



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de sondes peptidiques luminescentes pour l'imagerie biologique du cuivre (I) et du zinc (II)

Manon Isaac

► To cite this version:

Manon Isaac. Synthèse et caractérisation de sondes peptidiques luminescentes pour l'imagerie biologique du cuivre (I) et du zinc (II). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV032 . tel-01539503

HAL Id: tel-01539503

<https://theses.hal.science/tel-01539503v1>

Submitted on 15 Jun 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Bio-Inorganique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Manon ISAAC

Thèse dirigée par **Olivier SÉNÈQUE**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Synthèse et caractérisation de sondes peptidiques luminescentes pour l'imagerie biologique du cuivre(I) et du zinc(II)

Thèse soutenue publiquement le **lundi 14 décembre 2015**,
devant le jury composé de :

Pr. Clotilde POLICAR

Professeure, École Normale Supérieure, Paris (Rapporteuse).

Dr. Loïc CHARBONNIÈRE

Directeur de recherche, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien,
Strasbourg (Rapporteur).

Dr. Pascale DELANGLE

Ingénieure CEA, CEA Grenoble.

Dr. Olivier MAURY

Directeur de recherche, École Normale Supérieure de Lyon.

Dr. Didier BOTURYN

Directeur de recherche, Université Grenoble Alpes (Président du jury).

Dr. Olivier SÉNÈQUE

Chargé de recherche, CEA Grenoble.



Remerciements

Je remercie Olivier de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche à l'occasion de mon stage de L3. Grâce à lui, j'ai appris énormément pendant ces deux mois autant au niveau expérimental que théorique. C'est donc avec plaisir que je suis revenue en thèse. Tout au long de ces trois ans, Olivier a été à la fois présent, tout en me laissant libre d'orienter le sujet à ma guise. Il m'a appris à encadrer Valentin puis Mylène, deux stagiaires qui m'ont bien aidé en synthétisant de nombreux peptides. Enfin, Olivier m'a surtout appris à présenter mes résultats à l'oral, comme à l'écrit. Sans lui ce manuscrit aurait été beaucoup plus abrupte.

Bien que la thématique sondes luminescente soit assez récente au laboratoire, je n'ai pas été la première sur le sujet. Un grand merci à Amandine Roux qui a commencé sur le sujet, notamment en synthétisant les peptides CC1 → CC8. J'ai donc eu la chance de commencer ma thèse en synthétisant CC9, le peptide qui a marché ! Laurent m'a également accompagné sur le sujet. Les discussions synthèse vs spectro ont été très enrichissantes, en plus de nombreuses autres discussions plus ou moins scientifiques. Enfin je remercie Céline, qui prend la suite, pour les discussions variées autour du radiateur.

Je remercie très chaleureusement Aurélie et Vincent qui étaient en thèse quand je suis arrivée et qui m'ont intégrée rapidement. Merci pour les astuces et les conseils.

Je remercie Jean-Marc et Geneviève pour leur bons conseils lors de la préparation d'oraux et pour tout le travail administratif qu'on ne voit pas, mais qui fait que l'équipe fonctionne.

Merci à Claude pour l'aide dans toutes les démarches administratives.

Merci à Christelle, cobureau du début, qui m'a fait découvrir un sport typiquement grenoblois : la gym de Vincent !

Je remercie également tous les membres de l'équipe passée ou en court, sans qui l'ambiance (notamment lors du p'tit déj du vendredi matin) n'aurait pas été la même : Martin, Patrick, Victor, Richard, Eric, Patricia, Alexandra, Patricia, Angélique, Guillaume, Elena, Ranjan.

Je remercie également Colette, Daniel, Sergey, Nathan, Svetlana, Ivana, et Stéphane, pour toutes les expériences qu'ils ont réalisés et toutes leurs explications pour que je comprenne ce qu'ils ont fait.

Je remercie également tous ceux qui m'ont conduit jusqu'à la thèse : tous mes enseignants, et tous mes complices avec qui j'ai passé de formidables moments sur les "bancs de l'école" et en dehors.

Je remercie ma famille qui m'a toujours soutenu. J'admire leur tentatives pour essayer de comprendre mon sujet de thèse alors que la chimie est parfois très loin de leurs domaines de compétences.

Enfin je remercie Phil (Olivier de son vrai prénom) pour tout le soutien informatique patient mais surtout pour toutes ces dernières années ...

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	LE ZINC ET LE CUIVRE	2
1.1.1	Propriétés de ces métaux	2
1.1.2	Homéostasie	3
1.1.2.1	Homéostasie du zinc	3
1.1.2.2	Homéostasie du cuivre	5
1.1.2.3	Homéostasie et sphère de coordination	5
1.2	MÉTHODES DE DÉTECTION DES MÉTAUX	9
1.2.1	Sondes fluorescentes	9
1.2.1.1	Critères pour une sonde idéale	9
1.2.1.2	État de l'art	11
1.2.2	Projet de sonde	15
1.3	LANTHANIDES	17
1.3.1	Propriétés atomiques et chimiques	18
1.3.2	Propriétés magnétiques	18
1.3.3	Propriétés de luminescence	19
1.3.4	Sondes optiques utilisant des lanthanides	21
1.4	CONCEPTION DES SONDES	24
1.4.1	Sondes à zinc	24
1.4.1.1	Peptides doigts de zinc	24
1.4.1.2	Principe de la sonde	25
1.4.2	Sonde à cuivre	27
1.4.2.1	CusF	27
1.4.2.2	Principe de la sonde et conception du peptide modèle	29
1.4.3	Stratégie	30
2	Sondes visibles à Cu⁺ et Ag⁺	31
2.1	LE CUIVRE(I)	32
2.2	SYNTHÈSE	33
2.3	COMPLEXATION DU CUIVRE(I) ET INTERACTION CATION- π	36
2.3.1	Complexation du cuivre(I)	36
2.3.2	Interaction cation- π	37

2.3.3	Propriétés d'émission	38
2.4	SÉLECTIVITÉ	41
2.4.1	Sélectivité vis-à-vis des métaux physiologiques	41
2.4.2	Cas particulier de l'argent(I)	42
2.5	DÉTERMINATION DE L'AFFINITÉ	44
2.5.1	Compétition avec l'imidazole	44
2.5.2	Compétition avec l'acétonitrile	45
2.5.3	Comparaison de l'affinité du peptide CC9 et de CusF pour le cuivre(I)	47
2.6	MÉCANISME SPECTROSCOPIQUE	48
2.6.1	Nombre de molécules d'eau	48
2.6.2	Spectroscopie en temps résolu	49
2.7	DISCUSSION	54
3	Modifications de la sonde à Cu⁺	55
3.1	MODIFICATIONS DE LA SÉQUENCE	57
3.1.1	Conception de la sonde CC9[Tb]	57
3.1.2	Modification du coude, position des prolines	58
3.2	MODIFICATION DE L'AFFINITÉ	62
3.2.1	Mutation en vue d'augmenter l'affinité pour le cuivre(I)	62
3.2.2	Mutation en vue d'augmenter l'affinité pour l'argent(I)	64
3.2.3	Discussion sur la modification de la séquence du peptide	65
3.3	MODIFICATION DE L'ANTENNE	67
3.3.1	Synthèse	68
3.3.2	Sensibilisation des lanthanides proche infrarouge	69
3.3.3	Formation de l'interaction cation- π	70
3.3.4	Discussion sur la modification des antennes	72
3.4	CAS DE L'ANTENNE NAPHTALÈNE	75
3.4.1	Complexation du cuivre(I)	75
3.4.2	Interaction cation- π	76
3.4.3	Émission de l'euporium	77
3.4.3.1	Constantes d'affinité	78
3.4.4	Mécanisme spectroscopique	78
3.4.4.1	Échelle de la nanoseconde	78
3.4.4.2	Échelle de la microseconde	79
3.4.4.3	Échelle de la milliseconde	80
3.4.5	Discussion sur le peptide CC10(Nap)[Eu]	80
3.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	82
4	Sondes à zinc émettant dans le visible	83
4.1	VALIDATION DU PRINCIPE	84
4.1.1	Synthèse du peptide	84
4.1.2	Coordination du zinc	86
4.1.3	Émission de la sonde	86
4.1.4	Sélectivité	88
4.2	SONDES RATIOMÉTRIQUES	90
4.2.1	Conception des peptides ratiométriques	90
4.2.2	Synthèse	93
4.2.2.1	Synthèse peptidique	93

4.2.2.2	Méallation du peptide par deux lanthanides	94
4.2.3	Émission des peptides	96
4.2.3.1	Peptide SP2[Eu ^T -Tb ^O]	96
4.2.3.2	Comparaison de la fluorescence des quatre peptides	98
4.2.3.3	Comparaison de la luminescence des lanthanides	99
4.2.4	Sélectivité	103
4.3	DISCUSSION	106
4.4	Conclusion	108
5	Sonde à zinc émettant dans le proche infrarouge	109
5.1	SYNTHÈSE	112
5.2	CARACTÉRISATIONS	114
5.2.1	Étude du TTHA dans le visible	114
5.2.2	Complexation du zinc	115
5.2.3	Propriétés spectroscopiques	115
5.3	TESTS CELLULAIRES	119
5.4	Discussion	120
6	Conclusion et perspectives	123
6.1	Conclusion	123
6.2	Perspectives	124
	Bibliographie	127
7	Partie expérimentale	137
7.1	MATERIALS AND METHODS	138
7.2	SYNTHESIS	139
7.2.1	Copper(I) probes	139
7.2.1.1	CC9 synthesis	139
7.2.1.2	Other copper(I) probe	140
7.2.2	Zinc(II) probes	141
7.2.2.1	SP2[ϕ^O - ϕ^T] peptidic synthesis	141
7.2.2.2	Selective metallation	142
7.2.2.3	Other zinc(II) probes	143
7.2.2.4	SP2(NBD)[Nd ^{DOTA}] and SP2(NBD)[Nd ^{TTHA}] synthesis	143
7.3	SPECTROSCOPY	144
7.3.1	Sample preparation	144
7.3.1.1	Copper(I)/silver(I) probes	144
7.3.1.2	Zinc(II) probes	144
7.3.1.3	Selectivity	145
7.3.2	Spectroscopies	145
7.4	Références	146
	Annexes	147
1	Détermination de la constante K_{ternaire}	147

Introduction

1.1	LE ZINC ET LE CUIVRE	2
1.1.1	Propriétés de ces métaux	2
1.1.2	Homéostasie	3
1.1.2.1	Homéostasie du zinc	3
1.1.2.2	Homéostasie du cuivre	5
1.1.2.3	Homéostasie et sphère de coordination	5
1.2	MÉTHODES DE DÉTECTION DES MÉTAUX	9
1.2.1	Sondes fluorescentes	9
1.2.1.1	Critères pour une sonde idéale	9
1.2.1.2	État de l'art	11
1.2.2	Projet de sonde	15
1.3	LANTHANIDES	17
1.3.1	Propriétés atomiques et chimiques	18
1.3.2	Propriétés magnétiques	18
1.3.3	Propriétés de luminescence	19
1.3.4	Sondes optiques utilisant des lanthanides	21
1.4	CONCEPTION DES SONDES	24
1.4.1	Sondes à zinc	24
1.4.1.1	Peptides doigts de zinc	24
1.4.1.2	Principe de la sonde	25
1.4.2	Sonde à cuivre	27
1.4.2.1	CusF	27
1.4.2.2	Principe de la sonde et conception du peptide modèle	29
1.4.3	Stratégie	30

1.1 Le zinc et le cuivre

Le cuivre a commencé à être utilisé vers 5000 av. J.-C. pour fabriquer des outils, des armes et des bijoux. Puis il a été mélangé à l'étain pour donner du bronze. Cette découverte a conduit à la fin de l'âge de pierre et l'entrée dans l'âge de bronze, entre 3000-1000 av. J.-C. selon les civilisations. Aujourd'hui le cuivre est utilisé principalement pour l'équipement électrique, mais aussi pour la plomberie, l'industrie, et en alliage.

L'utilisation du zinc est plus tardive. Sous l'empire romain on retrouve les premiers objets en zinc ou en laiton (alliage zinc-cuivre). Aujourd'hui le zinc est principalement utilisé dans la galvanisation pour protéger les aciers. Il entre également dans la composition de plusieurs alliages comme le laiton, ou le zamac (aluminium).

Ces métaux sont utilisés par l'Homme mais également par nos cellules. Ils font partie des éléments essentiels (fig. 1.1), car ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la respiration mitochondriale, la protection contre les radicaux libres, et la synthèse de la mélanine pour le cuivre^[1-5] ; la régulation de la croissance et du développement, le système immunitaire, ou encore comme messager intercellulaire pour le zinc^[5-9].

Élément	Fraction massique	Élément	Fraction massique
Oxygène	61 %	Fer	60 p.p.m.
Carbone	23 %	Fluor	37 p.p.m.
Hydrogène	10 %	Zinc	33 p.p.m.
Azote	2,6 %	Cuivre	1 p.p.m.
Calcium	1,4 %	Manganèse	0,2 p.p.m.
Phosphore	1,1 %	Étain	0,2 p.p.m.
Soufre	0,2 %	Iode	0,2 p.p.m.
Potassium	0,2 %	Sélénium	0,2 p.p.m.
Sodium	0,14 %	Nickel	0,2 p.p.m.
Chlore	0,12 %	Molybdène	0,1 p.p.m.
Magnésium	0,027 %	Vanadium	0,1 p.p.m.
Silicium	0,026 %	Chrome	0,03 p.p.m.
		Cobalt	0,02 p.p.m.

Fig. 1.1 : Éléments essentiels dans le corps humain^[10].

1.1.1 Propriétés de ces métaux

Le cuivre et le zinc sont des métaux de la première période du bloc d. Leur configuration électronique est Zn(0) : [Ar] 4s² 3d¹⁰ et Cu(0) : [Ar] 4s¹ 3d¹⁰ car le cuivre est une exception à la règle de Klechkowski.

Dans les milieux biologiques le zinc n'est stable qu'au degré d'oxydation+II (Zn²⁺ : [Ar] 3d¹⁰). Il est diamagnétique et ne présente pas de propriétés oxydoréductrices. Dans les métalloprotéines, son rôle est principalement structural ou catalytique, le zinc est alors utilisé comme acide de Lewis. Le zinc est également un métal très labile comparativement aux métaux du bloc d, cette propriété est utilisée par la cellule pour en faire un messager intra- et intercellulaire^[11].

Le cuivre, quant à lui, présente des propriétés oxydoréductrices, car il possède deux degrés d'oxydation stables en milieu biologique : +I ou +II. Cette capacité à pouvoir osciller entre deux états d'oxydation est utilisé, entre autres, par les protéines bleues à cuivre pour du transfert d'électrons, ou par des enzymes de types oxydases ou réductases pour faire de la catalyse rédox^[12].

Dans la cellule, tout le métal n'est pas lié fortement par des métalloprotéines. Une partie du métal est mobile, c'est-à-dire qu'il est faiblement lié, et peut être échangé rapidement. L'environnement de la cellule étant réducteur, du fait de la présence de glutathion, le cuivre soluble est au degré d'oxydation +I^[2].

1.1.2 Homéostasie

Le zinc et le cuivre sont essentiels pour les organismes vivants, mais également toxiques s'ils ne sont pas correctement régulés. Un déficit en métal entraîne une baisse de la concentration en métalloprotéines fonctionnelles, ce qui est néfaste pour la cellule et l'organisme. Un excès de métal conduit à des substitutions du métal approprié par le métal en excès, ou à l'agrégation des protéines. Dans tous les cas, la fonction des protéines est altérée^[13,14].

Une dérégulation de l'homéostasie du zinc, du cuivre, mais aussi du fer, au niveau du cerveau, est observé dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme Alzheimer, Parkinson et Creutzfeldt-Jakob^[15-17].

À cause de ses propriétés rédox, le cuivre présente une toxicité supplémentaire. Il catalyse la réaction d'Haber-Weiss (fig. 1.2), qui conduit à la production de radical hydroxyle, espèce contribuant au stress oxydant. Au niveau cellulaire, cette toxicité est évitée par la complexation du cuivre pour qu'il y ait moins d'un atome de cuivre libre ($\text{Cu}_{\text{(aq)}}^+$) par cellule^[18]. Cependant, une partie du cuivre reste mobile, c'est-à-dire labile et faiblement complexée.

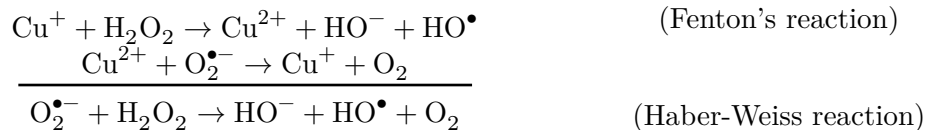


Fig. 1.2 : Catalyse de la production de radical hydroxyle par le cuivre.

Pour assurer le bon fonctionnement de l'organisme entier, il existe une régulation à l'échelle de la cellule mais aussi à l'échelle du tissu et de l'organisme entier. Par la suite, nous nous intéresserons uniquement au fonctionnement cellulaire.

1.1.2.1 Homéostasie du zinc

Le zinc est utilisé dans toutes les classes d'enzymes et par tous les types d'organismes^[19]. Dans le génome humain, 3000 protéines pourraient lier le zinc^[20], ce qui correspond à 10% de toutes les protéines codées. Pour que ces protéines soient fonctionnelles, la concentration en zinc mobile doit être maintenue dans la gamme 10^{-11} – 10^{-8} M (fig. 1.3).

La concentration totale en zinc à l'intérieur de la cellule est régulée par des transporteurs^[21-23] qui le font entrer ou sortir (fig. 1.4). Le nombre de transporteurs présents au niveau de la paroi cellulaire ou des parois des organites est régulé génétiquement. Un excès de zinc induit la transcription des gènes codant pour le transporteur excréteur le zinc. Inversement un manque de zinc induit la transcription des gènes codant pour les transporteurs d'entrée^[9].

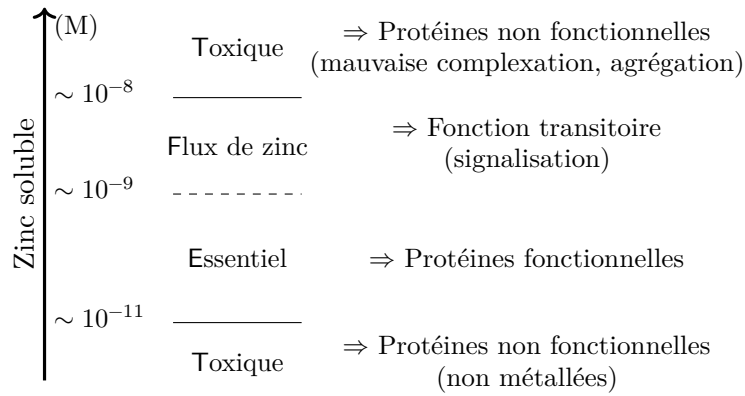


Fig. 1.3 : Conséquences de la concentration en zinc soluble sur la fonctionnalité des protéines, redessiné d'après^[13].

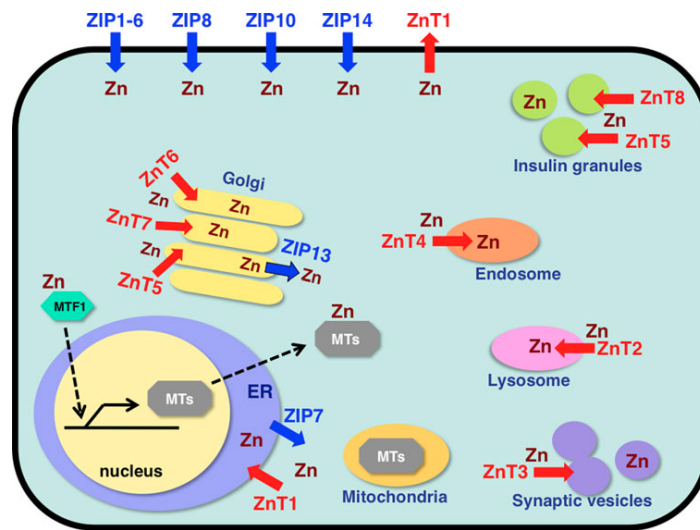


Fig. 1.4 : Localisation des transporteurs de zinc (ZIP et ZnT), des métallothionéines (MTs). ER : Réticulum endoplasmique.^[11]

Ces transporteurs permettent de réguler la concentration totale en zinc autour de 200-300 μM . Au niveau cytoplasmique, la concentration en zinc soluble est régulée par les métallothionéines. Ces protéines riches en cystéines, permettent de tamponner la concentration en zinc. Ce processus permet une réponse rapide à un léger déséquilibre. La régulation génétique est plus lente mais permet de faire face à un déséquilibre plus important^[9].

La concentration en zinc mobile est régulée pour limiter les effets toxiques. Cependant la concentration peut varier car le zinc est utilisé comme messenger intercellulaire, notamment dans le système immunitaire^[24], dans le système nerveux^[15,25], dans le cycle circadien^[26] et dans le système reproducteur^[27-29]. Certains types de cellules (neurones, ovocytes) sont capables d'accumuler du zinc en grande quantité. Ce zinc est stocké dans des vésicules avant d'être excrété par exocytose. Cette libération rapide de zinc contribue à la signalisation intercellulaire. Le zinc serait également un messenger intracellulaire. Des stimuli extérieurs seraient capables de déclencher des vagues de zinc mobile à l'intérieur de la cellule^[8,30,31]

1.1.2.2 Homéostasie du cuivre

Comme pour le zinc, la concentration totale en cuivre est régulée par le nombre de transporteurs présents au niveau de la paroi cellulaire. Le transporteur CTR1^[32] permet l'entrée du cuivre dans la cellule (fig. 1.5). Le cuivre est ensuite complexé par des chaperonnes qui le cèdent aux différentes protéines qui l'utilisent comme cofacteur (cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase) ou vers les ATPases^[1,33]. Les transporteurs ATP7A et ATP7B permettent la translocation du cuivre du cytosol vers le Golgi, vers un endosome, ou vers l'extérieur selon leur localisation^[2].

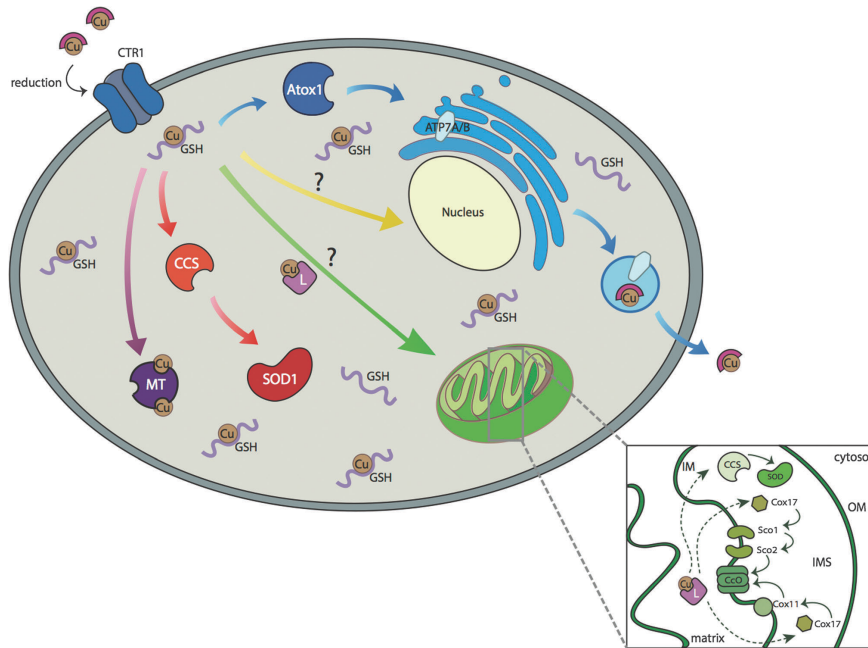


Fig. 1.5 : Transport du cuivre dans une cellule eucaryote^[33]. Le cuivre(II) est réduit en cuivre(I) avant d'entrer dans la cellule grâce au transporteur CTR1. À l'intérieur, le cuivre interagit avec les ligands cellulaires que sont le glutathion (GSH) qui tamponne la quantité de cuivre(I), une métallochaperone (CCS, Atox1, L) qui délivre le cuivre à une cible : la superoxyde dismutase (SOD1), la mitochondrie (L), les ATPases de l'appareil de Golgi (ATP7A, ATP7B). Les métallothionéines (MTs) stockent le cuivre.

Les ATP7A et ATP7B ne sont pas exprimées dans les mêmes cellules. C'est pourquoi les mutations conduisant à une ATP7A non fonctionnelle (maladie de Menkès) ne provoquent pas les mêmes effets qu'une mutation de l'ATP7B (maladie de Wilson). La mutation de l'ATP7A conduit à un défaut en cuivre dans tout l'organisme, ce qui est létal *in utero* ou lors des premières années de vie. À l'inverse la mutation de l'ATP7B entraîne une accumulation du cuivre notamment dans le foie^[34] (fig.1.6). Quelques traitements existent à base de chélateurs de cuivre^[35,36].

1.1.2.3 Homéostasie et sphère de coordination

Dans une cellule, le zinc et le cuivre sont utilisés par des protéines pour réaliser différentes fonctions : catalyse, transfert d'électron (cuivre), structure (zinc). Pour arriver jusqu'aux protéines qui les utilisent, ces métaux doivent être transportés à travers des membranes et, même dans le cytoplasme, le cuivre est complexé pour éviter la réaction d'Haber-Weiss.

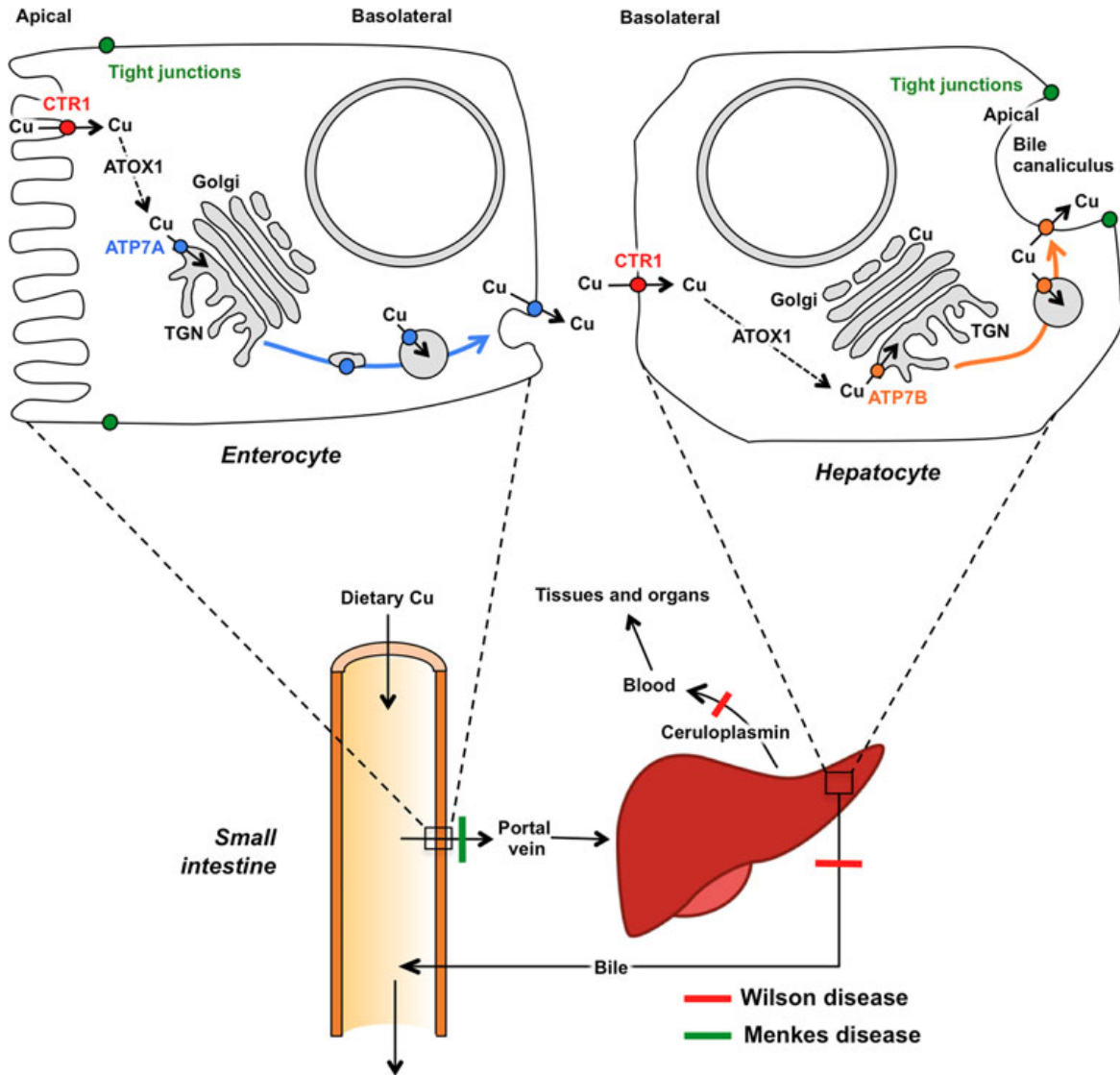


Fig. 1.6 : Homéostasie du cuivre à l'échelle du corps humain^[34]. Le cuivre est absorbé par les enterocytes de l'intestin grêle via le transporteur CTR1. Le cuivre est ensuite relargé dans la veine portale grâce à l'ATPase ATP7A pour être absorbé par les hépatocytes via CTR1. L'ATP7B permet aux hépatocytes d'excréter le cuivre vers le sang et tous les organes.

Les protéines de transport sont capables de transférer le métal. À l'inverse, les protéines l'utilisant pour une fonction donnée, le complexent fortement. Les sphères de coordination de ces protéines ne sont donc pas les mêmes.

Parmi les acides aminés naturels, il existe trois types de ligands : les ligands oxygénés (aspartate, glutamate), azotés (histidine), et soufrés (cystéine, méthionine). Les sphères de coordinations dures, avec des ligands oxygénés, azotés (fig.1.7) permettent de stabiliser le degré d'oxydation +II du cuivre et de renforcer l'acidité du zinc ce qui favorise la catalyse^[13,37]. Les sphères de coordination plus molles avec des ligands de type soufrés (cystéines, méthionines), azotés (histidine) rendent le métal plus labile, ce qui facilite l'échange de métal entre protéines.

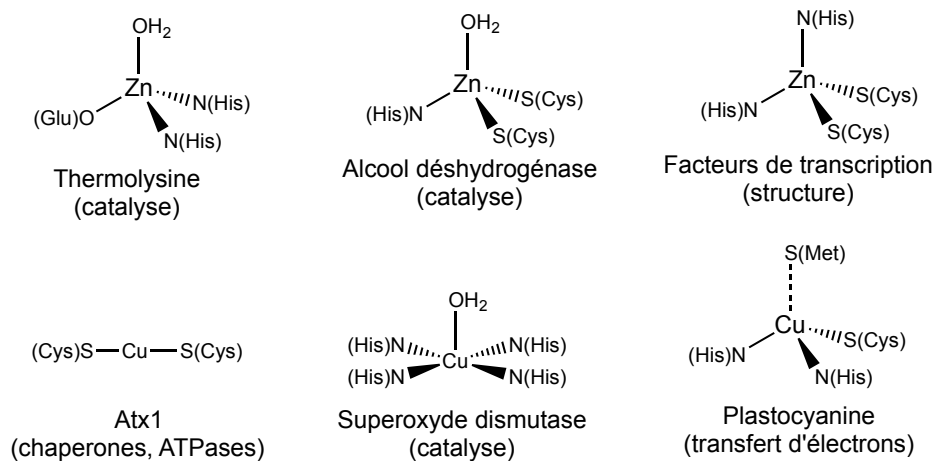


Fig. 1.7 : Exemples de sites de coordination du zinc et du cuivre.

Le nombre de ligands varie également selon la fonction de la protéine^[37]. Par exemple, si le rôle du zinc est structural, alors la sphère de coordination sera complète avec un nombre élevé de ligands (4). De même, lorsque le cuivre sert au transfert d'électrons, sa géométrie est tétraédrique, et toutes les positions sont occupées par des chaînes latérales d'acides aminés. En revanche pour que la catalyse ait lieu, il faut qu'une position soit échangeable pour lier le substrat. Enfin les protéines de transport ont en général un nombre plus faible de ligands pour pouvoir transférer le métal, en général, deux pour le cuivre(I) et trois pour le zinc(II).

Enfin, la nature des ligands est également influencée par l'environnement. Le périplasma des bactéries gram négatives est un environnement plus oxydant que le cytoplasme. Les cystéines (thiols) étant sensibles à l'oxydation, les protéines périplasmiques présentent davantage de méthionines (thioéthers) moins sensibles à l'oxydation que les thiols^[38].

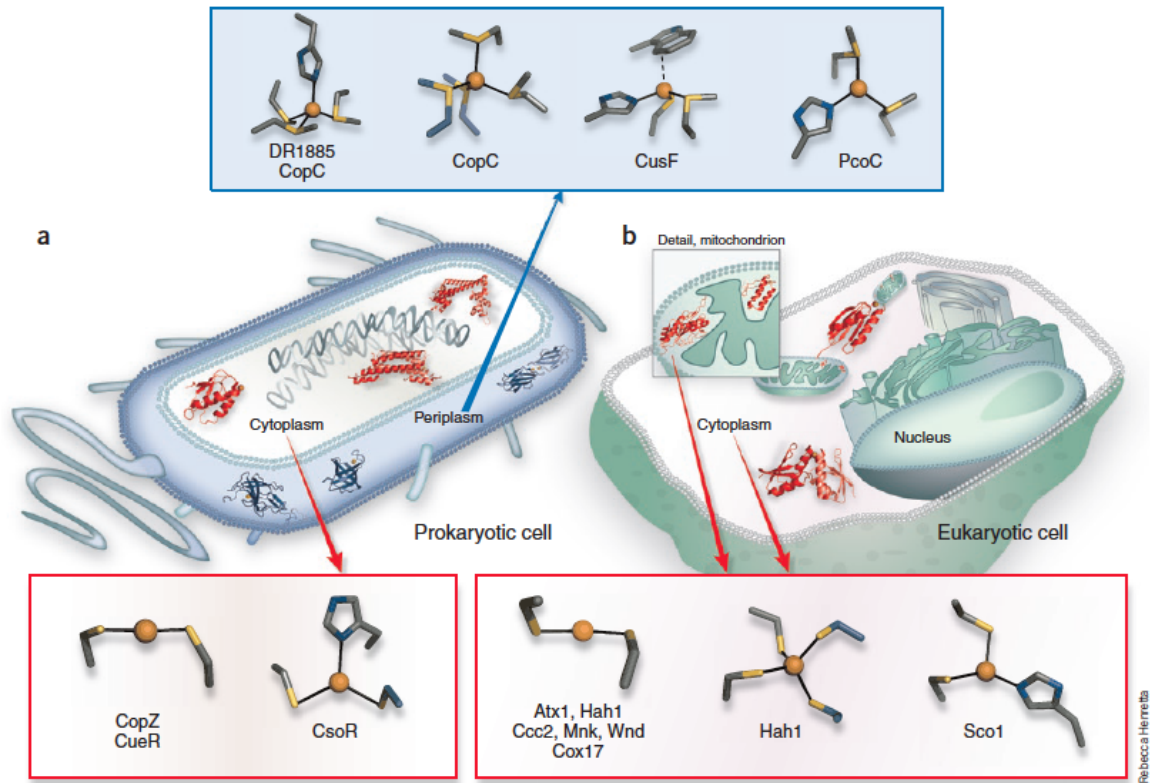


Fig. 1.8 : Sites de coordination assurant le transport ou la détection du cuivre(I) selon leur localisation^[38]. (a) Structure des protéines à cuivre chez les procaryotes. Les protéines périplasmiques (en bleu) forment des complexes chargés positivement alors que les sites des protéines cytoplasmiques sont chargés négativement (en rouge).

1.2 Méthodes de détection des métaux

Les méthodes de détection des métaux^[39,40] sont variées et permettent de répondre à des questions différentes. Les techniques basées sur l'analyse élémentaire (spectrométrie par torche à plasma), la spectrométrie de masse (ICP-MS, NanoSIMS), ou les rayons X (XAS), détectent directement le métal, ce qui donne accès à la concentration totale en métal. La sensibilité et la résolution spatiale de ces méthodes augmentent, mais ne permettent pas d'imager la répartition du métal au sein d'une cellule unique. Ces techniques sont utilisées pour quantifier la répartition des métaux au sein d'un organisme, ou d'un tissu.

Par ailleurs, toutes ces techniques permettent d'imager uniquement la quantité totale de métal. Les sondes fluorescentes sont complémentaires, car elles permettent uniquement d'imager le métal qu'elles sont capables de lier, c'est-à-dire le métal mobile. L'utilisation de sondes fluorescentes permet d'imager de manière dynamique la répartition du métal au niveau subcellulaire. Les informations obtenues sont donc complémentaires de celles obtenues par d'autres techniques. La fluorescence est une technique peu onéreuse et son utilisation est répandue. Il existe deux types de sondes : les sondes synthétiques (souvent de petites molécules organiques) et les sondes codées génétiquement (protéines).

1.2.1 Sondes fluorescentes

Les sondes organiques^[33,41,42] sont composées d'un chromophore et d'une partie permettant de lier le métal. Certaines sondes entrent dans les cellules sous cette forme, pour d'autres il est nécessaire de masquer les fonctions trop hydrophiles^[43] ou d'ajouter un peptide aidant à la pénétration cellulaire^[44,45]. En effet, certaines séquences peptidiques sont connues pour faire entrer des protéines de taille conséquente dans les cellules. L'adressage de ces peptides à l'intérieur de la cellule est en revanche souvent mal connu. Enfin, les sondes peuvent être microinjectées, ce qui permet de mieux contrôler la quantité de sonde à l'intérieur de la cellule.

Les sondes codées génétiquement^[46] ont l'avantage et l'inconvénient d'être directement exprimées dans les cellules. Elles ne souffrent pas de difficultés pour entrer dans la cellule mais ne sont utilisables que dans les cellules capables de les exprimer. Ces protéines correspondent à l'association de protéines fluorescentes et de protéines complexant le métal.

1.2.1.1 Critères pour une sonde idéale

Les critères pour la conception d'une sonde sont de nature biochimique et photophysique.

- D'un point de vue biochimique, la sonde doit être sélective et spécifique d'un métal. Dans la cellule de nombreux métaux de la première période du bloc d sont présents (Fe, Cu, Zn, Mn, Ni, V). Il faut que la sonde soit capable de complexer sélectivement^[47] un métal qui n'est pas nécessairement le plus abondant ou le plus compétitif de la série d'Ivring-Williams ($Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$)^[48].
- La cinétique et la thermodynamique de la complexation du métal par la sonde doivent être ajustées. La complexation du métal doit être réversible et rapide pour mesurer la distribution de manière dynamique. L'affinité de la sonde doit être telle que la constante de dissociation soit dans la gamme de concentration en métal mobile. Si l'affinité est trop faible, la sonde ne complexera pas le métal. Si l'affinité est trop importante, toute la sonde sera sous forme complexée, ce qui peut faire varier la quantité de métal disponible et perturber le fonctionnement de la cellule.

Cependant la « bonne » affinité dépend de la concentration en sonde à l'intérieur de la cellule. En effet, si la concentration en sonde est plus importante que la concentration en métal à imager, la sonde peut séquestrer tout le métal labile. Cet effet peut être contrebalancé par la décomplexation du métal stocké par la cellule. Mais si la concentration en sonde est plus importante que le stock, alors la sonde entre en compétition avec les protéines utilisant le métal comme cofacteur, ce qui perturbe le fonctionnement cellulaire^[46].

- Enfin la sonde doit être capable d'entrer dans les cellules et de ne pas perturber leur fonctionnement. Les sondes doivent être stables, c'est-à-dire ne doivent pas réagir avec le milieu cellulaire, et être non toxiques.
- La concentration locale de la sonde doit être connue ou mesurable pour ne pas confondre une forte concentration en métal avec une concentration localement élevée en sonde libre. Une des possibilités pour éviter de déterminer la concentration locale en sonde, est de concevoir une sonde ratiométrique, c'est-à-dire d'ajouter à la sonde qui s'allume en présence de métal, un signal référence dont l'intensité ne varie pas (fig.1.10). Plus généralement, il faut que les deux signaux varient de manières indépendantes lors de la complexation du métal. Ces deux signaux peuvent être l'émission à deux longueurs d'onde différentes pour une même longueur d'onde d'excitation, ou bien l'émission à une longueur d'onde donnée pour deux longueurs d'onde d'excitation (fig.1.9).



Fig. 1.9 : Deux possibilités pour une sonde ratiométrique : deux signaux d'émission (à gauche) ou deux signaux d'excitation indépendants (à droite).

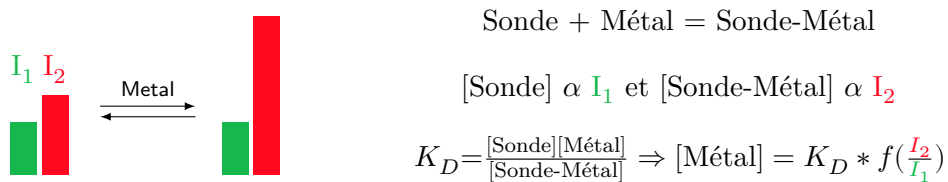


Fig. 1.10 : Principe d'une sonde ratiométrique. Exemple de variations de l'intensité des signaux en présence de métal (à gauche). La concentration en métal dépend uniquement du rapport des deux signaux et pas de la concentration en sonde (à droite).

- D'un point de vue photophysique, la réponse de la sonde doit varier en présence de métal. Pour une meilleure résolution spatiale, il est préférable que la sonde s'allume plutôt qu'elle ne s'éteigne en présence du métal. La sonde doit également résister au photoblanchiment pendant la durée de l'expérience.
- Les milieux biologiques absorbent la lumière dans l'ultraviolet (UV) et jusque dans le visible (fig.1.11), et l'eau dans l'infrarouge. Pour ne pas endommager les cellules avec un rayonnement trop énergétique et pour une meilleure pénétration de la lumière, il est préférable de travailler dans la fenêtre de transparence des milieux biologiques^[49],

c'est-à-dire exciter dans le visible ou le proche infrarouge et détecter dans le proche infrarouge. De plus, en augmentant la longueur d'onde, on diminue la diffusion de la lumière^[50].

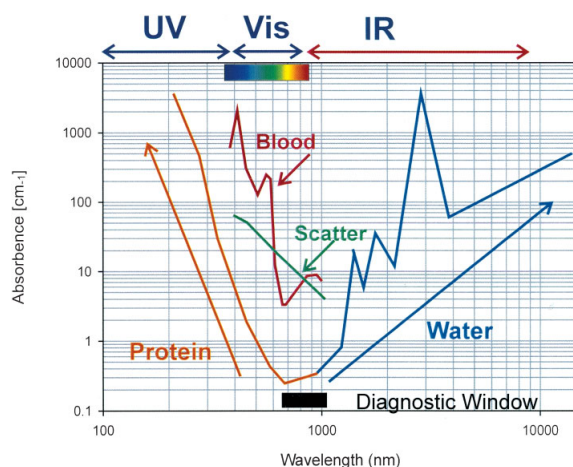


Fig. 1.11 : Absorption des milieux biologiques^[51].

1.2.1.2 État de l'art

Les premières sondes à avoir été synthétisées sont des sondes organiques composées d'une partie liant le métal et d'un chromophore organique. En l'absence de métal, un transfert d'électron photoinduit (PET : *Photoinduced electron transfer*) (fig.1.13) de la partie liant le métal vers le chromophore, éteint la fluorescence du chromophore. En présence de métal, les paires libres d'électrons sont impliquées dans la liaison du métal. Le transfert d'électron photoinduit n'a pas lieu et le chromophore fluoresce, la sonde s'allume (fig.1.12)^[33,41,42,46].

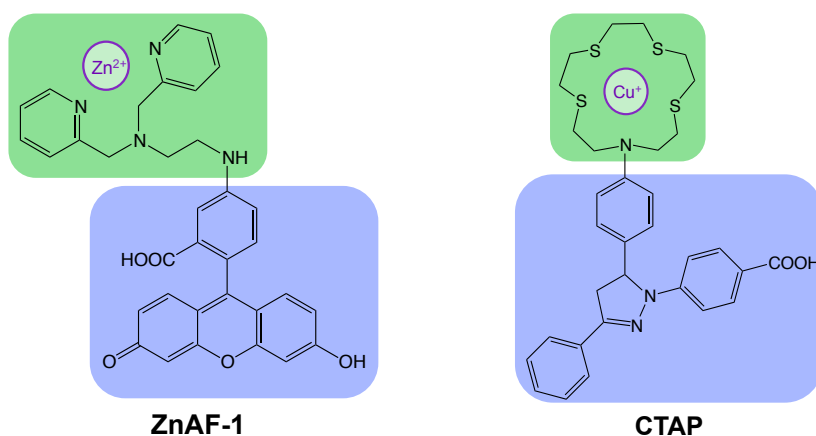


Fig. 1.12 : Sondes organiques à zinc^[52] et à cuivre^[53] basées sur le transfert d'électron photoinduit. En vert : partie liant le métal, donneur d'électron. En bleu : le chromophore, accepteur d'électron.

Ces sondes étaient loin de répondre aux différents critères d'une sonde idéale. Elles ont donc été améliorées point par point.

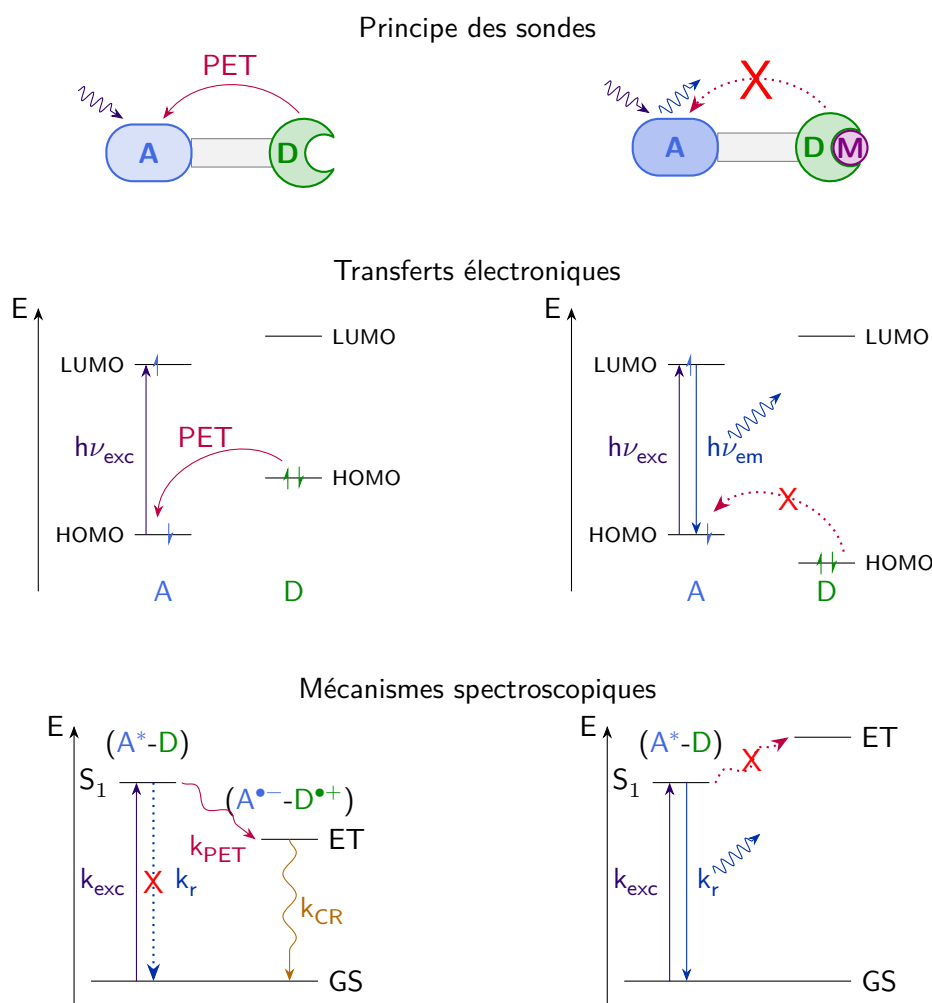


Fig. 1.13 : Principe des sondes basées sur le transfert d'électron photoinduit (PET). A : accepteur, D : donneur, GS : *Ground state*, état fondamental, S_1 : état excité singulet, r : désexcitation radiative, ET : état de transfert d'électron, CR : recombinaison de charge.

Le transfert d'électron photoinduit peut se produire entre deux entités distantes de plusieurs dizaines d'angströms. Pour rendre une sonde ratiométrique, il faut ajouter un deuxième chromophore. Si on veut que l'émission de ce chromophore soit indépendante du premier, il est alors nécessaire de l'éloigner du premier chromophore. L'équipe de S. Lippard a séparé les deux chromophores par une dizaine d'acides aminés^[54]. La séquence d'acides aminés (neuf prolines et une lysine) est choisie pour que le peptide ait une structure rigide, dans ce cas une hélice, afin de maintenir les deux chromophores à distance (fig.1.14A).

À cause de leur squelette aromatique, ces sondes sont souvent peu solubles dans l'eau et ont tendance à s'agréger. Pour les rendre plus solubles, il est nécessaire d'ajouter des groupements hydrophiles. L'équipe de C.Fahrni a modifié la sonde à cuivre CTAP^[55] avec des groupements hydroxyles ou sulfates pour éviter l'agrégation (fig.1.14B).

Ces sondes organiques sont souvent capables de rentrer dans les cellules mais leur répartition n'est pas prévisible. Pour palier à cela, il est possible de greffer à ces sondes une séquence peptidique connue pour aider à la pénétration cellulaire^[44,45], ou pour l'adressage à un compartiment spécifique. C'est ce qui a été fait sur des sondes à zinc par l'équipe de

S.Lippard^[56] (fig.1.14C).

Les sondes organiques émettant dans le rouge ou le proche infrarouge sont peu nombreuses^[57,58] car le photoblanchiment est souvent important. Au final, les objectifs en terme de longueur d'onde sont rarement atteints (fig.1.15), de même que la gamme d'affinité pour les sondes à cuivre.

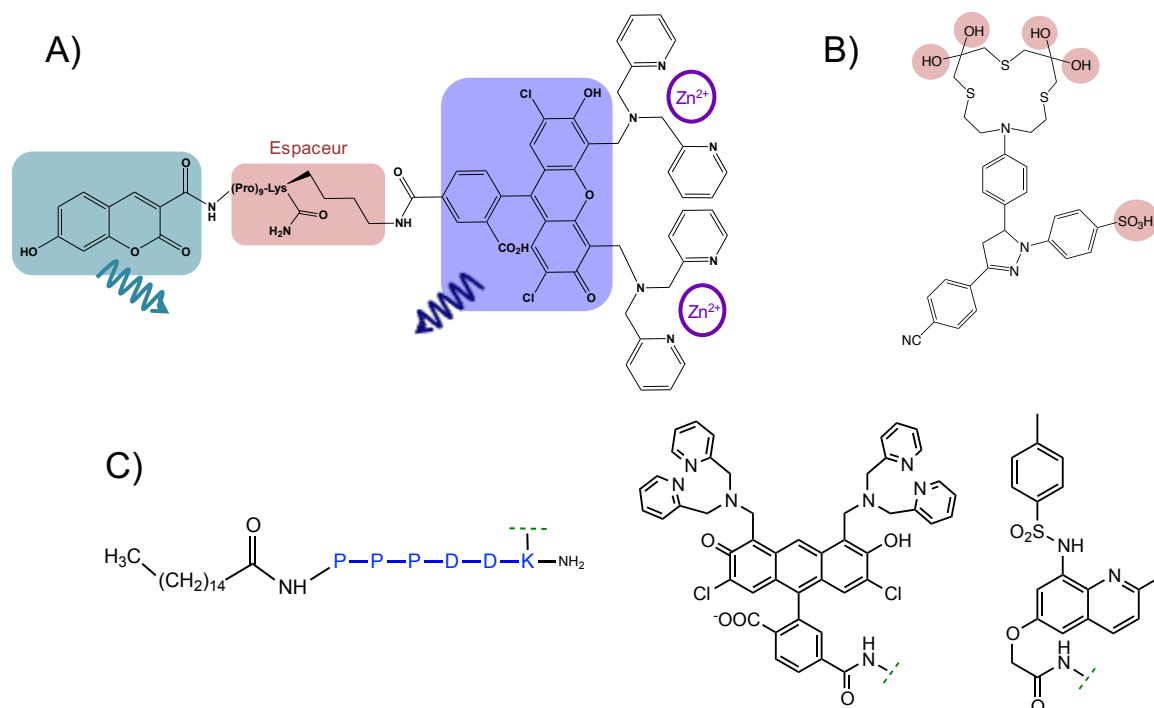


Fig. 1.14 : Exemples de sondes pour lesquelles un des critères a été amélioré^[54-56].

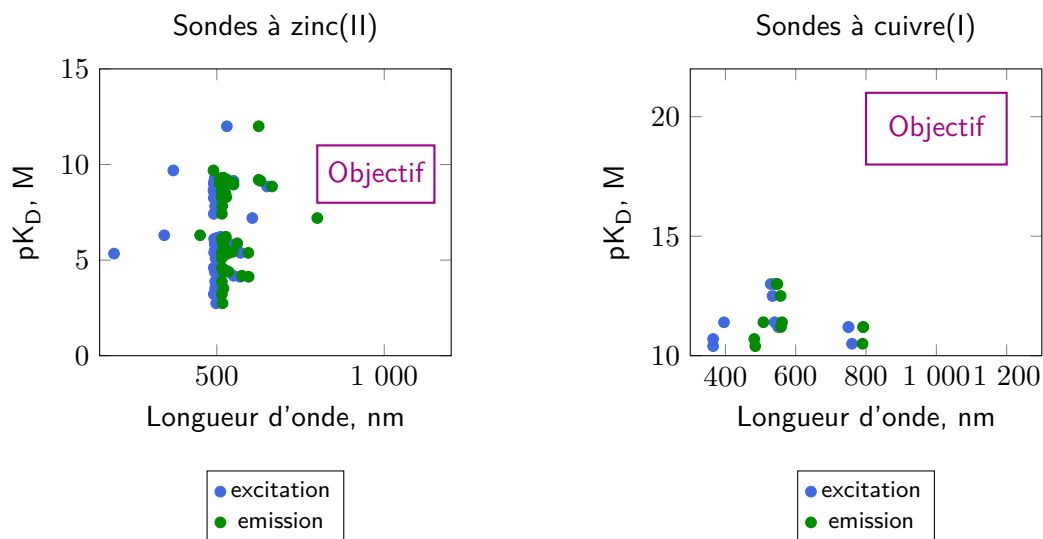


Fig. 1.15 : Positionnement des sondes en fonction de leur constante de dissociation et de leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission. En violet : Situation d'une sonde idéale. Affinité dans la gamme de la concentration en métal mobile, et émission/excitation dans le proche infrarouge.

Un autre moyen de concevoir des sondes est d'utiliser le transfert d'énergie, en particulier de type Förster (FRET pour *Förster Resonance Energy Transfer*) (fig.1.18). Ce transfert d'énergie non radiatif nécessite le recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur (fig.1.16). L'efficacité du transfert dépend notamment de la distance entre donneur et accepteur.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \text{ avec } R_0^6 = \frac{9000Q_0(\ln 10)\kappa^2 J}{128\pi^5 n^4 N_A}$$

Q_0 le rendement quantique du donneur en l'absence d'accepteur, κ le facteur d'orientation des dipôles, n l'indice de réfraction du milieu, et J l'intégrale de recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.

La modulation de l'intensité du FRET en fonction de la distance entre donneur et accepteur est utilisée par les biologistes pour faire des études d'interaction entre protéines. Ces protéines sont génétiquement modifiées pour pouvoir accrocher une protéine fluorescente à la protéine d'intérêt. A. Palmer a conçu une sonde à zinc sur le même principe. Il s'agit d'une protéine de fusion^[59,60] composée de deux protéines fluorescentes reliées par un domaine liant le zinc (fig.1.17). Le domaine doigts de zinc choisi est connu pour passer d'un état désordonné à un état structuré, plus compact, en présence de zinc. Cette structure compacte permet de rapprocher les deux protéines fluorescentes. Ainsi le transfert d'énergie entre les protéines fluorescentes devient plus efficace en présence de zinc, et la sonde s'allume.

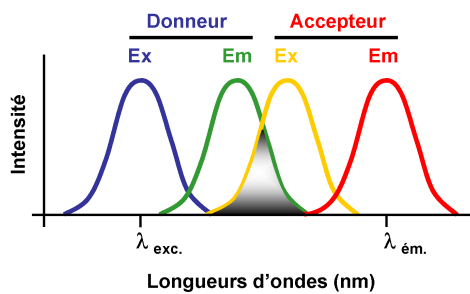


Fig. 1.16 : Spectres d'absorption et d'émission du donneur et de l'accepteur. Le recouvrement est nécessaire pour qu'il y ait transfert d'énergie.

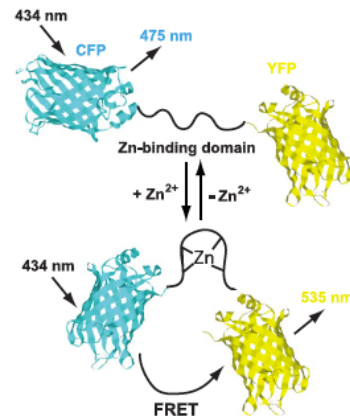


Fig. 1.17 : Sonde à zinc basée sur des protéines fluorescentes^[59].

Le rayon de Förster, distance pour laquelle l'efficacité du transfert est de 50 %, varie entre 10 et 100 Å selon la nature du donneur et de l'accepteur. Pour des molécules organiques, dont l'absorption et l'émission sont de larges bandes, le rayon de Förster est de plusieurs dizaines d'angströms, ce qui est adapté pour étudier l'interaction entre protéines. Il est difficile de concevoir une sonde organique moléculaire permettant de faire varier la distance entre donneur et accepteur de plusieurs dizaines d'angströms, car cela nécessiterait la synthèse de molécules de grandes tailles. Pour ce type de sondes, dont le principe repose sur une variation de distance, il est préférable que le rayon de Förster soit plus court. Une possibilité est d'utiliser des lanthanides comme accepteur, car dans ce cas, les transferts d'énergie ne sont efficaces qu'à faible distance (<10 Å). Ainsi une variation de quelques angströms aura plus de conséquences sur l'efficacité du transfert d'énergie.

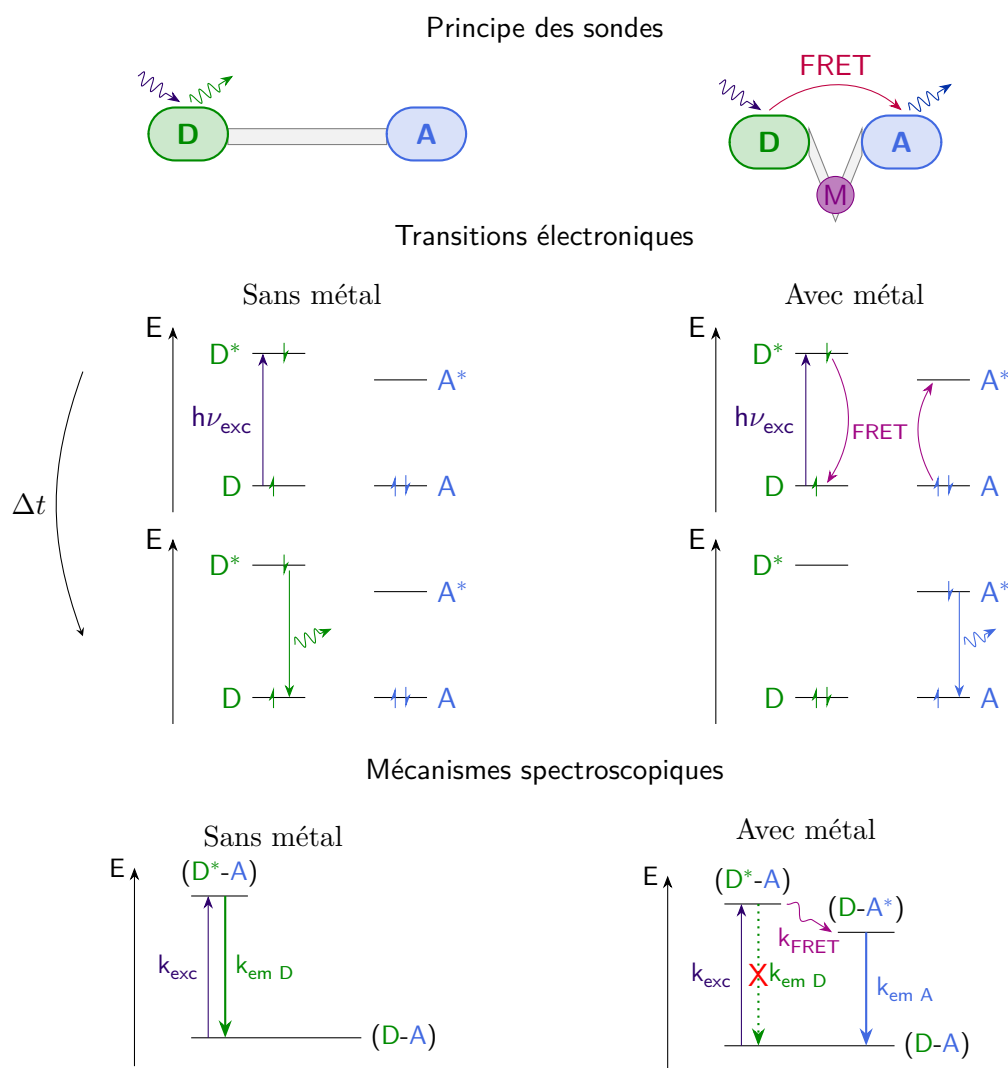


Fig. 1.18 : Principe des sondes basées sur le transfert d'énergie de type Förster (FRET). D : donneur, A : accepteur, M : métal, exc : excitation, em : émission.

1.2.2 Projet de sonde

Dans la conception des sondes, nous nous sommes inspirés de métalloprotéines pour leur sélectivité et leur spécificité vis-à-vis d'un métal particulier. Nous avons utilisé des peptides d'une vingtaine d'acides aminés qui modélisent le site de liaison du métal de la protéine.

La structure peptidique peut permettre d'éviter les problèmes d'agrégation rencontrés par les sondes organiques, et d'assurer une certaine biocompatibilité. Certains peptides sont capables d'entrer passivement dans les cellules, d'autres entrent grâce à des séquences de pénétration cellulaire^[44]. Grâce à la flexibilité de la synthèse peptidique, il est possible de greffer ces séquences à nos peptides.

L'utilisation de peptides permet également d'ajuster finement l'affinité pour le métal en mutant les acides aminés directement liés au métal, ou en modifiant la seconde sphère de coordination, ou encore en influant sur le repliement du peptide^[61]. Par exemple, pour le peptide consensus^[62], modèle de doigt de zinc $\beta\beta\alpha$, la formation du cœur hydrophobe lors de la complexation du zinc augmente l'affinité pour le zinc^[63].

Pour l'émission de la sonde, nous utilisons des complexes de lanthanides (cf § 1.3). Selon le lanthanide utilisé, l'émission se fait dans le visible (excitation dans l'ultraviolet) ou le proche infrarouge (excitation dans le visible). Les lanthanides proche infrarouge sont plus adaptés à l'imagerie, mais ils nécessitent des détecteurs appropriés dont nous ne disposons pas au laboratoire. Étant donné que les lanthanides ont des propriétés chimiques semblables, il est aisé de mettre au point les sondes avec des lanthanides émettant dans le visible, et seulement dans un deuxième temps de changer le lanthanide pour émettre dans le proche infrarouge.

1.3 Lanthanides

Les lanthanides sont les 14 éléments de la première période du bloc f allant du lanthane à l'ytterbium, plus le lutécium qui est l'élément suivant dans la classification périodique (fig. 1.19). Les lanthanides ainsi que l'yttrium et le scandium sont également appelés « terres rares » car ils ont été découverts au XIX^{ème} siècle dans des minerais peu courants à cette époque, mais il ne sont pas tous rares. Le plus abondant est le cérium c'est le 25^{ème} élément le plus abondant (68 p.p.m.). Le lutécium, un des lanthanides les plus rares et aussi un des lanthanides le plus cher : 75 000 \$/kg en 2001^[10]. Le plus rare est le prométhium, qui est même quasiment absent de la croûte terrestre, car il ne possède pas d'isotope stable à long terme. L'isotope le plus stable a une période de 17,7 ans. Les seules traces existantes sont issues de la fusion de l'uranium.

Tableau périodique des éléments

1 IA																												18 VIIIA													
1	H																	He																							
2	Li Be																	B C		N O		F Ne																			
3	Na Mg																	Al Si		P S		Cl Ar																			
4	K Ca Sc Ti V Cr Mn Fe Co Ni Cu Zn Ga Ge As Se Br Kr																																								
5	Rb Sr Y Zr Nb Mo Tc Ru Rh Pd Ag Cd In Sn Sb Te I Xe																																								
6	Cs Ba La-Lu Hf Ta W Re Os Ir Pt Au Hg Tl Pb Bi Po At Rn																																								
7	Fr Ra Ac-Lr Rf Db Sg Bh Hs Mt Ds Rg Cn Uut Fl Uup Lv Uus Uuo																																								
19	Scandium																	Aluminium		Silicium		Phosphore		Sulphure		Chlore		Argon													
20	Calcium																	Gallium		Germanium		Arsenic		Sélénium		Brome		Krypton													
21	Scandium																	Indium		Tin		Antimoine		Tellure		Iode		Xénon													
22	Titane																	Thallium		Plomb		Bismuth		Polonium		Astate		Radon													
23	Vanadium																	Cadmium		Mercure		Thallium		Plomb		Bismuth		Polonium		Astate		Radon									
24	Chrome																	Zinc		Cadmium		Mercure		Thallium		Plomb		Bismuth		Polonium		Astate		Radon							
25	Manganèse																	Gallium		Germanium		Arsenic		Sélénium		Brome		Krypton													
26	Fer																	Indium		Tin		Antimoine		Tellure		Iode		Xénon													
27	Cobalt																	Thallium		Plomb		Bismuth		Polonium		Astate		Radon													
28	Nickel																	Cadmium		Mercure		Thallium		Plomb		Bismuth		Polonium		Astate		Radon									
29	Cuivre																	Zinc		Cadmium		Mercure		Thallium		Plomb		Bismuth		Polonium		Astate		Radon							
30	Zinc																	Gallium		Germanium		Arsenic		Sélénium		Brome		Krypton													
31	Ga																	In		Sn		Sb		Te		I		Xe													
32	Ge																	Tl		Pb		Bi		Po		At		Rn													
33	As																	Cd		In		Sn		Sb		Te		I		Xe											
34	Se																	Ag		Pd		Rh		Ru		Tc		Mo		Nb		Zr		Y		Sr		Rb			
35	Br																	Pt		Au		Hg		Tl		Pb		Bi		Po		At		Rn							
36	Kr																	Os		Ir		Pt		Au		Hg		Tl		Pb		Bi		Po		At		Rn			
37	Rb																	Re		Os		Ir		Pt		Au		Hg		Tl		Pb		Bi		Po		At		Rn	
38	Sr																	Rh		Pd		Ag		Cd		In		Sn		Sb		Te		I		Xe					
39	Y																	Ru		Rh		Pd		Ag		Cd		In		Sn		Sb		Te		I		Xe			
40	Zr																	Pd		Ag		Cd		In		Sn		Sb		Te		I		Xe							
41	Nb																	Ag		Cd		In		Sn		Sb		Te		I		Xe									
42	Mo																	Cd		In		Sn		Sb		Te		I		Xe											
43	Tc																	In		Sn		Sb		Te		I		Xe													
44	Ru																	Sn		Sb		Te		I		Xe															
45	Rh																	Sb		Te		I		Xe																	
46	Pd																	Te		I		Xe																			
47	Ag																	I		Xe																					
48	Cd																	Xe																							
49	In																																								
50	Sn																																								
51	Sb																																								
52	Te																																								
53	I																																								
54	Xe																																								
55	Cs																																								
56	Ba																																								
57	La																																								
58	Ce																																								
59	Pr																																								
60	Nd																																								
61	Pm																																								
62	Sm																																								
63	Eu																																								
64	Gd																																								
65	Tb																																								
66	Dy																																								
67	Ho																																								
68	Er																																								
69	Tm																																								
70	Yb																																								
71	Lu																																								
72	Hf																																								
73	Ta																																								
74	W																																								
75	Re																																								
76	Os																																								
77	Ir																																								
78	Pt																																								
79	Au																																								
80	Hg																																								
81	Tl																																								
82	Pb																																								
83	Bi																																								
84	Po																																								
85	At																																								
86	Rn																																								
87	Fr																																								
88	Ra																																								
89	Ac																																								
90	Th																																								
91	Pa																																								
92	U																																								
93	Np																																								
94	Pu																																								
95	Am																																								
96	Cm																																								
97	Bk																																								
98	Cf																																								
99	Es																																								
100	Fm																																								
101	Md																																								
102	No																																								
103	Lr																																								

■ Alcalins
 ■ Alcalino-terreux
 ■ Métaux
 □ Métalloïdes
 □ Non-métaux
 ■ Halogènes
 ■ Gaz nobles
 ■ Lanthanides
 □ Actinides

Fig. 1.19 : Tableau périodique des éléments

Il y a dix ans, la Chine était le seul producteur de lanthanides. Pour des raisons géostratégiques, en 2011 l'Australie et les États-Unis ont relancés l'exploitation de gisements (cf [Société chimique de France](#)). Les minerais extraits contiennent des mélanges de lanthanides, principalement du cérium (50%), du lanthane (25%), du néodyme (14%), du praséodyme (4%) et 7% des autres. Les lanthanides ont des propriétés chimiques similaires, il est donc difficile de les séparer par les méthodes classiques. C'est pourquoi ils sont aussi utilisés directement en mélange (*Mischmetall*).

Les lanthanides sont utilisés pour leurs propriétés magnétiques dans la fabrication d'aimants puissants ou comme agent de contraste pour l'imagerie magnétique, mais aussi pour leurs propriétés de luminescence. En effet ils entrent dans la composition de nombreux objets de la vie courante comme les ampoules basse consommation, les écrans LCD, les lasers, et même les engrais (Chine), bien que leur toxicité soit peu connue^[64].

Au vu de l'importance que prennent les lanthanides dans nos sociétés, des entreprises se lancent dans le recyclage. Même si le recyclage est encore marginal, moins de 1% des « terres rares » étaient recyclées en 2011, il est crucial pour les pays qui n'ont pas de mines de lanthanides^[65].

1.3.1 Propriétés atomiques et chimiques

Les lanthanides existent principalement au degré d'oxydation +III, leur configuration électronique est donc $\text{Ln}^{3+} : [\text{Xe}] 6s^0 4f^n$, $n = 0$ pour le lanthane et $n = 14$ pour le lutécium. L'extension spatiale des orbitales f est plus faible que celle des orbitales $5s^2 5p^6$ (fig. 1.20). Elles sont donc souvent considérées comme des orbitales de cœur. Cette propriété des orbitales f confèrent aux lanthanides des propriétés particulières.

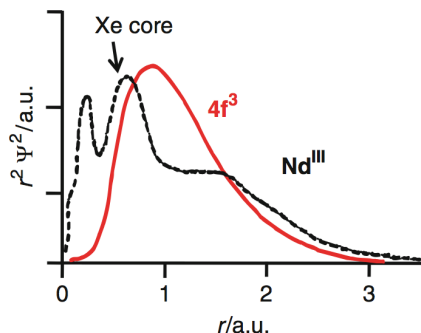


Fig. 1.20 : Fonction d'onde radiale des trois électrons 4f du néodyme(III) comparée à la fonction d'onde radiale du cœur xénon^[66].

La taille des lanthanides diminue du lanthane au lutécium, c'est la contraction des lanthanides. L'électron 4f ajouté, en passant d'un lanthanide au suivant dans la classification périodique, écran peu les électrons externes. La charge partielle ressentie par les électrons $5s^2 5p^6$ est donc plus importante et le rayon diminue.

Les électrons externes étant les électrons des orbitales $5s^2 5p^6$, tous les lanthanides présentent quasiment la même chimie de coordination. Les liaisons formées avec les ligands sont de nature électrostatique, il n'y a pas de direction privilégiée. Les complexes formés sont donc un compromis entre interactions électrostatiques stabilisantes et encombrement stérique déstabilisant. Ainsi plus le rayon du lanthanide est grand et plus il acceptera de ligands. Cependant en général, un environnement de 8 ou 9 ligands convient à tous les lanthanides.^[67]

1.3.2 Propriétés magnétiques

Le néodyme entre dans la composition d'aimants permanents puissants en alliage avec du fer et du bore. Ces aimants sont utilisés dans les générateurs des éoliennes, les moteurs électriques des voitures hybrides, ou encore dans les moteurs des disques durs.

Le gadolinium avec ses 7 électrons non appariés, possède la propriété de réduire fortement le temps de relaxation du milieu environnant. C'est pourquoi il est utilisé comme agent de contraste. Bien que la toxicité des lanthanides soit encore peu décrite^[64], dans le cas du gadolinium, la toxicité aiguë des agents de contrastes chez les personnes souffrant d'insuffisance rénale a été montrée^[68]. Pour limiter la toxicité du gadolinium, les agents de contraste utilisés en IRM sont des complexes de gadolinium. Les chélates utilisés sont des polyaminocarboxylates cycliques (DOTA-Gd), ou linéaires (DTPA-Gd) (fig.1.21). Pour que ces agents de contraste ne soient pas toxiques, il faut notamment que les complexes soient stables thermodynamiquement et cinétiquement. Pour nos sondes, nous utiliserons donc des dérivés de ces chélates, qui présentent en plus l'avantage d'être commerciaux.

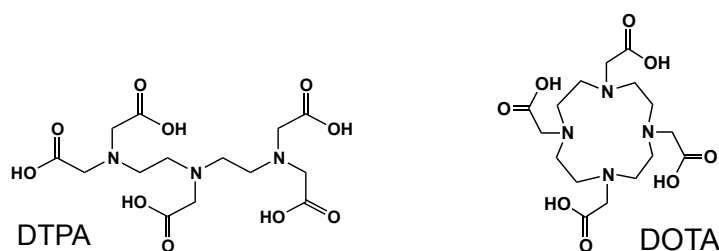


Fig. 1.21 : Formule du DTPA (2-[Bis[2-[bis(carboxyméthyle)amino]éthyl]amino]acide acétique) et du DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tetraacide acétique).

Les acides carboxyliques de ces ligands se déprotonnent pour lier le gadolinium, en plus des azotes. Ces ligands octadentes ne suffisent pas à remplir la sphère de coordination des lanthanides, une molécule d'eau vient en neuvième ligand^[69,70]. Au contact du gadolinium, le temps de relaxation de la molécule d'eau diminue. L'échange de cette molécule d'eau avec les molécules du milieu induit une relaxation plus rapide de l'environnement proche de l'agent de contraste. La molécule d'eau présente dans la sphère de coordination du lanthanide est donc essentielle au fonctionnement de l'agent de contraste^[71].

1.3.3 Propriétés de luminescence

L'émission des lanthanides est dû à trois types de transitions électroniques : les transitions f-f, les transitions 4f-5d, et s'ils sont complexés les transitions dues à des transferts de charge métal-ligand (MLCT) ou ligand-métal (LMCT)^[72]. Les transitions 4f-5d et celles dues à des transferts de charge MLCT et LMCT sont hautes en énergie^[66] et conduisent à des transitions dans l'UV lointain. Nous nous intéresserons donc uniquement aux transitions f-f.

Les transitions f-f sont des transitions entre états de même symétrie, elles sont donc interdites par un mécanisme de type dipolaire (règles de sélection de Laporte)^[73]. C'est pourquoi les coefficients d'absorption molaires des lanthanides sont faibles ($1-10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). L'intensité des transitions est décrite par la théorie de Judd-Ofelt^[74,75]. Ces règles établies pour un ion isolé sont partiellement relaxées lorsque l'environnement du lanthanide est non centrosymétrique. Cependant l'excitation directe des lanthanides reste peu efficace.

Les lanthanides sont en général excités par un transfert d'énergie provenant d'un chromophore organique, appelé antenne. On parle alors d'effet d'antenne^[76,77]. Pour que le transfert soit efficace, il faut que l'antenne soit adaptée en énergie au lanthanide. Dans le cas de du terbium, les meilleurs rendements quantiques sont obtenus lorsque l'état excité de l'antenne transférant au lanthanide est située entre 2000 et 5000 cm^{-1} au-dessus de l'état accepteur 5D_4 . En dessous de 2000 cm^{-1} , la probabilité de transfert retour est importante et le rendement du transfert diminue^[78]. L'euprium présente plusieurs états excités proches en énergie pouvant intervenir dans le transfert d'énergie^[77]. La corrélation entre le rendement quantique et la position de l'état transférant au lanthanide est plus délicate que pour le terbium. Empiriquement, de bon rendements quantiques sont observés lorsque l'état excité de l'antenne transférant au lanthanide se situe au niveau de l'état 5D_2 de l'euprium^[78].

Par exemple, le tryptophane est une antenne adaptée au terbium (fig.1.22) car son état triplet^[79], à 24600 cm^{-1} ^[79], se situe 4000 cm^{-1} au dessus de l'état 5D_4 du terbium (20500 cm^{-1})^[80]. L'état de l'antenne qui transfère au lanthanide est souvent l'état triplet, mais des transferts via l'état singulet ou un état de transfert de charge sont possibles.^[72]

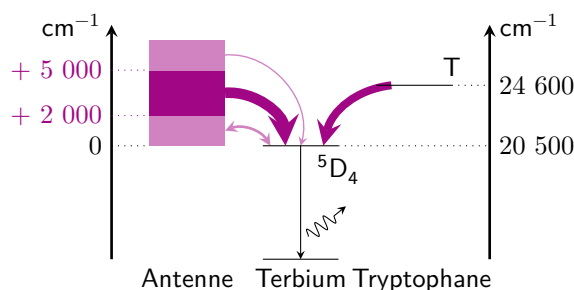


Fig. 1.22 : Énergie de l'état triplet de l'antenne et efficacité du transfert vers le terbium. L'énergie de l'état triplet du tryptophane est dans la gamme d'énergie pour un transfert optimal : entre 2000 et 5000 cm^{-1} au dessus de l'état 5D_4 du terbium.

L'émission des lanthanides est composée de bandes fines qui sont peu modifiées par l'environnement (fig.1.23). Les orbitales f étant des orbitales de cœur, elles sont faiblement affectées par l'environnement. Les transitions f-f sont donc peu sensibles au champ des ligands et peuvent être attribuées à l'aide du diagramme des niveaux d'énergie (fig.1.23 et fig.1.24). Selon le lanthanide l'émission a lieu dans l'ultraviolet (Gadolinium, Thulium), dans le visible (Terbium, Dysprosium, Europium et Samarium) ou dans le proche infrarouge (Samarium, Ytterbium, Néodyme, et Erbium).

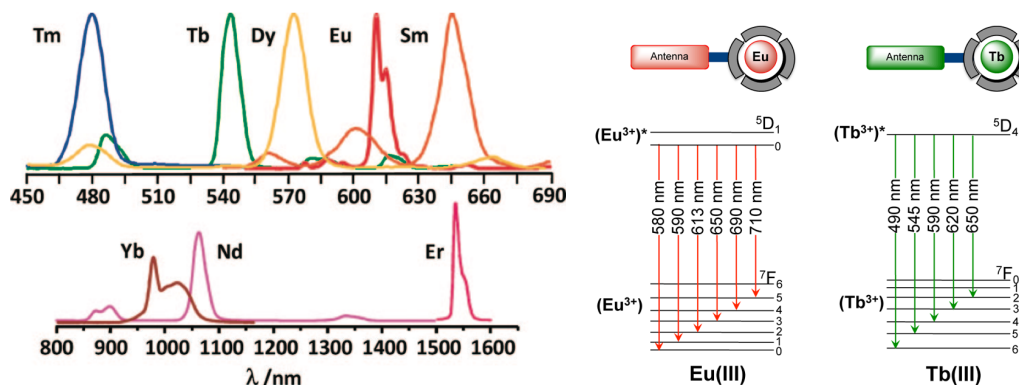


Fig. 1.23 : Spectres de complexes de lanthanides^[81,82] et les transitions associées pour l'euporium et le terbium.^[83]

Une autre particularité des lanthanides, due à l'interdiction des transitions f-f, est leur temps de vie long : de l'ordre de la microseconde pour les lanthanides proche infrarouge, à la milliseconde pour les lanthanides visibles. Ainsi il est possible de faire de la détection résolue en temps (fig.1.25)^[85], c'est-à-dire d'enregistrer le signal après un temps de délai, ce qui permet de couper le signal de fluorescence, dont le temps de vie est de l'ordre de la nanoseconde, et d'isoler le signal du lanthanide (fig.1.26).

Le temps de vie de luminescence des lanthanides est sensible à l'environnement. Les vibrations de type O-H, mais aussi C-H et N-H sont énergétiques et présentent des harmoniques dont l'énergie est proche de l'état excité des lanthanides. La présence de ces vibrateurs offre des voies de désexcitations non radiatives, et diminue le temps de vie des lanthanides. La fréquence de vibration O-D est plus faible que celle de la liaison O-H, ainsi la présence d'une molécule d'eau lourde dans la sphère de coordination du lanthanide n'a pas le même effet sur

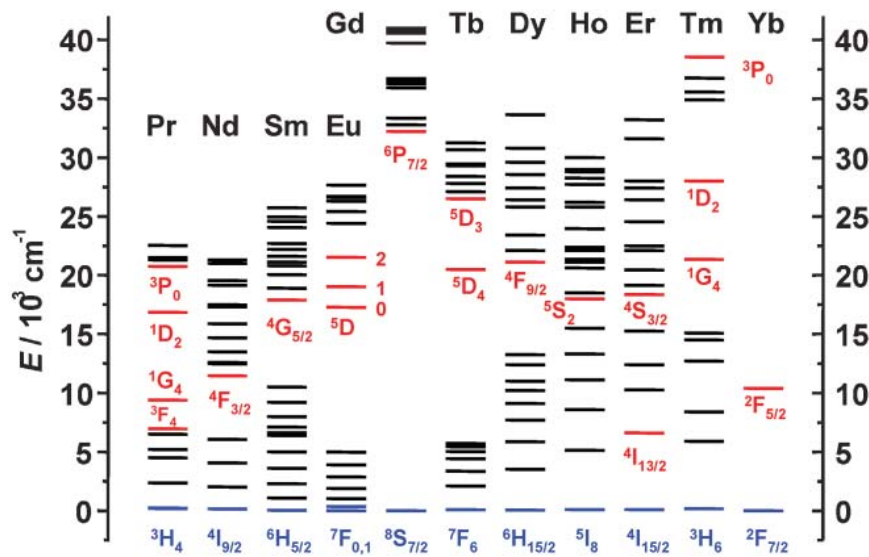


Fig. 1.24 : Diagramme partiel des niveaux d'énergie des lanthanides^[84].

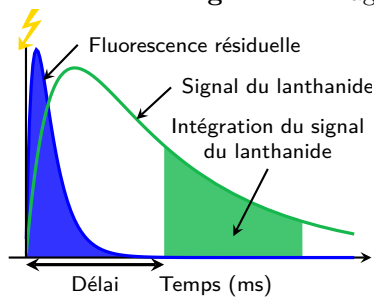


Fig. 1.25 : Principe de la détection résolue en temps.

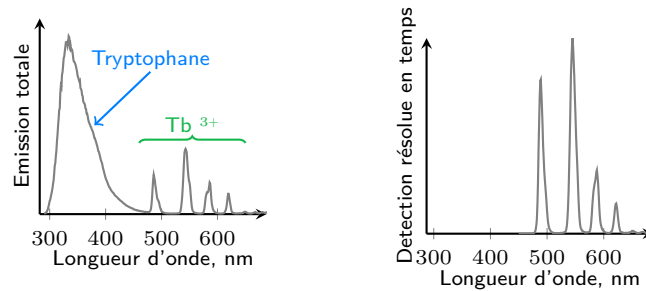


Fig. 1.26 : Effet de la détection résolue en temps sur l'émission d'un complexe contenant un tryptophane et un terbium. (À gauche) Spectre d'émission totale. (À droite) Spectre d'émission en temps résolue. Délai : 200 μ s

le temps de vie qu'une molécule d'eau légère. Le temps de vie de luminescence du lanthanide est plus court dans H_2O que dans D_2O . Cette différence de temps de vie est utilisée pour déterminer expérimentalement le nombre de molécules d'eau grâce aux relations empiriques déterminées pour chaque lanthanide (eq.(1.1)). Pour le terbium : $A = 5 \text{ ms}^{-1}$, $B = 0,06 \text{ ms}$ et $C = 0$ ^[86].

$$q = A \cdot (\Delta k_{\text{obs}} - B) - C \text{ avec } \Delta k_{\text{obs}}(\text{ms}) = k_{H_2O} - k_{D_2O} = \frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \quad (1.1)$$

1.3.4 Sondes optiques utilisant des lanthanides

Les sondes utilisant des lanthanides sont basées sur deux principes différents : soit la présence du substrat module le transfert d'énergie vers le lanthanide, soit la complexation du substrat modifie le temps de vie de luminescence.

Les sondes basées sur la modulation du transfert d'énergie sont les plus nombreuses. La

modification de l'efficacité du transfert d'énergie est due soit à une diminution des processus compétitifs, soit à l'augmentation de l'efficacité du transfert.

Comme pour les sondes purement organiques (cf 1.2.1.2), certaines sondes à zinc sont basées sur le transfert d'électron photoinduit. Elles sont composées de trois parties : le complexe de lanthanide, la partie pour lier le métal, et le chromophore organique, qui dans ce cas est également l'antenne du lanthanide. En l'absence de zinc, l'antenne est principalement désexcitée par le transfert d'électron photoinduit depuis la partie liant le métal. En présence de zinc, ce phénomène compétitif n'a plus lieu, la fluorescence et le croisement intersystèmes sont restaurés, le transfert d'énergie vers le lanthanide est plus important. La luminescence du lanthanide augmente. Pour les trois sondes de la figure 1.27, la luminescence du terbium ou de l'euprimum est multipliée par 1,42, 8,5, et 11 respectivement en présence de zinc^[87–89].

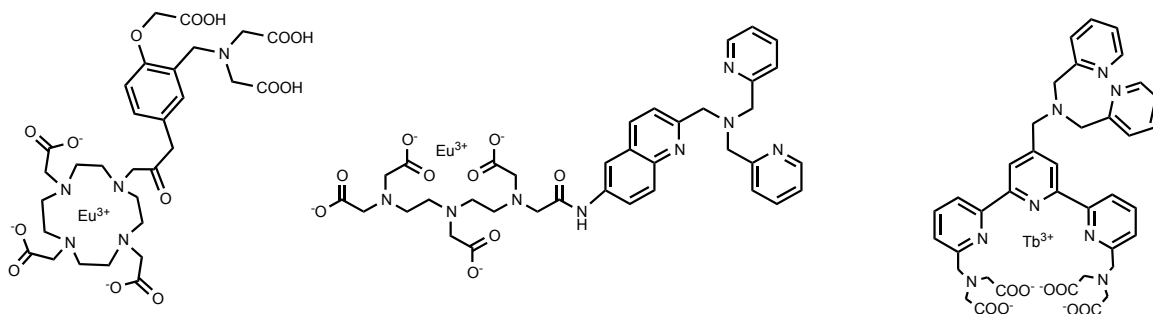


Fig. 1.27 : Exemples de sondes à zinc basées sur le transfert d'électron photoinduit et utilisant des lanthanides^[87–89].

Une possibilité pour modifier l'efficacité du transfert d'énergie vers le lanthanide en présence de substrat, est de modifier la distance entre l'antenne et le lanthanide. La diminution de la distance entre l'antenne et le lanthanide permet d'augmenter l'efficacité du transfert d'énergie et ainsi d'allumer la sonde. En présence de zinc, le peptide développé par l'équipe de M.Taki^[90], se replie ce qui entraîne le rapprochement de l'antenne (carbostyryle 124) du terbium (fig.1.28). La luminescence de la sonde est multipliée par 15.

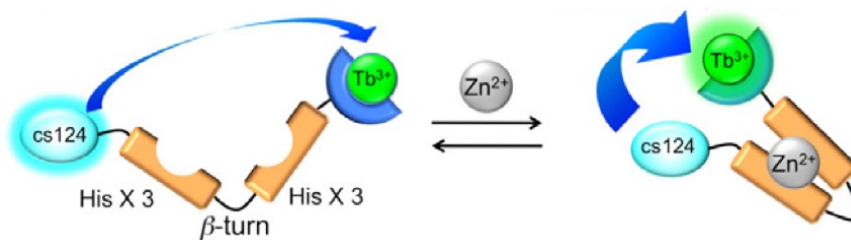


Fig. 1.28 : Exemple de sonde basée sur la modification de la distance antenne-lanthanide en présence de zinc^[90].

Les sondes fonctionnant grâce à une modification du temps de vie, sont basées sur une modification de la sphère de coordination du lanthanide. Par exemple, le remplacement de ligands par des molécules d'eau augmente les désexcitations non radiatives et donc diminue le temps de vie de luminescence du lanthanide. Pour la sonde décrite par S.Pope^[91], la complexation du zinc entraîne le remplacement d'un bras pyridine par deux molécules d'eau dans la sphère de coordination de l'euprimum (fig.1.29). Les désexcitations non radiatives

augmentent, et le temps de vie de luminescence diminue. L'intensité d'émission de l'euporium est divisée par deux en présence de zinc. Pour ces sondes la présence du zinc peut être détectée par la modification de l'intensité d'émission du lanthanide, comme pour les sondes précédentes, ou bien par la modification du temps de vie. L'intérêt de la détection en temps de vie est que les variations observées sont indépendantes de la concentration en sonde. Le temps de vie détecté permet directement de connaître le taux de complexation de la sonde.

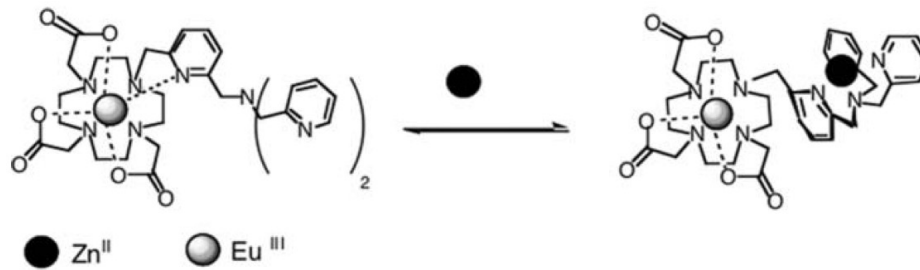


Fig. 1.29 : Exemple de sonde en temps de vie^[91].

1.4 Conception des sondes

Les sondes utilisées au laboratoire sont basées sur des peptides modèles de métalloprotéines, sur lesquels des complexes de lanthanides ont été greffés. La position du lanthanide par rapport à l'antenne est déterminée en fonction du principe qui permet à la sonde de s'allumer en présence du métal. Les sondes à zinc et à cuivre fonctionnent sur des principes différents.

1.4.1 Sondes à zinc

Pour pouvoir faire une sonde basée sur une modulation du transfert d'énergie (FRET), il faut s'inspirer d'une protéine pour laquelle le changement structural est important lors de la complexation du zinc.

Le nombre de protéines à zinc est estimé par génomique à 3000 chez l'Homme^[19,20,92]. 80% de ces protéines contiendraient des domaines doigts de zinc. Les doigts de zinc sont de petits domaines dans lesquels le zinc joue un rôle structural et contribue à la stabilité du domaine. Ils sont notamment impliqués dans des processus d'interaction avec l'ADN, ARN ou avec d'autres protéines^[93,94]. Il existe plusieurs classifications de ces doigts de zinc basées sur leur structure^[95-99].

Pour concevoir la sonde à zinc, nous nous sommes basés sur le doigt zinc classique $\beta\beta\alpha$ (fig.1.30), car ce domaine est connu pour se structurer uniquement en présence de zinc. De plus, les peptides modèles de ce doigt de zinc sont linéaires, ce qui facilite la synthèse.

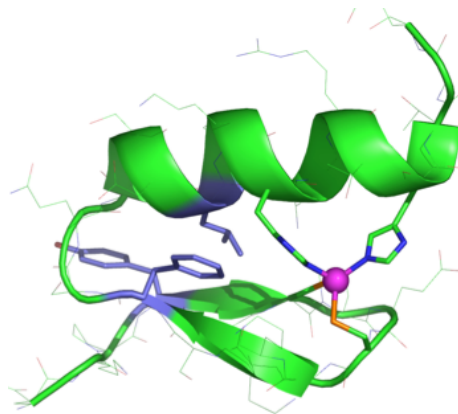


Fig. 1.30 : Structure d'un domaine doigt de zinc $\beta\beta\alpha$.

1.4.1.1 Peptides doigts de zinc

L'alignement des séquences de doigts de zinc classiques $\beta\beta\alpha$ a montré que de nombreux acides aminés sont conservés. La séquence de ces doigts de zinc est de la forme (Tyr,Phe)-X-Cys-X₂₋₄-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X_{3,4}-His^[100], où X représente un acide aminé quelconque. Les acides aminés conservés sont non seulement les acides aminés liant le zinc, mais aussi des acides aminés hydrophobes (en bleu) qui forment un cœur hydrophobe lorsque le peptide est structuré autour du zinc. Les interactions hydrophobes participent à la structuration du peptide et augmentent l'affinité du peptide pour le zinc^[63].

Des peptides modèles des doigts de zinc de type $\beta\beta\alpha$ ont été utilisés comme sonde à zinc. L'équipe de B.Imperiali a intégré un acide aminé non naturel portant un groupement dansyl

sur sa chaîne latérale^[101]. Ce chromophore est introduit dans la séquence peptidique de manière à être exposé au solvant en l'absence de zinc, et à l'intérieur du cœur hydrophobe en présence de zinc. Ce dansyl est sensible à l'environnement. Ainsi lorsque le peptide lie le zinc, la fluorescence augmente et se décale vers le bleu, car les désexcitations non radiatives sont moins nombreuses.

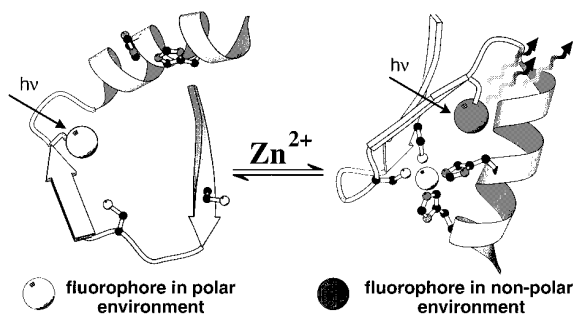


Fig. 1.31 : Principe de fonctionnement de la sonde développée par l'équipe de B.Imperiali, basée sur un doigt de zinc de type $\beta\beta\alpha$ ^[101].

L'équipe de J.M.Berg a greffé deux chromophores sur le peptide doigt de zinc classique $\beta\beta\alpha$ ^[102]. Il est proposé que la structuration du peptide en présence de zinc rapproche les deux chromophores, ce qui conduirait à l'augmentation du transfert d'énergie de la fluoresceine vers la lissamine. L'émission de la fluoresceine augmente moins que l'émission de la lissamine, cette sonde est ratiométrique. Cependant nous ne pouvons pas exclure que la modification de l'environnement entre le peptide libre et le peptide lié au zinc ne module pas aussi la fluorescence des deux chromophores.

1.4.1.2 Principe de la sonde

Notre sonde fonctionne sur le même principe que la sonde de J.M.Berg, en utilisant le tryptophane comme antenne et remplaçant le deuxième fluorophore par un complexe de terbium. Le complexe de terbium est greffé loin du tryptophane dans la chaîne peptidique. En absence de zinc, le tryptophane est loin du terbium, le transfert d'énergie est peu efficace. En présence de zinc, le peptide se compacte et le tryptophane se retrouve à proximité spatiale du terbium (fig.1.33).

La séquence peptidique utilisée est inspirée du deuxième doigt de zinc de la protéine humaine SP1^[103]. De nombreux acides aminés ont été mutés pour diverses raisons (solubilité, coût, réactions parasites ...). La séquence obtenue, notée **SP2**, respecte la forme canonique des doigts de zinc $\beta\beta\alpha$: Phe-X-Cys-X₄-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₄-His.

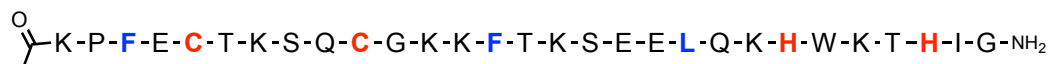


Fig. 1.32 : Séquence de SP2. En rouge : les acides aminés liant le zinc. En bleu : les acides aminés formant le cœur hydrophobe.

Un tryptophane est présent dans la séquence de SP2. Dans la structure du peptide le tryptophane se situe dans l'hélice du côté d'un des deux feuillets β . Pour que le complexe de terbium soit loin du tryptophane dans la chaîne peptidique mais proche spatialement du

tryptophane dans la structure du peptide lié au zinc, le terbium est introduit dans ce feuillet β (fig.1.34). Pour complexer le terbium, un DOTA est greffé sur la chaîne latérale de la lysine située entre les deux cystéines.

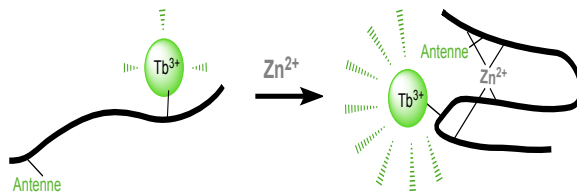


Fig. 1.33 : Principe de la sonde à zinc.

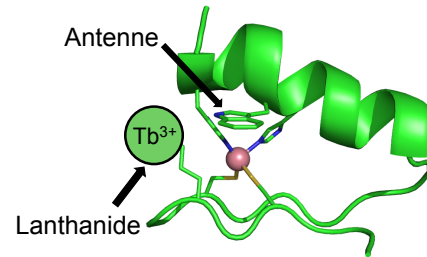


Fig. 1.34 : Structure du peptide doigt de zinc.

Les peptides d'une vingtaine d'acides aminés peuvent être synthétisés chimiquement. La synthèse de **SP2** est aisée et maîtrisée au laboratoire. La synthèse chimique permet d'introduire facilement des acides aminés non naturels dans la séquence. Pour les sondes codées génétiquement, l'insertion d'un acide aminé non naturel requiert de nombreuses manipulations génétiques^[104].

Dans les cellules, il est possible que les peptides soient hydrolysés par les protéases. Cependant la sonde d'Amy Palmer^[59], également basée sur un doigt de zinc $\beta\beta\alpha$, semble ne pas être hydrolysée pendant la durée de l'expérience. Si l'hydrolyse de nos sondes s'avérait trop importante, il serait toujours possible d'utiliser des modèles cycliques^[105], plus difficiles à hydrolyser, ou alors d'inverser la stéréochimie des acides aminés et synthétiser les peptides en série D.

1.4.2 Sonde à cuivre

Pour imaginer le cuivre labile, l'affinité de la sonde ne doit pas être trop importante, c'est pourquoi nous nous sommes inspirés d'une chaperonne à cuivre. Il s'agit de la protéine CusF, une chaperonne^[107] faisant partie du système CusCFBA d'efflux de l'argent et du cuivre chez *Escherichia coli*^[108] (fig. 1.35). L'opéron *cusCFBA* codant pour les protéines CusC, CusF, CusB, et CusA, est une des multiples lignes de défense d'*E.coli* en cas d'excès de cuivre(I) ou d'argent(I)^[106]. Il participe au système de résistance d'*E.coli* envers ces métaux.

Le complexe CusABC est transmembranaire et permet l'excrétion du cuivre(I) et de l'argent(I). CusF interagit avec CusB pour transférer le métal qui est ensuite éliminé de la cellule^[109,110]. Par ailleurs la transcription de CusF augmente en proportion plus importante que les autres en cas de stress métallique. Cela suggère que CusF permet la séquestration du cuivre dans le périplasma avant d'être éliminée via CusB^[106].

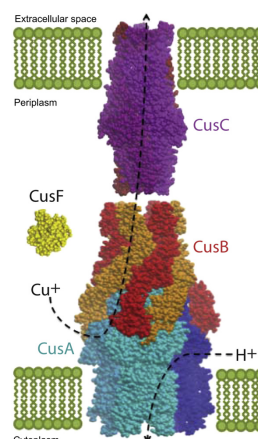


Fig. 1.35 : Le système d'efflux CusCFBA du cuivre(I) et de l'argent(I) chez *Escherichia coli*, d'après^[106]

1.4.2.1 CusF

CusF (fig.1.36) lie le cuivre par deux méthionines et une histidine, ligands classiques du cuivre(I), mais aussi par un tryptophane au moyen d'une interaction cation- π ^[111]. Le tryptophane n'est pas un ligand classique et dans 25% des protéines homologues de CusF, il est remplacé par une méthionine^[111]. La présence du tryptophane permet de moduler finement les propriétés de CusF. Contrairement à la mutation Trp \rightarrow Met qui augmente de trois ordres de grandeur l'affinité de la protéine pour le cuivre, la mutation Trp \rightarrow Ala ne déstabilise (~ 14 kcal.mol⁻¹) que très peu la protéine^[111-113]. Le rôle du tryptophane serait de protéger l'accès au cuivre(I).

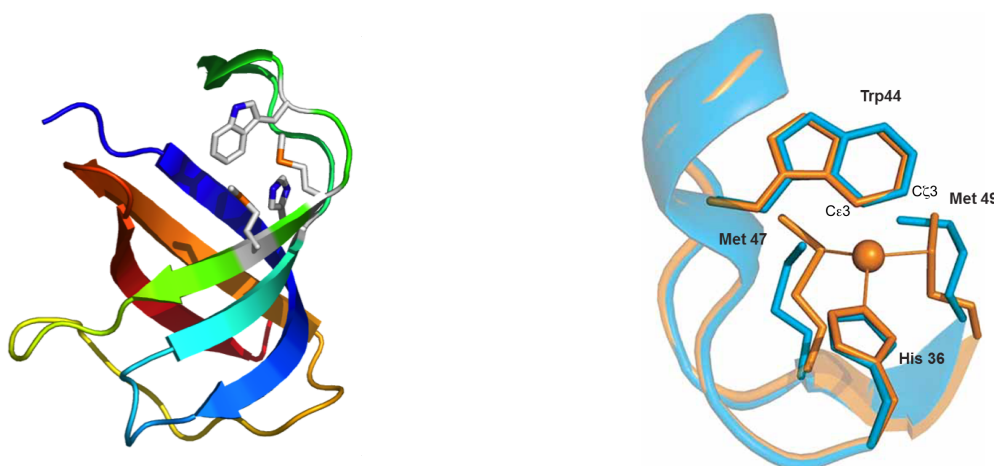


Fig. 1.36 : (À gauche) Structure cristallographique de CusF (pbd 2VB2). (À droite) Structure du site de coordination du cuivre de CusF avec (orange) et sans cuivre (bleu)^[111].

L'interaction cation- π entre le cuivre et le tryptophane est inhabituelle. En effet, les interactions cation- π connues lient le plus souvent un aromatique à un cation alcalin, alcalino-terreux, ou un cation organique. L'équipe de D. Dougherty a estimé que, dans les protéines, il y aurait une interaction cation- π entre l'ammonium d'une lysine ou d'une arginine, et un acide aminé aromatique (tryptophane, tyrosine, et phénylalanine) tous les 77 acides aminés en moyenne^[114]. Et que 25% des tryptophanes seraient engagés dans des interactions cation- π avec des arginines ou des lysines.

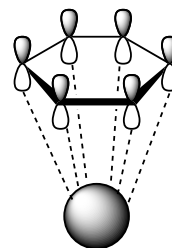


Fig. 1.37 : Interaction cation- π

Le cuivre(I) forme avec l'éthylène un complexe plan carré dans lequel la distance cuivre-carbone varie de 1,943 à 2,028 Å^[115]. Dans le cas de CusF les distances entre le cuivre et les carbones C ϵ 3 et C ζ 3 sont de 2,67 Å et 2,86 Å^[111]. Ces liaisons sont plus longues que les liaisons de coordination du complexe avec l'éthylène. Cependant elles sont plus courtes que la somme des rayons de Van der Waals. Cette liaison est faiblement covalente^[113]. Elle est classée comme interaction cation- π . Cette interaction a été décrite dans des complexes biomimétiques (fig.1.38) avant d'être découverte dans CusF.

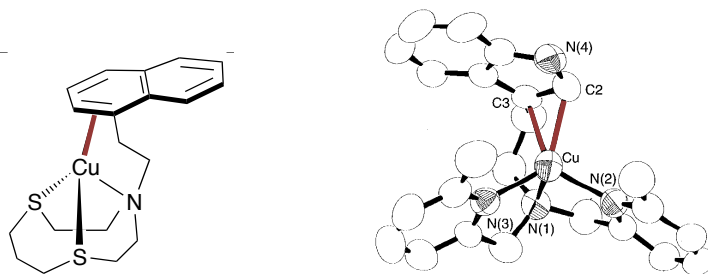


Fig. 1.38 : Exemple de complexes avec une interaction cation- π entre le cuivre(I) et un aromatique (naphtalène^[116], indole^[117]).

Cette interaction cation- π modifie les propriétés spectroscopiques de l'aromatique lié au métal. C'est d'ailleurs l'étude de CusF par spectroscopie Raman, réalisée par l'équipe de T.O'Halloran, qui a permis de confirmer la présence de cette interaction^[111]. L'interaction cation- π modifie la signature Raman du tryptophane mais également le spectre d'absorption UV-visible et d'émission de fluorescence (fig.1.39). En présence de cuivre(I), la bande d'absorption du tryptophane, liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ se déplace vers le rouge, et la fluorescence est éteinte. L'équipe de T.O'Halloran suggère que l'extinction de la fluorescence du tryptophane est provoquée par une augmentation du croisement intersystèmes de l'état singulet vers l'état triplet du tryptophane.

Ces changements dans les spectres d'absorption et d'émission ont été exploités dans la conception de sondes^[118-120]. Par exemple, la sonde développée par l'équipe de M.Kodera permet de détecter l'éthylène grâce à la formation d'une interaction cation- π (fig.1.40). En l'absence d'éthylène, le complexe utilisé lie l'argent(I) par deux sulfures, un azote, et un anthracène par une interaction cation- π . L'éthylène déplace l'anthracène pour former l'interaction cation- π . La disparition de l'interaction cation- π est visible sur les spectres d'absorption et de fluorescence de l'anthracène^[118].

Cette interaction est possible avec le cuivre(I) et l'argent(I) mais ne semble pas présente avec l'or(I). En effet, les structures des complexes de ces métaux avec un ligand de type

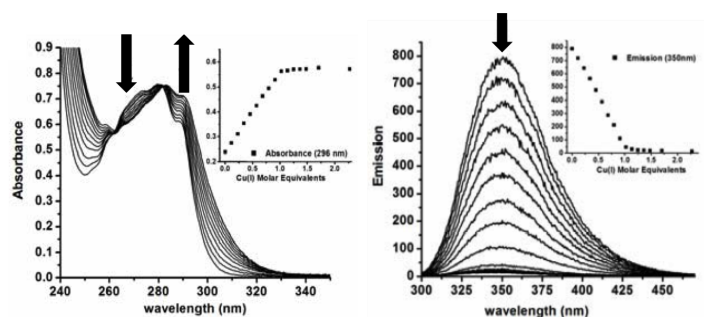


Fig. 1.39 : Spectres d'absorption UV-Vis et de fluorescence de CusF^[111]

dialkylbiphénylphosphane, développé par l'équipe de A.M.Echavarren, montre que pour le cuivre(I) et l'argent(I) la distance métal-aromatique est inférieure à la somme des rayons de Van der Waals, mais pas pour l'or^[121]. L'interaction cation- π est également présente dans des complexes de mercure^[122].

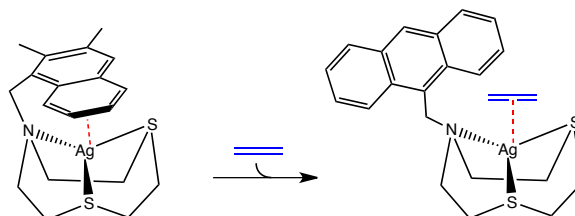


Fig. 1.40 : Exemple de sonde à éthylène exploitant la formation d'une l'interaction cation- π ^[118].

1.4.2.2 Principe de la sonde et conception du peptide modèle

Dans CusF, le tryptophane est un ligand du cuivre(I). Le tryptophane est également connu pour être capable de sensibiliser le terbium. On peut donc imaginer un peptide modèle de CusF, pour lequel le tryptophane serait à la fois ligand du cuivre et antenne du terbium. La complexation du cuivre par le peptide modèle modifie les propriétés du tryptophane, et notamment augmenterait le croisement intersystèmes vers l'état triplet du tryptophane. Or le tryptophane sensibilise le terbium par un transfert d'énergie depuis l'état triplet. Il est donc probable que le transfert d'énergie du tryptophane vers le terbium soit modifié en présence de cuivre(I) (fig.1.41).

L'examen de la structure cristallographique de CusF montre que les quatre acides aminés liant le cuivre sont tous situés dans la même boucle. Le peptide modèle utilisé comporte 16 acides aminés de cette boucle. Pour préorganiser le site de liaison au métal, deux acides aminés non naturels ont été ajoutés pour former un peptide cyclique. Ces deux acides aminés, un Aib (méthylalanine) et une ^DProline (fig.1.42), sont connus pour induire les feuilletts β vrillés comme ceux de la boucle de CusF. Enfin le terbium est complexé par un DOTA introduit sur une chaîne latérale d'une lysine proche du tryptophane dans la séquence peptidique (fig.1.43) pour que le transfert d'énergie soit efficace. Ce peptide est noté CC9[Tb].

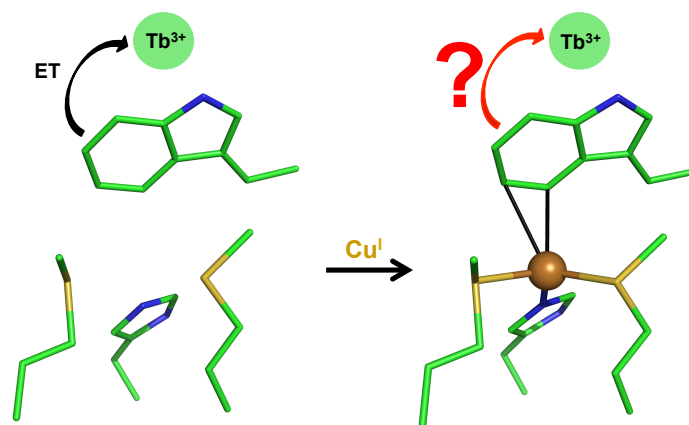


Fig. 1.41 : Principe de la sonde à cuivre.

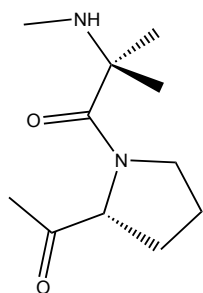


Fig. 1.42 : Formule Aib-^DPro

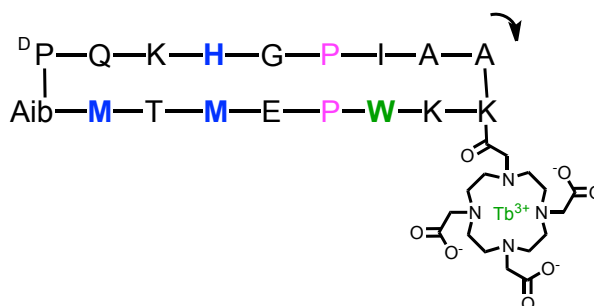


Fig. 1.43 : Séquence de CC9

1.4.3 Stratégie

Sur les deux modèles peptidiques divers points ont été améliorés pour tendre vers une sonde idéale. Étant donné que la plupart des améliorations sont transposables d'un modèle à l'autre, le choix du modèle est guidé par la commodité de la synthèse.

Sondes visibles à Cu^+ et Ag^+

2.1	LE CUIVRE(I)	32
2.2	SYNTHÈSE	33
2.3	COMPLEXATION DU CUIVRE(I) ET INTERACTION CATION- π	36
2.3.1	Complexation du cuivre(I)	36
2.3.2	Interaction cation- π	37
2.3.3	Propriétés d'émission	38
2.4	SÉLECTIVITÉ	41
2.4.1	Sélectivité vis-à-vis des métaux physiologiques	41
2.4.2	Cas particulier de l'argent(I)	42
2.5	DÉTERMINATION DE L'AFFINITÉ	44
2.5.1	Compétition avec l'imidazole	44
2.5.2	Compétition avec l'acétonitrile	45
2.5.3	Comparaison de l'affinité du peptide CC9 et de CusF pour le cuivre(I)	47
2.6	MÉCANISME SPECTROSCOPIQUE	48
2.6.1	Nombre de molécules d'eau	48
2.6.2	Spectroscopie en temps résolu	49
2.7	DISCUSSION	54

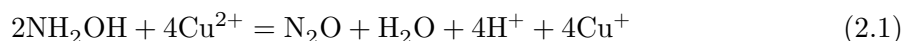
2.1 Le cuivre(I)

Le cuivre, au degré d'oxydation +I, n'est pas stable en solution. En solution aérée, il est oxydé en cuivre(II) par le dioxygène dissous. C'est pourquoi toutes les expériences sont menées en boîte à gants, où la teneur en dioxygène est inférieure à 2 p.p.m. Travailler à l'abri du dioxygène ne protège pas contre la dismutation du cuivre(I), en cuivre(0) et cuivre(II) (fig.2.1).



Fig. 2.1 : Potentiels standards à pH 7 des couples du cuivre, et dismutation.

Pour éviter la dismutation du cuivre(I), il est possible de le stabiliser par des ligands ou d'utiliser un réducteur. Les ligands généralement utilisés sont l'imidazole et l'acétonitrile, les réducteurs sont l'ascorbate et l'hydroxylamine. Nous avons choisi de travailler en présence d'un réducteur : l'hydroxylamine, comme proposé par l'équipe de A.Wedd^[123]. L'hydroxylamine réduit le cuivre(II) en cuivre(I), et donne du protoxyde d'azote, de l'eau et des protons (2.1)^[124].



En pratique, les cuves sont préparées avec le peptide (5 – 50 μM selon la technique utilisée), en présence de tampon (HEPES, phosphate, ou acétate d'ammonium) pH 7,5 10 mM, et d'hydroxylamine 2 mM. Le cuivre est ajouté sous forme de cuivre(II) ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$) jusqu'à deux équivalents par rapport au peptide. L'hydroxylamine est donc en large excès.

2.2 Synthèse

La synthèse du peptide CC9[Tb] (fig.2.2) est composée d'étapes de synthèse peptidique en phase solide (SPPS) et d'étapes en solution (cyclisation, greffage du DOTA-(^tBu)₃, décrochage des groupements protecteurs). La synthèse peptidique est effectuée du côté C-terminal vers le côté N-terminal. La cyclisation du peptide peut conduire à la racémisation de l'acide aminé en C-ter par formation d'une oxazolone^[125]. La synthèse est donc amorcée au niveau de la glycine, qui n'est pas chirale, pour éviter tout problème de racémisation lors de la cyclisation.

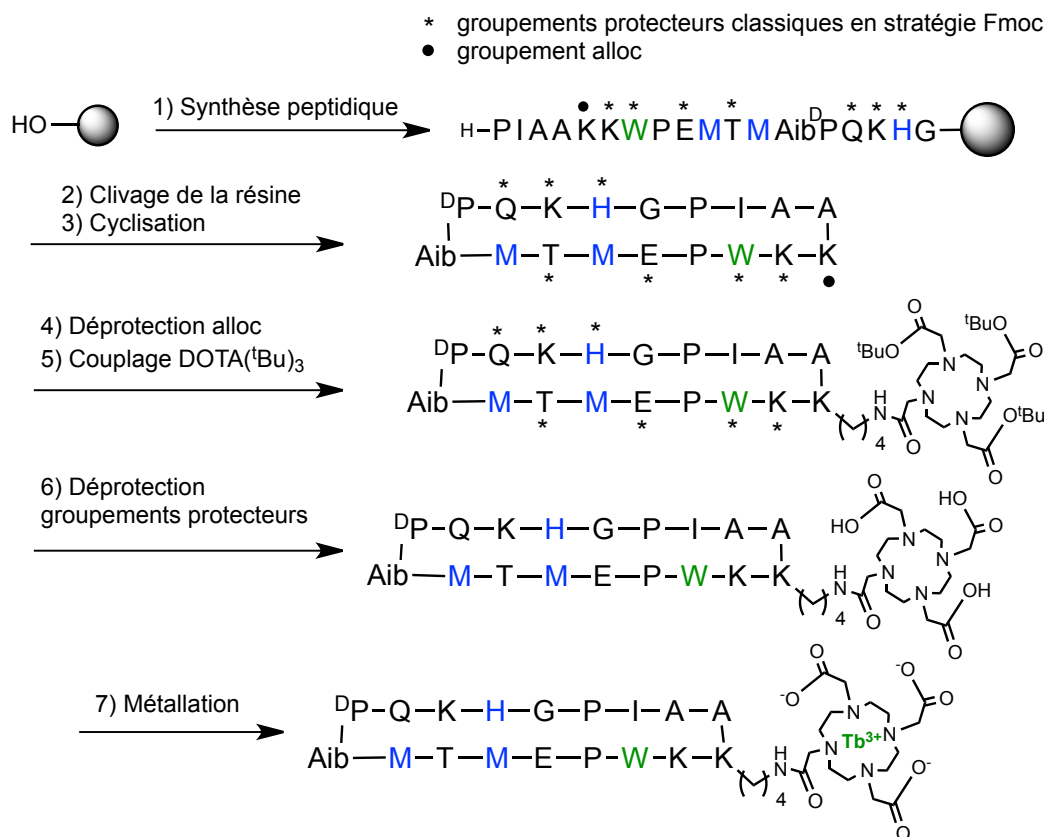


Fig. 2.2 : Synthèse CC9[Tb]. 1) SPPS. Couplage : DIEA, Fmoc-AA-OH, PyBOP dans le DMF. Déprotection du groupement Fmoc : pipéridine dans le DMF. 2) Clivage de la résine : 1% TFA dans le DCM. 3) Cyclisation : PyBOP, dans le DMF. 4) Déprotection sélective du groupement alloc : Pd(Ph₃)₄, phénylsilane dans le DCM. 5) Couplage du DOTA : DIEA, DOTA(^tBu)₃, PyBOP dans le DMF. 6) Déprotection des chaînes latérales. TFA, TIS, H₂O, DTT, Thioanisole, Octylsulfide. 7) Complexation du lanthanide : peptide dans H₂O à pH 6,2, avec TbCl₃.

La résine utilisée pour la synthèse peptidique en phase solide est une résine *NovaPEG HMPB* (substitution 0,52 mmol.g⁻¹, 0,13 mmol) présentant une extrémité alcool benzylique, ce qui permet de décrocher le peptide de la résine en milieu faiblement acide sans toucher aux groupements protecteurs. Le couplage du premier acide aminé n'est pas un couplage classique. La glycine est activée (diisopopylcarbodiimide) avant d'être ajoutée à la résine en présence de diméthylaminopyridine.

L'élongation du peptide est ensuite effectuée par le robot de synthèse peptidique dans le diméthylformamide (DMF). Chaque cycle de couplage commence par la déprotection du N-ter des chaînes peptidiques accrochées au support (piperidine 20% dans le DMF), suivi

par le couplage de l'acide aminé protégé par un groupement Fmoc (Fmoc-AA-OH, PyBOP, DIEA), et se termine par l'acétylation des chaînes n'ayant pas réagi (Ac_2O , DIEA). Tous les couplages sont réalisés à température ambiante pendant 30 minutes en utilisant le PyBOP comme activateur, sauf pour la $^{\text{D}}$ Proline (deux fois une heure), l'Aib (couplage à la main), et la méthionine suivante (deux fois une heure). L'Aib étant un acide aminé encombré, la réaction de couplage est plus difficile. Elle est effectuée à la main en utilisant un activateur plus efficace pour les réactions avec des acides aminés encombrés, le COMU. Pour améliorer le rendement la réaction est effectuée deux fois et le temps de couplage est allongé (deux heures au lieu de 30 min). Le couplage suivant est également délicat, c'est pourquoi la méthionine est couplée deux fois pendant une heure.

Une fois le peptide linéaire synthétisé, il est clivé de la résine avec une solution à 1% de TFA dans le DCM. Le peptide linéaire protégé est cyclisé en solution avec du PyBOP dans le DMF. La solution est agitée toute la nuit, sous argon. Le groupement alloc de la lysine, est clivé en présence de palladium(0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$, 0,5 équivalent) et de phénylsilane (25 équivalents) dans le DCM anhydre et dégazé. Le DOTA-*tris*(^tBu) ester (noté DOTA(^tBu)₃, commercial) est ensuite greffé par un couplage peptidique classique sur la nuit.

Tous les groupements protecteurs sont ensuite décrochés par une solution TFA/ TIS/ H_2O / DTT/ thioanisole/ octylsulfide pendant 4 heures. Après lyophilisation, le rendement est de 14%. Le peptide est ensuite caractérisé en spectrométrie de masse : $m/z = 1202,1$ (2+), 801,7 (3+), 601,5 (4+) ($m/z_{\text{calculée}} = 1202,11$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 801,74 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 601,56 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ pour $\text{M} = \text{C}_{108}\text{H}_{171}\text{N}_{29}\text{O}_{29}\text{S}_2$). Le chromatogramme d'HPLC analytique présente un pic unique à $t_R = 9$ min (fig.2.3), la pureté du peptide est estimée supérieure à 95%.

Le peptide est ensuite métallé avec le lanthanide, dans l'eau à pH 6,2. Ce pH correspond à un compromis entre un pH basique pour déprotonner les carboxylates, mais pas trop pour ne pas précipiter les hydroxydes de lanthanides. Le peptide est ensuite purifié par HPLC préparative, et lyophilisé. Il est ensuite caractérisé en spectrométrie de masse : $m/z = 1280,0$ (2+), 853,7 (3+), 640,5 (4+) ($m/z_{\text{calculée}} = 1280,07$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 853,71 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 640,53 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ pour $\text{M} = \text{C}_{108}\text{H}_{171}\text{N}_{29}\text{O}_{29}\text{S}_2\text{Tb}$). Sa pureté est contrôlée en HPLC analytique, $t_R = 9,15$ min (fig.2.3).

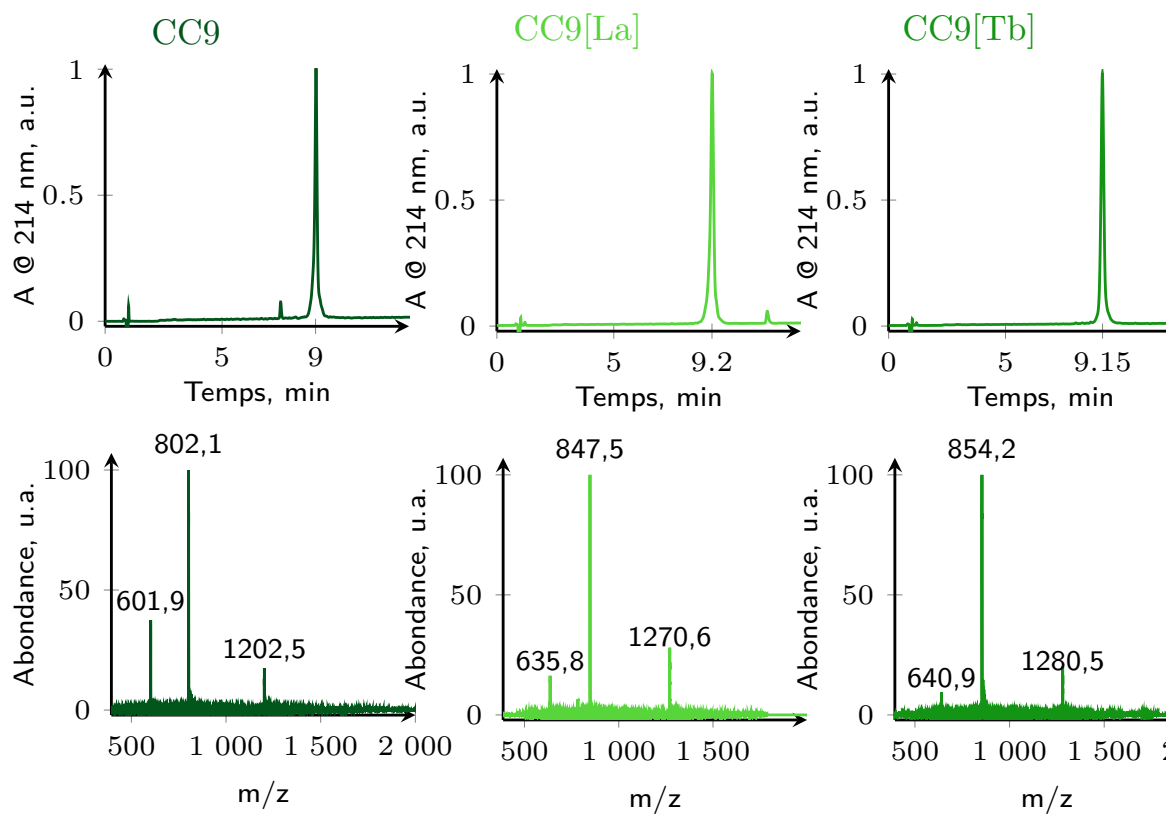


Fig. 2.3 : Chromatogrammes HPLC analytique (haut) et spectres de masse (ESI-MS, en mode positif) des peptides CC9, CC9[La], et CC9[Tb] purifiés.

2.3 Complexation du cuivre(I) et interaction cation- π

2.3.1 Complexation du cuivre(I)

Les peptides sont chiraux, car tous les acides aminés naturels qui les constituent sont chiraux, de configuration L selon la projection de Fisher. Les structures secondaires (hélices, feuillettes) sont également chirales, et présentent une signature en dichroïsme circulaire^[126,127]. Une modification de la structure du peptide est donc visible par cette technique. Les transitions ayant lieu dans un environnement chiral peuvent également participer au spectre de dichroïsme circulaire.

Le spectre de dichroïsme circulaire du peptide libre est négatif à 200 nm, et ne présente pas de maximum ou minimum local. Ce type de spectre est caractéristique d'un peptide sans structure secondaire particulière. L'ajout de cuivre(I) modifie le spectre du peptide : le signal à 200 nm devient moins négatif et un minimum local apparaît à 225 nm. Ces variations sont caractéristiques de la formation de structures secondaires. Le peptide se structure en présence de cuivre(I). Le signal de dichroïsme circulaire est modifié de manière linéaire jusqu'à l'ajout d'un équivalent de cuivre(I) par rapport au peptide, puis reste constant. Le complexe cuivre : peptide formé est de stœchiométrie 1 : 1.

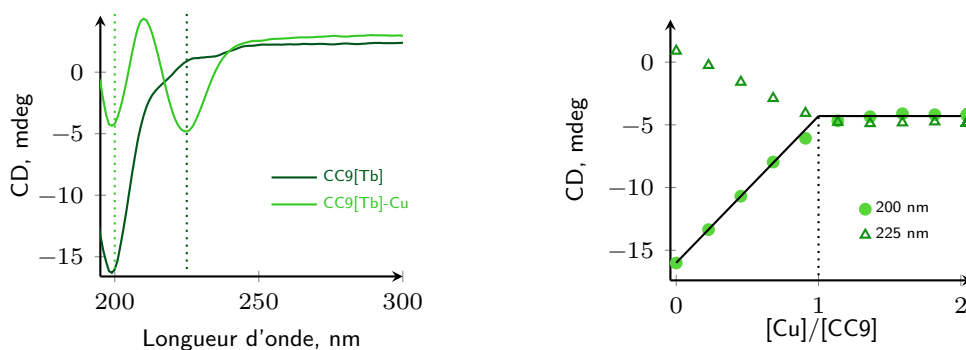


Fig. 2.4 : Titrage du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ par Cu^+ suivi par dichroïsme circulaire. $\text{CC9}[\text{Tb}]$ 15 μM , Phosphate pH 7,5 10 mM, Hydroxylamine 2 mM. Ajouts de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$ en boîte à gants.

La complexation du cuivre(I) par le peptide a également été caractérisée en spectrométrie de masse. Le peptide (acétate d'ammonium pH 7, hydroxylamine) a été injecté seul puis après ajout de deux équivalents de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$. Deux familles de pics sont présents dans le spectre après ajout de cuivre (fig.2.5). Les pics liés à la masse la plus faible ($m/z = 854,2$ (3+), 1280,7 (2+)) sont identiques à ceux obtenus pour le peptide sans cuivre ($m/z_{\text{calculée}} = 854,7$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1281,6 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, pour $\text{M} = \text{C}_{108}\text{H}_{171}\text{N}_{29}\text{O}_{29}\text{S}_2\text{Tb}$). Les pics correspondant à la masse la plus importante ($m/z = 656,7$ (4+), 875,2 (3+), 1311,6 (2+)), correspondent au peptide lié à un seul cuivre(I) ($m/z_{\text{calculée}} = 657,0$ $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 875,7 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1313,1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, pour $\text{M} = \text{C}_{108}\text{H}_{171}\text{N}_{29}\text{O}_{29}\text{S}_2\text{TbCu}$).

Le complexe formé entre le peptide et le cuivre(I) est donc bien un complexe 1 :1. La présence de peptide sans cuivre est probablement dû à une démétallation partielle du peptide dans le spectromètre.

Nous avons tenté de déterminer la structure du peptide avec et sans cuivre en RMN. Cependant les signaux obtenus étant trop larges, l'enregistrement de spectres de corrélation en deux dimensions n'est pas possible. La structure RMN ne peut donc pas être déterminée.

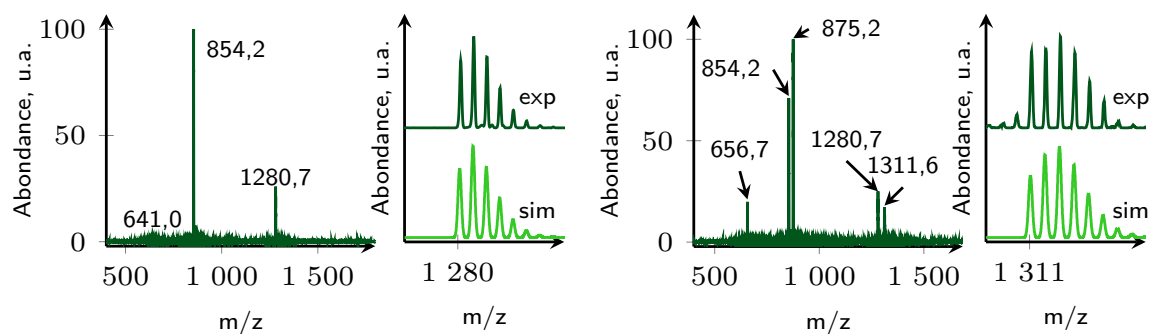


Fig. 2.5 : Spectre de masse (ESI en mode positif) du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ avant et après l'ajout de cuivre. $\text{CC9}[\text{Tb}]$ 50 μM , acétate d'ammonium pH 7,0 10 mM, hydroxylamine 2 mM. Ajout de 2 équivalents (100 μM) de $\text{Cu}^{\text{I}}\text{SO}_4$.

2.3.2 Interaction cation- π

Le peptide lie le cuivre(I), mais le dichroïsme circulaire et la spectrométrie de masse, ne nous donnent aucune information sur la sphère de coordination du cuivre(I), et notamment sur la présence de l'interaction cation- π . Dans le cas de la protéine CusF, l'interaction cation- π se traduit par le déplacement bathochrome de la bande d'absorption à 280 nm, liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du tryptophane, et par l'extinction de la fluorescence (fig.1.39).

Le titrage du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ a été suivi par spectroscopie d'absorption électronique UV-Visible et spectroscopie d'émission de fluorescence (fig.2.6). Les spectres sont modifiés de manière linéaire jusqu'à un équivalent. C'est donc bien le complexe 1 : 1 qui est responsable des changements spectroscopiques observés. L'absorbance du complexe est décalée vers le rouge et sa fluorescence est moins importante par rapport au peptide libre.

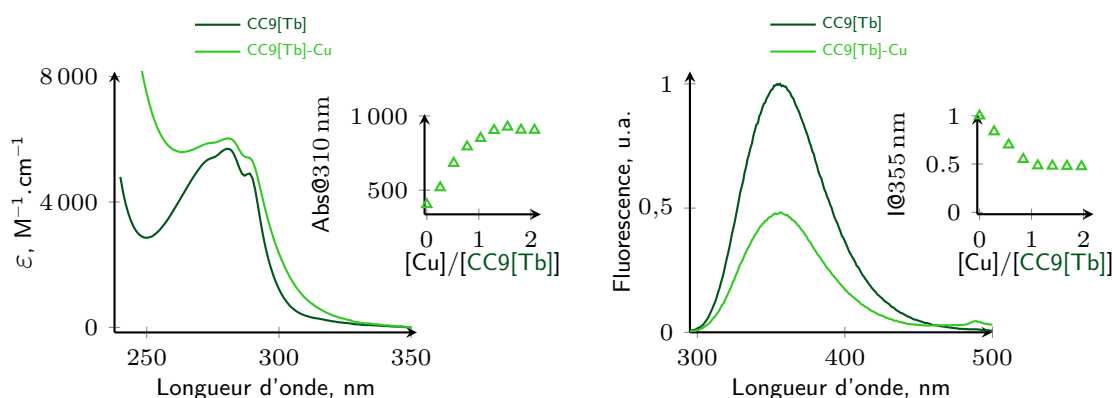


Fig. 2.6 : Spectres d'absorption (à gauche) et de fluorescence (à droite) du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ avec et sans cuivre(I). $\text{CC9}[\text{Tb}]$ 25 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, hydroxylamine 2 mM. Ajout de $\text{Cu}^{\text{I}}\text{SO}_4$ 50 μM (2 équivalents). Pour la fluorescence $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, fentes 5-5, PM 675 V.

Le déplacement et l'extinction sont deux fois plus faibles (fig.2.7) que ce qui est observé pour CusF (fig.2.7), mais ces variations suggèrent que l'interaction cation- π est tout de même présente au sein du complexe $\text{CC9}[\text{Tb}]\text{-Cu}$.

	CusF	CC9		$\Phi_{\text{Fluo}} \pm 0,5\%$
$\Delta\lambda$ abs $\pi \rightarrow \pi^*$ (nm)	10	5	CC9[Tb]	8,4
Extinction fluo (%)	100	55	CC9[Tb]-Cu	3,5

Fig. 2.7 : (À gauche) Comparaison de l'effet de l'interaction cation- π chez CusF et CC9. (À droite) Rendements quantiques de fluorescence du tryptophane, déterminés par S.Denisov (méthode comparative).

2.3.3 Propriétés d'émission

L'émission du terbium, enregistrée en temps résolu avec un délai de 200 μs , augmente linéairement jusqu'à un équivalent de cuivre(I) (fig.2.8). L'émission du terbium de complexe CC9[Tb]-Cu est six fois plus intense que celle du peptide libre (fig.2.8). La sonde s'allume en présence de cuivre(I).

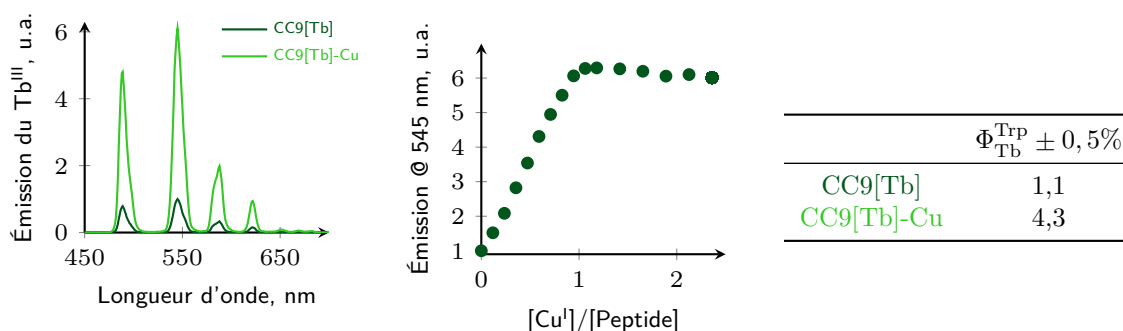


Fig. 2.8 : (À gauche) Spectres en temps résolu du peptide CC9[Tb] avec et sans cuivre(I). (Au milieu) Évolution de l'émission à 545 nm en fonction de la quantité de cuivre ajoutée. CC9[Tb] 5 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, NH_2OH 2 mM. Ajouts de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$. $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, fentes 5-5, PM 650 V. (À droite) Rendements quantiques de luminescence du terbium déterminés par S.Denisov (méthode comparative).

Afin de vérifier que l'émission du terbium est provoquée par un transfert d'énergie depuis le tryptophane, et non a une absorption directe, nous avons enregistré le spectre d'excitation du terbium. Le spectre d'excitation consiste à enregistrer l'émission à une longueur d'onde donnée, en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Pour le terbium, la longueur d'onde choisie est 545 nm, qui est le maximum d'émission du terbium. Ce spectre décrit l'absorption qui conduit à l'émission à 545 nm.

Pour le peptide CC9[Tb] sans cuivre, le spectre d'excitation du terbium ressemble au spectre d'absorption du tryptophane. L'émission du terbium est bien causée par un transfert d'énergie depuis le tryptophane. Le spectre d'excitation du peptide lié au cuivre(I) est déplacé vers le rouge par rapport au peptide libre (fig.2.9), le spectre d'excitation est sensible à l'interaction cation- π . Le tryptophane impliqué dans le transfert d'énergie vers le terbium forme l'interaction cation- π avec le cuivre(I).

En revanche, les spectres d'excitation de la fluorescence ne sont pas modifiés par la présence de métal. Le tryptophane qui fluoresce ne forme pas l'interaction cation- π .

Cette différence de comportement entre l'excitation de la fluorescence et l'émission du terbium, suggère la présence de deux populations de tryptophanes différentes. Une partie des

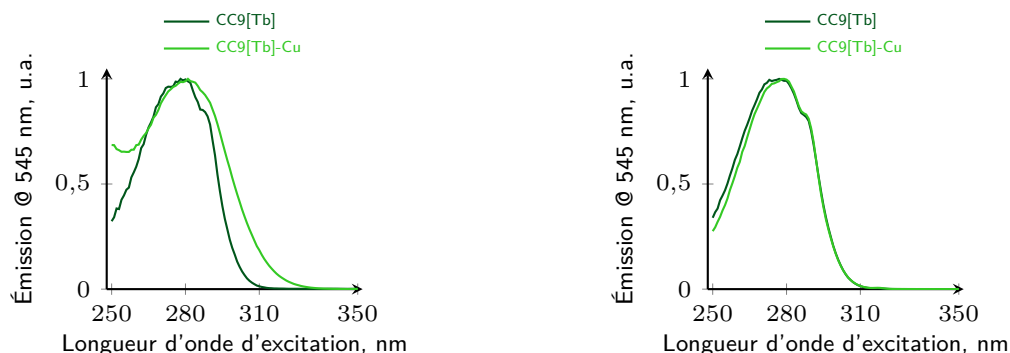


Fig. 2.9 : Spectres d'excitation de la luminescence du terbium (à gauche, $\lambda_{em} = 545$ nm) et de la fluorescence du tryptophane (à droite, $\lambda_{em} = 545$ nm). $CC9[Tb]$ $5 \mu M$, HEPES pH 7,5 10 mM, NH_2OH 2 mM. Ajouts de $Cu^{II}SO_4$ ou Ag^+ClO_4 . Excitation fluorescence : fentes 5-5, PM 700 V. Excitation Tb : 5-10 PM 730 V

tryptophanes est fluorescente, et n'est pas sensible à la présence de métal dans le peptide. L'autre population de tryptophanes est modifiée par la complexation de cuivre(I), et conduit à l'émission du terbium. Par ailleurs, la présence de deux populations de tryptophanes est également suggérée par la présence d'un minimum de deux signaux RMN dans la zone des protons N-H de l'indole du tryptophane ($\delta = 10$ ppm).

Tous ces éléments suggèrent la présence d'un équilibre entre deux conformations (fig.2.10) : une conformation où le tryptophane est engagé dans une interaction cation- π avec le cuivre(I) (notée Trp(lié)) et une conformation où le tryptophane est « libre », comme dans le peptide libre (notée Trp(libre)). Dans la conformation Trp(libre), le tryptophane est fluorescent. Dans la conformation Trp(lié), la fluorescence du tryptophane est entièrement éteinte, comme pour la protéine CusF, et la luminescence est plus intense que celle de la forme Trp(libre).

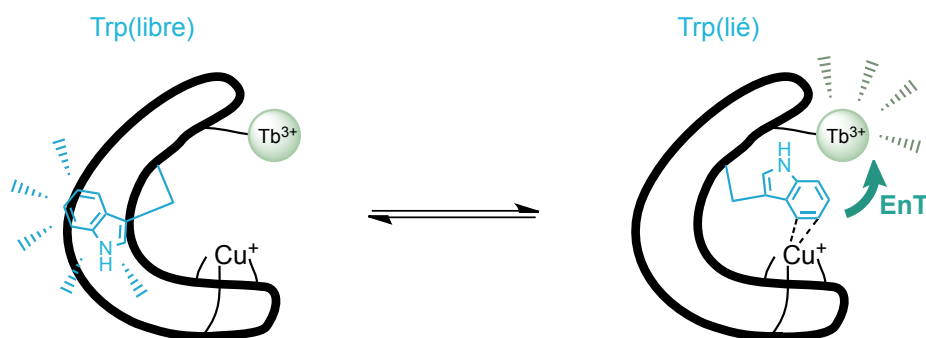


Fig. 2.10 : Équilibre conformationnel du peptide $CC9[Tb]-Cu$ entre la forme où tryptophane est libre, et où le tryptophane est lié par l'interaction cation- π .

L'interaction cation- π est une interaction faible. Elle a été estimée à 14 kcal.mol^{-1} dans la protéine CusF^[113]. Chez CusF, la position du tryptophane dans l'apoprotéine est proche de la position adoptée en présence de cuivre(I)^[111]. La protéine maintient le tryptophane en position pour former l'interaction cation- π . Le peptide $CC9[Tb]$ est flexible. Le tryptophane n'est pas contraint dans la position pour former l'interaction cation- π . La décoordination du tryptophane est possible dans le peptide $CC9[Tb]$, alors qu'elle n'est pas observée chez CusF.

Le déplacement du spectre d'excitation, peut être exploité pour augmenter le contraste

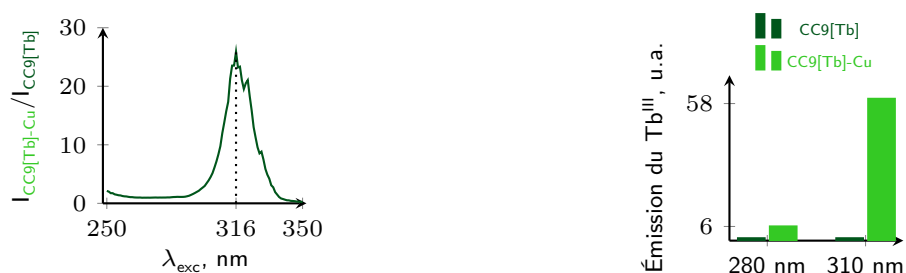


Fig. 2.11 : (À gauche) Rapport des spectres d'excitation du terbium de $\text{CC9[Tb]-Cu}/\text{CC9[Tb]}$. (À droite) Comparaison de l'augmentation de l'intensité d'émission du terbium à 545 nm pour des longueurs d'onde d'excitation différentes. CC9[Tb] 5 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, NH_2OH 2 mM. Ajouts de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$ 10 μM . $\lambda_{\text{em}} = 545$ nm, fentes 10-5, PM 600 V.

de la sonde. La longueur d'onde d'excitation classique du tryptophane est 280 nm, ce qui correspond au maximum d'excitation du tryptophane, et donc à l'émission maximum.

Pour une sonde, l'objectif est que le contraste soit important, c'est-à-dire que la différence d'émission entre le peptide seul et le peptide avec cuivre(I) soit maximale. Comme le spectre d'excitation se déplace en présence de cuivre(I), il est possible de trouver une longueur d'onde pour laquelle l'émission du peptide libre est plus faible que celle du peptide lié au cuivre(I). À cette longueur d'onde le peptide libre absorbe moins que le peptide lié au cuivre(I), il émet donc moins. Ainsi le contraste de la sonde augmente. La longueur d'onde pour laquelle le contraste est le plus important est 316 nm (fig.2.11). Cependant à cette longueur d'onde le peptide absorbe peu, et son émission est peu intense. Nous avons donc choisi d'exciter à 310 nm avec des fentes de 10 nm. Cette longueur d'onde correspond à un compromis entre contraste et intensité. En excitant à 310 nm, l'émission du terbium est multipliée par 58 en présence de cuivre(I) (fig.2.11). Ainsi le contraste de cette sonde devient important.

2.4 Sélectivité

La sélectivité du peptide CC9[Tb] vis-à-vis des métaux physiologiques a été étudiée par dichroïsme circulaire et en luminescence.

Le titrage du peptide CC9[Tb] suivi par dichroïsme circulaire (CD), nous a montré que la complexation du cuivre(I) induit un changement dans la signature CD enregistrée. Les spectres de dichroïsme circulaire du peptide en présence de différents métaux ont été enregistrés, afin de déterminer si d'autres métaux que le cuivre(I) sont liés par le peptide.

Même si aucun métal n'est lié par le peptide, ils pourraient modifier l'émission de la sonde, par exemple par transfert d'électron, ou en absorbant une partie de l'émission. C'est pourquoi la sélectivité de la réponse de la sonde en luminescence a également été testée. La luminescence de la sonde est enregistrée en présence du métal seul, ainsi qu'après l'ajout de cuivre. Cela permet de déterminer si l'émission de la sonde est perturbée par la présence des différents métaux.

2.4.1 Sélectivité vis-à-vis des métaux physiologiques

Les métaux physiologiques testés sont les métaux du bloc d (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), les alcalins (Na^+ , K^+) et alcalino-terreux (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Les concentrations physiologiques des alcalins et alcalino-terreux sont au maximum de quelques mM^[24,128,129]. Nous avons choisi des concentrations de 100 mM pour les alcalins, 10 mM pour les alcalino-terreux, ce qui correspond à un large excès de ces cations. Les métaux du bloc d sont en plus faible concentration dans les cellules. La concentration totale en zinc, qui est le plus abondant, est de l'ordre de 200 – 300 μM ^[130]. La concentration en métal mobile est plus faible, de l'ordre de 10^{-9} – 10^{-12} M dans le cytosol^[130], ce qui est négligeable devant la concentration en peptide utilisée (20 μM). Pour les métaux du bloc d, la concentration utilisée (30 μM) n'est donc pas physiologique, mais correspond à 1,5 équivalents par rapport au peptide.

Aucun métal testé n'entraîne de changement dans le spectre de dichroïsme circulaire (fig.2.12), ils ne lient pas le peptide. Il est important de noter que même le cuivre(II) n'est pas lié par le peptide ($K < 10^3 \text{M}^{-1}$). Après l'ajout de cuivre(I) (ou réduction du cuivre(II)), le spectre a la même allure que celui enregistré lors du titrage du peptide seul (fig.2.4). Le peptide CC9[Tb] lie donc sélectivement le cuivre(I) parmi tous les métaux testés.

Pour tester la réponse en luminescence de la sonde, l'intensité d'émission du peptide CC9[Tb] en présence des différents métaux physiologiques a été enregistrée avant et après l'ajout de cuivre(I). La présence des métaux ne provoque pas d'augmentation d'émission du terbium, et la sonde retrouve, après ajout de 1,5 équivalents de cuivre, une intensité comparable à celle du peptide seul en présence de cuivre(I) (fig.2.3.3). Le comportement de

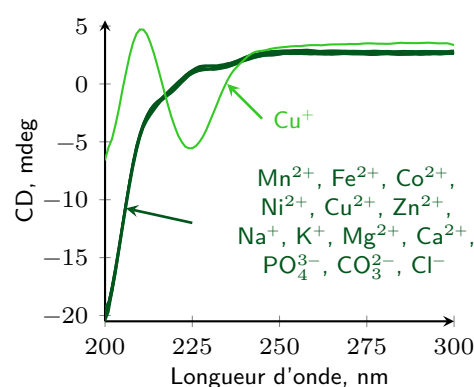


Fig. 2.12 : Spectres de dichroïsme circulaire du peptide CC9[Tb] en présence de métaux et d'anions physiologiques sans cuivre, et après l'ajout de cuivre. CC9[Tb] 20 μM , Phosphate pH 7,5 10 mM. Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 30 μM . Na^+ , K^+ 100 mM. Mg^{2+} , Ca^{2+} 10 mM. CO_3^{2-} , Cl^- 100 mM.

la sonde en présence des métaux testés est semblable à celui de la sonde seule. La réponse du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ est donc sélective du cuivre(I) vis-à-vis des métaux physiologiques.

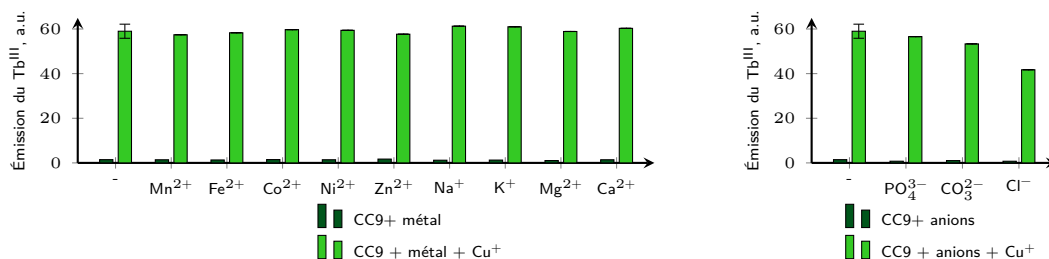


Fig. 2.13 : Réponse en luminescence du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ vis-à-vis des métaux et anions physiologiques. $\text{CC9}[\text{Tb}]$ $5\ \mu\text{M}$, HEPES pH 7,5 10 mM. Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} $8\ \mu\text{M}$. Na^+ , K^+ 100 mM, Mg^{2+} , Ca^{2+} 10 mM, CO_3^{2-} , Cl^- 100 mM. Ajout de cuivre jusqu'à 1,5 équivalent.

Les anions chlorures, phosphates et carbonates, ont également été testés, car ils pourraient remplacer la molécule d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide et en modifier l'émission. D'après les spectres de dichroïsme circulaire (fig.2.12) et la luminescence (fig.2.13), les phosphates et les carbonates ne perturbent pas le fonctionnement de la sonde.

En présence de chlorures, l'ajout de 1,5 équivalents de cuivre(I) ne permet pas de retrouver le niveau d'émission de la sonde seule en présence de cuivre(I). En effet, les chlorures ont une affinité plus faible ($K_{\text{CuCl}} = 1,7 \cdot 10^{-7}$) que le peptide (cf §2.5) pour le cuivre(I), mais ils sont en large excès. Ils entrent en compétition avec le peptide pour lier le cuivre(I). Le peptide n'est donc pas totalement métallé après l'ajout de 1,5 équivalents de cuivre(I). Le taux de métallation inférieur à 1 est également visible sur le spectre de dichroïsme circulaire, où le signal à 200 nm n'est pas tout à fait au niveau du signal à 225 nm après l'ajout de 1,5 équivalents de cuivre(I).

Les ions chlorures entrent en compétition avec le peptide pour lier le cuivre(I), mais n'altèrent pas son fonctionnement. Un environnement tamponné en chlorures ne devrait donc pas gêner le fonctionnement de la sonde. Le peptide est donc sélectif du cuivre(I) vis-à-vis des métaux et des anions physiologiques testés.

2.4.2 Cas particulier de l'argent(I)

L'argent(I) et le cuivre(I) sont chimiquement proches. Ils ont le même nombre d'électrons de valence, et sont tous les deux des cations mous. Il est difficile de synthétiser un ligand capable de lier sélectivement l'un ou l'autre. CusF lie le cuivre et l'argent^[131,132]. Cependant l'argent(I) n'est pas physiologique pour la plupart des organismes. Chez la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34, capable de résister à la présence de métaux lourds^[133], le système permettant de détoxifier l'argent est le même que pour le cuivre^[134]. L'une des protéines de ce système, SilB, comporte un domaine homologue à CusF^[135].

La réponse du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ en présence d'argent(I) a donc également été étudiée. Toutes les expériences ont été effectuées à l'abri du dioxygène (boîte à gants).

Lors du titrage du peptide par de l'argent(I), le spectre de dichroïsme circulaire est modifié de manière linéaire jusqu'à un équivalent (fig.2.14). Le peptide forme un complexe 1 : 1 avec l'argent(I), comme avec le cuivre(I). Le spectre du peptide complexé à l'argent(I) ne se superpose pas à celui du peptide lié au cuivre(I). La différence principale est la présence d'un

maximum local à 243 nm dans le cas de l'argent(I) mais pas du cuivre(I). Ce signal pourrait correspondre à une contribution d'un transfert de charge impliquant l'argent(I).

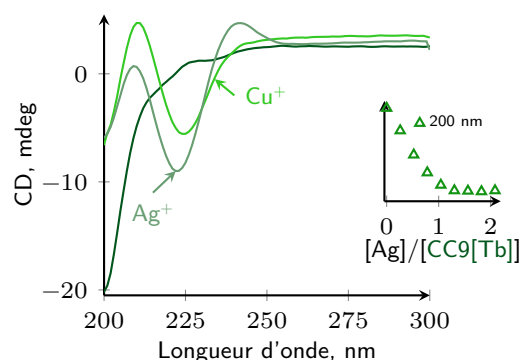


Fig. 2.14 : Spectres de dichroïsme circulaire du peptide CC9[Tb] seul, en présence de cuivre(I) ou d'argent(I).

Le titrage suivi en absorbance UV-Visible et en fluorescence montre que la bande d'absorption liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ se déplace vers le rouge de 5 nm, comme pour le cuivre(I). 75% de la fluorescence est éteinte en présence d'argent(I) contre 55% avec le cuivre(I). L'interaction cation- π est présente entre l'argent et le tryptophane. L'augmentation de l'émission du terbium est similaire à celle provoquée par la présence de cuivre(I) : $\times 6$ (fig.2.15).

Même si l'intensité des modifications provoquées par la complexation de l'argent(I) n'est pas toujours la même que pour le cuivre(I), le comportement du peptide en présence d'argent(I) est similaire à celui en présence de cuivre(I) .

	Cu ⁺	Ag ⁺
$\Delta\lambda$ absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ (nm)	5	5
Extinction fluorescence (%)	55	75
$\Phi_{\text{Fluo Trp}} \pm 0,5$ (CC9[Tb] $\Phi = 8,4\%$)	3,5	2,0
Augmentation Tb $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm	6	6
Augmentation Tb $\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm	58	52

Fig. 2.15 : Comparaison des propriétés du peptide CC9[Tb] en présence de cuivre et d'argent.

2.5 Détermination de l'affinité

Le peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ lie le cuivre(I) et l'argent(I). Nous avons donc déterminé l'affinité du peptide pour ces deux métaux par des titrages en compétition.

2.5.1 Compétition avec l'imidazole

L'imidazole forme des complexes de stœchiométrie 1 : 1, et 1 : 2 avec le cuivre(I) (fig.2.16).



Fig. 2.16 : Formation des complexes entre l'imidazole et le cuivre(I) ou l'argent(I).

Pour déterminer la constante d'affinité, le peptide a été titré en présence d'imidazole par de l'argent(I) ou du cuivre(I). La proportion relative d'imidazole par rapport au peptide a été choisie de manière à ce que le taux de complexation après l'ajout d'un équivalent de métal soit entre 20% et 80% (fig.2.17), afin de minimiser l'erreur lors de l'ajustement^[138]. Le titrage est ensuite modélisé à l'aide du logiciel *Specfit*. Les équilibres pris en compte dans la modélisation sont : la complexation du métal par l'imidazole pour former les deux espèces métal-imidazole_x ($x = 1, 2$), la complexation du métal par le peptide.

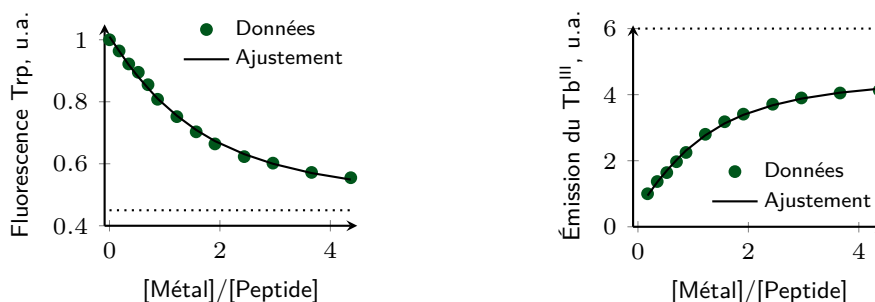


Fig. 2.17 : Ajustements, par le logiciel *Specfit*, des données de fluorescence (à gauche) et d'émission du terbium (à droite), en fonction du nombre d'équivalents de métal ajouté par rapport au peptide. $\text{CC9}[\text{Tb}]$ 25 μM , HEPES pH 7.5 10 mM, NH_2OH 2 mM. Ajout CuSO_4 . $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. Fentes 5-5. Emission Tb : délai 200 μs .

Pour pouvoir ajuster les données expérimentales (spectres de fluorescence et de luminescence du terbium), le logiciel *Specfit* requiert les concentrations des différentes espèces pour chaque spectre. Le pKa de l'imidazole (pKa=7,05) a été pris en compte. Le logiciel ajuste l'évolution des spectres en fonction de la concentration, et détermine la constante d'affinité du peptide pour le métal, ainsi que les spectres des espèces présentant une réponse spectroscopique, dans notre cas il s'agit du peptide avec et sans métal (fig.2.17).

La valeur de l'affinité, déterminée en ajustant les données de fluorescence dans le cas du cuivre(I) ($\log K_{\text{fluo}} = 9,19 \pm 0,03$) est proche de la valeur issue de l'ajustement des données d'émission du terbium pour les deux longueurs d'onde d'excitation ($\log K_{280 \text{ nm}} = 9,38 \pm 0,03$ et $\log K_{310 \text{ nm}} = 9,24 \pm 0,05$). Dans le cas de l'argent(I) ces valeurs sont proches également. En conclusion, les constantes d'affinité du peptide pour le cuivre(I) et pour l'argent(I) sont : $\log K_{\text{CC9-Cu}} = 9,3 \pm 0,1$ et $\log K_{\text{CC9-Ag}} = 7,3 \pm 0,1$.

2.5.2 Compétition avec l’acétonitrile

Dans l’eau, l’acétonitrile forme des complexes avec le cuivre(I) de type cuivre(I)-acétonitrile_x, $x = 1-3$. Lors des premiers titrages du peptide, nous avons utilisé l’acétonitrile pour stabiliser le cuivre(I), et nous avons observé que l’intensité d’émission du terbium variait en fonction de la concentration en acétonitrile. Elle diminue lorsque la concentration d’acétonitrile augmente, et cela n’est pas dû à une diminution du taux de complexation du peptide car l’ajout de cuivre(I) ne modifie pas de manière importante l’émission du peptide. L’acétonitrile interagit donc avec le complexe peptide-Cu^I, et en diminue la luminescence. L’ajout d’acétonitrile sur le complexe CC9[Tb]-Cu préparé en présence d’hydroxylamine, provoque un déplacement du spectre d’excitation se déplace vers le bleu (fig.2.18).

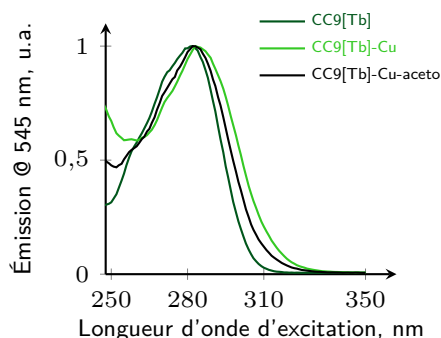


Fig. 2.18 : Spectres d’excitation de l’émission du terbium ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \text{ nm}$) du peptide seul, après ajout de 5 équivalents de cuivre(I), puis 1 M d’acétonitrile. CC9[Tb] 25 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, CH₃CN 0,2 M, NH₂OH 2 mM. $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$, fentes 5-10.

Tous ces éléments suggèrent la formation d’un complexe ternaire peptide-cuivre(I)-acétonitrile. La luminescence du complexe ternaire est plus faible que celle du peptide lié au cuivre(I). Dans le complexe ternaire l’acétonitrile vient probablement remplacer le tryptophane en quatrième ligand du cuivre(I) (fig.2.19). Dans le complexe ternaire, le tryptophane ne forme pas d’interaction cation- π , il est « libre ». Cela est cohérent avec l’équilibre conformationnel Tryptophane(libre) \rightleftharpoons Tryptophane(lié).

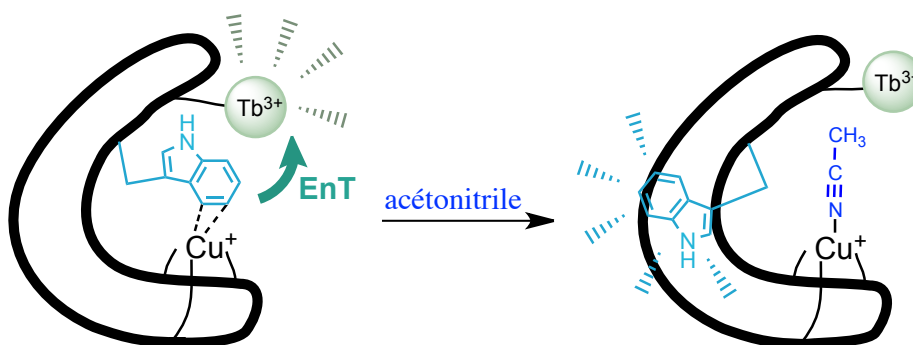
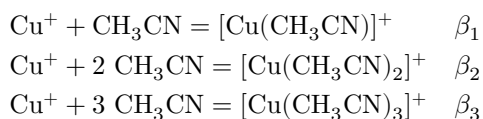


Fig. 2.19 : Formation du complexe ternaire peptide-cuivre(I)-acétonitrile.

Pour modéliser un titrage du peptide par du cuivre(I) en présence d’acétonitrile, les équilibres à prendre en compte sont : les trois équilibres de formation des complexes

cuivre-acétonitrile_x ($x = 1, 2, 3$), l'équilibre de complexation du cuivre(I) par le peptide (K), et l'équilibre de formation du complexe ternaire (K_{ternaire}) (fig.2.20).

Complexes avec l'acétonitrile :



Équilibres impliquant le peptide :

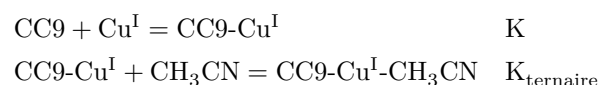


Fig. 2.20 : Équilibres pris en compte lors du titrage du peptide par du cuivre(I) en présence d'acétonitrile.

La formation du complexe ternaire empêche la détermination directe de la constante de complexation du cuivre(I) par le peptide (K). En ajustant les titrages à différentes concentration d'acétonitrile par le logiciel *Specfit*, nous avons déterminé des constantes apparentes de formation de ce complexe (fig.2.21). La constante K peut s'exprimer à partir de ces constantes apparentes et de la constante de formation du complexe ternaire K_{ternaire} (cf. §1). Dans un deuxième temps, nous avons donc cherché à déterminer cette constante.

$$\frac{\langle\langle \text{CC9} \rangle\rangle + \langle\langle \text{Cu}^{\text{I}} \rangle\rangle}{[\text{CC9}][\text{Cu}]_{\text{libre}}} = \frac{\langle\langle \text{CC9-Cu} \rangle\rangle}{[\text{CC9-Cu}] + [\text{CC9-Cu-CH}_3\text{CN}]}$$

$$K_{\text{app}}([\text{CH}_3\text{CN}]) = \frac{[\text{CC9-Cu}] + [\text{CC9-Cu-CH}_3\text{CN}]}{[\text{CC9}]\cdot[\text{Cu}]}$$

$$= \frac{[\text{CC9} - \text{Cu}]}{[\text{CC9}]\cdot[\text{Cu}]} \cdot (1 + K_{\text{ternaire}}\cdot[\text{CH}_3\text{CN}])$$

$[\text{CH}_3\text{CN}]$	$\log K_{\text{app}}[\text{CH}_3\text{CN}]$
0,5 M	$10,1 \pm 0,1$
1 M	$10,1 \pm 0,1$

$$K = \frac{K_{\text{app}}(\text{CH}_3\text{CN})}{1 + K_{\text{ternaire}}[\text{CH}_3\text{CN}]} \quad (2.2)$$

Fig. 2.21 : Détermination des constantes apparentes de complexation du cuivre(I) par le peptide CC9.

La proportion de complexe ternaire formée dépend de la concentration en acétonitrile. Plus la concentration d'acétonitrile augmente, plus la proportion de complexe ternaire augmente, et plus l'intensité de luminescence du terbium observée diminue, car l'émission du complexe ternaire est plus faible que celle du peptide lié au cuivre(I). L'évolution de la luminescence en fonction de la concentration en acétonitrile, nous renseigne sur la proportion de complexe ternaire formé, et donc sur la position de l'équilibre de formation de complexe ternaire (K_{ternaire}).

Plusieurs titrages, du peptide par du cuivre(I) ont été effectués à des concentrations d'acétonitrile de 0,05 M, à 1 M. Ces titrages ont permis de déterminer l'augmentation de l'émission du terbium entre celle du peptide libre et celle du peptide lié au cuivre(I) à différentes concentrations en acétonitrile (fig.2.22). Le point de concentration nulle en acétonitrile correspond au titrage en présence d'hydroxylamine. La variation de l'augmentation d'émission du terbium en fonction de la concentration en acétonitrile a été ajustée « à la main » (cf annexe).

La constante d’équilibre trouvée est $K_{\text{ternaire}} = 2,9 \pm 0,2$. L’équation (2.2) permet de calculer la constante d’affinité du peptide pour le cuivre(I) à partir de la constante de l’équilibre ternaire et des constantes apparentes déterminées pour deux concentrations d’acétonitrile différentes. On trouve $\log K = 9,4 \pm 0,2$ et $\log K = 9,6 \pm 0,2$.

La constante d’affinité du peptide pour le cuivre(I) trouvée par compétition avec l’acétonitrile $\log K_{\text{CC9-Cu}} = 9,5 \pm 0,2$ est proche de la valeur trouvée par compétition avec l’imidazole : $\log K_{\text{CC9-Cu}} = 9,3 \pm 0,1$.

La formation du complexe ternaire avec l’acétonitrile montre que le tryptophane peut être déplacé par un autre ligand. Cela est cohérent avec l’existence de la forme Trp(libre). Lorsque le tryptophane se décoordonne, le cuivre(I) devient accessible. Or le cuivre(I) catalyse la réaction d’Haber-Weiss, ce qui produit des espèces dérivées du dioxygène. Pour éviter cette toxicité liée au cuivre(I) accessible, il est nécessaire de modifier la séquence de CC9[Tb] afin de limiter la formation de complexe ternaire.

2.5.3 Comparaison de l’affinité du peptide CC9 et de CusF pour le cuivre(I)

L’affinité de CusF pour le cuivre(I) est de $K_{\text{CusF-Cu}} = 10^{14,3}$ [139]. L’affinité du peptide pour le cuivre(I) est plus faible que celle de la protéine. Le peptide est flexible, il adopte au minimum deux conformations. Chez CusF, le site de liaison du métal est préformé. La position de l’histidine et du tryptophane n’est quasiment pas modifiée par la présence du métal. Seule les deux méthionines, qui pointent vers l’extérieur en l’absence de métal, changent de conformation pour lier le métal[111]. La flexibilité beaucoup plus importante du peptide par rapport à la protéine peut expliquer l’affinité plus faible pour le cuivre(I).

Dans les cellules, le cuivre(I) est au minimum lié par le glutathion présent en quantité importante (quelques mM)[140] et dont l’affinité pour le cuivre(I) est $K_{\text{GSH}} = 10^{12-14}$ [35]. L’affinité du peptide pour le cuivre(I) ($K_{\text{CC9-Cu}} = 10^{9,4}$) est donc trop faible pour pouvoir imager le cuivre(I) à l’intérieur des cellules. Cependant le cuivre(I) n’est pas toujours aussi fortement complexé. Par exemple, les peptides amyloïde- β ont une affinité pour le cuivre(I) seulement d’environ $\sim 10^{7,3}$ [17]. Il serait donc possible d’imager le cuivre(I) lors de la formation des plaques β -amyloïdes.

Pour pouvoir utiliser la sonde dans les cellules, nous avons essayé d’augmenter l’affinité du peptide pour le cuivre(I) en modifiant les acides aminés directement impliqués dans la complexation du cuivre(I) (cf §3.2).

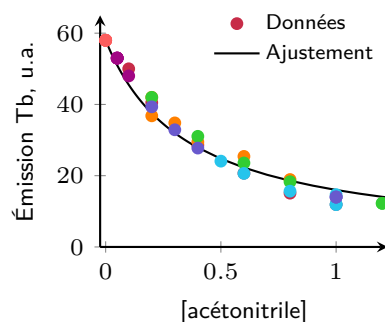


Fig. 2.22 : Augmentation de l’intensité d’émission du terbium ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) en fonction de la concentration en acétonitrile.

2.6 Mécanisme spectroscopique

La sonde $\text{CC9}[\text{Tb}]$ s'allume en présence de cuivre(I) et d'argent(I). Afin d'en connaître les raisons, nous avons étudié le mécanisme spectroscopique de cette sonde.

Dans un premier temps, le nombre de molécules d'eau liées au terbium a été déterminé afin de vérifier qu'il ne variait pas lors de la complexation du cuivre(I) ou de l'argent(I). La spectroscopie résolue en temps, effectuée par S.Denisov de l'équipe de N.McClenaghan, nous a permis de comprendre le mécanisme spectroscopique qui conduit à l'augmentation de l'émission du terbium en présence de cuivre(I) ou d'argent(I).

2.6.1 Nombre de molécules d'eau

La présence de vibrateurs de type O-H à proximité du lanthanide, a pour conséquence d'augmenter les désexcitations non radiatives^[86]. La durée de vie de luminescence du lanthanide est d'autant plus faible que le nombre de molécules d'eau, noté q , est important. La désexcitation d'un lanthanide par des vibrateurs, comme la liaison O-H, est un phénomène à plusieurs phonons. C'est-à-dire que la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental du lanthanide correspond à un multiple de l'énergie de la vibration (fig.2.24).

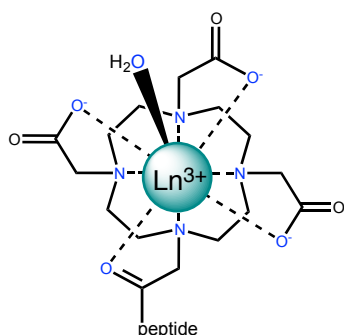


Fig. 2.23 : Lanthanide complexé par un DOTA et une molécule d'eau. En bleu : atomes liant le lanthanide.

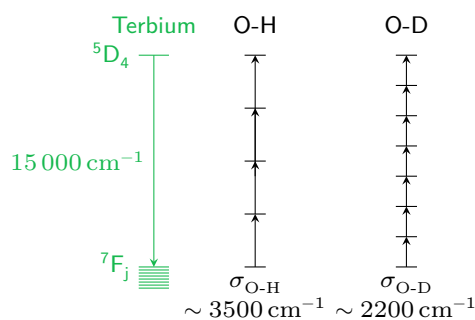


Fig. 2.24 : Illustration de l'extinction de la luminescence du terbium par des vibrations de type O-H et O-D^[66].

Or plus le nombre de phonons requis est important, moins le phénomène est probable. C'est pourquoi le temps de vie de luminescence des lanthanides est plus long dans D_2O que dans H_2O . Plusieurs équations phénoménologiques^[86,141] basées sur cette différence de temps de vie permettent de déterminer le nombre de molécules d'eau (2.23).

$$q_{\text{Tb}}(\text{H}_2\text{O}) = 5,0 * (\Delta k_{\text{obs}} - 0,06), \text{ avec } \Delta k_{\text{obs}} (\text{ms}) = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = \frac{1}{\tau(\text{H}_2\text{O})} - \frac{1}{\tau(\text{D}_2\text{O})}$$

Fig. 2.25 : Équation phénoménologique^[86] permettant de calculer le nombre de molécules d'eau lié au terbium.

Une diminution du nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination du terbium, diminuerait les désexcitations non radiatives, et la proportion de désexcitations radiatives augmenterait. Par conséquent, l'intensité mesurée serait plus importante. Pour vérifier que les variations de la luminescence du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ observées ne sont pas dues à un changement dans la sphère de coordination du terbium, nous avons donc déterminé le nombre de molécules

d'eau présentes dans la sphère de coordination du terbium pour le peptide seul, en présence de cuivre(I) ou d'argent(I).

Pour des raisons pratiques, il est difficile de mesurer directement le temps de vie de luminescence dans D₂O (peptide hydraté et présentant des hydrogènes échangeables, tampon préparé dans l'eau). Le temps de vie de luminescence du peptide est donc mesuré dans différents mélanges H₂O/D₂O, et le temps de vie dans D₂O est extrapolé (fig.2.26).

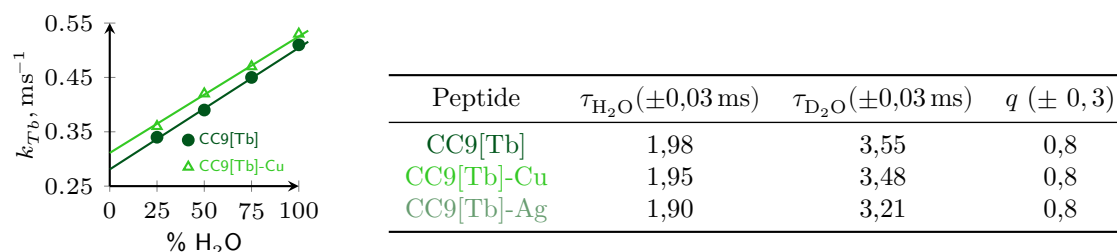


Fig. 2.26 : (À gauche) Constantes de vitesse de désexcitation radiative du terbium (k_{Tb}) en fonction du % H₂O dans D₂O, et (à droite) temps de vie de luminescence dans H₂O et dans D₂O et nombre de molécules d'eau pour le peptide CC9[Tb] seul, et en présence de cuivre(I) ou d'argent(I).

Le nombre de molécules d'eau calculé ne varie pas lors de la complexation du cuivre ou de l'argent, il est toujours de 0,8. Une molécule d'eau est donc présente dans tous les cas, ce qui est classique pour un terbium complexé par un DOTA^[69]. Les variations de luminescence observées ne sont donc pas dues à une modification du nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination du terbium.

2.6.2 Spectroscopie en temps résolu

Le spectrofluorimètre Cary Eclipse disponible au laboratoire permet de mesurer la fluorescence du tryptophane et la luminescence du terbium, mais pas la phosphorescence du tryptophane. Des échantillons ont été préparés avec S.Denisov de l'équipe de N.McClenaghan, afin d'effectuer des études spectroscopiques complémentaires.

Le temps caractéristique de l'absorption est la femtoseconde (fig.2.27). La fluorescence, qui est une transition autorisée de spin, est en général de l'ordre de la nanoseconde. La fluorescence du tryptophane est biexponentielle à cause de la présence de deux états émissifs^[142]. Dans le cas de la cod paralbumine, ces deux temps de vie sont : $\tau_1 = 4,3 \text{ ns}$ et $\tau_2 = 1,0 \text{ ns}$ ^[143]. La phosphorescence, qui est une transition interdite de spin, est un phénomène plus long de l'ordre de la microseconde jusqu'à plusieurs secondes (objets phosphorescents). La phosphorescence du tryptophane en solution aqueuse est de l'ordre de 10-20 μs ^[144]. Enfin, la luminescence du terbium est de l'ordre de 2 ms lorsqu'il est complexé par un DOTA et une molécule d'eau (cf §2.6.1). Tous ces phénomènes ont des temps de vie

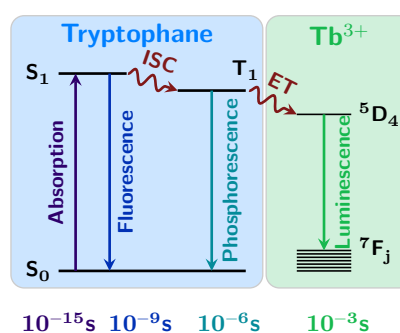


Fig. 2.27 : Diagramme de Jablonski de la sonde CC9[Tb], avec les temps de vie caractéristiques des différents phénomènes.

différents, il est donc possible de favoriser un des phénomènes par le choix des paramètres d'acquisition : le délai avant l'enregistrement, et le temps d'intégration.

L'instrumentation utilisée par S.Denisov (un laser Nd :YAG dont la fréquence est multipliée trois fois, un spectrographe, et une streak camera) permet d'obtenir des cartes d'émission en trois dimensions : en abscisse les longueurs d'onde, en ordonnée le temps, et l'échelle de couleur indique l'intensité d'émission. De la carte, on peut extraire un spectre pour un temps donné, ou bien l'intensité à une longueur d'onde donnée en fonction du temps. Ainsi il est possible de voir l'évolution du spectre en fonction du temps, ou d'extraire des temps de vie.

Échelle de la nanoseconde : Sur la carte, où l'échelle de temps est la nanoseconde (fig.2.28), on ne voit que la fluorescence du tryptophane. L'ajustement des données expérimentales par une double exponentielle a permis de déterminer les deux temps de vie du tryptophane (cf d) fig.2.28). Les temps de vie du peptide seul et en présence d'argent(I) sont proches, ceux obtenus en présence de cuivre(I) sont plus courts.

La fluorescence du tryptophane est sensible à l'environnement, notamment aux liaisons amides, aux molécules d'eau, et aux espèces susceptibles d'interagir par transfert d'énergie. Les différences de temps de vie observées sont dues à un changement d'environnement. De manière générale, les temps de vie sont dans la gamme des temps de vie obtenus pour des protéines contenant un seul tryptophane ($\tau_1 = 3,5 - 7 \text{ ns}$, $\tau_2 = 0,18 - 3,3 \text{ ns}$)^[142]. Pour une protéine dénaturée, les temps de vie moyens sont $\tau_1 = 4 \text{ ns}$, $\tau_2 = 1,5 \text{ ns}$ ^[142].

Les temps de vie du peptide sont proches de ceux d'une protéine dénaturée, c'est-à-dire pour laquelle le tryptophane est exposé à l'eau. Cela est cohérent avec l'équilibre conformationnel où seule la conformation Trp(libre) est fluorescente. La présence de métal diminue la proportion de tryptophanes libres, donc diminue l'intensité de fluorescence, mais n'affecte pas notablement la fluorescence des tryptophanes libres.

Échelle de la microseconde À l'échelle de la microseconde, sur la carte du peptide CC9[Tb], seules les 4 bandes correspondant au terbium sont visibles (fig.2.29). En revanche, pour le peptide en présence de cuivre(I), une bande large de temps de vie court est visible en plus du terbium.

Le temps de vie de cette bande large ($16 \mu\text{s}$ en présence de cuivre(I) et $18 \mu\text{s}$ en présence d'argent) est dans la gamme observée pour la phosphorescence du tryptophane : $10-20 \mu\text{s}$ ^[144]. De plus, la position de cette bande ($450-600 \text{ nm}$) est proche en longueur d'onde de ce qui est observé pour la phosphorescence du tryptophane seul ($400-550 \text{ nm}$)^[79,145,146]. Cette bande correspond à la phosphorescence du tryptophane.

La phosphorescence du tryptophane est visible uniquement en présence de cuivre(I) ou d'argent(I). L'état triplet du tryptophane est donc plus peuplé en présence de métal. L'interaction cation- π augmente donc le croisement intersystème comme ce qui avait été proposé.

Le temps de vie de l'augmentation de l'émission du terbium est de $16 \mu\text{s}$ en présence de cuivre(I) et $19 \mu\text{s}$ en présence d'argent(I) (fig.2.29). Ces temps de vie correspondent au temps de vie de déclin de la phosphorescence du tryptophane. Le transfert d'énergie du tryptophane vers le terbium a donc lieu entre le triplet du tryptophane et l'état excité 5D_4 du terbium^[147].

Afin d'étudier l'état triplet, sans être perturbé par l'émission du terbium, nous avons métallé un peptide par du lanthane à la place du terbium. La configuration électronique du lanthane(III) est $[\text{Xe}]4f^0$, il n'y a pas de transition $f \rightarrow f$ possible, donc pas de transfert d'énergie possible depuis le tryptophane. Ce peptide permet d'étudier l'influence de l'interaction cation- π sur les propriétés du tryptophane "seul", c'est-à-dire sans transfert d'énergie

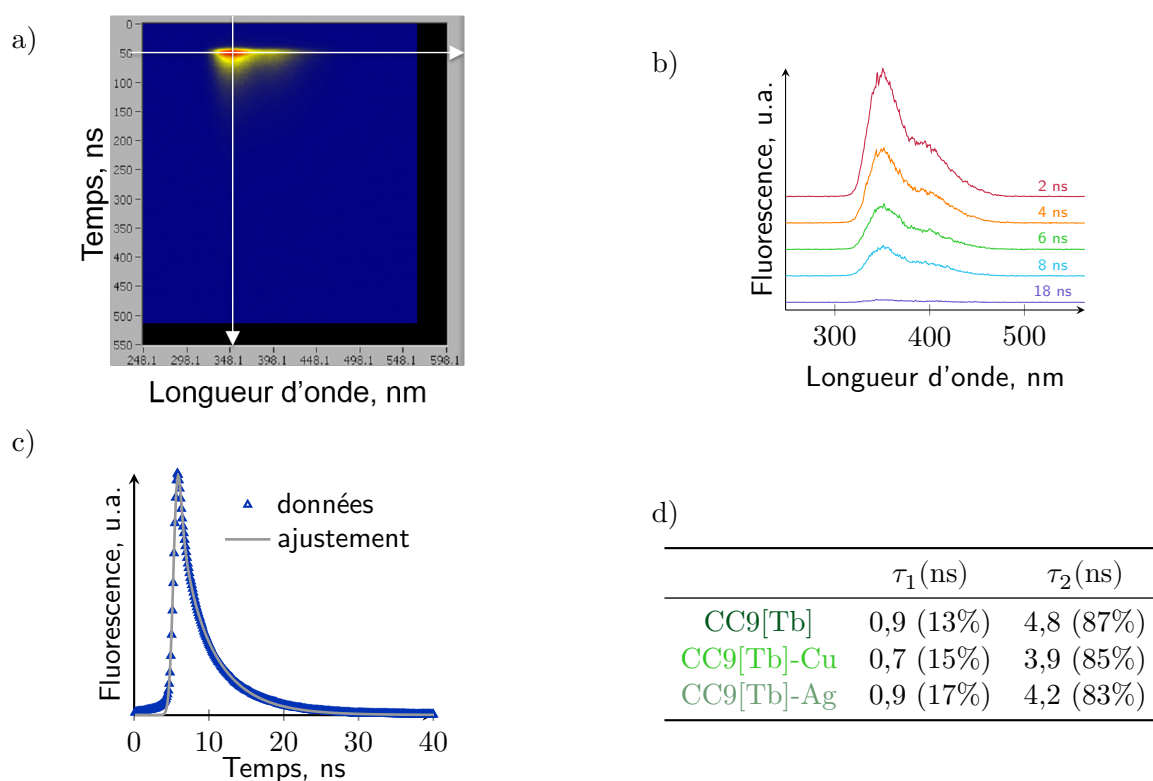


Fig. 2.28 : a) Carte d'émission du peptide CC9[Tb] à l'échelle de la nanoseconde. b) Spectres extraits de la carte à différents temps (temps d'intégration de 2 ns). c) Émission à 350 nm en fonction du temps et ajustement par une double exponentielle. d) Temps de vie de fluorescence. CC9[Tb] 20 μ M, HEPES pH 7,5 10 mM, NH₂OH 2 mM. Excitation par un laser Nd-YAG dont la fréquence a été multiplié trois fois, $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm. Détection grâce à un streak camera (principe §7.3.2)

possible. La phosphorescence du peptide CC9[La] en présence de cuivre(I) est décalée vers le rouge par rapport à la phosphorescence du peptide en présence d'argent(I) (fig.2.30). L'état triplet du peptide en présence de cuivre(I) est donc abaissé par rapport à l'état triplet du peptide en présence d'argent(I).

La position de l'état triplet pour le tryptophane lié au terbium est déterminée sur les spectres à température ambiante. La position de la transition $T_1(\nu = 0) \rightarrow T_0(\nu = 0)$, est estimée en prenant la longueur d'onde à mi-hauteur de la phosphorescence du côté des hautes énergies (fig.2.30). Ainsi l'énergie de l'état triplet du peptide CC9[La] en présence d'argent est de 23 500 cm^{-1} et en présence de cuivre(I) de 21 700 cm^{-1} (fig.2.30). L'interaction cation- π abaisse l'énergie de l'état triplet de 300 cm^{-1} dans le cas de l'argent(I), et 2300 cm^{-1} dans le cas du cuivre(I).

Le tryptophane n'étant pas lié directement au terbium, le mécanisme du transfert d'énergie n'est pas de type Dexter mais plutôt Förster. L'efficacité du transfert d'énergie par mécanisme Förster est fonction du recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur. Le déplacement bathochrome de la phosphorescence du tryptophane a pour conséquence de modifier l'intégrale de recouvrement du spectre de phosphorescence du tryptophane et d'absorption du terbium. L'efficacité du transfert d'énergie par résonance de type Förster peut être déterminée à partir du temps de vie d'émission du donneur en présence (τ_{DA}) et en l'absence d'accepteur (τ_D)^[148] : $E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$.

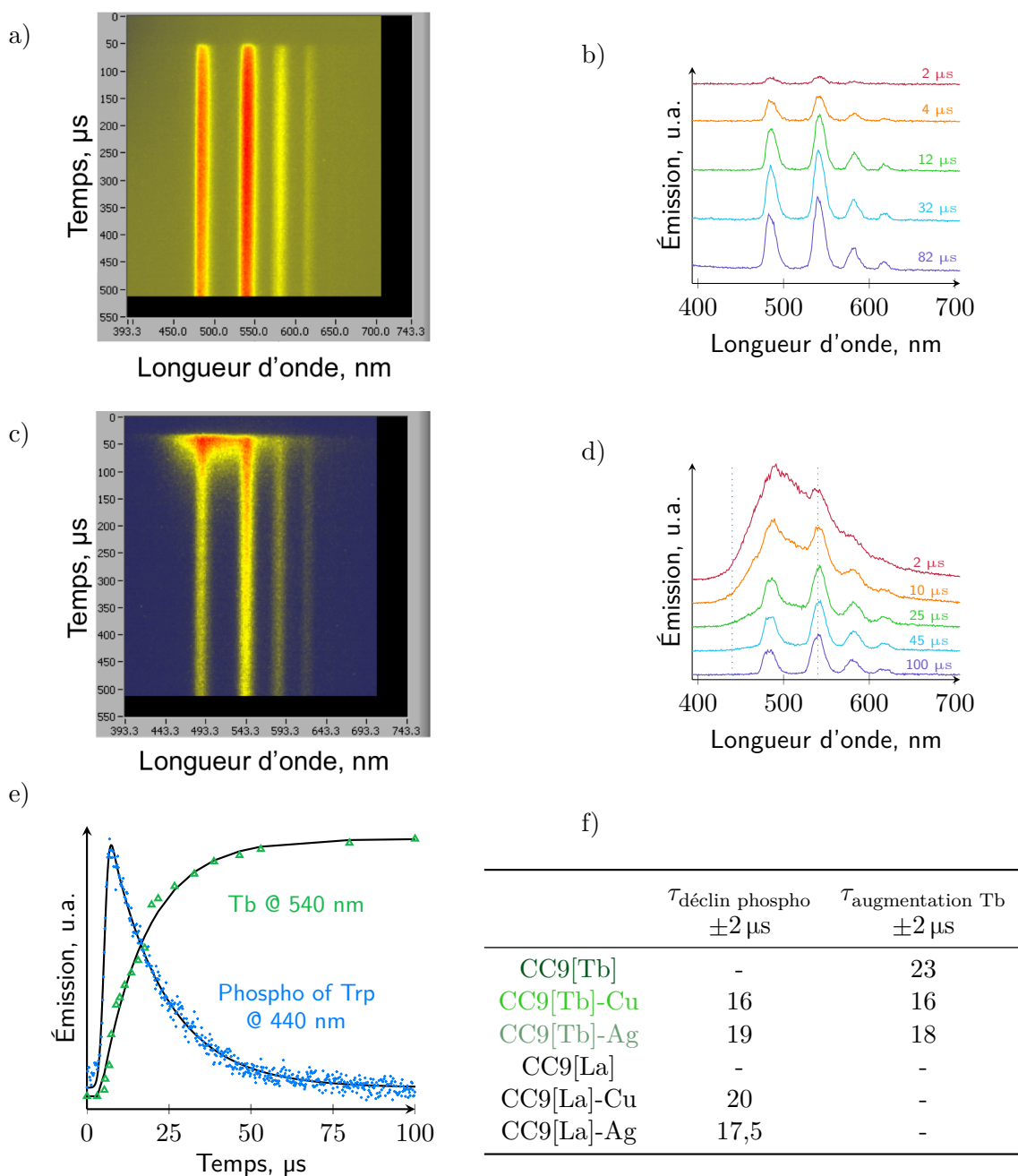


Fig. 2.29 : a) c) Cartes d'émission des peptides $\text{CC9}[\text{Tb}]$ et $\text{CC9}[\text{Tb}]\text{-Cu}$ à l'échelle de la microseconde. b) d) Spectres extraits des cartes à différents temps (temps d'intégration de 2 ns). e) Émissions à 510 nm et 540 nm et ajustements. f) Temps d'extinction de la phosphorescence et augmentation de la luminescence du terbium.

Dans notre cas, τ_{DA} est le temps de vie de phosphorescence du tryptophane pour le peptide métallé avec du terbium et τ_{D} celui du peptide métallé avec du lanthane. Comme la phosphorescence du tryptophane (donneur) n'est visible qu'en présence de métal, il n'est pas possible de déterminer l'efficacité du transfert pour le peptide libre. En présence d'argent(I), l'efficacité du transfert d'énergie est de 5%, et de 10% dans le cas du cuivre(I). Les temps de vie de phosphorescence sont déterminés avec une précision de $2 \mu\text{s}$, ce qui correspond à

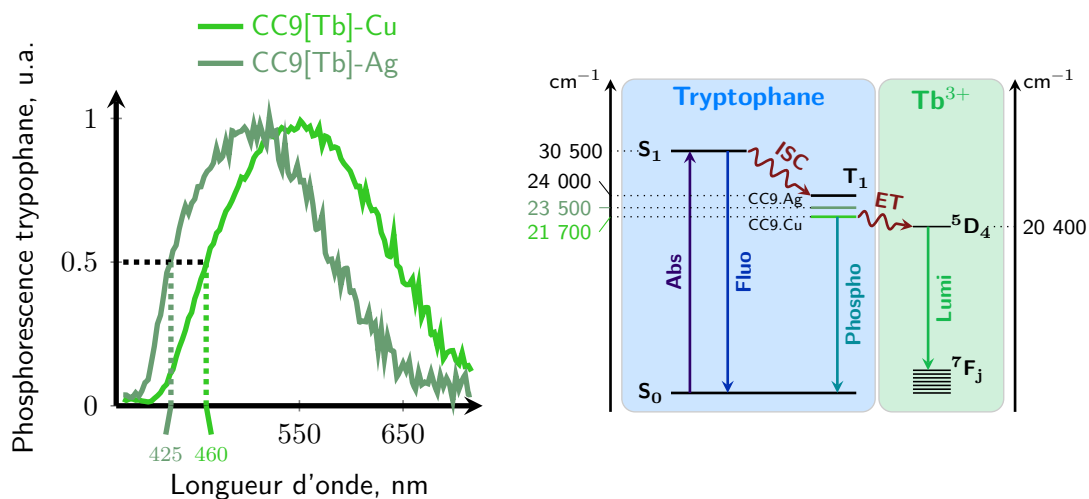


Fig. 2.30 : Spectres en temps résolu (à gauche) de la phosphorescence du tryptophane pour le peptide CC9[Tb] en présence d'argent(I) ou de cuivre(I). Diagramme de Jablonski (à droite) montrant l'abaissement de l'état triplet du tryptophane en présence de cuivre(I) et d'argent(I).

une incertitude de 5%. La différence d'efficacité du transfert d'énergie entre le cuivre(I) et l'argent(I) n'est donc pas significative. Dans les deux cas, le transfert d'énergie est peu efficace.

2.7 Discussion

Le peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ est une sonde qui s'allume sélectivement en présence de cuivre(I) et d'argent(I) avec un contraste important ($\times 58$). Le mécanisme de cette sonde est basé sur la présence de l'interaction cation- π entre le tryptophane et le cuivre(I). L'interaction cation- π modifie les propriétés du tryptophane (augmentation du croisement intersystème et abaissement de l'état triplet). Le tryptophane est également l'antenne permettant de sensibiliser le terbium. L'augmentation du croisement intersystème en présence de métal a pour conséquences de peupler davantage l'état triplet du tryptophane et d'augmenter le transfert d'énergie vers le terbium, ce qui allume la sonde. L'abaissement de l'état triplet modifie le recouvrement du spectre de phosphorescence du tryptophane et d'absorption du terbium, cela doit donc modifier l'efficacité du transfert d'énergie. Cependant comme la phosphorescence du peptide libre n'est pas visible, nous n'avons pas pu déterminer l'efficacité du peptide libre. Nous ne pouvons donc pas déterminer l'influence de l'abaissement de l'état triplet en présence de métal sur l'efficacité du transfert d'énergie.

En conclusion, le mécanisme de cette sonde est original et différent du mécanisme par transfert d'électron photoinduit sur lequel sont basées la plupart des sondes pour le cuivre(I)^[42].

Pour être utilisée dans les cellules, cette sonde doit être optimisée : affinité, longueur d'onde d'excitation et d'émission (cf §3).

Modifications de la sonde à Cu^+

3.1	MODIFICATIONS DE LA SÉQUENCE	57
3.1.1	Conception de la sonde CC9[Tb]	57
3.1.2	Modification du coude, position des prolines	58
3.2	MODIFICATION DE L’AFFINITÉ	62
3.2.1	Mutation en vue d’augmenter l’affinité pour le cuivre(I)	62
3.2.2	Mutation en vue d’augmenter l’affinité pour l’argent(I)	64
3.2.3	Discussion sur la modification de la séquence du peptide	65
3.3	MODIFICATION DE L’ANTENNE	67
3.3.1	Synthèse	68
3.3.2	Sensibilisation des lanthanides proche infrarouge	69
3.3.3	Formation de l’interaction cation- π	70
3.3.4	Discussion sur la modification des antennes	72
3.4	CAS DE L’ANTENNE NAPHTALÈNE	75
3.4.1	Complexation du cuivre(I)	75
3.4.2	Interaction cation- π	76
3.4.3	Émission de l’euprium	77
3.4.3.1	Constantes d’affinité	78
3.4.4	Mécanisme spectroscopique	78
3.4.4.1	Échelle de la nanoseconde	78
3.4.4.2	Échelle de la microseconde	79
3.4.4.3	Échelle de la milliseconde	80
3.4.5	Discussion sur le peptide CC10(Nap)[Eu]	80
3.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	82

Plusieurs peptides de la famille de $\text{CC9}[\text{Tb}]$ ont été synthétisés. D'abord $\text{CC9}[\text{Tb}]$ n'est pas le premier, comme son nom l'indique. Auparavant huit autres peptides ont permis d'affiner la conception de la sonde : peptide linéaire ou cyclique, choix du dipeptide pour induire la formation des feuillets β , position du lanthanide.

Chez le peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$, l'existence de la forme $\text{Trp}(\text{libre})$ fluorescente en équilibre avec la forme $\text{Trp}(\text{lié})$ luminescente diminue, d'un point de vue macroscopique, le rendement de luminescence du peptide. Nous avons donc modifié la séquence du peptide pour essayer de favoriser la forme $\text{Trp}(\text{lié})$. Dans la structure de la protéine CusF, la chaîne peptidique forme un coude. Les deux prolines qui se font face dans la structure cristallographique, semblent être le "point de pivot" de ce coude qui amène le tryptophane au-dessus du plan formé par les deux méthionines et l'histidine. Dans la séquence des protéines homologues de CusF, ces prolines ne sont pas toujours situées au même endroit. Deux peptides, dont la séquence est celle de protéines homologues de CusF, ont été synthétisés pour déterminer si la modification de la position des prolines pouvait aider à mieux replier le peptide et favoriser la forme $\text{Trp}(\text{lié})$.

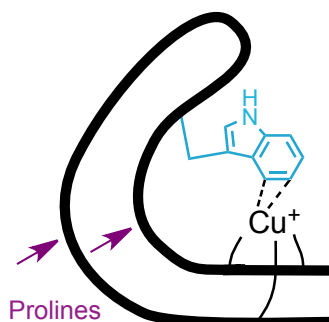


Fig. 3.1 : Schéma du coude formé par CusF permettant au tryptophane de lier le cuivre(I).

Un deuxième inconvénient de la sonde $\text{CC9}[\text{Tb}]$ est sa faible affinité pour le cuivre(I) comparé au milieu intracellulaire (glutathion). Pour modifier les constantes d'affinité du peptide, nous avons muté les acides aminés liant le métal. Une méthionine (thioéther) a été mutée en homocystéine (thiolate) pour augmenter l'affinité pour le cuivre(I). Pour augmenter l'affinité pour l'argent(I), nous avons remplacé les méthionines par des sénométhionines.

En vue d'une utilisation en imagerie, il faudrait décaler l'excitation vers le visible et l'émission vers le proche infrarouge pour profiter de la fenêtre de diagnostic^[51]. Le tryptophane doit être remplacé par une autre antenne capable de sensibiliser un lanthanide émettant dans le proche infrarouge. Pour déterminer s'il est possible de former l'interaction cation- π avec un autre aromatique que l'indole du tryptophane et caractériser la topologie de l'antenne permettant de former cette interaction, nous avons utilisé le naphthalène et l'anthracène, connus pour sensibiliser respectivement l'euporium^[149] et les lanthanides proche infrarouge^[150]. Par ailleurs, afin de sensibiliser les lanthanides proche infrarouge, nous avons testé trois nouvelles antennes potentielles : deux azulènes et un benzofurazane.

3.1 Modifications de la séquence

3.1.1 Conception de la sonde CC9[Tb]

Les peptides CC1 à CC8 ont été synthétisés par A.Roux avant mon arrivée en thèse. Le premier peptide testé était linéaire et précipitait en présence d'argent(I), ce qui suggère la formation d'espèces polymériques insolubles. Pour mieux contrôler la conformation et la nucléation des complexes formés, il a été choisi de synthétiser des peptides cycliques. Plusieurs dipeptides induisant des feuilletts β ont été testés pour cycliser le peptide : D Proline - Proline, Aib - D Proline, et Proline - Glycine (fig.3.2).

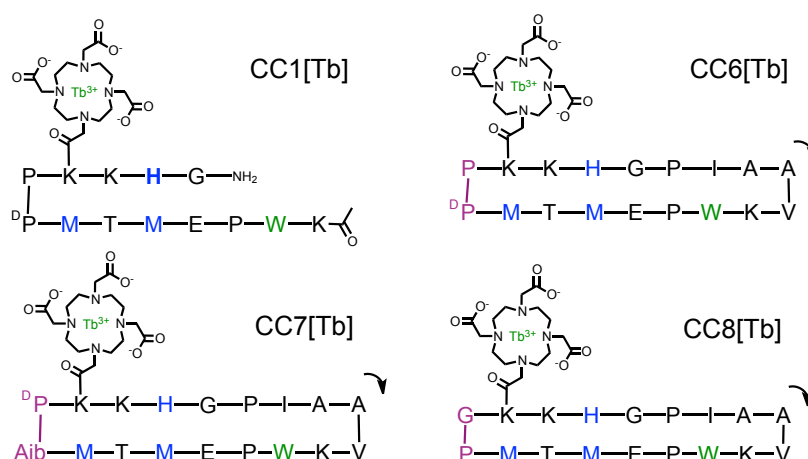


Fig. 3.2 : Quelques séquences des premiers peptides à cuivre(I) synthétisés.

À l'époque des stages d'A.Roux, l'influence du dipeptide sur la modification des propriétés du tryptophane en présence de métal était caractérisée par le déplacement de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$, et l'extinction de la fluorescence. Le déplacement de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ augmente, comme le pourcentage d'extinction de la fluorescence, en passant d'un dipeptide Proline-Glycine (CC8), à D Proline - Proline (CC6), puis Aib - D Proline (CC7) (fig.3.2). Le dipeptide Aib - D Proline a donc été gardé pour les peptides suivants.

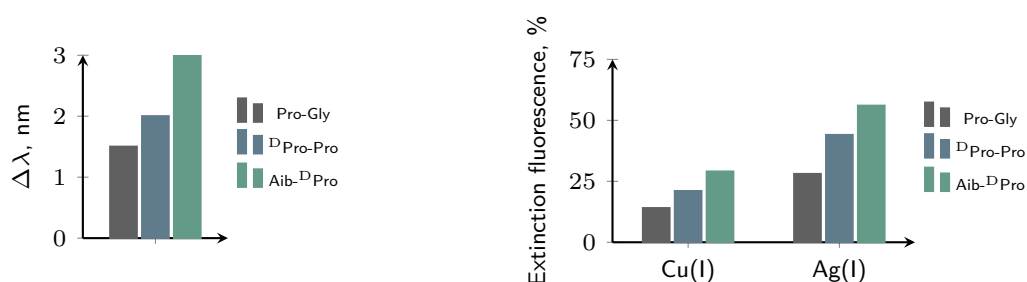


Fig. 3.3 : Déplacement bathochrome de la bande d'absorption et extinction de la fluorescence du tryptophane pour les peptides CC6[Tb] (D Pro-Pro), CC7[Tb] (Aib- D Pro), et CC8[Tb] (Pro-Gly).

Ce critère, consistant à garder le peptide avec la plus « forte » interaction cation- π , est validé a posteriori. L'étude du peptide CC9[Tb] a montré que l'interaction cation- π éteint complètement la fluorescence du tryptophane, et que la fluorescence résiduelle provient de la

conformation du peptide où le tryptophane n'est pas lié. Le dipeptide Aib - $^{\text{D}}$ Pro est donc celui qui favorise la conformation Trp(lié), et donc l'interaction cation- π , au détriment de la forme Trp(libre). Pour augmenter le contraste entre l'absence et la présence de métal, il est préférable de limiter la population de forme Trp(libre). Ce dipeptide est donc bien celui qu'il fallait choisir.

Pour ces trois peptides, l'émission du terbium n'augmente pas en présence de cuivre(I) mais diminue (fig.3.4). En présence d'argent(I), l'émission du terbium augmente pour deux peptides et diminue pour le troisième. Dans ces peptides, le DOTA est éloigné du tryptophane dans la chaîne peptidique et à proximité du dipeptide d'acides aminés non naturels. Le repliement du peptide induit par chaque dipeptide est différent. Il est probable que la chaîne latérale de la lysine portant le DOTA ne pointe pas dans la même direction pour les trois peptides. La distance entre le terbium et le tryptophane n'est donc pas la même dans les trois cas. De plus, la complexation du métal modifie la conformation du peptide, et surement la distance entre le tryptophane et le terbium. L'évolution de cette distance lors de la complexation du métal n'est sans doute pas la même pour les trois peptides. Ainsi l'efficacité du transfert d'énergie du tryptophane vers le terbium n'est pas seulement modulée par l'interaction cation- π mais également par la variation de la distance entre le tryptophane et le terbium. L'émission du terbium n'est donc pas un critère pertinent pour comparer ces peptides. Par ailleurs, cela montre que la position du DOTA doit être optimisée.

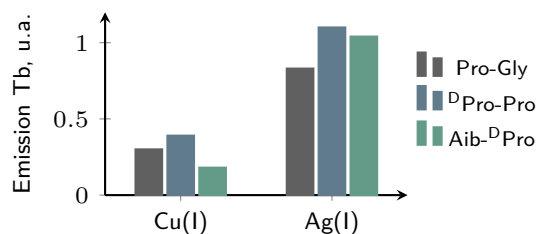


Fig. 3.4 : Augmentation de l'émission du terbium en présence de cuivre(I) ou d'argent(I) en fonction du dipeptide utilisé pour cycliser le peptide.

Après avoir choisi le dipeptide permettant de cycliser le peptide, la position du DOTA a donc été modifiée. Dans un premier temps, pour ne pas modifier la séquence de la boucle de la protéine CusF, le DOTA est greffé sur la chaîne latérale d'une lysine à l'extrémité de cette boucle (peptides CC6 \rightarrow CC8). Cette position est éloignée de l'antenne dans la séquence mais aussi dans l'espace en se basant sur la structure de CusF. Pour augmenter l'efficacité du transfert d'énergie du tryptophane vers le terbium, le DOTA a été greffé plus proche du tryptophane dans la chaîne peptidique. Dans la séquence de CusF, la valine, à deux acides aminés du tryptophane, est dirigée du même côté que le tryptophane dans la structure de CusF et sa chaîne latérale établit une interaction CH- π avec le tryptophane. Elle a été mutée en lysine pour greffer le DOTA sur la chaîne latérale. Ainsi le terbium est plus proche du tryptophane dans la chaîne peptidique et dans l'espace. De plus, il est possible que la chaîne latérale de la lysine forme une interaction CH- π avec le tryptophane. Cette interaction maintiendrait la lysine dans une conformation où le DOTA serait proche du tryptophane.

3.1.2 Modification du coude, position des prolines

Dans la séquence de CusF, deux prolines se font face dans la structure de la boucle en position 38 et 45 (fig.3.6). La proline est un acide aminé cyclique (fig.3.5), il contraint la structure secondaire de la protéine. La présence des deux prolines et leur position aide probablement à former le coude qui permet de ramener le tryptophane au-dessus du plan des atomes liant le cuivre.

Parmi les protéines homologues de CusF, il existe deux positions pour ces prolines : soit en position 38 et 45 comme pour CC9[Tb], soit en position 41 et 45. La protéine SilB est une protéine du complexe permettant l'efflux du cuivre(I) et de l'argent(I) chez *Cupriavidus metallidurans* CH34^[135]. Cette protéine possède un domaine homologue à CusF comprenant une seule proline en position 45 et une glycine en position 41.

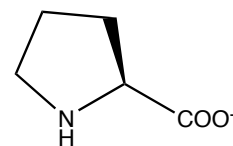


Fig. 3.5 : Structure de la proline

Les deux peptides correspondant à la séquence de protéines homologues de CusF avec les prolines en position 41 et 45 (CC10[Tb]), et à la séquence de SilB avec une proline et une glycine (CC11[Tb]) ont été synthétisés et caractérisés en présence d'argent(I) par V.Chabert lors de son stage de M1.

Le déplacement de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ du tryptophane est du même ordre de grandeur pour les trois peptides (4 – 5 nm). La différence entre les peptides n'est pas significative. La comparaison des peptides est donc basée sur leur propriété d'émission. L'extinction de la fluorescence est plus importante en présence d'argent(I) qu'en présence de cuivre(I) pour tous les peptides (fig.3.7). Pour ces deux métaux l'extinction de fluorescence est plus importante dans le cas du peptide CC10[Tb], puis pour le peptide CC9[Tb], et enfin pour CC11[Tb]. Le peptide CC10[Tb] est donc le peptide qui favorise le plus l'interaction cation- π , c'est-à-dire la forme Trp(lié). À l'inverse, le peptide CC11[Tb] est le moins performant pour former l'interaction cation- π .

L'augmentation de l'émission du terbium lors de la complexation du métal ne varie pas de la même manière que l'extinction de la fluorescence. Elle est plus importante pour le peptide CC9[Tb], puis pour le peptide CC10[Tb], enfin pour le peptide CC11[Tb](fig.3.7). Le peptide CC10[Tb], qui favorise le plus l'interaction cation- π n'est pas celui pour lequel le contraste est le plus important. C'est le peptide CC9[Tb] qui présente le plus fort contraste.

Il est difficile de rationaliser pourquoi le peptide dont la fluorescence est la plus éteinte en présence du métal n'est pas celui pour lequel l'augmentation de l'émission du terbium est la plus importante. L'efficacité du transfert d'énergie selon le mécanisme Förster est proportionnel au recouvrement spectral entre donneur et accepteur, à la distance entre donneur et accepteur et à leur orientation relative. Pour les trois peptides le donneur et l'accepteur sont identiques donc le recouvrement spectral aussi. Le DOTA complexant le terbium est à proximité du tryptophane dans la séquence peptidique et dans l'espace car le tryptophane et la lysine sur laquelle est greffé le DOTA sont du même côté de la chaîne peptidique.

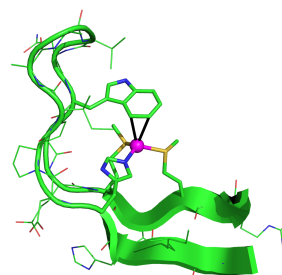


Fig. 3.8 : Structure de CusF

La distance entre le tryptophane et le terbium sera probablement peu modifiée par les modifications de la séquence peptidique entre les différents peptides, ainsi que l'orientation relative entre le tryptophane et le terbium. Cependant comme le rayon de Förster est petit, de faibles variations de distance peuvent conduire à une modification non négligeable de l'efficacité du transfert d'énergie.

Il est possible que l'efficacité du transfert d'énergie soit similaire dans les trois cas et que la différence entre les peptides provienne d'un autre phénomène. Par exemple, l'interaction cation- π augmente le croisement intersystèmes, qui permet de peupler davantage l'état triplet T_1 . Cependant si le croisement intersystèmes est favorisé en présence de métal, la désexcitation de l'état T_1 vers l'état fondamental S_0 est probablement favorisée également. Le peptide

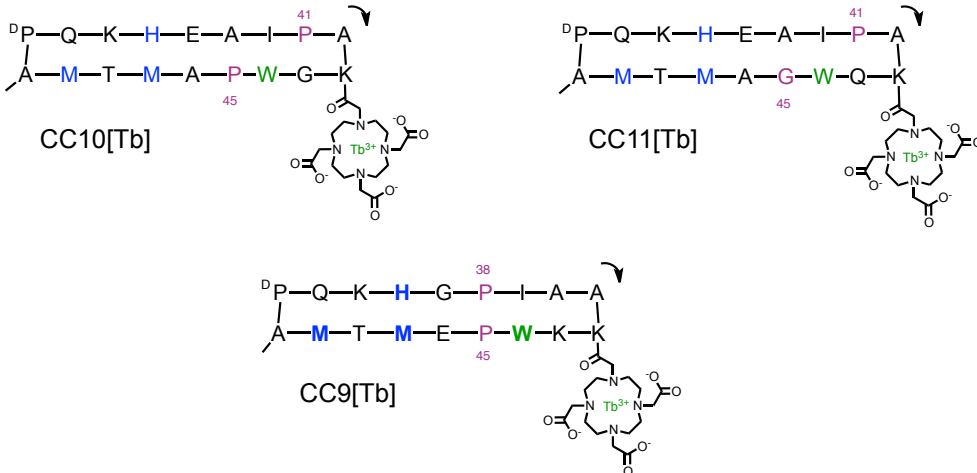
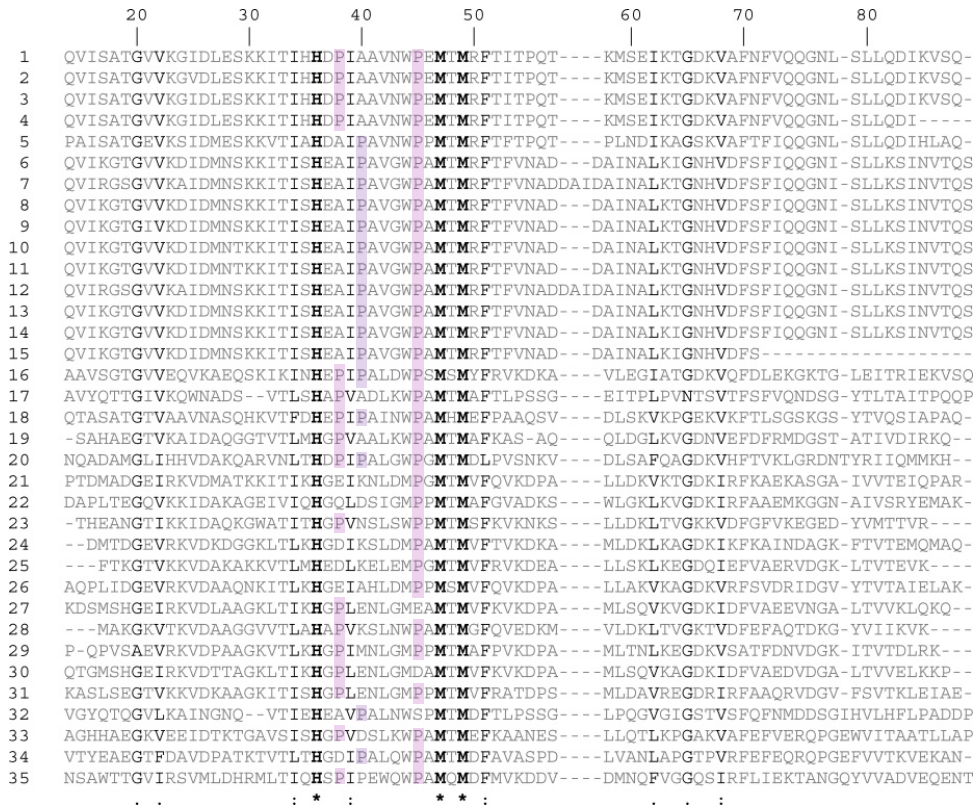


Fig. 3.6 : Alignements de séquence de protéines homologues de CusF (haut)^[107]. Séquence des peptides **CC10[Tb]** et **CC11[Tb]** (bas), permettant d'étudier l'influence de la position des prolines sur le repliement du peptide et l'interaction cation- π .

CC9[Tb] correspondrait à un optimum pour l'augmentation de luminescence du terbium, mais il est difficile de rationaliser pourquoi.

Enfin, la constante d'affinité du peptide **CC10[Tb]** pour le cuivre(I) et l'argent(I) est légèrement supérieur à celles des peptides **CC9[Tb]** et **CC11[Tb]**. Le peptide **CC10[Tb]** est donc le peptide qui lie le plus fortement le métal, mais aussi celui qui favorise le plus l'interaction cation- π .

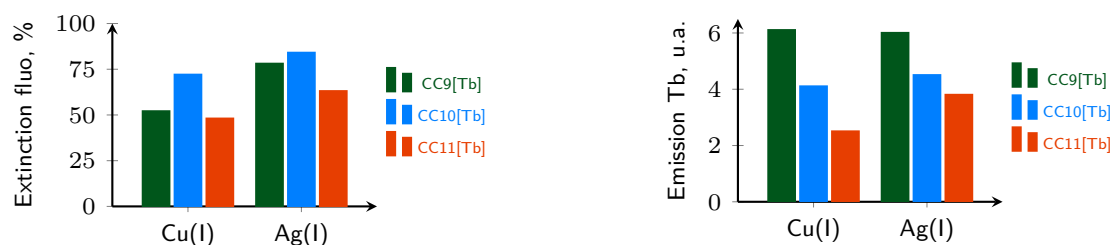


Fig. 3.7 : (À gauche) Extinction de la fluorescence et augmentation de la luminescence du terbium en présence de cuivre(I) ou d'argent(I) (à droite) pour les peptides **CC9[Tb]**, **CC10[Tb]**, et **CC11[Tb]** en présence de cuivre(I) ou d'argent(I). Peptide 5 μ M, HEPES pH 7,5 10 mM, NH_2OH 2 mM. $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm (fluorescence) ou 280 nm (luminescence). Fentes 10-5.

K_{aff}	Cu^+	Ag^+
CC9[Tb]	9,4	7,3
CC10[Tb]	10,2	8
CC11[Tb]	9,2	7,2

Fig. 3.9 : Constantes d'affinité des peptides **CC9[Tb]**, **CC10[Tb]**, et **CC11[Tb]** pour le cuivre(I) et l'argent(I).

3.2 Modification de l'affinité

L'affinité du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ pour le cuivre(I) est de $K_{\text{CC9-Cu}} = 10^{9,4}$. Dans une cellule, le cuivre(I) est au minimum lié par le glutathion ($K_{\text{aff}} = 10^{12-13}$ ^[35]), dont la concentration est de l'ordre du millimolaire^[140]. Le peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$ n'est pas un compétiteur assez fort pour pouvoir complexer le cuivre(I) *in vivo*. Nous avons donc cherché à augmenter l'affinité de ce peptide pour le cuivre(I). Nous avons également essayé d'augmenter l'affinité du peptide pour l'argent(I).

3.2.1 Mutation en vue d'augmenter l'affinité pour le cuivre(I)

Les sites de coordination des protéines à cuivre sont composés d'histidines (imidazoles), de cystéines (thiols) et de méthionines (thioéthers)^[37]. Les cystéines déprotonnées sous forme de thiolates sont les ligands les plus affins du cuivre(I). Nous avons donc cherché à introduire des thiolates dans notre peptide. Une seule des deux méthionines a été mutée. Nous voulions éviter la formation d'un complexe linéaire thiolate-cuivre-thiolate qui modifierait la structure du peptide complexé au cuivre(I). Enfin la méthionine choisie pour la mutation est la méthionine équivalente à la méthionine 49 chez CusF (fig.3.10), car son groupement méthyle terminal est exposé au solvant, alors que celui de la méthionine 47 est impliqué dans une interaction hydrophobe avec le tryptophane.

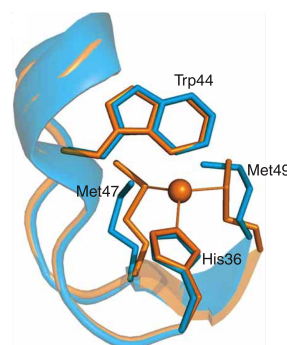


Fig. 3.10 : Structure de la protéine CusF seule (bleu) et liée au cuivre (jaune)^[111].

Pour perturber au minimum la structure du peptide, le thiolate est introduit à la place d'un thioéther (méthionine) et non à la place de l'imidazole (histidine). La chaîne latérale de la méthionine est plus longue que celle de la cystéine (fig.3.12). Dans la méthionine, deux carbones séparent le carbone α du soufre, au lieu d'un seul pour la cystéine. Pour garder la même géométrie, nous avons donc remplacé une des méthionines par une homo-cystéine (fig.3.12), c'est-à-dire une cystéine avec deux carbones au lieu d'un seul dans la chaîne latérale. Ce peptide est noté $\text{CC9}(\text{hCys})[\text{Tb}]$ (fig.3.11).

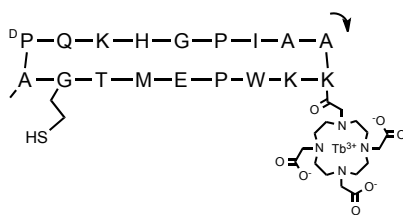


Fig. 3.11 : Séquence du peptide $\text{CC9}(\text{hCys})[\text{Tb}]$.

La synthèse du peptide $\text{CC9}(\text{hCys})[\text{Tb}]$ est similaire à celle de $\text{CC9}[\text{Tb}]$ en utilisant l'acide aminé commercial Fmoc-hCys(Trt)-OH à la place de Fmoc-Met-OH. Le peptide obtenu a été caractérisé en spectrométrie de masse. En HPLC analytique, le chromatogramme présente un pic unique.

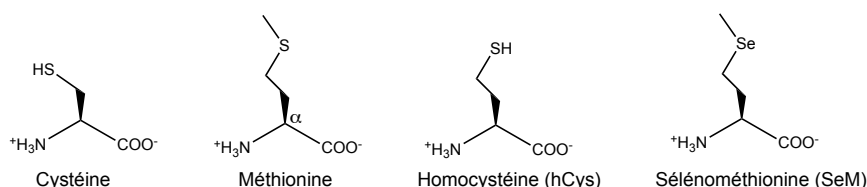


Fig. 3.12 : Structure de quelques acides aminés naturels et non naturels.

Le titrage du peptide suivi en fluorescence et en absorbance UV-Visible montre un déplacement de la bande d’absorption liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et une extinction de la fluorescence du tryptophane (fig.3.13). Le peptide forme bien l’interaction cation- π , donc lie bien le cuivre(I).

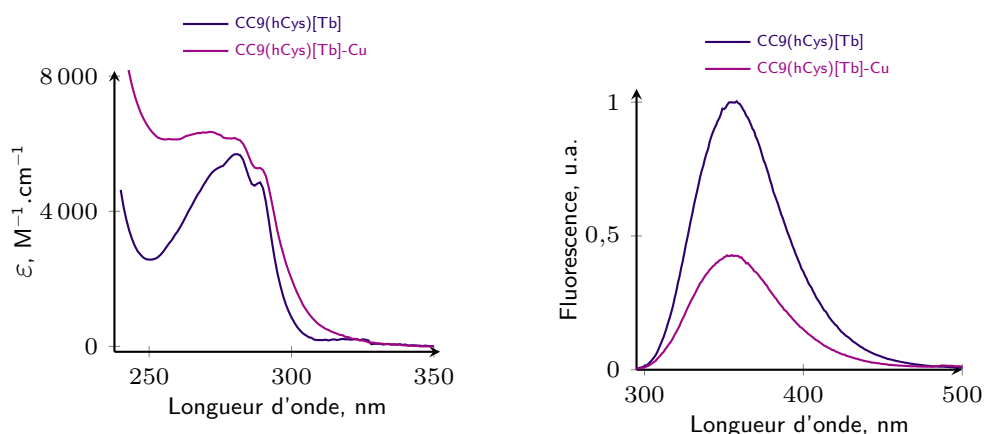


Fig. 3.13 : Spectres d’absorption UV-Visible et de fluorescence pour le peptide CC9(hCys)[Tb] seul et en présence de cuivre(I). CC9(hCys)[Tb] 20 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, NH_2OH 2 mM. Ajout $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$ 0,9 équivalents (18 μM). Fentes 5-5. PM 710 V.

Sur le titrage suivi en luminescence, l’augmentation de l’émission du terbium en fonction de la quantité de métal ajouté présente une inflexion, lors des premiers ajouts de cuivre(I). Après un équivalent, l’émission du terbium chute brutalement jusqu’à retrouver le niveau d’émission du peptide sans cuivre (fig.3.14). Le phénomène se produit en quelques minutes. La fluorescence et l’absorption marquent également une rupture à 1 équivalent mais cela est moins net.

Après l’ajout d’un équivalent de cuivre(I) une réaction conduit à la formation d’un composé peu luminescent. Afin de déterminer la nature du composé formé, le peptide est titré jusqu’à ce que l’émission chute puis le peptide est analysé en spectrométrie de masse (fig.3.14). Sur le spectre, le pic présent correspond au peptide libre : $m/z = (3+) 869,9$ ($m/z_{\text{calculé}} = 870,4$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ pour $\text{M}=\text{C}_{107}\text{H}_{165}\text{N}_{29}\text{O}_{29}\text{S}_2\text{TbCu}$). Un grossissement du massif isotopique 870,4, montre que le massif isotopique expérimental ne correspond pas au massif isotopique calculé. Le massif est plus large. Des pics de masse plus faible sont présents. Le massif isotopique commence par un pic correspondant à une masse plus faible de 4 unités par rapport au peptide CC9(hCys)[Tb].

Une possibilité pour expliquer les 4 unités de masse en moins serait une déshydrogénation du peptide. Pour tester si cette oxydation est due à la présence de cuivre(II) ajouté lors du ti-

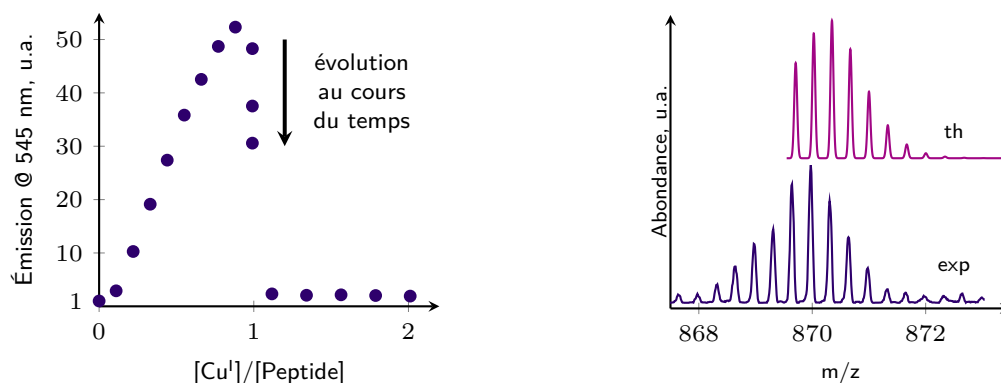


Fig. 3.14 : (À gauche) Émission du terbium ($\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$) lors du titrage du peptide CC9(hCys)[Tb] par du cuivre(I). (À droite) Spectre de masse du peptide en présence de cuivre 1,2 équivalents par rapport au peptide. CC9(hCys)[Tb] $33 \mu\text{M}$ (lumi) $10 \mu\text{M}$ (masse), HEPES pH 7,5 10 mM (lumi) AcONH_4 pH 7,4 10 mM (masse), NH_2OH 2 mM . Ajouts $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4 \cdot \lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$, fentes 5-5, PM 825 V.

trage en présence d'hydroxylamine, nous avons réalisé un titrage directement avec du cuivre(I) stabilisé par l'acétonitrile. Lors du titrage (CH_3CN $0,2 \text{ M}$, ajouts $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{CH}_3\text{CN})_4 \cdot \text{PF}_6$), l'inflexion lors de premiers ajouts n'est pas présente. En revanche, la chute de la luminescence après un équivalent est toujours présente. La réaction se produisant après un équivalent n'est donc pas due à la présence de cuivre(II). De plus, le spectre de masse ne peut pas être déconvolué par la superposition du peptide, d'un peptide ayant perdu 2 protons, et d'un peptide ayant perdu 4 protons.

En conclusion, le peptide CC9(hCys)[Tb] est capable de former un complexe 1 : 1 dans lequel l'interaction cation- π est présente, mais en excès de cuivre(I) le complexe réagit pour donner au moins une espèce de masse plus faible, dont la luminescence est proche de celle du peptide libre. Nous n'avons pas réussi à déterminer la nature de cette espèce. Les espèces formées en présence de cuivre(I) n'étant pas clairement identifiées, nous n'avons pas pu déterminer l'affinité de ce peptide pour le cuivre(I).

Une possibilité pour synthétiser un autre peptide plus affiné du cuivre(I) serait de muter l'autre méthionine. Cela permettrait également de déterminer si le complexe 1 :1 se dégrade également en excès de ce cuivre(I).

3.2.2 Mutation en vue d'augmenter l'affinité pour l'argent(I)

L'argent est le métal situé au-dessous du cuivre dans la classification périodique. l'extension spatiale des orbitales 4d étant plus importante que celle des orbitales 3d, le rayon de l'argent(I) est plus grand que celui du cuivre(I), il est donc plus polarisable. Une possibilité pour augmenter l'affinité du peptide pour l'argent(I) est de rendre la sphère de coordination plus molle avec des ligands plus polarisables. Dans notre cas, il est possible de muter les méthionines en sélénométhionines. Le sélénium étant l'élément en dessous du soufre dans la classification périodique, il est plus polarisable donc plus mou. Le sélénium est un nutriment essentiel^[151] qui entre dans la composition des sélénoprotéines sous forme de sélénocystéine ou sélénométhionine^[152].

La sélénométhionine, Fmoc-SeM-OH, est commerciale. Nous avons donc synthétisé le peptide **CC9(2*SeM)[Tb]** pour lequel les deux méthionines ont été mutées en sélénométhionines (fig.3.15) de la même manière que **CC9[Tb]**. La sélénométhionine est plus sensible à l’oxydation par le dioxygène de l’air que la méthionine. Cependant les sélénoxydes formés sont réductibles par une phosphine, comme la TCEP, ce qui n’est pas le cas des sulfoxides. La seule différence lors de la synthèse par rapport à celle du peptide **CC9[Tb]** est donc l’ajout de TCEP avant la purification par HPLC préparative afin de réduire les sélénoxydes éventuellement formés. Le peptide est caractérisé par spectrométrie de masse : $m/z = 1328, 2(2+), 885, 8(3+), 664, 8(4+)$, $m/z_{\text{calculé}} = 1328, 0[M + 2H]^{2+}, 885, 7[M + 3H]^{3+}, 664, 5[M + 4H]^{4+}$, pour $M = C_{108}H_{168}N_{29}O_{29}Se_2Tb$, et sa pureté est évaluée supérieure à 95% par HPLC analytique.

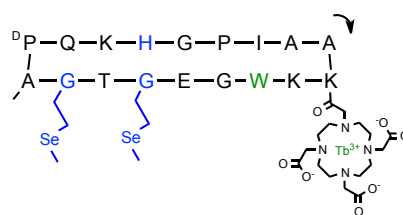


Fig. 3.15 : Séquence du peptide **CC9(2*SeM)[Tb]**.

L’étude spectroscopique du peptide **CC9(2*SeM)[Tb]** montre un déplacement bathochrome (3 nm) de la bande d’absorption UV-Visible correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du tryptophane et une extinction de la fluorescence légèrement plus importante que **CC9[Tb]** en présence de cuivre(I) (70%) et d’argent(I) (80%). Ce peptide forme l’interaction cation- π . Les spectres sont modifiés de manière linéaire jusqu’à un équivalent avant d’atteindre un plateau. Le peptide forme donc un complexe 1 : 1 avec le cuivre(I) et l’argent(I). La luminescence du terbium augmente en présence de métal. Les augmentations déterminées pour le cuivre(I) et l’argent(I) aux deux longueurs d’onde sont quasiment de même intensité que pour le peptide **CC9[Tb]** (fig.3.16). Enfin les constantes d’affinité de **CC9(2*SeM)[Tb]** pour le cuivre(I) et l’argent(I), déterminées par compétition avec l’imidazole, sont quasiment identiques à celle du peptide **CC9[Tb]** (fig.3.16).

	CC9(2*SeM)[Tb]		CC9[Tb]	
	Cu ⁺	Ag ⁺	Cu ⁺	Ag ⁺
$\Delta\lambda$, nm	3	3	5	5
Extinction fluorescence, %	70	80	55	75
Émission Tb ^{III} $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm	6	6	6	6
Émission Tb ^{III} $\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm	62	57	58	52
K_{aff}	10^{10}	10^7	$10^{9,4}$	$10^{7,3}$

Fig. 3.16 : Comparaison des propriétés spectroscopiques et des affinités des peptides **CC9(2*SeM)[Tb]** et **CC9[Tb]** avec le cuivre(I) et l’argent(I).

En conclusion, la mutation des deux méthionines en sélénométhionines n’a pas permis de modifier l’affinité du peptide pour l’argent(I), ni pour le cuivre(I).

3.2.3 Discussion sur la modification de la séquence du peptide

Huit peptides ont été synthétisés avant le peptide **CC9[Tb]**. Ces peptides ont permis de montrer qu’une possibilité pour éviter la formation d’espèces polymériques et d’utiliser des peptides cycliques. Parmi les dipeptides testés pour cycliser le peptide et induire la formation des feuilletts β , c’est la séquence Aib-^DPro qui a été retenue, car elle favorise la conformation

Trp(lié) lorsque le métal est lié par le peptide. Enfin, deux positions ont été testées pour le DOTA permettant de complexer le terbium. La première position choisie dans un premier temps pour perturber au minimum la structure du peptide est loin du tryptophane dans la séquence peptidique et dans l'espace. La position du terbium dans le peptide CC9[Tb] est plus proche du tryptophane dans la séquence peptidique mais aussi dans l'espace, ce qui permet d'augmenter le transfert d'énergie du tryptophane vers le terbium.

Lorsque le peptide CC9[Tb] lie le métal, un minimum de deux conformations sont en équilibre : $\text{Trp}(\text{lié}) \rightleftharpoons \text{Trp}(\text{libre})$. La conformation Trp(libre) a des caractéristiques proches de celle du peptide libre. Elle est principalement fluorescente et peu luminescente. Pour améliorer le contraste de la sonde il faut déplacer l'équilibre vers la formation de la conformation Trp(lié). Dans la structure de la protéine CusF, la chaîne peptidique forme un coude pour amener le tryptophane au-dessus du plan des trois autres acides aminés liant le métal. Deux prolines se situent à la base de ce coude, il est possible que leur position soit importante pour aider au repliement de la chaîne peptidique. Dans la séquence de protéines homologues de CusF, ces prolines ne sont pas toujours au même endroit dans la séquence. Nous avons donc testé deux autres séquences, inspirées de protéines homologues de CusF, pour lesquelles la position des prolines a été modifiée.

Pour ces trois peptides, la complexation du métal entraîne une extinction de la fluorescence et une augmentation de l'émission du terbium. Ces trois peptides sont des sondes qui s'allument en présence de cuivre(I) ou d'argent(I). Le peptide CC11[Tb], dont la séquence comporte une proline et un glycine, est le moins performant des trois peptides à tous points de vue. Le peptide CC10[Tb] est celui qui favorise le plus l'interaction cation- π , d'après l'extinction de la fluorescence, et qui a la plus forte affinité pour le cuivre(I) et l'argent(I). Cependant c'est le peptide CC9[Tb], qui présente le meilleur contraste dans l'émission du terbium.

Après avoir modifié les acides aminés de la séquence aidant le peptide à se replier, nous avons muté les acides aminés directement liés au métal dans le but d'augmenter l'affinité du peptide pour le cuivre(I) ou l'argent(I). Une méthionine a été mutée en homocystéine pour augmenter l'affinité pour le cuivre(I). Le peptide réagit avec un excès de cuivre(I) pour donner au minimum une autre espèce non identifiée. L'affinité de ce peptide pour le cuivre(I) n'a donc pas pu être déterminé. Une autre possibilité pour augmenter l'affinité du peptide pour le cuivre(I) est de muter l'autre méthionine. Pour augmenter l'affinité du peptide pour l'argent(I), les deux méthionines ont été mutées en sélénométhionines. Le peptide obtenu a des propriétés très similaires au peptide CC9[Tb]. Ces mutations n'ont pas permis d'augmenter l'affinité ni pour l'argent(I) ni pour le cuivre(I).

Toutes les mutations effectuées n'ont pas forcément permis d'améliorer le peptide, cependant tous les peptides forment l'interaction cation- π . Il est donc possible de modifier les acides aminés liés ou non au métal sans altérer le fonctionnement de la sonde. Le principe de la sonde est robuste. De plus, les peptides étudiés peuvent avoir un intérêt synthétique. Par exemple, dans la synthèse du peptide CC10[Tb], le dernier acide aminé ajouté est l'antenne. Ce peptide permet donc de tester facilement plusieurs antennes (cf §3.3).

3.3 Modification de l'antenne

Idéalement, une sonde devrait émettre dans la fenêtre de diagnostique, c'est-à-dire dans le proche infrarouge. Il nous faut donc trouver une antenne permettant de sensibiliser un lanthanide qui émet dans le proche infrarouge (ytterbium, néodyme, erbium). Ces antennes sont des aromatiques dont la topologie est différente de celle du tryptophane. Pour que la sonde fonctionne dans le proche infrarouge il faut donc trouver une antenne capable de sensibiliser un lanthanide proche infrarouge et qui forme l'interaction cation- π avec le cuivre(I).

Les objectifs du changement d'antenne sont 1) déterminer si le mécanisme spectroscopique permettant d'allumer la sonde CC9[Tb] est transposable à d'autres antennes, 2) définir des topologies d'acide aminés antenne, 3) de trouver de nouvelles antennes capables de sensibiliser un lanthanide émettant dans le proche infrarouge.

Les rendements quantiques observés pour des complexes d'erbium sont souvent plus faibles que ceux obtenus avec l'ytterbium et le néodyme^[153]. Nous avons donc testé uniquement la sensibilisation de l'ytterbium et du néodyme par les différentes antennes. L'état $^2F_{5/2}$ de l'ytterbium est situé $\sim 10\,000\text{ cm}^{-1}$ et l'état $^4F_{3/2}$ du néodyme est à $\sim 11\,500\text{ cm}^{-1}$. Pour qu'une antenne sensibilise ces lanthanides il faut que l'état excité de l'antenne permettant de transférer au lanthanide soit plus énergétique que l'état excité des lanthanides.

Nous avons donc testé trois antennes potentielles pour sensibiliser des lanthanides émettant dans le proche infrarouge : deux azulènes et un benzofurazane (noté NBD=7-nitrobenzofurazane) (fig.3.19).

Un azulène portant un groupement hydroxyle et deux groupements esters (fig.3.18) est connu pour bien sensibiliser les lanthanides proche infrarouge^[154]. Les deux azulènes testés n'ont jamais été décrits comme antenne dans la littérature. L'état triplet de l'azulène est situé à $\sim 13\,600\text{ cm}^{-1}$ lorsqu'il n'est pas substitué^[155]. Il est donc quelques milliers de cm^{-1} au-dessus de l'état $^2F_{5/2}$ de l'ytterbium et de l'état $^4F_{3/2}$ du néodyme.

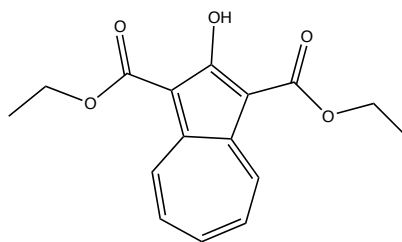


Fig. 3.18 : Structure de l'azulène utilisé par l'équipe de S.Petoud pour sensibiliser les lanthanides proche infrarouge^[154].

L'état triplet du NBD est à $17\,850\text{ cm}^{-1}$ dans le cyclohexane^[156], c'est-à-dire au-dessus de l'état $^4F_{3/2}$ du néodyme et $^2F_{5/2}$ de l'ytterbium. Le NBD testé est



Fig. 3.17 : Diagramme partiel des niveaux d'énergie de l'ytterbium et le néodyme^[66].

substitué par un groupement nitro. Ce type de NBD est utilisé dans la conception de sondes fluorescentes^[157–159], mais jamais comme antenne pour sensibiliser des lanthanides.

En plus des peptides portant une de ces trois antennes potentielles, deux autres peptides ont été synthétisés avec un naphthalène ou un anthracène. Le naphthalène et l'anthracène sont des antennes connues pour sensibiliser respectivement l'euprium^[149,160–162], et les lanthanides proche infrarouge^[150,163,164]. Les antennes de tous ces peptides ont des géométries variées : 2 ou 3 cycles, nombre d'atome d'un cycle, nature des atomes. La présence ou non de l'interaction cation- π dans les différents peptides nous renseignera sur la géométrie de l'antenne capable de former cette interaction.

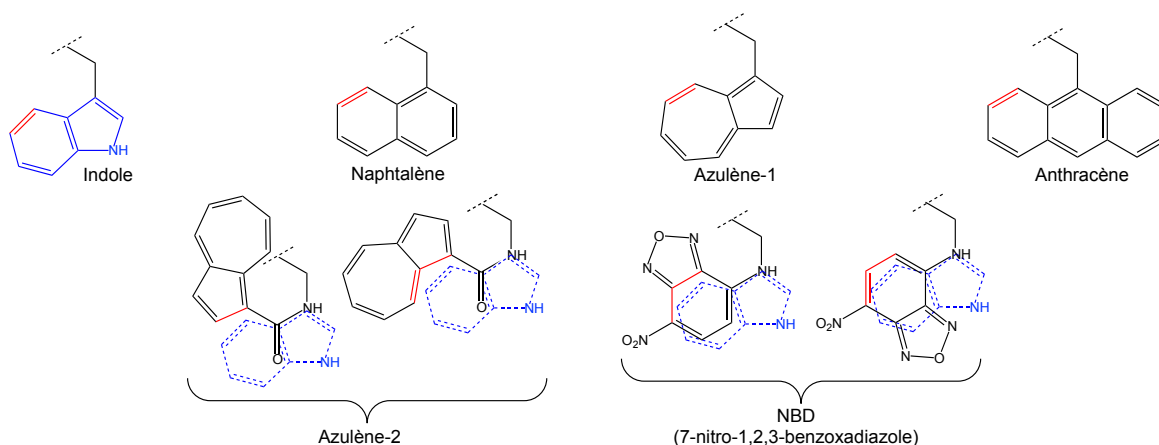


Fig. 3.19 : Structure des différentes antennes testées. En rouge : position de l'interaction cation- π dans le cas de l'indole du tryptophane, et position supposée de l'interaction cation- π pour les autres antennes.

Enfin, l'étude spectroscopique détaillée du peptide avec le naphthalène permettra de déterminer si le mécanisme spectroscopique de la sonde **CC9[Tb]** est transposable à une autre antenne. L'étude de ce peptide émettant dans le visible étant différente de celle des peptides émettant dans le proche infrarouge, elle est traitée à part (§3.4).

3.3.1 Synthèse

Les peptides synthétisés sont basés sur la séquence de **CC10[Tb]** et non de **CC9[Tb]** (fig.3.20). Le peptide **CC10[Tb]** reproduit l'interaction cation- π , et il a des propriétés spectroscopiques semblables à **CC9[Tb]** (cf §3.1.2). Dans la séquence de ce peptide **CC10[Tb]**, l'antenne est le dernier acide aminé ajouté. La synthèse de ces peptides aux antennes variées est identique à celle de **CC10[Tb]**, sauf le couplage du dernier acide aminé portant l'antenne (fig.3.20).

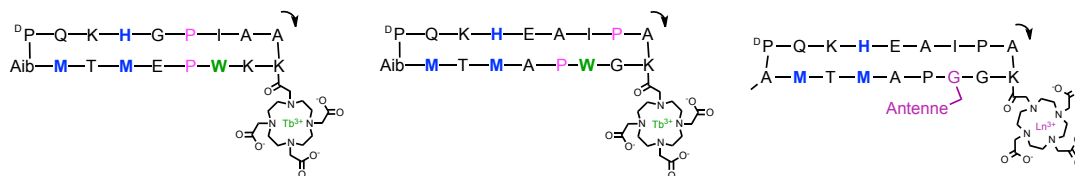


Fig. 3.20 : Séquences des peptides **CC9[Tb]**, **CC10[Tb]**, et des peptides **CC10(antenne)[Ln]**.

Les acides aminés non naturels Fmoc-3-(1-naphthyl)-L-alanine, Fmoc-3-(9-anthryl)-L-alanine, et Fmoc-3-(1-azulyl)-L-alanine sont commerciaux. En revanche, pour l'azulène-2 et le NBD, les acides aminés ont été synthétisés par O.Sénèque (fig.3.22). Les deux acides aminés sont synthétisés sur résine chlorotrityle. L'acide aminé Fmoc-Dap(alloc)-OH (chaîne latérale CH_2NH_2 , fig.3.21) est couplé à la résine,

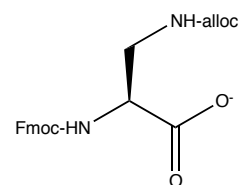


Fig. 3.21 : Fmoc-Dap(alloc)-OH

puis le groupement alloc est déprotégé par du palladium(0). L'acide (1-azulenyl)-carboxylique est greffé par couplage peptidique avec l'amine de la chaîne latérale de l'acide aminé H_2N -Dap-OH. L'antenne NBD est introduite par substitution nucléophile aromatique du chlore du NBD-Cl (4-chloro-7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazole) par l'amine de la chaîne latérale de l'acide aminé H_2N -Dap-OH^[165].

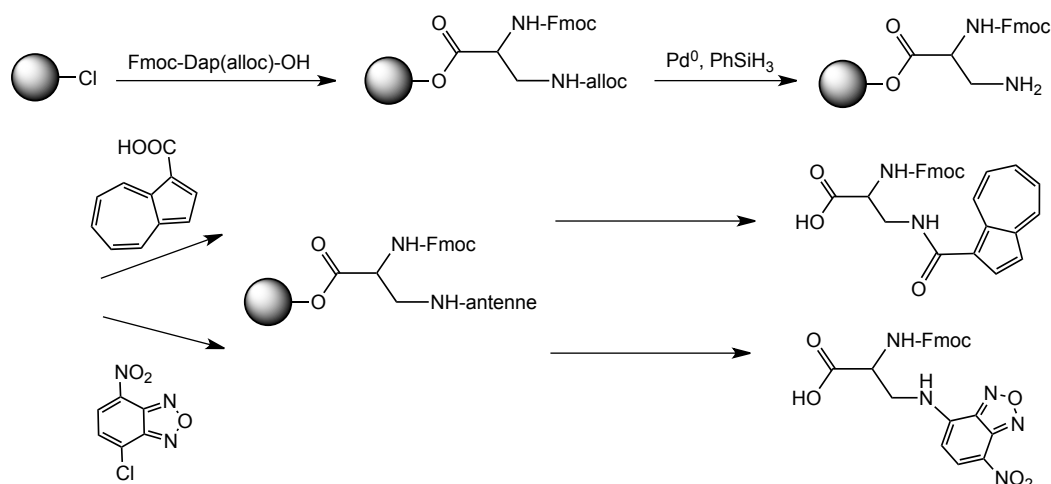


Fig. 3.22 : Synthèse des acides aminés non naturels avec l'azulène-2 et le NBD en chaîne latérale.

Les peptides ont été synthétisés. Les peptides obtenus en plus grande quantité (CC10(azulène-2) et CC10(NBD)) ont été métallés avec du néodyme ou de l'ytterbium. Les peptides obtenus en plus faible quantité (CC10(azulène-1) et CC10(anthracène)) n'ont été métallés qu'avec du néodyme. Tous les peptides ont été caractérisés en spectrométrie de masse et leur pureté est contrôlée par HPLC analytique.

Dans un premier temps, les peptides ont été caractérisés en absorbance et en fluorescence avant d'être étudiés dans le proche infrarouge. Cependant les spectres d'absorption et de fluorescence sont présentés et discutés plus tard (fig.3.27).

3.3.2 Sensibilisation des lanthanides proche infrarouge

La détection de rayonnements proche infrarouge nécessite l'utilisation de détecteurs spécifiques, nous n'en disposons pas au laboratoire. Toutes les études proche infrarouge sont donc réalisées en collaboration avec S.Petoud et S.Eliseeva du Centre de Biophysique moléculaire d'Orléans, ou bien avec D.Imbert de l'iNAC à Grenoble. Pour des raisons pratiques la luminescence des peptides a été enregistrée à l'air. C'est donc de l'argent(I) qui a été ajouté pour tester les sondes à la place du cuivre(I).

Pour chaque peptide, la luminescence de l'ytterbium ou du néodyme est recherchée, puis un spectre d'excitation est enregistré afin de déterminer si l'émission observée est due à

l'excitation directe du lanthanide ou à un transfert d'énergie depuis l'antenne. Pour les peptides avec les antennes azulène-2 et NBD et métallé avec de l'ytterbium, l'émission de l'ytterbium n'a pas été détectée. Ces deux antennes ne permettent pas de sensibiliser l'ytterbium, qui est pourtant le lanthanide émettant dans le proche infrarouge pour lequel les rendements quantiques sont les plus importants, car l'écart énergétique entre l'état excité et l'état fondamental est le plus important ($\sim 10\,000\text{ cm}^{-1}$) contre $\sim 6500\text{ cm}^{-1}$ pour l'erbium et $\sim 5500\text{ cm}^{-1}$ pour le néodyme^[166]. L'ytterbium est donc moins sujet aux désexcitations non radiatives que le néodyme ou l'erbium.

L'émission du néodyme n'est pas observée non plus pour le peptide avec l'azulène-1. Pour le peptide avec l'azulène-2, l'émission du néodyme est très faible (fig.3.23). Le spectre d'excitation présente une bande vers 370 nm qui pourrait correspondre à l'absorption de l'azulène-2 (fig.3.27). Cependant dans le spectre d'excitation d'autres bandes fines sont présentes et ne correspondent pas à l'azulène-2 mais à l'excitation directe du néodyme. L'azulène-2, comme l'azulène-1 ne sensibilise ni l'ytterbium, ni le néodyme.

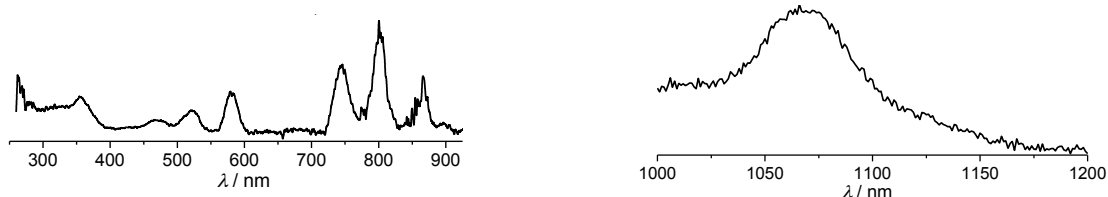


Fig. 3.23 : Spectres d'excitation ($\lambda_{\text{em}} = 1064\text{ nm}$) et d'émission ($\lambda_{\text{ex}} = 350\text{ nm}$) du peptide CC(azulène-2) avec et sans argent(I), réalisés par S.Eliseeva. CC(azulène-2)[Nd] 500 μM , HEPES pH 7,5 100 mM, 1,5 éq AgClO_4 . Fentes 14-40, temps d'intégration 0,2 s

Avec le NBD, l'émission du néodyme est plus intense (fig.3.25) et le spectre d'excitation présente deux bandes larges à 340 nm et 470 nm qui correspondent au spectre d'absorption du NBD (fig.3.27). Le NBD permet de sensibiliser le néodyme. Nous avons donc une nouvelle antenne permettant de sensibiliser un lanthanide proche infrarouge. Les rendements quantiques déterminés sont faibles (fig.3.24). Il s'agit de rendements quantiques partiels calculés sur la transition ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$, les autres transitions (${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$, et ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$) sont trop faibles pour être détectées.

Métal	$\Phi_{\text{Nd}}^{\text{NBD}}$
-	$1,23 \pm 0,06 \cdot 10^{-5}$
Ag	$1,41 \pm 0,02 \cdot 10^{-5}$

Fig. 3.24 : Rendements quantiques partiels du peptide CC(NBD)[Nd] calculés sur la transition ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$. CC(NBD)[ND] 200 μM , HEPES pH 7,5 100 mM, AgClO_4 1,5 équivalents par rapport au peptide. $\lambda_{\text{ex}} = 475\text{ nm}$.

L'émission du néodyme est visible pour le peptide CC(anthracène)[Nd], et le spectre d'excitation correspond à l'absorption de l'anthracène (fig.3.26). L'anthracène sensibilise au moins le néodyme. L'anthracène est connu pour sensibiliser également l'ytterbium^[164], mais nous n'avons pas de peptide métallé à l'ytterbium pour le tester.

3.3.3 Formation de l'interaction cation- π

Les antennes testées ont des géométries variées, et les bras les reliant à la chaîne peptidique ne sont pas toujours les mêmes. La présence ou non de l'interaction cation- π avec les

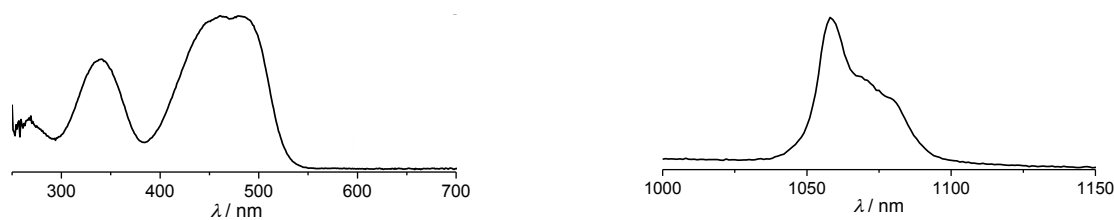


Fig. 3.25 : Spectres d'excitation ($\lambda_{em} = 1064$ nm) et d'émission ($\lambda_{ex} = 475$ nm) du peptide CC(NBD) avec et sans argent(I), réalisés par S.Eliseeva. CC(NBD)[Nd] 200 μ M, HEPES pH 7,5 100 mM, 1,5 μ g AgClO₄. Fentes 14-3, temps d'intégration 200 μ s

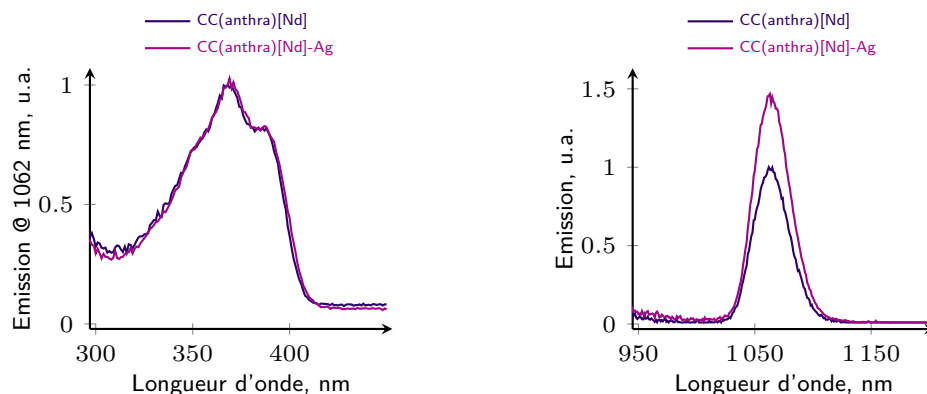


Fig. 3.26 : Spectres d'excitation (à gauche, $\lambda_{em} = 1062$ nm) et d'émission (à droite, $\lambda_{ex} = 370$ nm) du peptide CC(anthracène)[Nd] avec et sans argent(I), enregistrés avec D.Imbert. CC(anthracène)[Nd] 50 μ M, HEPES pH 7,5 10 mM. Ajout AgClO₄ 75 μ M. Fentes 14-32 (excitation) et 32-14 (émission).

différentes antennes, nous renseigne sur la topologie de l'acide aminé permettant de former cette interaction.

Le peptide avec le naphthalène forme l'interaction cation- π , comme nous le verrons plus loin (cf §3.4.2). Pour les deux azulènes (fig.3.27), on observe une légère modification du spectre d'absorption en présence de métal et une extinction (50% pour l'azulène-1 et 10% pour l'azulène-2). La modification du spectre d'absorption n'est pas très importante. Les azulènes ne sensibilisent pas le néodyme. Il n'est donc pas possible d'enregistrer les spectres d'excitation du lanthanide qui auraient pu fournir des éléments supplémentaires sur le déplacement, ou non, de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ des azulènes. Cependant, la légère modification du spectre d'absorption et l'extinction de la fluorescence semblent suggérer la présence de l'interaction cation- π .

Le spectre d'absorption du peptide portant l'antenne NBD est modifié par la présence d'argent(I) (fig.3.27). La fluorescence du NBD est partiellement éteinte (20%) en présence d'argent(I). Cela suggère la présence de l'interaction cation- π .

Dans le cas de l'anthracène, le spectre d'absorption n'est pas modifié par la présence d'argent(I), mais la fluorescence est éteinte (25%). Le spectre d'excitation du néodyme (fig.3.26) confirme l'absence de modification de la bande liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$. L'interaction cation- π est absente dans le peptide CC(anthracène). L'extinction de la fluorescence serait alors due à la présence de l'argent(I) à proximité de l'anthracène, mais pas à la formation de l'interaction cation- π .

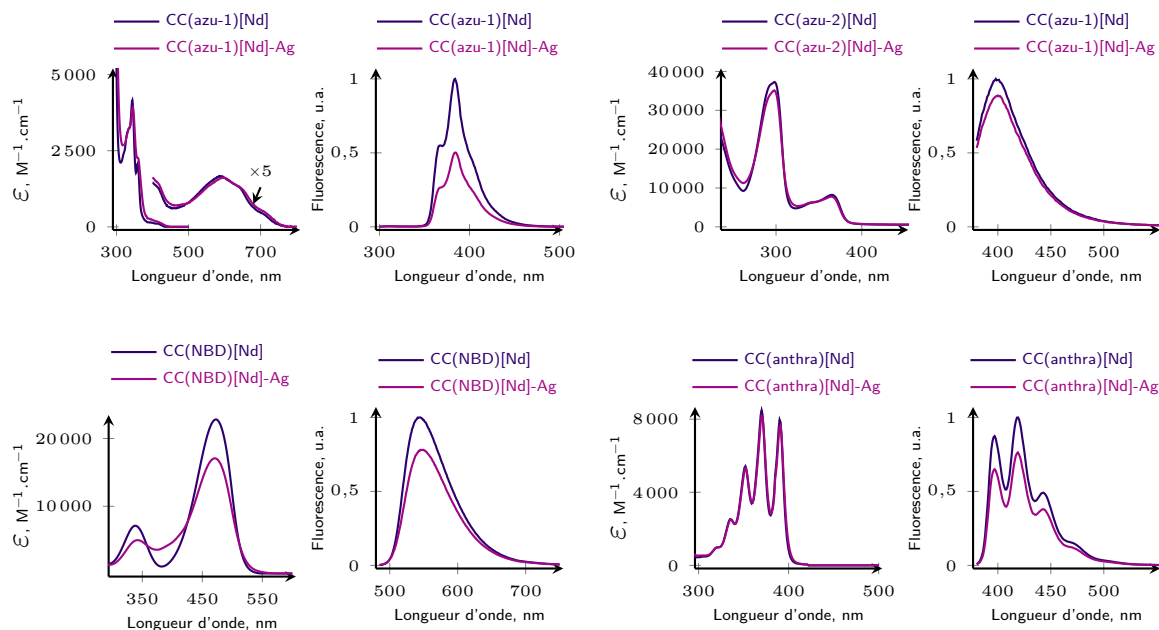


Fig. 3.27 : Spectres d'absorption électronique UV-Vis et de fluorescence des peptides CC(azulène-1)[Nd], CC(azulène-2)[Nd], CC(NBD)[Nd], et CC(anthracène)[Nd], avec et sans argent(I).

3.3.4 Discussion sur la modification des antennes

La sensibilisation de l'ytterbium et du néodyme par trois antennes potentielles a été étudiée. Les deux azulènes testés ne sensibilisent ni l'ytterbium, ni le néodyme. En revanche, le NBD ne sensibilise pas l'ytterbium mais sensibilise le néodyme (fig.3.29). Le NBD est donc une nouvelle antenne pour le néodyme, elle sera greffée sur un peptide à zinc (cf §5).

Les rendements quantiques de l'émission de la sonde sont de l'ordre 10^{-5} , ce qui est très faible. Les rendements quantiques pour des complexes en solution dans des solvants organiques sont souvent de l'ordre de 10^{-3} pour l'ytterbium et le néodyme^[166]. Quelques complexes récents ont des rendements quantiques beaucoup plus élevés, jusqu'à 12% pour un cryptate d'ytterbium décrit récemment^[167].

Pour le peptide avec le NBD, le néodyme est complexé par un DOTA. Le DOTA ne permet pas de saturer la sphère de coordination du néodyme, une molécule d'eau est présente dans la sphère de coordination du néodyme et de nombreuses liaisons C-H se trouvent à proximité. Les voies de désexcitations non radiatives sont donc nombreuses. Nous ne pouvons donc pas savoir si le faible rendement quantique est dû à un transfert d'énergie faible depuis le NBD ou une forte proportion de désexcitations non radiatives. Pour déterminer l'efficacité du transfert d'énergie, un moyen serait d'étudier des peptides sans néodyme comme cela a été fait pour CC9[Tb].

Afin d'obtenir un rendement quantique plus important sans changer d'antenne, il faudrait utiliser un chélate permettant de saturer la sphère de coordination du lanthanide, ou diminuer le temps de vie intrinsèque du lanthanide pour que les désexcitations non radiatives deviennent moins compétitives.

Ces peptides avec de nouvelles antennes ont également permis de déterminer quelles antennes sont capables de former l'interaction cation- π . Le naphthalène, l'azulène-1, probablement l'azulène-2, et le NBD semble capable de former cette interaction, même si les effets sur le déplacement de la bande d'absorption et l'extinction de la fluorescence sont parfois faibles. L'anthracène ne semble pas former l'interaction cation- π . La topologie du naphthalène et de l'azulène-1 est très proche de celle du tryptophane. L'azulène-2 et le NBD ont des topologies plus éloignées du tryptophane. Ces deux antennes sont plus volumineuses que le tryptophane dans les directions ① et ② (fig.3.28). Il est donc possible de concevoir des antennes qui s'étendent dans ces directions. À l'inverse l'anthracène ne forme pas l'interaction cation- π , l'encombrement stérique lié au troisième cycle aromatique dans la direction ③ empêche probablement l'antenne de se positionner correctement pour former l'interaction cation- π . Il est donc préférable d'éviter de concevoir des antennes qui s'étendraient du côté du troisième cycle de l'anthracène (fig.3.28).

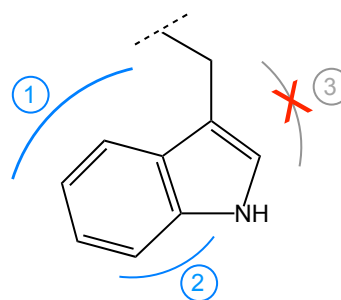


Fig. 3.28 : Structure du tryptophane. En bleu : directions où il est possible d'étendre l'antenne en gardant l'interaction cation- π . En gris : direction où l'extension de l'antenne a empêché la formation de l'interaction cation- π .

Antennes	Naphtalène	Azulène-1	Azulène-2	NBD	Anthracène
Interaction cation- π	oui	oui	possible	oui	non
Sensibilisation Yb ^{III}	-	-	non	non	-
Sensibilisation Nd ^{III}	-	non	non	oui	oui

Fig. 3.29 : Présence de l'interaction cation- π et sensibilisation des lanthanides pour les différentes antennes testées.

Sur la structure de la protéine (fig.3.30), l'intérieur de la protéine (l'isoleucine et la proline dans notre peptide) est dans la direction ①, le solvant est dans la direction ②, et la direction ③ pointe vers la chaîne peptidique.

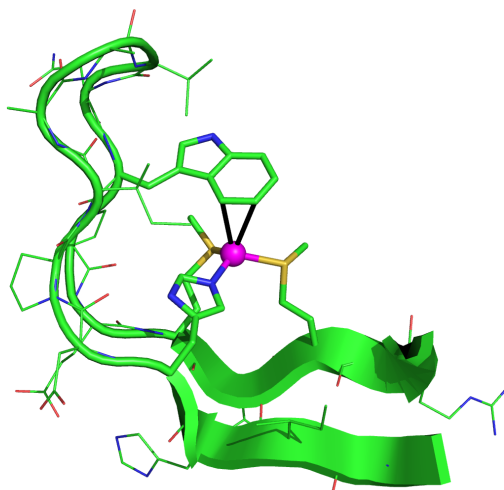


Fig. 3.30 : Structure du site de liaison du cuivre(I) de CusF.

La présence du deuxième feuillet de la boucle dans la direction ① limite les possibilités d'extension de l'antenne dans cette direction. En effet, l'azulène-2 pointerait dans cette direction, or nous ne sommes pas complètement sûr qu'il forme l'interaction cation- π . L'azulène-2 est probablement à la limite de l'encombrement stérique possible dans cette direction. La présence de la chaîne peptidique à laquelle le tryptophane est rattaché dans la direction ③ empêche l'extension de l'antenne dans cette direction, comme pour l'anthracène. Enfin, la direction ② est celle du solvant. Il semble possible d'étendre l'antenne dans cette direction.

Cette étude de la topologie des antennes est basée sur des comparaisons en deux dimensions entre antennes, car nous n'avons pas la structure des peptides avec les différentes antennes. Il est possible que l'arrangement tridimensionnel des acides aminés non naturel soit différent de ce qui est représenté en deux dimensions. Une possibilité pour mieux comprendre l'orientation de l'antenne en trois dimensions serait d'effectuer de la modélisation moléculaire. Les peptides étant des objets de taille conséquente, il faudrait les modéliser par des méthodes hybrides, c'est-à-dire décrire les acides aminés liés au métal par des méthodes quantiques et le reste du peptide par de la mécanique moléculaire.

3.4 Cas de l'antenne naphtalène

Pour tester s'il est possible de faire l'interaction cation- π avec un autre acide aminé que le tryptophane nous avons testé dans un premier temps l'acide aminé non naturel H₂N-Ala(Nap)-OH dont la topologie est très proche de celle du tryptophane : deux cycles de six atomes au lieu d'un cycle à six et d'un cycle à cinq. Le naphthalène, dont l'état triplet est à 22 000 cm⁻¹^[155], est connu pour sensibiliser l'euporium^[149,160-162].

Trois niveaux excités de l'euporium sont proches en énergie de l'état triplet du naphthalène : le ⁵D₂, le ⁵D₁, et le ⁵D₀ (fig.3.31). Les états ⁵D₁, et ⁵D₂ se désexcitent rapidement et de manière non radiative vers l'état ⁵D₀, qui est l'état émissif. Cette désexcitation est autorisée, elle est donc rapide ce qui limite le transfert retour de l'euporium vers l'antenne.

Expérimentalement, pour des chélates de type polyaminocarboxylate, les rendements quantiques les plus élevés sont obtenus, entre autre, lorsque l'état triplet de l'antenne est proche en énergie que l'état ⁵D₂ de l'euporium^[78].

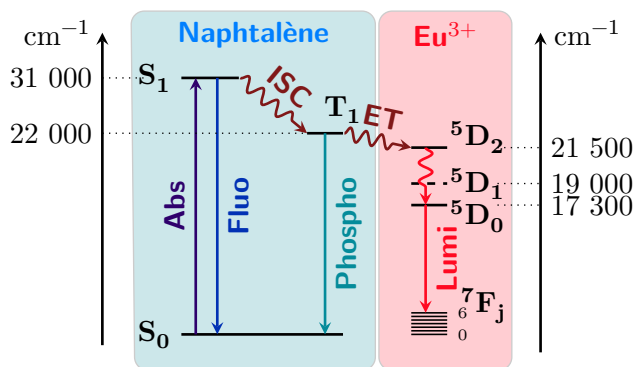


Fig. 3.31 : Digramme de Jablonski du couple naphthalène euporium.

3.4.1 Complexation du cuivre(I)

Pour pouvoir étudier le peptide en présence de cuivre(I) et d'argent(I), toutes les expériences ont été effectuées à l'abri du dioxygène (boîte à gants) contrairement à l'étude des autres antennes.

La complexation du cuivre(I) et de l'argent(I) par le peptide CC10(Nap)[Eu] a été étudiée par dichroïsme circulaire. Le spectre de dichroïsme circulaire du peptide libre est différent de celui du peptide CC9[Tb]. Il présente plusieurs minima (198 nm, 216 nm, 236 nm) et maxima locaux (209 nm, 228 nm), et le signal à 200 nm est moins négatif que pour le peptide CC9[Tb]. Tout cela suggère que le peptide CC10(Nap)[Eu] est plus structuré que le peptide CC9[Tb]. Cependant le peptide est encore trop flexible pour pouvoir déterminer sa structure par RMN.

L'ajout de cuivre(I) ou d'argent(I) entraîne une modification du spectre de dichroïsme circulaire (fig.3.32) jusqu'à un équivalent. Au delà, le spectre est inchangé par l'ajout de métal. Le peptide forme donc bien un complexe 1 :1 avec le cuivre(I) et l'argent(I), comme le peptide CC9[Tb]. On peut observer vers 280 nm une légère augmentation du dichroïsme circulaire. Ce signal est lié à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du naphthalène. Sur les spectres du peptide CC9[Tb], cette bande est également présente mais elle est moins intense. Le fait que cette transition soit visible sur le spectre de dichroïsme circulaire indique que le naphthalène est dans un environnement chiral bien défini. Ceci suggère la formation de l'interaction cation- π semble présente entre le naphthalène et le cuivre(I) ou l'argent(I).

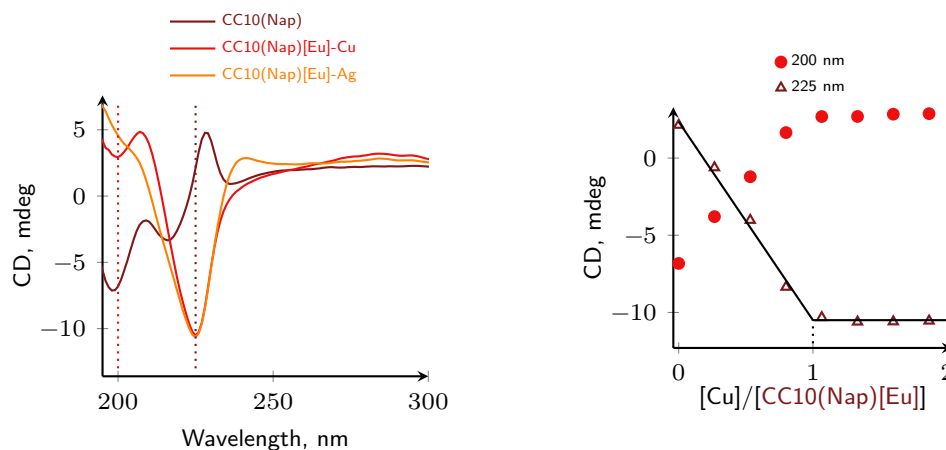


Fig. 3.32 : Titrage du peptide CC10(Nap)[Eu] par du cuivre(I) ou de l'argent (I) suivi par dichroïsme circulaire. CC10(Nap)[Eu] $15\ \mu\text{M}$, Phosphate pH 7,5 $20\ \text{mM}$, NH_2OH $2\ \text{mM}$. Ajouts de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$ ou $\text{Ag}^{\text{I}}\text{ClO}_4$.

3.4.2 Interaction cation- π

Le titrage du peptide CC10(Nap)[Eu] par du cuivre(I) ou de l'argent(I) montre une légère modification de la bande d'absorption et une extinction de la fluorescence importante, aussi bien avec le cuivre(I) qu'avec l'argent(I) (fig.3.33). Le déplacement de la bande d'absorption liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (2 nm) est plus faible que pour CC9[Tb] (5 nm). L'extinction de la fluorescence est du même ordre de grandeur que pour le peptide CC9[Tb] . Cependant l'extinction est plus importante avec le cuivre(I) (70%) qu'avec l'argent(I) (60%), alors que c'est l'inverse pour CC9[Tb] .

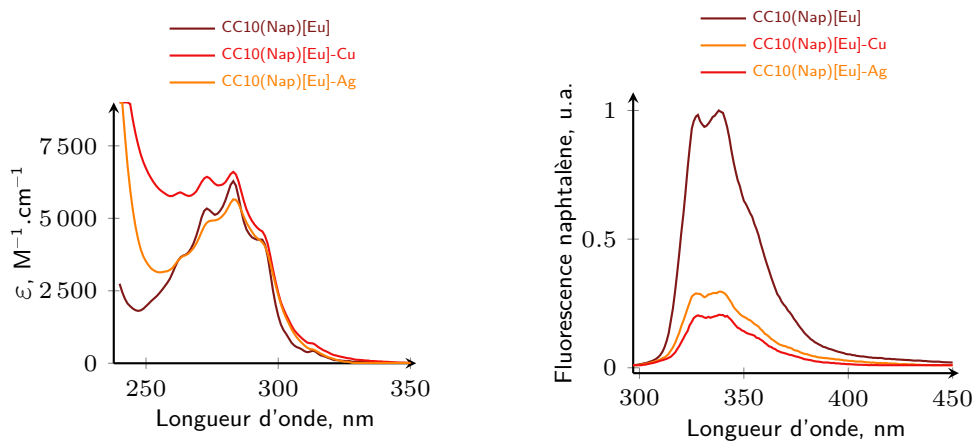


Fig. 3.33 : Spectres d'absorption (à gauche) de fluorescence (à droite) du peptide CC10(Nap)[Eu] , en présence de cuivre(I) ou d'argent(I). CC10(Nap)[Eu] $25\ \mu\text{M}$, HEPES pH 7,5 $10\ \text{mM}$, NH_2OH $2\ \text{mM}$ (dans le cas du cuivre(I)). Ajouts AgClO_4 ou CuSO_4 $50\ \mu\text{M}$ (2 équivalents par rapport au peptide).

L'interaction cation- π semble donc bien présente dans le peptide CC10(Nap)[Eu] entre le métal et le naphthalène. Néanmoins les effets de cette interaction ne sont pas complètement semblables à ce qui est observé pour CC9[Tb] . Ces différences peuvent être dues au naphthalène, ou bien au squelette peptidique. En effet, le peptide CC10(Nap)[Eu] est basé sur la séquence

de **CC10[Tb]**, qui n'a pas les mêmes propriétés que **CC9[Tb]**.

	CC9[Tb]			CC10(Nap)[Eu]		
	-	Cu ⁺	Ag ⁺	-	Cu ⁺	Ag ⁺
$\Delta\lambda$, nm	-	5	5	-	2	1-2
Extinction fluo, $\pm 0,5\%$	-	55	75	-	80	70
Φ_{fluo} , $\pm 0,5\%$	8,4	3,5	2,0	2,8	1,2	0,4

Fig. 3.34 : Comparaison des propriétés des peptide **CC9[Tb]** et **CC10(Nap)[Eu]**.

3.4.3 Émission de l'euporium

Le spectre d'émission en temps résolu de l'euporium pour le peptide **CC10(Nap)[Eu]** seul, en présence de cuivre(I) ou d'argent(I) sont représentés sur la figure 3.35. La présence d'argent(I) induit une augmentation de la luminescence de l'euporium ($\times 3$), alors que le cuivre(I) provoque une diminution de la luminescence de l'euporium ($/2$). Le peptide **CC10(Nap)[Eu]** est une sonde qui s'éteint en présence de cuivre(I) et qui s'allume en présence d'argent(I). Le peptide **CC10(Nap)[Eu]** est capable de discriminer entre Cu⁺ et Ag⁺, ce qui est rare car ces deux ions ont des propriétés chimiques proches. Parmi les sondes à cuivre(I) et à argent(I) certaines sont peut-être sélectives de l'un de cation, curieusement il est très rare que la réponse des sondes pour ces deux cations soit étudiée. L'argent(I) n'étant pas physiologique les sondes conçues pour détecter le cuivre(I) ne sont pas étudiées en présence d'argent(I). Et même si des métaux physiologiques sont testés, l'argent(I) n'en fait pas parti^[168]. La réponse des sondes conçues pour détecter l'argent(I) est souvent testée en présence de cuivre mais au degré d'oxydation +II. Le cuivre, même au degré d'oxydation +II, interfère souvent dans la réponse des sondes à argent(I)^[169]. Le peptide **CC10(Nap)[Eu]** est probablement une des rares sondes spécifiques à l'argent(I) .

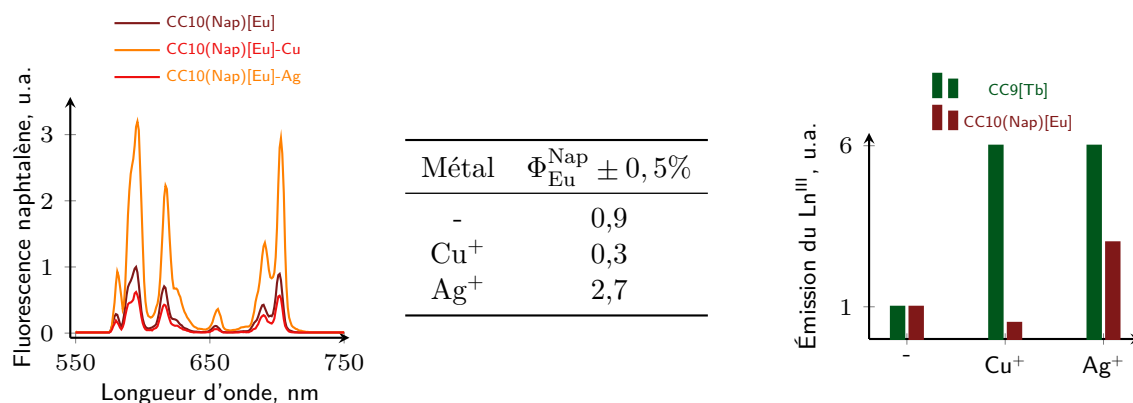


Fig. 3.35 : (À gauche) Spectres de luminescence en temps résolu du peptide **CC10(Nap)[Eu]** seul, en présence de cuivre(I) ou d'argent(I) et (au milieu) rendements quantiques de l'euporium associés mesuré par S.Denisov par méthode comparative. (À droite) Comparaison des variations de la luminescence des peptides **CC10(Nap)[Eu]** et **CC9[Tb]** seuls, en présence de cuivre(I) ou d'argent(I). Pour les spectres **CC10(Nap)[Eu]** 5 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, NH₂OH 2 mM (uniquement pour titrage au cuivre(I)). Ajouts AgClO₄ ou CuSO₄.

Le comportement en luminescence de ce peptide est différent du peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$, qui s'allumait aussi bien en présence de cuivre(I) que d'argent(I). Le peptide $\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]$ lie le cuivre(I) et l'argent(I) (fig.3.32), la différence de comportement observée n'est donc pas dû à une différence de complexation, mais à une différence dans le mécanisme spectroscopique.

3.4.3.1 Constantes d'affinité

Les constantes de complexation du cuivre(I) et de l'argent(I) par le peptide $\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]$ ont été déterminées, de la même manière que pour $\text{CC9}[\text{Tb}]$, par des titrages en compétition avec l'imidazole. Les titrages sont ajustés à l'aide du logiciel *Specfit*. L'affinité du peptide $\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]$ pour le cuivre(I) et l'argent(I) est plus forte que celle de $\text{CC9}[\text{Tb}]$ (fig.3.36). Cela est peut-être dû en partie à la structure du peptide, car l'affinité du peptide $\text{CC10}[\text{Tb}]$ pour le cuivre(I) et l'argent(I) sont également légèrement plus élevées que celle de $\text{CC9}[\text{Tb}]$. Cependant l'affinité du peptide $\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]$ est un ordre de grandeur plus importante que celle du peptide $\text{CC10}[\text{Tb}]$, le naphthalène doit contribuer également à augmenter l'affinité.

	Cu^+	Ag^+
$K_{\text{CC9}[\text{Tb}]}$	$10^{9,4}$	$10^{7,3}$
$K_{\text{CC10}[\text{Tb}]}$	$10^{10,2}$	$10^{8,0}$
$K_{\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]}$	$10^{11,5}$	10^8

Fig. 3.36 : Constantes d'affinité des peptides $\text{CC9}[\text{Tb}]$ et $\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]$ pour le cuivre(I) et l'argent(I), déterminées par compétition avec l'imidazole.

3.4.4 Mécanisme spectroscopique

Comme le peptide $\text{CC9}[\text{Tb}]$, le peptide $\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]$ a été étudié par S.Denisov de l'équipe de N.McClenaghan à trois échelles de temps différentes : la nanoseconde (déclin de la fluorescence du naphthalène), la microseconde (déclin de la phosphorescence du naphthalène et début de la luminescence de l'euporium), et la milliseconde (déclin de la luminescence du terbium).

3.4.4.1 Échelle de la nanoseconde

Le temps de vie de fluorescence du peptide libre est de 20 ns. Lorsque le peptide est lié à un métal, le déclin de la fluorescence est ajusté par une biexponentielle (fig.3.37). Or le déclin de fluorescence du naphthalène est monoexponentiel, contrairement au tryptophane. Les deux temps de vie suggèrent donc la présence de deux populations de naphthalènes différentes.

Métal	τ_{fluo}
-	20 ns
Cu^+	$\tau_1 = 7,6 \text{ ns } 39\%$, $\tau_2 = 21,5 \text{ ns } 61\%$
Ag^+	$\tau_1 = 10 \text{ ns } 17\%$, $\tau_2 = 23,5 \text{ ns } 83\%$

Fig. 3.37 : Temps de vie de fluorescence du peptide $\text{CC10}(\text{Nap})[\text{Eu}]$ seul, en présence de cuivre(I) ou d'argent(I) déterminé par S.Denisov.

En effet, comme pour le peptide **CC9[Tb]**, on observe que le spectre d'excitation de l'euporium est très légèrement déplacé en présence du métal, alors que le spectre d'excitation de la fluorescence ne l'est pas (fig.3.38). Le peptide lié au métal existe sous deux conformations en équilibre au minimum : la conformation où le naphthalène est lié au métal (**Nap(lié)**) et la conformation où le naphthalène est exposé au solvant comme dans le peptide libre (**Nap(libre)**). Ainsi en présence de métal, le temps de vie $\tau_2 \sim 20$ ns, proche du temps de vie observé pour le peptide libre, correspondrait à la population de naphthalènes libres. Le temps de vie $\tau_1 \sim 10$ ns correspondrait au naphthalène impliqué dans l'interaction cation- π . Le croisement intersystèmes est un phénomène qui dépeuple l'état S_1 . En présence de métal, le croisement intersystèmes est plus important (cf §3.4.4.2), c'est pourquoi le temps de vie de la fluorescence est plus faible. Si ce deuxième temps de vie correspond bien au naphthalène lié, cela signifie qu'il est fluorescent, contrairement au tryptophane du peptide **CC9[Tb]**. En effet, nous supposons que l'interaction cation- π éteint complètement la fluorescence du tryptophane lié au métal dans le peptide **CC9[Tb]**.

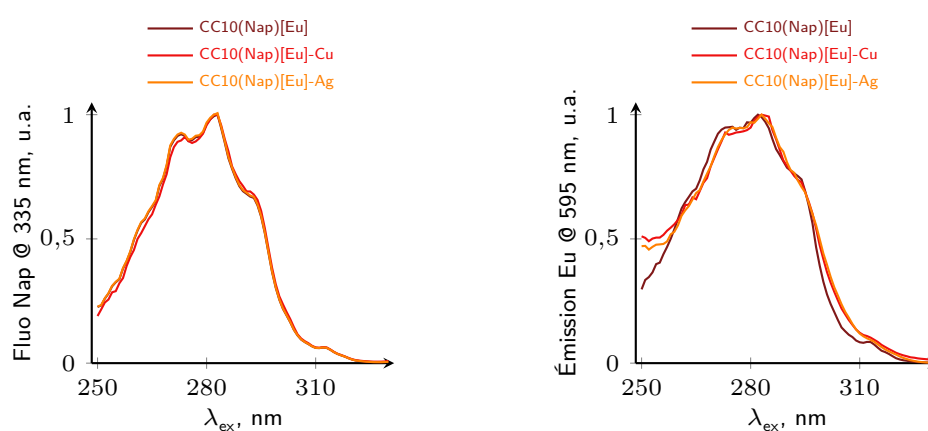


Fig. 3.38 : Spectres d'excitation de la fluorescence (à gauche, $\lambda_{em} = 330$ nm) et de l'émission de l'euporium (à droite, $\lambda_{em} = 595$ nm) pour le peptide **CC10(Nap)[Eu]** seul, en présence d'argent(I) ou de cuivre(I). **CC10(Nap)** 5 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, NH_2OH 2 mM (pour le cuivre uniquement). Ajouts AgClO_4 ou CuSO_4 . Fentes 5-5 (fluorescence), 5-10 (luminescence).

3.4.4.2 Échelle de la microseconde

De même que pour le peptide **CC9[Tb]**, la phosphorescence à température ambiante du naphthalène n'est pas détectable pour le peptide libre, mais uniquement en présence de métal (fig.3.41). L'état triplet est donc plus peuplé en présence de métal que dans le peptide libre. Comme pour le peptide **CC9[Tb]**, l'interaction cation- π augmente le croisement intersystèmes. L'interaction cation- π augmente l'efficacité du croisement intersystème. La phosphorescence du peptide **CC10(Nap)[Eu]** lié au cuivre(I) est déplacée de ~ 50 nm (~ 2000 cm^{-1}) vers le rouge par rapport à la phosphorescence du peptide lié à l'argent(I). L'état triplet du naphthalène isolé est à $22\,000$ cm^{-1} [155]. En prenant la longueur d'onde correspondant à une phosphorescence de 0,5, l'état triplet en présence d'argent(I) est à $20\,800$ cm^{-1} , et l'état triplet en présence de cuivre(I) est à $18\,900$ cm^{-1} . L'interaction cation- π abaisse donc l'état triplet du naphthalène de 1200 cm^{-1} avec l'argent(I) et 3100 cm^{-1} avec le cuivre(I). Cet abaissement de l'état triplet par l'interaction cation- π est donc plus important pour le naphthalène que pour l'indole du peptide **CC9[Tb]**(cf §2.6.2).

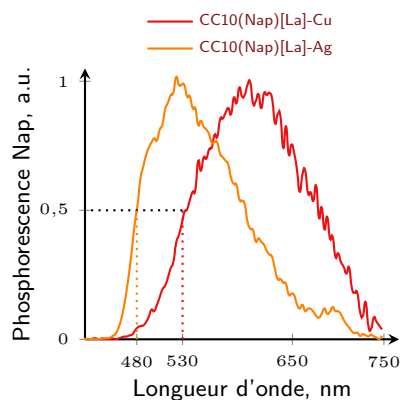


Fig. 3.39 : Phosphorescence du peptide CC10(Nap)[La] en présence d'argent(I) et de cuivre(I). CC10(Nap)[La] $90\ \mu\text{M}$, HEPES pH 7,5 $10\ \text{mM}$, NH_2OH $2\ \text{mM}$ (pour le cuivre seulement). $\lambda_{\text{ex}} = 280\ \text{nm}$, fentes 14-14.

CC10(Nap)[Eu]	-	Cu^+	Ag^+
$\tau_{\text{phospho}\downarrow} \pm 2\ \mu\text{s}$	-	23	45
$\tau_{\text{Eu}\uparrow} \pm 2\ \mu\text{s}$	52	23	42

Fig. 3.40 : Temps de vie de déclin de la phosphorescence du naphthalène et augmentation de la luminescence de l'euporium, déterminés par S.Denisov.

Les temps de vie de déclin de la phosphorescence et d'augmentation de la luminescence de l'euporium ont été déterminés par S.Denisov. Dans le cas du cuivre(I) et argent(I), ces deux temps de vie coïncident. Le transfert d'énergie du naphthalène vers l'euporium a bien lieu depuis l'état triplet du naphthalène.

Ces temps de vie ne sont pas les mêmes pour le peptide libre, le peptide en présence de cuivre(I), ou d'argent(I). Le temps de vie de phosphorescence du peptide libre ($52\ \mu\text{s}$) est plus long qu'en présence d'argent(I) ($45\ \mu\text{s}$) et de cuivre(I) ($23\ \mu\text{s}$). La présence de cuivre(I) diminue davantage le temps de vie que l'argent(I). Par ailleurs le cuivre(I) abaisse davantage l'état triplet du naphthalène que l'argent(I). Les effets de l'interaction cation- π sur la phosphorescence sont plus importants en présence de cuivre(I) qu'en présence d'argent(I). L'interaction cation- π favorise le croisement intersystème de l'état S_1 vers l'état T_1 du naphthalène, mais aussi de l'état T_1 vers l'état S_0 . Si le cuivre(I) favorise plus le croisement intersystème, il favorise aussi la désexcitation de l'état triplet T_1 . Il est donc possible que pour le cuivre(I) les désexcitations non radiatives soient plus importantes ce qui diminue le temps de vie de phosphorescence.

3.4.4.3 Échelle de la milliseconde

Le seul phénomène ayant lieu à l'échelle de la milliseconde est le déclin de la luminescence de l'euporium. Ce temps de vie est le même pour le peptide libre, en présence de cuivre(I), et en présence d'argent(I) : $0,6\ \text{ms}$. Ce temps de vie est en accord avec ce qui est observé pour l'euporium dans un ligand DOTA avec un bras amide^[170].

3.4.5 Discussion sur le peptide CC10(Nap)[Eu]

Le peptide CC10(Nap)[Eu] lie le cuivre(I) et l'argent(I) et forme l'interaction cation- π avec ces deux métaux. Il est donc possible de modifier l'acide aminé qui lie le métal par interaction cation- π , comme ce qui a été montré précédemment (cf §3.3.3). La luminescence du peptide augmente en présence d'argent(I) et diminue en présence de cuivre(I). Ce peptide est donc une sonde qui s'allume sélectivement en présence d'argent(I), ce qui est plutôt rare^[169]. Cependant comme la constante d'affinité du peptide est plus forte pour le cuivre(I)

que pour l'argent(I), cela peut gêner la détection de l'argent(I).

Pour comprendre pourquoi la sonde ne s'allume qu'en présence d'argent(I), nous avons étudié le mécanisme spectroscopique. Comme pour le peptide CC9[Tb], l'interaction cation- π abaisse l'état triplet du naphthalène. Cette baisse d'énergie est importante en présence de cuivre(I) qu'en présence d'argent(I). L'état triplet du naphthalène lié à l'argent(I) est situé $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$ en dessous de l'état 5D_2 de l'euprimum. En présence de cuivre(I), l'état triplet est situé au niveau de l'état 5D_1 , c'est-à-dire $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ en dessous de l'état 5D_2 .

L'état fondamental de l'euprimum est l'état 7F_0 . À température ambiante l'état 7F_1 est peuplé thermiquement à 35%^[171]. Pour des transitions de types dipolaires électrique, comme le transfert d'énergie par mécanisme Förster, les règles de sélection sont : $\Delta J = 0, 2, 4, 6$ sauf $0 \rightarrow 0$. Ainsi à partir de l'état 7F_0 , la transition vers l'état 5D_0 est interdite de même que la transition vers l'état 5D_1 . Seule la transition vers l'état 5D_2 est autorisée par un mécanisme dipolaire électrique. Cependant comme l'état 7F_1 est peuplé thermiquement, d'autres transitions sont possibles comme la transition $^7F_1 \rightarrow ^5D_1$, cependant ces transitions sont moins intenses. De plus, ces règles de sélection sont établies pour des atomes isolés. Lorsque les lanthanides sont complexés, les règles de sélection sont relaxées par le champ des ligands qui permet le mélange de fonctions d'onde de J différents. Ainsi il est possible d'observer des transitions « interdites », comme la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ dans les spectres d'émission de l'euprimum^[171].

Pour le peptide CC10(Nap)[Eu], étant donné que la luminescence de l'euprimum augmente en présence d'argent(I) et diminue en présence de cuivre(I), la position de l'état triplet en présence d'argent(I) doit être favorable au transfert d'énergie mais pas la position de l'état triplet en présence de cuivre(I). Ainsi dans notre système le transfert d'énergie le plus efficace est obtenu lorsque l'état triplet est à proximité de l'état 5D_2 de l'euprimum, ce qui est cohérent avec un mécanisme de type dipolaire (Förster).

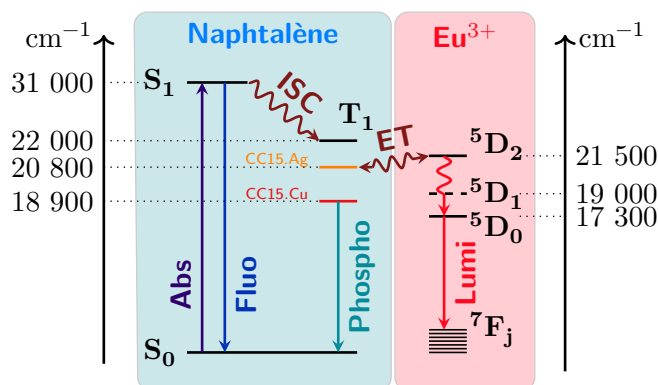


Fig. 3.41 : Diagramme de Jablonski du fonctionnement de la sonde CC10(Nap)[Eu]

3.5 Conclusion et perspectives

La séquence du peptide **CC9[Tb]** a été modifiée pour savoir s'il était possible de favoriser l'interaction cation- π et tester la robustesse du système. Les acides aminés liant le peptide ont également été mutés pour modifier l'affinité du peptide. Toutes ces mutations n'ont pas permis d'améliorer de manière significative le peptide, cependant tous les peptides synthétisés dans ce but forment l'interaction cation- π et leur luminescence augmente en présence de cuivre(I) et d'argent(I). Cela montre qu'il est possible de modifier la séquence, et même les acides aminés directement liés au métal sans altérer le fonctionnement de la sonde. La sonde est donc modulable, ce qui est intéressant pour des développements futurs.

Les peptides **CC9[Tb]** et **CC10(Nap)** sont excités dans l'ultraviolet. Pour être utilisés *in vivo*, il est préférable de décaler l'excitation et l'émission vers le rouge et le proche infrarouge pour profiter de la fenêtre de transparence des milieux biologiques. Il faut donc modifier l'antenne afin de sensibiliser un lanthanide émettant dans le proche infrarouge. La sensibilisation de l'ytterbium et du néodyme par deux azulènes et un benzofurazane (NBD) a été étudié. Parmi toutes ces antennes seul le NBD a permis de sensibiliser le néodyme. Cette nouvelle antenne sera greffée sur un peptide à zinc (cf §5).

En plus des peptides portant les antennes potentielles, deux autres peptides ont été synthétisés avec une antenne naphthalène ou anthracène. Tous ces peptides, sauf le peptide **CC10(anthracène)[Nd]**, forment l'interaction cation- π . Il est donc possible de modifier l'antenne sans perturber l'interaction cation- π .

Le peptide portant le naphthalène a été étudié plus en détail. Ce peptide lie le cuivre(I) et l'argent(I), et forme l'interaction cation- π avec ces deux métaux, mais la luminescence de l'euprium augmente en présence d'argent(I) et diminue en présence de cuivre(I). **CC10(Nap)[Eu]** est capable de discriminer entre l'argent(I) et le cuivre(I), ce qui à notre connaissance est unique pour des sondes luminescentes. La discrimination semble être reliée à l'abaissement de l'énergie de l'état triplet T_1 du naphthalène, provoqué par l'interaction cation- π . L'effet de cette interaction n'est pas le même pour le cuivre(I) et pour l'argent(I), ce qui permet de moduler le transfert d'énergie vers l'euprium et conduit à l'augmentation de la luminescence de l'euprium uniquement en présence d'argent(I).

Sondes à zinc émettant dans le visible

4.1	VALIDATION DU PRINCIPE	84
4.1.1	Synthèse du peptide	84
4.1.2	Coordination du zinc	86
4.1.3	Émission de la sonde	86
4.1.4	Sélectivité	88
4.2	SONDES RATIOMÉTRIQUES	90
4.2.1	Conception des peptides ratiométriques	90
4.2.2	Synthèse	93
	4.2.2.1 Synthèse peptidique	93
	4.2.2.2 Métallation du peptide par deux lanthanides	94
4.2.3	Émission des peptides	96
	4.2.3.1 Peptide SP2[Eu ^T -Tb ^O]	96
	4.2.3.2 Comparaison de la fluorescence des quatre peptides	98
	4.2.3.3 Comparaison de la luminescence des lanthanides	99
4.2.4	Sélectivité	103
4.3	DISCUSSION	106
4.4	Conclusion	108

4.1 Validation du principe

Les sondes à zinc sont basées sur le doigt de zinc classique $\beta\beta\alpha$. En présence de zinc le peptide se structure. L'antenne se rapproche du lanthanide, l'efficacité du transfert d'énergie FRET augmente, et la sonde s'allume.

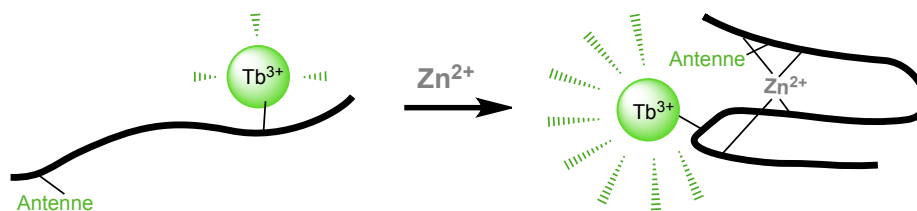


Fig. 4.1 : Principe de la sonde à zinc.

La première sonde basée sur ce principe a été synthétisée avant mon arrivée en thèse. La séquence de ce peptide (fig.4.2) est notée SP2[Tb⁰]. L'antenne utilisée est le tryptophane présent dans la séquence entre les deux histidines. Le DOTA permettant de chélater le terbium, est greffé sur la chaîne latérale de la lysine située entre les deux cystéines, car cette lysine est loin du tryptophane dans la chaîne peptidique, mais se trouve à proximité du tryptophane lorsque le peptide est structuré.

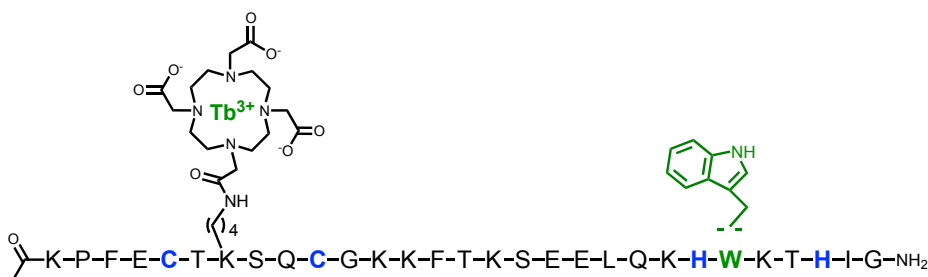


Fig. 4.2 : Séquence de SP2[Tb⁰].

4.1.1 Synthèse du peptide

Le peptide est synthétisé du C-ter (Glycine, G) vers le N-ter (Lysine, K), par synthèse peptidique en phases solide (SPPS), en stratégie Fmoc. La résine *NovaPEG Rink amid* utilisée, présente des extrémités NH₂ (substitution 0,37 mmol.g⁻¹, 0,1 mmol). Le premier couplage (glycine) est effectué à la main pour contrôler le taux de greffage sur la résine, puis les couplages suivants sont effectués par le robot de synthèse peptidique, comme pour le peptide CC9[Tb] (cf §2.2). Les acides aminés utilisés sont protégés par des groupements classiques de synthèse peptidique en stratégie Fmoc, sauf la lysine 7, qui est protégée par un groupement alloc en vue de l'introduction du DOTA. Le dernier acide aminé (lysine) est acétylé en N-ter pendant 5 minutes par un mélange (anhydride acétique : pyridine le DMF, 1/2/7). Cette acétylation est nécessaire pour pouvoir greffer sélectivement le DOTA(^tBu)₃ ester sur la chaîne latérale de la lysine entre les deux cystéines.

Le groupement alloc de la chaîne latérale de la lysine 7, entre les deux cystéines, est clivé sélectivement en présence de palladium(0) (Pd(Ph₃)₄, 0,5 équivalents) et de phénylsilane (25

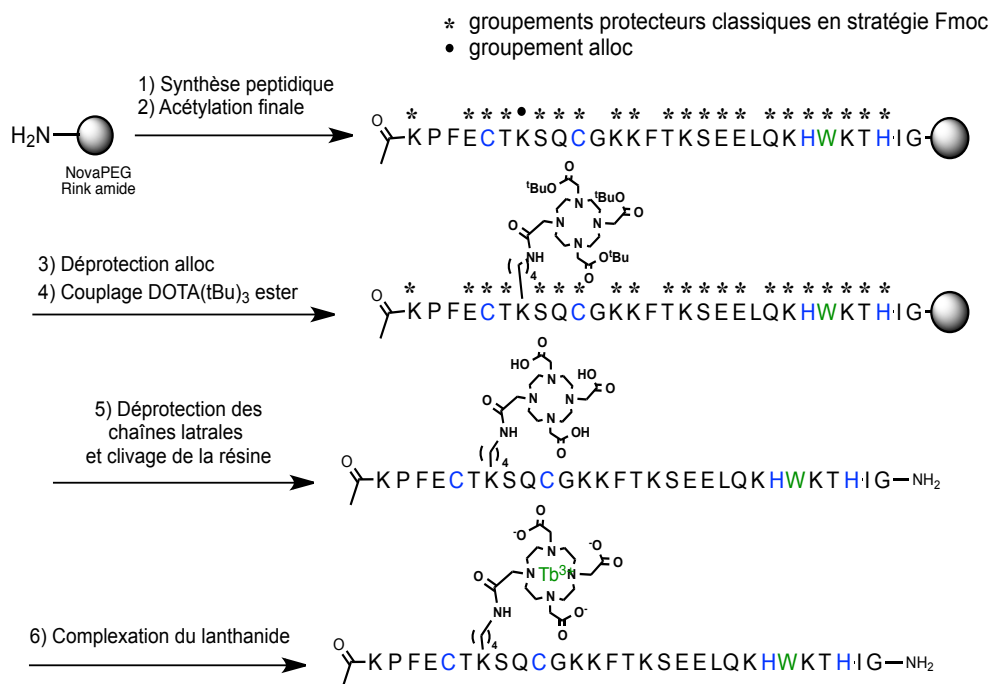


Fig. 4.3 : Synthèse du peptide SP2[Tb^O]. **1) SPPS.** Couplage : DIEA, Fmoc-AA-OH, PyBOP dans la DMF. Déprotection du groupement Fmoc : pipéridine dans la DMF. **2) Acétylation terminale :** Ac₂O/pyridine/DMF (1/2/7). **3) Déprotection sélective du groupement alloc :** Pd(Ph₃)₄, phénylsilane dans le DCM. **4) Couplage du DOTA :** DIEA, DOTA(^tBu)₃, PyBOP dans la DMF. **5) Déprotection des chaînes latérales et clivage de la résine.** TFA, TIS, H₂O, DTT, Thioanisol. **6) Complexation du lanthanide :** peptide dans H₂O à pH 6,2, avec TbCl₃.

équivalents) dans le dichlorométhane (DCM) anhydre et dégazé. La réaction est effectuée deux fois à l'abri de la lumière, pendant 1 heure. Le DOTA protégé sous forme DOTA(^tBu)₃ est greffé sur la chaîne latérale de la lysine par un couplage peptidique classique durant une nuit.

Enfin le peptide est décroché de la résine et tous les groupements protecteurs sont retirés à l'acide trifluoroacétique (TFA). Pour éviter les réactions parasites on ajoute également du triisopropylsilane, de l'eau, du dithioéthanol, et du thioanisol (TFA 18 mL/TIS 0,6 mL/H₂O 0,6 mL/DTT 650 mg/Thioanisol 0,3 mL, 4 heures).

Le peptide est précipité à l'éther froid puis lavé deux fois à l'éther pour éliminer le TFA. Il est ensuite purifié par HPLC préparative en phase inverse (gradient eau/acétonitrile, avec 0,1% de TFA), puis lyophilisé. Le peptide est caractérisé en spectrométrie de masse et sa pureté est contrôlée par HPLC analytique.

Le peptide est ensuite métallé par ~ 5 équivalents de TbCl₃ dans l'eau à pH 6,1 pendant une nuit sous argon. Le peptide est à nouveau purifié par HPLC préparative. De la Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)^[172] est ajoutée avant l'injection pour réduire les ponts dissulfures éventuellement formés par l'oxydation des cystéines par le dioxygène. Après lyophilisation, le peptide est caractérisé en spectrométrie de masse et sa pureté est contrôlée par HPLC analytique.

4.1.2 Coordination du zinc

Le signal de dichroïsme circulaire du peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ est fortement négatif à 200 nm, mais présente un épaulement à 223 nm (fig.4.4). Le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ est donc légèrement structuré. Ce spectre est semblable à ce qui a été obtenu au laboratoire pour d'autres peptides modèles de doigts de zinc $\beta\beta\alpha$ d'autres peptides doigts de zinc $\beta\beta\alpha$ ^[63].

Lors de l'ajout de zinc, le signal de dichroïsme circulaire devient moins négatif à 200 nm, et l'épaulement est légèrement plus important, le peptide se structure. L'évolution du spectre est linéaire jusqu'à un équivalent, puis atteint un plateau. Le peptide forme bien un complexe 1 : 1 avec le zinc.

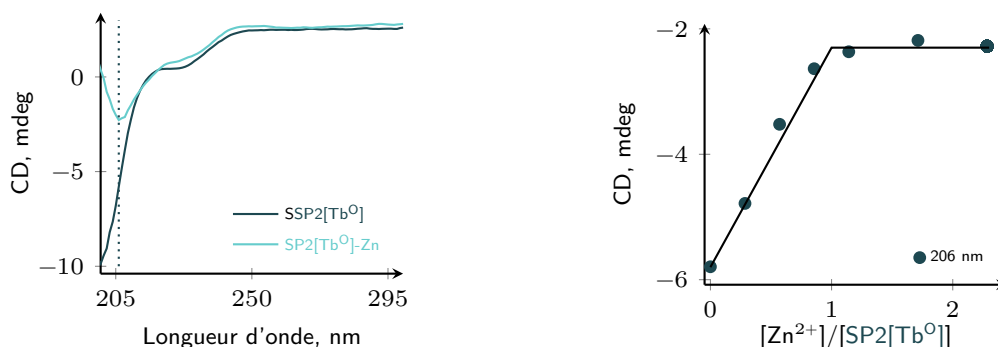


Fig. 4.4 : Titrage du peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ par du zinc suivi par dichroïsme circulaire. $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ $6\mu\text{M}$, Pi pH 7,5 20mM, Dithiothreitol 1 mM.

4.1.3 Émission de la sonde

Le titrage de ce peptide par du zinc, est effectué à l'air, à pH 7,5. À ce pH les cystéines non liées au zinc sont susceptibles d'être oxydées en ponts disulfures par le dioxygène dissout. L'ajout de TCEP permet de réduire les ponts disulfures^[173] éventuellement formés avant l'ajout de zinc car, une fois lié au zinc, le peptide ne s'oxyde pas ou très lentement^[174].

Lors de l'ajout de zinc, la fluorescence du tryptophane augmente et se déplace vers le bleu jusqu'à un équivalent, puis n'est plus modifiée par l'ajout de zinc (fig.4.5). C'est donc bien la formation du complexe 1 : 1 qui est responsable de la variation de fluorescence.

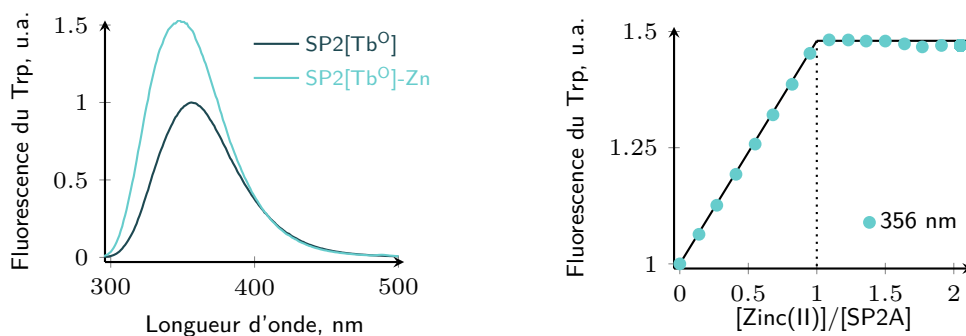


Fig. 4.5 : Titrage du peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ par ZnCl_2 suivi en fluorescence. $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ $10\mu\text{M}$ HEPES pH 7,5 90mM, TCEP $250\mu\text{M}$. $\lambda_{\text{ex}} = 280\text{ nm}$, fentes 5-5, PM 650 V.

La fluorescence du tryptophane est sensible à l'environnement (polarité, liaisons hydrogène)^[142]. Plus le solvant est polaire et protique, et plus la fluorescence se déplace vers les basses énergies. Le décalage vers le bleu de la fluorescence du peptide SP2[Tb⁰] indique que l'environnement du tryptophane dans le peptide lié au zinc est plus hydrophobe. Cela est cohérent avec la structuration du peptide (fig.4.6). Par ailleurs, dans un environnement plus hydrophobe les désexcitations non radiatives sont moins importantes, c'est pourquoi l'intensité de la fluorescence est plus importante^[142].

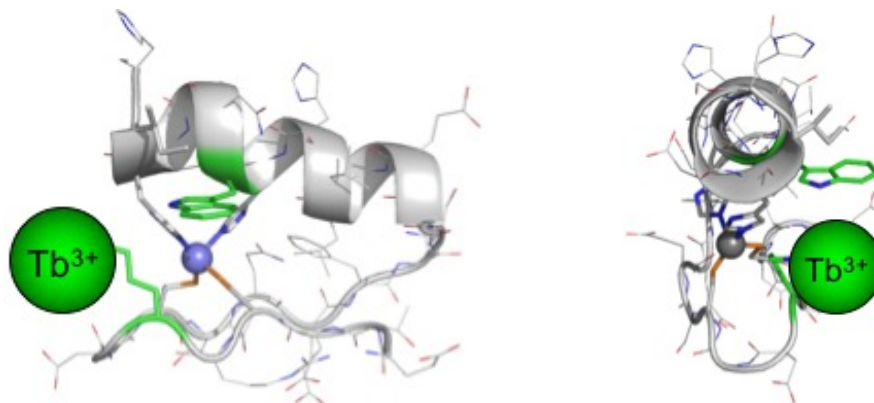


Fig. 4.6 : Structure du peptide SP2A et position estimée du terbium.

La luminescence du terbium augmente en présence de zinc jusqu'à un équivalent avant d'atteindre un plateau. Ce peptide est donc une sonde qui s'allume en présence de zinc. L'intensité d'émission est multipliée par 30 en présence de zinc. De plus, grâce à la détection résolue en temps, le bruit de fond est très faible. Le contraste de cette sonde est important. Cependant pour certaines sondes l'augmentation de l'émission peut atteindre $\times 200$ ^[41,46].

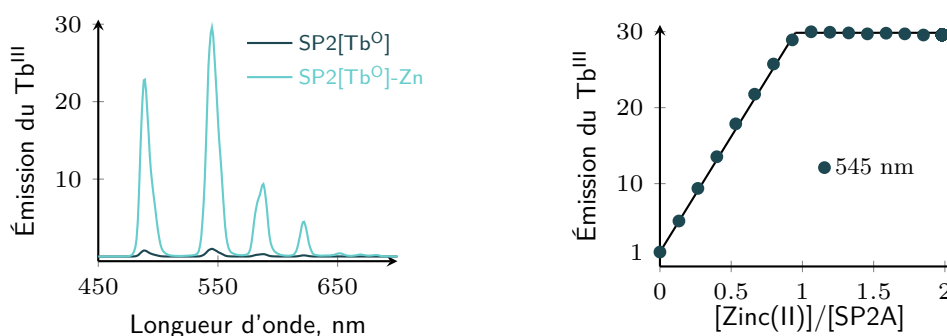


Fig. 4.7 : Titrage du peptide SP2[Tb⁰] par ZnCl₂ suivi par spectroscopie d'émission en temps résolu. SP2[Tb⁰] 10 μ M, HEPES 90 mM pH 7.5, TCEP 250 μ M. λ_{ex} = 280 nm, fentes 10-5, PM 670 V, délai 200 μ s, temps d'intégration 2 ms

Le spectre d'excitation du peptide SP2[Tb⁰] (fig.4.8) présente une bande large à 280 nm, qui correspond à l'absorption du tryptophane liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Le terbium est donc excité par un transfert d'énergie depuis le tryptophane et non par excitation directe.

Afin de vérifier que les variations de l'émission du terbium ne sont pas dues à une modification du temps de vie, ou du nombre de molécules d'eau, mais bien à une augmentation du

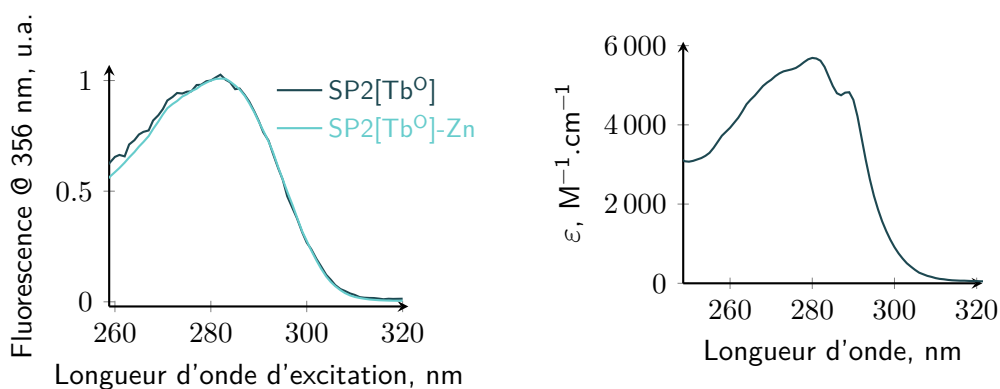


Fig. 4.8 : Spectres d'excitation (gauche) et d'absorption (droite) du peptide SP2[Tb^O] avec et sans zinc. SP2[Tb^O] 10 μ M HEPES pH 7.5 90 mM TCEP 250 μ M. $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, fentes 10-5, délai 200 μ s, temps d'intégration 2 ms.

transfert d'énergie, nous avons mesuré le temps de vie de luminescence du terbium avec et sans zinc dans l'eau légère et dans l'eau lourde. Le temps de vie ne varie quasiment pas avec l'ajout de zinc, il est toujours de 1,96(4) ms dans l'eau légère. Ce temps de vie est habituel pour le terbium dans un DOTA avec une molécule d'eau^[69].

Le nombre de molécules d'eau calculé ne varie pas lors de la complexation du zinc, on obtient $q = 0,8 \pm 0,3$. Une seule molécule d'eau est présente dans la sphère de coordination du terbium. Le DOTA rattaché au peptide, lie le terbium avec les quatre atomes d'azotes, les trois atomes d'oxygène des groupements carboxylates et l'oxygène de l'amide du bras lié au peptide^[70]. Les lanthanides acceptant en général 9 ligands^[175], la place vacante est occupée par une molécule d'eau (fig.2.23)^[69,175].

4.1.4 Sélectivité

Pour pouvoir être utilisé comme sonde, la réponse du peptide doit être spécifique du zinc, notamment vis-à-vis des différents métaux physiologiques (alcalins, alcalino-terreux et métaux du bloc d) et des anions physiologiques. Les doigts de zinc sont connus pour lier préférentiellement le zinc(II)^[63] mais ils complexent d'autres métaux avec une affinité plus faible, comme le cobalt(II)^[100], le fer(II), et le nickel(II)^[176].

Pour déterminer si ces métaux perturbent le fonctionnement de la sonde, la luminescence de la sonde en présence de ces métaux a été enregistrée avant et après l'ajout de zinc (fig.4.9). En l'absence de zinc, l'émission de la sonde est comparable à celle du peptide libre, sauf pour le cobalt où elle est plus faible. Après ajout de zinc, l'émission est aussi intense que pour le peptide en présence de zinc seul. Tous ces métaux et anions physiologiques ne perturbent pas le fonctionnement de la sonde.

Deux possibilités permettent d'expliquer qu'aucun métal testé n'induit d'augmentation de la luminescence du terbium : soit ils ne lient pas le peptide, soit ils le lient mais n'induisent pas d'augmentation de la luminescence du terbium.

Les métaux alcalins et alcalino-terreux, comme les anions ne lient pas le peptide dont la sphère de coordination est plutôt molle. Ils ne perturbent pas non plus l'émission de la sonde en modifiant l'émission du terbium par substitution de la molécule d'eau par exemple.

Les métaux de transitions testés lient le peptide. Cependant ces métaux présentent des

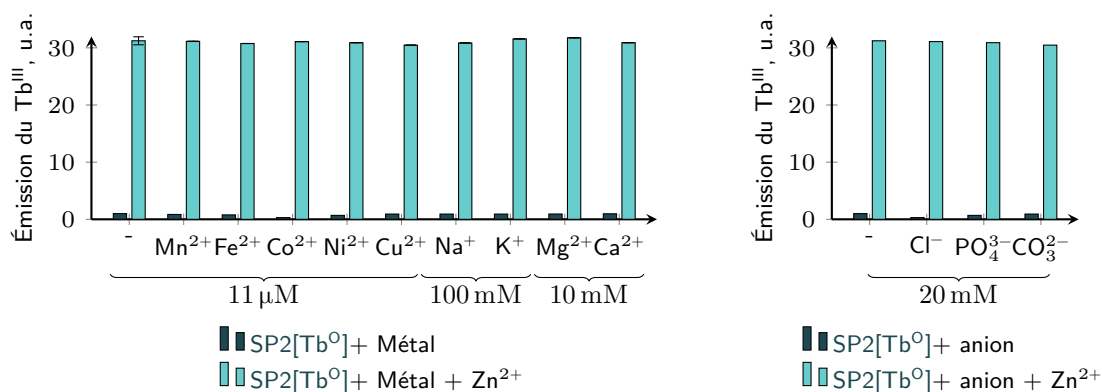


Fig. 4.9 : Luminescence du peptide SP2[Tb⁰] en présence de métaux ou anions physiologiques avant et après ajout de zinc(II). SP2[Tb⁰] 10 μM, HEPES pH 7,4 90 mM, TCEP 230 μM. Ajout de ZnCl₂ 11 μM. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, fentes 10-5, PM 670 V.

bandes d'absorption dans le visible, dues aux transitions d-d. Le transfert d'énergie du terbium vers le métal est possible, comme l'a montré W.Horrocks dans le cas du cobalt(II)^[177]. Ainsi ces métaux lient et structurent le peptide, le transfert d'énergie du tryptophane vers le terbium augmente, mais la luminescence du terbium est éteinte pas le transfert d'énergie vers le métal de transition. De plus, la constante d'affinité du peptide étant plus élevée, de plusieurs ordres de grandeur, pour le zinc^[100] que pour les autres métaux de transition^[176]. Ces métaux sont déplacés par la présence de zinc. L'équilibre est atteint rapidement en moins d'une minute.

En conclusion, le peptide SP2[Tb⁰] est une sonde en intensité pour une détection résolue en temps. Cette sonde s'allume en présence de zinc avec un contraste important. Elle est sélective du zinc vis-à-vis des métaux physiologiques du bloc d, alcalins et alcalino-terreux.

4.2 Sondes ratiométriques

Une réponse en intensité ne permet pas de pouvoir quantifier la concentration en zinc, car l'intensité du signal dépend de la concentration en sonde. Pour s'affranchir de la concentration en sonde, il est possible d'ajouter un signal de référence, qui varie de manière différente du premier signal. Ainsi le rapport des deux signaux donne accès à la concentration en métal indépendamment de la concentration locale en sonde. Les deux signaux d'une sonde ratiométrique peuvent être l'émission à deux longueurs d'onde différentes, pour une longueur d'excitation donnée (fig.4.10), ou bien l'émission à une longueur d'onde donnée, pour deux longueurs d'onde d'excitation différentes. La situation la plus courante est la détection à deux longueurs d'onde différentes. C'est également celle que nous allons développer.

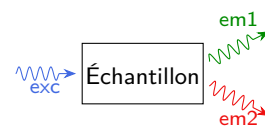


Fig. 4.10 : Principe d'une détection ratiométrique à deux longueurs d'onde d'émission différentes pour une longueur d'onde d'excitation.

Pour les sondes organiques, l'ajout d'un deuxième chromophore est souvent difficile à réaliser, car pour limiter les transferts d'énergie entre chromophores, il est nécessaire de les éloigner. Dans la sonde développée par S.Lippard, les deux chromophores, séparés par dix acides aminés, ont un comportement indépendants^[54].

Dans notre cas, ajouter une deuxième émission, consiste à greffer un deuxième lanthanide, sensibilisé par la même antenne que le premier lanthanide, ou par une antenne différente. Nous avons choisi de garder le couple tryptophane/terbium du peptide SP2[Tb⁰] et d'ajouter un deuxième couple antenne/lanthanide.

4.2.1 Conception des peptides ratiométriques

L'objectif est de construire une sonde excitée à une seule longueur d'onde, et dont l'émission à deux longueurs d'onde varie différemment en présence de métal. Pour cela nous allons ajouter un deuxième couple antenne/lanthanide au peptide SP2[Tb⁰].

Pour rendre la sonde ratiométrique, il faut choisir un couple antenne/lanthanide avec une antenne qui puisse être excitée à 280 nm comme le tryptophane, et un lanthanide qui émette à d'autres longueurs d'onde que le terbium. Ensuite il faut déterminer la position de ce deuxième couple pour que l'émission du deuxième lanthanide varie de manière différente de l'émission du terbium en présence de zinc. Enfin, il faudra déterminer comment introduire deux lanthanides différents dans un même peptide.

Pour des raisons pratiques, le deuxième lanthanide doit également émettre dans le visible. Le deuxième lanthanide émettant dans le visible et couramment utilisé est l'europlum. L'émission de l'europlum est située dans le rouge alors que celle du terbium est plus dans le vert (fig.4.11). Les deux spectres ne se chevauchent pas complètement. L'émission du terbium sera caractérisée à 490 nm et celle de l'europlum à 700 nm (fig.4.11).

Comme antenne de l'europlum, nous avons choisi le naphthalène dont la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ est située vers 280 nm^[155], et dont le coefficient d'absorption molaire est proche de celui du tryptophane (fig.4.12).

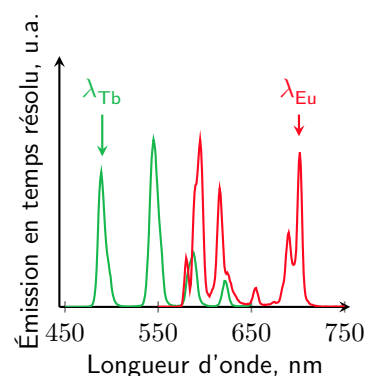


Fig. 4.11 : Spectres du terbium et de l'europlum. Spectres des sondes à cuivre (cf §2.3.3 et §3.4.3).

Ainsi statistiquement, le tryptophane et le naphthalène sont excités de manière équivalente.

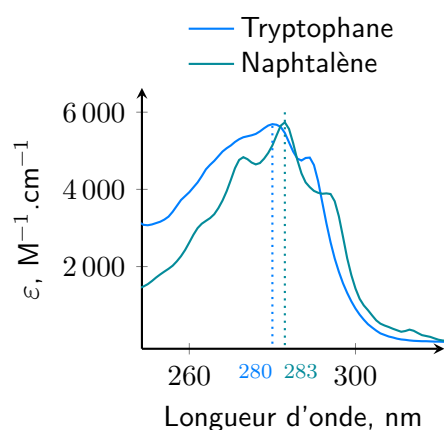


Fig. 4.12 : Spectres d'absorption du tryptophane et du naphthalène. Spectres des sondes à cuivre (cf §2.3.2 et §3.4.2).

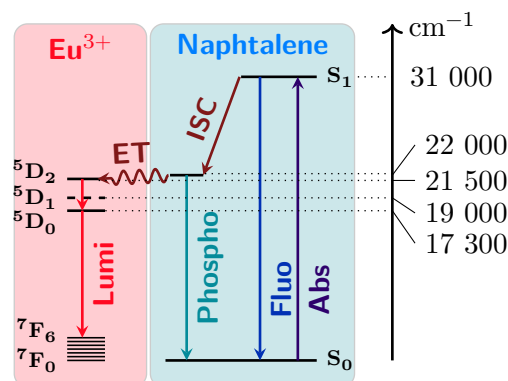


Fig. 4.13 : Diagramme de Jablonski du couple Naphthalène-Europium.

Pour le peptide SP2[Tb⁰], le signal du terbium augmente en présence de zinc. L'ajout d'un signal non modifié par la présence de zinc rendrait la sonde ratiométrique. Pour éviter que l'intensité du transfert d'énergie varie avec la structuration du peptide, notamment à cause d'une variation de la distance, nous avons choisi d'introduire le naphthalène et l'euprium de manière consécutive dans la séquence peptidique. Ainsi l'émission de l'euprium ne devrait quasiment pas être modifiée par la présence de zinc, et la sonde serait ratiométrique (fig.4.14).

Le plus simple synthétiquement est de greffer un chélate pour l'euprium en N-ter du peptide. Pour introduire le naphthalène, nous utilisons l'acide aminé non naturel, mais néanmoins commercial, Fmoc-3-(1-naphthyl)-L-alanine. Afin de perturber au minimum la structure du peptide, cet acide aminé aromatique est greffé à la place de la phénylalanine présente du côté N-ter du peptide SP2[Tb⁰]. Le chélate est greffé directement après cet acide aminé, le peptide synthétisé est donc plus court que le peptide SP2[Tb⁰] de deux acides aminés. Cependant dans le peptide SP2[Tb⁰] la phénylalanine est le dernier acide aminé du feuillet. La structure du peptide ne devrait pas être perturbée par ces modifications.

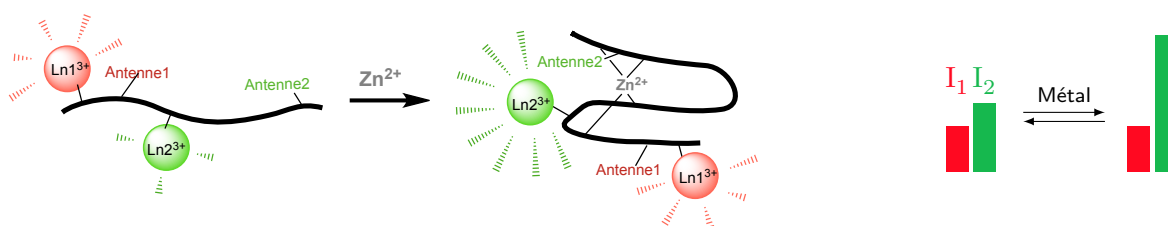


Fig. 4.14 : Principe de fonctionnement de la sonde ratiométrique.

Les chélates utilisés pour complexer les lanthanides, n'ont pas tous les deux les mêmes propriétés. Le DOTA forme des complexes stables thermodynamiquement, les constantes d'affinité vont de $\log K = 22$ à 26 selon les lanthanides^[70]. Les complexes formés sont également inertes. Même en milieu acide ($[HCl]=0,1 M$), le complexe DOTA-Gd a un temps de vie de $\tau_{1/2} = 229 h$ à $25^\circ C$ ^[178,179]. Il est donc difficile de retirer un lanthanide d'un DOTA.

Le DTPA (fig.4.15) est également stable thermodynamiquement ($\log K = 20 - 23$ ^[180]). Il est également inerte cinétiquement à pH 7, mais devient labile en condition acide. Dans les mêmes conditions acides que le DOTA ($[\text{HCl}] = 0,1 \text{ M}$, 25°C), le complexe DTPA a un temps de vie très court $\tau_{1/2} = 7,9.10^{-3} \text{ s}$ ^[179].

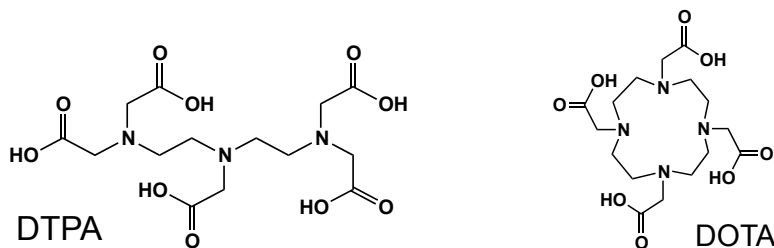


Fig. 4.15 : Formule du DTPA et du DOTA.

Cette différence entre DOTA et DTPA a été utilisée par l'équipe de D.Sames pour préparer des composés hétéro-bimétalliques contenant du terbium et de l'euprium^[181]. Le ligand est composé d'un tryptophane lié à un acide aminé non naturel (2,3-acide diaminopropanoïque, Dap), sur lequel un DOTA et un DTPA sont greffés sélectivement (fig.4.16). La première étape consiste à métalliser les deux chélates avec le terbium, pour former le composé homobimétallique. Le terbium du DTPA est ensuite retiré par une purification en HPLC en milieu acide (0,1% de TFA). Le DTPA est ensuite métallé avec de l'euprium. Nous avons choisi d'utiliser la même stratégie.

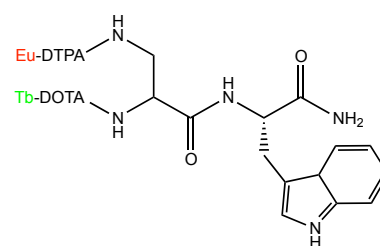


Fig. 4.16 : Composés hétéro-bimétalliques métallés sélectivement par l'équipe de D.Sames^[181].

Au final, le peptide conçu correspond au peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ dont les trois acides aminés en N-ter ont été modifiés en un acide aminé non naturel comportant un méthyl-naphtalène sur sa chaîne latérale et un DTPA. Ce peptide est noté $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ (fig.4.17). En présence de zinc ce peptide se structure, nous nous attendons à ce que l'émission du terbium augmente comme pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ et que celle de l'euprium reste constante (fig.4.14).

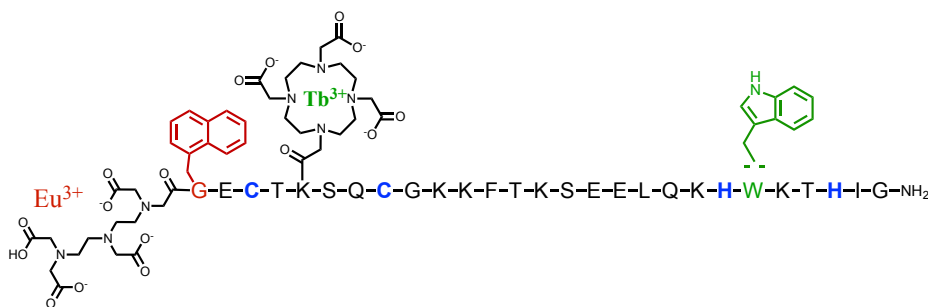


Fig. 4.17 : Séquence de la sonde ratiométrique $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$.

En synthèse peptidique, il est facile d'échanger les « blocs ». Notamment il est possible d'intervertir la position du DOTA et du DTPA, ou bien d'échanger les antennes. Au final, nous

pouvons facilement synthétiser 4 peptides différents (fig.4.18), ce qui permet d'évaluer l'effet du chélate et de la position de l'antenne sur la luminescence des lanthanides. Les peptides sont notés $SP2[Ln_1^{Chélate1}-Ln_2^{Chélate2}]$. Le couple antenne1/lanthanide1 est le couple greffé consécutivement dans la séquence du côté N-terminal. Le couple antenne2/lanthanide2 est celui dont la distance varie lorsque le peptide se replie. L'antenne n'est pas notée, il s'agit du tryptophane si le lanthanide est le terbium, et du naphtalène si le lanthanide est l'euprium.

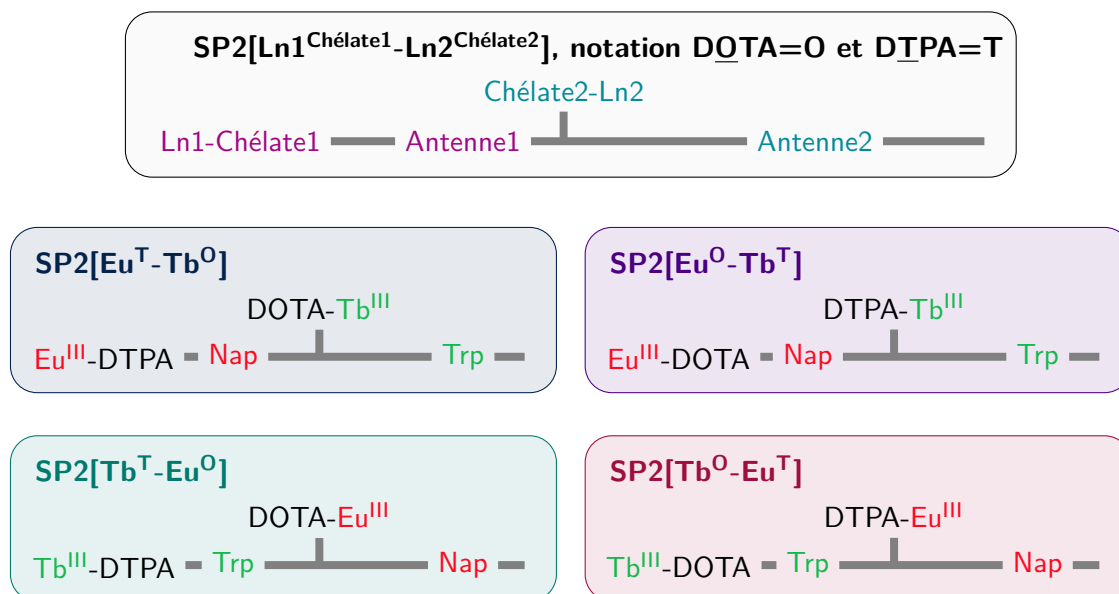


Fig. 4.18 : Schéma des quatre peptides ratiométriques synthétisés. Notation $SP2[Ln_1^{chélate1}-Ln_2^{chélate2}]$, DOTA=O et DTPA=T.

4.2.2 Synthèse

La synthèse décrite correspond à celle du peptide $SP2[Eu^T-Tb^O]$. Les trois autres peptides ont été obtenus de manière similaire.

4.2.2.1 Synthèse peptidique

Le peptide est synthétisé de manière similaire à $SP2[Tb^O]$ (cf §4.1.1), en utilisant le robot de synthèse peptidique. Le premier acide aminé (glycine) est couplé à la main afin de vérifier la charge de la résine. Le dernier acide aminé (Fmoc-3-(1-naphtyl)-L-alanine) est couplé à la main pour limiter la quantité d'acide aminé non naturel utilisé. Le $DTPA(tBu)_4$ (commercial) est ensuite greffé par couplage peptidique classique pendant une nuit. La chaîne latérale de la lysine, située entre les deux cystéines, est déprotégée de son groupement protecteur alloc en présence de palladium(0). Le $DOTA(tBu)_3$ est greffé sur la chaîne latérale de la lysine par un couplage peptidique classique pendant une nuit.

Le peptide est clivé de la résine et tous les groupements protecteurs sont retirés en présence de TFA et de *scavengers* pour éviter les réactions parasites, dans les mêmes conditions que $SP2[Tb^O]$. Le peptide est purifié par HPLC préparative. Le peptide est caractérisé en spectrométrie de masse, et sa pureté est contrôlée par HPLC analytique.

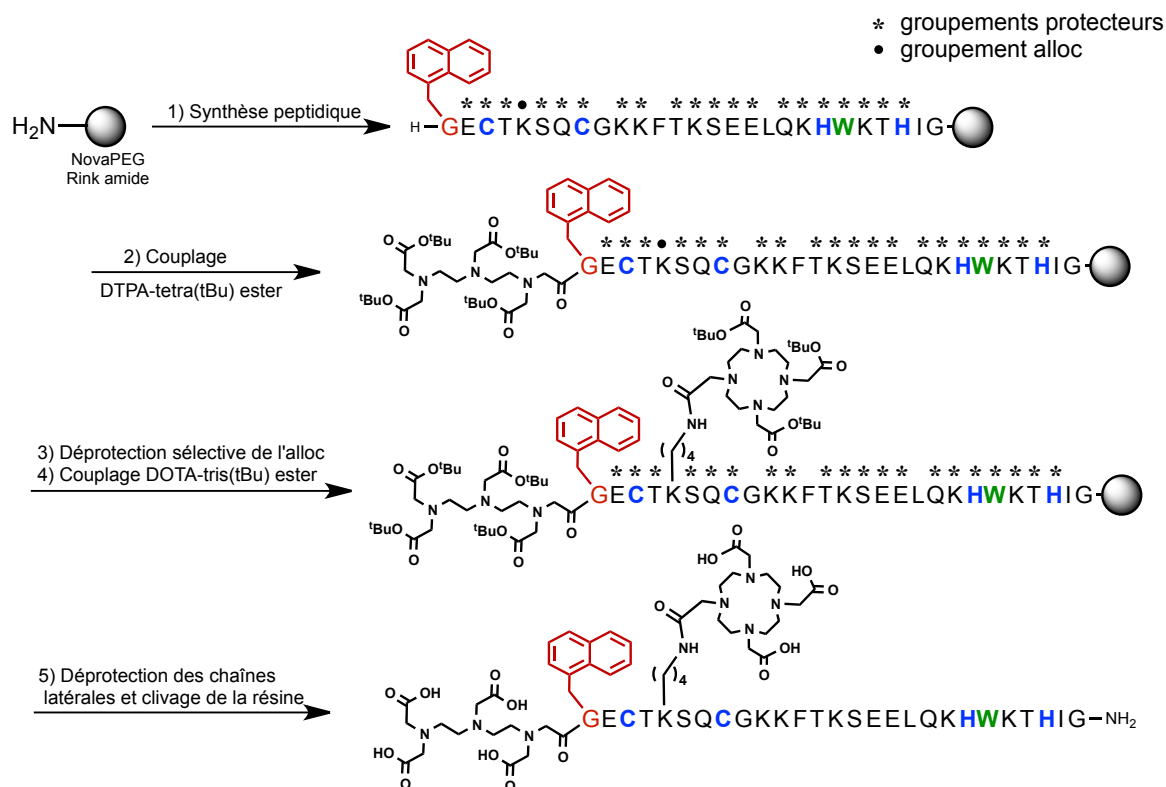


Fig. 4.19 : Synthèse du peptide SP2[Eu^T-Tb^O]. 1) **Synthèse peptidique en phase solide.** Couplage : DIEA, Fmoc-AA-OH, PyBOP dans la DMF. Déprotection du groupement Fmoc : pipéridine 20% dans la DMF. 2) **Couplage du DTPA protégé :** DIEA, DTPA-*tetra*(^tBu) ester, PyBOP dans la DMF. 3) **Déprotection sélective du groupement alloc :** Pd(Ph₃)₄, phénylsilane dans le DCM. 4) **Couplage du DOTA protégé :** DIEA, DOTA-*tris*(^tBu) ester, PyBOP dans la DMF. 5) **Déprotection des chaînes latérales et clivage de la résine.** TFA 18 mL/TIS 0.6 mL/H₂O 0.6 mL/DDT 650 mg/Thioanisol 0,3 mL.

4.2.2.2 Métallation du peptide par deux lanthanides

La première métallation est identique à celle de SP2[Tb^O], le peptide est dissout dans de l'eau dont le pH est ajusté à 6,1, puis 5 équivalents de TbCl₃ sont ajoutés. La solution est agitée pendant une nuit sous argon. Du TCEP est ajouté, afin de réduire les ponts disulfures éventuellement formés, avant de purifier le peptide par HPLC préparative (eau/acétonitrile avec 0,1% de TFA). Le peptide est ensuite lyophilisé, et analysé en spectrométrie de masse (fig.4.21). Le peptide métallé et non métallé ont le même temps de rétention (8,5 min) en HPLC analytique, il n'est donc pas possible de suivre la métallation par HPLC analytique.

Le suivi de la métallation est effectué par spectrométrie de masse. Après la première métallation au terbium et purification par HPLC 0,1% TFA, le pic correspondant au peptide avec deux terbiums est majoritaire dans le spectre de masse. Le DTPA n'est pas totalement démétallé. Pour déterminer le taux de démétallation du DTPA, le peptide est titré par de l'euporium. Le signal de l'euporium augmente jusqu'à 0,4 équivalents d'euporium ensuite le signal n'augmente plus. Le taux de démétallation du DTPA est donc de 40%.

Pour arriver à démétaller entièrement le DTPA, les conditions ont été modifiées plusieurs fois, en quantité d'acide (0,1%, 1%, 2%) et en temps (temps passé sur l'HPLC, 1h, 4h). Au final, les conditions permettant une démétallation totale du DTPA, d'après le spectre de

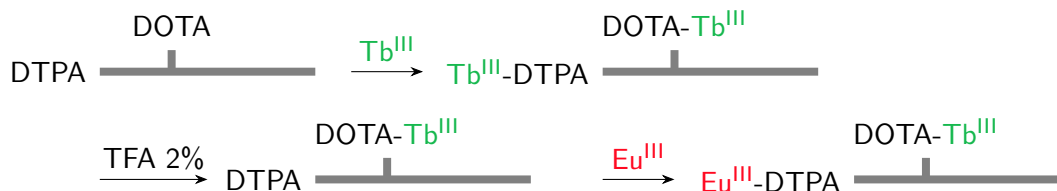


Fig. 4.20 : Métallation sélective du peptide ratiométrique SP2[Eu^T-Tb^O] par du terbium et de l'euporium.

masse (fig.4.21) et le titrage à l'euporium, sont : TFA 2% dans l'eau pendant 4 heures.

La colonne HPLC ne supportant pas des conditions trop acides ($\text{pH} < 1$), le peptide est purifié sur colonne Waters Oasis (phase inverse C18, HLB 3cc, 400 mg) à usage unique. La purification est effectuée en boîte à gants pour protéger le peptide de l'oxydation. Le peptide est dilué deux fois, puis déposé sur la colonne. La colonne est rincée à l'eau, puis le peptide est élué par un mélange 50/50 eau/acétonitrile, puis 20/80. Il est ensuite lyophilisé, analysé en spectrométrie masse (fig.4.21), et titré par de l'euporium.

La deuxième métallation est identique à la première, sauf que le sel ajouté est EuCl₃. La purification est également réalisée sur colonne Oasis en boîte à gants, en milieu non acidifié pour éviter la démétallation du DTPA. Le peptide est lyophilisé, et analysé en spectrométrie de masse (fig.4.21).

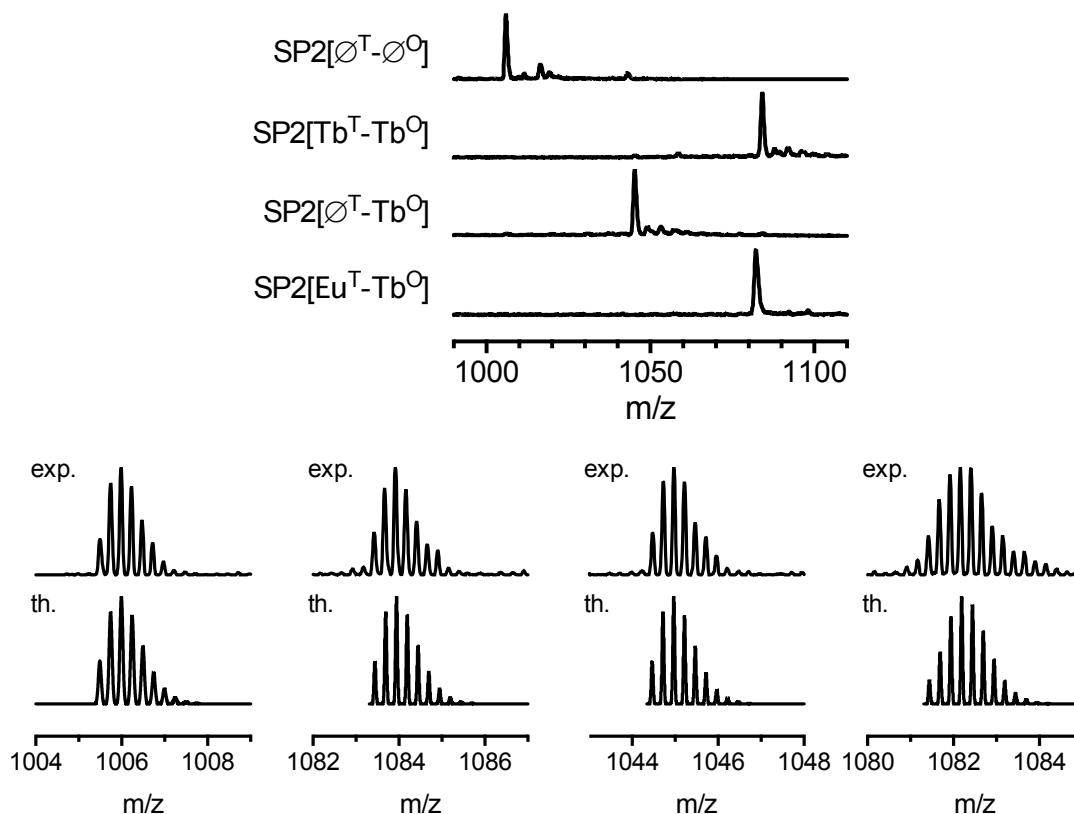


Fig. 4.21 : Spectre de masse du peptide SP2[Eu^T-Tb^O] lors des étapes de métallation.

Afin de vérifier qu'il n'y a pas d'échange de lanthanide entre les deux chélates, le peptide SP2[Eu^T-Tb^O] a été digéré pendant une nuit à pH 7 (tampon acétate d'ammonium, 25 mM), par l'endopeptidase GluC (10 mg.mL⁻¹) coupant les chaînes peptidiques du côté C-ter des acides glutamiques (fig.4.22). La solution est ensuite analysée en spectrométrie de masse.

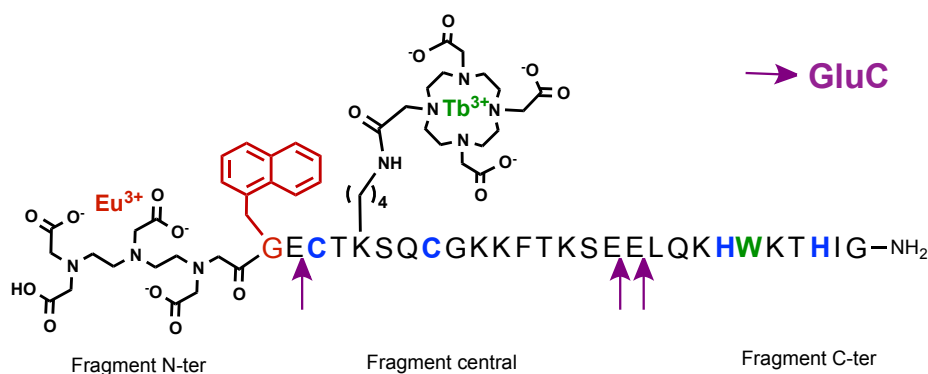


Fig. 4.22 : Séquence du peptide SP2[Eu^T-Tb^O]et positions des coupures possibles lors de la digestion du peptide par l'endopeptidase GluC.

Le spectre de masse est difficile à interpréter, car tous les pics attendus sont souvent peu abondants, et des pics abondants n'ont pas pu être attribués. Parmi les pics attribués, le fragment C-ter comprenant ni terbium, ni europium est visible en mode positif ($m/z=1246,7$ (2+), 623,9 (3+), 416,3 (4+), $m/z_{calculé} = 1246,71$ [M+2H]²⁺, 623,85 [M+3H]³⁺, 416,23 [M+4H]⁴⁺, pour M=C₅₈H₉₁N₁₉O₁₂), mais n'apporte pas d'informations. Le fragment central comprenant le terbium est visible en mode négatif mais très peu abondant, 5% ($m/z = 704,2$, $m/z_{calculé} = 704,27$ [M-3H]³⁻, pour M=C₈₁H₁₃₄N₂₃O₂₉S₂Tb). Le fragment N-ter, comprenant le DTPA/Eu est peu abondant (11%) mais visible en mode négatif ($m/z=433,5$ (2-), $m/z_{calculé} = 433,6$ [M-2H]²⁻, pour M=C₃₂H₃₈N₅O₁₄Eu). Un grossissement du pic permet de voir que le massif isotopique ($m/z=433,4/95\%$, 432,9/39%, 433,4/100%, 433,9/40%) correspond bien à de l'euporium (¹⁵¹Eu/47,8%, et ¹⁵³Eu/52,2%). Ces éléments permettent de penser qu'il n'y a pas d'échange. La spectroscopie apportera d'autres indices (fig.4.2.3.3).

4.2.3 Émission des peptides

Toutes les expériences sont réalisées à l'air. Le peptide (10 μM) en présence de tampon HEPES pH 7,5 (10 mM) et de TCEP (250 μM), est titré par une solution de ZnCl₂ à 1,6 mM.

4.2.3.1 Peptide SP2[Eu^T-Tb^O]

Fluorescence : Le spectre de fluorescence du naphthalène est plus étroite que celle du tryptophane, mais se situe dans la même gamme de longueur d'onde (fig.4.23). En effet, le spectre de fluorescence du naphthalène présente deux bandes distinctes, maxima 327 nm et 338 nm alors que celle du tryptophane est composée d'une seule bande large ($\lambda_{max} = 355$ nm). La fluorescence du peptide SP2[Eu^T-Tb^O] ressemble plus à celle du tryptophane qu'à celle du naphthalène (fig.4.24). Cependant le maximum de la fluorescence (345 nm) est décalé vers le bleu par rapport au peptide SP2[Tb^O] (355 nm). Cela suggère une contribution du naphthalène à la fluorescence.

Lors de l'ajout de zinc la fluorescence augmente et se déplace vers le bleu jusqu'à un équivalent, de manière similaire à ce qui est observé pour SP2[Tb^O].

Le rendement de fluorescence du tryptophane mesuré dans l'eau pour le peptide CC9[Tb] est de 8,4%, et celui du naphthalène mesuré pour le peptide CC10(Nap)[Eu] est de 3%. Comme les coefficients d'extinction molaire du tryptophane et du naphthalène sont quasiment identiques, et le rendement quantique de fluorescence du naphthalène est plus faible que celui du tryptophane, la brillance du naphthalène est plus faible que celle du tryptophane. C'est ce qui est observé pour le peptide SP2[Eu^T-Tb^O].

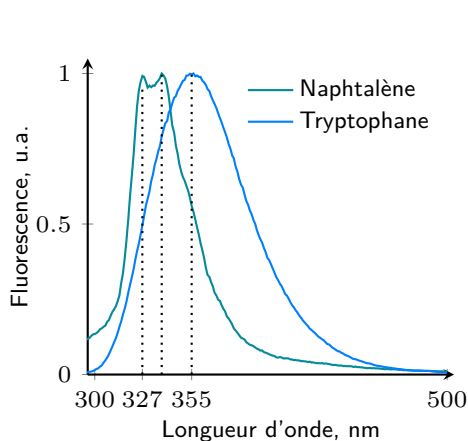


Fig. 4.23 : Spectre de fluorescence du tryptophane et du naphthalène, issu de la sonde à zinc SP2[Tb^O] et de la sonde à cuivre CC10(Nap)[Eu] (cf §4.1.3 et §3.4.2).

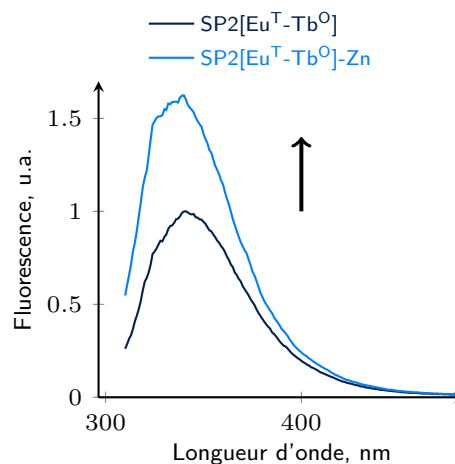


Fig. 4.24 : Spectres de fluorescence du peptide SP2[Eu^T-Tb^O] avec et sans zinc. SP2[Eu^T-Tb^O] 105 μM, HEPES pH 7.5 10 mM, TCEP 1 mM dans un capillaire. Ajouts 1,2 équivalents de ZnCl₂. λ_{ex} = 280 nm, fentes 5-1.

Luminescence : En l'absence de zinc, l'émission du terbium et celle de l'euporium sont visibles sur le spectre d'émission en temps résolu du peptide (fig.4.25). L'intensité des maxima est du même ordre de grandeur. L'émission du terbium à 545 nm est normalisée à 1, l'intensité d'émission de l'euporium à 696 nm est alors de 0,85.

Lors du titrage du peptide par le zinc, l'émission du terbium augmente (×3,8) alors que celle de l'euporium reste quasi-constante (×1,1). La faible variation de l'émission de l'euporium lors de l'ajout de zinc correspond à ce qui était recherché en positionnant le naphthalène et le DTPA-Eu^{III} proches dans la chaîne peptidique. En revanche l'augmentation de l'émission du terbium est plus faible que celle observée pour le peptide SP2[Tb^O] (fig.4.7, ×30).

Puisqu'en présence de zinc, le signal de l'euporium varie peu et celui du terbium augmente, le rapport de l'émission à 545 nm (terbium) sur l'émission à 596 nm (euporium) augmente de 1,2 à 4 pour un équivalent de zinc, puis reste constant (fig.4.25). Ce peptide permet donc une détection ratiométrique du zinc.

Les variations observées sur les spectres (fig.4.25) en temps résolu sont similaires aux variations des rendements quantiques (fig.4.26). Le rendement quantique de l'euporium pour le peptide libre (0,14) est plus important que celui du terbium (0,0285). Or sur les spectres le signal de l'euporium semble moins intense que celui du terbium. Le terbium a un temps de vie de luminescence de 1,95 ms alors que le temps de vie de luminescence de l'euporium est de 0,6 ms. Le délai de 200 μs élimine proportionnellement plus le signal de l'euporium

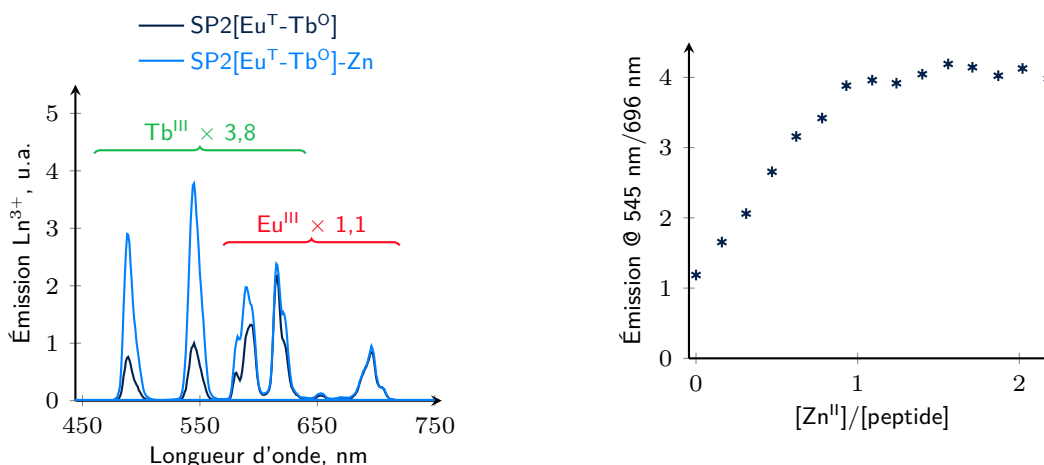


Fig. 4.25 : Spectre en temps résolu du peptide SP2[Eu^T-Tb^O] avec et sans zinc et rapport de l'émission du terbium (545 nm) par l'émission de l'euporium (696 nm). SP2[Eu^T-Tb^O] 5 μM, HEPES pH 7,5 10 mM, TCEP 250 μM. Ajout de ZnCl₂ 13,5 μM. λ_{ex} = 280 nm, fentes 10-5, PM 800V, délai 200 μs, temps d'intégration 2 ms.

que celui du terbium. C'est pourquoi sur les spectres, le signal de l'euporium apparaît moins intense que le signal du terbium.

Φ, %	Tb	Eu
SP2[Eu ^T -Tb ^O]	0,0285(2)	0,14(1)
SP2[Eu ^T -Tb ^O]-Zn	0,111(2)	0,140(3)
évolution	×3,9	×1

Fig. 4.26 : Rendements quantiques du peptide SP2[Eu^T-Tb^O]. Les rendements quantiques ont été déterminés en capillaires avec une sphère d'intégration par Svetlana Eliseeva.

Nous allons maintenant comparer les propriétés d'émission de ce peptide à celles des trois autres peptides synthétisés en inversant les chélates ou en inversant la position des antennes.

4.2.3.2 Comparaison de la fluorescence des quatre peptides

La forme de la fluorescence n'est pas la même pour les quatre peptides (fig.4.27). Celle des deux peptides dont l'antenne 2 (celle qui se rapproche du lanthanide en présence de zinc), est le tryptophane, ressemble à la fluorescence du tryptophane. À l'inverse, la fluorescence des peptides dont l'antenne 2 est le naphthalène, ressemble à celle du naphthalène. Au final, la fluorescence majoritaire est celle de l'antenne 2 alors que le rendement quantique de fluorescence du tryptophane (8,4%) est plus important que celui du naphthalène (3%). Il semblerait que la fluorescence de l'antenne 1 soit éteinte.

L'antenne 1 est plus proche du lanthanide 1 (~ 5 Å), que du lanthanide 2 (~ 18 Å). Ces distances sont estimées à partir des structures pdb de doigts de zinc classique ββα (1_MEY et 2GLI). L'antenne 1 remplace la phénylalanine qui fait partie du cœur hydrophobe. Cette antenne est donc probablement enfouie dans le peptide. Une possibilité de désexcitation du tryptophane est un transfert d'électron photoinduit avec l'euporium $\text{Trp}^* + \text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{Trp}^{\bullet+} + \text{Eu}^{2+}$ [182,183]. Ce transfert d'électron est non radiatif, et peut dimi-

nuer l'émission du tryptophane. Dans le cas des peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$, le tryptophane est plus proche de l'euprimum que pour les deux autres peptides. L'extinction de la fluorescence du tryptophane est donc probablement plus importante pour ces deux peptides que pour les peptides $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$.

Par ailleurs la fluorescence de type tryptophane (peptides $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$) augmente en présence de zinc, comme pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ alors que la fluorescence de type naphtalène (peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$) diminue en présence de zinc. Le changement d'environnement n'a pas le même effet sur la fluorescence du tryptophane et du naphtalène.

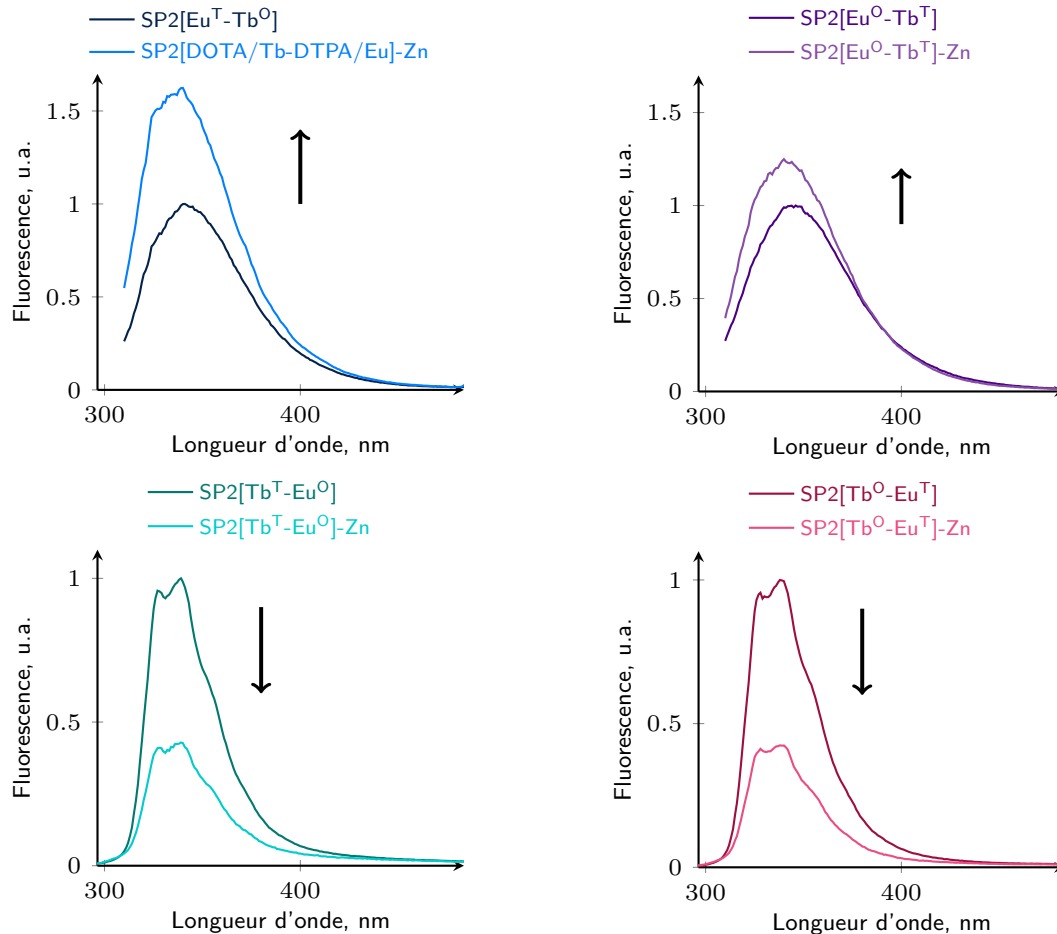


Fig. 4.27 : Fluorescence des quatre peptides à deux lanthanides. $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ 10 μM ou $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ 5 μM , HEPES pH 7,5 10 mM, TCEP 250 μM . $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, fentes 10-5.

4.2.3.3 Comparaison de la luminescence des lanthanides

Pour tous les peptides sans zinc, l'émission du terbium est visible, elle a donc été choisie comme référence pour la normalisation et fixée arbitrairement à 1.

Peptides $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$: En l'absence de zinc, l'émission de l'euprimum est du même ordre de grandeur que celle du terbium pour les peptides $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ (0,85

à 696 nm) et $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ (2,3 à 701 nm). Lors de l'ajout de zinc, l'émission du terbium augmente. Elle est multipliée par 3,8 pour le peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ et par 12,3 pour le peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$. La luminescence de l'euporium augmente peu en présence de zinc : 1,1 pour $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ et 1,6 pour $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$. Les variations de la luminescence des lanthanides n'est pas la même pour les deux peptides. La seule différence entre ces deux peptides est la nature des chélates complexant les lanthanides. Les chélates ont donc une influence sur les propriétés de la sonde.

Le spectre de l'euporium n'a pas le même profil dans les deux cas. Cela est visible sur la bande correspondant à la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$, vers 700 nm. Sur le spectre du peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$, on observe qu'une seule bande à 696 nm, alors que sur le spectre du peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ cette bande est éclatée en deux bandes dont les maxima sont à 690 et 702 nm. L'euporium du peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ est dans un DTPA, alors que celui du peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ est dans un DOTA. Le champ des ligands créé par le DOTA, plus symétrique, est plus important que celui créé par le DTPA, moins symétrique. L'éclatement des niveaux à cause du champ des ligands est plus important lorsque l'euporium est complexé par un DOTA que par un DTPA. Cette différence a déjà été montrée par l'équipe de P.Selvin^[184].

Pour le terbium, c'est l'intensité relative des bandes qui n'est pas la même. La transition ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ est favorisée par rapport à la transition ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$ lorsque le terbium est dans un DTPA.

Peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$: Pour les peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$, les spectres de luminescence sont dominés par l'émission du terbium. L'émission de l'euporium est beaucoup plus faible : 0,04 à 702 nm pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et de 0,05 à 696 nm pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$.

Pour ces deux peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$, la différence d'intensité d'émission du terbium et de l'euporium est trop importante pour pouvoir trouver, sur notre spectrofluorimètre Cary Eclipse, des paramètres d'acquisition satisfaisants pour les deux lanthanides. Le rapport de l'émission de l'euporium sur celle du terbium n'est donc pas exploitable pour ces deux sondes.

Sur le spectre du peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$, le profil de la bande liée à la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ de l'euporium est semblable à celui du peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$. Pour ces deux peptides l'euporium est dans un DOTA. De la même manière, le profil de l'euporium est semblable dans les spectres des peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$ et $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$. Ces différences spectrales montrent bien qu'il n'y a pas d'échange de lanthanides entre les DOTA et le DTPA.

Lors de l'ajout de zinc, l'émission de l'euporium augmente de 3,5 pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et de 2,5 pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$. L'émission du terbium augmente davantage que l'émission de l'euporium : $\times 7,4$ pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}-\text{Eu}^{\text{O}}]$ et $\times 3,8$ pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}-\text{Eu}^{\text{T}}]$. L'augmentation du terbium plus intense que celle de l'euporium en présence de zinc n'est pas ce qui était attendu.

En effet, dans ces peptides le naphthalène se rapproche de l'euporium lors de la complexation du zinc, ce qui peut expliquer l'augmentation de la luminescence de l'euporium. À l'inverse, la distance entre le tryptophane et le terbium n'est a priori pas ou peu modifiée par la présence de zinc. L'augmentation de la luminescence du terbium ne peut pas être expliquée par une diminution de la distance entre le tryptophane et le terbium. Une possibilité pour expliquer

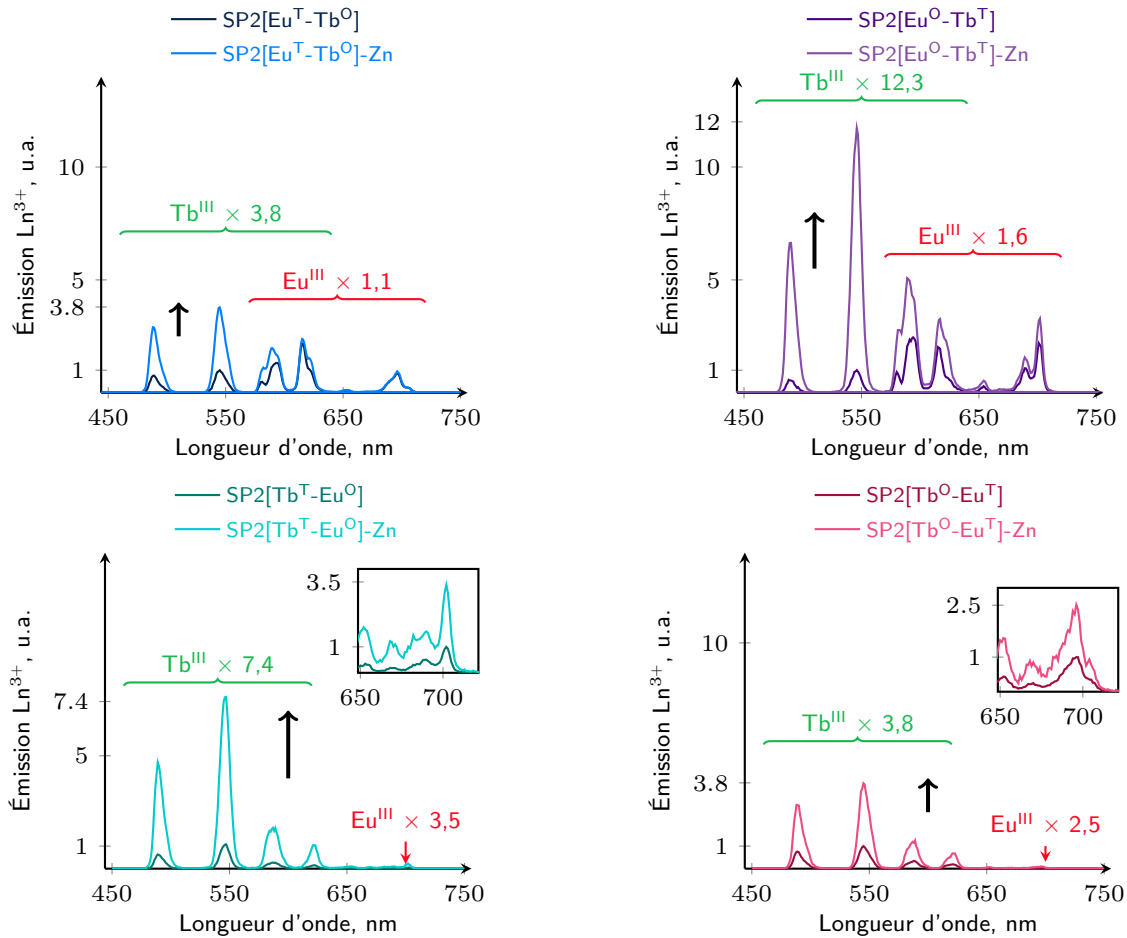


Fig. 4.28 : Émission en temps résolu des quatre peptides à deux lanthanides avec et sans zinc. $SP2[Eu^T-Tb^O]$ 10 μ M ou $SP2[Eu^O-Tb^T]$ 5 μ M, HEPES pH 7,5 10 mM, TCEP 250 μ M. $\lambda_{ex} = 280$ nm, délai 200 μ s, temps d'intégration 2 ms. $SP2[Eu^T-Tb^O]$ et $SP2[Eu^O-Tb^T]$ fentes 10-5 PM 800 V. $SP2[Tb^T-Eu^O]$ et $SP2[Tb^O-Eu^T]$: fentes 5-5 ou 10-5 (grossissement) PM 850 V.

cette augmentation de la luminescence du terbium est la présence de transfert d'énergie. Les deux couples antenne/lanthanide ne peuvent pas être considérés comme indépendants.

Pour comprendre pourquoi l'augmentation du terbium est plus importante que celle de l'euporium pour ces deux peptides, nous avons enregistré le spectre d'excitation du terbium et de l'euporium. Ces spectres permettent de déterminer s'ils sont sensibilisés par leur antenne respective ou si d'autres transferts d'énergie contribuent à la sensibilisation du lanthanide.

Dans les deux cas, le spectre d'excitation du terbium ($\lambda_{em} = 545$ nm), ne se superpose pas complètement au spectre d'excitation de l'euporium ($\lambda_{em} = 700$ nm). La bande présente sur le spectre d'excitation de l'euporium est légèrement plus large vers les grandes longueurs d'onde que celle présente sur le spectre d'excitation du terbium. Cependant le signal de l'euporium étant beaucoup plus faible que le signal du terbium, paramètres utilisés ne sont pas les mêmes. Les fentes utilisées pour les spectres d'excitation de l'euporium sont plus larges (10-20) que celles utilisées pour les spectres d'excitation du terbium (5-10). Cela peut expliquer que le spectre d'excitation de l'euporium soit plus large que celui du terbium.

Les sondes à cuivre sont constituées d'un seul couple antenne/lanthanide. Les spectres

d'excitation du terbium par le tryptophane (CC9[Tb]) et de l'euporium par le naphthalène (CC10(Nap)[Eu]), enregistrés avec les mêmes fentes (5-10), sont peu différents. Le spectre d'excitation de l'euporium par le naphthalène est légèrement plus large vers les grandes longueurs d'onde que celui du du terbium. On peut penser que pour les peptides ratiométriques, malgré la différence dans les conditions d'enregistrement, les deux spectres sont bien légèrement différents. Le terbium serait bien sensibilisé majoritairement par le tryptophane et l'euporium par le naphthalène. Cependant cela ne nous permet pas d'exclure la présence d'autres transferts d'énergie.

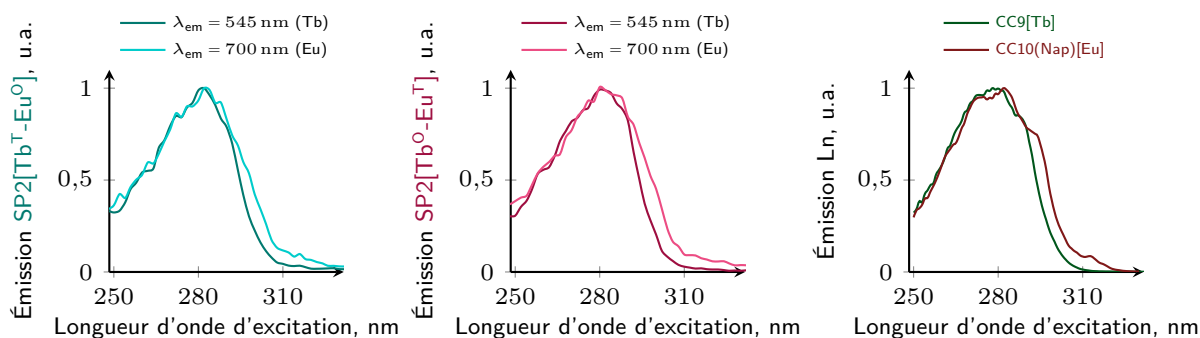


Fig. 4.29 : Spectres d'excitation du terbium et de l'euporium pour les peptides $\text{SP2[Tb}^{\text{T}}\text{-Eu}^{\text{O}}]$ (à gauche) et $\text{SP2[Tb}^{\text{O}}\text{-Eu}^{\text{T}}]$ (au milieu). Spectres d'excitation du terbium pour le peptide CC9[Tb] et de l'euporium pour le peptide CC10(Nap)[Eu] (à droite). Fentes 10-20 pour l'euporium, 10-5 pour le terbium et 10-5 pour les peptides CC9[Tb] et CC10(Nap)[Eu] .

Temps de vie de luminescence : Les mesures de temps de vie de luminescence pour le peptide $\text{SP2[Eu}^{\text{T}}\text{-Tb}^{\text{O}}]$ montrent que l'euporium a un temps de vie unique de 0,62 ms avec et sans zinc. Le terbium présente deux temps de vie : un de 0,20 ms et un de 1,95 ms. Sans zinc, les deux temps de vie ont des poids semblables. En présence de zinc, le temps de vie 1,95 ms est largement prépondérant (90%). Le temps de vie de 1,95 ms est celui observé pour le peptide $\text{SP2[Tb}^{\text{O}}]$, et correspond donc au couple tryptophane/terbium isolé. Le temps de vie de 0,2 ms est plus faible que ce qui est observé pour du terbium avec 9 molécules d'eau dans la sphère de coordination ($\tau_{[\text{Tb}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}} = 0,396 \text{ ms}^{[69]}$). Ce temps de vie correspond à une deuxième population de terbium impliquée dans un transfert d'énergie. Il pourrait s'agir d'un transfert impliquant l'état triplet du naphthalène. L'équipe de S.Faulkner a synthétisé une sonde pour détecter le dioxygène en solution. Cette sonde est basée sur une antenne naphthalène sensibilisant un terbium et un euporium. En l'absence de dioxygène, lorsque le naphthalène est excité ($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$), deux temps de vie sont observés (1,8 – 1,9 ms et 0,25 ms^[185]) mais ne sont pas expliqués.

En conclusion, tous les peptides sont ratiométriques, mais les deux peptides $\text{SP2[Tb}^{\text{T}}\text{-Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2[Tb}^{\text{O}}\text{-Eu}^{\text{T}}]$, ne peuvent pas être utilisés comme sonde ratiométrique car l'émission de l'euporium est trop faible par rapport au terbium. En revanche, pour les peptides $\text{SP2[Eu}^{\text{T}}\text{-Tb}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2[Eu}^{\text{O}}\text{-Tb}^{\text{T}}]$, le rapport de l'émission à 545 nm sur l'émission à 696 ou 702 nm, augmente jusqu'à un équivalent de zinc, avant d'atteindre un plateau. Pour $\text{SP2[Eu}^{\text{T}}\text{-Tb}^{\text{O}}]$ le rapport augmente de 1,2 à 4 ($\times 3,3$) et pour $\text{SP2[Eu}^{\text{O}}\text{-Tb}^{\text{T}}]$ de 0,45 à 3,4 ($\times 7,5$). L'augmentation du rapport $I_{\text{Tb}}/I_{\text{Eu}}$ est plus importante pour le peptide $\text{SP2[Eu}^{\text{O}}\text{-Tb}^{\text{T}}]$ que pour le peptide $\text{SP2[Eu}^{\text{T}}\text{-Tb}^{\text{O}}]$, le contraste de cette sonde est donc meilleur.

4.2.4 Sélectivité

La sélectivité vis-à-vis des métaux physiologiques du bloc d, a été testée uniquement sur les peptides ratiométriques $SP2[Eu^T-Tb^O]$ et $SP2[Eu^O-Tb^T]$. L'émission du peptide a été enregistrée en présence de 1,5 équivalents de métal, puis après l'ajout de 1,5 équivalents de zinc. Pour comprendre l'effet de ces métaux sur l'émission de la sonde, nous discuterons les variations observées dans l'émission de chaque lanthanide, avant d'étudier la sélectivité de la réponse ratiométrique.

Sélectivité du terbium : La présence des différents métaux du bloc d entraîne un légère extinction de l'émission des peptides $SP2[Eu^T-Tb^O]$ et $SP2[Eu^O-Tb^T]$, notamment le cobalt(II) (fig.4.30). Après l'ajout de zinc, l'émission du terbium augmente et l'intensité d'émission est la même, à 7% près, quelque soit le métal présent en plus du zinc. Tous ces métaux n'interfèrent pas dans la réponse de la sonde, comme ce qui est observé pour le peptide $SP2[Tb^O]$ (fig.4.9).

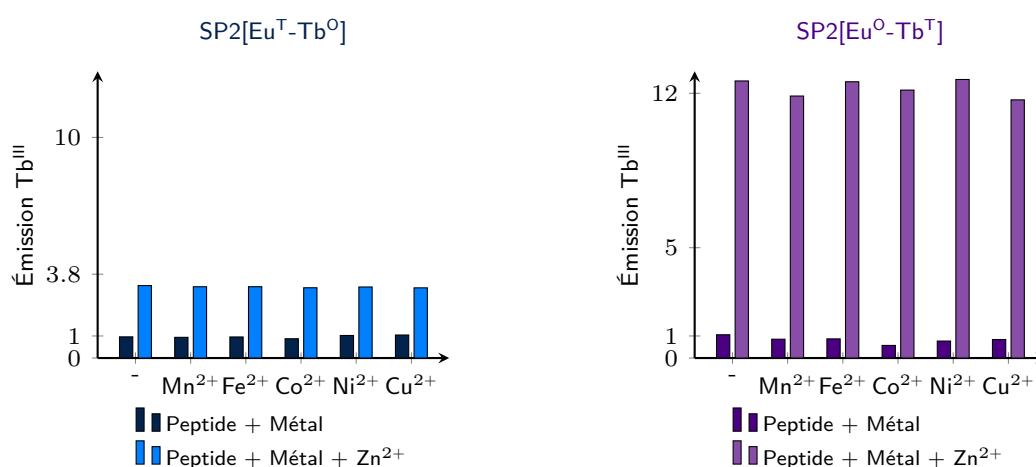


Fig. 4.30 : Sélectivité de l'émission du terbium pour les peptides $SP2[Eu^T-Tb^O]$ et $SP2[Eu^O-Tb^T]$ vis-à-vis des métaux physiologiques du bloc d. Peptide $5\mu M$, HEPES pH 7,5 10 mM , TCEP $250\mu M$. Métaux $8\mu M$. $\lambda_{ex} = 280\text{ nm}$, fentes 10-5, PM 900 V, délai $200\mu s$, temps d'intégration 2 ms.

Sélectivité de l'euporium : L'émission de l'euporium est éteinte par la présence des métaux testé (fig.4.32). Après l'ajout de zinc, l'émission de l'euporium est aussi intense, à 10% près, que pour la sonde seule en présence de zinc. La présence de ces métaux ne perturbe pas l'émission de la sonde liée au zinc.

Le métal qui éteint le plus la luminescence du peptide libre est le cobalt(II). Pour le peptide $SP2[Eu^T-Tb^O]$, le cobalt induit une diminution de $\sim 10\%$ de la luminescence du terbium et de $\sim 60\%$ pour l'euporium. Pour le peptide $SP2[Eu^O-Tb^T]$, le cobalt induit une diminution de $\sim 20\%$ de la luminescence du terbium et de $\sim 70\%$ pour l'euporium.

La luminescence de l'euporium est probablement éteinte, comme l'émission du terbium, par un transfert d'énergie depuis l'euporium vers le cobalt. Ce transfert d'énergie est probablement de type Förster. L'efficacité de ce transfert dépend notamment du recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, de la distance entre donneur (lanthanide) et accepteur (cobalt) ainsi que de l'orientation relative du donneur et de l'accepteur. Les distances estimées à partir de structures pdb (1_MEY et 2GLI) de doigts de zinc classiques $\beta\beta\alpha$ sont de 15 \AA pour la distance cobalt-euporium et de 8 \AA pour la distance

cobalt-terbium. Le terbium est plus proche du cobalt que l'euporium, ce qui est plus favorable pour le transfert d'énergie. D'après les distances, le terbium devrait être plus éteint que l'euporium, or ce n'est pas ce qui est observé.

Le spectre d'absorption du cobalt est large et se situe vers $\sim 550 - 675$ nm lorsqu'il est complexé par deux histidines et deux cystéines (fig.4.31). Le recouvrement spectral est plus important avec l'euporium qu'avec le terbium, ce qui augmente l'efficacité du transfert d'énergie. Ce phénomène est probablement le plus important, c'est pourquoi l'extinction de l'émission de l'euporium est plus importante que celle du terbium.

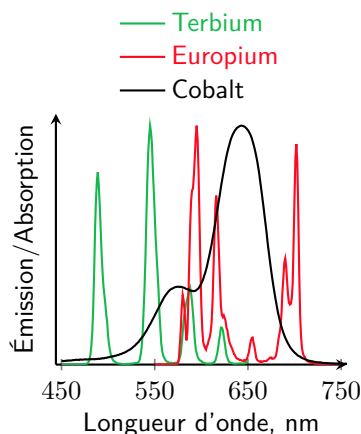


Fig. 4.31 : Superposition des spectres d'émission du terbium et de l'euporium, et du spectre d'absorption du cobalt complexé par deux histidines et deux cystéines d'un peptide doigt de zinc.

Les remarques faites pour le cobalt sont également valables pour les autres métaux, car ils éteignent tous la luminescence de l'euporium et dans une moindre mesure celle du terbium.

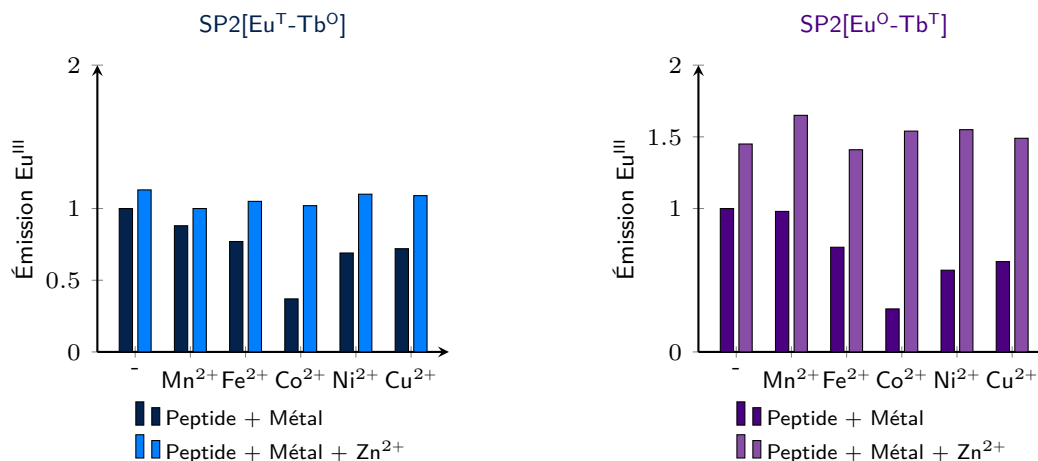


Fig. 4.32 : Sélectivité de l'émission de l'euporium pour les peptides $SP2[Eu^T-Tb^O]$ et $SP2[Eu^O-Tb^T]$ vis-à-vis des métaux physiologiques du bloc d. Conditions idem fig.4.30.

Sélectivité de la réponse ratiométrique : L'extinction de l'émission de l'euporium affecte la réponse ratiométrique. En effet, une diminution du signal à ~ 700 nm, entraîne une augmentation du rapport I_{Tb}/I_{Eu} . L'augmentation de ce rapport n'est donc pas spécifique

de la présence de zinc (fig.4.33). Cependant l'augmentation de ce rapport en présence de cobalt est plus faible qu'en présence de zinc. Pour le peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ seul, le rapport $I_{\text{Tb}}/I_{\text{Eu}}$ est de 1,3. En présence de cobalt ce rapport est de 3, alors qu'il est de 4 en présence de zinc. La réponse ratiométrique du peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ est très affectée par la présence de cobalt. Pour le peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ seul le rapport $I_{\text{Tb}}/I_{\text{Eu}}$ est de 0,4. En présence de cobalt, ce rapport augmente légèrement jusqu'à 0,8, ce qui est faible comparé à la valeur en présence de zinc 3,4. De plus l'augmentation du rapport $I_{\text{Tb}}/I_{\text{Eu}}$ lors de la complexation du zinc est plus faible pour $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ ($\times 3,3$) que pour $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ ($\times 7,5$).

Le peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ présente donc un meilleur contraste et une moindre perturbation par le cobalt, c'est donc la meilleure sonde ratiométrique.

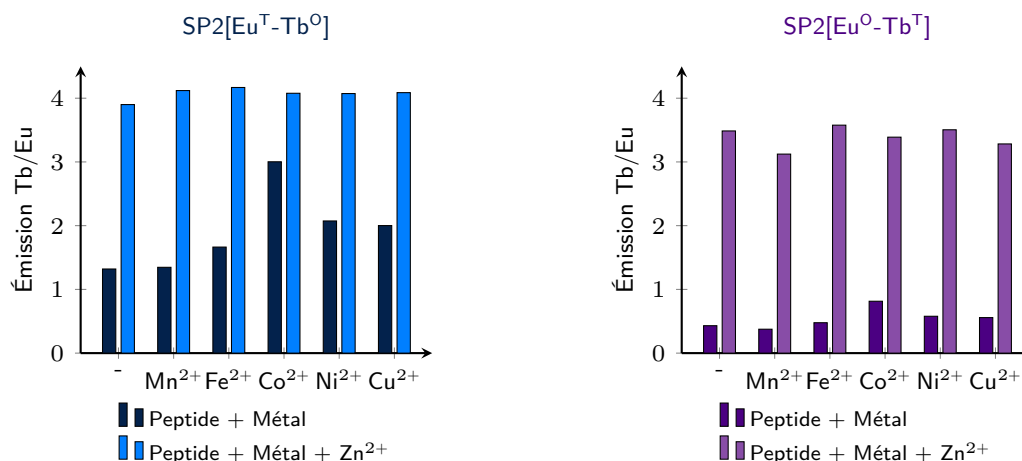


Fig. 4.33 : Sélectivité de la réponse ratiométrique, rapport terbium (545 nm) sur europium (696 ou 702 nm), pour les peptides $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}-\text{Tb}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$.

Nous avons testé la sélectivité de la sonde *in vitro* en ajoutant 1,5 équivalents de tous les métaux du bloc d. Cette sélectivité *in vitro* n'est pas complètement représentative des conditions *in vivo*. Tous les métaux du bloc d ne sont pas présents aux mêmes concentrations dans une cellule. Le zinc, qui est le métal le plus abondant, est en concentration beaucoup plus importante que le cobalt par exemple. De plus, même si ces métaux sont abondants, ils ne sont pas forcément « libres ». Cependant, cette sélectivité *in vitro* nous permet de connaître le comportement de la sonde en présence de ces différents métaux.

4.3 Discussion

Le peptide SP2[Tb^O], basé sur un doigt de zinc $\beta\beta\alpha$, est une sonde qui s'allume en présence de zinc(II) avec un contraste important ($\times 30$). Cette sonde est sélective du zinc parmi les métaux (alcalins, alcalino-terreux et métaux du bloc d) et les anions physiologiques. Comme toutes les sondes en intensité, il est nécessaire de connaître la concentration de la sonde pour obtenir la concentration en zinc. Pour pallier cela, il faut rendre la sonde ratiométrique.

Pour rendre cette sonde ratiométrique, nous avons modifié la séquence du peptide SP2[Tb^O] pour introduire un deuxième couple antenne/lanthanide. Le couple choisi est naphthalène/europium car le naphthalène absorbe à 280 nm comme le tryptophane et permet de sensibiliser l'europlum qui émet dans le visible. L'acide aminé non naturel portant le naphthalène (Fmoc-3-(1-naphtyl)-L-alanine) est introduit du côté N-terminal du peptide à la place de la phénylalanine du peptide SP2[Tb^O], et le DTPA permettant de complexer l'europlum est greffé à la suite. La métallation sélective du DOTA et du DTPA a été mise au point pour obtenir le complexe hétérobimétallique.

Pour le peptide SP2[Eu^T-Tb^O], la luminescence du terbium augmente et la luminescence de l'europlum est quasiment constante. Ce peptide est une sonde dont le signal ratiométrique I_{Tb}/I_{Eu} est presque sélectif du zinc. Cependant l'augmentation de la luminescence du terbium est plus faible ($\times 3, 8$) que celle observée pour le peptide SP2[Tb^O] ($\times 30$). D'autres peptides de la série SP2[Tb^O] ont également montré une augmentation de la luminescence du terbium plus faible que le peptide SP2[Tb^O]. Ce peptide est sensible aux modifications de la séquence. Ce n'est pas le cas de tous les peptides. En effet, une autre série de peptides, pour lesquels la position de l'antenne et du lanthanide sont différentes, est très peu sensible aux modifications.

Pour tester si les chélates (DOTA et DTPA) utilisés et la position des antennes avaient une influence sur la réponse de la sonde, trois autres peptides ont été synthétisés. Pour tous ces peptides les variations de la luminescence du terbium et de l'europlum n'ont pas la même intensité. Tous ces peptides sont donc des sondes ratiométriques. Cependant pour les peptides SP2[Tb^T-Eu^O] et SP2[Tb^O-Eu^T], l'émission du terbium est beaucoup plus intense que l'émission de l'europlum. Le rapport I_{Tb}/I_{Eu} ne peut pas être déterminé avec précision, ils ne sont donc pas exploitables en tant que sonde ratiométrique.

Le peptide SP2[Eu^O-Tb^T] est le peptide pour lequel les variations du rapport I_{Tb}/I_{Eu} sont les plus importantes. De plus, la réponse ratiométrique de ce peptide est sélective du zinc, c'est le meilleur des peptides ratiométriques.

Pour tous les peptides l'augmentation de l'émission du terbium est plus importante que l'augmentation de l'émission de l'europlum. Pour les peptides SP2[Eu^T-Tb^O] et SP2[Eu^O-Tb^T], le tryptophane se rapproche du terbium lors de la structuration du peptide. En revanche, pour les peptides SP2[Tb^T-Eu^O] et SP2[Tb^O-Eu^T], le tryptophane et le chélate complexant le terbium sont greffés de manière consécutive dans la séquence. L'évolution de la luminescence de ces peptides ne peut pas être expliqué par une simple juxtaposition de deux couples antenne/lanthanide. Le mécanisme spectroscopique est plus complexe. En effet, des transferts d'énergie entre les deux couples antenne/lanthanide sont possibles (fig.4.35).

Le transfert d'énergie de l'état triplet du tryptophane vers l'état triplet du naphthalène est possible pour tous les peptides. Dans tous les cas, la distance entre les deux antennes est similaire. Cette distance varie probablement lors de la complexation du zinc, même si les deux antennes restent loin dans la structure.

Le transfert entre le tryptophane et l'europlum est plutôt du transfert d'électron photoinduit : $Trp^* + Eu^{3+} \rightarrow Trp^{\bullet+} + Eu^{2+}$ ^[182,183]. Ce transfert d'électron est non radiatif, et peut

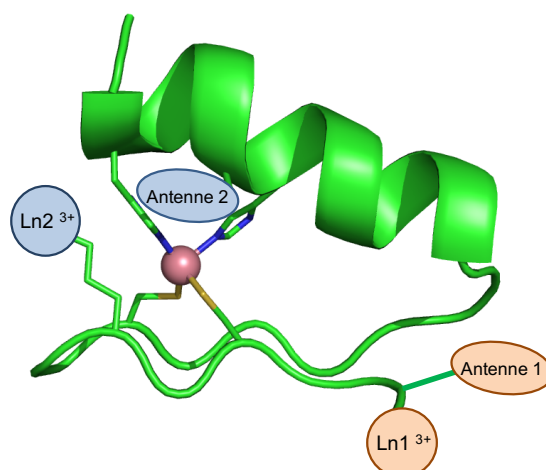


Fig. 4.34 : Structure supposée des sondes ratiométriques à partir de la structure pdb 2GLI.

diminuer la fluorescence du tryptophane, notamment pour les peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}\text{-Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}\text{-Eu}^{\text{T}}]$.

Le transfert d'énergie de l'état triplet du naphthalène ($\sim 21\,000\text{ cm}^{-1}$) vers l'état $^5\text{D}_4$ du terbium ($20\,500\text{ cm}^{-1}$) est également possible en sens inverse grâce à l'énergie thermique^[78]. Dans les peptides $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{T}}\text{-Eu}^{\text{O}}]$ et $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}\text{-Eu}^{\text{T}}]$, la distance entre le naphthalène et le terbium est grande en l'absence de zinc car ils sont loin dans la chaîne peptidique. En présence de zinc, le naphthalène est à $\sim 15\text{ \AA}$ du terbium. Il est possible que le transfert d'énergie du naphthalène vers le terbium soit plus efficace dans le complexe que dans le peptide libre, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'émission du terbium en présence de zinc alors que la distance tryptophane-terbium reste quasiment constante car ils sont à proximité dans la chaîne peptidique.

Les transferts d'énergie entre lanthanides sont possibles^[186,187], cependant le rayon de Förster est souvent faible ($< 10\text{ \AA}$). Dans nos peptides, les deux lanthanides sont éloignés ($> 15\text{ \AA}$), le transfert est probablement peu efficace.

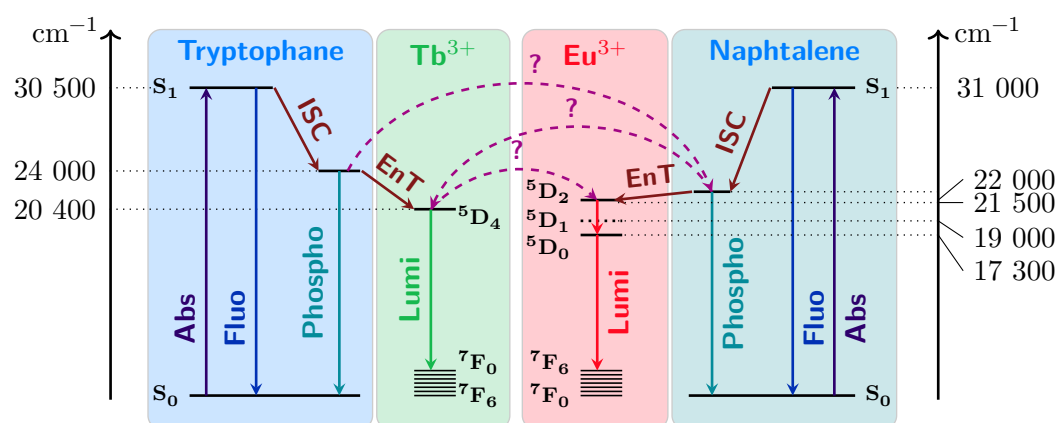


Fig. 4.35 : Diagramme de Jablonski pour le couple tryptophane/terbium et naphthalène/europium. En violet : les transferts d'énergie possibles.

Enfin, le rendement quantique du terbium est de 1,6% pour le peptide $\text{SP2}[\text{Tb}^{\text{O}}]$ lié au zinc. Pour le peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{T}}\text{-Tb}^{\text{O}}]$, le rendement quantique du terbium atteint seulement 0,11%

en présence de métal. L'émission du terbium dix fois plus faible pour le peptide ratiométrique que pour le peptide avec un seul couple antenne/lanthanide. Les voies de désexcitations non radiatives sont plus importantes pour le peptide ratiométrique. Il est possible que l'émission du terbium augmente lors de la complexation du zinc car la désexcitation non radiative est moins importante, et pas uniquement car la distance entre le tryptophane et le terbium diminue.

Au final, le mécanisme spectroscopique de ces sondes est plus complexe qu'une juxtaposition de deux couples antenne/lanthanide, d'autres transferts d'énergie interviennent probablement mais nous n'avons pas assez d'éléments pour pouvoir déterminer lesquels sont prépondérants. Afin de déterminer quels transferts d'énergie ont lieu, il faudrait synthétiser d'autres peptides en enlevant un élément : remplacer une antenne par un acide aminé non aromatique, ou remplacer un des lanthanides par du lanthane(III).

Même si nous n'avons pas élucidé le mécanisme spectroscopique des peptides ratiométriques, le peptide $\text{SP2}[\text{Eu}^{\text{O}}-\text{Tb}^{\text{T}}]$ permet la détection ratiométrique et sélective du zinc. De plus l'écart en longueur d'onde entre les deux émissions est important (150 nm). Parmi les sondes ratiométriques à zinc existantes, parfois le contraste des sondes est important mais le signal ratiométrique n'est pas toujours sélectif du zinc^[54,58,188], ou bien l'écart entre les longueurs d'onde est faible (30 – 40 nm)^[58,189]. Cependant certaines de ces sondes ont tout de même été utilisées *in cellulo*^[54,189,190].

4.4 Conclusion

L'association d'un peptide modèle avec un lanthanide a permis de concevoir une sonde en intensité qui s'allume sélectivement en présence de zinc. Le changement d'intensité repose sur la variation de la conformation du peptide lors de la complexation du zinc, ce qui permet de rapprocher l'antenne et le lanthanide. La détection en temps résolu permet d'éliminer les phénomènes de fluorescence, qui pourraient perturber le signal.

L'ajout d'un deuxième couple antenne/lanthanide a permis de rendre cette sonde ratiométrique. Le comportement de ces sondes est difficile à prévoir car le mécanisme spectroscopique de ces sondes est complexe et fait intervenir d'autres transferts d'énergie que le transfert de l'antenne vers le lanthanide associé. Néanmoins pour un des quatre peptides synthétisés, les variations de l'émission du terbium et de l'euporium sont telles que la sélectivité est acceptable.

Un des points faibles de cette sonde est l'excitation dans l'UV, à 280 nm. Pour déplacer l'excitation et l'émission du peptide vers le visible et le proche infrarouge, nous avons synthétisé un peptide avec une antenne permettant de sensibiliser un lanthanide émettant dans le proche infrarouge. Ce peptide est décrit dans le chapitre suivant (cf §5).

Sonde à zinc émettant dans le proche infrarouge

5.1	SYNTHÈSE	112
5.2	CARACTÉRISATIONS	114
5.2.1	Étude du TTHA dans le visible	114
5.2.2	Complexation du zinc	115
5.2.3	Propriétés spectroscopiques	115
5.3	TESTS CELLULAIRES	119
5.4	Discussion	120

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'il est possible de concevoir une sonde à partir d'un peptide doigt de zinc, dont la structuration en présence de métal permet de rapprocher l'antenne du lanthanide et d'allumer la sonde. Un des inconvénients de la sonde SP2[Tb^O] est qu'elle est excitée dans l'UV et qu'elle émet dans le visible. Pour profiter de la fenêtre de transparence des milieux biologiques, il faut décaler l'excitation et l'émission vers le visible et le proche infrarouge.

Il existe quelques sondes moléculaires à zinc dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont réciproquement dans le visible et le proche infrarouge. Comme pour les sondes émettant dans le visible, les sondes organiques émettant dans le proche infrarouge sont souvent basées sur le transfert d'électron photoinduit entre la partie chélatant le métal et le chromophore. Le PET éteint la fluorescence du chromophore en l'absence de métal. La complexation du métal empêche ce PET et le chromophore retrouve sa fluorescence. Les chromophores utilisés sont basés sur des cyanines, des Bodipys, ou des naphthalènediimides^[49,58]. Une autre possibilité pour déplacer l'excitation, est d'utiliser des chromophores optimisés pour l'absorption à deux photons^[191].

De nombreux lanthanides ont une bande d'émission dans le proche infrarouge : praséodyme, néodyme, samarium, dysprosium, holmium, erbium, thulium. Cependant pour de nombreux lanthanides d'autres transitions sont possibles correspondant à des émissions dans l'ultraviolet et dans le visible, et souvent les rendements quantiques de l'émission dans le proche infrarouge sont faibles^[153]. Les lanthanides les plus utilisés pour leur émission dans le proche infrarouge sont l'ytterbium, le néodyme et l'erbium.

L'ytterbium n'a qu'une seule transition possible située vers 1025 nm. De plus, cette transition correspond à un écart énergétique plus important que pour le néodyme et l'erbium. L'ytterbium est donc moins sensible aux désexcitations non radiatives que le néodyme et l'erbium. Les meilleurs rendements quantiques sont souvent obtenus avec l'ytterbium^[166]. À l'inverse, l'erbium dont l'émission se situe vers 1550 nm est le lanthanide le plus sensible aux désexcitations non radiatives et donc celui pour lequel les rendements quantiques sont les plus faibles. Les rendements quantiques des lanthanides émettant dans le proche infrarouge sont souvent très faibles : $\sim 10^{-3}$ pour l'ytterbium, $\sim 10^{-4}$ pour le néodyme et $\sim 10^{-5}$ pour l'erbium^[153,166].

Pour augmenter les rendements quantiques, il est possible d'augmenter le transfert d'énergie de l'antenne vers le lanthanide, ou de diminuer les désexcitations non radiatives, ou encore augmenter le rendement intrinsèque du lanthanide. En optimisant ces paramètres, certains complexes ont des rendements quantiques plus importants de l'ordre de quelques 10^{-2} ^[192] et même $1,2 \cdot 10^{-1}$ ^[167]. Tous ces rendements quantiques sont bien souvent déterminés dans des solvants organiques car dans l'eau, les rendements quantiques sont plus faibles à cause des vibrateurs O-H dans l'environnement proche du lanthanide^[86].

Pour déplacer l'émission de la sonde SP2[Tb^O] (cf §4), vers le proche infrarouge nous avons utilisé l'antenne NBD (7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-4-amine) qui permet de sensibiliser le néodyme (cf §3.3). Le peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] a la même séquence que le peptide SP2[Tb^O], la seule différence est le remplacement du tryptophane par l'acide aminé non naturel portant le NBD (fig.5.1).

Dans ce peptide, le néodyme est complexé par un DOTA, qui ne permet pas de saturer la sphère de coordination du lanthanide, une molécule d'eau est présente comme neuvième ligand. Afin de saturer la sphère de coordination du lanthanide et essayer d'améliorer le rendement

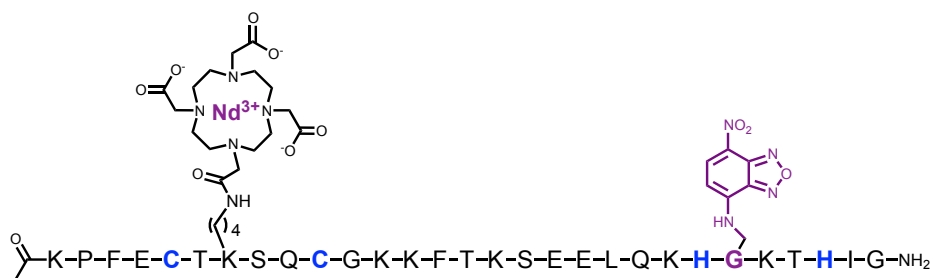


Fig. 5.1 : Séquence du peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}].

quantique du peptide, nous avons synthétisé un deuxième peptide où le néodyme est complexé par un TTHA, polyaminocarboxylate décadentate (fig.5.2). Ce ligand a été utilisé par P.Selvin pour de nombreuses études de complexation du terbium et de l'euprium^[170,184,193,194].

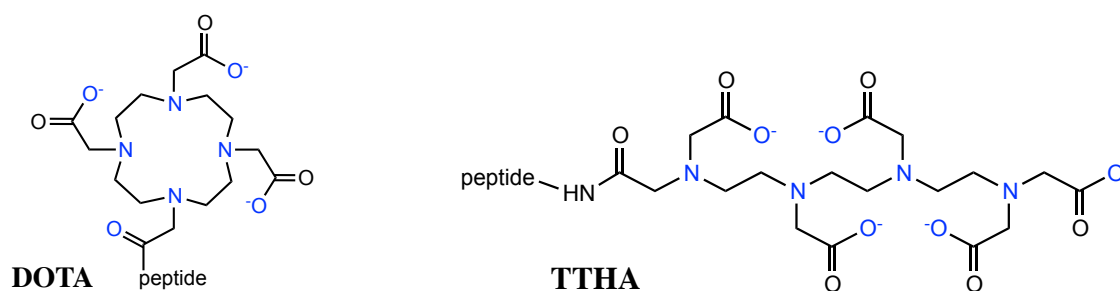


Fig. 5.2 : Structure du DOTA et du TTHA liés aux peptides.

5.1 Synthèse

Les deux peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] ne diffèrent que par le chélate permettant de lier le lanthanide. Le chélate est introduit en dernier sur le peptide. La synthèse est donc identique pour ces deux peptides, sauf la dernière étape (fig.5.3).

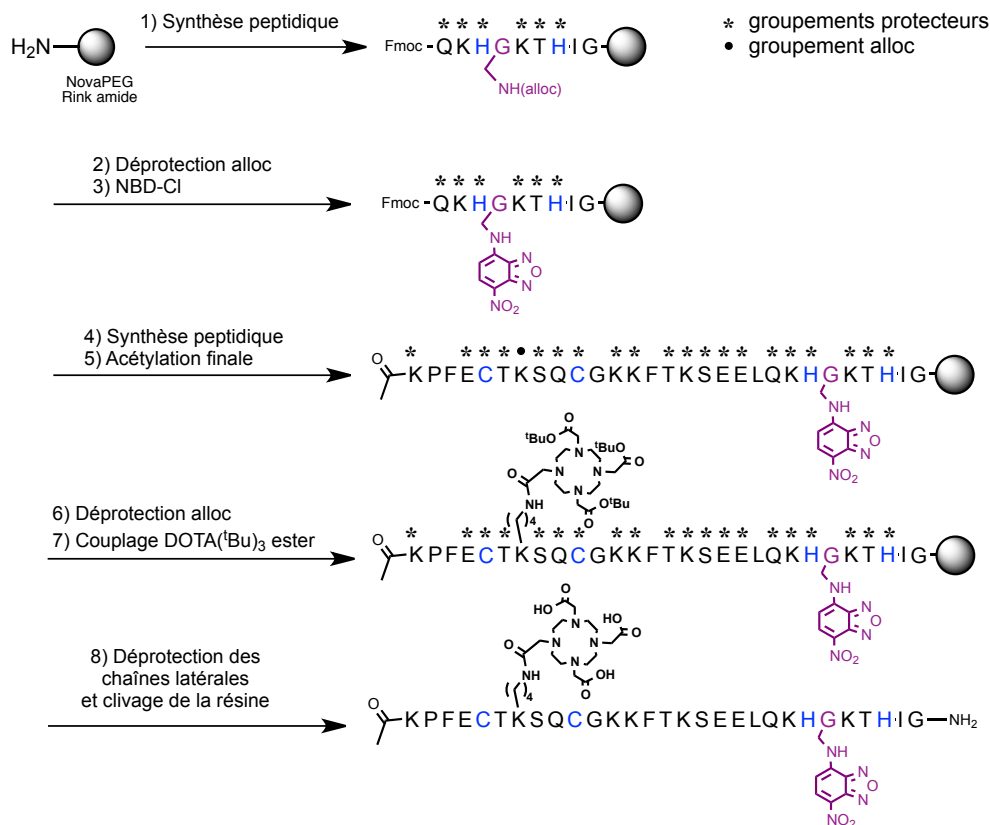


Fig. 5.3 : Synthèse du peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}]. **1) SPPS.** Couplage : DIEA, Fmoc-AA-OH, PyBOP dans la DMF. Déprotection du groupement Fmoc : pipéridine dans la DMF. **2) Déprotection sélective alloc :** Pd(Ph₃)₄, phénylsilane dans le DCM. **3) Couplage NBD-Cl :** NBD-Cl, DIEA DCM/DMF 1/1. **4) SPPS :** idem 1). **5) Acétylation terminale :** Ac₂O/pyridine/DMF (1/2/7). **6) Déprotection alloc :** Pd(Ph₃)₄, phénylsilane dans le DCM. **7) Couplage du DOTA :** DIEA, DOTA(^tBu)₃, PyBOP dans la DMF. **8) Déprotection des chaînes latérales et clivage de la résine.** TFA, TIS, H₂O, DTT, Thioanisole.

La synthèse de ces peptides est similaire à celle de SP2[Tb^O]. Le peptide est synthétisé en phase solide par le robot de synthèse peptidique. La seule différence par rapport au peptide SP2[Tb^O] est l'introduction de l'antenne (fig.5.3). L'acide aminé portant l'antenne NBD est synthétisé en deux étapes. Dans un premier temps, l'acide aminé commercial Fmoc-Dap(alloc)-OH est introduit dans la séquence peptidique. Les trois acides aminés suivants sont greffés, puis la synthèse est arrêtée (après la glutamine, Q). Le groupement protecteur alloc de l'acide aminé H₂N-Dap(alloc)-OH est déprotégé au palladium(0) en présence de phénylsilane. L'amine libérée sur la chaîne latérale du Dap a un pKa de 8,5, qui est trop bas pour provoquer la déprotection de l'amine de la chaîne principale (Fmoc-NH₂-peptide), contrairement à ce qui a été rapporté pour la lysine (pKa=10,1)^[195] dont l'amine libérée provoque le départ du Fmoc en N-ter. Même si cette réaction de déprotection parasite n'a pas été décrite pour le Dap nous avons choisi de greffer trois acides aminés derrière le Dap

avant la déprotection pour éviter tout effet de proximité.

La synthèse peptidique est terminée à l'aide du robot de synthèse peptidique. Le peptide est acétylé. La lysine(alloc) est déprotégée au palladium(0) en présence de phénylsilane. Le DOTA et le TTHA sont introduits sous forme protégée : DOTA(t Bu)₃ ester et TTHA(t Bu)₄ ester. Le DOTA(t Bu)₃ ester est commercial. Le TTHA(t Bu)₄ ester a été synthétisé sur support solide (fig.5.4) par V.Chabert au laboratoire, en s'inspirant du protocole développé pour le DOTA^[196].

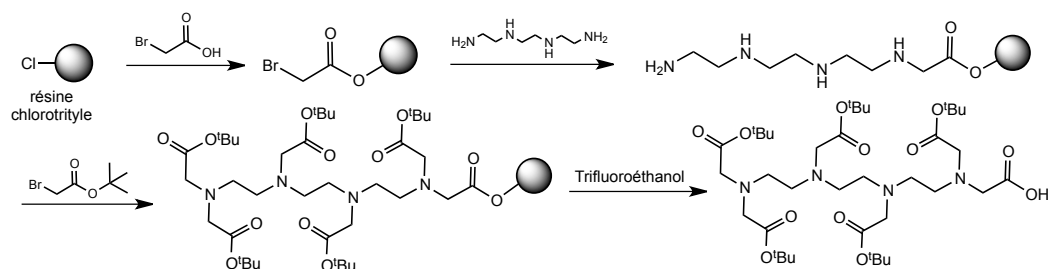


Fig. 5.4 : Synthèse du TTHA(t Bu)₄ ester par L.Raibaut.

Enfin le peptide est déprotégé au TFA, précipité, et purifié par HPLC préparative. Il est ensuite métallé avec du néodyme et purifié sur colonne Water Oasis en conditions non acides. Avant et après métallation, le peptide est caractérisé en spectrométrie de masse et sa pureté est contrôlée par HPLC analytique.

5.2 Caractérisations

Afin de vérifier si le TTHA permet bien de saturer la sphère de coordination du lanthanide, le TTHA a d'abord été greffé sur un peptide comportant un tryptophane comme antenne par L.Raibaut. Ainsi l'étude du temps de vie de luminescence du terbium permet de déterminer le nombre de molécules d'eau dans sa sphère de coordination.

Ensuite, la complexation du zinc par les peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] a été étudiée par dichroïsme circulaire. L'étude spectroscopique de ces peptides dans le visible (absorbance et fluorescence) a été réalisée au laboratoire puis l'étude dans le proche infrarouge a été réalisé avec S.Eliseeva à Orléans.

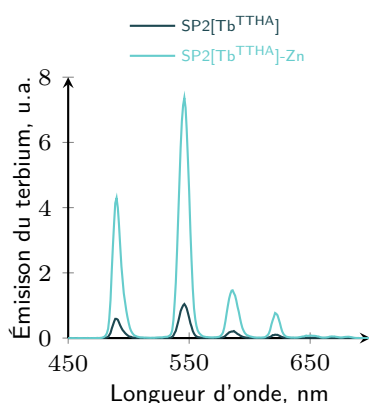
5.2.1 Étude du TTHA dans le visible

La synthèse du peptide SP2[Tb^{TTHA}] est similaire à celle du peptide SP2[Tb^O]. L'augmentation de la luminescence du terbium est plus faible ($\times 7,1$, fig.5.5) que pour le peptide SP2[Tb^O] ($\times 30$). L'augmentation de la luminescence du terbium pour ce peptide est sensible aux modifications du peptide.

Le temps de vie de luminescence du terbium du peptide SP2[Tb^{TTHA}] dans l'eau légère est plus long pour le peptide SP2[Tb^{TTHA}] (2,25 ms) que pour le peptide SP2[Tb^O] (1,96 ms). Cela suggère l'absence de molécule d'eau dans la sphère de coordination du terbium lorsqu'il est complexé par le TTHA. Les mesures du temps de vie de luminescence du terbium dans l'eau légère et dans l'eau lourde permettent de déterminer le nombre de molécules d'eau présent dans la sphère de coordination du lanthanide^[86]. Ainsi le nombre de molécules d'eau calculé est $q = -0,1 \pm 0,3$, le TTHA permet bien de saturer la sphère de coordination du terbium.

Ces temps de vie ne sont quasiment pas modifiés par l'ajout de zinc (fig.5.5). Il n'y a pas de modification de la sphère de coordination du terbium lors de la complexation du zinc.

Le temps de vie de luminescence du terbium pour le peptide SP2[Tb^{TTHA}] dans l'eau lourde (2,49 ms) est différent du temps de vie dans l'eau légère. On peut supposer que la première sphère de coordination du terbium est identique dans l'eau légère et dans l'eau lourde. La différence de temps de vie serait donc dû à la présence des molécules d'eau dans la deuxième sphère de coordination du lanthanide.



SP2[Tb ^{chélate}]	DOTA		TTHA	
	-	Zn	-	Zn
Luminescence Tb	$\times 30$		$\times 7,1$	
$\tau_{\text{H}_2\text{O}}, \pm 0,03$ ms	1,96	1,97	2,26	2,25
$\tau_{\text{D}_2\text{O}}, \text{ms}$	3,45	3,44	2,49	2,49
$q \pm 0,3$	0,80	0,78	-0,08	-0,10

Fig. 5.5 : (À gauche) Spectres d'émission du terbium pour le peptide SP2[Tb^{TTHA}] seul et en présence de zinc. (À droite) Comparaison des peptides SP2[Tb^O] et SP2[Tb^{TTHA}].

5.2.2 Complexation du zinc

La complexation du zinc(II) par le peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] est étudiée par dichroïsme circulaire. Le spectre du peptide libre est semblable à celui du peptide SP2[Tb^O] : négatif à 200 nm avec un épaulement à 225 nm. Le peptide libre est partiellement replié.

Lors de l'ajout de zinc, le signal de dichroïsme circulaire augmente à 200 nm, et un minimum local apparaît à 206 nm. Le peptide se structure en présence de zinc. Le signal de dichroïsme varie linéairement jusqu'à un équivalent, et atteint un plateau. Le peptide forme bien un complexe 1 : 1 avec le zinc(II), comme le peptide SP2[Tb^O].

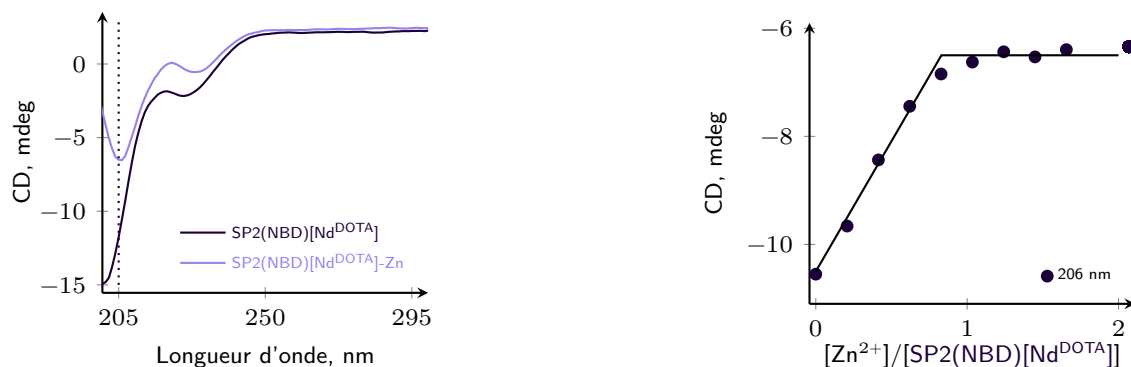


Fig. 5.6 : Titration du peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] suivi par dichroïsme circulaire. SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] 12 μ M, Pi pH 7,5 20 mM, DTT 1 mM, dégazé. Ajouts ZnCl₂ 1,62 mM.

La concentration du peptide avec le TTHA est deux fois plus faible que celle du peptide avec le DOTA, c'est pourquoi le signal est moins intense pour le peptide SP2(NBD)[Nd^{TTHA}]. Dans le spectre du peptide SP2(NBD)[Nd^{TTHA}], le signal à 200 nm est moins négatif et le minimum local à 225 nm semble moins prononcé que dans le spectre du peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}]. Les structures des deux peptides ne sont pas complètement identiques. Après l'ajout de zinc, un deuxième minimum local apparaît à 205 nm, comme pour le peptide avec le DOTA et comme pour le peptide SP2[Tb^O]. Ces deux peptides sont donc bien structurés en présence de zinc.

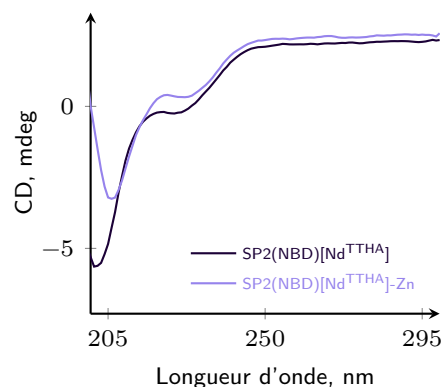


Fig. 5.7 : Spectres de dichroïsme circulaire du peptide SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] seul et en présence de zinc. SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] 6 μ M, Pi pH 7,5 20 mM, DTT 1 mM, dégazé. Ajouts ZnCl₂ 1,62 mM.

5.2.3 Propriétés spectroscopiques

Les cystéines de ces peptides sont sensibles à l'oxydation par le dioxygène de l'air. Les titrages sont effectués à l'air. Pour réduire les ponts disulfures éventuellement formés, le réducteur habituellement utilisé est la tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Cette phosphine est utilisée préférentiellement au dithiothréitol (DTT), car elle est moins sensible à l'oxydation par l'air et ne lie pas les métaux divalents qui nous intéressent (Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ ...)^[173]. Les complexes entre la TCEP et ces métaux ne sont pas formés aux concentrations où nous travaillons. Cependant lors de l'ajout de TCEP sur le peptide, on observe une modification du spectre d'absorption

et une diminution de la fluorescence. La TCEP réagit avec le NBD. Le réducteur utilisé pour ces peptides portant une antenne NBD est donc le DTT, qui ne réagit pas avec le NBD. Le pont disulfure intramoléculaire de la forme oxydée du DTT absorbe à 280 nm^[197]. Une bande d'absorption à 280 nm se forme avec le temps lors des titrages en absorption UV-Visible.

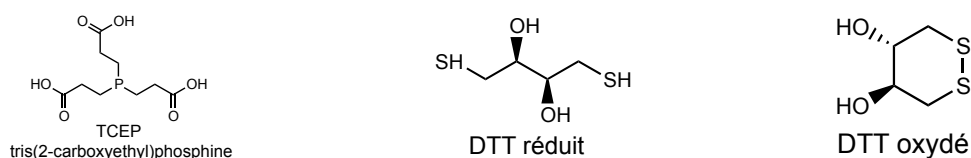


Fig. 5.8 : Structure de la TCEP, et du DTT sous forme réduite et oxydée.

Absorption UV-Vis :

Le spectre d'absorption présente deux bandes : une à 340 nm liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et une bande de transfert de charge à 480 nm. La bande à 480 nm se déplace vers le bleu en présence de zinc (fig.5.9). En effet, le NBD est très sensible à l'environnement^[198], et à la présence d'un métal^[157]. Ce déplacement hypsochrome est plus marqué pour le peptide, où le néodyme est complexé par le DOTA ($\delta\lambda = 8$ nm) que par le TTHA ($\Delta\lambda = 3$ nm).

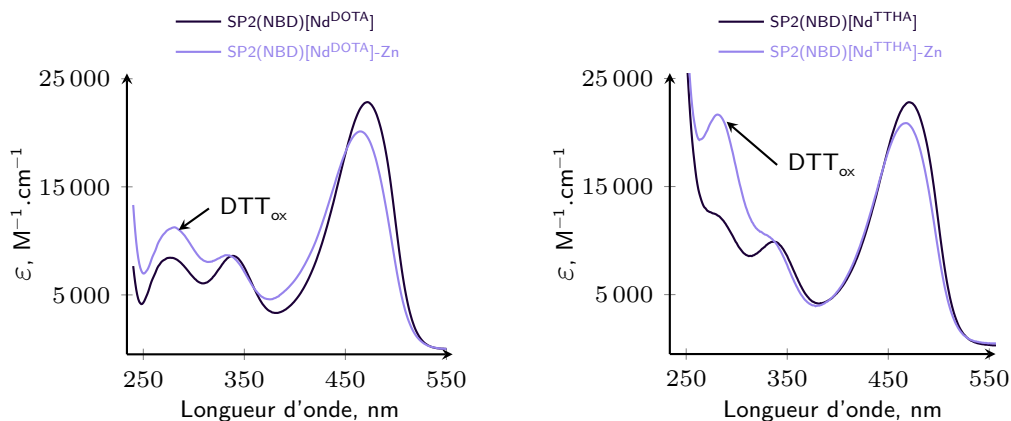


Fig. 5.9 : Spectres d'absorption UV-Vis des peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] seul et en présence de zinc. SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] 30 μ M ou SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] 6 μ M, Pi pH 7,5 10 mM, DTT 1 mM. Ajouts ZnCl₂ 1,62 mM.

Fluorescence : Lors du titrage des peptides par le zinc, la fluorescence du NBD diminue de manière linéaire jusqu'à un équivalent, alors que pour le peptide SP2[Tb^O] la fluorescence du tryptophane augmente en présence de zinc. Dans tous les cas la fluorescence est sensible au changement d'environnement induit par la complexation du zinc, mais les effets ne sont pas les mêmes.

Les changements observés pour le peptide avec le TTHA sont plus faibles (20% d'extinction de la fluorescence et déplacement hypsochrome de 2 nm) que pour le peptide avec le DOTA (40% d'extinction de la fluorescence et déplacement hypsochrome de 7 nm). Il est possible que l'environnement du NBD ne soit pas complètement le même dans les deux peptides lié au zinc.

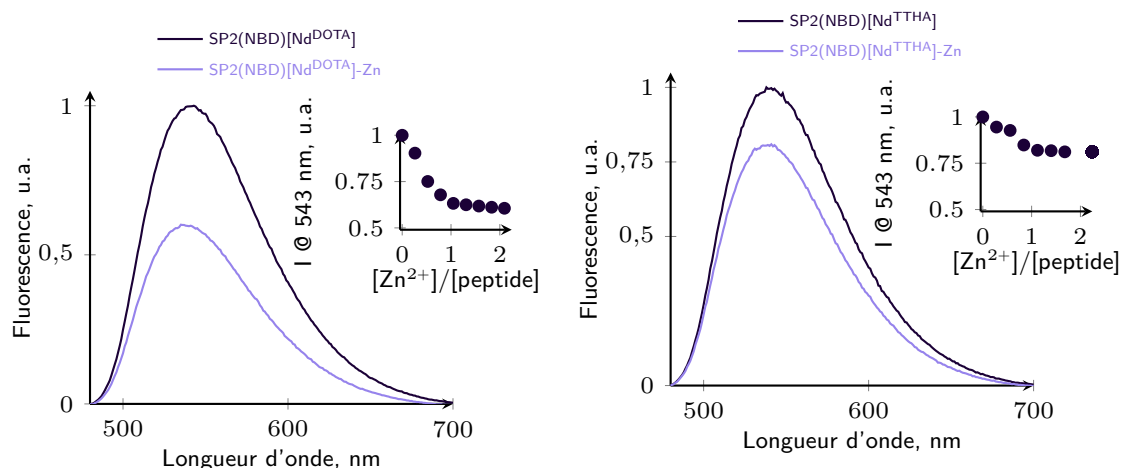


Fig. 5.10 : Titrage des peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] suivi en fluorescence. SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] 12 μ M SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] 6 μ M, Pi 20 mM, DTT 1 mM, dégazé. Ajouts ZnCl₂ 1,62 mM.

La bande d'absorption du NBD à 480 nm est une bande de transfert de charge. C'est probablement depuis cet état excité à transfert de charge que la sensibilisation du néodyme a lieu. Une augmentation de l'efficacité du transfert d'énergie vers le néodyme aurait pour conséquence de dépeupler cet état excité et donc de diminuer la fluorescence. Si l'efficacité du transfert d'énergie vers le néodyme augmente plus pour le peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}], que pour le peptide SP2(NBD)[Nd^{TTHA}], cela pourrait également expliquer l'extinction plus importante de la fluorescence pour le peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] que pour le peptide SP2(NBD)[Nd^{TTHA}].

Émission du néodyme : Lorsque les peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] sont excités à 480 nm, ce qui correspond à l'absorption du NBD, l'émission du néodyme 1060 nm est visible (fig.5.13). Afin de vérifier que l'émission du néodyme est bien due à la sensibilisation par le NBD, nous avons enregistré les spectres d'excitation du néodyme. Ces spectres d'excitation ($\lambda_{em} = 1060$ nm) présentent deux bandes : une à 340 nm et la plus intense à 475 nm (fig.5.12). Ces spectres ressemblent aux spectres d'absorption du peptide, c'est bien l'excitation du NBD qui conduit à l'émission du néodyme. Le NBD sensibilise bien le néodyme. Pour le peptide avec le DOTA, on peut observer un très léger décalage hypsochrome du spectre d'excitation, comme pour le spectre d'absorption.

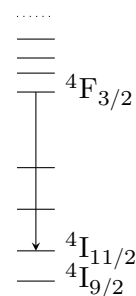


Fig. 5.11 : Niveaux d'énergie du néodyme.

Dans le spectre d'émission du néodyme, seule la bande à 1060 nm, correspondant à la transition ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ est visible. Cette bande n'a pas la même forme pour les deux peptides, bien que les fentes soient identiques dans les deux cas. Le spectre du peptide avec le TTHA présente une seule bande. Sur le spectre du peptide avec le DOTA, on observe un léger épaulement. Le niveau ${}^4I_{5/2}$ étant dégénéré, le champ des ligands créé par le DOTA, plus symétrique que le TTHA, permet de lever partiellement cette dégénérescence.

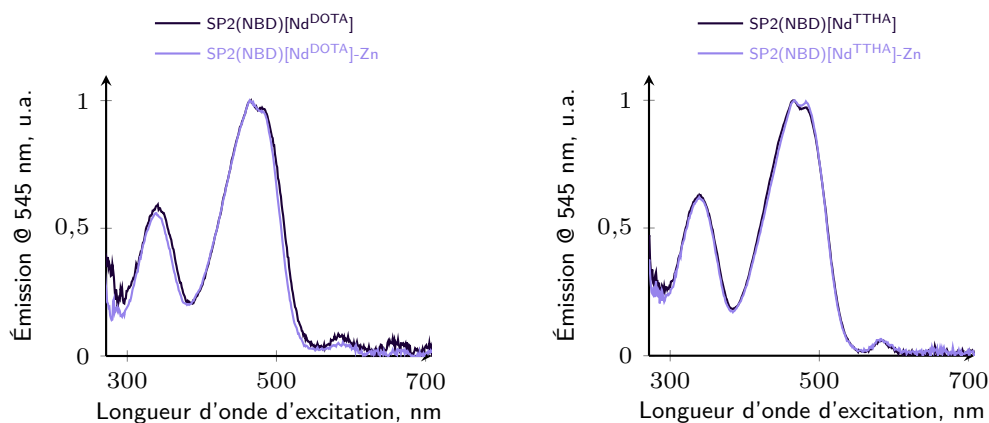


Fig. 5.12 : Spectres d'excitation du néodyme pour les peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}]. SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] 230 μ M et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] 275 μ M, HEPES pH 7,5 10 mM, DTT 5 mM. $\lambda_{em} = 1060$ nm, fentes 14-14. Zinc 350 μ M.

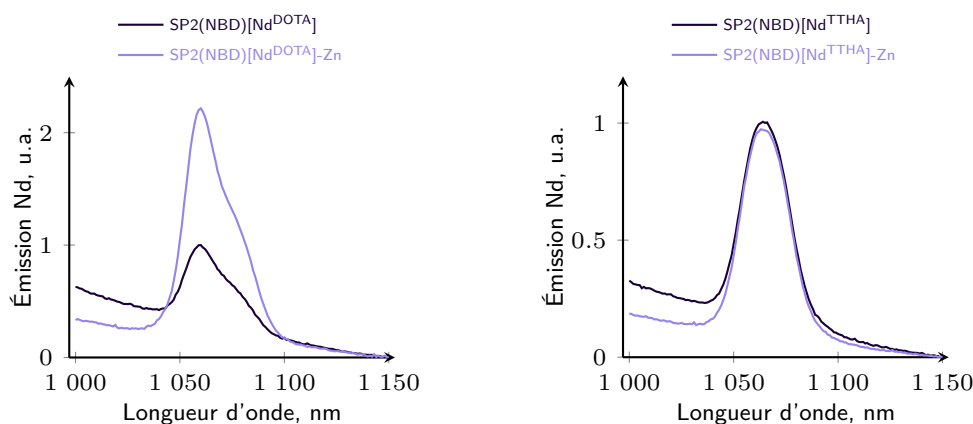


Fig. 5.13 : Spectres d'émission du néodyme pour les peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}]. SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] 230 μ M et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] 275 μ M, HEPES pH 7,5 10 mM, DTT 5 mM. $\lambda_{ex} = 480$ nm, fentes 10-14. Zinc 350 μ M (SP2(NBD)[Nd^{DOTA}]) ou 430 μ M (SP2(NBD)[Nd^{TTHA}]).

La ligne de base des spectres n'est pas plate (fig.5.13). Une émission se superpose à l'émission du néodyme, il s'agit de la fluorescence résiduelle du NBD. Les spectres sont enregistrés sans délai car le temps de vie du néodyme est très court : 100 – 175 ns, (fig.5.14). En effet, la transition $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$ est autorisée de spin ($\Delta S = 0$), et les désexcitations non radiatives sont importantes, l'état excité est donc dépeuplé rapidement.

Le temps de vie du néodyme est plus important pour les peptides avec le TTHA que pour le DOTA. Cela est cohérent avec l'absence de molécule d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide lorsque celui-ci est chélaté par le TTHA. Lors de l'ajout de zinc, le temps de vie du néodyme ne varie quasiment pas. La sphère de coordination du lanthanide n'est pas modifié par la complexation du zinc.

SP2(NBD)[Nd]	$\tau_{Nd} \pm 1$ ns	
	-	Zn
DOTA	103	106
TTHA	173	168

Fig. 5.14 : Temps de vie du néodyme, déterminés par S.Eliseeva.

Les rendements quantiques des deux peptides sont très faibles ($\sim 10^{-6}$). L'émission du néodyme n'est pas intense. La fluorescence résiduelle de l'antenne n'est donc pas négligeable devant l'émission du néodyme, c'est pourquoi elle est visible sur les spectres d'émission du néodyme (fig.5.13).

Le rendement quantique d'émission du peptide libre ($\Phi_{\text{Nd}}^{\text{NBD}}$) est plus faible pour le peptide avec le DOTA qu'avec le TTHA (fig.5.15), probablement à cause de la présence de la molécule d'eau. Cependant l'écart n'est pas très important. Le rendement quantique du peptide avec le TTHA est seulement deux fois plus important que celui avec le DOTA. Cela est cohérent avec les temps de vie. Le temps de vie d'émission du néodyme est presque deux fois plus long pour le peptide avec TTHA que pour le peptide avec le DOTA.

Après l'ajout de zinc les rendements quantiques sont multipliés par 2,7 pour le peptide avec le DOTA et 1,08 pour le peptide avec le TTHA. Comme pour toutes les techniques spectroscopiques, les changements observés pour le peptide avec le TTHA sont plus faibles qu'avec le DOTA.

$\Phi_{\text{Nd}}^{\text{NBD}} \pm 0,02, \%$	DOTA	TTHA
Peptide	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$7,3 \cdot 10^{-4}$
Peptide-Zn	$9,3 \cdot 10^{-4}$	$7,9 \cdot 10^{-4}$

Fig. 5.15 : Rendements quantiques d'émission du néodyme, déterminés par S.Eliseeva par la méthode de la sphère d'intégration.

5.3 Tests cellulaires

L'émission du néodyme étant faible, nous avons testé *in vitro* s'il est possible de visualiser l'émission du peptide au microscope. Pour cela une photo de capillaires contenant une solution de peptide ($200 \mu\text{M}$) a été prise au microscope avec un filtre passe bas dont la bande passante est située dans le proche infrarouge ($\lambda > 770 \text{ nm}$). Les trois capillaires correspondent au peptide dans le tampon HEPES seul, en présence de guanidinium et en présence de zinc(II). L'ajout de guanidinium, qui est un dénaturant, permet de s'assurer que le peptide n'est pas en partie replié en l'absence de zinc(II).

Sur la photo, il est difficile d'observer une différence entre les tubes. Nous pensons que l'émission observée provient, en grande partie, de la fluorescence résiduelle de l'antenne et non du néodyme. Pour être capable d'imager l'émission du néodyme, il faut donc augmenter le rendement quantique du néodyme ou diminuer la fluorescence résiduelle de l'antenne.

Nous avons tout de même utilisé ces deux peptides pour les premiers tests *in cellulo*. L'objectif est de déterminer si ces peptides sont capables d'entrer dans les cellules et s'ils

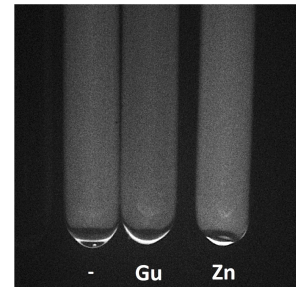


Fig. 5.16 : Image au macroscopie, avec un filtre proche infrarouge ($\lambda > 770 \text{ nm}$), des capillaires contenant le peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] seul (gauche), en présence de guanidinium (milieu), ou de zinc (droite). SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] $200 \mu\text{M}$, tampon HEPES 10 mM , DTT 5 mM . Ajouts de guanidinium 6 M ou de zinc(II) $350 \mu\text{M}$.

sont cytotoxiques. Les peptides ont été mis au contact des cellules pendant 12 heures. Au bout de ces 12 heures, les cellules incubées avec le peptide portant le TTHA sont mortes. En revanche, les cellules incubées avec le peptide portant le DOTA sont toujours vivantes et se divisent. Le peptide avec le TTHA semble toxique mais pas le peptide avec le DOTA.

Pour les cellules incubées avec le peptide portant le DOTA, l'émission du néodyme n'est pas détectable, le peptide est donc visualisé par la fluorescence du NBD (fig.5.17). Les images obtenues en transmission, permettent de visualiser les cellules. La superposition de ces images avec les images obtenues en fluorescence, permet de visualiser la répartition de la sonde par rapport aux cellules. Ainsi on peut voir que le NBD semble localisé à l'intérieur des cellules (fig.5.17). On peut donc penser que la sonde est entrée dans les cellules sauf si elle a été hydrolysée et que la fluorescence observée provient d'un fragment du peptide contenant le NBD.

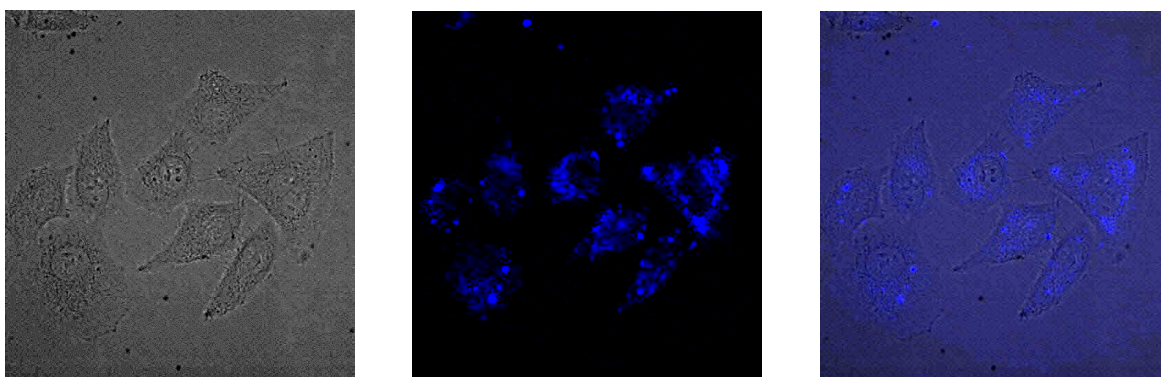


Fig. 5.17 : Image en transmission (à gauche) en fluorescence (au milieu) et superposition (à droite) de cellules HeLa incubées avec le peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}]. Cellules HeLa incubées pendant 12 heures avec 100 μ M de peptide SP2(NBD)[Nd^{DOTA}], dissout dans un milieu OPTIMEM avec 2% de sérum de veau fœtal. $\lambda_{\text{ex}} = 482$ nm bande passante 35 nm, $\lambda_{\text{em}} = 543$ nm bande passante 22 nm. Temps d'exposition 15 s, grossissement 40x.

5.4 Discussion

Deux peptides doigt de zinc avec une antenne NBD et ne différant que par le chélate permettant de complexer le néodyme (DOTA ou TTHA) ont été synthétisés. Le TTHA permet de saturer entièrement la sphère de coordination du lanthanide, alors qu'avec le DOTA une molécule d'eau vient compléter cette sphère de coordination.

L'étude spectroscopique de ces peptides a montré que l'absence de molécule d'eau dans la sphère de coordination du néodyme permet d'augmenter le temps de vie de luminescence du néodyme et le rendement quantique de la sonde. Cependant cette augmentation n'est pas encore suffisante pour que le signal du néodyme sorte du bruit de fond de la fluorescence de l'antenne NBD. Pour augmenter l'émission du néodyme au détriment de la fluorescence du NBD, il faudrait rapprocher l'antenne du lanthanide pour que le transfert soit plus efficace, ou trouver une antenne moins fluorescente.

Le TTHA permet d'augmenter le temps de vie de luminescence et le rendement quantique du néodyme par rapport au DOTA. Cependant l'amplitude des changements observés lors de l'ajout de zinc est souvent moins importante pour le peptide avec le TTHA qu'avec le

DOTA. Les spectres d'absorbance et de fluorescence des peptides libres se superposent. Les modifications plus faibles pour le peptide SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] lors de la complexation du zinc sont donc liées à des différences dans le peptide lié au zinc. Une possibilité pour expliquer la plus faible augmentation de l'émission du néodyme, serait une plus faible diminution de la distance entre le NBD et le néodyme. Il est possible que la distance entre la chaîne peptidique et le néodyme soit plus importante pour le TTHA que pour le DOTA. Cette distance plus importante dans le cas du TTHA implique une « mobilité » plus importante. Au final dans le peptide lié au zinc, le néodyme complexé par un TTHA serait statistiquement plus loin du NBD que le néodyme complexé par un DOTA. Le transfert d'énergie serait donc moins efficace, ce qui pourrait expliquer l'augmentation plus faible du rendement quantique dans le cas du TTHA par rapport au DOTA.

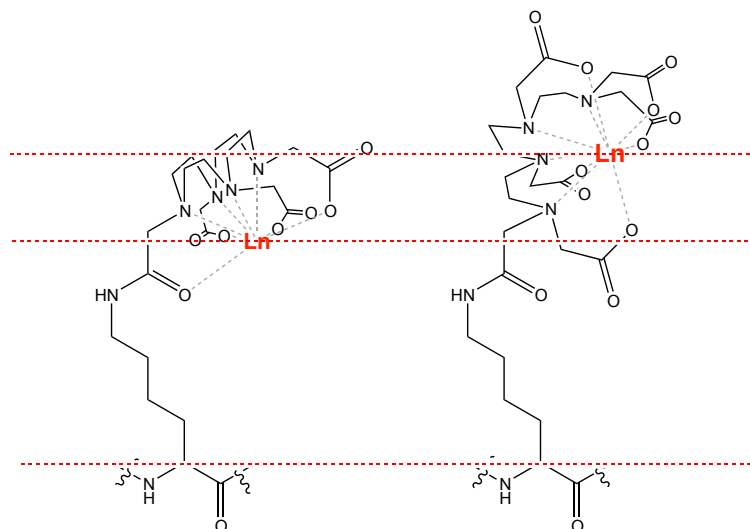


Fig. 5.18 : Comparaison de la distance entre la chaîne peptidique et le néodyme pour les peptides SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] et SP2(NBD)[Nd^{TTHA}].

Les premiers tests ont permis de montrer que le peptide avec le DOTA est capable de rentrer dans les cellules seul, sans ajout de séquence de pénétration cellulaire. De plus, les cellules sont encore vivantes, le peptide ne semble pas cytotoxique. Les propriétés spectroscopiques de ce peptide doivent être améliorées pour pouvoir détecter l'émission du lanthanide et pas celle de l'antenne, cependant l'utilisation de ce peptide *in cellulo* est possible. En revanche, le peptide avec le TTHA semble cytotoxique. Cette toxicité du peptide provient donc du TTHA : soit par la charge négative qu'il apporte par rapport au DOTA, soit par décomplexation du néodyme. Ceci reste cependant à confirmer avec d'autres peptides.

En conclusion, nous n'avons pas réussi à détecter la sonde en fonctionnement dans les cellules. Cependant cette sonde fonctionne *in vitro*. À notre connaissance, il s'agit de la première sonde permettant la détection du zinc avec une longueur d'onde d'émission supérieure à 800 nm.

Conclusion et perspectives

6.1 Conclusion

Les sondes développées pendant cette thèse sont basées sur des peptides modèles du site de liaison du métal de métalloprotéines. Deux types de sonde ont été étudiés : une sonde à zinc(II) basée sur la diminution de la distance antenne-lanthanide lors de la complexation du zinc, et une sonde à cuivre(I) basée sur la formation d'une interaction cation- π entre le cuivre(I) et l'antenne du lanthanide, greffée à proximité. Ces deux sondes s'allument en présence de métal et leur réponse est sélective vis-à-vis des métaux et anions physiologiques.

La synthèse chimique de ces peptides est modulable. Pour chaque sonde, de nombreux mutants ont été synthétisés. En effet, il est facile de modifier la séquence des peptides ou d'introduire un acide aminé non naturel dont la chaîne latérale porte le groupement désiré. Il est possible de greffer différents chélates, des antennes variées, ou encore d'introduire plusieurs antennes et/ou plusieurs chélates. Ainsi nous avons décalé l'émission des sondes dans le proche infrarouge, en introduisant des antennes capables de sensibiliser le néodyme. La flexibilité de la synthèse peptidique nous a également permis d'introduire un deuxième couple antenne/lanthanide. Cependant, il n'est pas toujours évident de synthétiser les acides aminés non naturels portant, par exemple, l'antenne désirée.

Pour les sondes à zinc, il est possible de modifier la position de l'antenne et du lanthanide sans altérer le fonctionnement de la sonde. De plus, le principe de modulation de l'efficacité du transfert d'énergie par variation de distance est applicable à tous les peptides se structurant en présence de métal. Ce principe est applicable dans de nombreux cas. Cependant cela impose une distance entre l'antenne et lanthanide plus importante que les sondes où l'antenne sert de chélate au lanthanide par exemple. L'efficacité du transfert d'énergie, et donc le rendement quantique et la brillance de ces sondes, seront donc plus faibles. Cela devient critique dans le proche infrarouge où les rendements quantiques de sensibilisation des lanthanides sont déjà très faibles. Cependant il serait possible d'étudier si l'augmentation du nombre d'antennes à proximité d'un lanthanide permet d'augmenter sa luminescence.

La sonde à cuivre(I) et à argent(I) fonctionne sur un nouveau principe. Le tryptophane formant l'interaction cation- π avec le métal est également l'antenne permettant de sensibiliser le terbium. La formation de l'interaction cation- π modifie les propriétés du tryptophane, ce qui permet d'allumer la sonde. L'utilisation d'une autre antenne peut modifier le fonctionnement de la sonde. En effet, le remplacement de l'indole du tryptophane en naphthalène a rendu la

réponse de la sonde sélective de l'argent(I), ce qui est intéressant car souvent les sondes à argent(I) répondent également au cuivre(I). En vue d'une application cellulaire, il faudrait déplacer la longueur d'onde d'excitation, cependant nous avons vu que toutes les antennes ne forment pas l'interaction cation- π . Il est possible que les contraintes sur le type d'antenne capable de former l'interaction cation- π et d'allumer la sonde, soient importantes. De plus, cette sonde est sensible au dioxygène. La sensibilisation du lanthanide a lieu depuis l'état triplet de l'antenne vers le lanthanide. Le dioxygène désactive l'état triplet, le transfert d'énergie vers le lanthanide, et l'émission de la sonde s'en trouvent donc diminués. Avec une telle sonde, pour que l'intensité mesurée *in vivo* soit fiable, il faudrait que la concentration en dioxygène ne varie pas de manière trop importante.

Enfin ces peptides sont également des objets intéressants pour l'étude des mécanismes spectroscopiques, en particulier pour les transferts d'énergie. Il est possible d'étudier l'effet de la distance entre l'antenne et le lanthanide sur le transfert d'énergie en jouant sur la taille de la chaîne latérale portant l'antenne ou le lanthanide, ou bien en modifiant la position de l'antenne par rapport au lanthanide dans la séquence peptidique. Pour les situations avec de nombreux transferts d'énergie impliquant plusieurs antennes et/ou lanthanides, il est possible de supprimer des éléments : lanthanide remplacé par du lanthane, ou antenne remplacée par un acide aminé non aromatique. Ce qui peut donner des pistes pour élucider les mécanismes spectroscopiques.

Les exemples de complexes hétérobimétalliques dont la synthèse est parfaitement contrôlée, c'est-à-dire sans mélange de composés homobimétalliques et hétérobimétalliques, restent rares. Il s'agit surtout des travaux récents de S.Faulkner. La maîtrise de la métallation et la versatilité des systèmes peptidiques pourraient permettre de réaliser des études spectroscopiques intéressantes et peu réalisées à ce jour.

6.2 Perspectives

Ces sondes nécessitent encore des améliorations pour être utilisées *in cellulo*. Cependant, les points améliorés sur une des sondes sont souvent facilement transposables à l'autre sonde.

Pour rendre la sonde à cuivre(I) et argent(I) ratiométrique, il est possible de greffer un deuxième couple antenne/lanthanide sur la chaîne latérale d'un acide aminé, car le peptide est cyclique. Une autre possibilité pour rendre le peptide ratiométrique est de trouver une antenne capable de sensibiliser deux lanthanides, et pour laquelle le transfert vers les deux lanthanides ne soit pas favorisé de la même manière en présence de métal. Par exemple, trouver une antenne capable de sensibiliser le terbium et l'euporium, et pour laquelle l'abaissement de l'état triplet, par formation de l'interaction cation- π , favorise le transfert d'énergie vers l'euporium au détriment du transfert vers le terbium.

La sonde à cuivre(I) et argent(I) est sensible au dioxygène, car le transfert d'énergie de l'antenne vers le lanthanide se fait depuis l'état triplet excité de l'antenne. Pour limiter cette sensibilité au dioxygène, une possibilité est d'utiliser une antenne dont le transfert d'énergie vers le lanthanide se fait depuis un état singulet. C'est le cas des antennes, dont le transfert a lieu depuis un état à transfert de charge. Il faudrait donc étudier si ces antennes sont capables de former l'interaction cation- π et si cette interaction modifie les propriétés de l'antenne et allume la sonde.

La plupart des sondes étudiées sont excitées à 280 nm ; pour pouvoir les utiliser *in cellulo*, il faut déplacer l'excitation et l'émission vers le rouge et le proche infrarouge. Les rendements quantiques de l'émission du néodyme pour les peptides à zinc avec l'antenne NBD sont

trop faibles pour permettre de détecter l'émission du néodyme dans les cellules. Il faut donc modifier le peptide en diminuant la distance antenne/lanthanide, et/ou modifier le chélate permettant de lier le néodyme, afin d'augmenter l'émission du néodyme par rapport à la fluorescence de l'antenne. Une autre possibilité est de tester de nouvelles antennes pour trouver une antenne moins fluorescente, ou bien une antenne dont le temps de vie du transfert d'énergie vers le lanthanide est long, car cela permettrait d'allonger le temps de vie du néodyme et de faire de la détection résolue en temps pour s'affranchir de la fluorescence de l'antenne.

Si nous trouvons deux antennes capables de sensibiliser deux lanthanides proche infrarouge différents (néodyme et ytterbium), il deviendrait possible de faire une sonde ratiométrique émettant dans le proche infrarouge.

Enfin pour être utilisé *in vivo*, il faudra ajouter des séquences de pénétration cellulaire pour faciliter l'entrée des peptides dans les cellules et déterminer leur toxicité.

Bibliographie

- [1] B.-E. KIM, T. NEVITT, D. J. THIELE, *Nature Chemical Biology* **2008**, *4*, 176–185.
- [2] S. LUTSENKO, *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14*, 211–217.
- [3] R. A. FESTA, D. J. THIELE, *Current Biology* **2011**, *21*, R877–R883.
- [4] T. NEVITT, H. ÖHRVIK, D. J. THIELE, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2012**, *1823*, 1580–1593.
- [5] M. A. SAGHIRI, A. ASATOURIAN, J. ORANGI, C. M. SORENSON, N. SHEIBANI, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2015**, *96*, 143–155.
- [6] T. V. O'HALLORAN, *Science* **1993**, *261*, 715–725.
- [7] J. M. BERG, Y. SHI, *Science* **1996**, *271*, 1081–1085.
- [8] S. YAMASAKI, K. SAKATA-SOGAWA, A. HASEGAWA, T. SUZUKI, K. KABU, E. SATO, T. KUROSAKI, S. YAMASHITA, M. TOKUNAGA, K. NISHIDA, T. HIRANO, *The Journal of Cell Biology* **2007**, *177*, 637–645.
- [9] P. BONAVENTURA, G. BENEDETTI, F. ALBARÈDE, P. MIOSSEC, *Autoimmunity Reviews* **2015**, *14*, 277–285.
- [10] J. EMSLEY, *Nature's Building Blocks - An A-Z Guide to the Elements*, Oxford University press, **2001**.
- [11] T. FUKADA, S. YAMASAKI, K. NISHIDA, M. MURAKAMI, T. HIRANO, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, *16*, 1123–1134.
- [12] E. I. SOLOMON, D. E. HEPPNER, E. M. JOHNSTON, J. W. GINSBACH, J. CIRERA, M. QAYYUM, M. T. KIEBER-EMMONS, C. H. KJAERGAARD, R. G. HADT, L. TIAN, *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 3659–3853.
- [13] T. KOCHAŃCZYK, A. DROZD, A. KRĘŻEL, *Metallomics* **2015**, *7*, 244–257.
- [14] M. E. HELSEL, K. J. FRANZ, *Dalton Transactions* **2015**, *44*, 8760–8770.
- [15] E. L. QUE, D. W. DOMAILLE, C. J. CHANG, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 1517–1549.
- [16] H. KOZŁOWSKI, M. LUCZKOWSKI, M. REMELLI, D. VALENSIN, *Coordination Chemistry Reviews, Metal Ions in Neurodegenerative Diseases* **2012**, *256*, 2129–2141.
- [17] P. FALLER, C. HUREAU, G. LA PENNA, *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 2252–2259.
- [18] T. D. RAE, *Science* **1999**, *284*, 805–808.
- [19] C. ANDREINI, L. BANCI, I. BERTINI, A. ROSATO, *Journal of Proteome Research* **2006**, *5*, 3173–3178.

- [20] C. ANDREINI, L. BANCİ, I. BERTINI, A. ROSATO, *Journal of Proteome Research* **2006**, *5*, 196–201.
- [21] M. L. GUERINOT, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**, *1465*, 190–198.
- [22] W. MARET, *BioMetals* **2011**, *24*, 411–418.
- [23] T. KAMBE, A. HASHIMOTO, S. FUJIMOTO, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2014**, *71*, 3281–3295.
- [24] B. CHAIGNE-DELALANDE, M. J. LENARDO, *Trends in Immunology* **2014**, *35*, 332–344.
- [25] I. SEKLER, W. F. SILVERMAN, *Glia* **2012**, *60*, 843–850.
- [26] I. SCHMALEN, S. REISCHL, T. WALLACH, R. KLEMZ, A. GRUDZIECKI, J. R. PRABU, C. BENDA, A. KRAMER, E. WOLF, *Cell* **2014**, *157*, 1203–1215.
- [27] A. M. KIM, S. VOGT, T. V. O’HALLORAN, T. K. WOODRUFF, *Nature Chemical Biology* **2010**, *6*, 674–681.
- [28] T. P. CROXFORD, N. H. MCCORMICK, S. L. KELLEHER, *Journal of Nutrition* **2011**, *141*, 359–365.
- [29] E. L. QUE, R. BLEHER, F. E. DUNCAN, B. Y. KONG, S. C. GLEBER, S. VOGT, S. CHEN, S. A. GARWIN, A. R. BAYER, V. P. DRAVID, T. K. WOODRUFF, T. V. O’HALLORAN, *Nature Chemistry* **2015**, *7*, 130–139.
- [30] J. WOODIER, R. D. RAINBOW, A. J. STEWART, S. J. PITT, *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 17599–17610.
- [31] S. YAMASAKI, A. HASEGAWA, S. HOJYO, W. OHASHI, T. FUKADA, K. NISHIDA, T. HIRANO, *PLoS ONE* **2012**, *7*, (éd. : D. HOLOWKA), e39654.
- [32] N. K. WEE, D. C. WEINSTEIN, S. T. FRASER, S. J. ASSINDER, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2013**, *45*, 960–963.
- [33] J. JOSEPH A. COTRUVO, A. T. ARON, K. M. RAMOS-TORRES, C. J. CHANG, *Chemical Society Reviews* **2015**, DOI [10.1039/C4CS00346B](https://doi.org/10.1039/C4CS00346B).
- [34] R. POLISHCHUK, S. LUTSENKO, *Histochemistry and Cell Biology* **2013**, *140*, WOS :000323288600007, 285–295.
- [35] P. DELANGLE, E. MINTZ, *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 6359–6370.
- [36] C. GATEAU, P. DELANGLE, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2014**, *1315*, 30–36.
- [37] J. T. RUBINO, K. J. FRANZ, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *107*, 129–143.
- [38] A. V. DAVIS, T. V. O’HALLORAN, *Nature Chemical Biology* **2008**, *4*, 148–151.
- [39] R. MCRAE, P. BAGCHI, S. SUMALEKSHMY, C. J. FAHRNI, *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 4780–4827.
- [40] E. J. NEW, *Dalton Transactions* **2013**, *42*, WOS :000314608700022, 3210–3219.
- [41] E. TOMAT, S. J. LIPPARD, *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14*, 225–230.
- [42] C. J. FAHRNI, *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*, 656–662.
- [43] C. C. WOODROOFE, R. MASALHA, K. R. BARNES, C. J. FREDERICKSON, S. J. LIPPARD, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 1659–1666.

- [44] X. WANG, H. CHANG, J. XIE, B. ZHAO, B. LIU, S. XU, W. PEI, N. REN, L. HUANG, W. HUANG, *Applications of Lanthanide Compounds to Materials Science and Biology* **2014**, 273–274, 201–212.
- [45] S. GUILLARD, R. R. MINTER, R. H. JACKSON, *Trends in Biotechnology* **2015**, 33, 163–171.
- [46] K. P. CARTER, A. M. YOUNG, A. E. PALMER, *Chemical Reviews* **2014**, 114, 4564–4601.
- [47] K. J. WALDRON, J. C. RUTHERFORD, D. FORD, N. J. ROBINSON, *Nature* **2009**, 460, 823–830.
- [48] H. IRVING, J. WILLIAMS, *Nature* **1948**, 746.
- [49] Z. GUO, S. PARK, J. YOON, I. SHIN, *Chemical Society Reviews* **2013**, 43, 16–29.
- [50] J. V. FRANGIONI, *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7, 626–634.
- [51] R. GILLIES, *Journal of Cellular Biochemistry* **2002**, 87, 231–238.
- [52] T. HIRANO, K. KIKUCHI, Y. URANO, T. HIGUCHI, T. NAGANO, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 12399–12400.
- [53] L. YANG, R. MCRAE, M. M. HENARY, R. PATEL, B. LAI, S. VOGT, C. J. FAHRNI, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 11179–11184.
- [54] D. Y. ZHANG, M. AZRAD, W. DEMARK-WAHNEFRIED, C. J. FREDERICKSON, S. J. LIPPARD, R. J. RADFORD, *ACS Chemical Biology* **2015**, 10, 385–389.
- [55] M. T. MORGAN, P. BAGCHI, C. J. FAHRNI, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 15906–15909.
- [56] R. J. RADFORD, W. CHYAN, S. J. LIPPARD, *Chemical Science* **2013**, 4, 3080–3084.
- [57] J. O. ESCOBEDO, O. RUSIN, S. LIM, R. M. STRONGIN, *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, 14, 64–70.
- [58] P. CAROL, S. SREEJITH, A. AJAYAGHOSH, *Chemistry – An Asian Journal* **2007**, 2, 338–348.
- [59] P. J. DITTMER, J. G. MIRANDA, J. A. GORSKI, A. E. PALMER, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284, 16289–16297.
- [60] J. G. PARK, Y. QIN, D. F. GALATI, A. E. PALMER, *ACS Chemical Biology* **2012**, 7, 1636–1640.
- [61] S. ALLEN, A. BADARAU, C. DENNISON, *Dalton Transactions* **2013**, 42, 3233–3239.
- [62] B. A. KRIZEK, D. L. MERKLE, J. M. BERG, *Inorganic Chemistry* **1993**, 32, 937–940.
- [63] O. SÉNÈQUE, J.-M. LATOUR, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 17760–17774.
- [64] V. GONZALEZ, D. A. L. VIGNATI, C. LEYVAL, L. GIAMBERINI, *Environment International* **2014**, 71, 148–157.
- [65] K. BINNEMANS, P. T. JONES, B. BLANPAIN, T. VAN GERVEN, Y. YANG, A. WALTON, M. BUCHERT, *Journal of Cleaner Production* **2013**, 51, 1–22.
- [66] J.-C. G. BÜNZLI, S. V. ELISEEVA in *Lanthanide Luminescence*, (éds. : P. HÄNNINEN, H. HÄRMÄ), Springer Series on Fluorescence 7, Springer Berlin Heidelberg, **2011**, p. 1–45.

- [67] J.-C. G. BÜNZLI, *Journal of Coordination Chemistry* **2014**, *67*, 3706–3733.
- [68] E. SAUSSEREAU, C. LACROIX, A. CATTANEO, L. MAHIEU, J. P. GOULLE, *Forensic Science International*, Practical Aspects of Drug Testing in Hair **2008**, *176*, 54–57.
- [69] J. MOREAU, E. GUILLON, J.-C. PIERRARD, J. RIMBAULT, M. PORT, M. APLINCOURT, *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10*, 5218–5232.
- [70] N. VIOLA-VILLEGAS, R. P. DOYLE, *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 1906–1925.
- [71] A. J. AMOROSO, S. J. A. POPE, *Chemical Society Reviews* **2015**, DOI [10.1039/C4CS00293H](https://doi.org/10.1039/C4CS00293H).
- [72] A. D'ALÉOA, F. POINTILLART, L. OUAHABB, C. ANDRAUD, O. MAURY, *Coordination Chemistry Reviews* **2012**.
- [73] J. H. V. VLECK, *The Journal of Physical Chemistry* **1937**, *41*, 67–80.
- [74] B. R. JUDD, *Physical Review* **1962**, *127*, 750–761.
- [75] G. S. OFELT, *The Journal of Chemical Physics* **1962**, *37*, 511–520.
- [76] G. A. CROSBY, R. E. WHAN, R. M. ALIRE, *The Journal of Chemical Physics* **1961**, *34*, 743–748.
- [77] J.-C. G. BÜNZLI, *Coordination Chemistry Reviews* **2015**, *293–294*, 19–47.
- [78] M. LATVA, H. TAKALO, V.-M. MUKKALA, C. MATACHESCU, J. C. RODRÍGUEZ-UBIS, J. KANKARE, *Journal of Luminescence* **1997**, *75*, 149–169.
- [79] K. UGURBIL, A. H. MAKI, R. BERSOHN, *Biochemistry* **1977**, *16*, 901–907.
- [80] W. T. CARNALL, G. L. GOODMAN, K. RAJNAK, R. S. RANA, *The Journal of Chemical Physics* **1989**, *90*, 3443–3457.
- [81] J.-C. G. BÜNZLI, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2729–2755.
- [82] S. V. ELISEEVA, M. RYAZANOV, F. GUMY, S. I. TROYANOV, L. S. LEPNEV, J.-C. G. BÜNZLI, N. P. KUZMINA, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2006**, *2006*, 4809–4820.
- [83] M. C. HEFFERN, L. M. MATOSZIUK, T. J. MEADE, *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 4496–4539.
- [84] J.-C. G. BÜNZLI, C. PIGUET, *Chemical Society Reviews* **2005**, *34*, 1048–1077.
- [85] A. THIBON, V. C. PIERRE, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, 107–120.
- [86] A. BEEBY, I. M. CLARKSON, R. S. DICKINS, S. FAULKNER, D. PARKER, L. ROYLE, A. S. d. SOUSA, J. A. G. WILLIAMS, M. WOODS, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2* **1999**, 493–504.
- [87] O. REANY, T. GUNNLAUGSSON, D. PARKER, *Chemical Communications* **2000**, 473–474.
- [88] K. HANAOKA, K. KIKUCHI, H. KOJIMA, Y. URANO, T. NAGANO, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 12470–12476.
- [89] Z. YE, Y. XIAO, B. SONG, J. YUAN, *Journal of Fluorescence* **2014**, *24*, 1537–1544.
- [90] T. HIRAYAMA, M. TAKI, K. AKAOKA, Y. YAMAMOTO, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 7410–7413.

- [91] S. J. A. POPE, R. H. LAYE, *Dalton Transactions* **2006**, 3108–3113.
- [92] W. MARET in *Metallomics and the Cell*, t. 12, (éd. : L. BANCI), Springer Netherlands, Dordrecht, **2013**, p. 479–501.
- [93] N. PACE, E. WEERAPANA, *Biomolecules* **2014**, *4*, 419–434.
- [94] S. J. LEE, S. L. J. MICHEL, *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 2643–2650.
- [95] J. H. LAITY, B. M. LEE, P. E. WRIGHT, *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11*, 39–46.
- [96] J. M. MATTHEWS, M. SUNDE, *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology : Life)* **2002**, *54*, 351–355.
- [97] S. S. KRISHNA, I. MAJUMDAR, N. V. GRISHIN, *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 532–550.
- [98] R. GAMSJAEGER, C. K. LIEW, F. E. LOUGHLIN, M. CROSSLEY, J. P. MACKAY, *Trends in Biochemical Sciences* **2007**, *32*, 63–70.
- [99] C. ANDREINI, I. BERTINI, G. CAVALLARO, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26325.
- [100] B. A. KRIZEK, B. T. AMANN, V. J. KILFOIL, D. L. MERKLE, J. M. BERG, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 4518–4523.
- [101] G. K. WALKUP, B. IMPERIALI, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 3053–3054.
- [102] H. A. GODWIN, J. M. BERG, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 6514–6515.
- [103] V. A. NARAYAN, R. W. KRIWACKI, J. P. CARADONNA, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 7801–7809.
- [104] L. C. SPEIGHT, A. K. MUTHUSAMY, J. M. GOLDBERG, J. B. WARNER, R. F. WISSNER, T. S. WILLI, B. F. WOODMAN, R. A. MEHL, E. J. PETERSSON, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 18806–18814.
- [105] A. JACQUES, B. METTRA, V. LEBRUN, J.-M. LATOUR, O. SÉNÈQUE, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 3921–3931.
- [106] T. D. MEALMAN, N. J. BLACKBURN, M. M. MCEVOY in *Current Topics in Membranes*, t. Volume 69, (éd. : JOSÉ M. ARGÜELLO AND SVETLANA LUTSENKO), Academic Press, **2012**, p. 163–196.
- [107] I. R. LOFTIN, S. FRANKE, S. A. ROBERTS, A. WEICHSEL, A. HÉROUX, W. R. MONTFORT, C. RENSING, M. M. MCEVOY, *Biochemistry* **2005**, *44*, 10533–10540.
- [108] S. FRANKE, G. GRASS, C. RENSING, D. H. NIES, *Journal of Bacteriology* **2003**, *185*, 3804–3812.
- [109] I. BAGAI, C. RENSING, N. J. BLACKBURN, M. M. MCEVOY, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11408–11414.
- [110] T. D. MEALMAN, M. ZHOU, T. AFFANDI, K. N. CHACÓN, M. E. ARANGUREN, N. J. BLACKBURN, V. H. WYSOCKI, M. M. MCEVOY, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6767–6775.
- [111] Y. XUE, A. V. DAVIS, G. BALAKRISHNAN, J. P. STASSER, B. M. STAEHLIN, P. FOCIA, T. G. SPIRO, J. E. PENNER-HAHN, T. V. O'HALLORAN, *Nature Chemical Biology* **2008**, *4*, 107–109.

- [112] I. R. LOFTIN, N. J. BLACKBURN, M. M. MCEVOY, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2009**, *14*, 905–912.
- [113] D. K. CHAKRAVORTY, B. WANG, M. N. UCISIK, K. M. MERZ, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 19330–19333.
- [114] D. A. DOUGHERTY, *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 885–893.
- [115] H. MASUDA, N. YAMAMOTO, T. TAGA, K. MACHIDA, S. KITAGAWA, M. MUNAKATA, *Journal of Organometallic Chemistry* **1987**, *322*, 121–129.
- [116] R. R. CONRY, *Chemical Communications* **1998**, 555–556.
- [117] Y. SHIMAZAKI, H. YOKOYAMA, O. YAMAUCHI, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 2401–2403.
- [118] Y. HITOMI, T. NAGAI, M. KODERA, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 10392.
- [119] I. TAKASHIMA, A. KANEGAE, M. SUGIMOTO, A. OJIDA, *Inorganic Chemistry* **2014**, *53*, 7080–7082.
- [120] J. KUMAR, P. K. BHATTACHARYYA, D. K. DAS, *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *138*, 99–104.
- [121] P. PÉREZ-GALÁN, N. DELPONT, E. HERRERO-GÓMEZ, F. MASERAS, A. M. ECHAVARREN, *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 5324–5332.
- [122] J. W. NUGENT, H. LEE, H.-S. LEE, J. H. REIBENSPIES, R. D. HANCOCK, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 9749.
- [123] Z. XIAO, L. GOTTSCHLICH, R. v. d. MEULEN, S. R. UDAGEDARA, A. G. WEDD, *Metallomics* **2013**, *5*, 501–513.
- [124] J. ANDERSON, *Analyst* **1964**, *89*, WOS :A19643964A00013, 357–&.
- [125] M. GOODMAN, L. LEVINE, *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 2918–2922.
- [126] S. M. KELLY, T. J. JESS, N. C. PRICE, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2005**, *1751*, 119–139.
- [127] N. J. GREENFIELD, *Nature protocols* **2006**, *1*, 2876–2890.
- [128] C. ANDREINI, I. BERTINI, G. CAVALLARO, G. L. HOLLIDAY, J. M. THORNTON, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, *13*, 1205–1218.
- [129] M. PARIKH, S. T. WEBB, *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **2012**, *12*, 195–198.
- [130] W. MARET, *Metallomics* **2015**, *7*, 202–211.
- [131] J. T. KITTLESON, I. R. LOFTIN, A. C. HAUSRATH, K. P. ENGELHARDT, C. RENSING, M. M. MCEVOY, *Biochemistry* **2006**, *45*, 11096–11102.
- [132] I. R. LOFTIN, S. FRANKE, N. J. BLACKBURN, M. M. MCEVOY, *Protein Science* **2007**, *16*, 2287–2293.
- [133] P. MONSIEURS, H. MOORS, R. V. HOUDT, P. J. JANSSEN, A. JANSSEN, I. CONINX, M. MERGEAY, N. LEYS, *BioMetals* **2011**, *24*, 1133–1151.
- [134] S. MONCHY, M. A. BENOTMANE, P. JANSSEN, T. VALLAEYS, S. TAGHAVI, D. v. d. LELIE, M. MERGEAY, *Journal of Bacteriology* **2007**, *189*, 7417–7425.

- [135] B. BERSCH, K.-M. DERFOUFI, F. DE ANGELIS, V. AUQUIER, E. NGONLONG EKENDÉ, M. MERGEAY, J.-M. RUYSSCHAERT, G. VANDENBUSSCHE, *Biochemistry* **2011**, *50*, 2194–2204.
- [136] P. KAMAU, R. B. JORDAN, *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 3879–3883.
- [137] R. CZOIK, A. HEINTZ, E. JOHN, W. MARCZAK, *Acta Physica Polonica A* **2008**, *114*, A-51 A-56.
- [138] Z. XIAO, A. G. WEDD, *Natural Product Reports* **2010**, *27*, 768.
- [139] P. BAGCHI, M. T. MORGAN, J. BACSA, C. J. FAHRNI, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 18549–18559.
- [140] A. MEISTER, M. E. ANDERSON, *Annual Review of Biochemistry* **1983**, *52*, 711–760.
- [141] W. D. HORROCKS, D. R. SUDNICK, *Accounts of Chemical Research* **1981**, *14*, 384–392.
- [142] J. R. LAKOWICZ, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third edition, Springer, **2006**.
- [143] K. SUDHAKAR, C. M. PHILLIPS, S. A. WILLIAMS, J. M. VANDERKOOI, *Biophysical Journal* **1993**, *64*, 1503–1511.
- [144] M. GONNELLI, G. B. STRAMBINI, *Biochemistry* **1995**, *34*, 13847–13857.
- [145] G. B. STRAMBINI, M. GONNELLI, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 7646–7651.
- [146] J. A. SCHAUERTE, D. G. STEEL, A. GAFNI in *Methods in Enzymology*, (éd. : M. L. J. LUDWIG BRAND), Fluorescence Spectroscopy, Academic Press, **1997**, p. 49–71.
- [147] S. GHOSH, A. MISRA, A. OZAROWSKI, A. H. MAKI, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, WOS :000185857500034, 11520–11526.
- [148] I. MAJOU, Y. JIA, R. DUDEN in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, (éd. : J. B. PAWLEY), Springer US, **2006**, p. 788–808.
- [149] Y. H. KIM, N. S. BAEK, H. K. KIM, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 213–221.
- [150] N. S. BAEK, Y. H. KIM, S.-G. ROH, B. K. KWAK, H. K. KIM, *Advanced Functional Materials* **2006**, *16*, WOS :000241014700012, 1873–1882.
- [151] N. METANIS, D. HILVERT, *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *22*, 27–34.
- [152] C. WEEKLEY, J. AITKEN, L. FINNEY, S. VOGT, P. WITTING, H. HARRIS, *Nutrients* **2013**, *5*, 1734–1756.
- [153] M. H. V. WERTS in *Lanthanide Luminescence*, (éds. : P. HÄNNINEN, H. HÄRMÄ), Springer Series on Fluorescence 7, Springer Berlin Heidelberg, **2011**, p. 133–159.
- [154] J. ZHANG, S. PETOUD, *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 1264–1272.
- [155] M. MONTALTI, A. CREDI, L. PRODI, T. GANDOLFI, *Handbook of photochemistry*, Third edition, CRC Press, **2006**.
- [156] C. SVEEN, N. MACIA, V. ZAREMBERG, B. HEYNE, *Photochemistry and Photobiology* **2015**, *91*, 272–279.
- [157] S. AMATORI, G. AMBROSI, M. FANELLI, M. FORMICA, V. FUSI, L. GIORGI, E. MACEDI, M. MICHELONI, P. PAOLI, R. PONTELLINI, P. ROSSI, M. A. VARRESE, *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 4274–4284.

- [158] T. MISTRI, R. ALAM, M. DOLAI, S. K. MANDAL, A. R. KHUDA-BUKHSH, M. ALI, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 1563–1569.
- [159] H. ZHU, J. FAN, B. WANG, X. PENG, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 4337–4366.
- [160] C. S. BONNET, J. MASSUE, S. J. QUINN, T. GUNNLAUGSSON, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 3074–3078.
- [161] M. CANTUEL, C. LINCHENEAU, T. BUFFETEAU, L. JONUSAUSKAITE, T. GUNNLAUGSSON, G. JONUSAUSKAS, N. D. MCCLENAGHAN, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 2486–2488.
- [162] S. COMBY, T. GUNNLAUGSSON, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7184–7197.
- [163] B. BRANCHI, P. CERONI, V. BALZANI, F.-G. KLÄRNER, F. VÖGTLE, *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 6048–6055.
- [164] M. A. PALACIOS, S. TITOS-PADILLA, J. RUIZ, J. M. HERRERA, S. J. A. POPE, E. K. BRECHIN, E. COLACIO, *Inorganic Chemistry* **2014**, *53*, 1465–1474.
- [165] I. DUFAU, H. MAZARGUIL, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 6063–6066.
- [166] J.-C. G. BÜNZLI, S. V. ELISEEVA, *Journal of Rare Earths* **2010**, *28*, 824–842.
- [167] C. DOFFEK, M. SEITZ, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 9719–9721.
- [168] M. T. MORGAN, P. BAGCHI, C. J. FAHRNI, *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 3240–3248.
- [169] S. SINGHA, D. KIM, H. SEO, S. W. CHO, K. H. AHN, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 4367–4399.
- [170] M. XIAO, P. R. SELVIN, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 7067–7073.
- [171] K. BINNEMANS, *Coordination Chemistry Reviews* **2015**, *295*, WOS :000355028200001, 1–45.
- [172] J. A. BURNS, J. C. BUTLER, J. MORAN, G. M. WHITESIDES, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 2648–2650.
- [173] A. KRŻEL, R. LATAJKA, G. D. BUJACZ, W. BAL, *Inorganic Chemistry* **2003**, *42*, 1994–2003.
- [174] M. ISAAC, J.-M. LATOUR, O. SÉNÈQUE, *Chemical Science* **2012**, *3*, 3409–3420.
- [175] D. PARKER, *Chemical Society Reviews* **2004**, *33*, 156–165.
- [176] B. A. KRIZEK, J. M. BERG, *Inorganic Chemistry* **1992**, *31*, 2984–2986.
- [177] W. D. HORROCKS, B. HOLMQUIST, B. L. VALLEE, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1975**, *72*, 4764–4768.
- [178] M. PORT, J.-M. IDÉE, C. MEDINA, C. ROBIC, M. SABATOU, C. COROT, *BioMetals* **2008**, *21*, 469–490.
- [179] E. BRÜCHER, G. TIRCSÓ, Z. BARANYAI, Z. KOVÁCS, A. D. SHERRY in *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, (éds. : A. MERBACH, L. HELM, É. TÓTH), John Wiley & Sons, Ltd, **2013**, p. 157–208.
- [180] G. TIAN, L. R. MARTIN, Z. ZHANG, L. RAO, *Inorganic Chemistry* **2011**, *50*, 3087–3096.

- [181] M. S. TREMBLAY, D. SAMES, *Chemical Communications* **2006**, 4116–4118.
- [182] HORROCKS, J. P. BOLENDER, W. D. SMITH, R. M. SUPKOWSKI, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 5972–5973.
- [183] V. P. KAZAKOV, S. S. OSTAKHOV, G. G. FARRAKHOVA, *High Energy Chemistry* **2008**, *42*, 283–286.
- [184] M. LI, P. R. SELVIN, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 8132–8138.
- [185] T. J. SØRENSEN, A. M. KENWRIGHT, S. FAULKNER, *Chemical Science* **2015**, *6*, 2054–2059.
- [186] A. NONAT, M. REGUEIRO-FIGUEROA, D. ESTEBAN-GÓMEZ, A. de BLAS, T. RODRÍGUEZ-BLAS, C. PLATAS-IGLESIAS, L. J. CHARBONNIÈRE, *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 8163–8173.
- [187] A. ZAÏM, S. V. ELISEEVA, L. GUÉNÉE, H. NOZARY, S. PETOUD, C. PIGUET, *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 12172–12182.
- [188] Y. MA, H. CHEN, F. WANG, S. KAMBAM, Y. WANG, C. MAO, X. CHEN, *Dyes and Pigments* **2014**, *102*, 301–307.
- [189] M. TAKI, J. L. WOLFORD, T. V. O’HALLORAN, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 712–713.
- [190] M. INIYA, D. JEYANTHI, K. KRISHNAVENI, A. MAHESH, D. CHELLAPPA, *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *120*, 40–46.
- [191] H. M. KIM, B. R. CHO, *Chemical Reviews* **2015**, *115*, 5014–5055.
- [192] Y. HASEGAWA, T. OHKUBO, K. SOGABE, Y. KAWAMURA, Y. WADA, N. NAKASHIMA, S. YANAGIDA, *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 357–360.
- [193] J. CHEN, P. R. SELVIN, *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* **2000**, *135*, 27–32.
- [194] P. GE, P. R. SELVIN, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 1105–1111.
- [195] J. FARRERA-SINFREU, M. ROYO, F. ALBERICIO, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 7813–7815.
- [196] M. OLIVER, M. R. JORGENSEN, A. D. MILLER, *Synlett* **2004**, 453–456.
- [197] W. W. CLELAND, *Biochemistry* **1964**, *3*, 480–482.
- [198] S. UCHIYAMA, K. KIMURA, C. GOTA, K. OKABE, K. KAWAMOTO, N. INADA, T. YOSHIHARA, S. TOBITA, *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 9552–9563.
- [199] M. I. A. LOURAKIS, A. A. ARGYROS in *Tenth Ieee International Conference on Computer Vision, Vols 1 and 2, Proceedings*, WOS :000233155100199, Ieee Computer Soc, Los Alamitos, **2005**, p. 1526–1531.
- [200] P. W. RIDDLES, R. L. BLAKELEY, B. ZERNER, *Methods in Enzymology* **1983**, *91*, 49–60.

Partie expérimentale

7.1	MATERIALS AND METHODS	138
7.2	SYNTHESIS	139
7.2.1	Copper(I) probes	139
7.2.1.1	CC9 synthesis	139
7.2.1.2	Other copper(I) probe	140
7.2.2	Zinc(II) probes	141
7.2.2.1	SP2[ϕ^O - ϕ^T] peptidic synthesis	141
7.2.2.2	Selective metallation	142
7.2.2.3	Other zinc(II) probes	143
7.2.2.4	SP2(NBD)[Nd ^{DOTA}] and SP2(NBD)[Nd ^{TTHA}] synthesis	143
7.3	SPECTROSCOPY	144
7.3.1	Sample preparation	144
7.3.1.1	Copper(I)/silver(I) probes	144
7.3.1.2	Zinc(II) probes	144
7.3.1.3	Selectivity	145
7.3.2	Spectroscopies	145
7.4	Références	146

7.1 Materials and methods

DOTA-tris(tBu)ester was purchased from Chematech. N- α -Fmoc-protected amino acids for peptide synthesis, PyBOP coupling reagent and resins were obtained from Novabiochem or Iris Biotech. Other reagents for peptide synthesis, solvents, buffers and metal salts were purchased from Sigma-Aldrich. All buffer or metal solutions were prepared with MilliQ water (Millipore). HPLC analyses and purifications were performed on an Agilent Infinity 1200 system or on a VWR LaPrep system. Analytical and preparative HPLC separations were performed at 2 and 14 mL/min, respectively, using Chromolith (Merck) RP-18e 10-4.6mm and XBridge Prep (Waters) C18 5 μ m 150-19 mm columns, respectively. Mobile phase consisted in a gradient of solvent A (0.1% TFA in H₂O) and B (0.1% TFA in MeCN/H₂O 9:1). The gradient used for purification by preparative RP-HPLC was : 5 to 20% B in 3 min followed by 20 to 40% B in 15 min. ESI-MS analyses were performed on a Thermo LXQ spectrometer.

UV-Vis spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer or on a Varian Cary 50 spectrophotometer. CD spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan spectropolarimeter. Luminescence spectra were recorded on a Cary Eclipse spectrometer or on a modular Fluorolog FL3-22 spectrometer from Horiba-Jobin Yvon-Spex equipped with a double-grating excitation monochromator and an iHR320 imaging spectrometer coupled to an R928P Hamamatsu photomultiplier. All spectra were corrected for detection and optical spectral response (instrumental functions) of the spectrofluorimeters. Phosphorescence lifetimes were measured in time-resolved mode on a Cary Eclipse spectrometer. UV-Vis, CD and Cary Eclipse luminescence spectrometers are equipped with a thermo-regulated cell holder and spectra were recorded at 298 K. Quantum yield studies were performed using a Fluorolog-3 (Jobin Yvon) spectrofluorometer with iHR-320 and cooled (-30 °C) photomultiplier from Hamamatsu Photonics: R928 (range 280-900 nm).

Time-resolved emission studies were performed using degassed solutions at 20 °C using a frequency-tripled Nd:YAG amplified laser system (30 ps, 30 mJ @ 1064 nm, 20 Hz, Ekspla model PL 2143) whose output was used to pump an optical parametric generator (Ekspla model PG 401) producing tunable excitation pulses in the range 410-2300 nm. All light signals were analysed by a spectrograph (Princeton Instruments Acton model SP2300) coupled with a high dynamic range streak camera (Hamamatsu Photonics C7700, 1 ns – 1 ms). Data were analysed using an in-house software developed in LabVIEW 2014 system-design platform and development environment. The trust-region dogleg algorithm^[199] (supported by LabVIEW 2014) was applied to determine the set of parameters that best fit the set of input data. The trust-region dogleg algorithm was used instead of Levenberg-Marquardt algorithm, the latter being less stable in most cases during optimization process, because trust region methods are robust, and can be applied to ill-conditioned problems.

All buffer or metal solutions for spectroscopic measurements were prepared with MilliQ water (Millipore) or pure deuterium oxide (D₂O, 99.9% Eurisotop) in a glovebox. Buffer solutions were treated with Chelex 100 resin (Biorad) to remove metal traces. The pH of buffer solutions was adjusted using NaOH and HClO₄ to ensure that no chloride is present during Ag⁺ complexation studies.

7.2 Synthesis

7.2.1 Copper(I) probes

7.2.1.1 CC9 synthesis

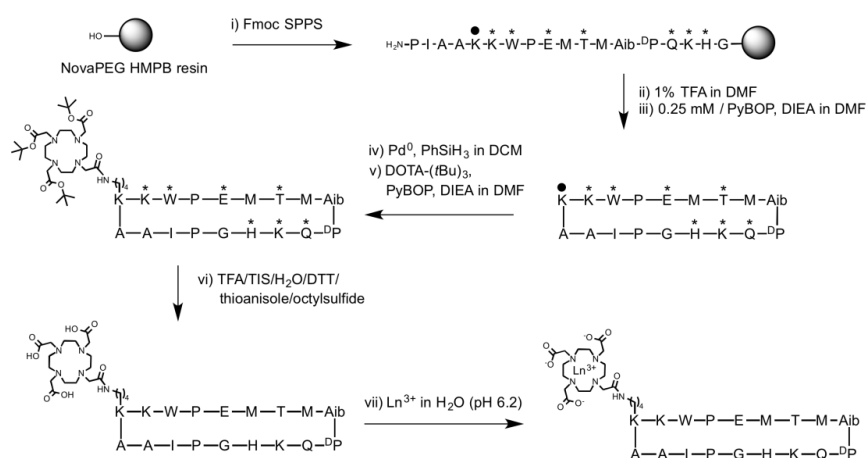


Figure 7.1: Synthetic pathway for CC9[Ln] probes (Ln = Tb or La). * denotes standards protecting groups for Fmoc SPPS (tBu for Glu and Thr, Trt for His and Gln, Boc for His and Trp). • denotes the alloc protecting group.

Linear precursor: The peptide synthesis was performed by solid-phase peptide synthesis (SPPS) on NovaPEG HMPB resin (substitution 0.52 mmol/g, 250 mg, 0.13 mmol) using Fmoc chemistry. The coupling of the first amino acid was performed manually as followed. Fmoc-Gly-OH (1.4 mmol, 416 mg) and DIPCIDI (0.7 mmol, 0.1 mL) were dissolved in anhydrous DCM (8 mL) and DMF (4 mL) under argon. After stirring for 20 min, DCM was evaporated under reduced pressure. The solution was poured into the reactor containing the resin and DMAP (0.04 mmol, 5 mg) was added. After stirring for 30 min, the resin was washed with DMF and DCM. Then, the linear precursor was assembled on a CEM Corporation Liberty1 peptide synthesizer. Fmoc removal was performed by two successive treatments with 20 % piperidine in DMF (10 and 5 min) at room temperature. Coupling reactions were performed with N- α -Fmoc-protected amino acids (0.2 M in DMF, 5 eq.), PyBOP (0.5 M in DMF, 5 eq.) and DIEA (2 M in NMP, 10 eq.) for 30 min at room temperature, except for ^DPro (double coupling, 1h each), Aib (double coupling, 2h each) and the first Met (double coupling, 1h each). Each coupling was followed by a capping treatment performed with 2 % Ac₂O in DMF and DIEA (2 M in NMP, 10 eq.) for 5 min at room temperature. Resin cleavage was performed using 1% TFA in DCM. The solution containing the protected peptide was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of DCM and Et₂O was added to promote precipitation. The supernatant was removed and the solid was washed twice with Et₂O and dried. It was used without further purification in the next step.

Note : Coupling of Aib is improved by using COMU instead of PyBOP.

Cyclization: The powder corresponding to the linear precursor was dissolved in degassed DMF (1 mg / 1 mL) and PyBOP (0.26 mmol, 2 eq., 137 mg) and DIEA (6.5 mmol, 60 eq., 1.1 mL) were added. The solution was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and Et₂O was added. The supernatant was removed and the solid was washed twice with Et₂O and dried. It was used without further purification

in the next step.

Alloc removal: The cyclic peptide was reacted with Pd(PPh₃)₄ (0.017 mmol, 0.1 eq., 20 mg) and phenylsilane (4.3 mmol, 25 eq., 0.5 mL) in degassed anhydrous DCM (20 mL) for 1h in the dark. The solution was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of DCM/MeOH (1:2) mixture before precipitation using Et₂O. The supernatant was removed and the solid was washed twice with Et₂O and dried. It was used without further purification in the next step.

Coupling of DOTA-*tris*(*t*Bu)ester: The powder corresponding to the alloc-free cyclic peptide was dissolved in degassed DMF (8 mL). DOTA-*tris*(*t*Bu)ester, (0.26 mmol, 0.15 mg), PyBOP (0.26 mmol, 135 mg) and DIEA (0.78 mmol, 0.5 mL) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of DCM/MeOH (1:2, v/v) mixture before precipitation using Et₂O. The supernatant was removed and the solid was washed twice with Et₂O and dried. It was used without further purification in the next step.

Removal of side-chain protecting groups : The DOTA-substituted cyclic peptide was stirred for 4h in a TFA/TIS/H₂O/DTT/thioanisole (18 mL / 0.6 mL / 0.6 mL / 650 mg / 0.3 mL) mixture. The solution was evaporated to yield a yellow oil which was precipitated with cold Et₂O. The crude peptide was purified by preparative RP-HPLC to yield CC9 (50 mg, 14% overall yield) as a white powder after freeze-drying. CC9 : t_R(analytical) = 9.0 min; ESI-MS monoisotopic m/z = 1202.1 (2+), 801.7 (3+), 601.5 (4+) (calculated m/z = 1202.11 [M+2H]²⁺, 801.74 [M+3H]³⁺, 601.56 [M+4H]⁴⁺ for M = C₁₀₈H₁₇₁N₂₉O₂₉S₂).

Formation of Ln³⁺ complexes CC9[Tb] and CC9[La] : CC9 (0.004 mmol, 10 mg) was dissolved in H₂O and the pH was adjusted to 6.2 using NaOH. Then TbCl₃ (0.019 mmol, 5 mg) or LaCl₃ (0.020 mmol, 5 mg) was added. The solution was stirred overnight (after 1h, the pH was controlled and adjusted to 6.2 if needed) and then it was purified by preparative RP-HPLC to yield CC9[Tb] or CC9[La] (quantitative yield) as a white powder after freeze-drying. CC9[Tb]: t_R(analytical) = 9.15 min; ESI-MS monoisotopic m/z = 1280.0 (2+), 853.7 (3+), 640.5 (4+) (calculated m/z = 1280.07 [M+2H]²⁺, 853.71 [M+3H]³⁺, 640.53 [M+4H]⁴⁺ for M = C₁₀₈H₁₆₈N₂₉O₂₉S₂Tb). CC9[La]: t_R(analytical) = 9.20 min; ESI-MS monoisotopic m/z = 1270.1 (2+), 847.1 (3+), 635.6 (4+) (calculated m/z = 1270.06 [M+2H]²⁺, 847.04 [M+3H]³⁺, 635.53 [M+4H]⁴⁺ for M = C₁₀₈H₁₆₈N₂₉O₂₉S₂La).

7.2.1.2 Other copper(I) probe

The syntheses of other copper(I) probes are similar to CC9[Tb].

CC10[Tb]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1252.0 (2+), 835.1 (3+), 626.5 (4+). Calculated m/z = 1251.5 [M+2H]²⁺, 834.7 [M+3H]³⁺, 626.3 [M+4H]⁴⁺ for M = C₁₀₅H₁₆₁N₂₈O₂₉S₂Tb. t_R = 9,5 min.

CC11[Tb]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1267.5 (2+), 845.4 (3+), 634.3 (4+). Calculated m/z = 1267.0 [M+2H]²⁺, 845.0 [M+3H]³⁺, 634.0 [M+4H]⁴⁺ for M = C₁₀₅H₁₆₂N₂₉O₃₀S₂Tb. t_R = 9,2 min.

CC9(hCys)[Tb]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1273.7 (2+), 849.6 (3+), 637.5 (4+). Calculated m/z = 1273.1 [M+2H]²⁺, 849.0 [M+3H]³⁺, 637.0 [M+4H]⁴⁺ for M = C₁₀₇H₁₆₆N₂₉O₂₉S₂Tb. t_R = 9 min.

CC9(2*SeM)[Tb]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1328.2 (2+), 885.8 (3+), 664.8 (4+). Calculated m/z = 1328.0 [M+2H]²⁺, 885.7 [M+3H]³⁺, 664.5 [M+4H]⁴⁺ for M = C₁₀₈H₁₆₈N₂₉O₂₉Se₂Tb. t_R = 9,35 min.

CC10(azulène-1)[Nd]: ESI-MS monoisotopic : three sets of peaks. The first set corresponds to the peptide with neodymium, the second correspond to the peptide with zinc (contamination) and the third one to the free peptide. m/z_1 : 1249.7 (2+), 833.8 (3+). Calculated m/z = 1250.0 $[M+2H]^{2+}$, 833.7 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{107}H_{165}N_{27}O_{29}S_2Nd$. m/z_2 : 1211 (2+), 807.8 (3+), 606.0 (4+). Calculated m/z = 1211.05 $[M+2H]^{2+}$, 807.7 $[M+3H]^{3+}$, 606.0 $[M+4H]^{4+}$ for $M = C_{107}H_{165}N_{27}O_{29}S_2Zn$. m/z_3 : 1179.8 (2+), 786.8 (3+), 590.3 (4+). Calculated m/z = 1179.1 $[M+2H]^{2+}$, 786.4 $[M+3H]^{3+}$, 590.0 $[M+4H]^{4+}$ for $M = C_{107}H_{165}N_{27}O_{29}S_2$.

CC10(azulène-2)[Nd]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1270.0 (2+), 847.1 (3+). Calculated m/z = 1270.0 $[M+2H]^{2+}$, 847.0 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{108}H_{163}N_{28}O_{30}S_2Nd$. **CC(azulène-2)[Yb]**: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1286.0 (2+), 857.7 (3+). Calculated m/z = 1286.0 $[M+2H]^{2+}$, 857.7 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{103}H_{158}N_{31}O_{32}S_2Yb$. $t_R = 9,6$ min

CC10(NBD)[Nd]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1274.7 (2+), 850.2 (3+). Calculated m/z = 1274.5 $[M+2H]^{2+}$, 850.0 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{103}H_{158}N_{31}O_{32}S_2Nd$. $t_R = 9,6$ min. ESI-MS monoisotopic : m/z : 1290.6 (2+), 860.8 (3+). Calculated m/z = 1290.5 $[M+2H]^{2+}$, 860.7 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{103}H_{158}N_{31}O_{32}S_2Yb$.

CC10(anthracène)[Nd]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1273.5 (2+), 849.3 (3+). Calculated m/z = 1273.5 $[M+2H]^{2+}$, 849.4 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{111}H_{164}N_{27}O_{29}S_2Tb$. $t_R = 11,5$ min.

CC10(Nap)[Eu]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1254.1 (2+), 836.8 (3+), 627.8 (4+). Calculated m/z = 1254.0 $[M+2H]^{2+}$, 836.4 $[M+3H]^{3+}$, 627.5 $[M+4H]^{4+}$ for $M = C_{107}H_{162}N_{27}O_{29}S_2Eu$. $t_R = 10,3$ min. **CC10(Nap)[La]** : ESI-MS monoisotopic : m/z : 1247.7 (2+), 832.2 (3+), 624.5 (4+). Calculated m/z = 1247.0 $[M+2H]^{2+}$, 831.7 $[M+3H]^{3+}$, 624.0 $[M+4H]^{4+}$ for $M = C_{107}H_{162}N_{27}O_{29}S_2La$. $t_R = 10,4$ min.

7.2.2 Zinc(II) probes

7.2.2.1 SP2 $[\phi^O-\phi^T]$ peptidic synthesis

Peptidic synthesis: The peptide synthesis was performed by solid-phase peptide synthesis (SPPS) on NovaPEG Rink amid resin (substitution 0.37 mmol/g, 330 mg, 0.12 mmol) using Fmoc chemistry. The coupling of the first amino acid was performed manually as followed. Fmoc-Gly-OH (0.36 mmol, 108 mg), PyBOP (0.36 mmol, 190 mg), DIEA (0.76 mmol, 150 μ L) were dissolved in DMF (8 mL). The capping treatment was performed with a mixture of Ac_2O /pyridine/DMF (1 mL/2 mL/7 mL) for 5 min at room temperature. Fmoc removal was performed by three successive treatments with 20 % piperidine in DMF (8 mL) for 3 min at room temperature. The peptide was assembled on a CEM Corporation Liberty1 peptide synthesizer. Fmoc removal was performed by two successive treatments with 20 % piperidine in DMF (10 and 5 min) at room temperature. Coupling reactions were performed with N- α -Fmoc-protected amino acids (0.2 M in DMF, 5 eq.), PyBOP (0.5 M in DMF, 5 eq.) and DIEA (2 M in NMP, 10 eq.) for 30 min at room temperature. Each coupling was followed by a capping treatment performed with 2 % Ac_2O in DMF and DIEA (2 M in NMP, 10 eq.) for 5 min at room temperature. The last amino acid (Fmoc-3-(1-naphthyl)-L-alanine) was coupled manually as was the first amino acid. The resin was split in two batches after the capping step. The Fmoc removal allowed quantification of the peptide in each batch : 50 μ mol.

Coupling of DTPA-*tetra*(*t*Bu) ester: The protected chelate was coupled by a classical peptidic coupling: DTPA-*tetra*(*t*Bu) ester (0.1 mmol, 61 mg), PyBOP (0.1 mmol, 52 mg), DIEA (0.25 mmol, 50 μ L) in DMF (8 mL). The solution was stirred overnight at room temperature. The resin was washed with DMF and DCM.

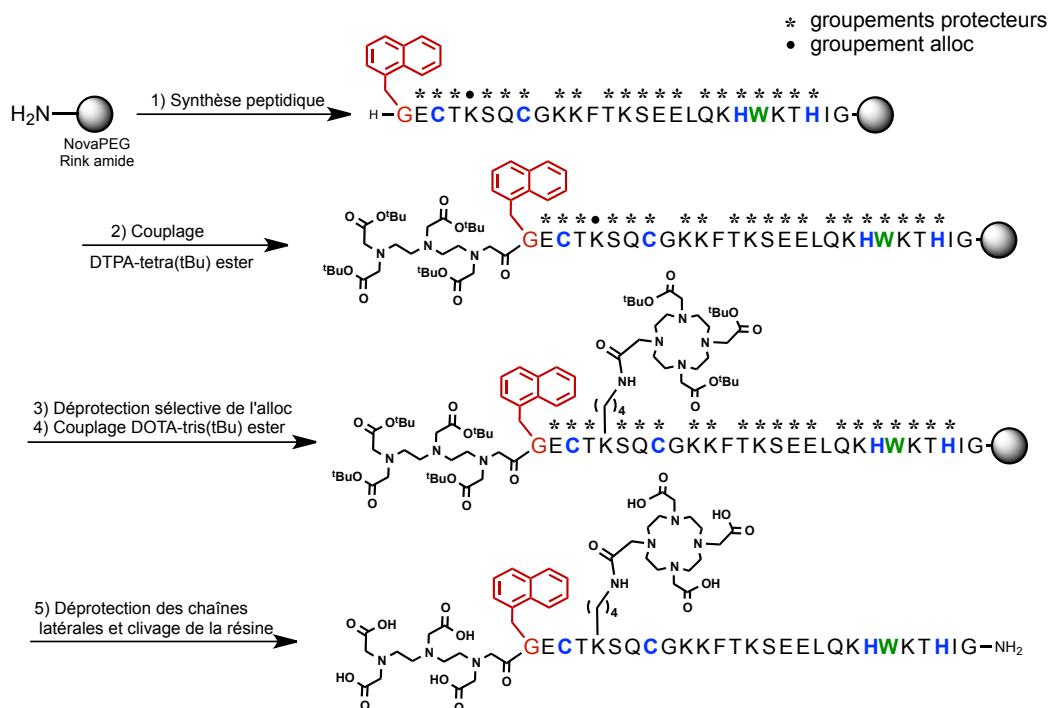


Figure 7.2: Synthèse du peptide SP2[ϕ^O - ϕ^T].

Alloc removal: The peptide was reacted with Pd(PPh₃)₄ (0.025 mmol, 0.5 eq., 30 mg) and phenylsilane (12.5 mmol, 25 eq., 155 μ L) in degassed anhydrous DCM (10 mL) for 1h in the dark. This step was performed two times. The resin was washed successively with 10 mL of DCM, DMF, DMF with H₂O (100 μ L), DMF, DMF with DIEA (50 μ L), DMF, DMF with diethylcarbodiimide (50 mg), and DMF.

Coupling of DTPA-*tetra*(*t*Bu) ester: The second chelate was grafted by a classical peptidic coupling: DOTA-*tris*(*t*Bu) ester (0.1 mmol, 57 mg), PyBOP (0.1 mmol, 52 mg), DIEA (0.25 mmol, 50 μ L) in DMF (8 mL). The solution was stirred overnight at room temperature. The resin was washed with DMF and DCM, and dried.

Resin cleavage and removal of side-chain protecting groups: The resin was stirred for 4h in a TFA/TIS/H₂O/DTT/thioanisole (18 mL/0.6 mL/0.6 mL/600 mg/0.3 mL/0.3 mL) mixture. The solution was evaporated to yield a yellow oil which was precipitated with cold Et₂O. The crude peptide was purified by preparative RP-HPLC (gradient: 5 to 20% B in 3 min followed by 20 to 40% B in 15 min) to yield SP2[Trp/ ϕ^O - Nap/ ϕ^T] (25 mg, 12% overall yield) as a white powder after freeze-drying. ESI-MS monoisotopic : m/z : 1340.8 (3+), 1005.9 (4+), 805.0 (5+), 671.0 (6+). Calculated m/z = 1340.3 [M+3H]³⁺, 1005.5 [M+4H]⁴⁺, 804.6 [M+5H]⁵⁺, 670.7 [M+6H]⁶⁺ for M = C₁₇₆H₂₆₆N₄₈O₅₆S₂. t_R = 8,5 min.

7.2.2.2 Selective metallation

Formation of SP2[Trp/Tb^O-Nap/Tb^T]: Le peptide (0.016 mmol, 6.5 mg) was dissolved in H₂O (1.3 mL) and the pH was adjusted to 6.2 using NaOH. Then TbCl₃ (0.037 mmol, 10 mg) was added. The solution was stirred overnight and then they were purified by preparative RP-HPLC to yield SP2[Trp/Tb^O-Nap/Tb^T] (quantitative yield) as a white powder after freeze-drying.

Removal of the lanthanide from DTPA: Peptides (0.016 mmol, 6.3 mg) were dissolved in a solution of TFA 2% in H₂O (2 mL) and stirred for 4h under argon atmosphere. In the glovebox, the solution was diluted twice then laid on a Waters Oasis column (HLB 3cc 400 mg). The column was washed with H₂O (1mL, 3x) to remove excess of lanthanide. Then the peptide was eluted with H₂O/CH₃CN (1:1) (1 mL, 3x) and H₂O/CH₃CN (1:4) (1 mL, 3x). After freeze-drying a white powder was obtained.

Formation of SP2[Trp/Tb^O-Nap/Eu^T]: The peptide (12.5 mmol, 5 mg) was dissolved in H₂O (1 mL) and the pH was adjusted to 6.2 using NaOH. A solution of EuCl₃ (20 mM, 200 μL) was added. The mixture was stirred overnight and then purified on a Waters Oasis column as described previously to yield SP2[Trp/Tb^O-Nap/Eu^T] as a white powder after freeze-drying.

SP2[Eu^T-Tb^O]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1082.4 (4+), 866.4 (5+), 722.1 (6+). Calculated m/z = 1081.9 [M+4H]⁴⁺, 865.75 [M+5H]⁵⁺, 721.6 [M+6H]⁶⁺ for M = C₁₇₆H₂₆₆N₄₈O₅₆S₂TbEu. t_R = 8,5 min.

7.2.2.3 Other zinc(II) probes

The three other peptides were synthesized the same way.

SP2[Eu^O-Tb^T]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1442.3 (3+), 1082.0 (3+), 866.0 (5+). Calculated m/z = 1442.25 [M+3H]³⁺, 1081.9 [M+4H]⁴⁺, 865.75 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₇₆H₂₆₆N₄₈O₅₆S₂TbEu. t_R = 8,5 min. Yield ~ 10%.

SP2[Tb^T-Eu^O]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1442.8 (3+), 1082.3 (4+), 866.1 (5+). Calculated m/z = 1442.25 [M+3H]³⁺, 1081.9 [M+4H]⁴⁺, 865.75 [M+5H]⁵⁺ for M = CHNOSTb. t_R = 8,7 min. Yield 3%.

SP2[Tb^O-Eu^T]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1442.7 (3+), 1082.3 (4+), 866.1 (5+). Calculated m/z = 1442.25 [M+3H]³⁺, 1081.9 [M+4H]⁴⁺, 865.75 [M+5H]⁵⁺ for M = CHNOSTb. t_R = 8,7 min. Yield 2%.

7.2.2.4 SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] and SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] synthesis

The synthesis of SP2(NBD)[Nd^{DOTA}] and SP2(NBD)[Nd^{TTHA}] are nearly the same as for the ratiometric peptides. The major difference is the acetylation of the N-terminal part of the peptide instead of grafting on chelate.

SP2(NBD)[Nd^{DOTA}]: ESI-MS monoisotopic : m/z : 1355.0 (3+), 1016.5 (4+), 813.4 (5+). Calculated m/z = 1354.6 [M+3H]³⁺, 1016.2 [M+4H]⁴⁺, 813.2 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₆₉H₂₆₃N₅₁O₅₃S₂Nd. t_R = 8,3 min.

7.3 Spectroscopy

7.3.1 Sample preparation

7.3.1.1 Copper(I)/silver(I) probes

All stock solutions (buffer, hydroxylamine) were prepared in order to avoid chloride. The pH was adjusted with HClO_4 . Peptide stock solutions were prepared by dissolving peptide in water. The concentrations were measured by absorbance spectroscopy (fig.7.3). Stocks solutions were kept in the glovebox for no more than three days. To avoid contact with dioxygen, all handlings were performed in the glovebox. Samples were prepared daily by mixing in rubber-sealed quartz cell (0.4 cm or 1 cm path length) the peptide, the buffer. The buffer were chosen according to the spectroscopy used : HEPES for absorbance, and luminescence studies, phosphate buffer for CD spectroscopy, and Ammonium acetate for mass spectrometry.

	λ , nm	ϵ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Tryptophan	280	5690
Naphtalene	283	5650
NBD	472	22800
	338	7 200
Anthracene	370	8000

Figure 7.3: Absorption coefficients of antennas.

For silver(I) experiments, metallation was performed using a solution of AgClO_4 (3.52mM in water). For copper(I) experiments, hydroxylamine (2 mM) or acetonitrile (1%, 0.2 M) was added to generate or stabilize copper(I). For hydroxylamine titrations, copper was added as CuSO_4 solution (2.18 mM, in water). For acetonitrile titrations, a solution of copper(I) added was prepared every day ($\text{Cu}^{\text{I}}(\text{CH}_3\text{CN})_4 \cdot \text{PF}_6$ in water with acetonitrile 1%, 0.2 M). Its concentration was determined by a BCA titration ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{BCA}_2$, $\epsilon_{452 \text{ nm}} = 7700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Titrations at different concentrations in acetonitrile (0.1M, 0.5M, and 1M) were performed for the determination of the affinity constant. In these cases, the solution of copper(I) was prepared in the corresponding concentration of acetonitrile.

The affinity constants of peptide for copper(I) et silver(I) were determined by competitive experiment with imidazole. As the affinity of imidazole for copper(I) ($\log \beta_1 = 6.83$ and $\log \beta_2 = 10.73$) is much higher than for silver(I) ($\log \beta_1 = 2.96$ and $\log \beta_2 = 6.71$), the concentrations of peptide and imidazole used were different according to the metal used. For copper(I) titration, the concentrations were 25 μM for the peptide and 1 mM for imidazole. In the case of silver(I), the concentrations were 10 μM for the peptide and 10 mM for imidazole.

7.3.1.2 Zinc(II) probes

The probe stock solution were prepared by dissolving the peptide in water. Its concentration was determined by measuring cysteine-free thiol concentration using Ellman's reagent^[200]. The stock solution was degased and kept under argon atmosphere to avoid oxidation. All other solutions were aerated solutions, and titrations were performed aerobically. For titrations, samples were daily prepared in quartz cell (0.4 cm or 1 cm path length) by mixing : peptide solution, buffer at pH 7.5, and reductant (tris(2-carboxyethyl)phosphine 250 μM or dithiotreitol 1 mM), completed with water. Titrations were performed by additions of metal ion stock solution (ZnCl_2 1.68mM in H_2O).

7.3.1.3 Selectivity

A stock solution of peptide with buffer and hydroxylamine (copper probe) was prepared then distributed in cuvettes. Then the cation or anion was added from stock solutions. Metal salts added were MnSO_4 , CuSO_4 , NiSO_4 , CoSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$, NaClO_4 , KClO_4 , $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. The anions added are NaCl , H_2CO_3 , Na_2HPO_4 . The emission or CD spectrum of each sample was recorded before and after addition of competitor, and after the addition of 1.5 equivalent of copper(I) or zinc(II).

7.3.2 Spectroscopies

Circular dichroism spectroscopy: For CD spectroscopy titrations, the sample was prepared in 0.4 path length cuvette with peptide ($\sim 15 \mu\text{M}$) in phosphate buffer (10 mM). The CD signal was recorded every 1 nm with a 2 s signal averaging for each point. Each spectrum was recorded two times and averaged.

Absorption spectroscopy: For UV-Visible absorption spectroscopy titrations, the peptide concentration was adjust so that the largest absorption is between 0.1 and 1 for every spectrum of the titration. UV-Vis spectra were recorded every 1 nm at a scan rate of 480 nm/min.

Fluorescence and luminescence spectroscopy: For fluorescence and luminescence spectroscopy titrations, the peptide concentration was 5 to 10 μM . Spectra were recorded at 298 K, every 1 nm with no delay for fluorescence, and with a delay of 0.2ms and a gate time of 2 ms. All spectra were recorded at least four times and averaged. To avoid the harmonic of the excitation a band-pass filter was used in emission : 295-1100 nm or 430-1100 nm.

Time resolved spectroscopy: To record the map of the spectra in time, S.Denisov used a combination of a spectroscope and a streak camera. The spectroscope splits the signal horizontally according to wavelength. Then the streak camera converts the photon into electrons with a photocathode. The electrons are deflected vertically according to a sweep voltage. Thus the spectra are shifted vertically to create the vertical time scale.

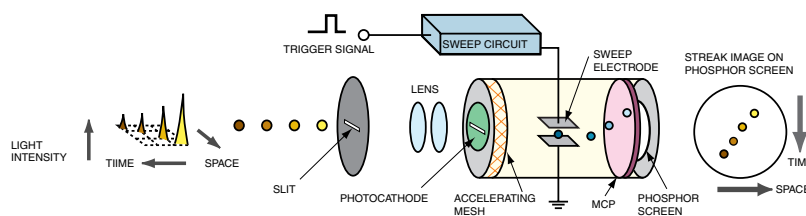


Fig.1 Operating Principle of the Streak Tube

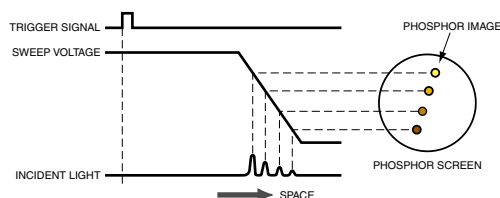


Fig.2 Operation Timing (at time of sweep)

Figure 7.4: Streak camera principle by HAMAMATSU.

7.4 Références

- [1] M. L. A. Lourakis, A. A. Argyros, Proceedings. *Tenth IEEE International Conference on Computer Vision* **2005**, 1526–31 vol.2.

Annexes

1 Détermination de la constante K_{ternaire}

- Pour chaque espèce luminescente, dans des conditions de haute dilution ($A < 0.05$) :

$$I_{\lambda_{em}} = k \cdot \underbrace{I_{\lambda_{ex}} \cdot \epsilon \cdot \phi \cdot l \cdot C}_{F_{\text{espèce}}} \quad (1)$$

où $I_{\lambda_{ex}}$ est l'intensité de l'excitation (nombre de photons), ϵ le coefficient d'absorption molaire ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), ϕ le rendement quantique, l longueur de la cuve, C la concentration.

- Pour alléger l'écriture on notera : le peptide CC9 (P), le complexe CC9-Cu(I) (PM), l'acétonitrile (A), et le complexe ternaire (PMA).

Espèces	Notation	absence de Cu(I)	excès de Cu ^I
CC9	P	C_P	0
CC9-Cu ^I	PM	0	$C_P - x$
CH ₃ CN	A	C_A	$\sim C_A$
CC9-Cu ^I -CH ₃ CN	PMA	0	x

- En l'absence de cuivre(I), la seule espèce luminescente est le peptide libre :

$$I_{[Cu^+]=0} = F_P[P] = F_P C_P \quad (2)$$

- En excès de cuivre(I), tout le peptide est lié au cuivre(I) :

$$\begin{aligned} I_{[Cu^+]=\text{excès}} &= F_{PM}[PM] + F_{PMA}[PMA] \\ &= F_{PM}(C_P - x) + F_{PMA}(x) \\ &= F_{PM}C_P - x(F_{PM} - F_{PMA}) \end{aligned} \quad (3)$$

Cas particulier en l'absence d'acétonitrile : $x = 0$, ainsi $I_{[Cu^+]=\text{excès}} = F_{PM}C_P$.

L'augmentation de luminescence observée lors du titrage réalisé en l'absence d'acétonitrile, c'est-à-dire avec de l'hydroxylamine, est :

$$\frac{I_{[Cu^+]=\text{excès}}}{I_{[Cu^+]=0}} = \frac{F_{PM}C_P}{F_P C_P} = \frac{F_{PM}}{F_P} = \alpha \quad (4)$$

- L'augmentation de la luminescence du terbium observée lors d'un titrage du peptide par du cuivre(I), pour un concentration d'acétonitrile donnée, est :

$$\begin{aligned}
 \frac{I_{[Cu^+]=excès}}{I_{[Cu^+]=0}} &= \frac{F_{PM}[PM] + F_{PMA}[PMA]}{F_P C_P} \\
 &= \frac{F_{PM} C_P - x(F_{PM} - F_{PMA})}{F_P C_P} \text{ d'après (3)} \\
 &= \underbrace{\frac{F_{PM}}{F_P}}_{\alpha, \text{ d'après (4)}} - \underbrace{\frac{(F_{PM} - F_{PMA})}{F_P}}_{\beta} \cdot \frac{x}{C_P}
 \end{aligned} \tag{5}$$

- La constante de l'équilibre de formation du complexe ternaire (PMA) à partir du peptide lié au cuivre(I) (PM) est :

$$K_{\text{ternaire}} = \frac{[PMA]}{[PM][A]} = \frac{x}{(C_P - x)C_A}, \text{ d'où } \frac{x}{C_P} = \frac{K_{\text{ternaire}} C_A}{1 + K_{\text{ternaire}} C_A} \tag{6}$$

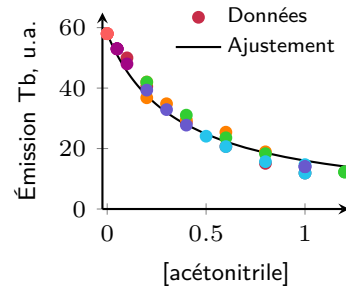
$$\boxed{\frac{I_{[Cu^+]=excès}}{I_{[Cu^+]=0}} = \underbrace{\frac{F_{PM}}{F_P}}_{\alpha} - \underbrace{\frac{(F_{PM} - F_{PMA})}{F_P}}_{\beta} \cdot \frac{K_{\text{ternaire}} C_A}{1 + K_{\text{ternaire}} C_A}} \tag{7}$$

- Ajustement de l'augmentation de luminescence du terbium pour des titrages à différentes concentration d'acétonitrile :
 - α , correspond à l'augmentation de luminescence lors d'un titrage du peptide par du cuivre(I) en l'absence d'acétonitrile (cf (4)). Nous avons considéré que cela correspond au titrage en présence d'hydroxyamine. Ainsi $\alpha = 58$, d'après §2.3.3.
 - β , correspond à la différence de luminescence du peptide métalé par du cuivre(I) et la luminescence du complexe ternaire. Pour calculer β , de la luminescence du complexe ternaire. Nous considérons que la luminescence du complexe ternaire est la même que celle du peptide libre, car dans les deux cas le tryptophane est libre et sensibilise peu le terbium. Cependant nous avons pu ajuster correctement les données expérimentales avec des valeurs allant de 0 à la luminescence du peptide libre, c'est-à-dire F_{PMA}/F_P allant de 0 à 1.

$$\beta = \underbrace{\frac{F_{PM}}{F_P}}_{\alpha} - \underbrace{\frac{F_{PMA}}{F_P}}_{=1} = 58 - 1 = 57 \tag{8}$$

L'ajustement de la figure est réalisé « à la main », par essais de valeurs.

$$\boxed{K_{\text{ternaire}} = 2,9 \pm 0,2}$$



Résumé en français

Le zinc et le cuivre sont à la fois essentiels et toxiques pour les organismes vivants, c'est pourquoi ils sont très finement régulés. Pour comprendre le rôle et les flux de ces métaux, il est nécessaire de pouvoir les imager, notamment à l'aide de sonde fluorescente. Les sondes développées sont basées sur des sites de liaison de métalloprotéines et un complexe de lanthanide pour l'émission en temps résolu.

Le principe de la sonde à cuivre(I), inspirée de la chaperonne CusF, repose sur la formation d'une interaction cation- π entre le cuivre(I) et la chaîne latérale du tryptophane. Cette interaction modifie les propriétés du tryptophane et conduit à l'augmentation de la luminescence du terbium. L'étude du mécanisme spectroscopique a montré que l'interaction cation- π augmente le croisement intersystèmes et donc la population de l'état triplet du tryptophane, ce qui permet de transférer plus d'énergie au lanthanide. Cette sonde est sélective de Cu^+ parmi les cations physiologiques mais s'allume également en présence d'argent(I). Cette sonde a été modifiée dans le but d'améliorer ses propriétés (constantes d'affinité, sélectivité, contraste, longueur d'onde d'émission). L'une des sondes dérivées est capable de différencier entre Cu^+ et Ag^+ , ce qui est unique.

Le principe de la sonde à zinc, basée sur une séquence à doigt de zinc, repose sur la modulation du transfert d'énergie entre le lanthanide et son antenne par une modification de la distance. La sonde s'allume sélectivement en présence de zinc. La sonde a ensuite été modifiée, premièrement pour incorporer un second complexe de lanthanide et obtenir une sonde ratiométrique, et deuxièmement pour décaler les longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement vers le spectre visible et le proche infra-rouge. Sur ce dernier point, une nouvelle antenne a été découverte pour la sensibilisation à le néodyme.

Résumé en anglais

Zinc and copper are essential and toxic for living organisms, so they are tightly regulated. To understand, at cellular level, the role of the kinetically exchangeable pool of these metals and their fluxes, we have designed peptidic luminescent probes based on the binding site of metalloproteins and on a lanthanide complex as time-resolved emitting moiety.

The copper(I) probe, which is inspired by the chaperone CusF, rely on the formation of a cation- π interaction between copper and a tryptophan side chain to turn on the luminescence of a terbium ion. Detailed spectroscopic characterizations, including time-resolved spectroscopy, have shown that the cation- π enhances intersystem crossing and thus population of the tryptophan triplet state, which transfers energy to the lanthanide. This probe is selective for Cu^+ among physiological cations but is able to detect silver(I) also. This probe was modified to change its properties (binding constants, selectivity, contrast, emission wavelength). Among derived probes, one of them is able to discriminate between Cu^+ and Ag^+ , a property that has not been reported so far for copper or silver probes.

The zinc probe is based on a zinc finger sequence and rely on the modulation of energy transfer between the lanthanide and its antenna by a distance change. It turns on upon zinc binding and is perfectly selective for zinc. The probe was then modified (i) to incorporate a second lanthanide complex and obtain a ratiometric probe and (ii) to shift the excitation and emission wavelength to the visible and near infrared, respectively. Concerning this last point, a new antenna was discovered for the sensitization of the neodymium ion.