suppl 5) :887–890, 2002.

[145] Aposhian,H.V. ; Maiorino,R.M. ; Gonzalez-Ramirez, D. ; Zuniga-charles,M. ; Xu,Z. ; Hurlbut,K.M. Mobilization of Heavy Metals by newer, Therapeutically useful Chelating Agents. *Toxicology*, 97 :23–38, 1995.

[146] Aposhian,H.V. ; Maiorino,R.M. ; Rivera,M. ; Bruce,D.C. ; Dart,R.C. ; Hurlbut,K.M. ; Levine,D.J. ; Zheng,W. ; Fernando,Q. ; Carter,D. Human Studies with the Chelating Agents, DMPS and DMSA. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 30 :505–528, 1992.

[147] F. Rieders. *Metal-Binding in Medecine.* Seven,M.J. ; Johnson,L.A. as editors ; J.B. Lippincott Company, 1960.

[148] Blanusa,M. ; Varnai,V.M. ; Piasek,M. ; Kostial,K. Chelators as Antidotes of Metal Toxicity : Therapeutic and Experimental Aspects. *Current Med. Chem.*, 12 :2771–2794, 2005.

[149] Utschig,L.M. ; Wright,J.G ; ; Dieckmann,G. ; Pecoraro,V. ; O'Halloran,T.V. The ^{199}Hg Chemical Shift as a Probe of Coordination Environments in Blue Copper Proteins. *Inorg. Chem.*, 34 :2497–2498, 1995.

[150] Summers,. ^{113}Cd NMR Spectroscopy of Coordination Compounds and Proteins. *Coord. Chem. Rev.*, 43 :43–134, 1986.

[151] Messori,L. ; Marcon,G. Gold Complexes in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Met. Ions Biol. Syst.*, 41 :279–304, 2004.

[152] Niemeyer,C.M. ; Simon,U. DNA-Based Assembly of Metal Nanoparticles. *Eur. J. Inorg. Chem.*, pages 3641–3655, 2005.

[153] Rawlings,D.E. Heavy Metal Mining Using Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56 :65–91, 2002.

[154] Chan,J. ; Huang,Z. ; Merrifield,M.E. ; Salgado,M.T. ; Stillman,M.J. Studies of Metal Binding Reactions in Metallothioneins by Spectroscopic, Molecular Biology, and Molecular Modeling Techniques. *Coord. Chem. Rev.*, 233-234 :319–339, 2002.

[155] Beltramini,M. ; Lerch,K. ; Vasak,M. Metal Substitution of *Neurospora* Copper Metallothionéines. *Biochem.*, 23 :3422–3427, 1984.

[156] Jorgensen,Ch.K. . *Prog. Inorg. Chem.*, 12 :101, 1970.

[157] Vasak,M. ; Kagi,J.H.R. ; Hill,H.A.O. Zinc(II), Cadmium(II), and Mercury(II) Thiolate Transitions in Metallothionéines. *Biochem.*, 20 :2852–2856, 1981.

[158] Willner,H. ; Vasak,M. ; Kagi,J.H.R. Cadmium-Thiolate Clusters in Metallothionéines : Spectrophotometric and Spectropolarimetric Features. *Biochem.*, 26 :6287–6292, 1987.

[159] Pountney,D.L. ; Schauwecker,I. ; Zarn,J. ; Vasak,M. Formation of Mammalian Cu_8-Metallothionein in Vitro : Evidence for the Existence of Two $Cu(I)_4$-Thiolate Clusters. *Biochem.*, 33 :9699–9705, 1994.

[160] Bogumil,R. ; Faller,P. ; Binz,P.-A. ; Vasak,M. ; Charnock,J.M. ; Garner,C.D. Structural Characterization of Cu(I) and Zn(II) Sites in Neuronal-Growth-Inhibitory Factor by Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS). *Eur. J. Biochem.*, 255 :172–177, 1993.

[161] Bogumil,R. ; Faller,P. ; Pountney,D.L. ; Vasak,M. Evidence for Cu(I) and Zn(II) Clusters in Neuronal-Growth-Inhibitory Factor isolated from Bovine. *Eur. J. Biochem.*, 238 :698–705, 1996.

[162] Ford,C.K. ; Vogler,A. Photochemical and Photophysical Properties of Tetranuclear and Hexanuclear Clusters of Metals with d^{10} and s^2 Electronic Configurations. *Acc. Chem. Res.*, 26 :220–226, 1993.

[163] Hasler,D.W. ; Faller,P. ; Vasak,M. Metal-Thiolate Clusters in the C-Terminal Domain of Human Neuronal Growth Inhibitory Factor(GIF). *Biochem.*, 37 :14966–14973, 1998.

[164] Faller,P. ; Vasak,M. Distinct Metal-Thiolate Clusters in the N-Terminal Domain of Neuronal Growth Inhibitory Factor. *Biochem.*, 36 :13341–13348, 1997.

[165] Dameron,C.T. ; Winge,D.R. ;George,G.N. ; Sansone,M. ; Hu,S. ; Hamer,D. A copper-Thiolate Polynuclear Cluster in the ACE1 Transcription Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :6127–6131, 1991.

[166] Stillman,M.J. ; Zelazowski,A.J. Domaine Specificity in Metal Binding to Metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 263 :6128–6133, 1988.

[167] Lu,W. ; Stillman,M.J. Mercury-Thiolate Clusters in Metallothionein. Analysis of Circular Dichroism Spectra of Complexes Formed between α-Metallothionein, Apometallothionein, Zinc Metallothionein, and Cadmium Metallothionein and Hg^{2+}. *J. Am. Chem. Soc.*, 115 :3291–3299, 1993.

[168] Hollander,F.J. ; Coucouvanis,D. Metallocubanes. Crystal and Molecular Structures of $[(C_6H_5)P]_4[Cu_8(S_2C_4O_2)_6]$ and$[(C_4H_9N]_4[Cu_8(S_2CC(COOC_2H_5)_2)_6]$. *J. Am. Chem. Soc.*, 99 :6268–6279, 1977.

[169] Coucouvanis,D. ; Murphy,C.N. ; Kanodia,S.K. Metal-Mercaptide Chemistry : Synthesis and Structural Characterization of the $[Cu(SC_6H_5)_3]^{2-}$ Anion. A Rational Synthesis and the Structure of the $[Cu_4(SC_6H_5)_6]^{2-}$ Cluster. *Inorg. Chem.*, 19 :2993–2998, 1980.

[170] Garner,C.D. ; Nicholson,J.R. ; Clegg,W. Preparation, Crystal Structure, and Spectroscopic Characterization of $[NEt_4]_2[Cu(SPh)_3]$. *Inorg. Chem.*, 23 :2148–2150, 1984.

[171] Fujisawa,K. ; Imai,S. ; Kitajima,N. ; Moro-Oka,Y. Preparation, Spectroscopic Characterization, and Molecular Structure of Copper(I) Aliphatic Thiolate Complexes. *Inorg. Chem.*, 37 :168–169, 1998.

[172] Kumsta,C. ; Jakob,U. Redox-Regulated Chaperones. *Biochem.*, 48 :4666–4676, 2009.

[173] Newman,J.D. ; Anthony,J.R. ; Donohue,T.J. The Importance of Zinc-Binding to the Function of Rhodobacter *Sphaeroides* ChrR as an Anti-sigma Factor. *J. Mol. Biol.*, 313 :485–499, 2001.

[174] D′Autréaux,B. ; Toledano,M.B. ROS as Signalling Molecules : Mechanisms that Generate Specificity in ROS Homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8 :813–824, 2007.

[175] Poole,L.B. Bacterial Defenses Against Oxidants : Mechanistic Features of Cysteine-Based Peroxidases and their Flavoprotein Reductases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433 :240–254, 2005.

[176] Sénèque,O. ; Bourles,E. ; Lebrun,V. ; Bonnet,E. ; Dumy,P. ; Latour,J.-M. Cyclic Peptides Bearing a Side-Chain Tail : A Tool to Model the Structure and Reactivity of Protein Zinc Sites. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47 :6888–6891, 2008.

[177] Janda,I. ; Devedjiev,Y. ; Derewenda,U. ; Dauter,Z. ; Bielnicki,J. ; Cooper,D.R. ; Graf, P.C.F. ; Joachimiak,A. ; Jakob,U. ; Derewenda,Z.S. The Crystal Structure of the Reduced, Zn^{2+}-Bound Form of the B.*subtilis* Hsp33 Chaperone and Its Implications for the Activation Mechanism. *Structure*, 12 :1901–1907, 2004.

[178] Ghering,A.B. ; Miller Jenkins,L.M. ; Schenck,B.L. ; Deo,S. ; Mayer,R.A. ; Pikaart,M.J. ; Omichinski,J.G. ; Godwin,H.A. Spectroscopic and Functional Determination of the Interaction of Pb^{2+} with GATA Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :3751–3759, 2005.

[179] Bridgewater,B.M. ; Parkin,G. Lead Poisoning and the Inactivation of 5-Aminolevulinate Dehydratase as Modeled by the Tris(2-mercapto-1-phenylimidazolyl)hydroborato Lead Complex, $([Tm^{Ph}]Pb)[ClO_4]$. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 :7140–7141, 2000.

[180] Payne,J.C. ; terHorst,M.A. ; Godwin,H.A. Lead Fingers : Pb^{2+} Binding to Structural Zinc-Binding Domains Determined Directly by Monitoring Lead-Thiolate Charge-Transfer Bands. *J. Am. Chem. Soc.*, 121 :6850–6855, 1999.

[181] Magyar,J.S. ; Weng,T.-C. ; Stern,C.M. ; Dye,D.F. ; Rous,B.W. ; Payne,J.C. ; Bridgewater,B.M. ; Mijovilovich,A. ; Parkin,G. ; Zaleski,J.M. ; Penner-Hahn,J.E. ; Godwin,H.A. Reexamination of Lead(II) Coordination Preferences in Sulfur-Rich Sites : Implication for a Critical Mechanism of Lead Poisoning. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :9495–9505, 2005.

[182] Claudio,E.S. ; Magyar,J.S. ; Godwin,H.A. Fundamental Coordination Chemistry, Environmental Chemistry and Biochemistry of Lead(II). *Prog. Inorg. Chem.*, 51 :1–144, 2003.

[183] Henehan,C.J. ; Pountney,D.L. ; Zerbe,O. ; Vasak,M. Identification of Cysteine Ligands in Metalloproteins Using Optical and NMR Spectroscopy : Cadmium-Substitued Rubredoxin as a Model $[Cd(CysS)_4]^{-2}$ Center. *Protein Sci.*, 2 :1756–1764, 1993.

[184] Faller,P. ; Ctortecka,B. ; Tröger,W. ; Butz,T. ; Vasak,M. Optical and TDPAC Spectroscopy of Hg(II)-Rubredoxin : Model for a Mononuclear Tetrahedral $[Hg(CysS)_4]^{-2}$ Center. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5 :393–401, 2000.

[185] Utschig,L.M. ; Wright,J.G, O′Halloran,T.V. Biochemical and Spectroscopic Probes of Mercury(II) Coordination Environments in Proteins. *Methods Enzymol.*, 226 :71–96, 1993.

[186] Watton,S.P. ; Wright,J.G. ; MacDonnell,F.M. ; Bryson,J.W. ; Sabat,M. ; O′Halloran,T.V. Trigonal Mercuric Complex of an Aliphatic Thiolate : A

Spectroscopic and Structural Model for the Receptor site in the Hg(II) Biosensor MerR. *J. Am. Chem. Soc.*, 112 :2824–2886, 1990.

[187] Utschig,L.M. ; Bryson,J.W. ; O′Halloran,T.V. Mercury-199 NMR of the Metal Receptor Site in MerR and its Protein-DNA complex. *Science*, 268 :380–385, 1995.

[188] Peacock,A.F.A. ; Iranzo,.O ; Pecoraro,V.L. Harnessing Natures Ability to Control Metal Ion Coordination Geometry using De Novo Designed Peptides. *Dalton Trans.*, pages 2257–2444, 2009.

[189] Peacock,A.F.A. ; Stuckey,J.A. ; Pecoraro,V.L. Switching the Chirality of the Metal Environment Alters the Coordination Mode in Designed Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48 :7371–7374, 2009.

[190] Farrer,B.T. ; Harris,N.P. ; Balchus ;K.E. ; Pecoraro,V. Thermodynamic Model for the stabilization of Trigonal Thiolato Mercury(II) in Designed Three-Stranded Coiled Coils. *Biochem.*, 40 :14696–14705, 2001.

[191] Ghosh,D. ; Lee, K.-H. ; Demeler,B. ; Pecoraro,V. Linear Free-Energy Analysis of Mercury(II) and Cadmium(II) Binding to Three-Stranded Coiled Coils. *Biochem.*, 44 :10732–10740, 2005.

[192] Iranzo,O. ; Thulstrup,P.W. ; Ryu,S.-B. ; Hemmingsen,L. ; Pecoraro,V.L. The Application of ^{199}Hg NMR and ^{199}Hg Perturbed Angular Correlation(PAC) Spectroscopy to Define the Biological Chemistry of Hg^{II} : A Case Study with Designed Two- and Three-Stranded Coiled Coils. *Chem. Eur. J.*, 13 :9178–9190, 2007.

[193] Matzapetakis,M. ; Farrer,B.T. ; Weng,T.-C. ; Hemmingsen,L. ; Penner-Hahn,J.E. ; Pecoraro,V.L. Comparison of the Binding of Cadmium(II), Mercury(II), and Arsenic(III) to the Novo Designed Peptides TRIL 12C and TRIL16C. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 :8042–8054, 2002.

[194] Rodolfo,A.S. ; Gruff,E.S. ; Koch,S.A. ; Harbison,G.S. Solid-State, ^{199}Hg and ^{113}Cd NMR Studies of Mercury-and Cadmium-Thiolate Complexes. Spectroscopic Models for [Hg(SCys)$_n$] Centers in the Bacterial Mercury Resistance Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 113 :469–475, 1991.

[195] Bush,A.I. The Metallobiology of Alzheimer′s Disease. *Trends Neurosci.*, 26 :207–214, 2003.

[196] Multhaup,G. ; Masters,C.L. Metal Binding and Radical Generation of Proteins in Human Neurological Diseases and Aging. *Met. Ions Biol. Syst.*, 36 :365–387, 1999.

[197] Bush,A.I. ; Multhaup,G. ; Moir,R.D. ; Williamson,T.G. ; Small,D.H. ; Rumble,B. ; Pollwein,P. ; Beyreuther,K. ; Masters,C.L. . A Novel Zinc(II) Binding Site Modulates the Function of the β A4 Amyloid Protein Precursor of Alzheimer′s Disease. *J. Biol. Chem.*, 268 :16109–16112, 1993.

[198] Ciuculescu,E.-D. ; Mekmouche,Y. ; Faller,P. Metal-Binding Properties of the Peptide $APP^{170-188}$: A Model of the Zn^{II}-Binding Site of Amyloid Precursor Protein(APP). *Chem. Eur. J.*, 11 :903–909, 2005.

[199] Steele, R.A. ; Opella,S.J. Structures of the Reduced and Mercury-Bound Forms of MerP, the Periplasmic Protein form the Bacterial Mercury Detoxification System. *Biochem.*, 36 :6885–6895, 1997.

[200] Veglia,G. ; Porcelli,F. ; DeSilva,T. ; Prantner,A. ; Opella,S.J. The Structure of the Metal-Binding Motif GMTCAAC Is Similar in an 18-Residue Linear Peptide and the Mercury Binding Protein MerP. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 :2389–2390, 2000.

[201] Rousselot-Pailley,P. ; Sénèque,O. ; Lebrun,C. ; Crouzy,S. ; Boturyn,D. ; Dumy,P. ; Ferrand,M. ; Delangle,P. Model Peptides Based on the Binding Loop of the Copper Metallochaperone Atx1 : Selectivity of the Consensus Sequence MxCxxC for Metal Ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II). *Inorg. Chem.*, 45 :5510–5520, 2006.

[202] Sénèque,O. ; Crouzy,S. ; Boturyn,D. ; Dumy,P. ; Ferrand,M. ; Delangle,P. Novel Model Peptide for Atx1-like Metallochaperone. *Chem. Commun.*, pages 770–771, 2004.

[203] PetersonC.W. ; Narula,S.S. ; Armitage,I.M. 3D Solution Structure of Copper and Silver-Substituted Yeast Metallothioneins. *FEBS Lett.*, 379 :85–93, 1996.

[204] Dumy,P. ; Eggleston,I.M. ; Cervigni,S. ; Sila,U. ; Sun,X. ; Mutter,M. A Convenient Synthesis of Cyclic Peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.*, 36 :1255–1258, 1995.

[205] Mutter,M. ; Dumy,P. ; Garrouste,P. ; Lehmann,C. ; Mathieu,M. ; Peggion,C. ; Peluso,S. ; Razaname,A. ; Tuchscherer,G. Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35 :1482–1485, 1996.

[206] Tuchscherer,G. Template Assembled Synthetic Proteins : Condensation of a Multitfunctional Peptide to a Topological Template via Chemoselective Ligation. *Tetrahedron Lett.*, 34 :8419–8422, 1993.

[207] Tuchscherer,G. ; Servis,C. ; Corradin,G. ; Blum,U. ; Rivier,J. ; Mutter,M. Total chemical Synthesis, Characterization, and Immunological Properties of an MHC Class I Model using the TASP Concept for Protein De Novo Design. *Protein Sci.*, 1 :1377–1386, 1992.

[208] Boturyn,D. ; Defrancq,E. ; Dolphin,G.T. ; Garcia,J. ; Labbe,P. ; Renaudet,O. ; Dumy,P. RAFT Nano-Constructs : Surfing to Biological Applications. *J. Pep. Sci.*, 14 :224–240, 2008.

[209] Boturyn,D. ; Coll,J.-L. ; Garanger,E. ; Favrot,M.-C. ; Dumy,P. Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 :5730–5739, 2004.

[210] Renaudet,O. ; Dumy,P. On-bead Synthesis and Binding Assay of Chemoselectively Template-Assembled Multivalent Neoglycopeptides. *Org. Biomol. Chem.*, 4 :2628–2636, 2006.

[211] Garanger,E. ; Boturyn,D. ; Jin,Z. ; Dumy,P. ; Favrot,M.-C. ; Coll,J.-L. New Multifunctional Molecular Conjugate Vector for Targeting, Imaging, and Therapy of Tumors. *Molecular Therapy*, 12 :1168–1175, 2005.

[212] Foillard,S. ; Sancey,L. ; Coll,J.-L. ; Boturyn,D. ; Dumy,P. Targeted Delivery of Activatable Fluorescent Pro-Apoptotic Peptide into Live Cells. *Org. Biomol. Chem.*, 7 :221–224, 2009.

[213] Jin,Z. ; Josserand,V. ; Razkin,J. ; Garanger,E. ; Boturyn,D. ; Favrot,M.-C. ; Dumy,P. ; Coll,J.-L. Noninvasive Optical Imaging of Ovarian Metastases Using Cy5-Labeled RAFT-c(-RGDfK-)$_4$. *Molecular Imaging*, pages 1–10, 2006.

[214] Dumy,P. ; Eggleston,I.M. ; Esposito,G. ; Nicula,S. ; Mutter,M. Solution Structure of Regioselectively Addressable Functionalized Templates : An NMR and Restrained Molecular Dynamics Investigation. *Biopolymers*, 39 :297–308, 1996.

[215] Peluso,S. ; Rückle,T. ; Lehmann,C. ; Mutter,M. ; Peggion,C. ;Crisma,M. Crystal Structure of a Synthetic Cyclodecapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design. *ChemBioChem*, 2 :432–437, 2001.

[216] Merrifield,R.B. Solid Phase Peptide Synthesis I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85 :2149–2154, 1963.

[217] Sheppard,R. The Fluorenylmethoxycarbonyl Group in Solid Phase Solid. *J. Pept. Sci.*, 9 :545–552, 2003.

[218] Gude,M. ; Ryf,J. ; White,P.D. An Accurate Method for the Quantitation of Fmoc-derivatized Solid Phase Supports. *J. Pept. Sci.*, 9 :203–206, 2002.

[219] Barlos,K. ; Gatos,D. ; Kallitsis,J. ; Papaiouannou,D. ; Sotiriu,P. Anwendung von 4-Polystyryltriphenylmethylchlorid zur Synthese von Peptiden und Aminosäure-Derivaten. *liebigs Ann. Chem.*, pages 1079–1981, 1988.

[220] Athanassopoulos,P. ; Barlos,K. ; Gatos,D. ; Hatzi,O. ; Tzavara,C. Application of 2-Chlorotrityl Chloride in Convergent Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 36 :5645–5648, 1995.

[221] Harre,M. ; Nickisch,K. ; Tilstam,U. An Efficient Method for Activation and Recycling of Trityl Resin. *Reactive & Functional Polymers*, 41 :111–114, 1999.

[222] Isidro-LLobet,A. ; Alvarez,M. ; Albericio,F. Amino Acid-Protecting Group. *Chem. Rev.*, 109 :2455–2504, 2009.

[223] Riddles,P. W. ; Blakeley,R.L. ; Zerner,B. Reassessment of Ellman′s reagent. *Methods Enzymol.*, 91 :49–60, 1983.

[224] Piotto,M. ; Saudek,V. ; Sklenar,V. Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum NMR Spectroscopy of Aqueous Solutions. *J. Biomol. NMR*, 2 :661–665, 1992.

[225] Bonnet,C.S. ; Fries,P.H. ; Crouzy,S. ; Sénèque,O. ; Cisnetti,F. ; Boturyn,D. ; Dumy,P. ; Delangle,P. A Gadolinium-Binding Cyclodecapeptide with a Large High-Field Relaxivity Involving Second-Sphere Water. *Chem. Eur. J.*, 15 :7083–7093, 2009.

[226] LLinas,M. ; Klein,M. P. Charge Relay at the Peptide Bond. A Proton Magnetic Resonance Study of Solvation Effects on the Amide Electron Density Distribution. *J. Am. Chem. Soc.*, 97 :4731–4737, 1975.

[227] Kopple,K. D. ; Ohnishi,M. ; Go,A. Conformations of Cyclic Peptides III Cyclopentaglycyltyrosyl and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 91 :4264, 1969.

[228] Dyson,H.J. ; Rance,M. ; Houghten,R.A. ; Lerner,R.A. ; Wright,P.E. Folding of Immunogenic Peptide Fragments of Proteins in Water Solution. *J. Mol. Biol.*, 201 :161–200, 1988.

[229] Rothemund,S. ; Weiβhoff,H. ; Beyermann,M. ; Krause,E. ; Bienert,M. ; Mügge,C. ; Sykes,B.D. ; Sönnichsen,F.D. . Temperature Coefficients of Amide Proton NMR Resonance Frequencies in Trifluoroethanol : A Monitor of Intramolecular Hydrogen Bonds in Helical Peptides ? *J. Biomol. NMR*, 8 :93–97, 1996.

[230] Pope,M. ; Mascagni,P. ; Gibbons,W.A. Fourier Transform IR and NMR Studies of Hydrogen Bonding in *Helminthosporium carbonum* Toxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 106 :3863–3865, 1984.

[231] Schievano,E. ; Bisello,A. ; Chorev,M. ; Bisol,A. ; Mammi,S. ; Peggion,E. Aib-Rich Peptides Containing Lactam-Bridged Side Chains as Models of the 3_{10}-Helix. *J. Am. Chem. Soc.*, 123 :2743–2751, 2001.

[232] Struthers,M. D. ; Cheng,R. P. ; Imperiali,B. Economy in Protein Design : Evolution of a Metal-Independent $\beta\beta\alpha$ Motif Based on the Zinc Finger Domaines. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 :3073–3081, 1996.

[233] Miras,R. ; Morin,I. ; Jacquin,O. ; Cuillel,M. ; Guillain,F. ; Mintz,E. Interplay between glutathione, Atx1 and copper : Cu(I) gluthinate induced dimerization of Atx1. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13 :1239–1248, 2008.

[234] Kamau,P. ; Jordan,R.B. Complex Formation Constants for the Aqueous Copper(I)-Acetonitrile System by a Simple General Method. *Inorg. Chem.*, 40 :3879–3883, 2001.

[235] Gampp,H. ; Maeder,M. ;Meyer,C.J. ; Zuberbühler,A.D. Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic Data I : Mathematical Considerations. *Talanta*, 32 :95–101, 1985.

[236] Gampp,H. ; Maeder,M. ;Meyer,C.J. ; Zuberbühler,A.D. . *Talanta*, 32 :257–264, 1985.

[237] Gampp,H. ; Maeder,M. ;Meyer,C.J. ; Zuberbühler,A.D. Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic Data III : Model-Free Analysis of Spectrophotometric and ESR Titrations. *Talanta*, 32 :1133–1139, 1985.

[238] Gampp,H. ; Maeder,M. ;Meyer,C.J. ; Zuberbühler,A.D. Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic Data IV : Model-Free Least-Squares Refinement by Use of Evolving Factor Analysis. *Talanta*, 33 :943–951, 1986.

[239] Scheller,K.H. ; Abel,T.H. ; Polanyi,P.E. ; Wenk,P.K. ; Fischer,B.E. ; Sigel,H. Metal Ion/Buffer Interactions. Stability of Binary and Ternary Complexes Containing 2-[Bis (2-hydroxyethyl) amino]-2(hydroxyme thy1)-1,3-propanediol (Bistris) and Adenosine 5′-Triphosphate (ATP). *Eur. J. Biochem.*, 107 :455–466, 1980.

[240] Magyar,J.S. ; Godwin,H.A. Spectropotentiometric analysis of metal binding to structural zinc-binding sites : accounting quantitatively for pH and metal ion buffering effects. *Anal. Biochem.*, 320 :39–54, 2003.

[241] Fabbrizzi,L. ; Licchelli,M. ; Pallavicini,P. ; Parodi,L. Controllable Intramolecular Motions That Generate Fluorescent Signals for a Metal Scorpionate Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 :800–802, 1998.

[242] Bünzli,J.C-.G. ; Piguet,C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem. Soc. Rev.*, 34 :1048–1077, 2005.

[243] Caravan,P. ; Ellison,J.J. ; McMurry,T.J. ; Lauffer,R.B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents : Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Soc. Rev.*, 99 :2293–2352, 1999.

[244] Thuéry,P. Uranyl ion complexation by the tripodal ligand nitrilotriacetate. *Inorg. Chem. Comm.*, 10 :423–426, 2007.

[245] Nonat,A. ; Giraud,M. ; Gateau,C. ; Fries, P.-H. ; Mazzanti,M. Gadolinium(III) complexes of 1,4,7-triazacyclononane based picolinate ligands : simultaneous optimization of water exchange kinetics and electronic relaxation. *Dalton. Trans.*, pages 8033–8066, 2009.

[246] Nonat,A. ; Imbert,D. ; Pécaut,J. ; Giraud,M. ; Mazzanti,M. Structural and Photophysical Studies of Highly Stable Lanthanides Complexes of Tripodal 8-Hydroxyquinolinate Ligands Based on 1,4,7-Triazacyclononane. *Inorg. Chem.*, 48 :4207–4218, 2009.

[247] Wietzke,R. ; Mazzanti,M. ; Latour,J.-M. ; Pécaut,J. Solution and Solid State Structures of Uranium(III) and Lanthanum(III)Iodide Complexes of Tetradentate Tripodal Neutral *N*-Donor Ligands. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, pages 4167–4173, 2000.

[248] Karmazin,L. ; Mazzanti,M. ; Bezombes,J.-P. ; Gateau,C. ; Pécaut,J. Comparative Structural Studies of Iodide Complexes of Uranium(III) and Lanthanide(III) with Hexadentate Tetrapodal Neutral N-Donor Ligands. *Inorg. Chem.*, 43 :4167–4173, 2004.

[249] Bolzati,C. ; Mahmood,A. ; Malago,E. ; Uccelli,L. ; Boschi,A. ; Jones,A.G. ; Refesco,F. ; Duatti,A. ; Tisato,F. The $[^{99m}\mathrm{Tc(N)(PNP)}]^{2+}$ Metal Fragment : A Technetium-Nitrido Synthon for Use with Biologically Active Molecules. The *N*-(2-Methoxyphenyl)piperazyl-cysteine Analogues as Examples. *Bioconjugate Chem.*, 14 :5147–5158, 2003.

[250] Gelinsky,M. ; Vogler,R. ; Vahrenkamp,H. Tripodal Pseudopeptides with Three Histidine or Cysteine Donors : Synthesis and Zinc Complexation. *Inorg. Chem.*, 41 :2560–2564, 2002.

[251] Broan,C.J. ; Cox,J.P.L. ; Craig,A.S. ; Kataky,R. ; Parker,D. ; Harrison,A. ; Randall,A.M. ; Ferguson,G. Structure and Solution Stability of Indium and Gallium Complexes of 1,4,7-Triazacyclononanetriacetate and of Yttrium Complexes of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecanetetraacetate and Related Ligands : Kinetically Stable Complexes for Use in Imaging and Radioimmunotherapy X-Ray Molecular Structure of the Indium and Gallium Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic Acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1 :87–89, 1991.

[252] Hedges,S.H. ; Herbert,R.B. ; Wormald,P.C. Biosynthesis of Lythraceae Alkaloids : Incorporation of DL-[4,5-$^{13}C_2$,6-^{14}C]Lysine and cis- and trans-4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-Quinolizidin-2-one into Vertine and Lythrine. *J. Chem. Soc. Chem. Com.*, 3 :145–146, 1983.

[253] Geiwiz,J. ; Goetschi,E. ; Hebeisen,P. Concise Synthesis of Cyclothialidine Analogues with Ring Sizes from 12 to 15 : Novel Macrocyclization Protocol Involving Reductive Thiolation. *Synthesis*, 11 :1699–1704, 2003.

[254] Gans,P. ; Sabatini,A. ; Vacca,A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta*, 43 :1739, 1996.

[255] Chihani,A. ; Akretche,D.E. ; Kerdjoudj,H. ; Persin,M. ; Sarrazin,J. Behaviour of Copper and Silver in Complexing Medium in the Course of Nanofiltration on both Mineral and Organic Membrane. *Separation and Purification Technology*, 22-23 :543–550, 2001.

[256] Siddons,C.J. ; Hancock,R.D. Possible Insights into Metal Ion Recognition in Calcium-Binding Proteins Provided by Complexing Properties of Ligands Containing Amide Oxygen Donors. *Chem. Comm.*, pages 1632–1633, 2004.

[257] Vogler,R. ; Gelinsky,M. ; Guo,L.F. ; Vahrenkamp,H. Solution Behaviour and Zinc Complexation of Di- and Tripeptides with two Cysteine Units. *Inorg. Chim. Acta*, 339 :1–8, 2002.

[258] Pujol,A.M. ; Gateau,C. ; Lebrun,C. ; Delangle,P. A Cysteine-Based Tripodal Chelator with a High Affinity and Selectivity for Copper(I). *J. Am. Chem. Soc.*, 131 :6928–6929, 2009.

[259] Alajarin,M. ; Pastor,A. ; Orenes,R.-A. ; Martinez-Viviente,E. ; Pregosin,P.S. Pulsed Gradient Spin Echo (PGSE) Diffusion Measurements as a Tool for the Elucidation ofa New Type of Hydrogen-Bond ed Bicapsular Aggregate. *Chem. Eur. J.*, 12 :877–886, 2006.

[260] Terazzi,E. ; Torelli,S. ; Bernardinelli,G. ; Rivera,J-.P. ; Bénech,J-.M. ; Bourgogne,C. ; Donnio,B. ; Guillon,D. ; Imbert,D. ; Bünzli,J-.C.G. ; Pinto,A. ; Jeannerat,D. ; Pi-

guet,C. Molecular Control of Macroscopic Cubic, Columnar, and Lamellar Organizations in Luminescent Lanthanide-Containing Thermotropic Liquid Crystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :888–903, 2005.

[261] Talmard,C. ; Guilloreau,L. ; Coppel,Y. ; Mazarguil,H. ; Faller,P. Amyloid-Beta Peptide Forms Monomeric Complexes With Cu^{II} and Zn^{2+} Prior to Aggregation. *ChemBioChem*, 8 :163–165, 2008.

[262] G.A. Jeffrey. *An Introduction to Hydrogen Bonding.* Truhlar,D.G. ; NY, Oxford University Press, 1997.

[263] W. Jeffrey, G.A. ; Saenger. *Hydrogen Bonding in Biological Structures.* Springer-Verlag, 1994.

[264] Smith,R.M. ; Martell,A.E. ; Motekaitis,R.J. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database. *NIST Standard Reference Database*, 46, 2001.

[265] Farrer,B.T. ; Pecoraro,V.L. Hg(II) Binding to a Weakly Associated Coiled Coil Nucleates an Encoded Metalloprotein Fold : A kinetc Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 :3760–3765, 2003.

[266] Dieckmann,G.R. ; McRorie,D.K. ; Tierney,D.L. ; Utschig,L.M. ; Singer,C.P. ; O′Halloran,T.V. ; Penner-Hahn,J.E. ; DeGrado,W.F. ; Pecoraro,V.L. De *Novo* Design of Mercury-Binding Two-and Three-Helical Bundles. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 :6195–6196, 1997.

[267] Heinz,U. ; Hemmingsen,L. ; Kiefer,M. ; Adolph,H.-W. On the Competition for Available Zinc. *J. Biol. Chem.*, 280 :3197–3207, 2005.

[268] Heinz,U. ; Kiefer,M. ; Tholey,A. ; Adolph,H.-W. Structural Adaptability of Zinc Binding Sites : Different Structures in Partially, Fully, and Heavy-Metal Loaded States. *Chem. Eur. J.*, 15 :7350–7358, 2009.

[269] Sénèque,O. ; Bonnet,E. ; Joumas,F.L. ; Latour,J.-M. Cooperative Metal Binding and Helical Folding in Model Peptides of Treble-Clef Zinc Fingers. *Chem. Eur. J.*, 15 :4798–4810, 2009.

[270] Plush,S.E. ; Lincoln,S.F. ; Wainwright,K.P. Aminoacid *N*-Substitued 1,4,7-Triazacyclononane and 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane Zn^{2+}, Cd^{2+} and Cu^{2+} Complexes. A Preparative, Potentiometric Titration and NMR Spectroscopic Study. *Dalton Trans.*, pages 1410–1417, 2004.

[271] Spiess,M. The Asialoglycoprotein Receptor : A Model for Endocytic Transport Receptors. *Biochem.*, 29 :10009–10018, 1990.

[272] Breitfeld,P.P. ; Simmons,Jr.C.F. ; Strous G.J.A.M. ; Geuze,H.J. ; Schwartz,A.L. Cell Biology of the Asialoglycoprotein Receptor System : A Model of Receptor-Mediated Endocytosis. *Int. Rev. Cytol.*, 97 :47–95, 1985.

[273] Meier,M. ; Bider,M.D. ; Malashkevich,V.N. ; Spiess,M. ; Burkhard,P. Crystal Structure of the Carbohydrate Recognition Domain of the H1 Subunit of the Asialoglycoprotein Receptor. *J. Mol. Biol.*, 300 :857–865, 2000.

[274] Lee,R.T. ; Lee,Y.C. Affinity Enhancement by Multivalent Lectin-Carbohydrate Interaction. *Glycoconjugate J.*, 17 :543–551, 2000.

[275] Lee,Y.C. Biochemistry of Carbohydrate-Protein Interaction. *FASEB J.*, 6 :3193–3200, 1992.

[276] Lee,Y.C. ; Lee,R.T. Carbohydrate-Protein Interactions : Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28 :321–327, 1995.

[277] Stokmaier,D. ; Khorev,O. ; Cutting,B. ; Born,R. ; Ricklin,D. ; Ernst,T.O.G. ; Böni,F. ; Schwingruber,K. ; Gentner,M. ; Wittwer,M. ; Spreafico,M. ; Vedani,A. ; Rabbani,S. ; Schwardt,O. ; Ernst,B. Design Synthesis and Evaluation of Monovalent Ligands for the Asialoglycoprotein Receptor (ASGP-R). *Bioorg. Med. Chem.*, 17 :7254–7264, 2009.

[278] Connolly,D.T. ; Townsend,R.R. ; Kawaguchi,K. ; Bell,W.R. ; Lee,Y.C. Binding and Endocytosis of Cluster Glycosides by Rabbit Hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 257 :939, 1982.

[279] Lee,R.T. ; Lee,Y.C. Preparation of Cluster Glycosides of *N*-Acetylgalactosamine that have Subnanomolar Binding Constants towards the Mamalian Hepatic Gal/GalNac-Specific Receptor. *Glycoconjugate J.*, 4 :317–328, 1987.

[280] Mammen,M. ; Choi,S.K. ; Whitesides,G.M. Polyvalent Interactions in Biological Systems : Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 :2754–2794, 1998.

[281] Jencks,W.P. On the Attribution and Additivity of Binding Energies . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 :4046–4050, 1981.

[282] Lee,Y.C. ; Townsend,R.R. ; Hardy,M.R. ; Lönngren,J. ; Arnarp,J. ; Haraldsson,M. ; Lönn,H. Binding of Synthetic Oligosaccharides to the Hepatic Gal/GalNac Lectin. *J. Biol. Chem.*, 258 :199–202, 1983.

[283] Lee,R.T. ; Rice,K.G. ; Rao,N.B.N. ; Ichikawa,Y. ; Barthel,T. ; Piskarev,V. ; Lee,Y.C. Binding Characteristics of *N*-Acetylglucosamine-Specific Lectin of the Isolated Chicken Hepatocytes : Similarities to Mammalian Hepatic Galactose *N*-Acetylgalactosmine-Specific Lectin. *Biochem.*, 28 :8351–8358, 1989.

[284] Khorev,O. ; Stokmaier,D. ; Schwardt,O. ; Cutting,B. ; Ernst,B. Trivalent, Gal/GalNAc-Containing Ligands Designed for the Asialoglycoprotein Receptor. *Bioorg. Med. Chem.*, 16 :5216–5231, 2008.

[285] Kempen,H.J.M. ; Hoes,C. ; Van Boom,J.H. ; Spanjer,H.H. ; De Lange,J. ; Langendoen,A. ; Van Berkel,T.J.C. A water-Soluble Cholesteryl-Containing Tris-Galactoside : Synthesis, Properties, and Use in Directing Lipid-Containing Particles to the Liver. *J. Med. Chem.*, 17 :1306, 1984.

[286] Akinc,A. ; Querbes,W. ; De, S. ; Qin,J. ; Frank-Kamenetsky,M. ; Jayaprakash,K.N. ; Jayaraman,M. ; Rajeev,K.G. ; Cantley,W.L. ; Dorkin,J.R. ; Butler,J.S. ; Qin,L. ; Racie,T. ; Sprague,A. ; Fava,E. ; Zeigerer,A. ; Hope,M.J. ; Zerial,M. ; Sah,D.W.Y. ; Fitzgerald,K. ; Tracy,M.A. ; Manoharan,M. ; Koteliansky,V. ; de FougerollesA. ; Maier,M.A. Targete Delivery of RNAi Therapeutics with Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Mol. Ther.*, doi :10.1038/mt.2020.85, 2010.

[287] Renaudet,O. ; Dumy,P. Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates. *Org. Lett.*, 15 :243–246, 2003.

[288] Renaudet,O. ; Dumy,P. Synthesis of Multitopic Neoglycopeptides Displaying Recognition and Detection Motifs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15 :3619–3622, 2005.

[289] Grigalevicius,S. ; Chierici,S. ; Renaudet,O. ; Lo-Man,R. ; Dériaud,E. ; Leclerc,C. ; Dumy,P. Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines. *Bioconjugate Chem.*, 16 :1149–1159, 2005.

[290] Renaudet,O. ; BenMohamed,L. ; Gasgupta,G. ; Bettahi,I. ; Dumy,P. Towards a Self-Adjuvanting Multivalent B and T cell Epitope Containing Synthetic Glycolipopeptide Cancer Vaccine. *ChemMedChem.*, 3 :737–741, 2008.

[291] Bettahi,I. ; Gasgupta,G. ; Renaudet,O. ; Chentoufi,A.A. ; Zhang,X. ; Carpenter,D. ; Yoon,S. ; Dumy,P. ; BenMohamed,L. Antitumor Activity of a Self-Adjuvanting Glyco-Lipopeptide Vaccine Bearing B Cell, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell Epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.*, 58 :187–200, 2009.

[292] Duléry,V. ; Renaudet,O. ; Wilczewski,M. ; Van der Heyden,A. ; Labbé,P. ; Dumy,P. Randomized Combinatorial Library of Heteroglycoclusters (hGC). *J. Comb. Chem.*, 10 :368–371, 2008.

[293] Liang,R. ; Yan,L. ; Lœbach,J. ; Ge,M. ; Uozumi,Y. ; Sekanina,K. ; Horan,N. ; Gildersleeve,J. ; Thompson,C. ; Smith,A. ; Biswas,K. ; Still,W.C. ; Kahne,D. Parallel Synthesis and Screening of a Solid Phase Carbohydrate Library. *Science*, 274 :1520–1522, 1996.

[294] Wittmann,V. ; Seeberger,S. Spatial Screening of Cyclic Neoglycopeptides : Identification of Polyvalent Wheat-Germ Agglutinin Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 :900–903, 2004.

[295] Singh,Y. ; Renaudet,O. ; Defrancq,E. ; Dumy,P. Preparation of a Multitopic Glycopeptide-Oligonucleotide Conjugate. *Org. Lett.*, 7 :1359–1362, 2005.

[296] Wilczewski,M. ; Van der Heyden,A. ; Renaudet,O. ; Dumy,P. ; Coche-Guerente,L. ; Labbe,P. Promotion of SugarLectin Recognition Through the Multiple Sugar Presentation offered by Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT) : a QCM-D and SPR Study. *Org. Biomol. Chem.*, 6 :1114–1122, 2008.

[297] Renaudet,O. Recent Advances on Cyclopeptide-Based Glycoclusters. *Mini-Rev. Org. Chem.*, 5 :274–286, 2008.

[298] Razkin,J. ; Josserand,V. ; Boturyn,D. ; Jin,Z.-H. ; Dumy,P. ; Favrot,M. ; Coll,J.-L. ; Texier,I. Activatable Fluorescent Probes for Tumor-Targeting Imaging in Live Mice. *ChemMedChem.*, 1 :1069–1072, 2006.

[299] Biessen,E.A.L. ; Beuting,D.M. ; Roelen,H.C.P.F. ; Van de Marel,G.A. ; Van Boom,J.H. ; Van Berkel,T.J.C. Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *J. Med. Chem.*, 38 :1538–1546, 1995.

[300] Biessen,E.A.L. ; Broxtermann,H. ; Van Boom,J.H. ; Van Berkel,T.J.C. The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor : a Potent Cholesterol Lowering Agent ? *J. Med. Chem.*, 38 :1846–1852, 1995.

[301] Sliedregt,L.A.J.M ; Rensen,P.C.N. ; Rump,E.T. ; Van Santbrink,P.J. ; Bijsterbosch,M.K. ; Valentijn,A.R.P.M. ; Van de Marel,G.A. ; Van Boom,J.H. ; Van Berkel,T.J.C. ; Biessen,E.A.L. Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *J. Med. Chem.*, 42 :609–618, 1999.

[302] Rensen,P.C.N. ; Van Leeuwen,S.H. ; Sliedregt,L.A.J.M ; Van Berkel,T.J.C. ; Biessen,E.A.L. Design and Synthesis of Novel *N*-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *J. Med. Chem.*, 47 :5798–5808, 2004.

[303] Mely,Y. ; Molecular Probes. Modalités d'Imageries en Microscopie optique. http ://lsiit-miv.u-strasbg.fr/lsiit/perso/collet/Enseignement/SeminairesFI/Mely09.pdf.

[304] Thermo Scientific. TRITC and Rhodamine Dyes and Labelling Kits. http ://www.piercenet.com/Objects/View.cfm ?type=ProductFamily&ID=02040402.

[305] Renaudet,O. ; Boturyn,D. ; Dumy,P. Biomolecular assembly by iterative oxime ligations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 :3880–3883, 2009.

[306] Rose,K. Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 116 :30–33, 1994.

[307] Lemieux,G.A. ; Bertozzi,C.R. Chemoselective Ligation Reactions with Proteins, Oligasaccharides and Cells. *Trends Biotechnol.*, 16 :506–513, 1998.

[308] Poethko,T. ; Schottelius,M. ; Thumshirm,G. ; Herz,M. ; Haubner,R. ; Henriksen,G. ; Kessler,H. ; Schwaiger,M. ; Wester,H.-J. Chemoselective Pre-conjugate Radiohalogenation of Unprotected Mono- and Multimeric Peptides *via* Oxime Ligation. *Radiochim. Acta*, 92 :317–327, 2004.

[309] Jenks,W.P. Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 81 :475–481, 1959.

[310] Foillard,S. ; Rasmussen,M.O. ; Razkin,J. ; Boturyn,D. ; Dumy,P. 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminooxyacetic Acid Containing Peptides. *J. Org. Chem.*, 73 :983–991, 2008.

[311] Geoghegan,K.F. ; Stroh,J.G. Site-Directed Conjugation of Nonpeptide Groups to Peptides and Proteins via Periodate Oxidation of a 2-Amino Alcohol. Application to Modification at N-Terminal Serine. *Bioconj. Chem.*, 3 :136–146, 1992.

[312] Juaristi,E. ; Cruz-Sanchez,J.S. Synthesis and Conformation of 4, 4, 5, 5-Tetramethyl-1,2-dithiane Mono-S-oxide. *J. Org. Chem.*, 53 :3334–3338, 1988.

[313] Braverman,S. ; Pechenick,T. ; Specher,M. Facile Syntheses of Allylic Allenethiosulfinates and -sulfonates and of β-Iodo α,β-Unsaturatedγ-sultines. *J. Org. Chem.*, 71 :3334–3338, 2006.

[314] Hiskey,R.G. ; Harpold,M.A. Chemistry of Aliphatic Disulfides. XIV. Preparation of Disulfide Sulfoxides by Selective Oxidation. *J. Org. Chem.*, 32 :3191–3194, 1967.

[315] Zalipsky,S. Chemistry of Polyethylene Glycol Conjugates with Biologically Active Molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 16 :157–182, 1995.

[316] Andrieux,K. ; Desmaële,D. ; D'Angélo,J. ; Couvreur,P. Nanotechnologies et Nouveaux Médicaments. *L'actualité chimique*, 11-12 :135–139, 2003.

[317] Khandare,J. ; Minko,T. PolymerDrug Conjugates : Progress in Polymeric Prodrugs. *Prog. Polym. Sci.*, 31 :359–397, 2006.

[318] *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis.* Edited by Khan,S.H. ; O′Neill,R.A. ; Harwood Academic Publisher, 1996.

[319] M. Miljkovic. *Carbohydrates Synthesis, Mechanisms and Stereoelectronic Effects.* Springer Science, 2010.

[320] A.V. Demchenko. *General Aspects of the Glycosidic Bond Formation.* Wiley.

[321] Wu,J. ; Guo,Z. Improving the Antigenicity of sTn Antigen by Modification of Its Sialic Acid Residue for Development of Glycoconjugate Cancer Vaccines. *Bioconj. Chem.*, 17 :1537–1544, 2006.

[322] Chaplin,D. ;Crout,D.H.G. ; Bornemann,S. ; Hutchinson,D.W. ; Khan,R. Conversion of 2-Acetamido-2-Deoxy-β-D-Glucopyranose (N-Acetylglucosamine) into 2-Acetamido-2-Deoxy-β-D-Galactopyranose (N-Acetylgalactosamine) using a Biotransformation to Generate a Selectively Deprotected Substrate for SN_2 Inversion . *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 17 :235–237, 1992.

[323] Kozikowski,A.P. ; Lee,J. A Synthetic Approach to the Cis-Fused Marine Pyranopyrans, (3E)- and (3Z)-Dactomelyne. X-Ray Structure of a Rare Organomercurial. *J. Org. Chem.*, 55 :863–870, 1990.

[324] Horton,D. 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl Chloride. *Method of Carbohydrate Research*, VI :282–285, 1972.

[325] Ruttens,B. ; Saksena,R. ; Kovac,P. Synthesis of Phosphorylated, Conjugation-Ready Di-, Tri- and Tetrasaccharide Fragments of the O-Specific Polysaccharide of *V. cholerae* O139. *Eur. J. Org. Chem.*, 26 :4366–4375, 2007.

[326] Bouillon,C. ; Meyer,A. ; Vidal,S. ; Jochum,A. ; Chevolot,Y. ; Cloarec,J.-P. ; Praly,J.-P. ; Vasseur,J.-J. ; Morvan,F. Microwave Assisted Click Chemistry for the Synthesis of Multiple Labeled-Carbohydrate Oligonucleotides on Solid Support. *J. Org. Chem.*, 71 :4700–4702, 2006.

[327] Koshi,Y. ; Nakata,E. ; Miyagawa,M. ; Tsukiji,S. ; Ogawa,T. ; Hamachi,I. Traget-Specific Chemical Acylation of Lectins by Ligand-Tethered DMAP Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 :245–251, 2008.

[328] Westerlind,U. ; Westman,J. ; Törnquist,E. ; Smith,C.I.E. ; Oscarson,S. ; Lahmann,M. ; Norberg,T. Ligands of the Asialoglycoprotein Receptor for Targeted Gene Delivery. Part I : Synthesis of and Binding Studies with Biotinylated Cluster. *Glycoconj. J.*, 21 :227–241, 2004.

[329] Witt,D. Recent Developments in Disulfide Bond Formation. *Synthesis*, 16 :2491–2509, 2008.

[330] Bernardes,G.J.L. ; Grayson,E.J. ; Thompson,S. ; Chalker,J.M. ; Errey,J.C. ; El Ouadid,F. ; Claridge,T.D.W. ; Davis,B.G. From Disulfide to Thioester-Linked Glycoproteins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47 :2244–2247, 2008.

[331] Prante,O. ; Einsiedel,J. ; Haubner,R. ; Gmeiner,P. ; Wester,H.-J. ; Kuwert,T. ; Maschauer,S. 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-[^{18}F]fluoroglucopyranosyl Phenylthiosulfonate : A Thiol-Reactive Agent for the Chemoselective ^{18}F-Glycosylation of Peptides. *Bioconj. Chem.*, 18 :254–262, 2007.

[332] Kim,E.J. ; Amorelli,B. ; Abdo,M. ; Thomas,C.J. ; Love,D.C. ; Knapp,S. ; Hanover,J.A. Distinctive Inhibition of *O*-GlcNAcase Isoforms by an α-GlcNac Thiosulfonate. *J. Am. Chem. Soc.*, 129 :14854–14855, 2007.

[333] Davis,B.G. ; Lloyd,R.C. ; Jones,J.B. Controlled Site-Selective Glycosylation of Proteins by a Combined Site-Directed Mutagenesis and Chemical Modification Approach. *J. Org. Chem.*, 63 :9614–9615, 1998.

[334] Park,S. ; Yousaf,M.N. An Interfacial Oxime Reaction to Immobilize Ligands and Cells in Patterns and Gradients to Photoactive Surfaces. *Langmuir*, 24 :6201–6207, 2008.

[335] Yeo,W.-S. ; Mrksich,M. Electractive Sel-Assembled Monolayers that Permit Orthogonal Control over the Adhesion of Cells to Patterned Substrates. *Langmuir*, 22 :10816–10820, 2006.

[336] Leonard,J.P. ; Jensen,P. ; McCabe,T. ; O'Brien,J.E. ; Peacock,R.D. ; Kruger,P.E. ; Gunnlaugsson,T. Sel-Assembled of Chiral Luminescent Lanthanide Coordination Bundles. *J. Am. Chem. Soc.*, 129 :10986–10987, 2007.

[337] Jones,L.R. ; Goun,E.A. ; Shinde,R. ; Rothbard,J.B. ; Contag,C.H. ; Wender,P.A. Releasable Luciferin-Transporter Conjugates : Tools for the Real-Time Analysis of Cellular Uptake and Release. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :6526–6527, 2006.

[338] Brzezinska,E. ; Ternay,Jr.A.L. Disulfides. 1. Syntheses Using 2,2'-Dithiobis(Benzothiazole). *J. Org. Chem.*, 59 :8239–8244, 1994.

[339] Vlahov,I.R. ; Santhapuram,H.K.R. ; Wang,Y. ; kleindl,P.J. ; You,F. ; Howard,S.J. ; Westrick,E. ; Reddy,J.A. ; Leamon,C.P. An assembly Concept for the Consecutive Introduction of Unsymmetrical Disulfide Bonds : Synthesis of a Releasable Multidrug Conjugate of Folic Acid. *J. Org. Chem.*, 72 :5968–5972, 2007.

[340] Chi,L. ; Sadovski,O. ; Woolley,G.A. A Blue-Green Absorbing Cross-Linker for Rapid Photoswitching of Peptide Helix Content. *Bioconj. Chem.*, 17 :670–676, 2006.

[341] Woehrle,G.H. ; Warner,M.G. ; Hutchison,J.E. Molecular-Level Control of Feature Separation in One-dimensional Nanostructure Assemblies Formed by Biomolecular Nanolithography. *Langmuir*, 20 :5982–5988, 2004.

[342] Floyd,N. ; Vijayakrishnan,B. ; Koeppe,J.R. ; Davis,B.G. Thiyl Glycosylation of Olefinic Proteins : S-Linked Glycoconjugate Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48 :7798–7802, 2009.

[343] Kazemekaite,M. ; Bulovas,A. ; Talaikyte,Z. ; Railaite,V. ; Niaura,G. ; Butkus,E. ; Razumas,V. ;. 2-Methyl 1,4-Naphthoquinones Containing 3[N-ωMercaptoalkylalkanamide]Chains : Synthesis, Self-assembling and Electrochemical Properties. *Tetrahedron Lett.*, 49 :6212–6216, 2008.

[344] Koeller,K.M. ; Smith,M.E.B. ; Wong,C.-H. Tyrosine Sulfation on a PSGL-1 Glycopeptide Influences the Reactivity of Glycosyltransferases Responsible for Synthesis of the Attached *O*-Glycan. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 :742–743, 2000.

[345] P.G.M. Greene, T.W. ; Wuts. *Protective Group in Organic Synthesis.* John Wiley & Sons, INC, 1999.

[346] Schottelius,M. ; Schwaiger,M. ; Wester,H.-J. Rapid and High-Yield Solution-Phase Synthesis of DOTA-Tyr^3-Octreotide and DOTA-Tyr^3-Octreotate using Unprotected DOTA. *Tetrahedron Lett.*, 44 :2393–2396, 2003.

[347] Schottelius,M. ; Reubi,J.-C. ; Eltschinger,V. ; Schwaiger,M. ; Wester,H.-J. *N*-Terminal Sugar Conjugation and *C*-Terminal Thr-for-Thr(ol) Exchange in Radioiodinated Tyr^3-octreotide : Effect on Cellular Ligand Trafficking in Vitro and Tumor Accumulation in Vivo. *J. Med. Chem.*, 48 :2778–2789, 2005.

[348] Nash,I.A. ; Bycroft,B.W. ; Chan,W.C. Dde - A Selective Primary Amine Protecting Group : A Facile Solid Phase Synthetic Approach To Polyamine Conjugates. *Tetrahedron Lett.*, 37 :2625–2628, 1996.

[349] Kellam,B. ; Bycroft,B.W. ; Chhabra,S.R. Solid Phase Applications of Dde and the Analogue Nde : Synthesis of Trypanothione Disulphide. *Tetrahedron Lett.*, 38 :4849–4852, 1997.

[350] Bycroft,B.W. ; Chan,W.C. ; Hone,N.D. ; Millington,S. ; Nash,I.A. Synthesis of the Spider Toxins Nephilatoxin-9 and -11 by a Novel Solid-Phase Strategy. *J. Am. Chem. Soc.*, 116 :7415–7416, 1994.

[351] Dixon,M.J. ; Maurer,R.I. ; Biggi,C. ; Oyarzabal,J. ; Essex,J.W. ; Bradley,M. Mechanism and StructureActivity Relationships of Norspermidine-Based Peptidic Inhibitors of Trypanothione Reductase. *Bioorg. Med. Chem.*, 13 :4513–4526, 2005.

[352] Meister,A. ; Anderson,M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52 :711–760, 1983.

[353] Decaens,C. ; Durand,M. ; Grosse,B. ; Cassio,D. Which *in vitro* Models Could be Best Used to Study Hepatocyte Polarity ? *Biol. Cell*, 100 :387–398, 2008.

[354] Schéma 19. Représentation tridimensionnelle de l'architecture du parenchyme hépatique. http ://romius.free.fr/histologie/cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/AppareilDigestif/TexteP7.html.

[355] Simons,K. ; Fuller,S.D. Cell Surface Polarity in Epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1 :243–288, 1985.

[356] Ihrke,G. ; Neufeld,E.B. ; Meads,T. ; Shanks,M.R. ; Cassio,D. ; Laurent,M. ; Schroer,T.A. ; Pagano,R.E. ; Hubbard,A.L. WIF-B Cells : An *In Vitro* Model for Studies of Hepatocyte Polarity. *J. Cell Biol.*, 123 :1761–1775, 1993.

[357] Cassio,D. ; Hamon-Benais,C. ; Guerin,M. ; Lecoq,O. Hybrid Cell Lines Constitute a Potentiel Reservoir of Polarized Cells : Isolation and Study of Highly Diferentiated Hepatoma-Derived Hybrid Cells able to Form Functional Bile Canaliculi *in vitro*. *J. Cell Biol.*, 115 :1397–1408, 1991.

[358] Hubbard,A. The Genealogy of WIFB cells. http ://www.bs.jhmi.edu/wifb/.

[359] Roelofsen,H. ; Wolters,H. ; Van Luyn,M.J. ; Miura,N. ; Kuipers,F. ; Vonk,R.J. Copper-Induced Apical Trafficking of ATP7B in Polarized Hepatoma Cells Provides a Mechanism for Biliary Copper Excretion. *Gastroenterology*, 119 :782–793, 2000.

[360] Guo,Y. ; Nyasae,L. ; Braiterman,L.T. ; Hubbard,A.L. NH_2-Terminal Signals in ATP7B Cu-ATPase Mediate its Cu-Dependent Anterograde Traffic in Polarized Hepatic Cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 289 :G904–G916, 2005.

[361] Muller,P. ; Van Bakel,H. ; Van De Sluis,B. ; Holstege,F. ; Wijmenga,C. ; Klomp,L.W.J. Gene Expression Profiling of Liver Cells after Copper Overload *in vivo* and *in vitro* reveals New Copper-Regulated Genes. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 12 :495–507, 2007.

[362] Yang,L. ; McRae,R. ; Henary,M.M. ; Patel,R. ; Lai,B. ; Vogt,S. ; Fahnri,C.J. Imaging of the Intracellula Topography of Copper with a Fluorescence Sensor and by Synchrotron X-ray Fluorescence Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 :11179–11184, 2005.

[363] Fahrni,C.J. Biological Applications of X-ray Fluorescence Microscopy : Exploring the Subcellular Topography and Speciation of Transition Metals. *Current Opinion Chem. Biol.*, 11 :121–127, 2007.

[364] Kozikowski,A.P. ; Lee,J. A Synthetic Approach to the Cis-Fused Marine Pyranopyrans, (3E)- and (3Z)-Dactomelyne. X-Ray Structure of a Rare Organomercurial. *J. Org. Chem.*, 55 :863–870, 1990.

[365] Lemieux,R.U. ; Ratcliffe,R.M. The azidonitration of tri-*O*-acetyl-D-galactal. *Can. J. Chem.*, 57 :1244–1251, 1979.

[366] Grundler,G. ; Schmidt,R.R. Anwendung des Trichloracetimidatverfahrens auf 2-Azidoglucose- und 2-Azidogalactose-Derivate. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, pages 1826–1847, 1984.

[367] Rosenbrook,W. ; Riley,D.A. ; Lartey,P.A. A New Method for the Synthesis of Glycosyl Fluorides. *Tetrahedron Lett.*, 26 :3–4, 1985.

[368] Posner,G.J. ; Haines,S.R. A convenient, One-step, High-yield Replacement of an Anomeric Hydroxyl Group by a Fluorine Atom Using DAST. Preparation of Glycosyl Fluorides. *Tetrahedron Lett.*, 26 :5–8, 1985.

[369] P.D. Chan, W.C. ; White. *Fmoc Solid Phase peptide Synthesis : a Pratical Approach.* Chan,W.C. and White,P.D. ; Oxford University Press, 2004.

[370] Jerschow,A. ; Müller,N. Suppression Of Convection Artifacts in Stimulated- Echo Diffusion Experiments. Double-Stimulated- Echo Experiments. *J. Magn. Reson.*, 125 :372–375, 1997.

[371] R.J. Kidd, R.G. ; Goodfellow. *NMR and the Periodic Table.* edited by Harris,R.K. ; Mann,B.E. ; NY edition, 1978.