



HAL
open science

Interaction de l'or avec des peptides modèles de doigts de zinc : caractérisation de la complexation des sels d'or et application à la toxicologie des nanoparticules d'or

Aurélie Jacques

► To cite this version:

Aurélie Jacques. Interaction de l'or avec des peptides modèles de doigts de zinc : caractérisation de la complexation des sels d'or et application à la toxicologie des nanoparticules d'or. Chimie inorganique. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV075 . tel-01555528

HAL Id: tel-01555528

<https://theses.hal.science/tel-01555528v1>

Submitted on 4 Jul 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 DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie Bio-Inorganique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Aurélie JACQUES

Thèse dirigée par **Jean-Marc LATOUR**
codirigée par **Olivier SENEQUE**

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

Interaction de l'or avec des peptides modèles de doigts de zinc : caractérisation de la complexation des sels d'or et application à la toxicologie des nanoparticules d'or.

Thèse soutenue publiquement le **18 / 12 / 13**,
devant le jury composé de :

Pr. Olivia REINAUD

Professeur, Université Paris Descartes, Paris (Rapporteur)

Pr. Peter FALLER

Professeur, Université de Toulouse (Rapporteur)

Dr. Olga IRANZO

Chargée de recherche, Université Aix-Marseille III, Marseille

Dr Pascale MALDIVI

Directeur de recherche, CEA Grenoble

Dr. Olivier SENEQUE

Chargé de recherche, CEA Grenoble

Dr. Jean-Marc LATOUR

Directeur de recherche, CEA Grenoble



A ma famille

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier Olivier Sénèque et Jean-Marc Latour de m'avoir accueilli au sein de l'équipe PMB et m'accorder leur confiance tout au long de ces trois dernières années. Il m'est vraiment difficile d'exprimer toute ma gratitude à leur égard en si peu de mots. J'écrirais simplement que j'ai énormément appris à votre contact et que j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous. Je tiens tout particulièrement à remercier Olivier pour sa présence et tous les conseils précieux qu'il a pu me donner au quotidien.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont contribué à ce travail. Tout d'abord, Vincent Fourmond pour les mesures d'électrochimie du complexe Fe-L_{ZR} qui ont nécessité du doigté. Je tiens à le remercier ainsi que Christophe Léger et Carole Baffert pour leur accueil et leurs conseils précieux qui nous ont permis de finalement obtenir un canard en voltalmmétrie cyclique au bout de mon troisième séjour à Marseille. Martin Clémancey et Geneviève Blondin pour m'avoir fait découvrir les mystères des analyses Mössbauer et RPE. Angela Casini qui a eu la gentillesse de nous fournir les complexes d'or(III). Colette Lebrun pour toutes les analyses par spectrométrie de masse des complexes d'or. Et, je tiens tout particulièrement à remercier Tanguy Le Marchand (mon petit poisson rouge de L3) qui a montré beaucoup d'intérêt et fait preuve d'une grande efficacité au cours des deux mois qu'il a passé au laboratoire et a, ainsi, beaucoup contribué à l'avancement des études sur l'aurothiomalate. Je remercie la région Rhône-Alpes pour le financement de ma thèse.

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail : Olivia Reinaud et Peter Faller, en tant que rapporteurs et Olga Iranzo et Pascale Maldivi, en tant qu'examinatrices.

Et comme faire une thèse, c'est avant tout faire partie d'une équipe. Un grand merci à toute l'équipe PMB pour leur soutien, leurs conseils ainsi que pour leur bonne humeur et tous les bons moments passés ensemble. Et on garde les meilleurs pour la fin ! Je remercie toute la « team peptide », les stagiaires (Amandine, Tanguy et Valentin) et le noyau dur (Manon,

Vincent « Poupé » et Olivier). J'ai adoré travailler avec vous et aussi (et surtout !) passer d'excellents moments avec vous. A quand la prochaine sortie ?

De façon plus personnelle, je tiens tout d'abord à remercier ma Maman parce que ça doit bien faire 5 ans qu'elle n'attend que ça ! Plus sérieusement, un grand merci à mes parents qui ont toujours été là pour me soutenir, m'encourager et me pousser au cul tout au long de mes études. Merci également à toute ma famille qui a toujours cru en moi.

Et un très grand merci à Charly pour avoir su me supporter tout au long de ces trois années et plus particulièrement ces derniers mois. Je lui suis vraiment reconnaissante du soutien qu'il a pu m'apporter à sa manière bien à lui.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	V
SOMMAIRE	VII
ABREVIATIONS	XI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1. Utilisation des métaux en médecine	2
1.2. L'or	3
1.2.1. Utilisations de l'or en médecine	3
1.2.2. Propriétés physico-chimiques	6
1.3. Complexes d'or(I) à visée thérapeutique	10
1.3.1. Traitement de la polyarthrite rhumatoïde	10
1.3.2. Complexes à propriétés anti-tumorales	14
1.4. Complexes d'or(III) à visée thérapeutique	17
1.4.1. Complexes d'or(III) à ligands azotés	18
1.4.2. Complexes d'or(III) à ligands soufrés et carbonés	20
1.5. Protéines à cystéines, cibles biologiques des sels d'or	21
1.5.1. Protéines à cystéines ou sélénocystéines libres	22
1.5.2. Protéines à doigts de zinc	28
1.6. Objectifs de la thèse	36
1.7. Bibliographie	37
CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU PEPTIDE MODELE DE DOIGTS DE ZINC « ZINC RIBBON » ET DU SITE ACTIF DE LA RUBREDOXINE	41
2.1. Introduction	42
2.1.1. Intérêt des modèles peptidiques de doigts de zinc	42
2.1.2. Modèles développés au laboratoire : CPLT	43
2.2. Intérêt d'un nouveau modèle peptidique « zinc ribbon »	45

2.2.1. Les doigts de zinc de type « zinc ribbon »	46
2.3. Synthèse et caractérisation du peptide « zinc ribbon »	47
2.3.1. Protéine modèle, présentation	47
2.3.2. Design et synthèse du peptide	48
2.3.3. Caractérisations de la coordination du Zn^{2+} et du Co^{2+} avec L_{ZR}	51
2.3.4. Constante apparente de complexation du Zn^{2+} pour L_{ZR}	54
2.3.5. Structure en solution de $Zn^{II}-L_{ZR}$	55
2.4. Un nouveau modèle rédox-actif de rubrédoxine	58
2.4.1. Rubrédoxine et modèles, état de l'art	58
2.4.2. Caractérisation du complexe $Fe-L_{ZR}$	60
2.4.3. Propriété redox du complexe $Fe-L_{ZR}$	70
2.4.4. Discussion : comparaison avec les autres modèles de rubrédoxine	72
2.5. Conclusion	73
2.6. Bibliographie	74
CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'INTERACTION D'UN COMPLEXE D'OR(III), $Au^{III}TERP$, AVEC UN MODELE PEPTIDIQUE DE DOIGT DE ZINC, $Zn^{II}-L_{ZR}$	79
3.1. Introduction	80
3.2. Réaction directe d'$Au^{III}Terp$ avec $Zn^{II}-L_{ZR}$	82
3.2.1. Cinétique de réaction	90
3.3. Influence des thiols libres sur la réactivité d'$Au^{III}Terp$	91
3.3.1. Réactivité de l' $Au^{III}Terp$ avec les thiols libres	92
3.3.2. Réaction d' $Au^{III}Terp$ avec $Zn^{II}-L_{ZR}$ en présence de thiols libres	95
3.4. Discussion	100
3.4.1. Réactivité du complexe $Au^{III}Terp$ avec les doigts de zinc	100
3.4.2. Comparaison avec d'autres études sur l'interaction des complexes d' Au^{III} avec les doigts de zinc	101
3.4.3. Pertinence biologique	106
3.5. Conclusions et perspectives	106
3.6. Bibliographie	108
CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DE L'INTERACTION DES COMPLEXES $(Au^I-SR)_N$ AVEC DES PEPTIDES DOIGTS DE ZINC	111
4.1. Introduction	113
4.2. Propriétés spectroscopiques des complexes Au^I-thiolates	115
4.3. Propriétés de complexation de l'Au^ITm sur les CP1	119

4.3.1.	Interaction de CP1(CCHH) avec Au ^I Tm	119
4.3.2.	Interaction de CP1(CCCC) avec Au ^I Tm	124
4.3.3.	Interaction de CP1(CCHC) avec Au ^I Tm	133
4.4.	Interaction de l'Au^I avec les doigts de zinc métallés	137
4.4.1.	Zn ^{II} -CP1(CCHH)	137
4.4.2.	Zn ^{II} -CP1(CCHC)	142
4.4.3.	Zn ^{II} -CP1(CCCC)	143
4.4.4.	Bilan	147
4.5.	Influence des thiols libres sur la réactivité de l'Au^I	148
4.5.1.	<i>Apo</i> -peptides	149
4.5.2.	Zn ^{II} -peptides	150
4.5.3.	Bilan	150
4.6.	Discussion	151
4.6.1.	Caractéristiques spectroscopiques des complexes Au ^I _n -peptide	151
4.6.2.	Réactivité de l'aurothiomalate avec les doigts de zinc : pertinence biologique	154
4.7.	Conclusions et perspectives	156
4.8.	Bibliographie	158
CHAPITRE 5 :	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	159
5.1.	Conclusions générales	160
5.2.	Perspectives	162
5.3.	Bibliographie	165
CHAPITRE 6 :	PARTIE EXPERIMENTALE	167
6.1.	Materials and methods	169
6.2.	Design and characterization of a new peptidic model of « zinc ribbon », Zn^{II}-L_{ZR}	170
6.2.1.	L _{ZR} synthesis	170
6.2.2.	UV-Vis and CD titrations.	171
6.2.3.	Determination of the apparent binding constants L _{ZR} with Zn ²⁺ and Fe ²⁺ .	172
6.2.4.	NMR solution structure determination.	173
6.2.5.	UV-Vis and CD spectra of Fe ^{III} -L _{ZR} .	174
6.2.6.	Redox cycling of iron substituted L _{ZR} .	174
6.2.7.	Electrochemistry.	174
6.2.8.	Mössbauer spectroscopy.	175
6.2.9.	EPR spectroscopy.	175
6.3.	Interaction of Au^{III}Terpy salts with Zinc fingers peptides	176

6.3.1.	Zn ^{II} -L _{ZR} stock solutions.	176
6.3.2.	UV-Vis and CD titrations of Zn ^{II} -L _{ZR} by Au ^{III} Terpy.	176
6.3.3.	UV-Vis titration of Au ^{III} Terpy by Zn ^{II} -L _{ZR} .	176
6.3.4.	HPLC titration of Zn ^{II} -L _{ZR} by Au ^{III} Terpy.	176
6.3.5.	Stopped-flow kinetics measurements.	177
6.3.6.	UV-Vis and HPLC monitoring of the reactivity of Au ^{III} Terpy with Zn ^{II} -L _{ZR} in the presence of βME or GSH.	177
6.4.	Interaction of Au^ITm with Zinc fingers peptides	177
6.4.1.	Synthesis of CP1 peptides:	177
6.4.2.	Preparation of stock solutions of zinc complexes and <i>apo</i> -peptides.	178
6.4.3.	UV-Vis and CD Au ^I Tm direct titrations.	179
6.4.4.	CD Au ^I Tm / Zn ²⁺ competitions studies.	179
6.4.5.	Monitoring of Zn ²⁺ release with PAR.	179
6.4.6.	NMR solution structure determination of Au ^I ₃ -CP1(CCCC).	180
6.5.	Bibliographie	181
CHAPITRE 7 :	ANNEXES	183
7.1.	Données RMN de Zn^{II}-L_{ZR}	184
7.2.	Données RMN de Au^I₃-CP1(CCCC)	188
7.3.	Articles publiés	196

ABREVIATIONS

Ac ₂ O	Anhydride acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Alloc	Allyloxycarbonyl
AP-1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucléique
AuNP	Nanoparticule d'or
AuTm	Aurothiomalate
Bipy	2,2'-bipyridine
BisTris	[Bis(2-hydroxyéthyl)amino]tris(hydroxyméthyl)méthane
βME	β-mercaptoéthanol
CD	Dichroïsme circulaire
COSY	Correlation spectroscopy
CPLT	Cyclic peptide bearing a linear tail, Peptide cyclique incorporant une queue linéaire
d2pypp	1,3-bis(di-2-pyridylphosphino)propane
DCM	Dichlorométhane
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
Dien	Diéthylène triamine
DLC	Delocalized lipophilic cations, Cations lipophiles délocalisés
DMDT	N,N-diméthylthiocarbamate
DMF	N,N-diméthylformamide
dppe	1,2-bis(diphénylphosphino)éthane
DSS	Sodium de 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétique
ESDT	Ethylsarcosinedithiocarbamate

Abréviations

ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry, Spectrométrie de masse à source d'ionisation par électrospray
Et ₂ O	Diéthyléther
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fmoc	9-fluorénylméthoxy-carbonyl
GSH	Glutathion
HEDTA	Acide N-(2-hydroxyéthyl)éthylènediamine-N,N',N'-triacétique
HEPES	Acide 4-(2-Hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique
HPLC	High-performance liquid chromatography, Chromatographie liquide haute performance
Hsp33	Heat shock protein 33
IC ₅₀	Concentration d'inhibiteur causant 50% d'inhibition
IL	Interleukines
ILS	Increase in life span, augmentation de la durée de vie
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LMCT	Ligand-to-metal charge transfer, Transfert de charge du ligand vers le métal
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Naphth	Naphthalène
NCp7	Protéine nucléocapside du VIH-1
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NHC	Carbène N-hétérocyclique
NHE	Electrode normale à hydrogène
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NP	Nanoparticules
PARP-1	Poly(adénosine diphosphate ribose) polymérase 1
PDB	Protein Data Bank
PerR	Peroxide resistance Regulator
Phen	Orthophénantroline
PyBOP	(Benzotriazole-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
Rd	Rubrédoxine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RP	Reversed phase, Phase inverse
RPE	Résonance paramagnétique électronique
Sec	Sélocystéine
SHE	Electrode standard à hydrogène

TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
Terpy	2,2':6',2''-terpyridine
TFA	Acide trifluoroacétique
TIS	Triisopropylsilane
TNF α	Tumor necrosis factor α
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPEN	Tetrakis-(2-pyridylméthyl)éthylènediamine
TPP	Tetraarylporphyrine
Trt	Trityl
Trx	Thiorédoxine
TrxR	Thiorédoxine réductase
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide, Nanoparticules d'oxyde de fer
UV/Vis	Ultra-violet/visible
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ZF	Zinc finger, Doigt de zinc
ZFS	Zero-field splitting, Levée de dégénérescence en champ nul

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Sommaire :

1.1. Utilisation des métaux en médecine	2
1.2. L'or	3
1.2.1. Utilisations de l'or en médecine	3
1.2.2. Propriétés physico-chimiques	6
1.3. Complexes d'or(I) à visée thérapeutique	10
1.3.1. Traitement de la polyarthrite rhumatoïde	10
1.3.2. Complexes à propriétés anti-tumorales	14
1.3.2.1. Analogues d'auranofine	14
1.3.2.2. Complexes tétraédriques d'or(I) à multiples ligands phosphines	16
1.3.2.3. Complexes or(I)-carbènes	17
1.4. Complexes d'or(III) à visée thérapeutique	17
1.4.1. Complexes d'or(III) à ligands azotés	18
1.4.2. Complexes d'or(III) à ligands soufrés et carbonés	20
1.5. Protéines à cystéines, cibles biologiques des sels d'or	21
1.5.1. Protéines à cystéines ou sélélocystéines libres	22
1.5.1.1. La thiorédoxine réductase	22
1.5.1.2. Les cathépsines	26
1.5.1.3. Les facteurs de transcription	27
1.5.2. Protéines à doigts de zinc	28
1.5.2.1. Qu'est-ce qu'un doigt de zinc ? Quelle est son importance biologique ?	28
1.5.2.2. Interaction doigts de zinc-or : état de l'art	29
• Interaction des complexes d'or(I) avec les peptides de type doigts de zinc	30
• Interaction des complexes d'or(III) avec les peptides de type doigts de zinc	32
1.6. Objectifs de la thèse	36
1.7. Bibliographie	37

1.1. UTILISATION DES METAUX EN MEDECINE

L'utilisation des métaux à des fins médicales est de nos jours très répandue. Et les recherches dans ce domaine vont grandissantes. Que ce soit pour trouver de nouvelles molécules offrant des propriétés thérapeutiques ou d'imagerie innovantes par rapport aux molécules organiques ou pour mieux comprendre le mécanisme d'action de complexes déjà utilisés, le champ des recherches dans ce domaine est très vaste.

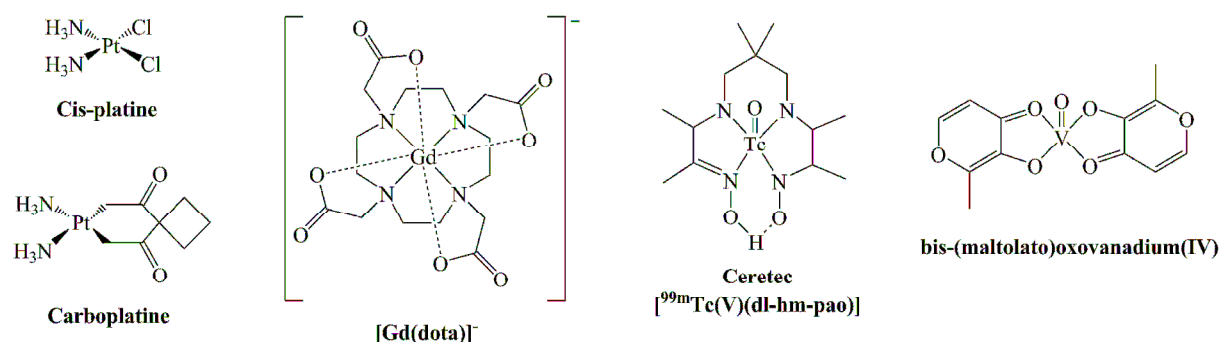


Figure 1 : Quelques exemples de complexes métalliques possédant des propriétés thérapeutiques ou d'imagerie intéressantes.

Le complexe métallique le plus connu et le plus utilisé dans les traitements anticancéreux est le cisplatine (Figure 1). Sa découverte par Rosenberg en 1965 et sa très large utilisation médicale depuis 1978 a ouvert le champ de la recherche dans le domaine de la chimie inorganique biomédicale (ou « chimie élémentaire »).¹ Ainsi, d'autres molécules ont pu voir le jour et sont utilisées couramment en médecine. Les exemples les plus connus sont les complexes de gadolinium utilisés comme agent de contraste pour les IRM ou les complexes de technétium et rhénium utilisés en radiodiagnostic et radiothérapie.

De nos jours, de nombreux complexes de métaux montrent des propriétés très intéressantes et sont très largement étudiés. Ainsi, le vanadium (Figure 1) a un gros potentiel pour être utilisé en tant que mime de l'insuline. De même, l'utilisation de lanthanides dans l'imagerie médicale est très largement étudiée.^{2,3}

Outre la recherche de nouveaux complexes ayant des propriétés thérapeutiques, de nombreuses recherches portent sur la compréhension du mécanisme d'action d'anciens

médicaments comme le bismuth, encore utilisé pour le traitement des ulcères gastriques ou encore les sels d'or(I) qui sont utilisés dans les traitements de la polyarthrite rhumatoïde depuis plus de 80 ans. Ceci amène à la découverte de nouvelles propriétés de ces sels d'or, telles que des propriétés anticancéreuses, antimalariales et anti-VIH ainsi qu'à la recherche de nouveaux complexes présentant des effets secondaires amoindris.

Un autre aspect plus récent des métaux en médecine est l'utilisation des nanoparticules (NP) inorganiques. En effet, ces nanoparticules sont très intéressantes du fait de leurs propriétés optoélectroniques intrinsèques qui dépendent à la fois du métal qui constitue la NP mais également de la taille et de la forme de cette dernière. Certaines de ces nanoparticules sont d'ores et déjà utilisées comme antibactériens dans les pansements (AgNP), dans la composition des crèmes solaires (TiO₂-NP) ou encore en imagerie médicale (GdNP, USPIO).^{4,5} De nombreuses recherches portent sur l'utilisation des nanoparticules à des fins de diagnostic et à des fins thérapeutiques. Dans ce domaine, les nanoparticules d'or font office d'objets d'études très intéressants de par leurs propriétés particulières.

1.2. L'OR

De tout temps l'or a suscité la fascination de l'homme. De par sa couleur dorée, l'or a été très vite utilisé pour l'ornementation et plus particulièrement l'ornementation religieuse. En Egypte, notamment, on pensait que l'or était l'incarnation du dieu du Soleil, Ra ou Ré, et il est présent dans tous les sites religieux, jusqu'aux tombes des pharaons. L'exemple le plus frappant reste encore le faste de la tombe de Toutankhamon. Les applications médicales de l'or sont moins connues. Pourtant, elles semblent aussi anciennes que son utilisation ornementale.

1.2.1. Utilisations de l'or en médecine

L'utilisation de l'or à des fins thérapeutiques remonte à l'Antiquité où, dans la tradition chinoise, de fines poudres d'or étaient utilisées dès 2500 avant Jésus-Christ.⁶ Dès lors, l'or a souvent été utilisé à des fins pseudo-médicinales à travers le monde sous forme de décoction ou sous forme d'amulettes. En effet, de par la couleur particulière de ce métal, on lui attribuait

des pouvoirs de guérisons et de protection.⁷ On peut toutefois noter que, dans la tradition Ayurvédique en Inde, l'or était utilisé sous forme de fines poudres pour le traitement entre autre de l'asthme et de l'arthrite, cette dernière application existant encore de nos jours.⁸

Les premières recherches « rationalisées » sur l'or remontent au Moyen-Age avec les alchimistes et la poursuite de l'élixir de vie capable de rendre la jeunesse. Ainsi, au 8^{ème} siècle, Geber découvrit que l'eau régale, une solution composée d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique 1:3, est capable de dissoudre l'or(0) sous forme d'acide tetrachloraurique. Ceci conduisit à l'ère de l'or potable, « aurum potabile », qui était utilisé comme une panacée, sans qu'aucun véritable effet curatif ait pu être mis en évidence. Ceci était en partie dû au fait qu'il n'existait pas un protocole unique. Ainsi, suivant les protocoles utilisés, l'or pouvait soit être absent, soit sous forme d'or(0) soit sous forme de sels d'or +I ou +III.⁷

Vers la fin du 19^{ème} siècle, les premières utilisations médicales modernes de l'or appurent. En effet, en 1890, le bactériologiste allemand Robert Koch mit en évidence que le dicyanoaurate(I) de potassium avait des effets cytotoxiques sur le bacille de Koch, la bactérie responsable de la tuberculose. Il fut donc introduit dans le traitement de la tuberculose dans les années 1920 et 1930 avant que des essais cliniques ne mettent en évidence l'inefficacité de la chrysothérapie contre la tuberculose.^{7,9} Dans le même temps, Jacques Forestier introduisit la chrysothérapie pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, on pensait que le bacille de Koch était également responsable de cette maladie. Différents sels d'or ont servi pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde parmi lesquels l'auranofine, l'aurothiomalate et l'aurothioglucose sont les plus utilisés.¹⁰ (Figure 2)

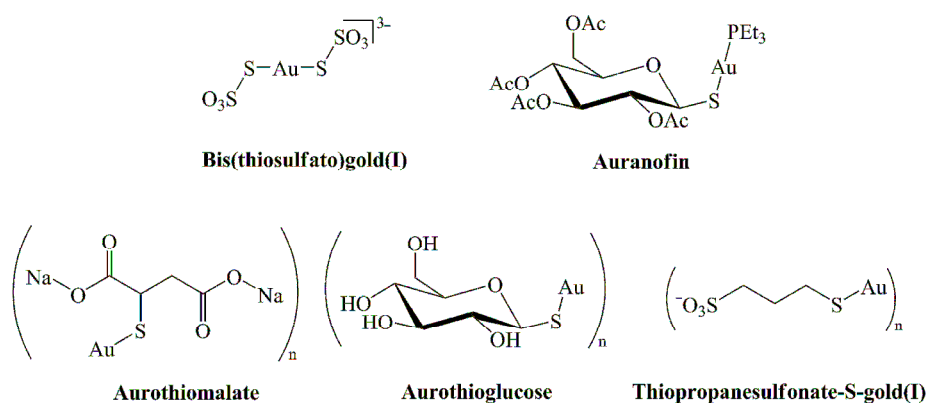


Figure 2 : Formules des différents sels d'or(I) utilisés pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

Depuis, les recherches sur les applications médicales de l'or n'ont pas cessé, conduisant à un grand développement des sels d'or et permettant la mise en évidence de nouvelles activités thérapeutiques de ceux-ci. Notamment, l'effet anti-VIH de l'or a pu être mis en évidence sur des patients atteints à la fois de polyarthrite rhumatoïde et du VIH et traités par des complexes d'aurothioglucose.¹¹ Des effets anti-malariaux de l'or ont également été rapportés.^{12,13}

La deuxième maladie après la polyarthrite rhumatoïde pour laquelle les sels d'or semblent avoir une forte activité est le cancer. Les recherches sur l'application de l'or en tant qu'anti-cancéreux remontent à la fin des années 1970 avec la découverte par Lorber *et al.* que l'auranofine a une activité cytotoxique importante à la fois *in vitro* et *in vivo* contre des cellules tumorales de type HeLa et P388.¹⁰ Ceci a conduit au développement de nombreux sels d'or à ligands de type diphosphine, mais les essais précliniques ont révélé qu'ils étaient très toxiques chez l'animal.¹⁴ D'autres sels d'or(I) sont encore en train d'être étudiés mais l'essentiel des recherches sur les traitements anti-cancéreux par chrysothérapie portent sur les sels d'or(III). Historiquement, l'idée que les sels d'or(III) pourraient servir d'anti-cancéreux remonte aux années 1980 et est basée sur l'analogie avec le Pt(II) du cis-platine de par sa configuration d⁸ et sa géométrie plan-carrée (voir plus loin). Le développement de ces sels d'or(III) est encore de nos jours très important et les résultats semblent prometteurs.

L'utilisation de l'or colloïdal, ou nanoparticule d'or (AuNP), semble remonter à l'Antiquité. La coupe de Lycurgus, une coupe romaine datant du IV^{ème} siècle après Jésus-Christ et conservée au British Museum en est l'exemple le plus connu. Cependant, l'or colloïdal ne semble pas avoir été utilisé à des fins thérapeutiques au cours de l'Histoire, mis à part involontairement dans certaines recettes d'or potable citées précédemment. L'utilisation des nanoparticules d'or semble commencer dans les années 1970 avec l'application d'immunomarqueurs à l'or en microscopie électronique.¹⁵ Depuis lors, il y a eu une émergence exponentielle d'articles portant sur l'utilisation des nanoparticules d'or à des fins thérapeutiques ou de diagnostic.

1.2.2. Propriétés physico-chimiques

Avant d'aborder la chimie de l'or en milieu biologique et la possible toxicité des nanoparticules d'or, il est important de bien connaître les propriétés physico-chimiques particulières de ce métal.

L'or, dont le symbole chimique Au vient du latin « aurum », est le 79^{ème} élément du tableau périodique des éléments. Il appartient à la famille des métaux nobles et est considéré comme étant le métal le plus résistant à la corrosion et à l'oxydation. Ceci a conduit à son utilisation, entre autres, dans les couronnes dentaire et comme enrobant des pilules en pharmacie. On le trouve à l'état naturel sous forme solide et son abondance naturelle est faible. Il n'appartient pas aux métaux essentiels à la vie mais quelques plantes et microorganismes qui vivent dans les zones riches en or sont capables de le stocker. Certaines souches de *Bacillus megaterium* sont même capables de solubiliser l'or en sécrétant des acides aminés tels que l'acide aspartique, l'histidine, la sérine, l'alanine et la glycine.¹⁶ On retrouve également de l'or en très faibles quantités dans le corps humain, à raison de 0,35 µg d'or(0) par gramme de poids tissulaire sec. On en retrouve notamment dans le sang, les cheveux, la peau et les ongles et en plus grande quantité sous les alliances en or suite à une dissolution du bijou par la peau.^{6,17}

L'or se trouve majoritairement à l'état d'oxydation 0 où sa configuration électronique est [Xe] 4f¹⁴ 5d¹⁰ 6s¹. L'or existe à d'autres degrés d'oxydation compris entre -I et +V. Cependant, dans les solvants aqueux, seuls les degrés d'oxydation 0, +I et +III sont stables. Les ions aureux, or(I), et auriques, or(III), peuvent être obtenus à partir de l'or solide par cyanuration et par dissolution dans l'eau régale respectivement. Il faut toutefois noter que l'or(I) libre en solution n'est pas stable mais se dismute en or(0) et or(III) mais ceci peut être empêché par la présence de ligands stabilisants.

La plupart des propriétés physico-chimiques de l'or viennent du très fort effet relativiste que présente ce dernier. En effet, d'après Pyykko, l'effet relativiste que présentent tous les métaux lourds serait le plus fort pour l'or (Figure 3).¹⁸ Ainsi cet effet relativiste est responsable de la contraction du rayon atomique de l'or à 62 pm (contre 68 pm pour l'argent) conduisant à des longueurs de liaisons réduites. Ceci contribue à différents effets sur la physico-chimie de l'or parmi lesquels le plus visible est la couleur doré de l'or métallique ou

rouge de l'or colloïdal qui est due à la transition des électrons des niveaux 5d vers le niveau 6s. Plus important encore, l'effet relativiste est responsable de l'aurophilie de l'or permettant des interactions or-or courtes (environ 3 Å) que ce soit au degré d'oxydation 0 ou au degré d'oxydation +I.^{10,19} Ce sont des liaisons covalentes quand l'or est au degré d'oxydation 0 et des liaisons non covalentes équivalentes énergétiquement à des liaisons hydrogène²⁰ appelées liaisons *aurophiles* quand l'or est au degré d'oxydation +I.

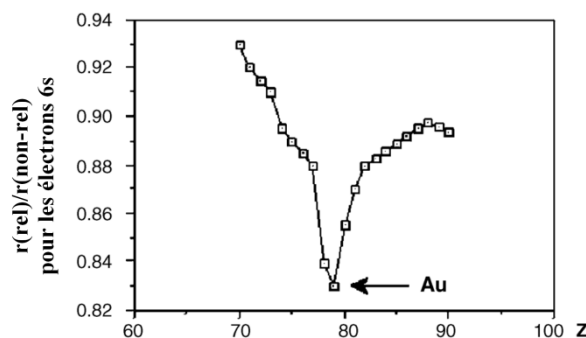


Figure 3 : Contraction relativiste pour les électrons des orbitales 6s pour les éléments allant de l'Yb (Z = 70) au Th (Z = 90). On observe une forte contraction du rayon électronique du fait de l'effet relativiste au fur et à mesure que l'orbitale 5d se remplit avec un minimum local très prononcé pour l'or.^{18,19}

Ces interactions or-or sont très connues car elles sont à l'origine de la capacité qu'a l'or de former des agencements de types clusters ou, à plus grande échelle, de former des nanoparticules d'or mais ces interactions existent également au niveau des complexes de type or(I)-thiolates de plus petites tailles (Figure 4). Les clusters (1-2 nm) et les nanoparticules d'or (2-100 nm) de formules générales Au_n-SR_m présentent une organisation similaire. En effet, ils sont constitués de deux parties bien distinctes à savoir, un cœur, composé uniquement d'atomes Au^0 reliés entre eux par des liaisons covalentes et une enveloppe, composée d'ensembles (Au^I-SR) reliés au cœur par des interactions aurophiles (Figure 4). Ainsi, la formule générale des clusters et des nanoparticules est en réalité de type $(Au_n)_m^0(Au^I-SR)_m$.²⁰⁻²⁴ Les complexes de type or(I)-thiolates de formule générale $(Au^I-SR)_n$ quant à eux s'organisent dans l'eau sous forme de polymères linéaires ou cycliques (Figure 4).^{1,10,20,25} C'est cette organisation qui permet l'existence d'interactions aurophiles entre les différents monomères. Ceci a notamment été caractérisé sur l'aurothiomalate, l'un des complexes d'or les plus utilisés pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Sa structure cristallographique a permis de mettre en évidence l'existence d'un tel arrangement

polymérique. Pour ce cas précis, le polymère s'organise sous forme de double hélice droite ou gauche suivant si l'or(I) est complexé à l'énantiomère R ou S du ligand thiomalate (Figure 5).²⁵ Cet arrangement en double hélice permet l'existence d'interaction aurophiles intra- (3,485(2) Å entre deux ions or(I) successifs) et interhélices (3,227(5) Å). Une structure hexamérique cyclique a également été mise en évidence sur la structure cristallographique du complexe (2,4,6-tri(isopropyl)thiophénolate)or(I) montrant que les polymères peuvent adopter différentes structures suivant la nature des ligands.¹

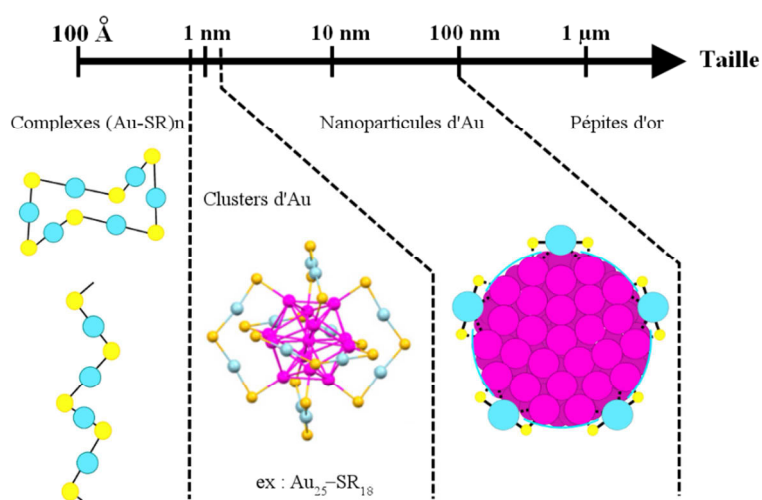


Figure 4 : Echelle de taille des complexes d'or-thiolates¹⁰ sous forme cyclique (haut) et linéaire (bas), des clusters d'or²³ et des nanoparticules d'or²¹. Sur les schémas, l' Au^I , l' Au^0 et les ligands thiolates sont représentés respectivement par des sphères bleues, roses et jaunes. Les substituants R sur les thiolates ont été retirés pour plus de clarté.

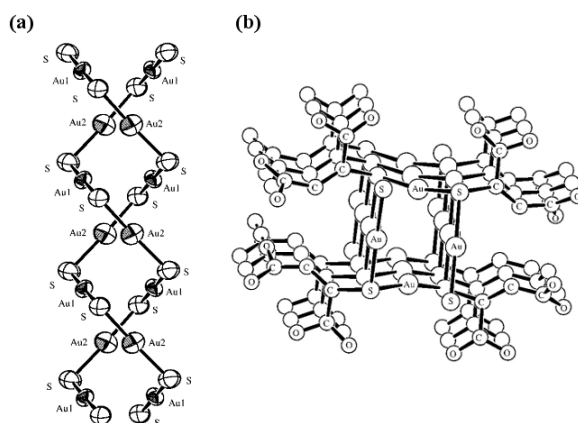


Figure 5 : Structure cristallographique de l'aurothiomalate vue de côté (a) et du dessus (b). L'aurothiomalate adopte une structure en double hélice gauche (formé uniquement avec des ligands (S)-thiomalate) avec un pas d'hélice d'environ 4, d'après Bau.²⁵

Plus généralement, l'ion aureux, Au^{I} , de configuration d^{10} , est mou dans la théorie de Pearson ce qui fait qu'il préférera des ligands mous tels que les thioéthers, les thiols, les phosphines, les sélénothiols, les cyanures ou encore les carbènes. Suivant la nature des ligands qui l'entourent, l'ion aureux peut être coordonné à deux, trois ou quatre ligands et ainsi adopter des géométries linéaires, trigonales ou tétraédriques. L'effet relativiste permet une grande stabilisation des complexes dicoordonnés linéaires par rapport aux tricoordonnés et tétracoordonnés, ainsi ce sont ces premiers qu'on rencontre majoritairement.^{10,19}

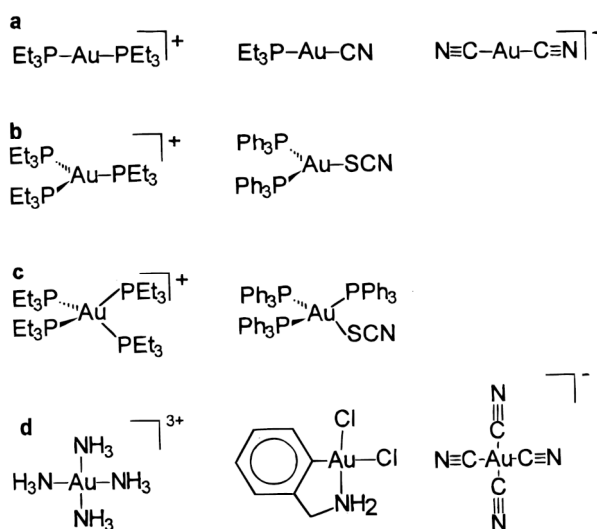


Figure 6 : Quelques exemples de sels d'or(I) (a) di-, (b) tri- et (c) tétracoordonnés et (d) de sels d'or(III).

Du fait de son degré d'oxydation plus élevé, l'ion Au^{III} de configuration d^8 se distingue de l'ion aureux par un caractère mou moins affirmé. De ce fait, il peut se complexer à un plus large éventail de ligands comprenant des amines, des thiocarbamates, des aromatiques ou encore des cyanures. L'ion aurique possède un potentiel d'oxydoréduction élevé (+ 0,55 V vs NHE pour $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_4]^-/[\text{Au}^{\text{I}}\text{Cl}_2]^-$)²⁶ qui le rend hautement oxydant vis-à-vis des thiols (- 0,3 à - 0,2 vs NHE).²⁷ Ainsi, sa réactivité avec les thiols a pu être observée vis-à-vis des cystéines ou du glutathion (Figure 7).²⁸⁻³²

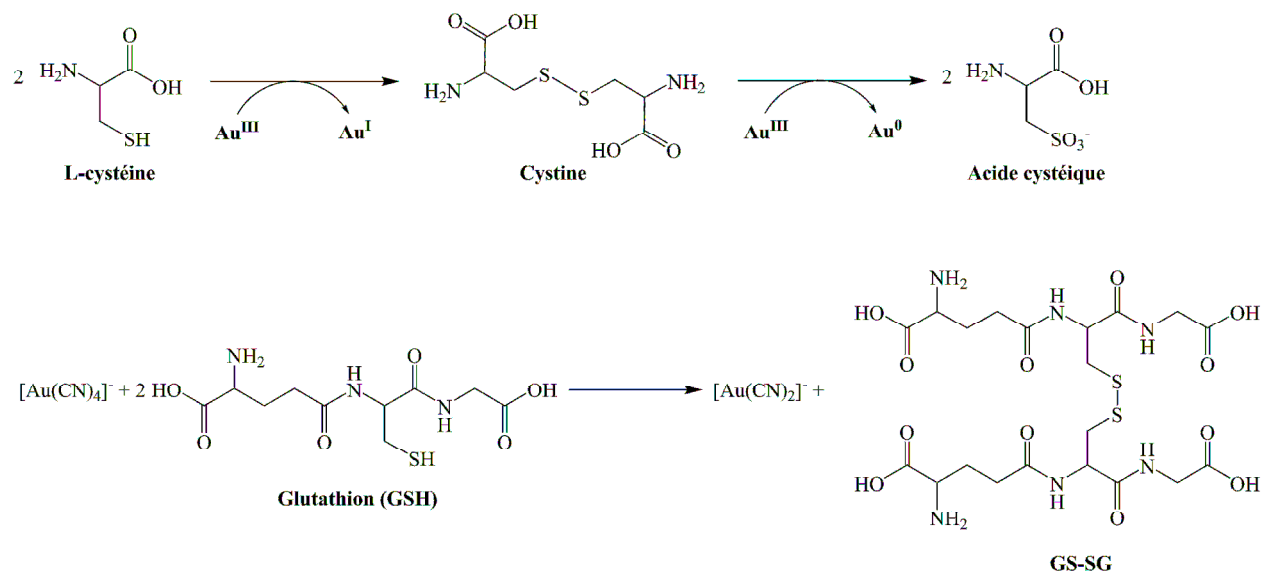


Figure 7 : Bilan de l'oxydation de la cystéine par l'ion aurique (en haut) et oxydation du glutathion par l'ion tetracyanoaurate(III).

1.3. COMPLEXES D'OR(I) A VISEE THERAPEUTIQUE

De nombreux complexes d'or(I) ont été développés. Les premiers complexes mis au point ont trouvé des applications dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Les suivants quant à eux ont été majoritairement développés pour des activités anti-cancéreuses.

1.3.1. Traitement de la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune qui se caractérise par une inflammation chronique des articulations (Figure 8). Cette inflammation conduit à un fort épaissement de la membrane synoviale et à la création de nouveaux vaisseaux sanguins à l'intérieur de la synovie qui vont permettre le rapatriement de cellules immunitaires (lymphocytes T, macrophages...). Les macrophages permettent l'expression dans la synovie d'un très grand nombre de cytokines et autres médiateurs de l'inflammation telles que le tumor necrosis factor α (TNF α) ou les interleukines (IL). Le TNF α et les interleukines vont à leur tour activer par diverses voies des facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1. Ceux-ci vont activer des gènes permettant la synthèse de nouvelles cytokines pro-inflammatoires, de nouvelles cellules immunitaires et activer les ostéoclastes qui sont les

cellules responsables de la dégradation des os. Ceci conduit progressivement à la déformation puis à la destruction des articulations.³³⁻³⁵

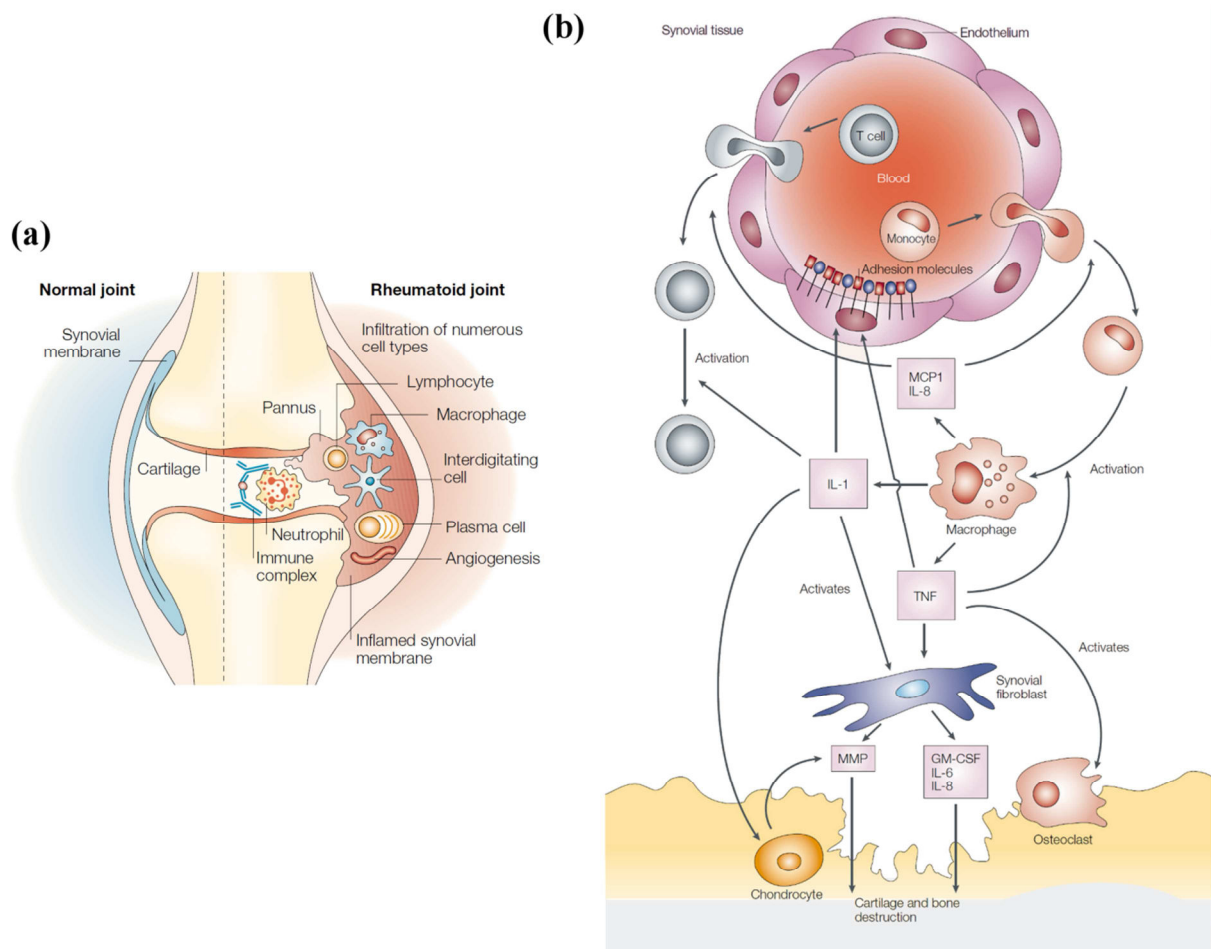


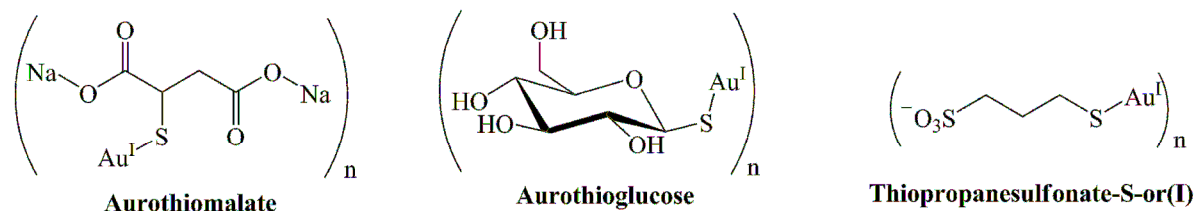
Figure 8 : (a) Comparaison entre une articulation saine et une articulation atteinte de polyarthrite rhumatoïde.³³ (b) Pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde.³⁴

Les causes de cette maladie sont encore inconnues et les traitements actuels consistent essentiellement en l'allègement des douleurs causées par l'inflammation par des traitements symptomatiques (antalgique et anti-inflammatoire) et la prévention des phénomènes de destruction des articulations (traitement de fond). Les complexes d'or ont longtemps eu une place de choix dans les traitements de fond de la polyarthrite rhumatoïde avant d'être abandonnés au profit du méthotrexate à cause de leurs trop nombreux effets indésirables. Aujourd'hui, seul l'aurothiomalate est encore utilisé dans certains rares cas.

Il existe plusieurs complexes d'or qui ont été utilisés comme traitements de fond (Figure 2). Ce sont tous des complexes d'or(I) dicoordonnés à géométrie linéaire. On peut les

regrouper en deux classes de composés : (i) les complexes polymériques à ligands de type thiols de formule générale $(\text{Au}^{\text{I}}-\text{SR})_n$ et (ii) les complexes monomériques à ligands phosphines de formule générale $\text{R}_3\text{P}-\text{Au}^{\text{I}}-\text{R}'$ (Figure 9).

Complexes $(\text{Au}-\text{SR})_n$ polymériques :



Complexes $\text{R}_3\text{P}-\text{Au}^{\text{I}}-\text{R}'$ monomériques :

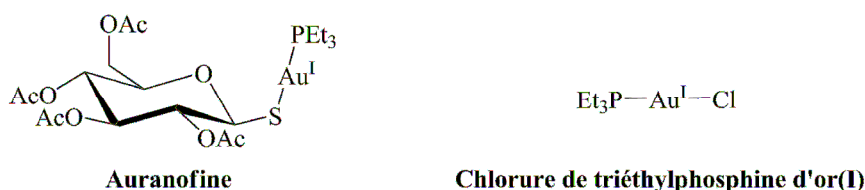


Figure 9 : Complexes d'or(I) de formule générale $(\text{Au}^{\text{I}}-\text{SR})_n$ et $\text{R}_3\text{P}-\text{Au}^{\text{I}}-\text{R}'$ utilisés pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

(i) Les complexes d'or de formule générale $(\text{Au}^{\text{I}}-\text{SR})_n$ comptent parmi leur rang la plupart des complexes d'or qui ont été utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde à savoir l'aurothiomalate, l'aurothioglucose et l'aurothiopropanolsulfonate (Figure 2). Comme nous l'avons mentionné au préalable dans la partie physico-chimie de l'or, ces complexes or-thiolate sont en fait sous la forme de polymères linéaires ou cycliques stables. Ces polymères sont hydrophiles et doivent être administrés par voie intraveineuse.

(ii) Les complexes d'or de formule générale $\text{R}_3\text{P}-\text{Au}^{\text{I}}-\text{R}'$, ne contiennent quant à eux que l'auranofine. Il s'agit d'un complexe d'or(I) neutre, linéaire et monomérique qui possède à la fois un ligand triéthylphosphine (R_3P) et un ligand acétylthioglucose (R'). On peut également y classer le chlorure (R') de triéthylphosphine (R_3P) d'or(I), qui est un analogue des métabolites de l'auranofine et qui est très étudié en tant que tel pour comprendre le mécanisme d'action de l'auranofine.

Grâce à la présence de son ligand phosphine, l'auranofine est hydrophobe contrairement aux autres complexes d'or(I). Ceci a permis son administration par voie orale ce qui l'a rendu

particulièrement attractif d'autant plus qu'il présente moins d'effets secondaires que ses prédécesseurs. Cependant, ceci s'accompagne d'une efficacité réduite.³⁶ Ainsi les traitements par voie orale ont peu à peu été abandonnés tandis que l'aurothiomalate est encore utilisé.

La présence de ce ligand phosphine sur l'auranofine permet également au composé de traverser les membranes contrairement aux complexes d'or(I) à ligand thiolates.¹⁴ Ceci semble être à l'origine de l'activité antitumorale de l'auranofine. En effet, il a été montré que l'auranofine permet l'inhibition de la croissance de cellules tumorales *in vitro* et présente des effets cytotoxiques limités *in vivo* sur des tumeurs P388 injectées à des souris (Tableau 1).^{10,14,37} Une étude de la relation entre la structure et la réactivité de différents analogues d'auranofine a permis de montrer que le ligand phosphine joue un rôle crucial dans l'activité cytotoxique du composé.^{10,37} Ceci est illustré dans le Tableau 1 par la comparaison des IC_{50} d'un analogue possédant uniquement le ligand phosphine, Et_3PAuCl , et d'un analogue possédant uniquement le ligand thiolate, l'auroacétylthiogluucose. Alors que le premier conserve un IC_{50} semblable à celui de l'auranofine, le second ne présente que très peu d'activités cytotoxiques.¹⁰ D'une manière plus générale, les complexes de type $(Au^I-SR)_n$ comme l'aurothiomalate ne présentent que de très faibles activités cytotoxiques *in vitro* et sont quasiment inactifs *in vivo* sur des tumeurs P388 injectées à des souris.¹⁴ Cependant, les activités antitumorales *in vivo* de l'auranofine sont plus faibles que celles du cis-platine et nécessitent d'être améliorées. Ainsi, de nombreux analogues d'auranofine ont été développés.

Tableau 1 : Activités antitumorale *in vivo* et activité cytotoxique *in vitro* du cis-platine et de quelques complexes d'or(I), d'après Shaw III.¹⁰

Complexes	Activités antitumorales <i>in vivo</i>		Activités cytotoxiques <i>in vitro</i>	
	ILS ⁱ (%)	Lignées tumorales	IC ₅₀ (μM)	Lignées cellulaires
Cis-platine	125	Leucémie P388	?	Mélanome B16
Auranofine	70	Leucémie P388	1,5	Mélanome B16
Et₃PAuCl	36	Leucémie P388	1	Mélanome B16
Auroacétylthioglucose	14	Leucémie P388	150	Mélanome B16
Aurothiomalate	24	Leucémie P388	60	Mélanome B16
Aurothioglucose	15	Leucémie P388	166	Mélanome B16

1.3.2. Complexes à propriétés anti-tumorales

D'après les résultats obtenus avec l'auranofine et les études de relations structure-activité, il est important de garder le ligand phosphine et d'augmenter la lipophilie du complexe d'or(I) pour augmenter sa capacité à traverser les membranes et ainsi avoir une meilleure activité antitumorale. En effet, de nombreuses preuves indiquent que les complexes d'or(I/III) devraient leur activité à un ciblage de différentes voies apoptotiques mitochondriales et plus particulièrement celles impliquant la thiorédoxine réductase.^{14,37,40-44} Ces observations ont amené au développement de nouveaux complexes avec des ligands à bases de phosphines et plus récemment à partir de carbènes.

1.3.2.1. Analogues d'auranofine

Les premiers complexes d'or(I) développés spécifiquement pour des applications anticancéreuses ont été tout naturellement des analogues d'auranofine à savoir des complexes

ⁱ L'activité antitumorale des complexes proposés s'exprime en pourcentage de l'allongement de la durée de vie des souris traitées (T) par rapport aux souris contrôles (C), noté ILS (pour « increase in life span ») et s'exprime d'après la formule : $ILS (\%) = (T/C - 1) \times 100$.^{38,39}

linéaires avec un ligand phosphine d'un côté et un ligand thiol de l'autre. Parmi ceux-ci on peut citer Au-Naphth-1 et des complexes de type phosphine-Au^I-dithiocarbamate (Figure 10).

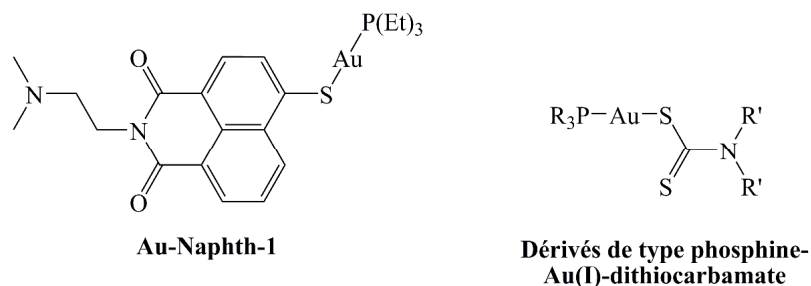


Figure 10 : Exemples de complexes d'or(I) analogues d'auranofine.

Le complexe Au-Naphth-1 est un complexe d'or(I) linéaire et mononucléaire qui possède le même ligand triéthylphosphine que l'auranofine et pour lequel le ligand acétylthiogluucose a été remplacé par un ligand naphthalimide.³⁷ Ce ligand a été choisi car il possède lui-même une activité anticancéreuse et plusieurs naphthalimides présentent de très bons résultats en essais pré-cliniques. Au-Naphth-1 présente des résultats intéressants. En effet, il s'est montré capable de pénétrer dans les cellules tumorales et d'inhiber leur croissance, d'induire l'apoptose et d'inhiber la thiorédoxine réductase.³⁷

Les complexes de type or(I)-dithiocarbamates quant à eux sont des complexes mononucléaires linéaires. Ils contiennent un ligand dithiocarbamate coordonné de façon monodente à l'ion aureux et un ligand phosphine (Figure 10). Un complexe dinucléaire or(I)₂-(dithiocarbamate)₂ a également été rapporté. Bien que quelques uns de ces complexes présentent des activités cytotoxiques plus importantes que le cis-platine (Figure 10), la plupart présentent des activités limitées et des profils cytotoxiques très variables suivant les complexes qui ne peuvent être rationalisées.⁴⁵ Les études sur ceux-ci ont donc été abandonnées au profit des complexes or(III)-dithiocarbamate qui présentent des résultats bien plus intéressants.

De façon générale, les activités *in vivo* de l'auranofine et de ses analogues sont limitées du fait de la présence de ligands thiolates échangeables donnant lieu à une complexation rapide et non spécifiques de l'ion aureux par des cystéines de protéines.¹⁴ Ainsi des complexes contenant uniquement des ligands phosphines ont été développés, nous allons en présenter quelques-uns ci-après.

1.3.2.2. Complexes tétraédriques d'or(I) à multiples ligands phosphines

Pour réduire ces réactivités non spécifiques vis-à-vis des thiols biologiques et augmenter la lipophilie du complexe d'or(I), l'idée a été d'entourer complètement l'ion aureux par quatre ligands phosphines suivant une géométrie tétraédrique. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un complexe mononucléaire ou dinucléaire entouré de deux ligands diphosphines bidentes tels que le 1,2-bis(diphénylphosphino)éthane (dppe) ou le 1,3-bis(di-2-pyridylphosphino)propane (d2pypp) (Figure 11).^{14,37,45} Mais il existe également quelques exemples avec un ou plusieurs ligands phosphines monodentes, tel que la tris(hydroxyméthyl)phosphine (Figure 11).^{14,37,45}

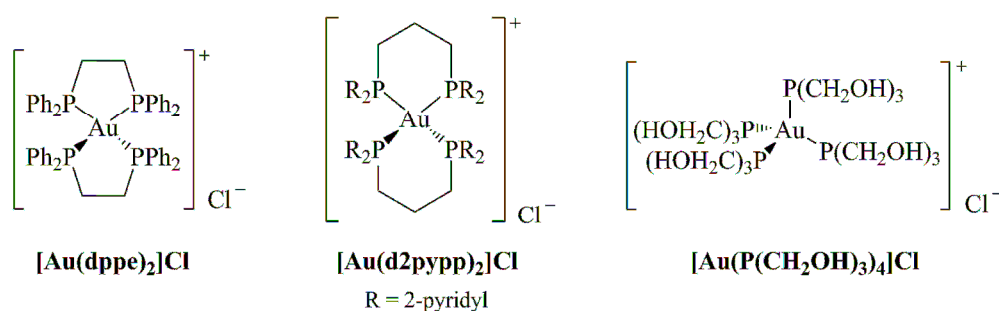


Figure 11 : Exemples de complexes or(I) à multiples ligands phosphines.

Ces différents complexes présentent de très fortes activités antitumorales *in vitro*, avec des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire ou même du nanomolaire, et *in vivo*.^{10,37,40} Les complexes à ligands diphosphines tels que [Au(dppe)₂]⁺ et [Au(d2pypp)₂]⁺ appartiennent au groupe des DLC (delocalized lipophilic cations). Ils ont ainsi la capacité de traverser les membranes et de s'accumuler dans la mitochondrie des cellules.¹⁴ Il est possible de cibler spécifiquement la mitochondrie des cellules tumorales en jouant sur la balance hydrophilie/lipophilie du complexe. En effet, la mitochondrie des cellules tumorales possède un potentiel membranaire plus important que celui des cellules saines. Mais si le complexe or(I)-phosphine est trop lipophile alors il s'accumulera également dans les cellules saines où il exercera une forte toxicité. C'est ainsi que [Au(dppe)₂]⁺, trop lipophile, a vu son développement s'arrêter au stade des essais précliniques.^{14,37,40} [Au(d2pypp)₂], quant à lui, s'accumule uniquement dans les cellules tumorales du cancer du sein où il induit l'apoptose par voies mitochondriales notamment par l'inhibition de la thiorédoxine réductase et de la thiorédoxine.

1.3.2.3. Complexes or(I)-carbènes

Les complexes or(I)-carbènes sont des complexes dicoordonnés linéaires. Ils possèdent des ligands de type carbènes N-hétérocycliques (NHC) monodentes pour les complexes mononucléaires et bidentes pour les complexes dinucléaires (Figure 12). Les NHC sont des ligands qui ont des propriétés de donneurs d'électrons similaires aux ligands phosphines mais qui ont l'avantage d'être plus simples à synthétiser.⁴⁰

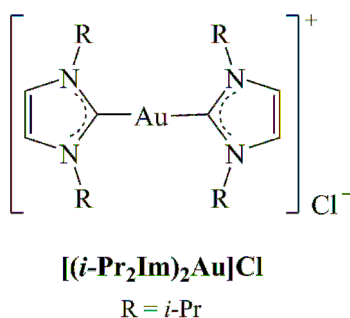


Figure 12 : Exemple de complexe or(I)-carbène.

De même que pour les complexes or(I)-phosphines, les complexes or(I)-carbènes sont cationiques et il est possible de moduler le caractère lipophile du complexe en modifiant les substituants alkyls R sur les azotes du carbène. Ainsi, [(i-Pr₂Im)₂Au]⁺ pour lequel les résultats se sont révélés les plus intéressants du fait de son caractère lipophile modeste s'est révélé actif uniquement sur les cellules tumorales du cancer du sein.^{14,37} Ces complexes or(I)-carbènes induisent l'apoptose des cellules tumorales par des voies mitochondriales et par inhibition de la thiorédoxine réductase tout comme les complexes or(I)-phosphine. Mais ils semblent également cibler d'autres voies conduisant à l'inhibition de la tyrosine phosphatase.³⁷

1.4. COMPLEXES D'OR(III) A VISEE THERAPEUTIQUE

L'ion aurique est isoélectronique et isostructurel de l'ion platine(II) qui possède une configuration électronique de type d⁸ et une géométrie plan carré. Du fait de leur analogie avec le cis-platine, il avait été envisagé que les complexes d'or(III) pourraient avoir des propriétés anticancéreuses importantes. De nombreux complexes d'or(III) ont été développés depuis quelques années dans ce but. Cependant, l'ion aurique n'est pas stable dans les cellules

où il est facilement réduit en ion aureux à cause de leur potentiel fortement réducteur lié à la présence de différentes espèces réductrices telles que le glutathion, la thiorédoxine et l'acide ascorbique. Il est donc important d'utiliser des ligands capables de stabiliser l'or(III) vis-à-vis des thiols biologiques.

Pour cela, l'idée principale a été d'utiliser des ligands polydents. Différents types de ligands ont été successivement développés pour y parvenir que ce soit des ligands de types azotés, soufrés ou carbonés. La plupart présentent de fortes activités cytotoxiques *in vitro* même contre les lignées cellulaires résistantes au cis-platine mais peu conservent cette activité *in vivo*.¹⁴

1.4.1. Complexes d'or(III) à ligands azotés

Les complexes à ligands azotés sont les premiers complexes d'or(III) qui ont été développés et représentent jusqu'à présent la plus grande famille de complexes d'or(III) développés pour des applications anticancéreuses. On trouve différents types de ligands comprenant entre autre des polypyridines, phénanthrolines, polyamines et porphyrines (Figure 13).

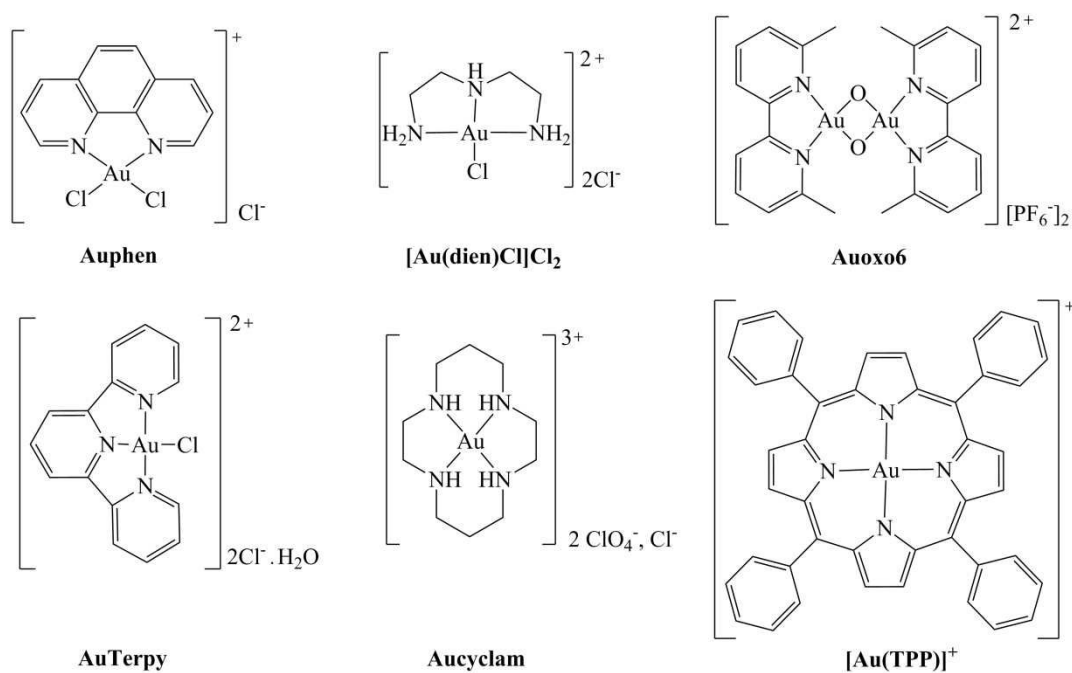


Figure 13 : Exemples de complexes d'or(III) avec des ligands azotés.

La présence de ces ligands polydentés azotés permet une bonne stabilisation du métal avec un abaissement du potentiel rédox de l'ion aurique pour la série de composés cationiques [Au(cyclam)]³⁺ (-0,20 V vs NHE), [Au(en)₂]³⁺ (+0,15 V vs NHE), [AuCl(dien)]²⁺ (+0,19 V vs NHE), [Au(terpy)Cl]²⁺ (+0,62 V vs NHE) et [Au(phen)Cl₂]⁺ (+0,80 V vs NHE).²⁶ Différents complexes dinucléaires ont également été synthétisés. Parmi ceux-ci, Auoxo6 présente les meilleurs résultats en termes de cytotoxicité et de stabilité.^{41,45}

Tous ces complexes, hormis [Au(cyclam)]³⁺, possèdent de bonnes activités cytotoxiques avec des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire sur les cellules cancéreuses d'ovaires humains A2780 sensibles, mais également, résistantes au cis-platine. Ceci indique que ces composés sont capables de passer outre les phénomènes de résistance au cis-platine, ce qui les rend particulièrement attrayants.

L'activité cytotoxique du cis-platine repose sur sa liaison covalente à l'ADN. Or ces complexes d'or n'interagissent avec l'ADN que par des interactions non covalentes faibles et réversibles.^{46,47} Ceci suggère qu'ils agissent de manière différente et en particulier par une forte inhibition de la thiorédoxine réductase avec des IC₅₀ de l'ordre du micro- voire même du nanomolaire.⁴¹ Cependant, la stabilité en milieu biologique de ces complexes n'a pas toujours été étudiée et il est possible que les espèces actives soient différentes.^{40,45}

Plusieurs complexes or(III)-porphyrines ont été synthétisés par Che *et al.*^{48,49} avec le complexe [Au(TPP)]⁺ en chef de file, qui possède un simple ligand tétraphénylporphyrine (Figure 13). Le ligand porphyrine protège fortement l'ion aurique vis-à-vis de la réduction par le glutathion et l'acide ascorbique pendant 72h.^{14,49} Ces complexes possèdent une activité cytotoxique *in vitro*⁴⁸ plus importante que le cis-platine et sont également actifs *in vivo*⁴⁹ avec une sélectivité pour les cellules cancéreuses. Le complexe [Au(TPP)]⁺ induit l'apoptose des cellules cancéreuses par l'activation de différentes voies mitochondriales « caspases dépendantes ou indépendantes ». ^{48,49} Ce serait entre autres lié à une interaction avec l'ADN.

D'une manière générale, les complexes d'or(III) à ligands azotés présentent des activités anti-cancéreuses très intéressantes *in vitro* mais leur manque de stabilité vis-à-vis des thiols limite leur activité *in vivo* sauf pour les complexes or(III)-porphyrines. Ainsi, de nouveaux complexes à base de ligands soufrés et carbonés sont développés depuis quelques années.

1.4.2. Complexes d'or(III) à ligands soufrés et carbonés

Du fait de leur développement récent, les complexes d'or(III) à ligands soufrés et carbonés ne présentent pas encore une grande diversité de composés mais ceux-ci présentent des résultats très intéressants aussi bien *in vitro* que *in vivo*.^{14,37,45}

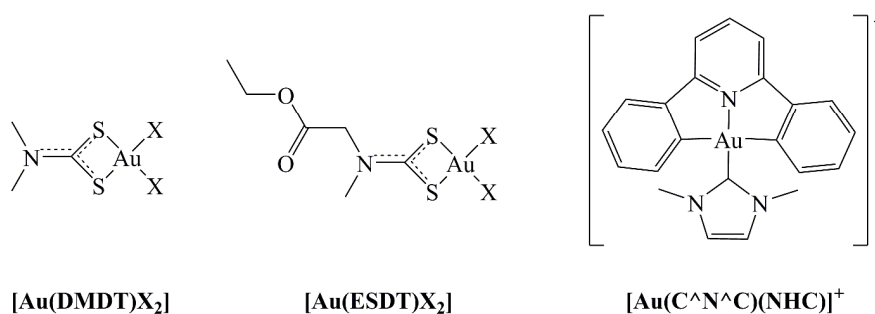


Figure 14 : Exemples de complexes d'or(III) à ligand S et C.

Les complexes à ligands soufrés sont des complexes de types or(III)-dithiocarbamates développés par Fregona *et al.* (Figure 14). Contrairement aux dérivés or(I)-dithiocarbamates qui présentaient des profils cytotoxiques variables, les complexes or(III)-dithiocarbamates présentent d'excellents résultats *in vitro* et *in vivo*.¹⁴ Pour cette série de composés, les complexes $[Au(DMDT)X_2]$ et $[Au(ESDT)X_2]$ ont montré les meilleurs résultats avec des cytotoxicités supérieures à celles du cis-platine *in vitro*.^{37,45} Ils sont également cytotoxiques sur les cellules humaines résistantes au cis-platine.^{37,45} Ces complexes induisent *in vivo* l'apoptose des cellules cancéreuses. Ceci semble être dû à une inhibition du protéasome par les complexes or(III)-dithiocarbamates.^{37,40}

Les ligands carbonés sont des ligands polydentes aromatiques qui possèdent au moins une liaison N–Au^{III}.³⁷ Les complexes qui ont montré les résultats les plus prometteurs *in vitro* et *in vivo* sont ceux développés par Che *et al.*⁴⁹ Il s'agit de composés d'or(III) de formule générale $[Au_m(C^N^C)_mL]^{n+}$ ($m = 1-3$ et $n = 0-3$), le ligand HC^N^CH étant une 2,6-diphénylpyridine et le ligand L pouvant être une phosphine ou un carbène N-hétérocyclique (NHC) (Figure 14). Ces complexes sont stables vis-à-vis du glutathion.^{45,49} *In vitro*, ils présentent des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire voire même du nanomolaire.⁴⁹ *In vivo*, ils permettent de supprimer la croissance tumorale sur des modèles de souris¹⁴ en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses par l'inhibition de la thiorédoxine réductase.³⁷

1.5.1. Protéines à cystéines ou sélénocystéines libres

1.5.1.1. La thiorédoxine réductase

Parmi les cibles potentielles identifiées pour les complexes d'or, la cible principale semble être la thiorédoxine réductase (TrxR).^{14,37,41-43} TrxR est une sélénoprotéine homodimérique (Figure 16(a)) constituée de deux monomères qui possèdent au niveau de leur site actif un cofacteur FAD, un site de fixation au NADPH, deux cystéines oxydées sous forme d'un pont disulfure à l'état natif et un motif Gly-Cys-Sec-Gly (Sec = sélénocystéine) provenant du second monomère (Figure 16(b)).^{41,55} La thiorédoxine réductase forme avec la thiorédoxine le deuxième système régulateur de l'état rédox de la cellule après le système glutathion réductase / glutathion.⁴⁰ La thiorédoxine réductase existe principalement sous deux

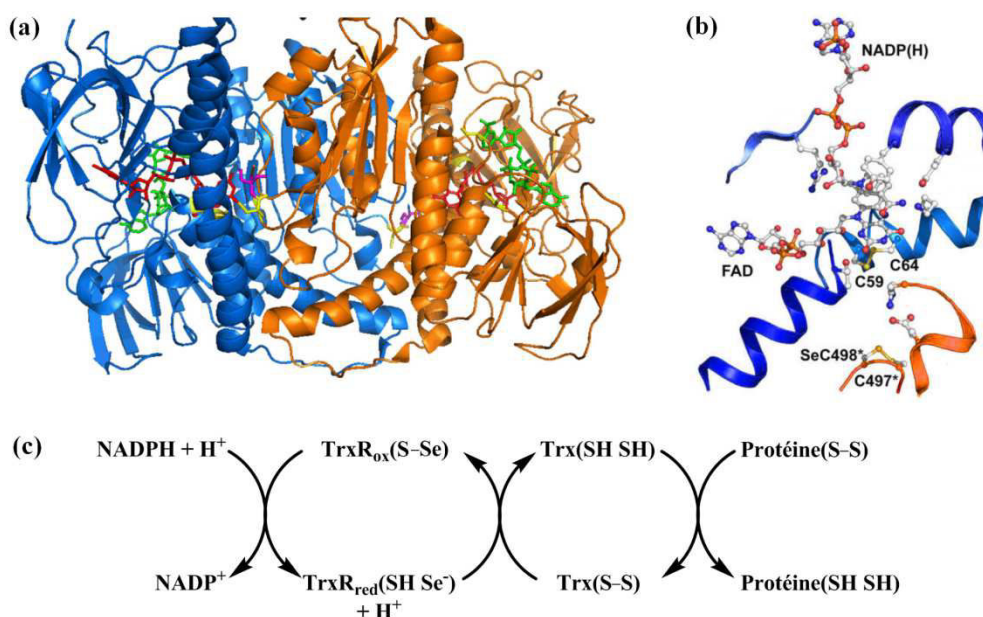


Figure 16 : (a) Représentation « cartoon » de la structure cristallographique de l'homodimère de la thiorédoxine réductase 1 humaine (Sec→Cys) (PDB 2J3N) Chaque dimère est représenté par une couleur différentes, les cystéines du site actif sont en jaune et les cofacteurs NADP(H) et FAD sont en représentation « ball and stick ». ⁴¹ (b) Site actif de l'homodimère de la thiorédoxine réductase 1 montrant le maintien des cofacteurs NADP(H) et FAD par différents acides aminés, leur interaction par π - π stacking et les cystéines actives C59-C64 sous leur forme disulfure provenant du premier monomère (en bleu) ainsi que les cystéines (C497*) et sélénocystéines (Sec498*) actives provenant du deuxième monomère (en orange). ⁵⁵ (c) Schéma réactionnel simplifié montrant la réduction d'une protéine par le système TrxR / Trx à l'aide du cofacteur NADP(H).

formes, la première TrxR1 est cytosolique et la deuxième TrxR2 est mitochondriale.^{14,41} Son rôle principal est d'effectuer la réduction « NADPH dépendante » de la thiorédoxine (Trx), une petite protéine permettant la réduction de nombreuses protéines (Figure 16(c)).^{14,40,41} Le système thiorédoxine réductase / thiorédoxine joue notamment un rôle dans la régulation du taux de peroxyde d'hydrogène en réduisant la peroxyrodoxine.⁴¹ Elle a également un rôle très important dans la régulation de l'activité de certains facteurs de transcription qui possèdent des cystéines sensibles à l'état rédox de la cellule tels que NF- κ B, AP-1 ou p53.⁴¹

Le système thiorédoxine réductase / thiorédoxine semble également être impliqué dans différentes pathologies telles que les cancers, les maladies infectieuses et la polyarthrite rhumatoïde.^{37,40} En effet, la thiorédoxine et la thiorédoxine réductase sont surexprimées dans les cellules malades. Ceci conduit, dans les cas de cancers, à la suspension de l'apoptose et l'augmentation de la croissance de la tumeur. De plus, dans les cas de très fortes concentrations en thiorédoxine réductase, les cellules tumorales deviennent résistantes aux chimiothérapies.^{40,55} Ainsi, la thiorédoxine réductase est une cible intéressante pour les traitements anti-cancéreux et anti-arthritiques. Il est intéressant de noter également que la thiorédoxine réductase existe également chez *Plasmodium falciparum*, ce qui en fait une cible de choix pour les anti-malariaux également.^{14,41,56,57}

Comme nous l'avons mentionné précédemment, de nombreux complexes d'or ont été identifiés comme des inhibiteurs de la thiorédoxine réductase aussi bien sous sa forme cytosolique (TrxR1) que mitochondriale (TrxR2). C'est le cas notamment des complexes d'or(I) utilisés dans le traitement de polyarthrite rhumatoïde pour lesquels l'auranofine présente la plus forte inhibition des deux formes de thiorédoxine réductase (Tableau 2). Mais d'autres complexes d'or(I) et d'or(III) qui ont été décrits précédemment sont capables de l'inhiber avec des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire voire même du nanomolaire (voir le Tableau 2 pour quelques exemples). Même les complexes or(III)-dithiocarbamates qui semblent plutôt cibler le protéasome sont capables également d'inhiber fortement la thiorédoxine réductase.⁴¹ Ceci souligne l'idée de cibles multiples des complexes d'or.

Tableau 2 : Inhibition des thiorédoxines réductases cytosoliques (TrxR1) et mitochondriales (TrxR2) chez le rat par quelques complexes d'or(I/III).⁴¹

Complexes	IC ₅₀ (μM)	
	TrxR1	TrxR2
Complexes d'Au(I)		
Auranofine	0,0007	0,0020
Et ₃ PAuCl	0,0012	0,0058
Aurothiomalate	0,0050	0,0280
Complexes d'Au(III)		
[AuCl(dien)]Cl ₂	0,0028	0,4200
[Au(bipy ^{dmb} -H)(OH)]PF ₆	0,0043	0,2800
[Au(DMDT)Cl ₂]	0,0057	0,0247
[Au(ESDT)Br ₂]	0,0139	0,0359

D'après les données obtenues, les complexes d'or pénètrent dans la cellule au sein du cytosol mais également de la mitochondrie où ils inhibent les TrxR1 et TrxR2 conduisant à l'augmentation des ROS et à la dysfonction dans la régulation de certains facteurs de transcription comme illustré en Figure 17 menant peu à peu la cellule vers un état d'apoptose.¹⁴

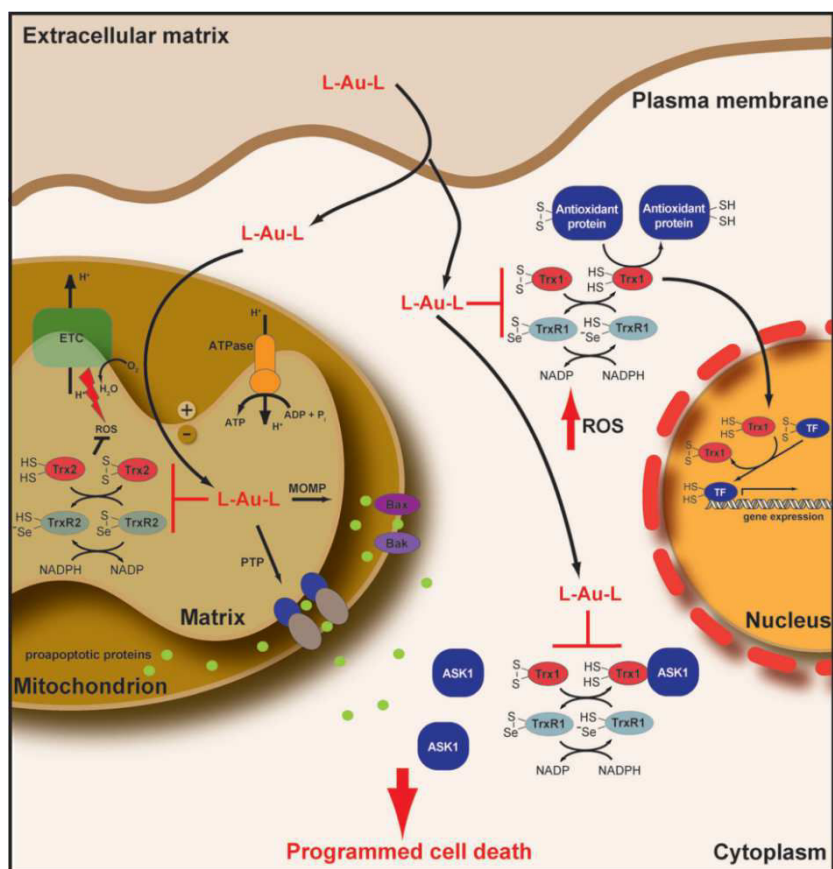


Figure 17 : Schéma montrant l'inhibition de la thioredoxine réductase dans les différents compartiments cellulaires par un complexe d'or(I) noté L-Au-L.¹⁴

L'inhibition par les différents complexes d'or(I) est attribuée à une complexation covalente de l'or(I) avec la sélénocystéine de la thioredoxine réductase. Cependant, cette hypothèse est basée sur des preuves indirectes. Ainsi, l'auranofine est capable d'inhiber la glutathion réductase, une enzyme proche de la thioredoxine réductase, à des concentrations 1000 fois supérieures à celles nécessaires pour inhiber la thioredoxine réductase. Ceci attestant d'une plus forte affinité du complexe d'or(I) pour la thioredoxine réductase du fait de la présence de sa sélénocystéine.^{14,40} Cependant des études plus récentes par spectrométrie de masse ont mis en évidence que quatre résidus $\text{Au}^{\text{I}}\text{PET}_3^+$ étaient liés à la thioredoxine réductase cytosolique. Ainsi, il semblerait que l'auranofine ne se lie pas uniquement à la sélénocystéine mais également aux autres cystéines présentes sur l'enzyme.¹⁴ Dans le cas d'un complexe de type or-phosphole, il semblerait une fois encore que ce soit la sélénocystéine qui soit principalement ciblée étant donné que la valeur d' IC_{50} est fortement diminuée sur une thioredoxine réductase où la sélénocystéine est mutée en cystéine.⁴¹ D'une manière générale,

les complexes d'or(III) ont une activité inhibitrice moins importante que les complexes d'or(I) vis-à-vis de la thiorédoxine réductase. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'or(III) est un métal moins mou que l'or(I) mais c'est plus vraisemblablement lié au fait que l'or(III) agit via un processus d'oxydoréduction et non de coordination.⁴¹ Cependant, la question n'est pas tranchée car beaucoup de composés d'or(III) sont réduits *in vivo* et qu'ainsi ce serait l'espèce or(I) qui serait la forme active.¹⁴

Ainsi la thiorédoxine réductase semble être la cible principale des complexes d'or que ce soit à l'état d'oxydation +I ou +III. Cependant, l'inhibition de cette enzyme n'explique pas à elle seule tous les effets observés *in vivo* concernant les propriétés anti-arthritiques et anti-cancéreuses. Ainsi, d'autres protéines à cystéines libres ont été proposées ou identifiées comme les cathépsines ou des facteurs de transcription.

1.5.1.2. Les cathépsines

Les cathépsines sont une famille de protéases lysosomales.⁵⁸ La plupart des cathépsines sont des protéases à cystéines qui se caractérisent par la présence d'une cystéine active (Cys25) au niveau de leur site actif dont le groupement thiol possède un pK_a extrêmement bas (pK_a ~2,5-3,5).⁵⁹ Ces cathépsines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le remodelage osseux ou encore l'apoptose par des voies TNF- α dépendantes. Ainsi, ces protéases sont impliquées dans de nombreuses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, des maladies inflammatoires (ostéoporose, polyarthrite rhumatoïde...) et elles jouent également un rôle dans le développement des cancers.⁵⁸⁻⁶⁰ Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, il y a surexpression des cathépsines B, L et K dans les fibroblastes et monocytes présents dans la synovie. Cette surexpression est stimulée par différentes cytokines. Ces trois cathépsines sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la destruction des cartilages et des os des articulations.⁵⁹ Les cathépsines ont été proposées comme cibles des complexes d'or dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde pour deux raisons. Premièrement, leur Cys25 est relativement accessible et donc potentiellement réactive avec les sels d'or. Deuxièmement, l'or s'accumule dans des régions riches en cathépsines. Une structure cristallographique a d'ailleurs mis en évidence l'interaction entre l'aurothiomalate et la cathépsine K.⁶¹ Les cathépsines à cystéines ayant toutes des structures très similaires surtout au niveau de leur site actif, il semble très vraisemblable de penser que

l'aurothiomalate pourrait se complexer de la même manière aux autres cathépsines. Ainsi, une étude par modélisation moléculaire a montré que des analogues d'auranofine étaient capables de se complexer à la cystéine active de la cathépsine B.⁶² De plus, différentes études *in vitro* ont révélé que les sels d'or(I) étaient capables d'inhiber ces différentes cathépsines de façon modérée mais à des concentrations qui sont biologiquement compatibles.⁶²⁻⁶⁴

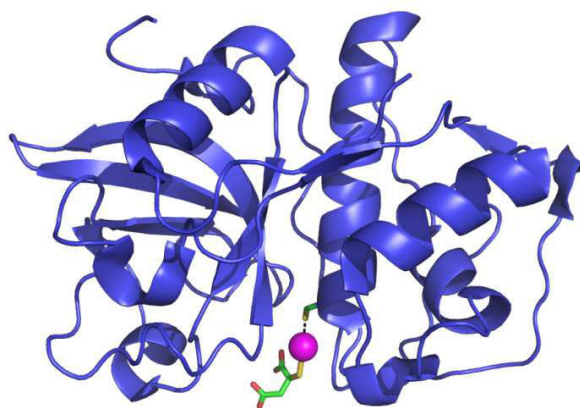


Figure 18 : Structure cristallographique montrant la complexation de l'AuTm sur la cystéine de la cathépsine K (pdb 2ATO).⁶¹

1.5.1.3. Les facteurs de transcription

Dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde, des études ont mis en évidence que l'inhibition des cytokines responsables de l'inflammation, TNF- α en tête, pouvait être le résultat d'une inhibition au niveau transcriptionnel. Ces études montrent que l'aurothiomalate était capable d'inhiber la complexation à l'ADN de certains facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1, AP-2 et TF-IID.^{65,66} Ils sont responsables du contrôle de la transcription des médiateurs de l'inflammation et, en particulier, de TNF- α pour NF- κ B.⁴⁰ Ils possèdent notamment des cystéines dont le rôle est très important pour leur fonctionnement ce qui pourrait expliquer l'interaction avec les sels d'or. Cependant, les études réalisées n'ont pas permis de montrer une complexation directe de l'or(I) sur ces cystéines contrairement aux cathépsines.

1.5.2. Protéines à doigts de zinc

Concernant la polyarthrite rhumatoïde, le contrôle du niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires met en jeu des boucles de régulation extrêmement complexes qui font intervenir d'autres facteurs de transcription que les quatre cités ci-dessus. Certains de ces facteurs de transcription sont des protéines à doigts de zinc.^{67,68} Il a alors été envisagé que ces protéines à doigts de zinc peuvent être des cibles des sels d'or. Ainsi, Handel *et al.*⁶⁹ ont pu montrer que l'aurothiomalate était capable d'inhiber l'interaction du récepteur de la progestérone, une protéine à doigt de zinc, avec son segment spécifique d'ADN. Concernant les composés d'or à propriétés anti-cancéreuses, Casini *et al.*⁷⁰ ont récemment proposé que la poly(adénosine diphosphate ribose) polymérase 1 (PARP-1), une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN et l'apoptose était une cible des sels d'or qui attaquent son doigt de zinc. Néanmoins, peu de travaux portent sur l'interaction de l'or avec les doigts de zinc, alors que cette hypothèse semble être une piste intéressante.

1.5.2.1. Qu'est-ce qu'un doigt de zinc ? Quelle est son importance biologique ?

Le zinc est un élément essentiel pour les organismes vivants. On le retrouve dans de très nombreuses protéines, environ 3000 chez l'homme, qui ont des rôles très variés et où il peut avoir un rôle structural ou catalytique. Chez les eucaryotes, la fonction principale des protéines à zinc est la régulation des gènes.⁷¹ Cette fonction est généralement assurée grâce à l'interaction d'un ou plusieurs domaines peptidiques appelés doigts de zinc.

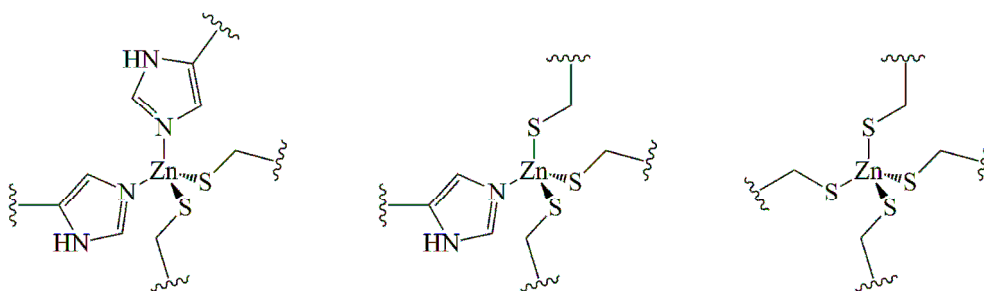


Figure 19 : Représentation des sites de coordination au zinc dans les protéines à doigts de zinc de formule générale $Zn^{II}(Cys)_{4-x}(His)_x$, avec $x = 0$ (à droite), 1 (au milieu) ou 2 (à gauche).

Les doigts de zinc appartiennent à une grande famille de petits domaines peptidiques d'environ 20 à 30 acides aminés où un ion zinc est tetracoordonné aux chaînes latérales de cystéines et d'histidines suivant une géométrie tétraédrique. (Figure 19) Ces sites ont ainsi la formule générale $Zn^{II}(Cys)_{4-x}(His)_x$, avec $x = 0, 1$ ou 2 . Dans ces protéines, le zinc permet d'assurer le bon repliement de la protéine et son bon fonctionnement.⁷² Les doigts de zinc adoptent différents types de repliements. Ceci a permis leur classification en plusieurs familles différentes (Figure 20).^{71,73} Parmi ces familles, les trois principales sont les doigts de zinc classiques de type $\beta\beta\alpha$, les doigts de zinc de type « treble-clef » et les doigts de zinc de type « zinc ribbon ».

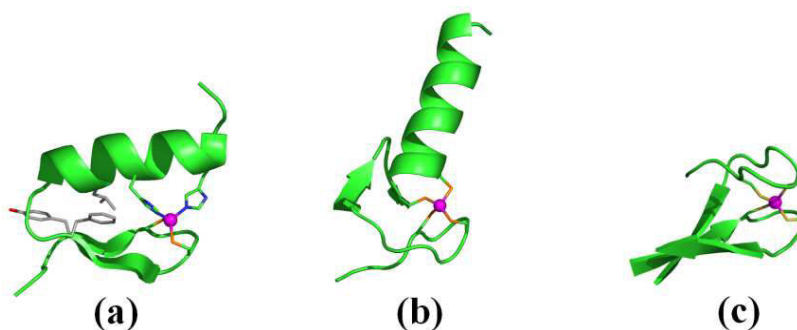


Figure 20 : Structures de trois des familles de doigts de zinc présentant des repliements de type (a) $\beta\beta\alpha$, (b) « treble clef » et (c) « zinc ribbon ».

Initialement, on pensait que les protéines à doigts de zinc étaient impliquées dans des interactions avec l'ADN, des ARN ou des protéines permettant d'assurer la régulation des gènes, l'initiation et la fin de la transcription et de la traduction, la régulation de l'apoptose, la suppression de tumeur... Mais on sait aujourd'hui qu'ils peuvent aussi jouer le rôle de site actif dans la protéine de réparation de l'ADN, Ada, qui permet la déméthylation de l'ADN, ou encore le rôle d'interrupteur redox dans la protéine Hsp33 qui réagit au stress oxydant.

1.5.2.2. Interaction doigts de zinc-or : état de l'art

Handel *et al.* ont été les premiers à mentionner l'inhibition de facteurs de transcription à doigts de zinc par l'aurothiomalate.⁶⁹ Depuis, quelques groupes se sont intéressés à mieux caractériser cette interaction.^{70,74-76}

• *Interaction des complexes d'or(I) avec les peptides de type doigts de zinc*

Avant les premières études sur l'interaction avec les doigts de zinc, Shaw *et al.* ainsi que Stillman *et al.* avaient montré que l'aurothiomalate était capable d'interagir avec les métallothionéines conduisant à la décomplexation du zinc et du cadmium de ces protéines.⁷⁷⁻⁸⁰ Deux études ont porté sur l'interaction des complexes d'or(I) avec des modèles de doigts de zinc de type $\beta\beta\alpha$. Ainsi, Hanas *et al.* ont déterminé que l'aurothiomalate était capable d'inhiber les facteurs de transcription TFIIIA et Sp1 à des concentrations de quelques micromolaires compatibles avec les concentrations utilisées lors du traitement de la polyarthrite rhumatoïde (30 à 40 μM en aurothiomalate au cours du traitement). A l'aide d'un modèle peptidique de Sp1, appelé Sp1-3, ils ont pu déterminer que l'aurothiomalate était capable de former des complexes or(I)/peptide 1:1 où l'or(I) est coordonné aux deux cystéines et de décomplexer le zinc avec un rapport des constantes de complexation pour l'or et pour le zinc $K_d(\text{Au}^{\text{I}})/K_d(\text{Zn}^{\text{II}})$ évalué à 4,2 par spectrométrie de masse (Figure 21). Cependant, ce résultat peut être sujet à caution du fait que cette valeur n'a été déterminée que par spectrométrie de masse.

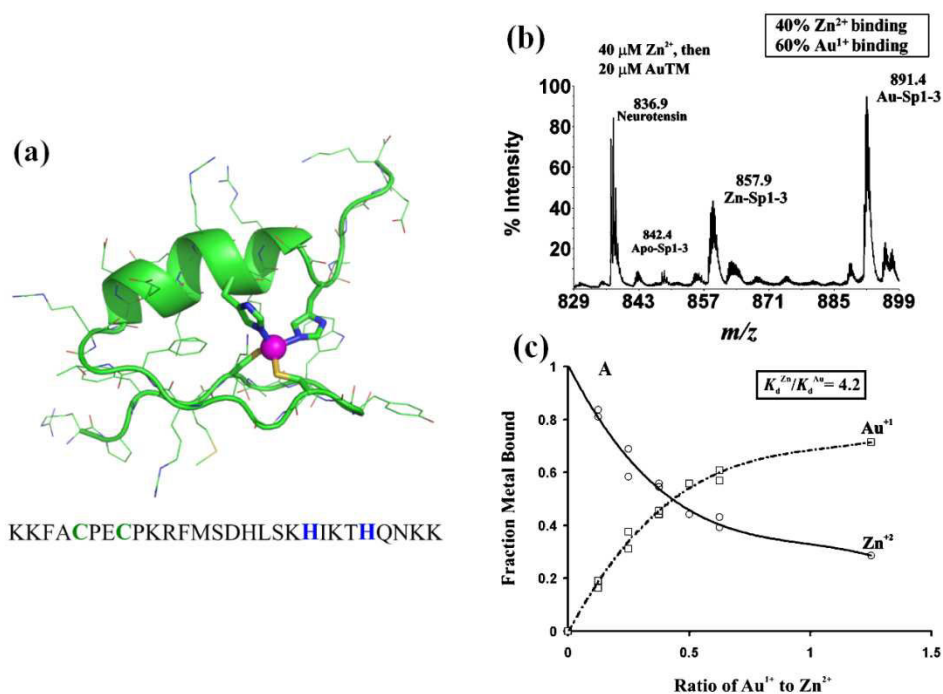


Figure 21 : (a) Séquence du peptide modèle de Sp1, Sp1-3, et structure RMN de Zn^{II}-Sp1-3 (pdb 1Sp2).⁸¹ (b) Spectre de masse obtenu après réaction entre Zn^{II}-Sp1-3 et Au^ITm. La réaction a été faite en deux étapes, (i) réaction entre Sp1-3 (20 μM) et Zn^{II}(OAc)₂ (40

μM) en présence de DTT (180 μM) et neurotensine (3 μM) en tampon acétate d'ammonium pH 6,8 (5% méthanol) et (ii) ajout de 20 μM $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$. (c) Titrage de Zn^{II} -Sp1-3 par l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$. Les ratios de Zn^{2+} et Au^{1+} sont obtenus d'après les aires des pics obtenus par analyse par ESI-MS dans les mêmes conditions que précédemment. D'après Hanas *et al.*⁷⁵

Une seconde étude a porté sur l'interaction du chlorure de triéthylphosphine d'or(I) ($\text{Et}_3\text{PAu}^{\text{I}}\text{Cl}$), un analogue de l'auranofine, avec les différents dérivés de CP1 développés par Berg *et al.*^{82,83} Ces travaux, réalisés par Barrios *et al.* ont montré que les trois peptides libres CP1(CCHH), CP1(CCHC) et CP1(CCCC) (Figure 22(a)) forment des complexes 1:1, 2:3 et 1:2 respectivement avec l'or(I) (Figure 22(b)).⁷⁴ Ces résultats sont en accord avec la formation de complexes où l'or(I) est coordonné uniquement par deux cystéines suivant une géométrie linéaire et non par les histidines. Lorsque les peptides CP1 sont mis en présence d'un excès d' $\text{Et}_3\text{PAu}^{\text{I}}\text{Cl}$, les complexes obtenus n'ont pas le même repliement que les complexes Zn^{II} -CP1, signe d'une possible perte d'activité des doigts de zinc. Toutefois, Barrios *et al.* n'ont pas étudié l'interaction de l'or avec le peptide lié au zinc, ils n'ont donc pas pu voir si l'or(I) pouvait se substituer au zinc.

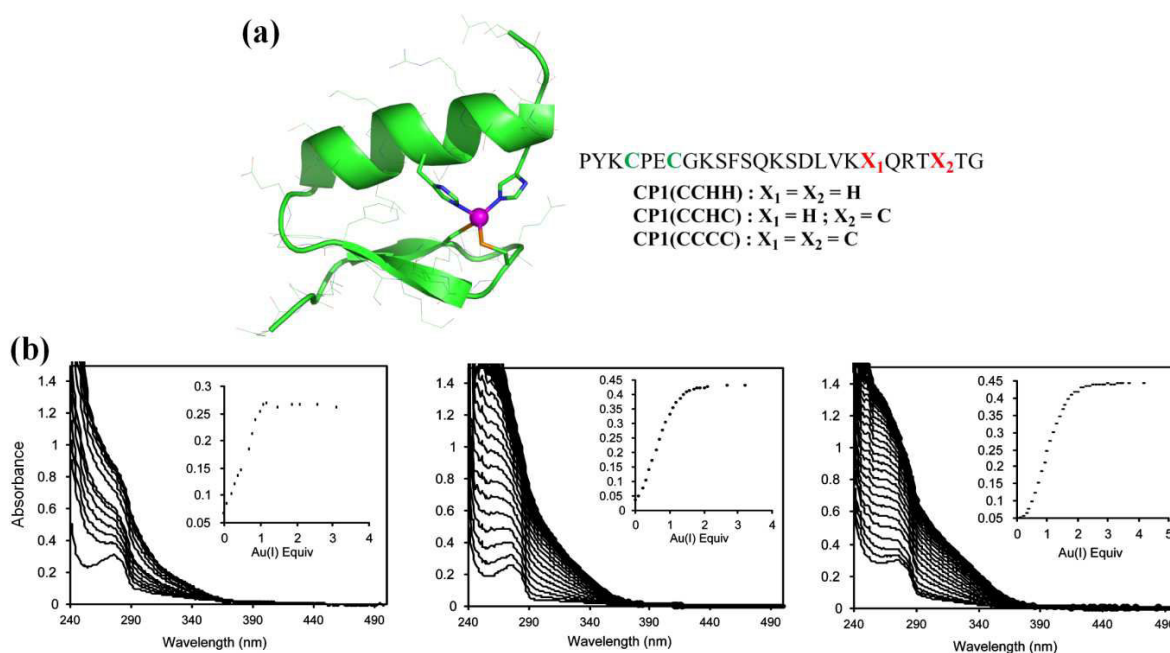


Figure 22 : (a) Structure ^1H RMN de Zn^{II} -CP1(CCHH) et séquence peptidique des différents peptides CP1 développés par Berg *et al.*^{82,83} (b) Spectres UV-Vis des titrages des peptides CP1(CCHH) (134 μM , à gauche), CP1(CCHC) (150 μM , au milieu) et CP1(CCCC) (142 μM , à droite) par Et_3PAuCl . L'encart montre l'augmentation de l'absorbance à 310 nm au cours des titrages.⁷⁴

- ***Interaction des complexes d'or(III) avec les peptides de type doigts de zinc***

Deux études ont également été menées pour comprendre les interactions des complexes d'or(III) à ligands azotés avec les doigts de zinc.

Les travaux de Farrell *et al.* ont porté sur l'interaction d'un peptide doigt de zinc mime de la protéine de nucléocapside du VIH-1 (NCp7) avec les complexes Audien et AuTerpy décrits précédemment (Figure 13).⁷⁶ La protéine de nucléocapside du VIH est une protéine de 72 acides aminés (55 aa une fois maturée) qui contient deux sites à zinc de type CCHC dans des séquences de type CX₂CX₄HX₄C (Figure 23). NCp7 joue un rôle important pour le virus à différents stades. Elle intervient en tant que chaperonne pour permettre la maturation du dimère d'ARN du virus et elle joue également un rôle important dans la réplication du VIH et plus particulièrement au niveau de la transcription inverse grâce à la présence de ses deux sites de type doigts de zinc.^{84,85} Du fait de cette implication dans la réplication du virus, NCp7 est devenue une cible privilégiée pour le développement d'antiviraux. Ainsi, Farrell *et al.* ont montré que les complexes Audien et AuTerpy réagissent rapidement avec un peptide mimant l'un des sites à zinc de NCp7, conduisant à la décomplexation du zinc et à la formation de complexes Au/peptide avec des ratios 2:1 et 4:1 observés par spectrométrie de masse. Ils ont également observé dans les deux cas des pics de plus faible intensité correspondant à l'oxydation du peptide. Ainsi, ils en ont supposé que les complexes d'or(III) devaient se comporter comme des oxydants et que les complexes Au/peptides 2:1 et 4:1 formés pourraient correspondre à de l'or(I) coordonné au peptide.

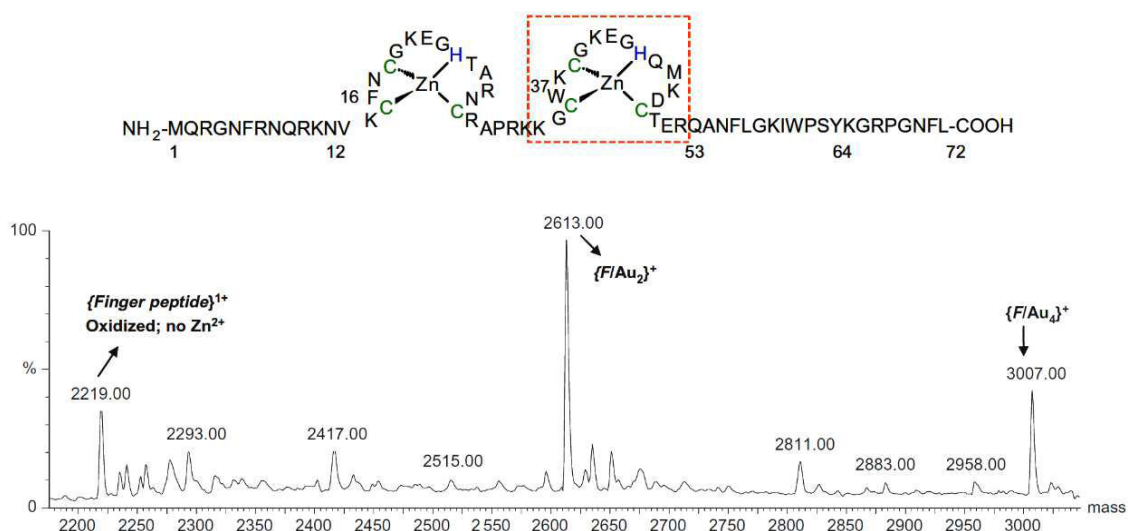


Figure 23 : En haut, séquence de la protéine de nucléocapside du VIH (NCp7), la séquence du peptide utilisé par Farrell *et al.*⁷⁶ est encadrée en rouge. En bas, spectre déconvolué montrant les pics des adduits or/peptides 2:1 et 4:1 et le peptide oxydé.

Cependant, cette étude ne repose pas sur des spectres de masse haute résolution et l'attribution des espèces et leur caractérisation restent hypothétiques.

Enfin, les travaux de Casini *et al.* portent sur l'interaction de complexes d'or(I), l'auranofine, et d'or(III), Aubipy et Auphen, avec la poly(adénosine diphosphate ribose) polymérase 1 (PARP-1).⁷⁰

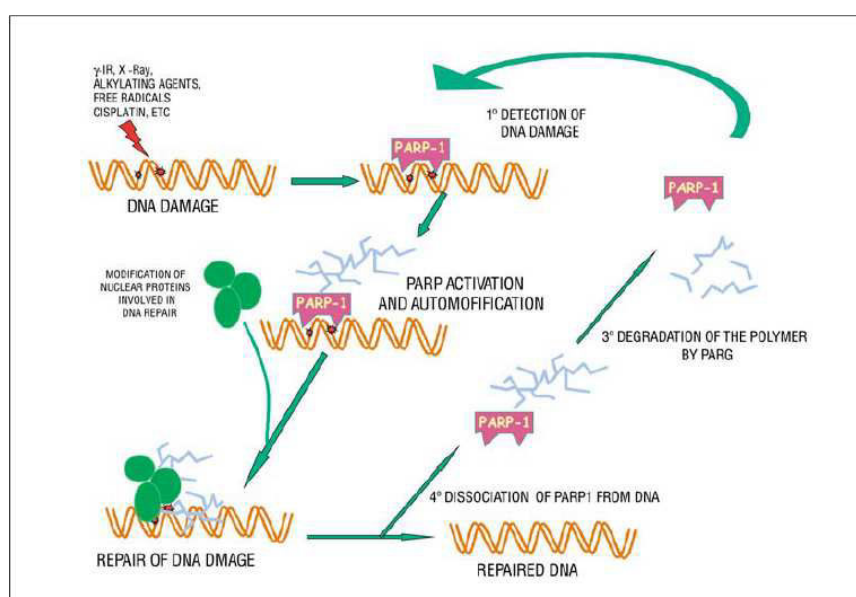


Schéma 1 : Mécanisme de réparation de l'ADN par PARP-1.

PARP-1 est une protéine très importante dans la machinerie cellulaire et est notamment très fortement impliquée dans certains mécanismes de résistance aux chimiothérapies. Il s'agit d'une des protéines les plus abondantes du noyau⁸⁶ et elle est le membre le plus abondant et le plus actif d'une superfamille de poly(ADP) polymérase qui compte 17 membres.⁸⁷ Cette protéine de 116 kDa permet la localisation de lésions mono-brin ou double-brin sur l'ADN puis l'activation de sa réparation grâce à la présence de trois domaines hautement conservés à savoir (i) un domaine contenant deux doigts de zinc de séquence CX₂CX_{28,30}HX₂C en partie N-terminale qui permet la liaison à l'ADN, (ii) un domaine d'automodification et (iii) un domaine catalytique en partie C-terminale qui permet la poly(ADP-ribosyl)ation NAD⁺ dépendante de PARP-1 lui-même. Cette poly(ADP-ribosyl)ation va permettre le recrutement de protéines réparatrices de l'ADN (Schéma 1).⁸⁶⁻⁸⁸ PARP-1 peut également interagir avec d'autres protéines. Notamment, lors de la réparation de l'ADN, PARP-1 va également poly(ADP-ribosyl)er les histones pour faciliter l'accès à la zone endommagée de l'ADN. PARP-1 permet également de réguler la machinerie transcriptionnelle en interagissant avec des facteurs de transcription tels que NF-κB et AP-1.⁸⁶⁻⁸⁸ Enfin, PARP-1 peut induire la mort cellulaire par différentes voies apoptotiques ou même par nécroses des cellules en cas de surexpression.^{86,88}

Il a également été montré que PARP-1 joue un rôle important dans les maladies inflammatoires et le cancer. En effet, de par son activité de régulateur des facteurs de transcription, PARP-1 est capable d'activer les facteurs de transcription NF-κB et AP-1 induisant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires.^{86,88} De plus, l'activité de PARP-1 est augmentée dans les cellules tumorales, ce qui leur permet d'éviter les mécanismes d'apoptose. Ainsi, PARP-1 permet la réparation de l'ADN dans ces cellules même lorsque celui-ci est endommagé par radiation ou par chimiothérapie.⁸⁶⁻⁸⁸ Il a d'ailleurs été montré que PARP-1 est capable de se lier à l'ADN modifié par le cis-platine.⁷⁰ Ainsi, plusieurs inhibiteurs de PARP-1 ont été développés et sont en cours d'essai en phase clinique pour être co-administrés avec des anti-cancéreux tels que le cis-platine et ainsi d'éviter ce mécanisme de résistance aux chimiothérapies des cellules tumorales.^{86,87}

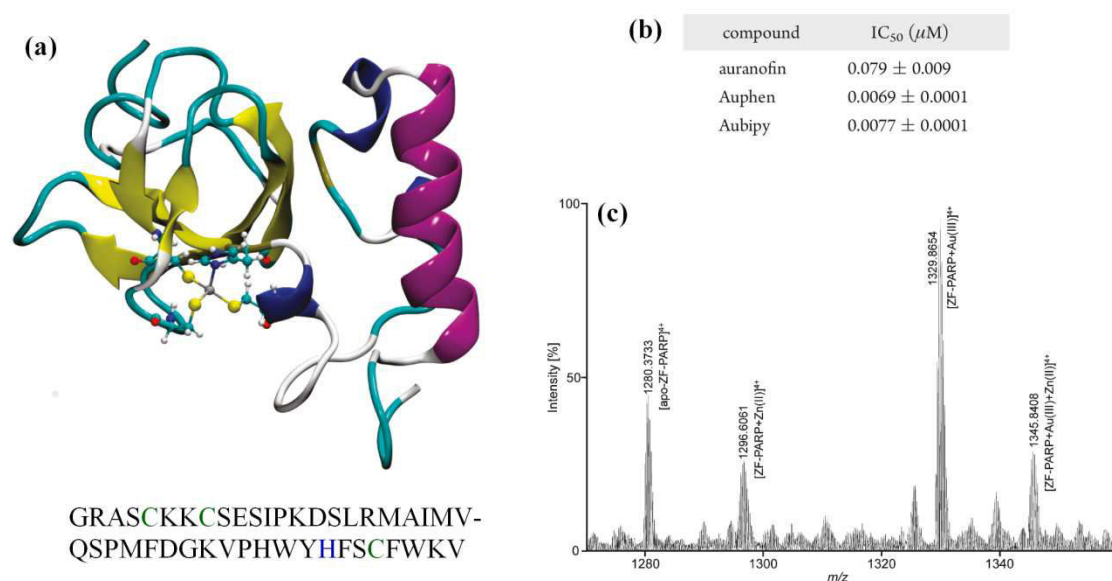


Figure 24 : (a) Structure en solution d'un des doigts de zinc de la protéine PARP-1 (pdb 2DMJ) et séquence peptidique du peptide ZF-PARP. (b) Valeurs d'IC₅₀ obtenues pour l'inhibition de PARP-1 après incubation de 24h avec les complexes d'or. (c) Spectre ESI FT-ICR MS de l'*apo*-ZF-PARP en présence de Zn^{II}(OAc)₂ et Aubipy à des ratios 1:2:2 incubés 10 min dans des conditions de compétition.⁷⁰

D'après les études menées par Casini *et al.*, les complexes d'or seraient capables d'inhiber très fortement PARP-1 avec des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire pour tous les complexes d'or étudiés (Figure 24). La réaction de l'auranofine avec l'*apo*-peptide (*apo*-ZF-PARP) conduit à la formation de complexes or(I)-peptide avec des ratios 1:1 uniquement. La réaction des complexes d'or(III) avec *apo*-ZF-PARP conduit quant à elle à la formation de différents adduits or/*apo*-ZF-PARP-1 avec des ratios 1:1, 2:1 et 3:1 d'après les analyses effectuées par spectrométrie de masse et où le premier or serait à l'état d'oxydation +III tandis que les deux autres seraient à l'état d'oxydation +I. Pour le premier adduit or/*apo*-ZF-PARP, les analyses spectrométriques indiquent que l'or(III) est lié au peptide et que deux cystéines sont oxydées sous la forme d'un pont disulfure. Dans le cas où l'*apo*-ZF-PARP est mis en présence de Zn^{II}(OAc)₂ et d'un complexe d'or(III) à des ratios 1:2:2 incubés 10 min, ils observent la formation d'adduits or/PARP-1 1:1 mais également d'adduits de type or/Zn^{II}/PARP-1 1:1:1 (Figure 24).

L'ensemble de ses études montrent que l'or est capable de se lier aux protéines à doigts de zinc et de chasser le zinc au moins en partie. Toutefois ces études reposent pour l'essentiel sur des analyses par spectrométrie de masse et les caractérisations sont lacunaires.

1.6. OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de ce travail a été d'identifier si les doigts de zinc étaient des cibles des complexes d'or aux degrés d'oxydation +I et +III. Ainsi, nous nous sommes posé la question de savoir si l'or était capable d'interagir avec les sites à doigts de zinc conduisant à la décomplexation du zinc. Le cas échéant, nous nous sommes intéressés à déterminer les mécanismes de cette décomplexation à savoir soit par substitution du zinc par l'or (+I ou +III) soit par oxydation des cystéines par l'or(III). Cependant, même si ces complexes d'or sont capables de décomplexer le zinc ceci peut être défavorable d'un point de vue cinétique avec des temps d'échange ou d'oxydation extrêmement lents. Nous nous sommes donc intéressés à déterminer les cinétiques de ces réactions. Enfin, le zinc(II) et l'or(I/III) possèdent des géométries de coordination différentes. Ainsi, la réaction de substitution du zinc par l'or devrait probablement conduire à des changements structuraux sur les doigts de zinc. Nous avons donc cherché à évaluer ces modifications structurales de façon à identifier si elles conduiraient à une perte totale ou partielle de structure du site à zinc ce qui se traduirait par une perte totale ou partielle d'activité du doigt de zinc. Pour cela nous utiliserons des peptides modèles de doigts de zinc développés au laboratoire, que nous décrirons dans le chapitre suivant, ou les peptides CP1 bien connus pour l'étude des propriétés des doigts de zinc.^{82,83}

1.7. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Guo, Z. J.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1513–1531.
- (2) Bünzli, J.-C. G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729–2755.
- (3) Thibon, A.; Pierre, V. C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 107–120.
- (4) Sekhon, B. S.; Kamboj, S. R. *Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6*, 516–522.
- (5) Sekhon, B. S.; Kamboj, S. R. *Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6*, 612–618.
- (6) Merchant, B. *Biologicals* **1998**, *26*, 49–59.
- (7) Higby, G. J. *Gold Bull.* **1982**, *15*.
- (8) Whitehouse, M. W. *Inflammopharmacol.* **2008**, *16*, 107–109.
- (9) Fricker, S. P. *Gold Bull.* **1996**, *29*, 53–60.
- (10) Shaw III, C. F. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2589–2600.
- (11) Eisler, R. *Inflamm. Res.* **2003**, *52*, 487–501.
- (12) Alesutan, I.; Bobbala, D.; Qadri, S. M.; Estremera, A.; Foeller, M.; Lang, F. *Malar. J.* **2010**, *9*.
- (13) Molter, A.; Rust, J.; Lehmann, C. W.; Deepa, G.; Chiba, P.; Mohr, F. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9810–9820.
- (14) Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. *Metallomics* **2011**, *3*, 863–873.
- (15) Boisselier, E.; Astruc, D. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759–1782.
- (16) Sadler, P. In *Biochemistry; Structure and Bonding*; Springer Berlin Heidelberg, 1976; Vol. 29, pp. 171–214.
- (17) Thakor, A. S.; Jokerst, J.; Zavaleta, C.; Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 4029–4036.
- (18) Pyykkö, P. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 563–594.
- (19) Gimeno, M. C. In *Modern Supramolecular Gold Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009; pp. 1–63.
- (20) Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261–5270.
- (21) Hakkinen, H. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 443–455.
- (22) Matthiesen, J. E.; Jose, D.; Sorensen, C. M.; Klabunde, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9376–9379.
- (23) Qian, H.; Zhu, M.; Wu, Z.; Jin, R. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1470–1479.
- (24) Qian, H.; Eckenhoff, W. T.; Bier, M. E.; Pintauer, T.; Jin, R. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 10735–10739.
- (25) Bau, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9380–9381.
- (26) Messori, L.; Abbate, F.; Marcon, G.; Orioli, P.; Fontani, M.; Mini, E.; Mazzei, T.; Carotti, S.; O’Connell, T.; Zanello, P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3541–3548.
- (27) Millis, K. K.; Weaver, K. H.; Rabenstein, D. L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4144–4146.
- (28) Canumalla, A. J.; Al-Zamil, N.; Phillips, M.; Isab, A. A.; Shaw III, C. F. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *85*, 67–76.
- (29) Yangyuoru, P. M.; Webb, J. W.; Shaw III, C. F. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 576–583.
- (30) Yangyuoru, P. M.; Webb, J. W.; Shaw III, C. F. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 584–593.
- (31) Glišić, B. Đ.; Rychlewska, U.; Djuran, M. I. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6887–6901.

- (32) Al-Maythaly, B. A.; Isab, A. A.; Wazeer, M. I. M.; Ibdah, A. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, *363*, 3200–3207.
- (33) Feldmann, M. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 364–371.
- (34) Pope, R. M. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 527–535.
- (35) Smolen, J. S.; Steiner, G. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 473–488.
- (36) Milacic, V.; Dou, Q. P. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1649–1660.
- (37) Ott, I. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1670–1681.
- (38) Djordjevic, C.; Wampler, G. L. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *25*, 51–55.
- (39) Kunimoto, T.; Nitta, K.; Tanaka, T.; Uehara, N.; Baba, H.; Takeuchi, M.; Yokokura, T.; Sawada, S.; Miyasaka, T.; Mutai, M. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5944–5947.
- (40) Barnard, P. J.; Berners-Price, S. J. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1889–1902.
- (41) Bindoli, A.; Rigobello, M. P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692–1707.
- (42) Pratesi, A.; Gabbiani, C.; Ginanneschi, M.; Messori, L. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7001–7003.
- (43) Schuh, E.; Pflueger, C.; Citta, A.; Folda, A.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Casini, A.; Mohr, F. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5518–5528.
- (44) Rigobello, M. P.; Folda, A.; Dani, B.; Menabo, R.; Scutari, G.; Bindoli, A. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *582*, 26–34.
- (45) Tiekink, E. R. T. *Inflammopharmacol.* **2008**, *16*.
- (46) Messori, L.; Orioli, P.; Tempì, C.; Marcon, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 352–360.
- (47) Casini, A.; Cinellu, M. A.; Minghetti, G.; Gabbiani, C.; Coronello, M.; Mini, E.; Messori, L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5524–5531.
- (48) Wang, Y.; He, Q.-Y.; Sun, R. W.-Y.; Che, C.-M.; Chiu, J.-F. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *554*, 113–122.
- (49) Che, C.-M.; Sun, R. W.-Y. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9554–9560.
- (50) Ahmad, S.; Isab, A. A. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 44–52.
- (51) Carlock, M. T.; Shaw III, C. F.; Eidsness, M. K.; Watkins, J. W.; Elder, R. C. *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 333–339.
- (52) Kaps, L.; Biersack, B.; Mueller-Bunz, H.; Mahal, K.; Muenzner, J.; Tacke, M.; Mueller, T.; Schobert, R. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106*, 52–58.
- (53) Nose, Y.; Rees, E. M.; Thiele, D. J. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 604–607.
- (54) Ghadially, F. N. *J. Rheumatol. Suppl.* **1979**, *5*, 45–50.
- (55) Lo, Y.-C.; Ko, T.-P.; Su, W.-C.; Su, T.-L.; Wang, A. H.-J. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1082–1092.
- (56) Sannella, A. R.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Messori, L.; Bilia, A. R.; Vincieri, F. F.; Majori, G.; Severini, C. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 844–847.
- (57) Saccoccia, F.; Angelucci, F.; Boumis, G.; Brunori, M.; Miele, A. E.; Williams, D. L.; Bellelli, A. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *108*, 105–111.
- (58) Chwieralski, C. E.; Welte, T.; Buhling, F. *Apoptosis* **2006**, *11*, 143–149.
- (59) Vasiljeva, O.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Turk, D.; Turk, V.; Turk, B. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 387–403.
- (60) Hook, V.; Funkelstein, L.; Wegrzyn, J.; Bark, S.; Kindy, M.; Hook, G. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2012**, *1824*, 89–104.
- (61) Weidauer, E.; Yasuda, Y.; Biswal, B. K.; Cherny, M.; James, M. N. G.; Bromme, D. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 331–336.

-
- (62) Gunatilleke, S. S.; de Oliveira, C. A. F.; McCammon, J. A.; Barrios, A. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 555–561.
- (63) Chircorian, A.; Barrios, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5113–5116.
- (64) Lewis, A. J.; Cottney, J.; White, D. D.; Fox, P. K.; McNeillie, A.; Dunlop, J.; Smith, W. E.; Brown, D. H. *Agents Actions* **1980**, *10*, 63–77.
- (65) Mangalam, A. K.; Aggarwal, A.; Naik, S. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 1165–1172.
- (66) Handel, M. L.; Watts, C. K. W.; Defazio, A.; Day, R. O.; Sutherland, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 4497–4501.
- (67) Grimbacher, B.; Aicher, W. K.; Peter, H. H.; Eibel, H. *Rheumatol. Int.* **1998**, *17*, 185–192.
- (68) Klinkenberg, M.; Van Huffel, S.; Heyninck, K.; Beyaert, R. *FEBS Lett.* **2001**, *498*, 93–97.
- (69) Handel, M. L.; Defazio, A.; Watts, C. K. W.; Day, R. O.; Sutherland, R. L. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40*, 613–618.
- (70) Mendes, F.; Groessler, M.; Nazarov, A. A.; Tsybin, Y. O.; Sava, G.; Santos, I.; Dyson, P. J.; Casini, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2196–2206.
- (71) Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G. *PLoS One* **2011**, *6*, e26325.
- (72) Laity, J. H.; Lee, B. M.; Wright, P. E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 39–46.
- (73) Krishna, S. S.; Majumdar, I.; Grishin, N. V. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 532–550.
- (74) Franzman, M. A.; Barrios, A. M. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 3928–3930.
- (75) Larabee, J. L.; Hocker, J. R.; Hanas, J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1943–1954.
- (76) De Paula, Q. A.; Mangrum, J. B.; Farrell, N. P. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1347–1354.
- (77) Shaw III, C. F.; Laib, J. E.; Savas, M. M.; Petering, D. H. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 403–408.
- (78) Munoz, A.; Petering, D. H.; Shaw III, C. F. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5655–5659.
- (79) Stillman, M. J.; Zelazowski, A. J.; Szymanska, J.; Gasyna, Z. *Inorg. Chim. Acta* **1989**, *161*, 275–279.
- (80) Stillman, M. J.; Presta, A.; Gui, Z.; Jiang, D. T. *Met.-Based Drugs* **1994**, *1*, 375–394.
- (81) Narayan, V. A.; Kriwacki, R. W.; Caradonna, J. P. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7801–7809.
- (82) Krizek, B. A.; Amann, B. T.; Kilfoil, V. J.; Merkle, D. L.; Berg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518–4523.
- (83) Krizek, B. A.; Merkle, D. L.; Berg, J. M. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 937–940.
- (84) Aduri, R.; Briggs, K. T.; Gorelick, R. J.; Marino, J. P. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 2565–2580.
- (85) Musah, R. A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1605–1622.
- (86) Jagtap, P.; Szabo, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 421–440.
- (87) Peralta-Leal, A.; Rodriguez, M. I.; Oliver, F. J. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 318–323.
- (88) Schreiber, V.; Dantzer, F.; Ame, J.-C.; de Murcia, G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 517–528.
-

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU PEPTIDE MODELE DE DOIGTS DE ZINC « ZINC RIBBON » ET DU SITE ACTIF DE LA RUBREDOXINE

Sommaire :

2.1. Introduction	42
2.1.1. Intérêt des modèles peptidiques de doigts de zinc	42
2.1.2. Modèles développés au laboratoire : CPLT	43
2.2. Intérêt d'un nouveau modèle peptidique « zinc ribbon »	45
2.2.1. Les doigts de zinc de type « zinc ribbon »	46
2.3. Synthèse et caractérisation du peptide « zinc ribbon »	47
2.3.1. Protéine modèle, présentation	47
2.3.2. Design et synthèse du peptide	48
2.3.3. Caractérisations de la coordination du Zn^{2+} et du Co^{2+} avec L_{ZR}	51
2.3.4. Constante apparente de complexation du Zn^{2+} pour L_{ZR}	54
2.3.5. Structure en solution de $Zn^{II}-L_{ZR}$	55
2.4. Un nouveau modèle rédox-actif de rubrédoxine	58
2.4.1. Rubrédoxine et modèles, état de l'art	58
2.4.2. Caractérisation du complexe $Fe-L_{ZR}$	60
2.4.2.1. Caractéristiques UV-Vis et CD, constante de complexation	60
2.4.2.2. Spectroscopies RPE et Mössbauer	64
2.4.2.3. Conclusions	70
2.4.3. Propriété redox du complexe $Fe-L_{ZR}$	70
2.4.4. Discussion : comparaison avec les autres modèles de rubrédoxine	72
2.5. Conclusion	73
2.6. Bibliographie	74

2.1. INTRODUCTION

Pour les études sur l'or, nous souhaitons nous concentrer sur les effets au niveau moléculaire des complexes d'or uniquement sur le site à zinc de protéines à doigts de zinc. Pour cela, nous utilisons des peptides modèles de doigts de zinc qui ont été développés au laboratoire. Afin d'augmenter le nombre de modèles de doigts de zinc de structures différentes disponibles au laboratoire, nous avons développé un nouveau peptide modèle de doigts de zinc de type « zinc ribbon » dont nous allons présenter ici le design et la synthèse.

2.1.1. Intérêt des modèles peptidiques de doigts de zinc

Pour les protéines à doigt de zinc, le site à zinc est l'élément nécessaire au bon repliement de la protéine et joue un rôle essentiel dans la reconnaissance protéine/ADN, ARN ou protéine et sur l'activité biologique de la protéine. Ces protéines jouent également un rôle important dans certains processus clés de maladies tels que la réplication du virus du VIH (NCp7^{1,2}), la réparation de l'ADN (Ada³⁻⁵ et PARP-1⁶⁻⁹), la résistance au stress oxydant (Hsp33¹⁰) ou encore la résistance aux chimiothérapies (PARP-1⁶⁻⁹). Ainsi, de nombreux groupes se sont intéressés à comprendre les mécanismes d'action des protéines à doigts de zinc dans la résistance au stress oxydant et ont également cherché à développer des inhibiteurs de ces protéines. Dans des protéines de tailles plus importantes, les sites doigts de zinc ne sont généralement constitués que 30 à 70 acides aminés. Il s'est donc vite révélé nécessaire d'utiliser des modèles peptidiques permettant de mimer uniquement le site à zinc de façon à pouvoir identifier les interactions des doigts de zinc avec les oxydants ou des inhibiteurs potentiels.

Les modèles peptidiques présentent différents avantages : (i) plus petits que la protéine entière, ils permettent de mettre en œuvre des investigations plus poussées permettant de comprendre les mécanismes impliqués au niveau moléculaire et (ii) leur synthèse par voie chimique est rapide (facilitée par l'utilisation d'un robot de synthèse) et permet d'obtenir de grosses quantités de peptide (de l'ordre de la centaine de mg) par simple purification par HPLC ; de plus, contrairement aux modèles inorganiques couramment employés, ils

permettent (iii) de travailler en solution aqueuse, dans les mêmes conditions de pH que dans les cellules et (iv) de tenir compte de la seconde sphère de coordination et des différentes liaisons hydrogène impliquées dans les protéines. Pour cela, il est donc nécessaire de reproduire fidèlement le repliement de la chaîne peptidique autour du métal.

Des modèles peptidiques linéaires mimant uniquement le doigt de zinc ont donc été développés.¹¹⁻²⁸ Ces peptides ont permis de reproduire fidèlement le repliement des doigts de zinc de type $\beta\beta\alpha$ uniquement. Le premier peptide de ce genre et le plus étudié jusqu'à présent est le peptide consensus, CP1, de Berg (Figure 25).²¹ La séquence de ce peptide linéaire est basée sur la sélection des acides aminés qui apparaissent le plus fréquemment dans la séquence d'une banque de donnée de 131 doigts de zinc de type $\beta\beta\alpha$. D'autres séquences de peptides modèles se basent uniquement sur la séquence d'un doigt de zinc comme pour le doigt de zinc de la nucléocapside p7 du VIH (Figure 23).^{11,12} Grâce à ces modèles, des données cinétiques^{11,16,29} et thermodynamiques^{12,13,18,19,24,25,28} sur la coordination du métal, sur la thermodynamique du repliement du peptide autour du métal^{14,15,30} des doigts de zinc ont été obtenues. De même, des données sur la réactivité des doigts de zinc ont été réunies^{17,26,27,31,32} et leur sensibilité aux ions métalliques tels que le cadmium²⁵, le nickel²⁴, le platine³³ et l'arsenic²⁶ a été décrite.

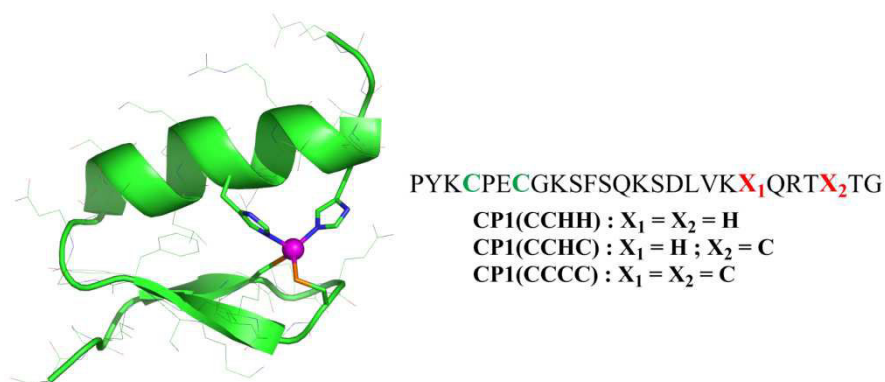


Figure 25 : Structure ¹H RMN de Zn^{II}-CP1(CCHH) et séquence peptidique des différents peptides CP1 développés par Berg *et al.*

2.1.2. Modèles développés au laboratoire : CPLT

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a cherché à mimer d'autres repliements de doigts de zinc, tels que les repliements « treble clef » ou « loosened zinc ribbon ». Dans ces

cas-là, il est impossible de reproduire correctement le repliement autour du métal en utilisant un peptide linéaire. Afin de reproduire ces repliements, un nouveau design de peptides modèles de doigts de zinc a été imaginé, appelé CPLT (cyclic peptide with a linear tail). Ce design reprend toujours le même principe, à savoir un peptide cyclique sur lequel on branche une queue peptidique linéaire.³⁴ Ainsi, deux modèles peptidiques de doigts de zinc de formule générale $Zn^{II}(Cys)_4$ et de type « treble clef » et « loosened zinc ribbon » ont été mis au point (Figure 26) afin de mimer les sites à doigts de zinc de PerR^{35,36} et de Hsp33^{37,38} respectivement. Ces modèles ont été choisis du fait de l'implication de ces deux protéines dans la réponse au stress oxydant. En effet, PerR est une protéine senseur du peroxyde d'hydrogène chez *Bacillus subtilis* et Hsp33 est une chaperonne moléculaire impliquée dans la réponse au stress oxydant, l'étude de nos modèles permettrait donc de mieux comprendre la réactivité supposée des doigts de zinc vis-à-vis du stress oxydant et plus particulièrement de H_2O_2 .^{39,40}

Sur ces deux sites doigts de zinc comme sur de nombreux autres, on retrouve une boucle de type épingle à cheveux β sur laquelle se situe la première paire de cystéine avec un motif CXXC. Sur le site à zinc de type « treble clef » de PerR, cette boucle est surmontée d'une hélice α sur laquelle se situe la deuxième paire de cystéine avec un motif CXXC.^{35,36,41} Sur le site de type « loosened zinc ribbon » de Hsp33 par contre, cette boucle est surmontée de la seconde paire de cystéine avec un motif CXC.^{37,38,41} Sur les modèles CPLT, le peptide cyclique de 8 à 12 acides aminés sert à mimer la boucle de type épingle à cheveux β qu'on retrouve à la fois sur PerR et sur Hsp33. Ce cycle est constitué des mêmes acides aminés que ceux retrouvés dans la séquence des boucles de type épingle à cheveux β , d'un dipeptide ^DPro-Pro qui permet d'induire le repliement désiré⁴² et d'un acide aminé dont la chaîne latérale sert à relier le peptide cyclique avec la queue linéaire, un glutamate pour L_{TC} et une lysine pour L_{HSP}. La queue linéaire, quant à elle, contient la seconde paire de cystéine et est constituée de la même séquence que celle de PerR ou Hsp33.

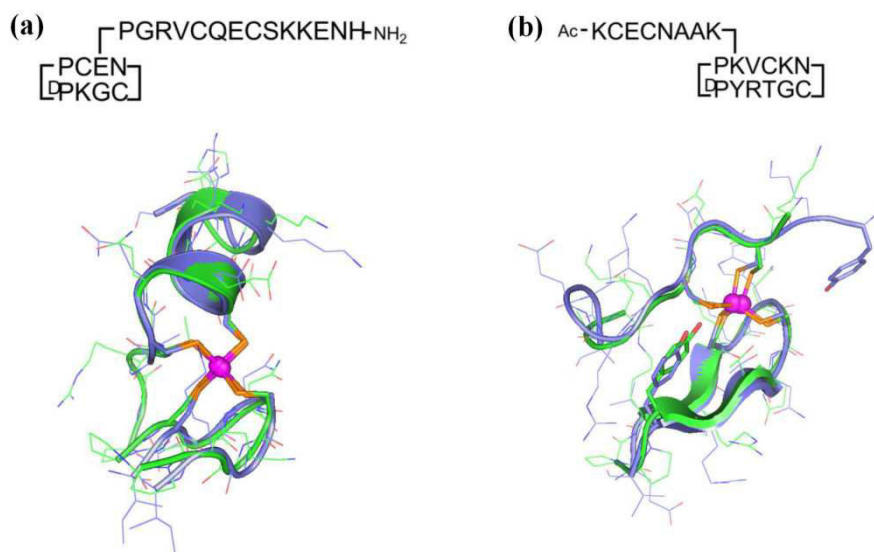


Figure 26 : (a) Séquence du peptide L_{TC},³⁴ modèle du site « treble clef » de la protéine PerR et superposition de la structure du peptide L_{TC} complexé au zinc (en vert) et de la structure cristallographique du site à zinc de PerR (en bleu). (b) Séquence du peptide L_{HSP},⁴³ modèle du site « loosened zinc ribbon » de la protéine Hsp33 et superposition de la structure du peptide L_{HSP} complexé au zinc (en vert) et de la structure cristallographique du site à zinc de Hsp33 (en bleu).

Les peptides ainsi obtenus forment des complexes 1:1 avec le zinc(II) avec des constantes d'affinité fortes, de l'ordre de 10^{14} - 10^{15} à pH 7,0.⁴⁴ Ces modèles peptidiques reproduisent parfaitement la structure autour du zinc(II) ainsi que l'orientation relative des chaînes latérales des cystéines et les liaisons hydrogène impliquées dans la coordination des sulfures pour les sites « treble clef » et « loosened zinc ribbon » (Figure 26).^{34,43} Ces modèles peptidiques se sont également révélés capables de reproduire la réactivité de ces sites à zinc vis-à-vis de H₂O₂.^{39,40}

2.2. INTERET D'UN NOUVEAU MODELE PEPTIDIQUE « ZINC RIBBON »

Avant d'obtenir des modèles qui reproduisent fidèlement le repliement des sites à zinc considérés, il a fallu faire quelques ajustements sur (i) la séquence en acides aminés du peptide, (ii) la taille du cycle et (iii) la taille de l'espaceur entre le cycle et la queue linéaire. Ainsi, le design d'un nouveau peptide était l'occasion de vérifier que la rationalisation des données obtenues précédemment pour le design de L_{TC} et L_{HSP} pouvait s'appliquer également à un nouveau modèle présentant un repliement différent.

2.2.1. Les doigts de zinc de type « zinc ribbon »

Pour ce nouveau modèle peptidique, nous avons choisi de reproduire un doigt de zinc de type « zinc ribbon ». En effet, la famille des doigts de zinc de type « zinc ribbon » est l'une des familles de doigts de zinc les plus abondantes. Ce type de doigts de zinc est impliqué dans la machinerie de translation et de transcription. On les retrouve principalement dans les facteurs de transcription, les ARN polymérases, les topoisomérases ou encore les protéines ribosomales.^{41,45,46}

Bien que la séquence d'acides aminés de ces sites varie énormément d'une protéine à l'autre⁴⁷, ces « zinc ribbon » ont une structure très conservée.⁴¹ Il est tout particulièrement intéressant de remarquer que la place du zinc lui-même varie très peu contrairement à d'autres structures, comme par exemple celle des « treble clefs » (Figure 27).⁴¹ Les doigts de zinc de type « zinc ribbon » sont constitués de deux boucles de type épingle à cheveux β qui sont presque perpendiculaires l'une par rapport à l'autre. Chacune de ces boucles porte deux cystéines qui forment la première sphère de coordination du zinc. Ces boucles sont entourées de deux brins β et on trouve souvent un troisième brin β pour compléter le feuillet (Figure 28).^{41,47}

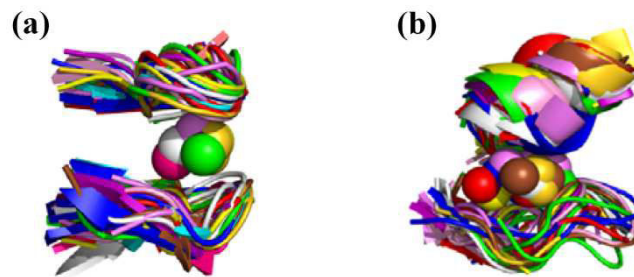


Figure 27 : Superposition de différents doigts de zinc de type (a) « zinc ribbon » et (b) « treble clef » (d'après Andreini *et al.*⁴¹).

En plus d'être l'une des familles de doigts de zinc les plus abondantes, le design d'un peptide de type « zinc ribbon » serait également tout particulièrement intéressant car on retrouve ce type de repliement dans certaines protéines à fer non hémique, à savoir la rubredoxine et la rubrerythrine. La rubredoxine est une petite protéine monomérique de 40 à 60 acides aminés qui est impliquée dans des transferts d'électrons.⁴⁸⁻⁵⁰ La rubrerythrine, quant

à elle, est une protéine tétramérique constituée de deux sous-unités qui contiennent chacune un site à fer différent. Le premier site est un site dinucléaire de type ferritine, tandis que le second est un site de type « zinc ribbon ».^{51,52}

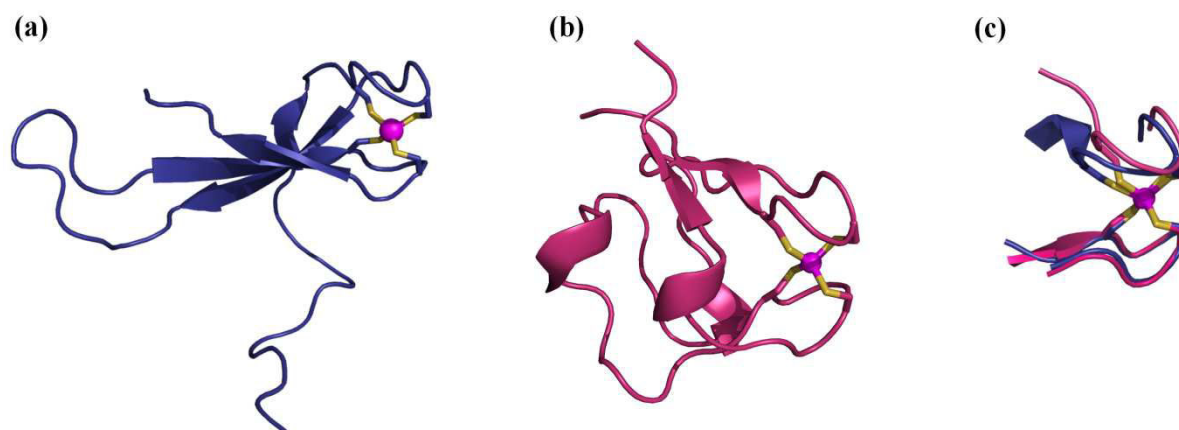


Figure 28 : Structures cristallographiques (a) de la sous-unité 9 de l'ARN polymérase II (RBP9) de *Thermococcus celer* (pdb 1QYP, d'après Wang *et al.*⁵³), (b) de la rubrédoxine métallée au zinc de *Clostridium pasteurianum* (pdb 1IRN, d'après Dauter *et al.*⁵⁰) et (c) superposition des sites métalliques de ces deux protéines.

Le nouveau modèle peptidique ainsi obtenu nous permettra d'avoir des informations supplémentaires concernant l'influence du repliement sur la réactivité des doigts de zinc à la fois vis-à-vis des ROS mais également sur la réactivité des sels d'or que nous étudierons tout au long de ce manuscrit. Enfin, l'existence de ce repliement de type « zinc ribbon » dans des protéines à fer nous a paru tout particulièrement intéressant car ce serait la première fois qu'on montrerait que notre design de modèles peptidiques permet également de reproduire une propriété redox.

2.3. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DU PEPTIDE « ZINC RIBBON »

2.3.1. Protéine modèle, présentation

Pour imaginer le modèle peptidique de « zinc ribbon », nous nous sommes basés sur la structure RMN de la sous-unité 9 de l'ARN polymérase II (RBP9, code pdb 1QYP) de *Thermococcus celer*.^{45,53} L'ARN polymérase II de *Thermococcus celer* est une protéine de 122 acides aminés et 14,2 Da qui possède deux sites à zinc. Elle est impliquée dans la

sélection du site de départ de la transcription et l'arrêt de l'élongation. Les deux sites à zinc sont situés respectivement en partie N-terminale pour le premier (aa 4-25) qui n'a pas été caractérisé pour le moment et C-terminale pour le second (aa 67-107) qui est un « zinc ribbon ».^{45,53}

2.3.2. Design et synthèse du peptide

Dans le « zinc ribbon » de RPB9, les deux boucles correspondant aux séquences C⁴⁶TKCGH⁵¹ et C¹⁸PKCGN²³ sont entourées par trois brins β anti-parallèles avec un brin après la boucle N-terminale et les deux autres avant et après la boucle C-terminale (Figure 29). Ceci nous a permis d'envisager deux modèles peptidiques d'après ce repliement : L_{ZR}, un peptide de 18 acides aminés élaboré suivant un design de type CPLT comme développé précédemment sur les modèles de Hsp33 et de PerR, et L_{ZR}^{lin}, un peptide linéaire de 22 acides

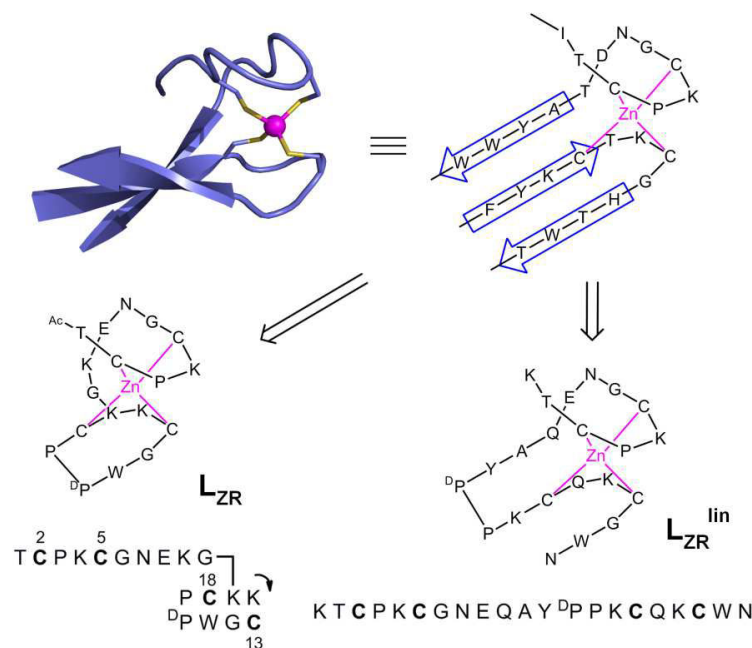


Figure 29 : Structure cristallographique du doigt de zinc « zinc ribbon » de la sous-unité 9 de l'ARN polymérase II (RPB9) de *Thermococcus celer*⁵³ (en haut à gauche), sa représentation schématique (en haut à droite) et les deux modèles peptidiques possibles, L_{ZR} et L_{ZR}^{lin} (en bas).

aminés (Figure 29). Ce design linéaire nécessite de relier les brins β anti-parallèles des boucles N-term et C-term à l'aide d'un dipeptide ^DPro-Pro, choisi pour induire la structure de feuillet β entre les deux boucles.⁵⁴

Nous avons donc cherché à concevoir le peptide le plus petit possible (Figure 29). Mais, de façon à obtenir une structure suffisamment rigide capable de lier l'ion Zn^{2+} fortement, il est important de conserver tous les acides aminés qui forment des liaisons hydrogène avec les cystéines et permettent la formation de la seconde sphère de coordination autour du zinc. Ces acides aminés sont tous localisés sur les boucles, il n'a donc pas été nécessaire d'étendre notre modèle au-delà de ces deux boucles. La boucle C-term $C^{46}TKCGH^{51}$ est donc mimée par un peptide cyclique de 8 acides aminés (cyclo(PCKKCGW^DP)), où le dipeptide ^DP-P a été inséré de façon à induire la formation d'une boucle de type épingle à cheveux de type β ,^{34,42} l'His51 a été mutée en tryptophane sur notre modèle de façon à éviter qu'il y ait un mélange entre les complexes $Zn^{II}(Cys)_4$ et $Zn^{II}(Cys)_3(His)$ et permettre le dosage du peptide grâce à l'absorbance à 280 nm du tryptophane.⁵⁵ Enfin, pour pouvoir greffer la queue linéaire sur le peptide cyclique, nous avons choisi de muter la Thr47 en Lys. En effet, sur la structure cristallographique de RPB9, on observe que cette Thr47 située sur la boucle C-terminale pointe vers l'Asn23 de la boucle N-terminale avec un espacement entre les deux acides aminés d'environ 7,5 Å (entre Thr47 C β et Asn23 CO) (Figure 30). D'après l'orientation de la queue linéaire, on choisit une lysine de façon à pouvoir poursuivre la synthèse sur la chaîne latérale de la lysine. Une lysine fait environ 5 Å quand elle est sous sa forme étendue, et la chaîne principale d'un acide aminé fait environ 3,7 Å sous sa forme étendue. Ainsi, un seul acide aminé entre la chaîne latérale de la lysine et la queue linéaire serait suffisant pour relier les deux boucles. Cependant, il faut laisser suffisamment de flexibilité pour faciliter la complexation du zinc. De l'expérience acquise au laboratoire avec les précédents modèles (L_{HSP} et L_{TC}), il ressort qu'un espaceur de trois acides aminés serait le plus approprié pour y parvenir.^{34,43,56} La queue linéaire est composée de la boucle N-terminale $C^{18}PKCGN^{23}$ sur laquelle on a ajouté une thréonine côté N-terminal et l'espaceur de trois acides aminés (EKG) côté C-terminal, sa séquence est donc (TCPKCGNEKG).

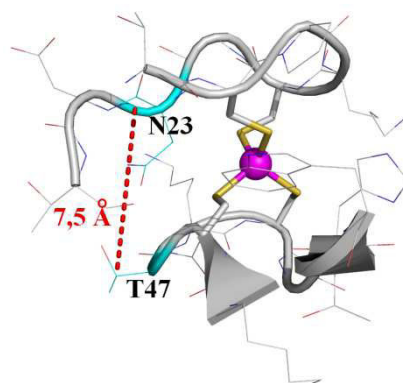


Figure 30 : Structure cristallographique du doigt de zinc « zinc ribbon » de la sous-unité 9 de l'ARN polymérase II (RPB9) de *Thermococcus celer*⁵³ montrant la distance (en rouge) entre Thr47 C β et Asn23 CO (en bleu).

La synthèse du précurseur linéaire de L_{ZR} a été réalisée par synthèse peptidique sur support solide classique de type Fmoc sur une résine de type chlorure de 2-chlorotrityle (Schéma 2). Le point clé pour l'insertion de la queue linéaire est le couplage d'une lysine dont le groupement protecteur orthogonal est situé sur la chaîne principale, Alloc-Lys(Fmoc)-OH.⁵⁷ Ceci permet de continuer l'élongation du peptide, non plus sur la chaîne principale mais sur la chaîne latérale de la lysine après déprotection du groupement Fmoc. Après couplage des 18 acides aminés, on acétyle l'extrémité N-terminale de la thréonine finale de façon à éviter toute cyclisation indésirable entre la queue linéaire et la partie C-terminale du peptide. Puis, on réalise une déprotection sélective du groupement Alloc en présence de Pd⁰ pour libérer l'extrémité N-terminale du cycle et on décroche le peptide de la résine en présence d'1% de TFA pour libérer la partie C-terminale. Ainsi, la Cys18 et la Lys11 ont respectivement leurs extrémités C-terminale et N-terminale libres pour procéder à la cyclisation du peptide. Celle-ci se fait dans le DCM en présence de PyBOP/DIEA comme activateurs comme lors d'un couplage classique sur résine. Pour éviter les cyclisations intermoléculaires et favoriser les cyclisations intramoléculaires, il est nécessaire de diluer fortement le peptide lors du couplage (0,25 mM). Enfin, on déprotège les chaînes latérales des acides aminés en présence de TFA et de piègeurs (TIS/H₂O/DTT) pour éviter la fixation sur le peptide des cations formés lors de la libération des groupements protecteurs. Le peptide L_{ZR} est ensuite purifié par HPLC et lyophilisé conduisant à un rendement total de 35 % avec une pureté > 95 %. Ce faible rendement s'explique par la formation d'un isomère au cours de la

déprotection finale des acides aminés ($t_R = 11,12$ min contre $t_R = 11, 26$ min pour L_{ZR}). La présence de cet isomère est due à la migration N→O du groupe acétyl de la thréonine N-terminale au moment de la déprotection finale en présence de TFA comme l'indiquent des études par RMN et ESI/MS.⁵⁸ Pour réduire la quantité de Thr O-acétylée, le traitement au TFA ne doit pas excéder 1h30.

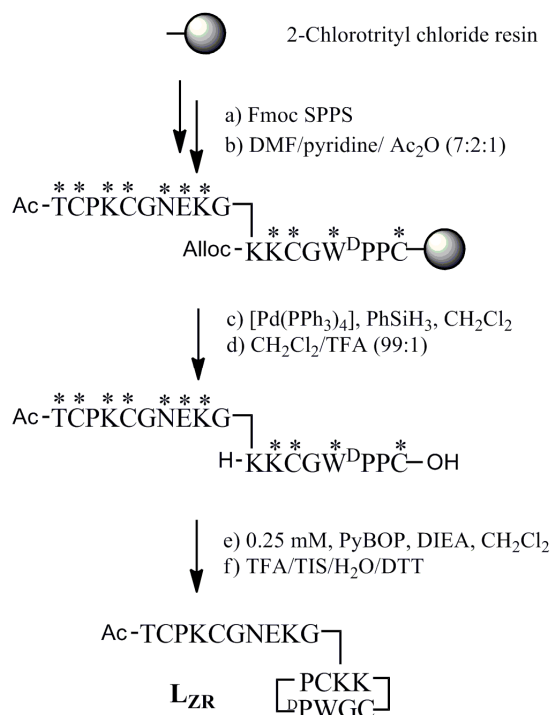


Schéma 2 : Synthèse peptidique sur support solide (SPPS) de L_{ZR} . Les * représentent les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés.

2.3.3. Caractérisations de la coordination du Zn^{2+} et du Co^{2+} avec L_{ZR}

Les propriétés de coordination des ions Zn^{2+} et Co^{2+} avec L_{ZR} ont été caractérisées par spectroscopies d'absorption UV-Vis et dichroïsme circulaire (CD) en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et à 298 K. La première information importante à connaître est la stœchiométrie du complexe formé entre l'ion Zn^{2+} et L_{ZR} . Pour cela, on suit l'évolution de la bande de transfert de charge du ligand vers le métal (LMCT) CysS→ Zn^{2+} par absorption UV-Vis lorsqu'on réalise un titrage de L_{ZR} par Zn^{2+} (Figure 31(a)). Les résultats montrent une augmentation linéaire de l'intensité de cette bande située à 207 nm jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint à un équivalent de Zn^{2+} . Ces résultats ont également été confirmés par titrage par

dichroïsme circulaire (résultats non montrés). Ils nous indiquent qu'il y a formation d'un complexe Zn^{II} -L_{ZR} avec un ratio 1:1. De plus, l'intensité de la bande LMCT à 207 nm (Tableau 3) est similaire à ce qui a pu être observé avec d'autres complexes peptidiques qui présentent un centre $Zn^{II}(Cys)_4$.^{34,43,44}

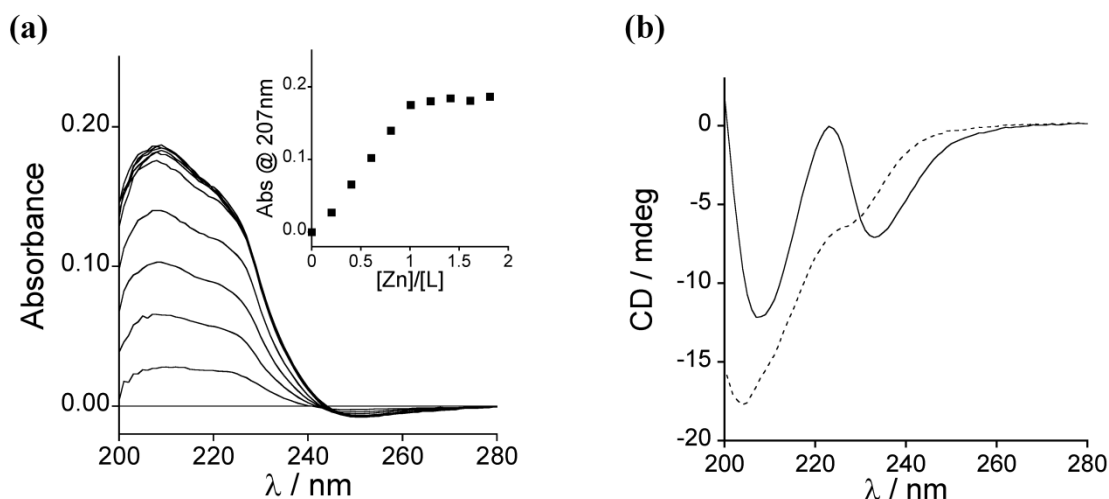


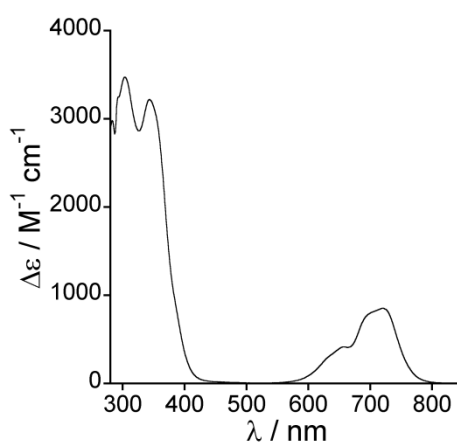
Figure 31 : (a) Titrage par absorption UV-Vis de L_{ZR} par $Zn^{II}Cl_2$ et (b) spectres CD de L_{ZR} (en traits pointillés) et Zn^{II} -L_{ZR} (en trait plein). Le spectre de l'apo-peptide a été soustrait des spectres UV-Vis.

Le spectre en CD de l'apo-peptide présente une bande fortement négative à 205 nm avec un épaulement vers 229 nm (Figure 31(b)). L'existence d'une bande fortement négative aux alentours de 200 nm est typique des peptides non structurés. Après addition d'un équivalent de Zn^{2+} , on observe un changement radical du spectre CD qui présente un minimum à 209 nm, un maximum à 224 nm et un minimum à 234 nm. On observe également que la bande vers 200 nm tend vers des valeurs positives ce qui signifie que le système évolue vers un état plus structuré. En dichroïsme circulaire, on peut avoir des informations telles que le repliement du peptide avec des signaux caractéristiques puisque les hélices α ou les feuillets β présentent des signaux différents. Cependant, il n'est pas possible de conclure sur la structure du peptide dans le cas où celui-ci est métallé par du zinc du fait de la contribution possible des transitions LMCT au signal CD.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des données UV-Vis et de la constante apparente des complexes M-L_{ZR} (K_{app} en M^{-1}) à pH 7,0 et à 298 K.

Ion métallique	$\log K_{app}$	λ [nm] ($\Delta\epsilon$ [$M^{-1} cm^{-1}$])
Zn^{2+}	15,4 (4)	207 (18 400), 225 (13 600)
Co^{2+}	–	304 (3 470), 343 (3 220), 625 (260), 654 (420), 691 (745), 721 (850)

De façon à accéder aux données sur la première sphère de coordination du métal, on utilise souvent l'ion Co^{2+} pour mimer l'ion Zn^{2+} . En effet, l'ion Co^{2+} adopte la même géométrie que le Zn^{2+} avec les cystéines et les histidines mais présente l'avantage de ne pas être spectroscopiquement silencieux du fait de sa configuration d^7 . Par titrage UV-Vis, on constate que l'ion Co^{2+} forme un complexe 1:1 avec L_{ZR}. Son spectre UV-Vis présente deux bandes LMCT CysS \rightarrow Co²⁺ à 304 et 343 nm et des bandes de transitions d-d centrées à environ 680 nm. L'énergie (vers 14700 cm^{-1}) et l'intensité ($\Delta\epsilon > 300 M^{-1} cm^{-1}$) de ces dernières sont typiques d'un ion Co^{2+} coordonné par quatre thiolates en une géométrie tétraédrique.^{13–15,18,34,43}

**Figure 32 :** Spectre UV-Vis de Co^{II} -L_{ZR} après soustraction du spectre de l'*apo*-peptide.

2.3.4. Constante apparente de complexation du Zn^{2+} pour L_{ZR}

Nous avons évalué la constante apparente de complexation entre le Zn^{2+} et L_{ZR} . Pour cela, nous avons réalisé une compétition entre le TPEN (25 μ M) et L_{ZR} (25 μ M) pour la complexation du Zn^{2+} en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0.

Le peptide existe sous différents états de protonation qui évoluent en fonction du pH. Sur un site de coordination de type $(Cys)_4$, il y a donc compétition entre la protonation des cystéines et la complexation du zinc. On peut ainsi répertorier 5 états de protonation différents à la fois pour l'*apo*-peptide et l'*holo*-peptide. La constante apparente de complexation du métal à un pH donné est définie par l'équation (1).

$$K_{app} = \frac{[ML]_{tot}}{[M] \times [L]_{tot}} = \frac{\sum_i [MLH_i]}{[M] \times \left(\sum_i [LH_i] \right)} \quad (1)$$

Le compétiteur a été choisi de façon à ce que sa constante de complexation apparente avec le Zn^{2+} à pH 7,0 soit proche de celle de Zn^{II} - L_{ZR} à deux ordres de grandeur près. Nous avons testé deux compétiteurs : l'EDTA ($\log K_{app} = 13,09$ à pH 7,0) et le TPEN ($\log K_{app} = 14,92$ à pH 7,0).⁵⁹ Cependant, l'EDTA s'est révélé être un compétiteur trop faible au cours des essais que nous avons menés. En revanche, le TPEN s'est trouvé être tout à fait adapté à cette compétition. Lorsqu'un équivalent de Zn^{2+} est ajouté au mélange équimolaire du compétiteur et du peptide, les deux équilibres représentés ci-dessous entrent en compétition (Figure 33). La compétition a été suivie en observant la cinétique de complexation de l'ion Zn^{2+} sur L_{ZR} à l'aide des bandes de transfert de charge LMCT présentes à 230 nm en absorbance UV-Vis. Une fois que l'équilibre est atteint, on observe que 65 % du peptide est complexé. La simulation de ces résultats nous a permis de déterminer la valeur de la constante K qui est le ratio $K_{app}(Zn^{II}-L_{ZR}) / K_{app}(Zn^{II}-TPEN)$ et vaut ici $K = 3,5$ à pH 7,0. On en déduit ainsi que $\log K_{app}(Zn^{II}-L_{ZR}) = 15,4(4)$ à pH 7,0. Cette valeur de constante de complexation apparente se situe donc environ un ordre de grandeur au-dessus des valeurs obtenues pour L_{HSP} et L_{TC} ($\log K_{app} = 14,6$ (1) pour Zn^{II} - L_{HSP} et $14,7$ (1) pour Zn^{II} - L_{TC}).^{34,40,43,44}

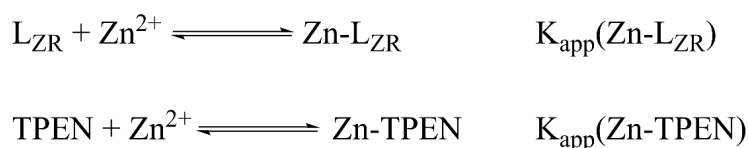


Figure 33 : Equilibres réactionnels mis en jeu lors de la compétition entre L_{ZR} et TPEN pour la complexation de l'ion Zn^{2+} .

2.3.5. Structure en solution de Zn^{II} - L_{ZR}

Le complexe Zn^{II} - L_{ZR} a été analysé par spectroscopie 1H RMN en solvant H_2O/D_2O 9:1. Avant de procéder à l'analyse en 2D 1H RMN, le spectre 1H RMN 1D à 298 K et pH 6,3 nous donne des informations précieuses sur la structure du complexe. En effet, il présente des signaux fins, bien définis et uniques pour chacun des atomes d'hydrogène du peptide. Dans la Figure 34(a), on peut également voir que la zone des signaux des NH et des aromatiques est très étendue (7,1 à 9,2 ppm) et que la plupart des couplages $^3J_{NH,H\alpha}$ sont situés en dehors de la zone 6-8 Hz. Tout ceci nous indique que le complexe Zn^{II} - L_{ZR} adopte un repliement unique avec une conformation bien définie.

Le complexe Zn^{II} - L_{ZR} a ensuite été étudié à l'aide de spectre RMN 1H 1D et 2D (TOCSY, NOESY, COSY et soft-COSY). Ces spectres complémentaires nous ont permis d'attribuer les déplacements chimiques pour chaque acide aminé avec les spectres TOCSY, COSY et NOESY, de mesurer les distances entre différents atomes d'hydrogène du peptide avec le spectre NOESY, et de déterminer les rotamères autour des liaisons N- C_α (angle ϕ) et, pour les cystéines, C_α - C_β (angle χ^1) en mesurant des couplages $^3J_{HN,H\alpha}$ et $^3J_{H\alpha,H\beta}$ avec les spectres 1D et soft-COSY. Nous avons ainsi pu mettre en évidence par effet NOE plusieurs interactions inter-résidus entre les chaînes latérales des acides aminés du cycle et de la queue linéaire (par exemple entre le Trp15 et la Pro3 et la Lys4 ou entre la Lys12 et l'Asn7) significatifs du repliement du peptide autour du métal. Des interactions inter-résidus entre la Thr1 et l'Asn7 d'une part et le Glu8 et la Lys9 d'autre part sont quant à elles significatives d'un repliement de la queue peptidique linéaire sur elle-même. De même, on observe des interactions inter-résidus dans le cycle.

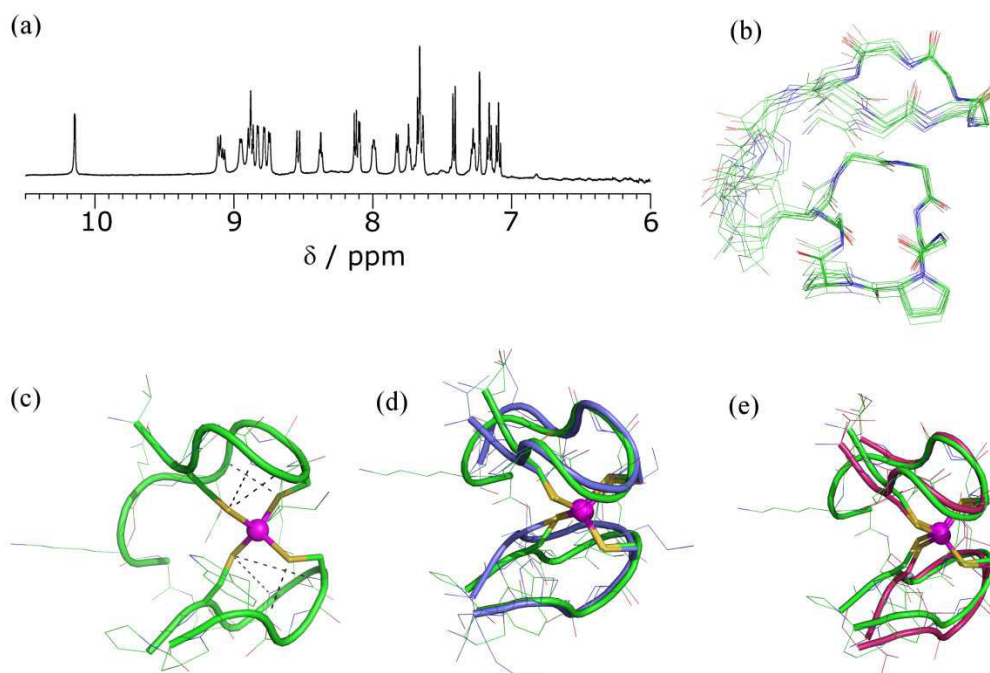


Figure 34 : (a) Spectre 1D ^1H RMN de $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ dans la région des protons NH et aromatiques (500 MHz, 298 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 6,3). Structure en solution de $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ obtenue d'après les spectres TOCSY, NOESY et COSY. (b) Superposition des 10 structures de plus basse énergie calculées en utilisant XPLOR.⁶⁰ Toutes les chaînes latérales à l'exception de celles du dipeptide $^{\text{D}}$ Pro-Pro et de la lysine qui sert pour le branchement de la queue linéaire sur le peptide cyclique ont été retirées pour plus de clarté. (c) Structure de plus basse énergie avec les six liaisons hydrogène $\text{NH}\cdots\text{S}$ apparentes en pointillés noirs. Superposition de la structure de plus basse énergie de $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ (en vert) avec (d) le « zinc ribbon » de RPB9 de *Thermococcus celer* (en bleu, 1QYP)⁵³ et (e) la rubrédoxine complexée au zinc de *Clostridium pasteurianum* (en violette, 1IRN)⁵⁰.

D'après ces spectres RMN, nous avons pu obtenir 167 contraintes de distances (61 intra-résidus, 57 séquentielles, 41 à moyenne et longue distances) et 13 contraintes d'angles dièdres qui nous ont permis de calculer la structure en solution de $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ en utilisant XPLOR, un logiciel de calcul de mécanique moléculaire sous contrainte couramment utilisé pour la détermination de structure RMN ou cristallographiques de protéine (ces calculs ont été effectués par Olivier Sénèque).⁶⁰ La superposition des 10 structures de plus basse énergie obtenue après calcul est représentée sur la Figure 34(b). On observe très clairement que le squelette du cycle se replie exactement de la même façon sur chacune de ces 10 structures montrant que cette zone est très bien structurée. De même, la zone du squelette peptidique de la queue linéaire qui contient les Cys2 et Cys5 est très rigide. On observe qu'il y a une plus

grande flexibilité au niveau de la chaîne latérale de la Lys11 et de l'espaceur (EKG). La structure de plus basse énergie de Zn^{II} -L_{ZR} (Figure 34(c)) montre que le complexe peptidique adopte un repliement de type « zinc ribbon ». Cette structure se superpose parfaitement à celles de RPB9 de *Thermococcus celer* (Figure 34(d))⁵³ et de la rubrédoxine complexée au zinc de *Clostridium pasteurianum* (Figure 34(e)).⁵⁰ En particulier, on note que notre modèle reproduit parfaitement la position du zinc, l'orientation des cystéines qui lui sont liées et les six liaisons NH...S typiques d'un repliement de type « zinc ribbon ».^{50,53,61}

Comme nous l'avons vu plus haut, la constante de complexation du zinc par L_{ZR} est plus forte que celle de L_{TC} et L_{HSP} (environ un ordre de grandeur). Ceci peut s'expliquer par la présence d'interactions hydrophobes entre le noyau indole du tryptophane et les chaînes latérales de la Lys4 d'un côté et de la ^DPro16 de l'autre qui permettent la stabilisation du complexe peptidique Zn^{II} -L_{ZR} (Figure 35). En effet, il a déjà été montré au laboratoire que la présence d'interactions hydrophobes au cœur du peptide CP1 quand celui-ci est métallé permet une stabilisation de 5,7 kcal mol⁻¹ du complexe peptidique.⁴⁴

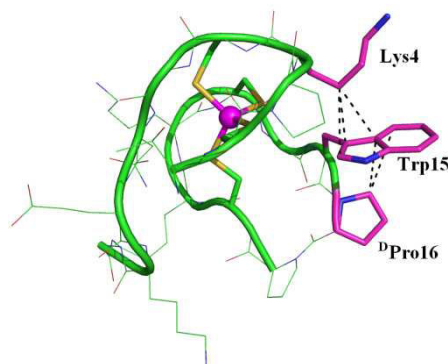


Figure 35 : Structure en solution de plus basse énergie de Zn^{II} -L_{ZR} (pH 6,3, 298 K) montrant, en pointillés noirs, les interactions hydrophobes entre l'indole du Trp15 et les chaînes latérales de la Lys4 et de la ^DPro16.

Pour L_{ZR}^{lin}, nous avons pu mettre en évidence par absorption UV-Vis que nous formions également un complexe Zn^{II} -L_{ZR}^{lin} avec un ratio 1:1. De plus, le complexe formé avec l'ion Co²⁺ possède une signature spectroscopique similaire à celle de Co^{II}-L_{ZR} montrant bien que le complexe peptidique linéaire est également capable de reproduire la première sphère de coordination autour du métal observée pour les doigts de zinc de type zinc ribbon. Cependant, le peptide linéaire s'est révélé moins performant d'un point de vue thermodynamique que le peptide cyclique avec une constante apparente de complexation pour Zn^{II} -L_{ZR}^{lin} cent fois plus

faible que pour Zn^{II} -L_{ZR}. Finalement, le spectre RMN ¹H 1D de Zn^{II} -L_{ZR}^{lin} présente un domaine spectral très étendu (6,5 à 9,2 ppm) pour les protons NH et aromatiques. Ceci indique que le complexe peptidique est replié. Cependant, la plupart des résonances sont larges du fait de la mobilité des acides aminés non coordonnés au métal et on observe également des résonances multiples pour de nombreux atomes d'hydrogène signe de la coexistence de multiple conformations en solution.⁵⁶ Il n'était pas possible de déterminer la structure en solution pour ce peptide. Ce peptide n'ayant pas été utilisé pour l'analyse de l'interaction des doigts de zinc avec les sels d'or, nous avons donc fait le choix de ne pas détailler plus les résultats obtenus.

2.4. UN NOUVEAU MODELE REDOX-ACTIF DE RUBREDOXINE

A présent que nous avons pu mettre en évidence que notre modèle peptidique était capable de lier le zinc fortement tout en reproduisant parfaitement un repliement de type zinc ribbon. Et plus particulièrement que la structure de notre modèle se superpose parfaitement à celle de la rubredoxine liée au zinc. Nous nous sommes demandés si L_{ZR} pouvait complexer les ions ferreux et ferriques et avoir une propriété redox similaire à la rubredoxine.

2.4.1. Rubredoxine et modèles, état de l'art

La rubredoxine est l'une des protéines fer-soufre les plus simples. Cette petite protéine (40-60 acides aminés) présente un repliement de type « zinc ribbon » autour de son centre Fe(Cys)₄. La rubredoxine est impliquée dans des réactions de transfert d'électrons. Ainsi, le fer oscille entre les états d'oxydation +II et +III avec un potentiel redox compris entre -100 et +50 mV vs SHE.⁶²

Longtemps considérée comme la seule protéine présentant ce type de site à fer, la rubredoxine a été très largement étudiée que ce soit sous sa forme native ou sa forme mutée, la rubredoxine la plus étudiée est celle de *Clostridium pasteurianum*. Plusieurs modèles ont été conçus de façon à reproduire ce site Fe(Cys)₄ et dans certains cas, son activité redox. Et parmi ces modèles, on trouve à la fois des complexes inorganiques⁶³⁻⁶⁵, des protéines mutées sur certains acides aminés^{66,67} et des modèles peptidiques.⁶⁸⁻⁷³

Les modèles de rubrédoxine les plus simples qui ont été imaginés sont basés sur des ligands arylthiolates monodentes. Ces modèles ont permis de mimer la première sphère de coordination de l'ion ferreux⁶³ ou ferrique^{64,65} en solvant organique. Suivant les ligands arylthiolates utilisés, il était possible d'obtenir soit des composés $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}_4$ stables soit des composés $\text{Fe}^{\text{III}}\text{S}_4$ stables mais aucun de ces ligands ne s'est révélé capable de stabiliser à la fois ces deux espèces redox du fer. Différents petits modèles peptidiques de 4 à 11 acides aminés contenant au minimum un site CXXC ont également été mis au point.⁶⁸⁻⁷¹ Ces peptides forment des complexes stables avec les ions ferreux avec des ratios Fe^{II} / peptide 1:2, un exemple de ces peptides est donné en Figure 36a.⁶⁸ Les complexes Fe^{III} / peptide 1:2 ont pu être caractérisés en solvant organique mais ils ne sont pas stables en solution aqueuse.

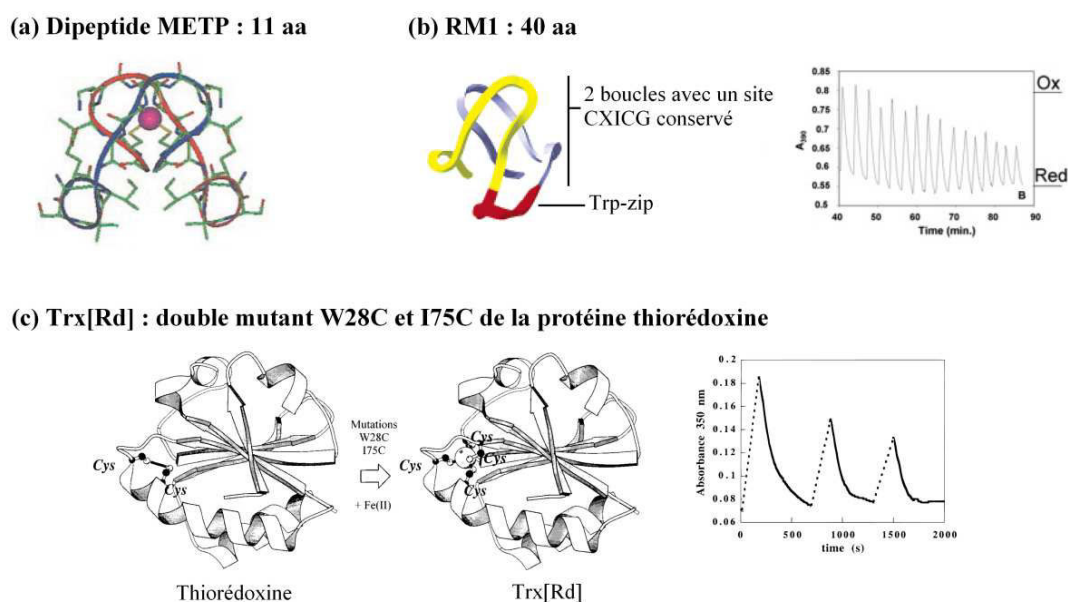


Figure 36 : Design de quelques-uns des modèles de rubrédoxine développés. (a) le dipeptide METP complexé au fer, d'après Pavone *et al.*⁶⁸, (b) RM1 et ses cycles d'oxydations et de réduction, d'après DeGrado *et al.*⁷² et (c) Trx[Rd] complexé au fer et ses cycles d'oxydation et de réduction, d'après Hellinga *et al.*⁶⁷

Des protéines ont également servi de base pour élaborer des sites de type $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ en mutant certains acides aminés en cystéines à des positions spécifiques. La première protéine utilisée pour ce type de design est la protéine G des streptocoques et plus particulièrement son domaine B1 de complexation à l'immunoglobuline. Dans ce cas, le centre $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ a pu être obtenu avec le fer à l'état d'oxydation +III en mutant quatre acides aminés en cystéines à des positions susceptibles de former des boucles de type épingle à cheveux. Cependant, celui-ci

n'est pas très stable et le complexe au Fe^{II} n'a pas été caractérisé.⁶⁶ Le second modèle, Trx[Rd], est basé sur la thiorédoxine d'*Escherichia coli* (Figure 36(c)).⁶⁷ Pour obtenir le centre $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Cys})_4$, les deux cystéines natives impliquées dans le pont disulfure ont été conservées et deux autres acides aminés ont été mutés en cystéines. Ainsi, le centre $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ a pu être caractérisé avec le fer aux états d'oxydation +II et +III avec des données spectroscopiques proches de celles de la rubredoxine. Ce complexe fut le premier capable d'avoir une activité redox. En effet, trois cyclages redox ont pu être réalisés par oxydation à l'air du centre $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ suivi d'une réduction sous argon en présence de β -mercaptoethanol (Figure 36(c)). Cependant, ces cycles ne sont pas totalement réversibles et le site $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ commence à se décomposer dès le premier cycle.

Le meilleur modèle de rubredoxine qui a été publié jusqu'à présent est RM1 qui a été développé par DeGrado et al.⁷² Il s'agit d'un peptide de 40 acides aminés dont le design a été fait *de novo*. Le peptide est constitué de deux boucles qui contiennent un site CXICG conservé qui permet de reproduire le repliement en épingle à cheveux. Ces deux boucles sont reliées par un linker de type tryptophane zipper (Trp-zip) qui permet de stabiliser la structure. RM1 forme un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Cys})_4$ stable dans l'eau quel que soit le degré d'oxydation du fer. De plus, il possède une activité redox avec un potentiel redox de +55 mV vs SHE et est capable d'effectuer 15 cycles redox en présence de β -mercaptoethanol (Figure 36(b)) soit le plus grand nombre de cycles redox effectués par un modèle de rubredoxine à ce jour. Cependant, il faut noter que ces cycles consistent en la réduction partielle du Fe^{III} en Fe^{II} ($\approx 30\%$) suivie d'une oxydation à l'oxygène.

2.4.2. Caractérisation du complexe Fe-L_{ZR}

2.4.2.1. Caractéristiques UV-Vis et CD, constante de complexation

Nous avons tout d'abord étudié les propriétés de complexation du Fe^{II} et du Fe^{III} par absorbance UV-Vis et CD en tampon HEPES à pH 7,5. Pour les études sur l'ion ferreux, les expériences ont été réalisées en boîte à gant pour prévenir l'oxydation du Fe^{II} en Fe^{III} . Les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} présentent des bandes de transfert de charge dans le domaine visible contrairement au Zn^{2+} pour lequel elles se situent dans le domaine UV. Plus particulièrement,

au sein de la rubrédoxine de *Clostridium pasteurianum*, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Cys})_4$ présente deux bandes d'absorption relativement intense à 311 et 335 nm qui correspondent à des transitions LMCT $\text{CysS} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$ et le complexe de type $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Cys})_4$ présente des bandes d'absorption à 350, 380, 490, 570 et 750 nm qui correspondent à des transitions LMCT de type $\text{CysS}_{\text{p}\sigma} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ (Figure 37).^{74,75} Ainsi, les spectroscopies d'absorption UV-Vis et CD nous donneront déjà une bonne appréciation de la faculté de notre complexe à reproduire la coordination du fer présent dans la rubrédoxine.

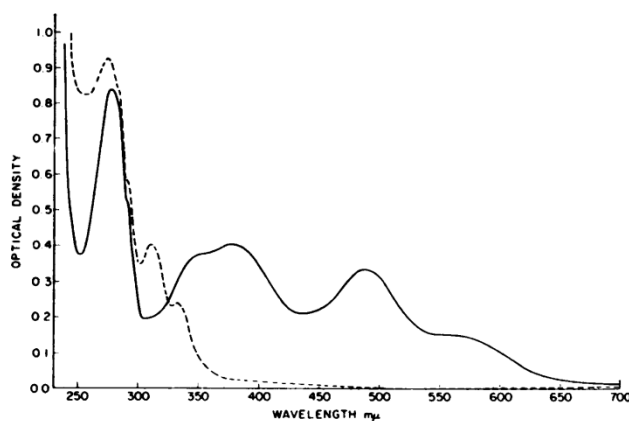


Figure 37 : Spectres UV-Vis de la rubrédoxine de *Clostridium pasteurianum* sous sa forme réduite (en pointillés) et oxydée (en traits pleins), d'après Lovenberg et Sobel.⁴⁸

Comme précédemment avec le complexe au zinc, nous avons tout d'abord évalué la stœchiométrie du complexe formé entre L_{ZR} et le Fe^{2+} . Nous avons donc réalisé un titrage de L_{ZR} par le sel de Mohr suivi par absorption UV-Vis au cours duquel on observe l'augmentation progressive des bandes de transition LMCT $\text{CysS} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$ à 312 et 332 nm jusqu'à atteindre un plateau à un équivalent (Figure 38 et Tableau 4). Ainsi, on observe bien la formation d'un complexe 1:1 $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$. En dichroïsme circulaire, on observe des bandes négatives à 314 nm et positives à 334 nm correspondant à ces mêmes transitions LMCT (Figure 38 et Tableau 4). Le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$, quant à lui, n'a pas pu être obtenu par complexation directe du Fe^{III} par L_{ZR} . En effet, nos essais de titrage de L_{ZR} par FeCl_3 dans le méthanol avec et sans TCEP n'ont pas pu aboutir à la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$. Mais ces essais de complexation directe du Fe^{III} par L_{ZR} étaient limités en termes de choix de sels de Fe^{III} . En effet, il n'existe que très peu de sels de Fe^{III} solubles dans l'eau du fait de la formation d'hydroxydes ferriques au pH utilisé. Nous avons donc formé le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$

par oxydation par l'oxygène de l'air du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ ($45 \mu\text{M}$) en tampon HEPES en présence de TCEP ($750 \mu\text{M}$). On observe alors que la solution devient peu à peu rouge. Le spectre d'absorption de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ présente des bandes intenses à 360 et 491 nm avec un épaulement à 570 nm qui correspondent bien à la formation d'un complexe de type $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Cys})_4$ (Figure 38 et Tableau 4). La formation de ce complexe est également observée par dichroïsme circulaire avec l'apparition de bandes caractéristiques à 436, 500, 557 et 640 nm. Les données spectroscopiques sur les complexes Fe-L_{ZR} à la fois en CD et UV-Vis sont très similaires à celles de la rubredoxine que ce soit sous sa forme réduite ou sous sa forme oxydée (Tableau 4).

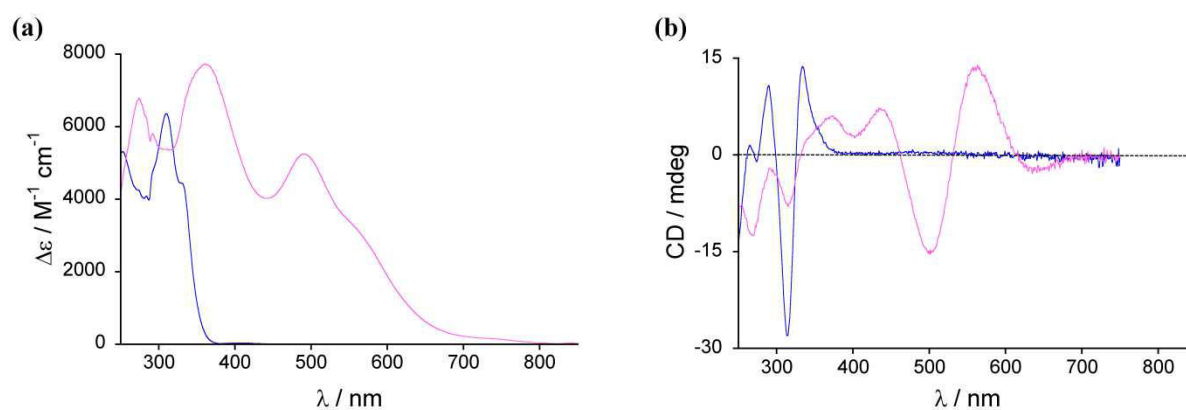


Figure 38 : Spectres UV-Vis (a) et CD (b) de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ ($45 \mu\text{M}$, en bleu) et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ ($45\mu\text{M}$, en rose) en présence de TCEP $750 \mu\text{M}$ dans un tampon HEPES (20mM) à pH 7,5 à 298 K. Le spectre de l'*apo*-peptide a été soustrait des spectres d'absorption.

Tableau 4 : Comparaison des données spectroscopiques des complexes Fe-L_{ZR} et des formes oxydées et réduites de la rubredoxine de *Clostridium pasteurianum*.

Ion métallique	Ligand	Absorption UV-Vis	CD
		λ [nm] ($\Delta\epsilon$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$])	λ [nm] (+/-)
Fe^{2+}	L_{ZR}	312 (6360), 332 (4410)	314 (-), 334 (+)
	<i>Cp Rd</i>	311, 331 ⁷⁴	311, 331 ⁷⁴
Fe^{3+}	L_{ZR}	360 (7730), 491 (5250), 570 (2900), 700 (220)	436 (+), 500 (-), 557 (+), 640 (-)
	<i>Cp Rd</i>	350 (7000), 380 (7700), 490 (6600), 570 (3200), 750 (350) ⁷⁵	437 (+), 500 (-), 560 (+), 635 (-) ⁷⁴

Les expériences de compétition avec HEDTA et EGTA effectuées comme précédemment pour le zinc montrent que L_{ZR} possède une forte affinité pour le Fe^{II} avec un log $K_{app} = 10,0(3)$ à pH 7,0. La complexation directe de l'ion ferrique par L_{ZR} n'étant pas possible, il n'a pas été possible de mesurer la constante de complexation apparente pour ce complexe.

Nous avons cherché à évaluer la stabilité du complexe Fe^{III}-L_{ZR}. En effet, les complexes Fe^{III}S₄ sont connus pour être instables et la réduction du métal par le ligand : $2 \text{Fe}^{\text{III}} + 2 \text{RS}^- \rightarrow 2 \text{Fe}^{\text{II}} + \text{RSSR}$ a déjà été rapportée.⁶⁸ Toutes les expériences d'oxydation du complexe Fe^{II}-L_{ZR} en Fe^{III}-L_{ZR} ont été réalisées en présence de TCEP (750 μM) afin d'éviter l'oxydation des cystéines par l'oxygène de l'air. Quand le complexe Fe^{III}-L_{ZR} est généré dans ces conditions, on observe, en suivant l'intensité de la bande d'absorption à 491 nm, que le complexe est stable pendant environ 8 heures avec une légère diminution d'absorbance d'environ 5 % uniquement pendant ce laps de temps (Figure 39). Après ces huit premières heures, une très forte décroissance de l'intensité de cette bande est observée (-75 % en 7h). Ceci est très probablement lié à la consommation de tout le TCEP présent en solution. Afin de le vérifier, nous avons cherché à générer le complexe Fe^{III}-L_{ZR} en l'absence de TCEP. Dans ces conditions, on observe la formation de seulement 30 % de complexe Fe^{III}-L_{ZR} suivie rapidement d'une diminution de l'intensité de la bande d'absorption à 491 nm. Ceci suggère que la présence de TCEP en solution permet la réduction des disulfures formés par réaction de réduction du Fe^{III} par les thiols permettant au peptide de revenir à son état réduit. Les ions Fe^{II} présents en solution peuvent alors de nouveau se coordonner au peptide réduit générant le complexe Fe^{II}-L_{ZR} qui peut ainsi être réoxydé à l'air.

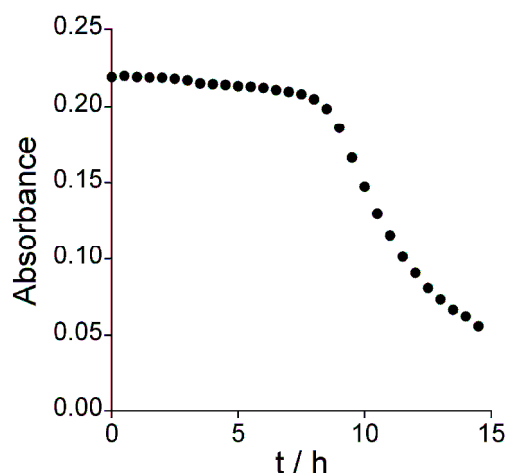


Figure 39 : Suivi par absorbance UV-Vis (491 nm) de la stabilité à l'air de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ (42 μM) en tampon HEPES 20 mM à pH 7,5, TCEP 750 μM et 298 K (chemin optique = 1,0 cm). L'absorbance a été enregistrée toutes les 30 minutes pendant 50 heures après oxydation à l'air du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$. Seule l'évolution initiale sur 15 heures est montrée.

2.4.2.2. Spectroscopies RPE et Mössbauer

Deux techniques spectroscopiques sont particulièrement appropriées pour l'étude de la structure électronique des complexes métalliques à base de fer : la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) et la spectroscopie Mössbauer.

La spectroscopie Mössbauer s'applique aux nucléides dont le noyau est capable d'émettre ou d'absorber des photons γ . Pour être observé, l'effet Mössbauer nécessite que cette absorption ou émission se fasse sans effet de recul (échantillon solide ou congelé). Parmi la quarantaine d'éléments pouvant interagir avec un rayonnement γ , on compte les isotopes ^{57}Fe , ^{119}Sn , ^{67}Zn , ^{197}Au , ainsi que de nombreux lanthanides et actinides.⁷⁶ Cependant, pour des raisons pratiques de mise en œuvre, la spectroscopie Mössbauer du ^{57}Fe est celle qui est la plus utilisée. Cette méthode conduit à la détection de l'ensemble des noyaux ^{57}Fe au sein de l'échantillon étudié, chaque noyau qu'il soit au sein d'un édifice paramagnétique ou diamagnétique, présentant sa propre signature selon son degré d'oxydation, son état de spin et son environnement.

La spectroscopie RPE, quant à elle, s'applique principalement aux espèces possédant un nombre impair d'électrons non appariés (complexes métalliques, radicaux, ...). Cette

technique consiste à appliquer un champ magnétique sur une espèce paramagnétique ce qui entraîne une levée de dégénérescence des niveaux quantiques de spin et permet d'étudier les énergies de transition entre les niveaux électroniques, appelées transitions RPE. Les signaux observés sont caractéristiques de l'état de spin du système, donnant ainsi, dans le cas des complexes d'ions de métaux de transition, de précieux renseignements sur les degrés d'oxydation des ions métalliques et leur environnement. Les complexes mononucléaires du Fe^{III} donnent des signaux très différents selon que le métal possède un spin électronique $S = 1/2$ ou $S = 5/2$. En revanche les complexes mononucléaires de Fe^{II} ne donnent aucune réponse lorsque l'ion Fe^{II} est bas spin ($S = 0$) et les spectromètres conventionnels ne permettent pas en règle générale de détecter un signal lorsqu'il est haut spin ($S = 2$).

Afin de caractériser pleinement les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$, nous avons donc entrepris une étude par spectroscopie Mössbauer, complétée par des enregistrements RPE dans le cas de l'état oxydé. Pour tester la fiabilité de notre modèle, nous bénéficions des publications détaillant, sur la base des données RPE et Mössbauer, la structure électronique de la rubrédoxine dans ses états oxydé et réduit.

- Analyse du complexe peptidique réduit

Afin de pouvoir être étudié par spectroscopie Mössbauer, le complexe peptidique $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ a été préparé en utilisant du sel de Mohr ^{57}Fe . Les spectres Mössbauer de $^{57}\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ ont été enregistrés à 4,2 K avec différents champs magnétiques appliqués parallèlement à la radiation γ émise par une source de ^{57}Co . En présence d'un petit champ magnétique (0,06 T), on observe un doublet dont la position centrale appelée déplacement isomérique (δ) et la séparation appelé éclatement quadripolaire (ΔE_Q) reflètent l'interaction électrique entre le noyau ^{57}Fe et les électrons (Figure 40). Ces deux paramètres traduisent donc l'état d'oxydation et le spin du fer et leurs valeurs ($\delta = 0.69 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ et $|\Delta E_Q| = 0.34 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) sont ici caractéristiques d'un ion Fe^{II} haut spin ($S = 2$). Les études en présence d'un fort champ magnétique ($> 1 \text{ T}$), quant à elles, permettent de faire apparaître les interactions magnétiques entre le noyau et le champ magnétique appliqué qui viennent en compétition avec l'interaction hyperfine entre les spins électronique et nucléaire de l'ion ^{57}Fe . Martin Clémancey a pu obtenir une très bonne simulation de l'ensemble des spectres en utilisant le formalisme de l'Hamiltonien de spin qui donne accès aux paramètres D et E de l'éclatement en champ nul de

l'état $S = 2$ ainsi qu'au couplage hyperfin du Fe^{II} (Figure 40). Les valeurs des différents paramètres sont rassemblées dans la première colonne du Tableau 5. On constate une très forte similitude entre les paramètres du Fe^{II} dans le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ avec ceux du Fe^{II} de la rubredoxine (cf deuxième colonne du Tableau 5).

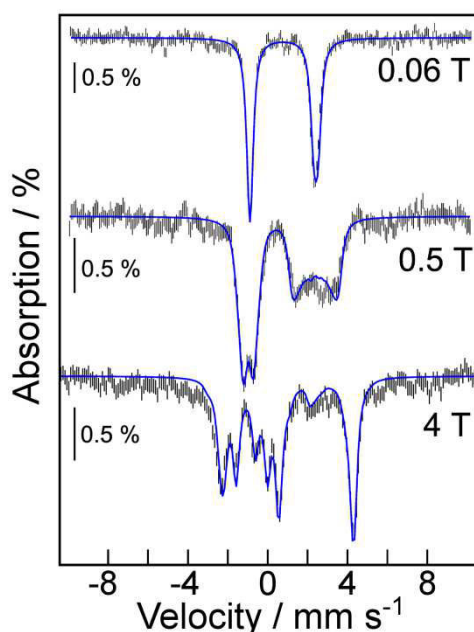


Figure 40 : Spectres Mössbauer du complexe peptidique $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ (1,17 mM) en présence de TCEP dans le tampon HEPES pH 7,5. Les échantillons ont été enrichis en ^{57}Fe . Les spectres (barres verticales) ont été enregistrés à 4,2 K avec différents champs magnétiques (0,06 - 4 T) appliqués parallèlement au rayonnement γ . La simulation (en traits pleins) a été obtenue en considérant un système de spin $S = 2$. Les valeurs des paramètres sont indiquées dans le Tableau 5.

Nous avons vérifié que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ ne donnait aucun signal RPE à 9,4 GHz et 4,2K.

- Analyse du complexe peptidique oxydé

Pour le complexe peptidique oxydé $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ nous avons pu combiner la spectroscopie Mössbauer et la spectroscopie RPE. Les échantillons pour les spectroscopies RPE et Mössbauer ont été préparés comme précédemment, en exposant une solution de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ (^{57}Fe pour le Mössbauer) à l'air. Il faut noter que la solution étudiée par RPE est de concentration nettement plus faible que celle étudiée par spectroscopie Mössbauer.

La Figure 41 reproduit le spectre RPE en bande X (9,4 GHz) de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ enregistré à 4,9 K. Le signal est constitué de quatre raies dont les valeurs de g_{eff} sont portées sur la figure. Ce spectre est caractéristique d'un système de spin électronique $S = 5/2$ pour lequel le phénomène de levée de dégénérescence en champ nul (ZFS) est supérieur à l'énergie de la transition RPE. Les six niveaux électroniques de l'état $S = 5/2$ se répartissent en trois doublets (appelés doublets de Kramers) et seules les transitions au sein de chacun de ces trois doublets sont observées.

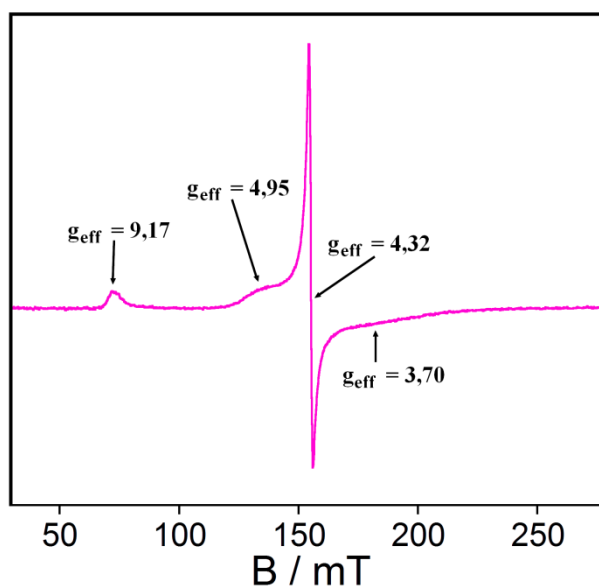


Figure 41 : Spectre RPE en bande X de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ (500 μM) enregistré à 4,9 K (puissance des micro-ondes : 0,503 mW, fréquence : 9,3859 GHz, modulation de fréquence : 100 kHz, modulation d'amplitude : 0,5 mT).

Chaque doublet est caractérisé par un jeu de trois valeurs de g_{eff} . Ces valeurs sont directement liées aux paramètres D et E du ZFS. On peut identifier les résonances en jouant sur la population des doublets de Kramers, ce qui se traduit par des variations relatives d'intensité des raies RPE. Des enregistrements à différentes températures ont donc été effectués. La Figure 42 reproduit les spectres enregistrés entre 4,9 et 20 K après avoir pris soin de caler à la même intensité la raie à $g_{\text{eff}} = 9,17$. On constate que les trois raies autour de 150 mT augmentent d'intensité avec la température. Ceci implique que la résonance à $g_{\text{eff}} = 9,17$ provient du doublet de Kramers fondamental tandis que les trois autres résonances à $g_{\text{eff}} = 4,95$, 4,32 et 3,70 proviennent du premier doublet de Kramers excité. Les positions des raies suggèrent une rhombicité du ZFS proche de 1/3, à savoir la valeur maximale. Les

simulations effectuées par Geneviève Blondin conduisent à $E/D \approx 0,22$ avec un paramètre D positif et de faible amplitude. Toutes ces données sont comparables à celles rapportées dans la littérature pour la rubredoxine oxydée.^{77,78}

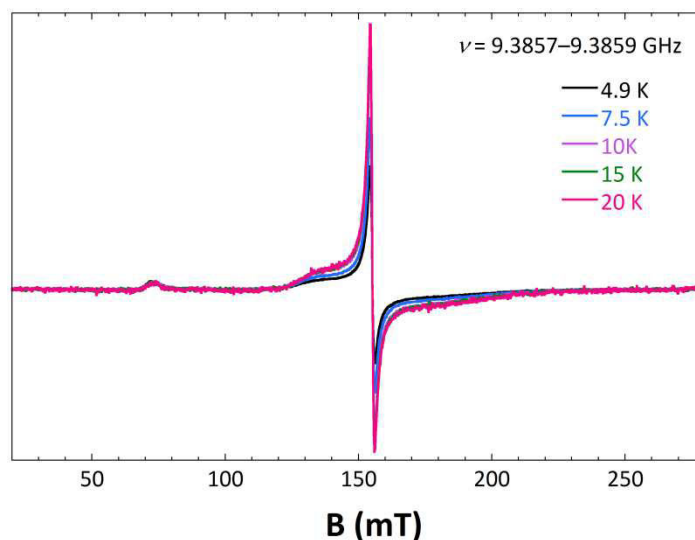


Figure 42 : Superposition de spectres RPE enregistrés entre 4,9 et 20 K dans les mêmes conditions (0,503 mW, 2 scans). Les raies à $g_{\text{eff}} = 9,17$ ont été superposées en intensité en imposant un facteur multiplicatif approprié.

Pour les analyses par spectroscopie Mössbauer, l'échantillon a été préparé suivant les mêmes conditions que précédemment (1 eq $^{57}\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ en présence de 10 eq TCEP) mais avec le complexe $^{57}\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ suffisamment concentré pour être détectable (1,72 mM). Des mesures par spectroscopie d'absorption UV-visible indiquent qu'à ces fortes concentrations, l'oxydation à l'air du complexe peptidique n'est pas totale.

La Figure 43(a) reproduit les spectres enregistrés à 4,2 K sous différents champs magnétiques (de 0,06 à 7 T) appliqués parallèlement à la direction des rayons γ . La complexité de ces spectres indique un mélange d'espèces en solution. Martin Clémancey est parvenu à reproduire de façon très satisfaisante ces quatre spectres en supposant l'existence de trois entités différentes : (i) un complexe mononucléaire de spin $S = 5/2$ qui n'est autre que le complexe peptidique $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$, (ii) un complexe mononucléaire de spin $S = 2$ correspondant au complexe peptidique $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ étudié précédemment et (iii) une entité de spin $S = 0$. Les abondances relatives sont respectivement de 51, 41 et 6%. Les deux premières espèces sont attendues d'après les mesures en UV-visible. L'impureté diamagnétique présente un signal

quadrupolaire dont les valeurs des paramètres ($\delta = 0.37 \text{ mm.s}^{-1}$, $\Delta E_Q = 0.97 \text{ mm.s}^{-1}$, $\eta = 0$) sont similaires à celles des systèmes oxodiférriques. On peut noter que tant l'impureté diamagnétique que le complexe de Fe^{II} ne donnent aucune réponse en RPE (si tant est qu'elles soient présentes dans les solutions plus faiblement concentrées). La Figure 43(b) montre la signature du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ après soustraction des contributions du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ et de l'impureté. Les valeurs des différents paramètres sont données dans la troisième colonne du Tableau 5. On peut noter que la rhombicité du ZFS ainsi que le signe du paramètre D sont en accord avec l'analyse des données RPE. De plus, les paramètres issus des spectres Mössbauer sont voisins de ceux obtenus pour la rubrédoxine oxydée (Tableau 5).

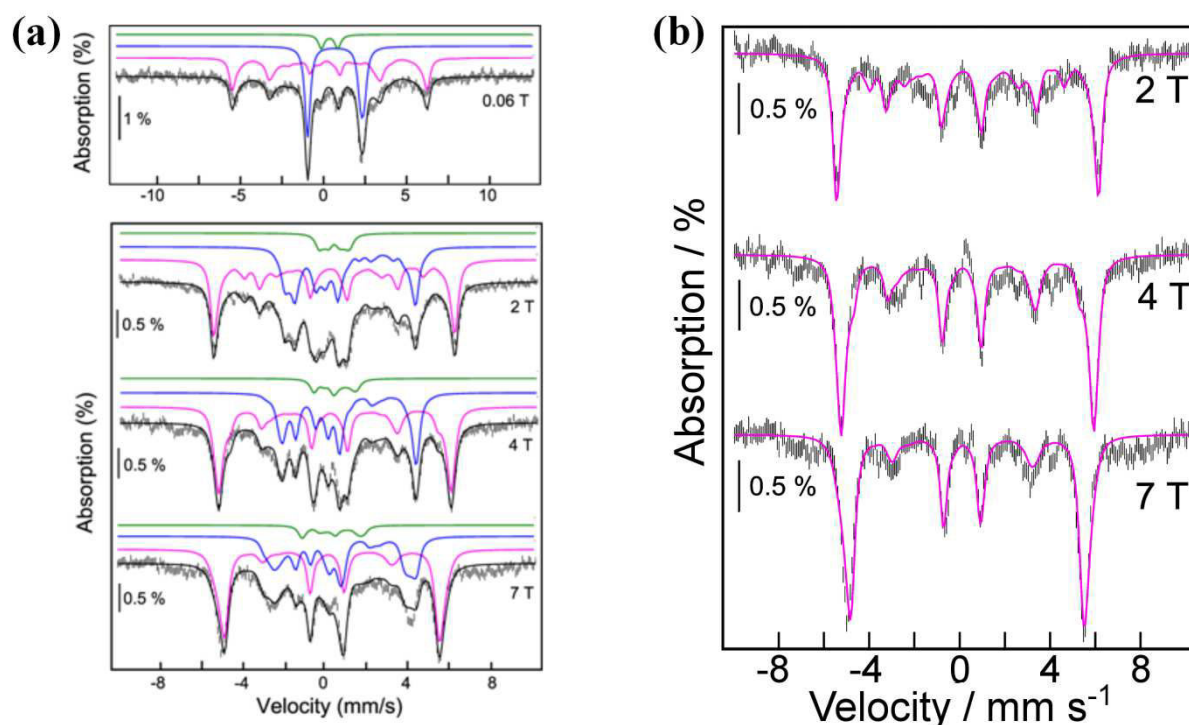


Figure 43 : (a) Spectres Mössbauer (barres verticales) d'une solution de $^{57}\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ (1,72 mM) en tampon HEPES (100 mM) à pH 7,55 après exposition à l'air en présence de TCEP (17,2 mM). Les spectres ont été enregistrés à 4,2 K avec différents champs magnétiques (0.06-7 T) appliqués parallèlement au rayonnement γ . Les spectres ont été déconvolués en trois composantes : $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ en bleu (41 %), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ en rose (51 %) et une impureté oxodiférrique en vert (6 %). (b) Spectres Mössbauer du complexe peptidique $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ expérimental (barres verticales) et théorique (en rose) obtenu après soustraction des spectres correspondant au complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ et à l'impureté.

Tableau 5 : Récapitulatif des paramètres de l'Hamiltonien de spin des complexes Fe-L_{ZR} et des formes oxydées et réduites de la rubredoxine de *Clostridium pasteurianum*.

		Fe ^{II} -L _{ZR}	Cp Rd _{red}	Fe ^{III} -L _{ZR}	Cp Rd _{ox}	
RPE	g_{eff}	–	–	9,17 ; 4,32	9,4 ; 4,3 ^{62,77}	
Mössbauer	δ /mm.s⁻¹	0,69	0,70 ⁷⁹	0,24	0,24 ⁷⁹	
	ΔE_Q /mm.s⁻¹	-3,24	-3,25	-0,5	-0,5	
	g_x, g_y, g_z	2,11 ; 2,19 ; 2,0	2,11 ; 2,19 ; 2,0	2,0 ; 2,0 ; 2,0	2,0 ; 2,0 ; 2,0	
	D /cm⁻¹	+7,6	+7,6	+1,9	+1,9	
	E/D	0,28	0,28	0,23	0,23	
	η	0,84	0,65	0,13	0,2	
	A_x, A_y, A_z/T		-18,8 ; -8,3 ;	-20,1 ; -8,3 ;	-15,8 ; -15,6 ;	-16 ; -15,9 ; -16,9
			-33,0	-30,1	-19,9	

2.4.2.3. Conclusions

L'analyse des données spectroscopiques démontrent que les structures électroniques des complexes Fe^{II}-L_{ZR} et Fe^{III}-L_{ZR} sont similaires à celles de la rubredoxine réduite ou oxydée de *Clostridium pasteurianum*.^{62,77,79} Cette forte similitude des structures électroniques ne peut s'expliquer que par l'existence d'environnements quasiment identiques. Le peptide L_{ZR} permet donc de reproduire de façon tout à fait remarquable le site de cette protéine.

2.4.3. Propriété redox du complexe Fe-L_{ZR}

Nous avons donc pu montrer que notre complexe Fe-L_{ZR} était un mime fidèle de la rubredoxine capable de reproduire la première sphère de coordination du métal avec la même orientation des cystéines et le même repliement du squelette peptidique autour du métal. Mais l'enjeu principal d'un modèle de rubredoxine est de pouvoir reproduire la réactivité redox de la protéine et comme nous avons pu le voir en introduction de cette partie peu de modèles de rubredoxine y sont parvenus. Les expériences précédentes ont montré que le complexe peptidique Fe^{III}-L_{ZR} est stable à l'air pendant 8 heures avec moins de 5% de diminution d'absorbance pendant ce laps de temps en présence de TCEP.

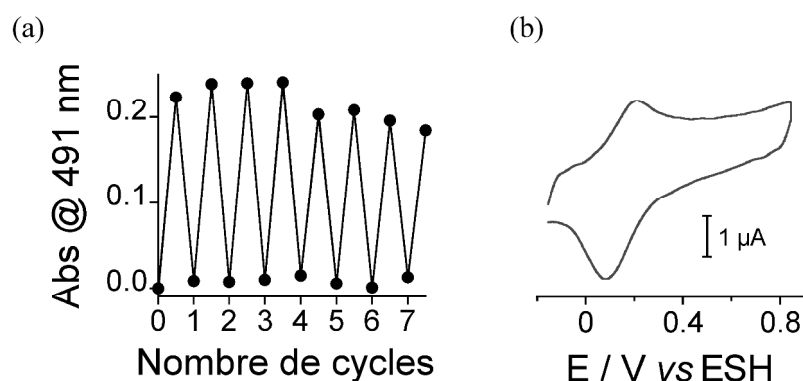


Figure 44 : (a) Cyclage redox de Fe-L_{ZR} (45 μM) dans un tampon HEPES (20 mM) à pH 7,5 suivi par absorption UV-Vis à 491 nm. (b) Voltammétrie cyclique de Fe^{II}-L_{ZR} dans un tampon HEPES (20 mM) à pH 7,2 (NaCl 100 mM, vitesse de balayage : 3 V.s⁻¹) à 298 K.

Nous avons mesuré le potentiel redox de Fe^{II}/Fe^{III}-L_{ZR} par voltammétrie cyclique en tampon HEPES à pH 7,2 sous atmosphère inerte (Figure 44b). Cette mesure n'a pas pu être faite sur une électrode d'or nue en présence ou en absence de médiateurs tels que la néomycine ou la poly-L-lysine qui sont couramment utilisés pour l'étude électrochimique de la rubrédoxine. Un voltammogramme a pu être obtenu quand l'électrode d'or était recouverte d'acide *p*-mercaptobenzoïque adsorbé à sa surface. Le couple Fe^{II}/Fe^{III}-L_{ZR} a été étudié à différentes vitesses de balayage allant de 0,1 à 3 V.s⁻¹, seul le voltammogramme obtenu avec une vitesse de balayage de 3 V.s⁻¹ est illustré en Figure 44b. Ces analyses montrent que le couple redox présente un comportement quasi-réversible avec un potentiel redox $E^{\circ} = 144$ mV vs SHE ($\Delta E_p = 140$ mV). Ce potentiel redox est plus élevé que ceux qui sont tabulés pour les rubrédoxines, entre -100 mV et + 50 mV vs SHE.^{62,80} Ceci peut s'expliquer par le fait que notre modèle peptidique possède un environnement plus hydrophile autour du centre Fe(Cys)₄ que le site de la rubrédoxine qui est, lui, très hydrophobe. En effet, il a déjà été montré que les chaînes latérales des acides aminés qui l'entourent peuvent moduler le potentiel redox du centre Fe(Cys)₄ de la rubrédoxine par leur orientation, leur nature ou leur capacité à laisser pénétrer l'eau au niveau du site actif.⁸⁰⁻⁸³ Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que la rubrérythrine qui possède un centre Fe(Cys)₄ comme la rubrédoxine mais dont la séquence est essentiellement constituée d'acides aminés polaires (Asn, His) a un potentiel redox plus élevé que la rubrédoxine, entre 180 et 280 mV vs SHE.^{84,85}

Nous avons également évalué l'activité redox de Fe-L_{ZR} de façon à voir si notre modèle était capable de reproduire la réactivité de la rubredoxine. Ainsi, nous avons cherché à réaliser plusieurs cycles d'oxydation / réduction que nous avons suivis par absorption à 491 nm. Pour cela, nous avons préparé une solution contenant le complexe réduit Fe^{II}-L_{ZR} (45 µM) en tampon HEPES 20 mM à pH 7,5 comme fait précédemment pour les analyses par absorption UV-Vis mais cette fois-ci nous nous sommes placés en présence de 1 mM de TCEP de façon à pouvoir effectuer un maximum de cyclage redox avant que le complexe ne soit détruit. Chaque cycle a été réalisé de la façon suivante : (i) la solution était exposée à l'air de façon à ce que le complexe soit presque totalement sous sa forme oxydée à savoir ≈ 95 % Fe^{III}-L_{ZR} pour la première oxydation comme l'atteste l'absorbance à 491 nm puis (ii) la solution était remplacée sous argon et le complexe était ensuite réduit par l'ajout de dithionite comme l'atteste la disparition de la bande d'absorption à 491 nm et la réapparition des bandes absorption caractéristiques de Fe^{II}-L_{ZR}. Cette opération a pu être reproduite sept fois (Figure 44a) avant que nous n'observions un précipité suite à l'ajout de dithionite. Nous avons également été à même de réaliser ces cycles successifs d'oxydo-réduction par simple purge sous argon, ce qui nous a permis de réaliser 5 cycles en 12 heures, le facteur limitant étant le temps de réduction du complexe.

2.4.4. Discussion : comparaison avec les autres modèles de rubredoxine

Ainsi, notre peptide, L_{ZR}, avec son repliement de type « zinc ribbon » nous a permis de former des complexes stables avec les ions ferreux et ferriques avec des données spectroscopiques très similaires à celles de la rubredoxine. De plus, il a été capable de mimer l'activité redox de la protéine en réalisant plusieurs cycles redox complets. En effet, parmi tous les modèles de rubredoxine présentés précédemment, seuls Trx[Rd]⁶⁷ et RM1⁷² ont été capables d'avoir une activité redox. Mais, ces modèles ont des tailles très proches de celle de la rubredoxine (40 acides aminés ou plus) et les cycles redox réalisés ne sont pas complets. Les plus petits modèles (≤ 11 acides aminés) qui ont été publiés ne sont quant à eux pas capables de stabiliser l'ion ferrique.⁶⁸⁻⁷¹ Ainsi, Fe-L_{ZR}, avec ses dix-huit acides aminés est le plus petit modèle fonctionnel de rubredoxine à avoir été publié. Grâce à cette petite taille, il sera possible d'étudier très facilement l'influence de la composition en acide aminé sur la

stabilité thermodynamique du complexe de façon à optimiser la stabilité de l'état ferrique et moduler le potentiel redox du complexe.

Un nouveau modèle basé sur la séquence de la rubrédoxine pourrait ainsi être envisagé de façon à recréer un environnement hydrophobe autour de l'ion ferrique et le stabiliser (Figure 45).

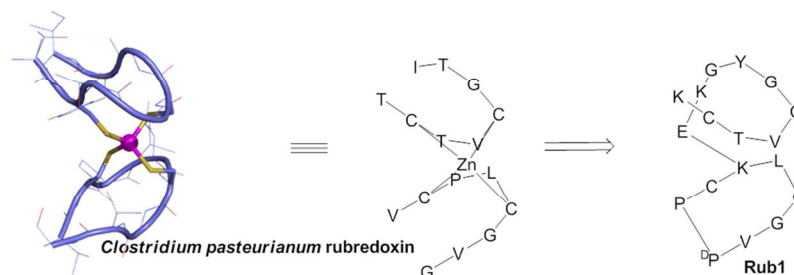


Figure 45 : Partie de la structure ^1H RMN de la rubrédoxine complexée au zinc de *Clostridium pasteurianum* (à gauche), sa représentation schématique (au milieu) et le modèle peptidique envisagé, Rub1 (à droite).

2.5. CONCLUSION

Ainsi, grâce à un peptide cyclique sur lequel est branchée une queue linéaire, nous avons été à même de reproduire très fidèlement le repliement des doigts de zinc de type « zinc ribbon » et du site actif de la rubrédoxine de *Clostridium pasteurianum*. Ce modèle adopte une conformation unique autour du métal qui permet de former des complexes 1:1 très stables thermodynamiquement avec les ions zinc et fer. Le complexe Fe-L_{ZR} s'est révélé être le modèle de rubrédoxine redox actif le plus petit et l'un des plus performants publiés à ce jour. Ce design va, par la suite, nous permettre d'étudier au sein du laboratoire la réactivité des doigts de zinc de type « zinc ribbon » vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène. Mais, plus particulièrement dans le cas présent, ce complexe peptidique va nous permettre d'étudier la réactivité des doigts de zinc avec des complexes d'or présentant un intérêt thérapeutique, comme le complexe d'or(III), $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ que nous allons étudier dans le chapitre suivant.

2.6. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Anzellotti, A. I.; Farrell, N. P. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1629–1651.
- (2) De Paula, Q. A.; Mangrum, J. B.; Farrell, N. P. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1347–1354.
- (3) Myers, L.; Terranova, M.; Ferentz, A.; Wagner, G.; Verdine, G. *Science* **1993**, *261*, 1164–1167.
- (4) Myers, L. C.; Verdine, G. L.; Wagner, G. *Biochemistry* **1993**, *32*, 14089–14094.
- (5) He, C.; Hus, J. C.; Sun, L. J.; Zhou, P.; Norman, D. P. G.; Dotsch, V.; Wei, H.; Gross, J. D.; Lane, W. S.; Wagner, G.; Verdine, G. L. *Mol. Cell* **2005**, *20*, 117–129.
- (6) Jagtap, P.; Szabo, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 421–440.
- (7) Peralta-Leal, A.; Rodriguez, M. I.; Oliver, F. J. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 318–323.
- (8) Schreiber, V.; Dantzer, F.; Ame, J.-C.; de Murcia, G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 517–528.
- (9) Mendes, F.; Groessel, M.; Nazarov, A. A.; Tsybin, Y. O.; Sava, G.; Santos, I.; Dyson, P. J.; Casini, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2196–2206.
- (10) Winter, J.; Ilbert, M.; Graf, P. C. F.; Oezcelik, D.; Jakob, U. *Cell* **2008**, *135*, 691–701.
- (11) Bombarda, E.; Grell, E.; Roques, B. P.; Mely, Y. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 208–217.
- (12) Bombarda, E.; Morellet, N.; Cherradi, H.; Spiess, B.; Bouaziz, S.; Grell, E.; Roques, B. P.; Mely, Y. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 659–672.
- (13) Petros, A. K.; Reddi, A. R.; Kennedy, M. L.; Hyslop, A. G.; Gibney, B. R. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9941–9958.
- (14) Reddi, A. R.; Gibney, B. R. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3745–3758.
- (15) Reddi, A. R.; Guzman, T. R.; Breece, R. M.; Tiemey, D. L.; Gibney, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12815–12827.
- (16) Buchsbaum, J. C.; Berg, J. M. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *297*, 217–219.
- (17) Roehm, P. C.; Berg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13083–13087.
- (18) Krizek, B. A.; Merkle, D. L.; Berg, J. M. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 937–940.
- (19) Krizek, B. A.; Berg, J. M. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2984–2986.
- (20) Zawadzke, L. E.; Berg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4002–4003.
- (21) Krizek, B. A.; Amann, B. T.; Kilfoil, V. J.; Merkle, D. L.; Berg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518–4523.
- (22) Berg, J. M.; Merkle, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3759–3761.
- (23) Frankel, A. D.; Berg, J. M.; Pabo, C. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 4841–4845.
- (24) Bal, W. C.; Schwerdtle, T.; Hartwig, A. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 242–248.
- (25) Kopera, E.; Schwerdtle, T.; Hartwig, A.; Bal, W. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1452–1458.
- (26) Piatek, K.; Schwerdtle, T.; Hartwig, A.; Bal, W. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 600–606.
- (27) Smirnova, J.; Zhukova, L.; Witkiewicz-Kucharczyk, A.; Kopera, E.; Oledzki, J.; Wyslouch-Cieszynska, A.; Palumaa, P.; Hartwig, A.; Bal, W. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 386–392.

-
- (28) Lachenmann, M. J.; Ladbury, J. E.; Phillips, N. B.; Narayana, N.; Qian, X. Q.; Stern, A. S.; Weiss, M. A. *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 969–989.
- (29) Heinz, U.; Kiefer, M.; Tholey, A.; Adolph, H. W. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3197–3207.
- (30) Rich, A. M.; Bombarda, E.; Schenk, A. D.; Lee, P. E.; Cox, E. H.; Spuches, A. M.; Hudson, L. D.; Kieffer, B.; Wilcox, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10405–10418.
- (31) Lee, S. J.; Michalek, J. L.; Besold, A. N.; Rokita, S. E.; Michel, S. L. *J. Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 5442–5450.
- (32) Lee, S. J.; Michel, S. L. *J. Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 1211–1219.
- (33) Morelli, M. A. C.; Ostuni, A.; Cristinziano, P. L.; Tesaro, D.; Bavoso, A. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 227–232.
- (34) Sénèque, O.; Bonnet, E.; Joumas, F. L.; Latour, J.-M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4798–4810.
- (35) Duarte, V.; Latour, J.-M. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 316–323.
- (36) Traore, D. A. K.; El Ghazouani, A.; Ilango, S.; Dupuy, J.; Jacquamet, L.; Ferrer, J.-L.; Caux-Thang, C.; Duarte, V.; Latour, J.-M. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 1211–1219.
- (37) Janda, I.; Devedjiev, Y.; Derewenda, U.; Dauter, Z.; Bielnicki, J.; Cooper, D. R.; Graf, P. C. F.; Joachimiak, A.; Jakob, U.; Derewenda, Z. S. *Structure* **2004**, *12*, 1901–1907.
- (38) Kumsta, C.; Jakob, U. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4666–4676.
- (39) Bourlès, E.; Isaac, M.; Lebrun, C.; Latour, J.-M.; Sénèque, O. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13762–13772.
- (40) Isaac, M.; Latour, J.-M.; Sénèque, O. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3409–3420.
- (41) Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G. *PLoS One* **2011**, *6*, e26325.
- (42) Favre, M.; Moehle, K.; Jiang, L. Y.; Pfeiffer, B.; Robinson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2679–2685.
- (43) Sénèque, O.; Bourlès, E.; Lebrun, V.; Bonnet, E.; Dumy, P.; Latour, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6888–6891.
- (44) Sénèque, O.; Latour, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17760–17774.
- (45) Cramer, P.; Bushnell, D. A.; Fu, J. H.; Gnatt, A. L.; Maier-Davis, B.; Thompson, N. E.; Burgess, R. R.; Edwards, A. M.; David, P. R.; Kornberg, R. D. *Science* **2000**, *288*, 640–649.
- (46) Laity, J. H.; Lee, B. M.; Wright, P. E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 39–46.
- (47) Krishna, S. S.; Majumdar, I.; Grishin, N. V. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 532–550.
- (48) Lovenberg, W.; Sobel, B. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1965**, *54*, 193–199.
- (49) Lovenberg, W.; Williams, W. M.; Bruckwick, E. C. *Biochemistry* **1969**, *8*, 141–148.
- (50) Dauter, Z.; Wilson, K. S.; Sieker, L. C.; Moulis, J. M.; Meyer, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 8836–8840.
- (51) deMare, F.; Kurtz, D. M.; Nordlund, P. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 539–546.
- (52) Dave, B. C.; Czernuszewicz, R. S.; Prickril, B. C.; Kurtz, D. M. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3572–3576.
- (53) Wang, B.; Jones, D. N. M.; Kaine, B. P.; Weiss, M. A. *Struct. Fold. Des.* **1998**, *6*, 555–569.
- (54) Chatterjee, B.; Saha, I.; Raghobama, S.; Aravinda, S.; Rai, R.; Shamala, N.; Balaram, P. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6192–6204.
- (55) Edelhoch, H. *Biochemistry* **1967**, *6*, 1948–1954.
- (56) Jacques, A.; Mettra, B.; Lebrun, V.; Latour, J.-M.; Sénèque, O. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3921–3931.
- (57) Boturnyn, D.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787–2790.
-

- (58) Carpino, L. A.; Krause, E.; Sferdean, C. D.; Bienert, M.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1361–1364.
- (59) Smith, R. M.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J. *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*; NIST Standard Reference Database; National Institute of Standards and Technology: Gaithersbyrg, 2001.
- (60) Brünger, A. T. *X-Plor Version 3.1: A System for X-Ray Crystallography and NMR*; Yale University Press: New Heaven, CT, 1992.
- (61) Adman, E.; Watenpaugh, K. D.; Jensen, L. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 4854–4858.
- (62) Meyer, J.; Moulis, J.-M. In *Handbook of Metalloproteins*; Messerschmidt, A.; Huber, R.; Poulos, T.; Weighart, K., Eds.; Wiley, Chichester, 2001.
- (63) Gebhard, M. S.; Koch, S. A.; Millar, M.; Devlin, F. J.; Stephens, P. J.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1640–1649.
- (64) Maelia, L. E.; Millar, M.; Koch, S. A. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4594–4600.
- (65) Millar, M.; Lee, J. F.; OSullivan, T.; Koch, S. A.; Fikar, R. *Inorg. Chim. Acta* **1996**, *243*, 333–343.
- (66) Farinas, E.; Regan, L. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1939–1946.
- (67) Benson, D. E.; Wisz, M. S.; Liu, W.; Hellinga, H. W. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7070–7076.
- (68) Lombardi, A.; Marasco, D.; Maglio, O.; Di Costanzo, L.; Nasti, F.; Pavone, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11922–11927.
- (69) Sun, W.-Y.; Ueyama, N.; Nakamura, A. *Biopolymers* **1998**, *46*, 1–10.
- (70) Sun, W. Y.; Ueyama, N.; Nakamura, A. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4026–4031.
- (71) Ueyama, N.; Nakata, M.; Nakamura, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 1727–1730.
- (72) Nanda, V.; Rosenblatt, M. M.; Osyczka, A.; Kono, H.; Getahun, Z.; Dutton, P. L.; Saven, J. G.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5804–5805.
- (73) Anglin, J. R.; Davison, A. *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 234–237.
- (74) Eaton, W. A.; Lovenberg, W. by W. Lovenberg, *Academic Press, New York and London* **1973**, *2*, 131.
- (75) Xiao, Z.; Lavery, M. J.; Ayhan, M.; Scrofani, S. D. B.; Wilce, M. C. J.; Guss, J. M.; Tregloan, P. A.; George, G. N.; Wedd, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4135–4150.
- (76) Kuzmann, E.; Homonnay, Z.; Nagy, S.; Nomura, K. In *Handbook of Nuclear Chemistry*; Vértes, A.; Nagy, S.; Klencsár, Z.; Lovas, R.; Rösch, F., Eds.; Springer US, 2011; pp. 1379–1446.
- (77) Börger, B.; Suter, D. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 9821–9826.
- (78) Peisach, J.; Blumberg, W. E.; Lode, E. T.; Coon, M. J. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 5877–5881.
- (79) Wegner, P.; Bever, M.; Schünemann, V.; Trautwein, A. X.; Schmidt, C.; Bönisch, H.; Gnida, M.; Meyer-Klaucke, W. *Hyperfine Interact.* **2004**, *156*, 293–298.
- (80) Eidsness, M. K.; Burden, A. E.; Richie, K. A.; Kurtz; Scott, R. A.; Smith, E. T.; Ichiye, T.; Beard, B.; Min, T.; Kang, C. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14803–14809.
- (81) Ergenekan, C. E.; Thomas, D.; Fischer, J. T.; Tan, M. L.; Eidsness, M. K.; Kang, C. H.; Ichiye, T. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2818–2829.
- (82) Sulpizi, M.; Raugei, S.; VandeVondele, J.; Carloni, P.; Sprik, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 3969–3976.
- (83) Perrin, B. S.; Ichiye, T. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 103–110.

- (84) Pierik, A.; Wolbert, R.; Portier, G.; Verhagen, M.; Hagen, W. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 237–245.
- (85) Pinto, A. F.; Todorovic, S.; Hildebrandt, P.; Yamazaki, M.; Amano, F.; Igimi, S.; Romao, C. V.; Teixeira, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 501–510.

CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'INTERACTION D'UN COMPLEXE D'OR(III), Au^{III}TERPY, AVEC UN MODELE PEPTIDIQUE DE DOIGT DE ZINC, Zn^{II}-L_{ZR}

Sommaire :

3.1. Introduction	80
3.2. Réaction directe d'Au^{III}Terpy avec Zn^{II}-L_{ZR}	82
3.2.1. Cinétique de réaction	90
3.3. Influence des thiols libres sur la réactivité d'Au^{III}Terpy	91
3.3.1. Réactivité de l'Au ^{III} Terpy avec les thiols libres	92
3.3.2. Réaction d'Au ^{III} Terpy avec Zn ^{II} -L _{ZR} en présence de thiols libres	95
3.4. Discussion	100
3.4.1. Réactivité du complexe Au ^{III} Terpy avec les doigts de zinc	100
3.4.2. Comparaison avec d'autres études sur l'interaction des complexes d'Au ^{III} avec les doigts de zinc	101
3.4.3. Pertinence biologique	106
3.5. Conclusions et perspectives	106
3.6. Bibliographie	108

3.1. INTRODUCTION

Nous avons vu précédemment que les complexes d'Au^{III} possèdent des activités cytotoxiques importantes *in vitro* voire même *in vivo* pour certains d'entre eux vis-à-vis des cellules tumorales. En particulier, les complexes d'Au^{III} à ligands azotés se sont révélés être de puissants agents cytotoxiques *in vitro* des cellules tumorales d'ovaires humains A2780 sensibles et résistantes au cis-platine.¹ Il a été proposé que cette activité cytotoxique des complexes d'Au^{III} à ligands azotés provienne de leur interaction avec différentes protéines qui ont été évoquées au cours du chapitre d'introduction. Notamment, les travaux de Casini et de Farrell ont pu mettre en évidence que la réaction entre ces complexes d'Au^{III} à ligands azotés avec des peptides modèles de doigts de zinc conduisent à la décomplexation du zinc associée à la complexation de différents équivalents d'Au^{I/III} et à une oxydation des peptides.^{2,3}

Dans ce chapitre, nous allons étudier la réactivité d'un complexe d'Au^{III} à ligands azotés avec Zn^{II}-LZR, le peptide doigt de zinc de type « zinc ribbon » caractérisé précédemment. Le but de ce travail a été de caractériser les espèces formées au cours de la réaction par ESI-MS mais également par absorption UV-Vis, CD et HPLC. Nous avons également cherché à déterminer la cinétique de cette réaction afin de voir si elle a un sens physiologique.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec A. Casini qui nous a envoyé deux complexes d'or(III) à ligands azotés (Figure 46), [Au^{III}(Terpy)Cl]Cl₂ et [Au^{III}(Phen)Cl₂]Cl qui ont révélé des activités cytotoxiques importantes *in vitro* vis-à-vis des cellules tumorales d'ovaires humains A2780 sensibles et résistantes au cis-platine. Pour notre étude de l'interaction des complexes d'or(III) avec les peptides de type doigts de zinc, nous avons choisi d'utiliser le complexe Au^{III}Terpy qui s'est révélé être le plus cytotoxique *in vitro*¹ et qui présente l'avantage de posséder des bandes de transfert de charge N→Au^{III} intenses et bien définies dans le visible ($\lambda_{\text{max}} = 350$ et 367 nm, Figure 46(a)) contrairement à Au^{III}Phen pour lequel ces bandes d'absorption sont moins intenses et moins bien définies (Figure 46(b)). De plus, le ligand terpyridine présente également l'avantage d'avoir des bandes d'absorption caractéristiques lorsqu'il est libre en solution (bande large à $\lambda_{\text{max}} = 290$ nm) et lorsqu'il est complexé au Zn²⁺ (Figure 46). Suivant la quantité de Zn²⁺ présente en solution, deux

complexes Zn^{II} /terpyridine peuvent coexister : le complexe $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{Terpy})_2$ ($\lambda_{\text{max}} = 320$ et 334 nm) obtenu avec de faibles quantités de Zn^{2+} ($n_{\text{eq}} < 0,5$ éq.) et le complexe $[\text{Zn}^{\text{II}}(\text{Terpy})\text{Cl}_2]$ ($\lambda_{\text{max}} = 319$ et 330 nm) qui commence à se former après $0,5$ éq. de Zn^{2+} (Figure 47).

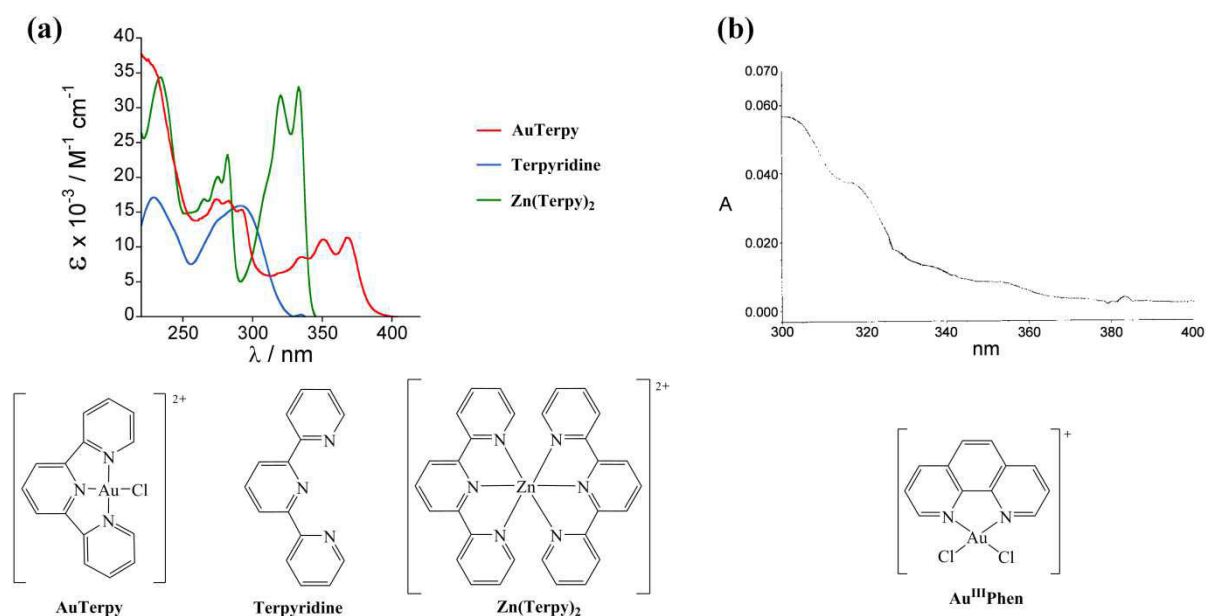


Figure 46 : En haut, spectres d'absorbance (a) d' $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ (en rouge), de la terpyridine (en bleu) et de $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{Terpy})_2$ (en vert) en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et 298 K et (b) d' $\text{Au}^{\text{III}}\text{Phen}$ (7,5 μM) en tampon physiologique (tampon phosphate 50 mM, NaCl 4 mM à pH 7,4), d'après Messori *et al.*⁴ En bas, formules chimiques de ces composés.

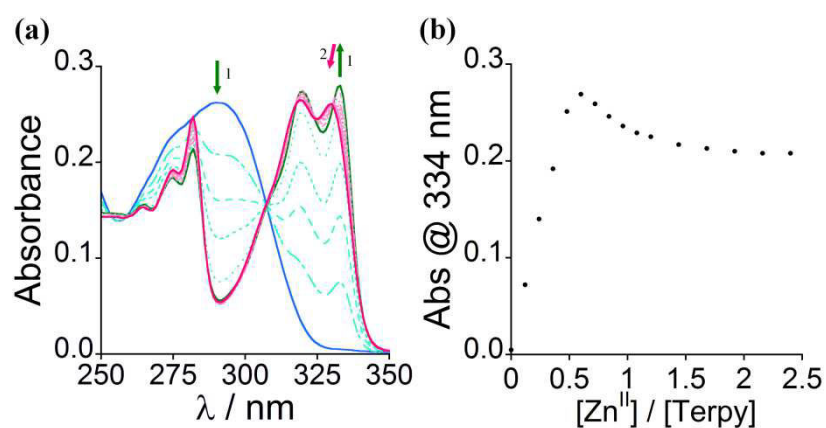


Figure 47 : (a) Titrage UV-Vis de la terpyridine (17 μM) par $\text{Zn}^{\text{II}}\text{Cl}_2$. Les spectres représentés en traits pleins correspondent aux spectres de la terpyridine (en bleu) et des complexes $[\text{Zn}^{\text{II}}(\text{Terpy})_2]^{2+}$ (en vert) et $[\text{Zn}^{\text{II}}(\text{Terpy})\text{Cl}_2]$ (en rose). (b) Suivi de l'absorbance à 334 nm en fonction du nombre d'équivalents d' $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ ajoutés. Les analyses ont été effectuées en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et à 298 K. Les spectres ont été corrigés de la dilution.

Ce complexe Au^{III}Terpy a été développé par Lippard *et al.*⁵ et a été très étudié par Messori *et al.*^{1,4} Il est soluble et stable en solution aqueuse. Cependant, avec son potentiel d'oxydoréduction de +0,62 V vs NHE, l'Au^{III}Terpy est rapidement réduit en milieu réducteur ; ceci a été montré en présence d'ascorbate ou de thiosulfate avec lesquels on observe la rapide réduction du complexe Au^{III}Terpy par la perte des bandes LMCT dans le visible.¹ Or, les cellules possèdent un fort potentiel réducteur dû essentiellement à la présence de glutathion (GSH) à des concentrations de l'ordre du millimolaire⁶ mais également dans une plus faible mesure à la présence de thiorédoxine (concentration de l'ordre du micromolaire).⁷ Le glutathion possède un potentiel d'oxydo-réduction de -0,263 V vs NHE⁸ et est connu pour réduire les complexes d'Au^{III}.⁹⁻¹⁴ Ainsi, dans la cellule, il est possible que l'Au^{III}Terpy soit réduit par le GSH avant même qu'il ne réagisse avec les facteurs de transcription à doigts de zinc du fait de la forte concentration de ce thiol. Il est donc nécessaire de vérifier la stabilité du complexe Au^{III}Terpy en milieu réducteur et de voir si sa réactivité est modifiée aussi bien au niveau de la nature des produits formés que de la cinétique de réaction.

3.2. REACTION DIRECTE D'Au^{III}TERPY AVEC Zn^{II}-LZR

Dans un premier temps, nous avons étudié la réactivité entre le complexe peptidique Zn^{II}-LZR et le complexe Au^{III}Terpy en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. Pour cela, nous avons réalisé un titrage de Zn^{II}-LZR (20 µM) par le complexe Au^{III}Terpy que nous avons suivi par UV-Vis (Figure 48). Nous observons alors l'augmentation de la bande à 331 nm caractéristique de la formation du complexe Zn^{II}(Terpy)_n (n = 1 et 2) en solution. On note également l'absence des bandes à 350 et 367 nm caractéristiques du complexe Au^{III}Terpy, signe que celui-ci est entièrement consommé en début de réaction. Il ne commence à s'accumuler qu'après l'ajout de 1,5 équivalent. La réaction nécessite environ deux équivalents d'Au^{III}Terpy pour qu'elle soit finie comme le montre l'intersection des asymptotes sur le titrage de la Figure 48(b). Ceci nous indique que le complexe Au^{III}Terpy est capable de réagir avec le complexe peptidique Zn^{II}-LZR et de conduire à la décomplexation du zinc. L'analyse du milieu réactionnel en présence d'un excès d'Au^{III}Terpy (3 eq.) par dichroïsme circulaire (Figure 48) confirme bien la décomplexation du zinc avec la disparition des bandes négative à 209 nm, positive à 224 nm et négative à 234 nm caractéristiques du complexe Zn^{II}-LZR. De

plus, la perte de la bande positive à 200 nm est significative d'un peptide moins bien replié. Cependant, le signal ne correspond pas à celui du peptide libre réduit L_{ZR}, signe d'une modification du peptide sous l'action de l'Au^{III}.

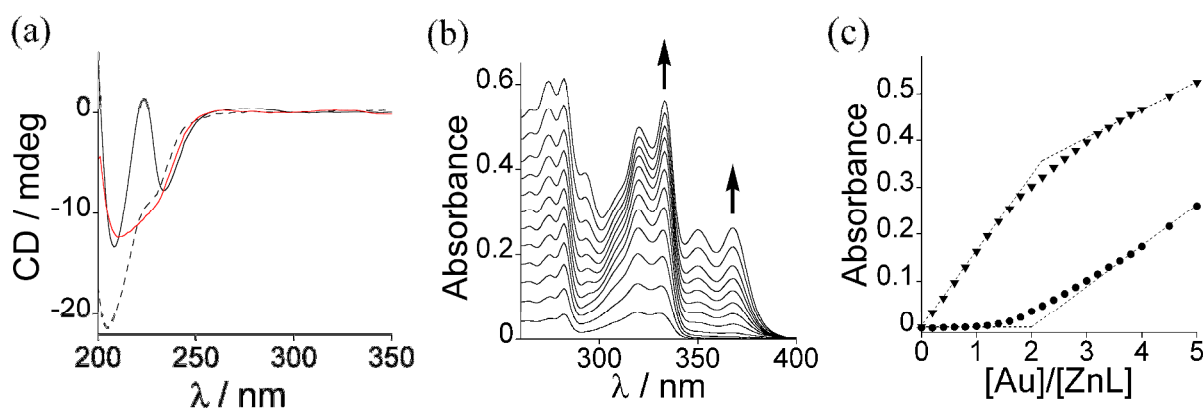


Figure 48 : (a) Spectres CD de L_{ZR} (en pointillés noirs), Zn^{II}-L_{ZR} (en trait plein noir) et du produit obtenu (en trait plein rouge) après réaction de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) avec Au^{III}Terpy (60 μM) (en rouge). (b) Titration UV-Vis de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) par Au^{III}Terpy. (c) Suivi de l'absorbance à 367 nm (●) et 331 nm (▼) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^{III}Terpy ajouté. Les analyses ont été effectuées en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et à 298 K. Les spectres ont été corrigés de la dilution et pour (b) le spectre de Zn^{II}-L_{ZR} a été soustrait de chaque spectre.

Finalement, l'analyse par ESI-MS en fin de réaction du milieu réactionnel confirme bien la présence de Zn^{II}(Terpy)_n (n = 1 ou 2) avec m/z = 265,1 ([M+2H]²⁺ pour n = 2) et m/z = 366,9 ([Zn^{II}(Terpy)Cl₂+H]⁺ pour n = 1) et montre la présence de pics de masse m/z = 652,9 ([M+3H]³⁺), 979,1 ([M+2H]²⁺) et 1956,8 ([M+H]⁺) significatifs de la présence de peptide oxydé sous forme de bis-disulfures L_{ZR}(S-S,S-S). Ainsi, la réaction entre Zn^{II}-L_{ZR} et Au^{III}Terpy est une réaction d'oxydoréduction qui conduit à la formation de peptide oxydé sous forme de bis-disulfures L_{ZR}(S-S,S-S) par réduction de deux équivalents d'Au^{III}. Ceci induit la décomplexation du Zn^{II} qui forme un complexe avec le ligand terpyridine.

Afin de vérifier ces résultats, nous avons étudié la réaction inverse, c'est-à-dire entre le complexe Au^{III}Terpy en excès et Zn^{II}-L_{ZR} par absorption UV-Vis en tampon phosphate à pH 7,0. Pour cela, nous avons suivi la décroissance de l'absorbance à 367 nm caractéristique du complexe Au^{III}Terpy (30 μM) quand 0,22 équivalent de Zn^{II}-L_{ZR} est ajouté. On observe dans le temps de mélange une diminution d'environ 25 % de l'absorbance à 367 nm (Figure 49). Puis l'absorbance continue de diminuer lentement jusqu'à atteindre environ 50 à 55 % de

l'absorbance initiale après environ 4h d'analyse (Figure 49). Ceci nous indique que deux réactions successives ont lieu avec des temps de réaction très différents.

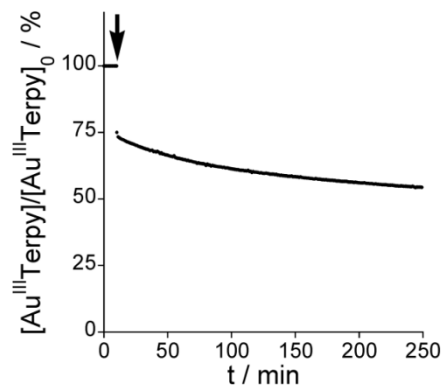


Figure 49 : Evolution de la concentration en Au^{III}Terpy après ajout de Zn^{II}-LZR (6,5 μM) sur 30 μM d'Au^{III}Terpy en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. L'évolution de la concentration a été observée par UV-Vis en suivant l'évolution de l'absorbance à 367 nm (trajet optique = 1 cm). La flèche indique le moment où l'addition du complexe Zn^{II}-LZR a été effectuée.

Afin d'identifier ces deux étapes, nous avons donc réalisés deux titrages du complexe Au^{III}Terpy par Zn^{II}-LZR. L'un « rapide » (Figure 50 (a)), où on ne laissait pas de temps entre l'ajout de Zn^{II}-LZR et l'enregistrement du spectre UV-Vis afin que la deuxième étape n'ait pas le temps de se faire, et l'autre « lent » (Figure 50 (b)), où on laisse un délai suffisant entre l'ajout de Zn^{II}-LZR et l'enregistrement du spectre UV-Vis afin que la deuxième réaction ait le temps d'aller à son terme.

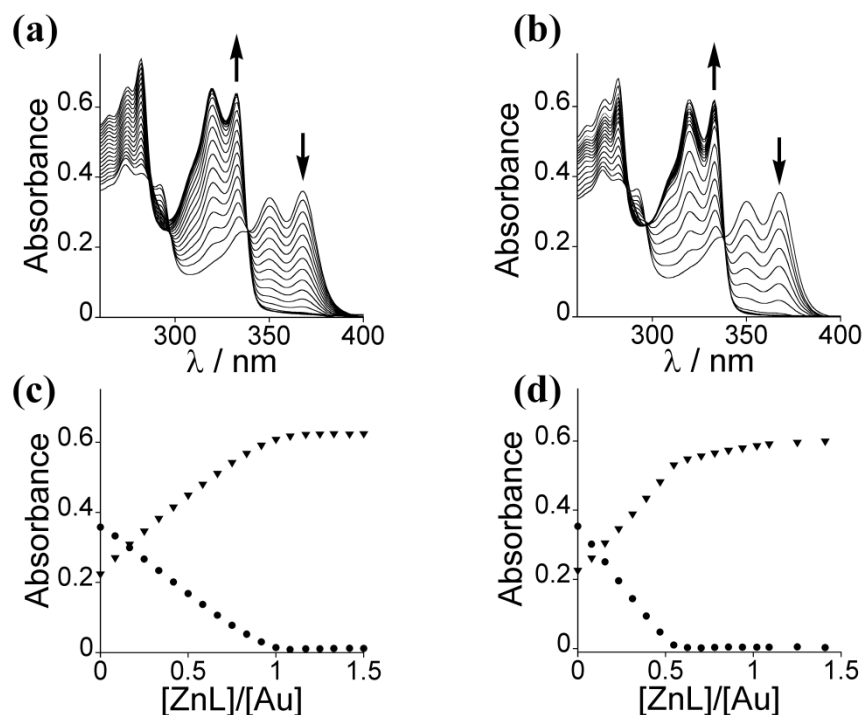
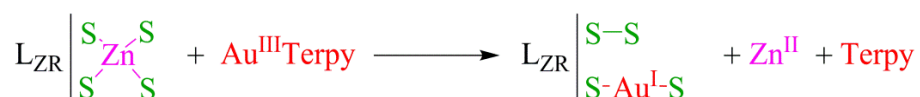


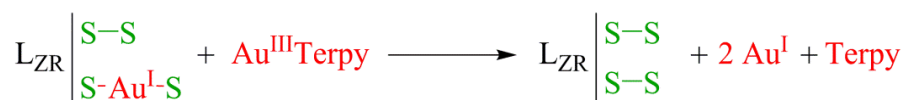
Figure 50 : Titrages par UV-Vis « rapides » (a et c) et « lents » (b et d) d'Au^{III}Terpy (32 μM) par Zn^{II}-L_{ZR} en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K (chemin optique = 1 cm). Le titrage « rapide » (a et c) a été effectué sans attente entre l'ajout de Zn^{II}-L_{ZR} et l'enregistrement. Le titrage « lent » (b et d) a été effectué en laissant un délai suffisant entre l'ajout de Zn^{II}-L_{ZR} et l'enregistrement du spectre UV-Vis pour que le système soit équilibré. (c et d) Suivi de l'absorbance à 367 nm (●) et 331 nm (▼) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^{III}Terpy ajouté. Les spectres ont été corrigés de la dilution.

Pour le titrage « rapide », on observe la disparition du complexe Au^{III}Terpy caractérisé par les bandes à 367 nm et 350 nm et l'apparition concomitante du complexe Zn^{II}(Terpy)_n (n = 1 ou 2) caractérisé par la bande à 331 nm jusqu'à environ un équivalent de Zn^{II}-L_{ZR}. L'analyse du milieu réactionnel en fin de titrage par spectrométrie de masse montre un pic de masse à m/z = 1075,3 ([M - H]⁻²) avec M = [C₈₃H₁₂₆N₂₄O₂₃S₄Au]⁻. Ce pic peut être attribué à la fois au complexe L_{ZR}(S-S,S-Au^I-S), contenant un disulfure et un ion aureux coordonné à deux thiolates, ou au complexe Au^{III}-L_{ZR} où l'ion aurique serait coordonné aux quatre thiolates des cystéines. Cependant, on peut très fortement douter de l'existence d'un tel complexe. En effet, (i) les complexes homoleptiques Au^{III}-(SR)₄ sont rares et n'ont été caractérisés que pour des ligands thiolates déficients en électron (ex : R = C₆F₅). Ils peuvent être stabilisés à l'état solide mais ils sont très instables en solution où ils se décomposent sous la forme d'oligomères (Au^I-SR)_n et de disulfures.^{15,16} De plus, (ii) de tels complexes

homoleptiques Au^{III}-(SR)₄ présentent une couleur rouge intense du fait de la présence de bandes de transferts de charges du ligand vers l'ion aurique, or nous n'avons pas observé de bandes similaires au cours du titrage. Finalement, (iii) le complexe Au^{III}Terpy présente un potentiel redox de +0,62 V / NHE¹ tandis que le couple RSSR / RSH possède un potentiel d'oxydoréduction compris entre -0,3 V et -0,2 V / NHE⁸ ce qui va bien dans le sens d'une réaction d'oxydoréduction entre les thiols des cystéines et Au^{III}Terpy conduisant à la formation de disulfures et d'Au^I. Ainsi, dans notre complexe peptidique Zn^{II}-LZR, cette réaction conduit à la décomplexation de l'ion zinc du peptide et à la formation du complexe Zn^{II}(Terpy)_n (n = 1 ou 2). Ceci conduit également à l'oxydation de deux des thiolates coordonnés au zinc par Au^{III}Terpy et à la complexation de l'ion aureux ainsi formé sur les deux thiolates restant :



Pour le titrage « lent », on observe une fois encore la disparition du complexe Au^{III}Terpy au profit de l'apparition du complexe Zn^{II}(Terpy)_n (n = 1 ou 2) mais cette fois-ci jusqu'à environ 0,5 équivalent de Zn^{II}-LZR ajouté. L'analyse par ESI-MS du mélange réactionnel en fin de titrage révèle la présence de pics de masse à m/z = 978,3 ([M+2H]²⁺) et 989,3 ([M+Na+H]²⁺) qui sont caractéristiques de la présence du peptide L_{ZR}(S-S,S-S) oxydé sous la forme de bis-disulfures (M = C₈₃H₁₂₆N₂₄O₂₃S₄). Ainsi, la seconde étape « lente » de la réaction correspond à l'oxydation de l'unité S-Au^I-S du complexe L_{ZR}(S-S,S-Au^I-S) en disulfure par Au^{III}Terpy :



Afin de vérifier que la réaction n'était pas due à la décomplexation préalable du zinc par chélation au ligand terpyridinique suivie de l'oxydation par l'Au^{III} libre en solution, nous avons réalisé un suivi dans le temps par UV-Vis du complexe peptidique Zn^{II}-LZR (23 μM) en présence de 1 à 3 équivalents de terpyridine libre. Le seul signal UV-Vis que nous avons observé est celui de la terpyridine libre (bande large à 290 nm) sans apparition des bandes caractéristiques de l'apparition du complexe Zn^{II}(Terpy)_n (331 nm).

Nous avons également cherché à confirmer l'oxydation du complexe Zn^{II}-L_{ZR} sous forme de bis-disulfures par HPLC. Afin d'identifier clairement l'apparition de bis-disulfures au cours de la réaction entre Zn^{II}-L_{ZR} et Au^{III}Terpy, nous avons tout d'abord déterminé les temps de rétention du complexe peptidique et du peptide oxydé. Il faut savoir que, dans le milieu acide de la HPLC, le Zn^{II} est décomplexé du peptide réduit L_{ZR} qui possède alors un temps de rétention $t_r = 23,0$ min (Figure 52(a)). Pour obtenir le peptide oxydé, nous avons procédé à l'oxydation de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μ M) par H₂O₂ (2,5 mM) en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0. Après une journée de réaction, le peptide est totalement oxydé et on observe trois nouveaux pics en HPLC avec des temps de rétention $t_r = 19,7$; 20,4 et 22,4 min (Figure 52(b)) qui correspondent aux trois isomères bis-disulfures de L_{ZR} (Figure 51). Le pic majoritaire à 22,4 min correspond à l'isomère où les disulfures se forment entre les deux cystéines du même motif CXXC. La terpyridine, ainsi que ses complexes avec l'Au^{III} et le Zn^{II}, ont quant à eux un temps de rétention inférieur $t_r = 12,0$ min.

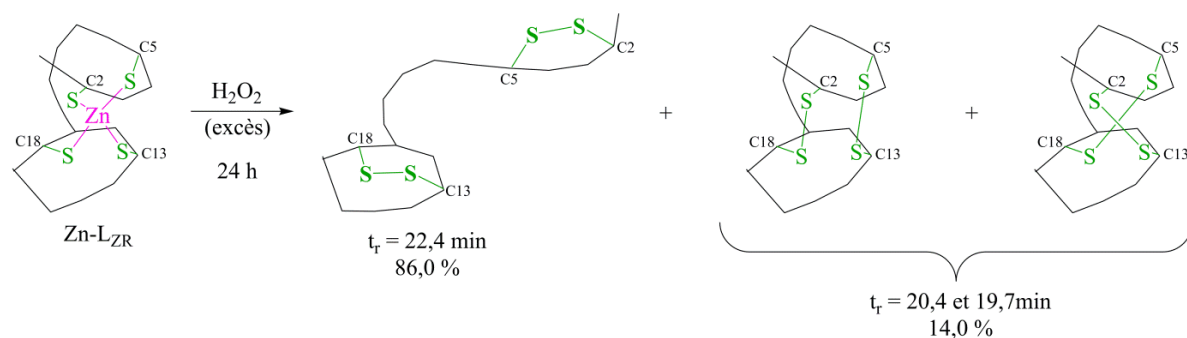


Figure 51 : Oxydation de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μ M) par H₂O₂ (2,5 mM) en tampon phosphate 50 mM à pH 7,0 et 298 K. Les trois isomères L_{ZR}(S-S, S-S) sont représentés avec leur temps de rétention et leurs pourcentages respectifs déterminés par HPLC.

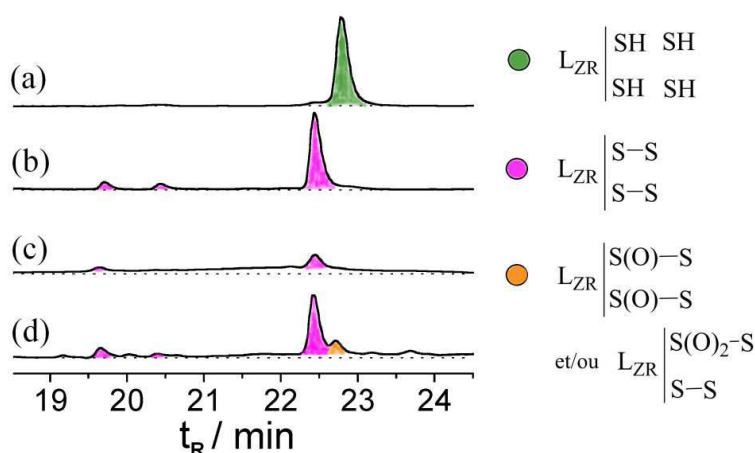


Figure 52 : Chromatogrammes obtenus par HPLC analytique de (a) L_{ZR} (20 μM), (b) des trois isomères bis-disulfures obtenus par oxydation de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) par H₂O₂ (10 mM) et des produits obtenus après réaction de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) avec Au^{III}Terpy (60 μM) (c) suivi de l'addition de thiourée (50 mM) juste avant l'injection (d).

Lorsqu'on injecte directement en HPLC le milieu réactionnel contenant Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) et Au^{III}Terpy (60 μM) en tampon phosphate 20 mM pH 7,0, on observe deux petits pics à $t_r = 19,7$ et $22,4$ min correspondant à deux des isomères bis-disulfures de L_{ZR}. Sous ces deux pics, on observe également la présence d'une bosse très large qui s'étend sur des temps de rétention allant de 18 à 25 minutes (Figure 52(c)). Cette bosse augmente au fur et à mesure des ajouts d'Au^{III}Terpy sur le complexe. Ceci peut être lié à la formation d'interactions non spécifiques avec l'Au^I. Pour remédier à ce problème, nous avons choisi d'utiliser un ligand capable de complexer l'Au^I formé en excès. Cependant, il fallait éviter les phosphines, telles que le TCEP, car elles sont également capables de réduire les disulfures ce qui fausserait le résultat. Nous avons donc opté pour l'utilisation de la thiourée, une thione pour laquelle il a déjà été montré qu'elle était capable de se complexer à l'Au^I (Figure 15).¹⁷ Afin de ne pas gêner la réaction, la thiourée est ajoutée au milieu réactionnel après que la réaction entre le complexe peptidique et le complexe d'Au^{III} ait eu lieu. Ceci nous a bien permis de retrouver une ligne de base correcte et des pics fins en HPLC (Figure 52(d)).

Nous avons donc réalisé le titrage du complexe peptidique Zn^{II}-L_{ZR} en ajoutant un nombre croissant d'équivalents d'Au^{III}Terpy dans ces conditions. Au cours de ce titrage, on observe bien la disparition du pic correspondant au peptide réduit ($t_r = 23,0$ min) ainsi que l'apparition progressive des trois isomères oxydés L_{ZR}(S-S,S-S) ($t_r = 19,7 ; 20,4$ et $22,4$ min)

(Figure 53), ce qui confirme bien les résultats obtenus précédemment par spectroscopie UV-Vis. On observe également l'apparition d'une espèce intermédiaire à $t_r = 21,5$ min qui présente un maximum quand un équivalent d'Au^{III}Terpy est ajouté au complexe peptidique Zn^{II}-LZR confirmant bien l'existence d'une réaction en deux étapes. Cette espèce a été caractérisée par ESI-MS comme étant le complexe peptidique LZR(S-S,S-Au^I-S) ($m/z = 539,0$ $[M+5H]^{4+}$ et $1077,7$ $[M+4H]^{3+}$, pas de zooms scan avec $M = [C_{83}H_{126}N_{24}O_{23}S_4Au]^-$). En fin de titrage, on observe également la formation d'une autre espèce à $t_r = 22,7$ min (Figure 53). Cette espèce a été collectée et analysée par spectrométrie de masse, il présente un pic de masse à $m/z = 994,4$ ($[M+2H]^{2+}$ avec $M = C_{83}H_{126}N_{24}O_{25}S_4$) qui correspond à une augmentation de +32 en masse par rapport au peptide oxydé. Ceci suggère qu'il y a oxydation des deux disulfures en thiosulfates, LZR(S(O)-S,S(O)-S), ou d'un seul des disulfures en thiosulfonate, LZR(S(O)₂-S,S-S).^{13,14} Cette espèce se forme dans les mêmes proportions en conditions aérobie et anaérobie ce qui signifie que la formation de cette espèce n'est pas due au dioxygène de l'air mais bien à l'oxydation des disulfures par l'Au^{III}.

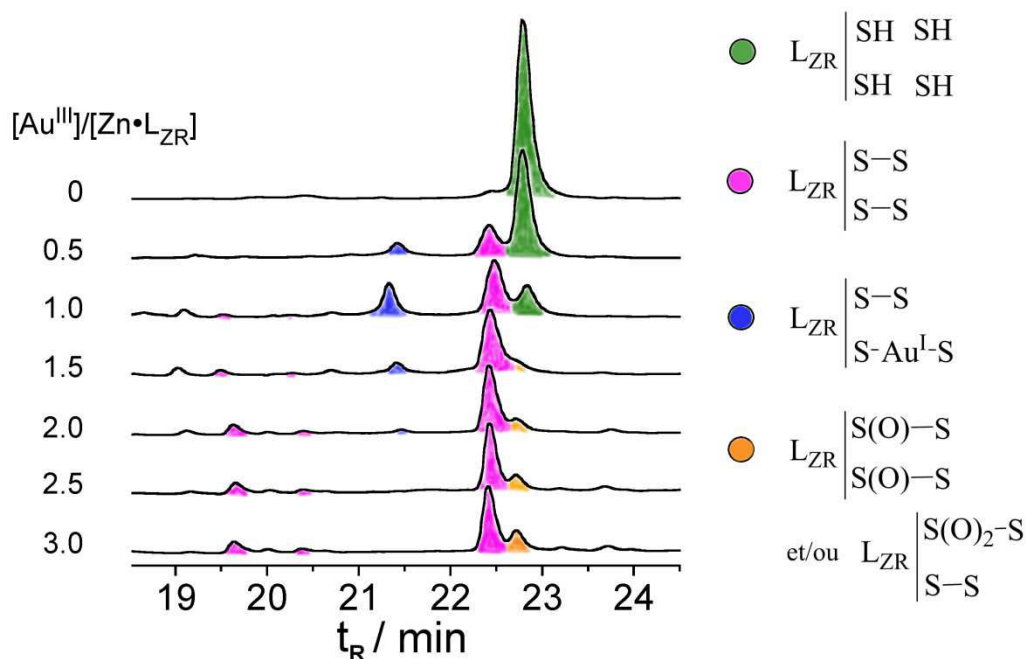


Figure 53 : Chromatogrammes obtenus par HPLC analytique des produits obtenus au cours de la réaction de Zn^{II}-LZR (20 μM) avec 0 à 3,0 équivalents d'Au^{III}Terpy en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et 298 K, 50 mM de thiourée sont ajoutés avant chaque injection.

3.2.1. Cinétique de réaction

Les analyses menées jusque-là nous ont permis de dire que la première étape de la réaction était rapide, mais sans plus de précisions. Nous avons donc cherché à déterminer la cinétique de la première étape de la réaction entre Au^{III}Terpy et Zn^{II}-LZR en suivant la décroissance de l'absorbance d'Au^{III}Terpy (1,5 μM) à 367 nm à l'aide d'un mélangeur rapide (stopped-flow) avec Zn^{II}-LZR en excès à des concentrations croissantes (28-86 μM). On se place ainsi dans des conditions de pseudo-premier ordre. Les cinétiques ainsi obtenues (Figure 54) peuvent être ajustées par une courbe monoexponentielle de type $y = A \times \exp(-k^{obs}t)$. Si on reporte les valeurs de k^{obs} sur un graphique en fonction de la concentration en Zn^{II}-LZR (Figure 54), on obtient une droite dont l'équation est : $k^{obs} = k \times [Zn^{II}\text{-LZR}]$. Ainsi, la réaction entre Au^{III}Terpy et Zn^{II}-LZR suit une loi cinétique du second ordre et la vitesse de la réaction v dépend donc à la fois de la concentration en Au^{III}Terpy et en Zn^{II}-LZR : $v = k \times [Au^{III}\text{Terpy}] \times [Zn^{II}\text{-LZR}]$. La pente de la droite $k^{obs} = k \times [Zn^{II}\text{-LZR}]$ (Figure 54) nous donne la valeur de la constante cinétique de second ordre $k_{Zn\text{-LZR}} = (3,3 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

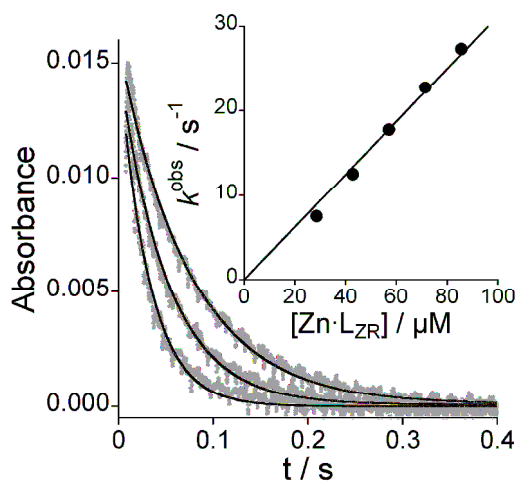


Figure 54 : Etude cinétique de la réaction entre Au^{III}Terpy (1,5 μM) et Zn^{II}-LZR (42,9 ; 57,1 et 85,7 μM) effectué en suivant la décroissance de l'absorbance d'Au^{III}Terpy à 367 nm en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. Les tracés expérimentaux sont représentés en gris, les courbes en traits pleins noir correspondent aux ajustements mono-exponentiels de type $y = A \cdot \exp(-k^{obs}t)$. L'insert représente les constantes apparentes de premier ordre k^{obs} obtenues des ajustements mono-exponentiels en fonction de la concentration en Zn^{II}-LZR (28,6 ; 42,9 ; 57,1 ; 71,4 et 85,7 μM). La pente donne une valeur de cinétique de second ordre $k_{Zn\text{-LZR}} = (3,3 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ainsi, le complexe Au^{III}Terpy est capable d'oxyder les cystéines du doigt de zinc Zn^{II}-L_{ZR} en disulfures en deux étapes qui sont résumées dans la Figure 55. La première étape (Figure 55(1)) consiste en l'oxydation de deux des cystéines par l'Au^{III} avec un temps de demi-vie de 0,11 s déterminé d'après l'équation $t_{1/2} = \ln 2/k^{obs}$ dans les conditions suivantes : [Zn^{II}-L_{ZR}] = 20 μM et [Au^{III}Terpy] = 20 μM conduisant à la formation d'un mono-disulfure, la décomplexation de l'ion zinc et la complexation de l'Au^I sur les deux cystéines restées libres, soit le complexe L_{ZR}(S-Au^I-S,S-S). La seconde étape (Figure 55(2)) qui se déroule dans un laps de temps plus long, de l'ordre de l'heure, consiste en l'oxydation de L_{ZR}(S-Au^I-S,S-S) par l'Au^{III} en bis-disulfures, L_{ZR}(S-S,S-S). Enfin, dans les cas où l'Au^{III} est en excès, une troisième étape a lieu (Figure 55(3)) qui consiste en la sur-oxydation des disulfures de l'espèce L_{ZR}(S-S,S-S) sous la forme de thiosulfates, L_{ZR}(S(O)-S,S(O)-S), ou en thiosulfonates, L_{ZR}(S(O)₂-S,S-S).

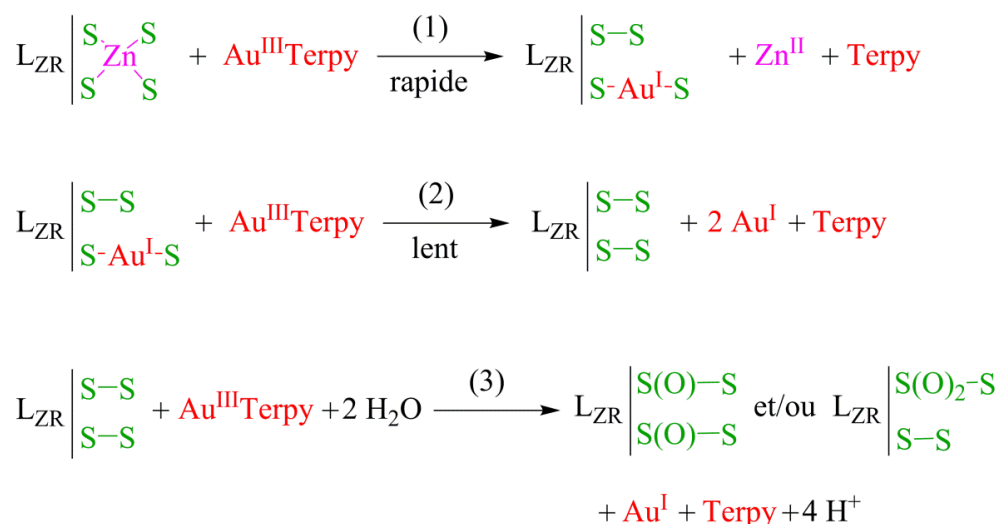


Figure 55 : Réaction du complexe Au^{III}Terpy avec Zn^{II}-L_{ZR}.

3.3. INFLUENCE DES THIOLS LIBRES SUR LA REACTIVITE D'Au^{III}TERPY

La cellule possède un potentiel réducteur du fait de la présence de glutathion (1-20 mM).⁶ Ainsi, l'Au^{III} peut très facilement être réduit sous forme d'Au⁰ ou de (Au^I-SR)_n s'il n'est pas suffisamment stabilisé par son ligand. Nous avons voulu vérifier si le complexe d'or(I), ainsi formé, est lui aussi à même de réagir avec les peptides doigts de zinc. Afin de mimer la réactivité d'Au^{III}Terpy dans la cellule et de caractériser la stabilité du complexe vis-à-vis des

thiols, nous avons donc étudié la réactivité de ce complexe avec Zn^{II}-LZR en présence de thiols libres, le β -mercaptoéthanol (β ME) et le glutathion (GSH) (Figure 56).

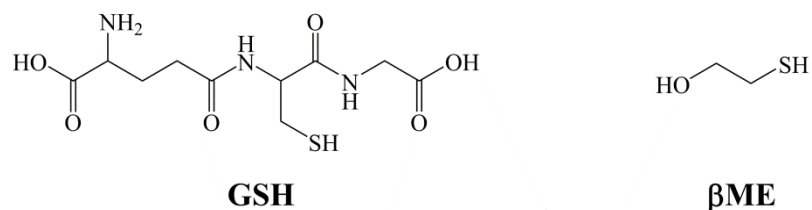


Figure 56 : Formules semi-développées du glutathion et du β -mercaptoéthanol.

3.3.1. Réactivité de l'Au^{III}Terpy avec les thiols libres

Nous avons tout d'abord voulu évaluer la stabilité du complexe Au^{III}Terpy en présence de deux thiols libres, un thiol simple, le β ME, et un thiol plus encombré, le GSH. Après l'ajout d'Au^{III}Terpy (60 μ M) sur le β ME ou le GSH (1 mM) en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0, on observe dans le temps de mélange par absorption UV-Vis une bande large à 290 nm correspondant à la terpyridine libre tandis qu'aucune des bandes caractéristiques du complexe Au^{III}Terpy n'apparaît (Figure 57). Ceci nous indique que le complexe Au^{III}Terpy est très rapidement réduits en Au^I par les thiols libres en solution sous la forme de polymère (Au^I-thiolate)_n¹⁸, oxydant une partie des thiols et libérant le ligand terpyridine en solution (Figure 58).

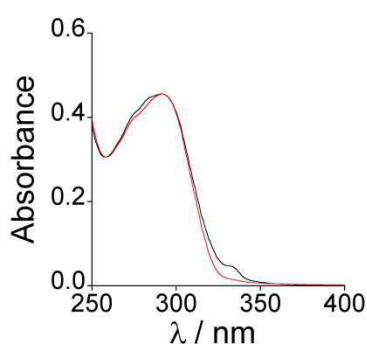


Figure 57 : Spectres d'absorption UV-Vis enregistrés sans attente après l'ajout d'Au^{III}Terpy (60 μ M) sur le GSH (1 mM, en rouge) ou le β ME (1 mM, en noir).



Figure 58 : Réaction d'Au^{III}Terpy avec le GSH ou le βME.

Nous avons évalué les cinétiques de ces réactions à l'aide d'un mélangeur rapide (stopped-flow) en se plaçant dans des conditions de pseudo premier ordre. Comme précédemment pour Zn^{II}-L_{ZR}, nous avons suivi la décroissance de l'absorbance d'Au^{III}Terpy (1,5 μM) à 367 nm lorsque ce dernier est mis en présence de concentrations croissantes de thiols (28-86 μM). Pour le GSH, on observe la décroissance de l'absorbance à 367 nm mais avec une intensité quatre fois moins importante que ce que nous avons observé pour le complexe peptidique Zn^{II}-L_{ZR}. Ceci peut être dû à une vitesse de réaction d'Au^{III}Terpy plus importante pour le GSH que pour Zn^{II}-L_{ZR}. La décroissance de l'absorbance à 367 nm a tout de même pu être simulée par une courbe monoexponentielle de type $y = A \times \exp(-k^{obs}t)$. Après analyse des courbes, on obtient une plus grande dispersion des valeurs de k^{obs} que pour Zn^{II}-L_{ZR} (Figure 59). Cette fois encore, on observe une dépendance linéaire entre la constante apparente de premier ordre et la concentration en GSH ($k^{obs} = k_{\text{GSH}} \times [\text{GSH}]$). Ainsi, la réaction entre Au^{III}Terpy et GSH suit une loi cinétique du second ordre et la vitesse de la réaction $v = k_{\text{GSH}} \times [\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}] \times [\text{GSH}]$ avec une constante $k_{\text{GSH}} = (10,0 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 59). Or, si la réaction entre Au^{III}Terpy et GSH était une réaction en une seule étape (Figure 58), on devrait observer que k^{obs} dépend du carré de la concentration en GSH ($k^{obs} = k_{\text{GSH}} \times [\text{GSH}]^2$). Ainsi, les résultats que nous avons obtenus nous indiquent que la réaction entre Au^{III}Terpy et le GSH est en fait une réaction en deux étapes. Aikens *et al.*¹⁹ ont d'ailleurs mis en évidence par des calculs DFT que l'oxydation des thiols en disulfures par des complexes d'Au^{III} est une réaction en deux étapes dont la première étape consiste en la complexation de l'Au^{III} sur le thiol libre et la seconde étape consiste en une réaction d'oxydoréduction entre l'espèce Au^{III}-thiolate et un autre équivalent de thiol (Figure 60). Le suivi de la décroissance de l'absorbance d'Au^{III}Terpy ne nous permettant de suivre que la deuxième étape de cette réaction, k_{GSH} correspond, en fait, à cette seconde étape. Le problème d'intensité que nous avons observé en

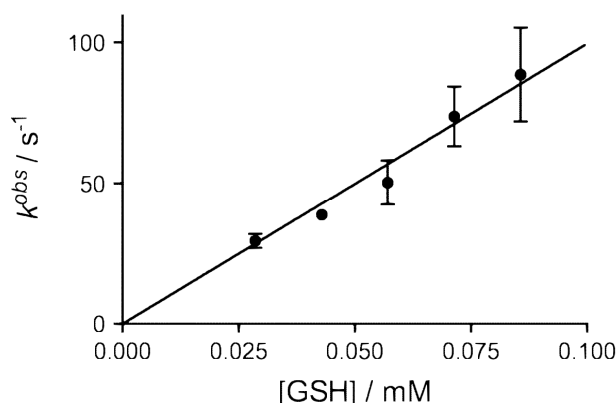


Figure 59 : Constantes apparentes de premier ordre k^{obs} obtenues des ajustements mono-exponentiels de type $y = A.exp(-k^{obs}t)$ en fonction de la concentration en GSH. Les ajustements ont été obtenus d'après les suivis cinétiques de la réaction entre Au^{III}Terpy (1,5 μ M) et GSH (28,6-85,7 μ M) effectuées en suivant la décroissance de l'absorbance d'Au^{III}Terpy à 367 nm en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. La pente donne une valeur de cinétique de second ordre $k_{GSH} = (10,0 \pm 0,3) \times 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$.

début de réaction pourrait ainsi s'expliquer par le fait que le complexe [Au^{III}(Terpy)(SR)] se forme pendant le temps de mélange du stopped-flow et que, du fait de la présence du ligand thiolate, le spectre d'absorbance du complexe [Au^{III}(Terpy)(SR)] est modifié par rapport à celui du complexe Au^{III}Terpy.

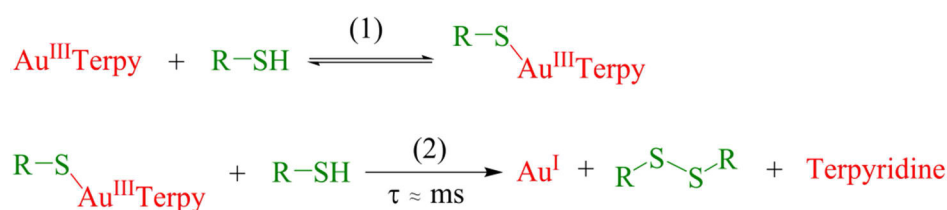


Figure 60 : Les deux étapes de la réaction d'oxydation des thiols par l'Au^{III}Terpy.

Pour le β ME, la réaction est encore plus rapide et est finie pendant le temps de mélange du stopped-flow qui a été évalué à 3,5 ms. Pour calculer une valeur limite de la constante apparente de premier ordre k^{obs} pour une concentration en thiol de 28,6 μ M (la plus faible concentration étudiée) et une concentration d'Au^{III}Terpy de 1,5 μ M, on considère que la réaction est finie quand on atteint $5t_{1/2}$. Ainsi, on a une approximation du temps de demi-vie qui est inférieur à 1 ms et on en déduit k^{obs} d'après l'équation : $k^{obs} = \ln 2/t_{1/2} > 693 s^{-1}$. Ceci

nous a permis d'en déduire une constante cinétique du second ordre limite $k_{\beta\text{ME}} > 240 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ainsi, compte-tenu des données cinétiques obtenues, les thiols libres en solution sont capables de réduire Au^{III}Terpy bien plus rapidement que le complexe peptidique Zn^{II}-L_{ZR}. Nous avons donc étudié la réaction entre Zn^{II}-L_{ZR} et Au^{III}Terpy en présence de glutathion ou de β-mercaptoéthanol de façon à voir si le polymère (Au^I-SR)_n est toujours capable de décomplexer le zinc de Zn^{II}-L_{ZR}.

3.3.2. Réaction d'Au^{III}Terpy avec Zn^{II}-L_{ZR} en présence de thiols libres

Pour étudier cette réaction, nous nous sommes placés à une concentration en thiols de 1 mM qui est une concentration comparable à celle du GSH intracellulaire.⁶ Quand environ 3 éq. d'Au^{III}Terpy sont ajoutés à une solution de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K contenant 1 mM de glutathion ou de β-mercaptoéthanol, on observe immédiatement par absorption UV-Vis l'absence des bandes d'absorbances à 350 et 367 nm caractéristiques de la présence du complexe Au^{III}Terpy. A la place, on observe la présence d'une bande d'absorbance large à environ 290 nm caractéristique du ligand terpyridine libre ainsi que la présence d'une bande à 331 nm qui correspond au complexe Zn^{II}(Terpy)₂ (Figure 61). On suit alors l'évolution du système au cours du temps et on observe la décroissance progressive de l'absorbance à 290 nm ainsi que l'augmentation de l'absorbance à 331 nm jusqu'à atteindre un plateau après 600 min en présence de GSH et 40 min en présence de βME (Figure 61). La valeur de l'absorbance à 331 nm en fin de réaction nous permet de déterminer que $(19,5 \pm 1) \mu\text{M}$ de Zn^{II}(Terpy)₂ ont été formés ce qui correspond à la totalité du Zn^{II} coordonné initialement à L_{ZR}. Nous avons également réalisé la même analyse en commençant par réduire Au^{III}Terpy (60 μM) par les thiols libres (1 mM) avant d'ajouter le complexe peptidique Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) à la solution. Dans ces conditions, nous avons observé

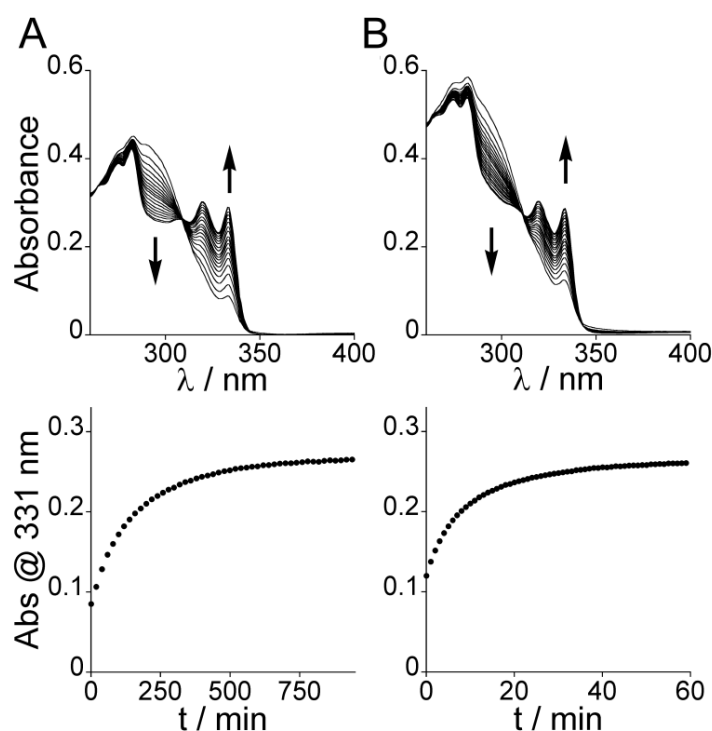


Figure 61 : Suivi au cours du temps de la réaction entre Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) et Au^{III}Terpy (55 μM en (a) et 70 μM en (b)) en présence de glutathion (1 mM en (a)) ou de β-mercaptoéthanol (1 mM en (b)) par UV-Vis en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. En haut, évolution des spectres d'absorbance et en bas, évolution de l'absorbance à 331 nm, les premiers spectres d'absorbance sont enregistrés à 7 s pour (a) et 3 s pour (b).

la formation de Zn^{II}(Terpy)₂ dans les mêmes proportions et avec les mêmes vitesses de réaction que décrites précédemment. Par ailleurs, nous avons réalisé des blancs afin de vérifier que ni les thiols libres (GSH ou βME, 1 mM) ni la terpyridine (60 μM) ne sont capables de décomplexer le zinc de Zn^{II}-L_{ZR}. Tout ceci nous indique que le polymère (Au^I-SR)_n formé par réduction d'Au^{III}Terpy par les thiols est toujours capable de détruire la totalité du complexe peptidique Zn^{II}-L_{ZR} en solution.

Pour les deux thiols, l'absorbance à 331 nm enregistrée sur le premier spectre est importante dénotant une décomplexation très rapide du Zn^{II} entre le moment de l'ajout d'Au^{III}Terpy et l'enregistrement du premier spectre. En effet, on observe que l'ajout d'Au^{III}Terpy conduit à la décomplexation de 35 % du Zn^{II} en 28 s en présence de GSH et de 46% du Zn^{II} en 24 s en présence de βME. Cette décomplexation du Zn^{II} est bien plus importante pendant le temps de mélange qu'au cours du reste de l'évolution du système. Ceci

s'explique par le fait qu'au moment de l'addition d'Au^{III}Terpy, il y a une forte concentration locale en complexe d'or(III) ce qui favorise la réaction entre l'Au^{III} et les thiols localement présents.

Nous avons cherché à vérifier ces résultats et, surtout, à identifier les espèces formées par d'autres méthodes spectroscopiques. Ainsi, quand on ajoute environ 3 éq. d'Au^{III}Terpy sur une solution contenant 20 μ M Zn^{II}-L_{ZR} en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 1 mM de β ME, on observe un signal en dichroïsme circulaire (Figure 62) avec des bandes à 208 nm (+), 228 nm (-) et 244 nm (+). Ce signal est différent de celui du complexe peptidique Zn^{II}-L_{ZR}, du peptide libre L_{ZR} et même de celui observé précédemment en absence de thiols libres (Figure 48) ce qui est significatif de la formation d'une espèce différente de celle observée précédemment en l'absence de thiols correspondant à l'oxydation du peptide sous forme de disulfures L_{ZR}(S-S,S-S). Cependant, aucune des publications sur les réactions entre les doigts de zinc et les complexes d'or(I/III) ne rapportent un tel signal. Il est donc difficile de déterminer la nature de la réaction entre Zn^{II}-L_{ZR} et Au^{III}Terpy en présence de β ME à ce stade.ⁱ L'analyse par CD de la réaction en présence de GSH s'est révélée impossible à faire car ce dernier présente un signal trop intense du fait de sa forte concentration dans les conditions utilisées qui masque totalement celui du doigt de zinc.

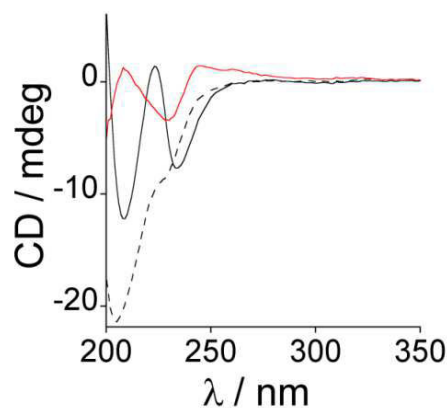


Figure 62 : Spectres CD de L_{ZR} (en pointillés noirs), Zn^{II}-L_{ZR} (en trait plein noir) et du produit obtenu (en trait plein rouge) après réaction de Zn^{II}-L_{ZR} (20 μ M) avec Au^{III}Terpy (60 μ M).

ⁱ Nous verrons dans le chapitre suivant que les bandes à 208 nm (+), 228 nm (-) et 244 nm (+) dénotent la formation d'un complexe S-Au^I-S (Figure 80 et Tableau 9)

μM en présence de β -mercaptoéthanol (βME) en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et à 298 K. Les spectres ont été corrigés de la dilution.

L'analyse par HPLC de la réaction entre le complexe peptidique Zn^{II}-LZR (20 μM) et Au^{III}Terpy (≈ 3 éq.) en présence de βME (1 mM) présente également un profil différent de celui observé précédemment (Figure 63). Cette fois-ci nous n'avons pas eu besoin d'ajouter de thiourée avant injection pour avoir des pics fins. On observe la consommation relativement rapide (45 min) de tout le complexe peptidique ($t_r = 23,0$ min), mais, cette fois, on n'observe la formation que d'une seule espèce qui présente un temps de rétention $t_r = 21,3$ min.

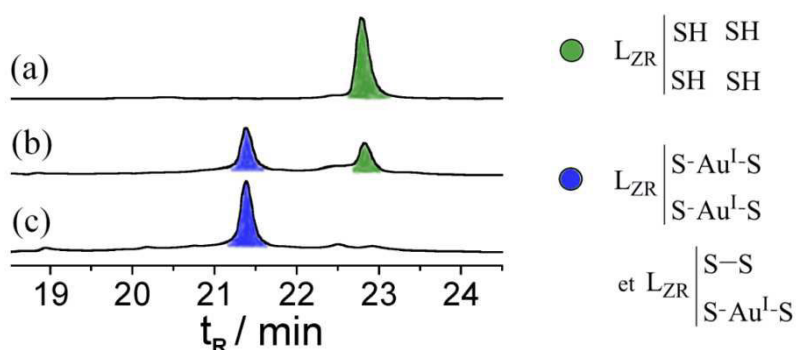


Figure 63 : Chromatogrammes obtenus par HPLC analytique des produits de la réaction de Zn^{II}-LZR (20 μM) avec Au^{III}Terpy (60 μM) en présence de β -mercaptoéthanol (1 mM) en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et 298 K. (a) Chromatogramme avant réaction, (b) chromatogramme obtenu sans attente entre l'ajout d'Au^{III}Terpy et l'injection et (c) chromatogramme obtenu après 45 min de réaction.

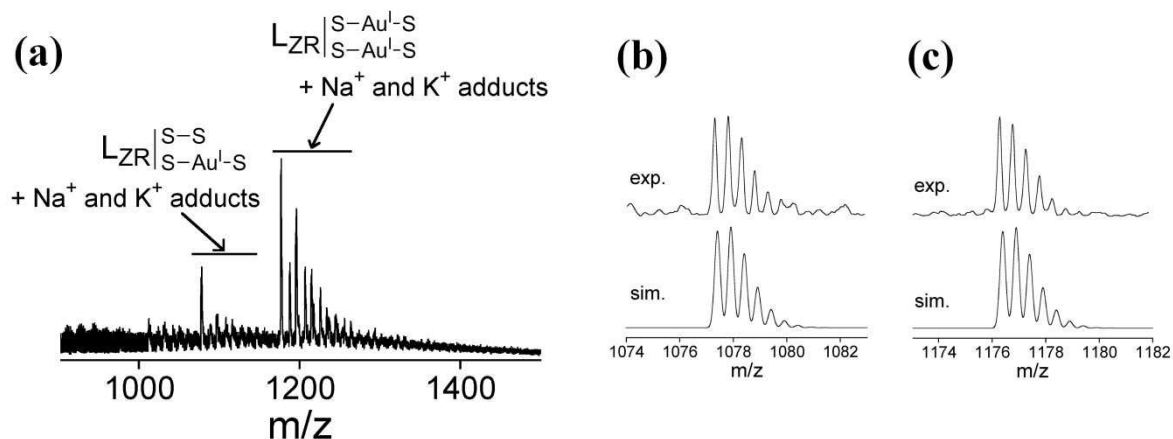


Figure 64 : Analyse ESI-MS de la réaction entre Zn^{II}-LZR (20 μM) et Au^{III}Terpy (55 μM) en présence de βME (1 mM) en tampon acétate d'ammonium (20 mM) à pH 7,0 et 298 K. (a) Spectre ESI/MS en mode positif de la région $m/z = 900$ -1500. (b) et (c) Zooms

scans expérimentaux et simulés des pics à $m/z = 1077,3$ et $1176,3$ correspondant aux espèces $[M+3H]^{2+}$ avec $M = L_{ZR}(S-S,S-Au^I-S) = [C_{83}H_{126}N_{24}O_{23}S_4Au]^-$ et $[M+4H]^{2+}$ avec $M = L_{ZR}(S-Au^I-S,S-Au^I-S) = [C_{83}H_{126}N_{24}O_{23}S_4Au_2]^{2-}$, respectivement.

Afin de préciser la nature de cette espèce, nous avons donc procédé à l'analyse par ESI-MS du milieu réactionnel contenant $Zn^{II}-L_{ZR}$ ($20 \mu M$) et $Au^{III}Terpy$ ($55 \mu M$) en présence de βME (1 mM) en tampon acétate d'ammonium (20 mM) à $pH 7,0$ et 298 K . Cette analyse révèle la présence d'un pic de masse de très faible intensité correspondant à $Zn^{II}-L_{ZR}$ avec $m/z = 1011,3$ ($[M+4H]^{2+}$) et de pics de masse correspondant à L_{ZR} complexé à un ou deux équivalents d' Au^I , $L_{ZR}(S-S,S-Au^I-S)$ à $m/z = 1077,3$ et $L_{ZR}(S-Au^I-S,S-Au^I-S)$ à $m/z = 1176,3$ respectivement avec leurs différents adduits Na^+ et K^+ , ce dernier étant largement majoritaire (Figure 64).

D'après les résultats que nous avons obtenus et compte-tenu des cinétiques déterminées pour les réactions d' $Au^{III}Terpy$ ($60 \mu M$) avec $Zn^{II}-L_{ZR}$ ($20 \mu M$), GSH et βME (1 mM), nous pouvons proposer que, dans un premier temps, le complexe $Au^{III}Terpy$ est réduit en Au^I par les thiols avec un temps de réaction τ inférieur à 1 ms . Cette réaction est accompagnée de la formation concomitante de disulfures $RS-SR$ et d'oligomères $(RS-Au^I)_n$ ainsi que de la libération du ligand terpyridine (Figure 65(1 et 2)). Ensuite, l'oligomère $(RS-Au^I)_n$ réagit avec $Zn^{II}-L_{ZR}$ selon une réaction d'échange de métal entre l' Au^I et le Zn^{II} avec, cette fois-ci, un temps de demi-vie plus long (allant de quelques minutes à environ une heure) pour former le complexe $L_{ZR}(S-Au^I-S,S-Au^I-S)$ (Figure 65(3)). L'ion Zn^{II} ainsi libéré est complexé par le ligand terpyridine.

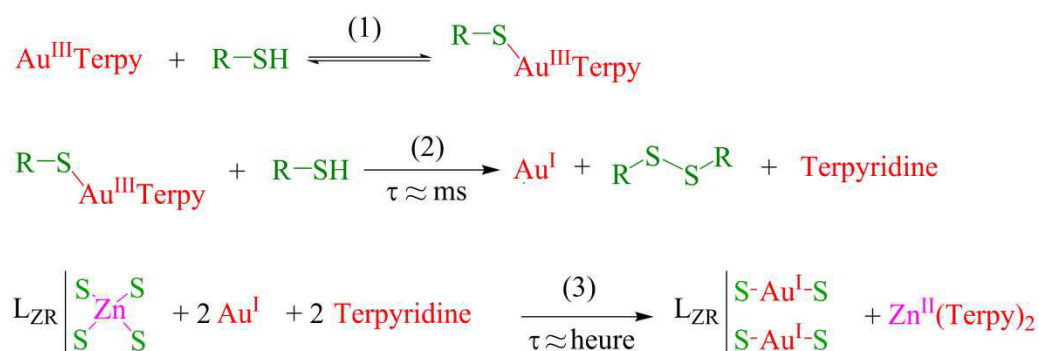


Figure 65 : Réaction du complexe $Au^{III}Terpy$ avec $Zn^{II}-L_{ZR}$ en présence de thiols libres tels que le GSH et βME .

3.4. DISCUSSION

3.4.1. Réactivité du complexe Au^{III}Terpy avec les doigts de zinc

Les complexes d'Au^{III} à ligands azotés sont très étudiés en vue de leur potentielle application en tant qu'anticancéreux. Dans ce cadre, il a, entre autres, été proposé que ces complexes pouvaient inhiber l'activité de protéines à doigts de zinc.^{2,20} Les analyses que nous avons menées nous ont permis de déterminer que les complexes d'Au^{III} étaient bien capables d'interagir avec les doigts de zinc, conduisant à la décomplexation du zinc de son site. De plus, nos analyses nous ont permis de mettre en évidence deux types de réactivité des complexes d'Au^{III} avec les doigts de zinc en fonction de l'absence ou la présence de thiols libres et d'identifier les mécanismes impliqués pour ces réactions.

En absence de thiols libres, le complexe d'Au^{III}, Au^{III}Terpy, est capable d'oxyder le doigt de zinc, Zn^{II}-LZR, conduisant à la formation successive de trois espèces LZR(S-S,S-Au^I-S), LZR(S-S,S-S) et LZR(S(O)-S,S(O)-S) ou LZR(S(O)₂-S,S-S) selon le mécanisme réactionnel décrit en Figure 55. Ce type de réactivité est en accord avec la littérature où le pouvoir oxydant des complexes d'or(III) avait déjà été évoqué. En effet, le complexe Au^{III}Terpy avec son potentiel d'oxydoréduction de +0,62 V vs NHE¹ est un fort oxydant des thiols (-0,3 à -0,2 V vs NHE⁸). Il a d'ailleurs été montré que différents complexes d'Au^{III} étaient capables d'oxyder les cystéines libres¹¹ et les petits peptides à cystéines libres, tel que le glutathion^{11,21} conduisant à l'oxydation des cystéines sous forme de disulfures et la réduction de l'Au^{III} en Au^I. Il a même été montré par différentes méthodes spectroscopiques que la réaction de complexes d'Au^{III} à ligands azotés sur différentes protéines comme l'albumine, le cytochrome c ou encore l'ubiquitine²²⁻²⁵ conduisait à la réduction de l'Au^{III} en Au^I ce qui montre une fois encore la capacité de ces complexes à effectuer des réactions d'oxydoréduction avec des protéines. Enfin, Shaw *et al.* ont mis en évidence que les complexes d'Au^{III} étaient à même, en présence d'eau, d'oxyder les disulfures de l'insuline sous forme de thiosulfinate qui est à son tour hydrolysé en acide sulfinique confirmant la possibilité de former les espèces thiosulfinate et thiosulfonate en présence d'excès d'Au^{III}.¹⁴

Par des mesures de cinétique, nous avons pu déterminer que la différence des réactions observées entre le complexe d'Au^{III} et le doigt de zinc en présence et en absence de thiols libres n'était pas uniquement liée à la plus forte concentration des thiols dans le milieu réactionnel (environ 50 fois supérieure) mais à une grande différence de cinétique de réaction entre les thiols libres ($k_{\text{GSH}} = (10,0 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_{\beta\text{ME}} > 240 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et le doigt de zinc ($k_{\text{Zn-LZR}} = (3,3 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette différence de réactivité ne semble pas liée à la différence de potentiel rédox des thiols considérés qui se situe classiquement entre -0,3 et -0,2 V vs NHE mais pourrait s'expliquer par une différence d'accessibilité des thiols liée à l'encombrement de la molécule comme on peut le constater pour le βME et le GSH ou par un possible rôle protecteur du Zn^{II} sur Zn^{II}-L_{ZR}.

En présence de thiols libres, le complexe d'Au^{III} est très rapidement réduit en Au^I conduisant à la décomplexation du ligand terpyridine libre en solution. L'Au^I se trouve alors très probablement sous la forme du polymère [Au^I-SR]_n. Ainsi, c'est ce polymère qui joue le rôle d'espèce active et qui réagit avec le doigt de zinc selon une réaction d'échange de métaux conduisant à la décomplexation du zinc associée à la complexation de deux équivalents d'Au^I pour former l'espèce L_{ZR}(S-Au^I-S, S-Au^I-S) (Figure 65). Ce type de réaction d'échange de métal entre l'Au^I et le Zn^{II} a d'ailleurs déjà été observé sur les métallothionéines²⁶⁻²⁹ mais également sur les doigts de zinc³⁰ avec l'aurothiomalate.

3.4.2. Comparaison avec d'autres études sur l'interaction des complexes d'Au^{III} avec les doigts de zinc

Seulement deux études sur l'interaction des complexes d'Au^{III} avec les doigts de zinc ont été publiées jusqu'à présent. Ces études, menées par les groupes de Casini² et de Farrell³ ont porté sur l'analyse, en milieu non réducteur, de la réactivité, avec des doigts de zinc de type CCHC (ZF-PARP² et NCp7³), de complexes d'Au^{III} à ligands azotés (Au^{III}phen et Au^{III}bipy², Au^{III}dien et Au^{III}Terpy³) similaires à celui utilisé présentement. Au cours de leurs analyses effectuées par spectrométrie de masse, ils ont effectivement tous deux observés la décomplexation du zinc sous l'effet de ces complexes d'or(III) ainsi que des produits d'oxydation de leur peptide par l'or(III). Cependant, leurs résultats diffèrent de ceux que nous avons pu obtenir au cours de notre étude avec Zn^{II}-L_{ZR} puisqu'ils observent majoritairement

la formation de différents adduits Au/doigt de zinc, appelés doigts d'or (« goldfinger »), alors qu'ils se placent en milieu non réducteur.

Pour leurs analyses sur l'interaction du doigt de zinc NCp7 avec les complexes Au^{III}Terpy et Au^{III}dien, Farrell *et al.*³ observent un pic de masse de faible intensité à $m/z = 2219,00 [L+H]^+$ correspondant au peptide démétallé et oxydé sous forme de disulfure, et deux pics à $m/z = 2613,00 [L+2Au^I-H]^+$ et $3007,00 [L+4Au^I-3H]^+$ qui ont été attribués à la complexation de deux ou quatre or sur le NCp7 quand les complexes d'or(III) et le complexe peptidique sont en quantités équimolaires (Figure 66). Etant donné qu'ils observaient également la présence de peptide oxydé en disulfure, Farrell *et al.* en ont déduit que l'or était au degré d'oxydation +I sans pouvoir le confirmer du fait qu'ils ne présentent pas de spectres haute résolution qui permettent de voir les massifs isotopiques et d'identifier clairement les espèces. La faible intensité du pic de masse attribué au doigt de zinc oxydé peut s'expliquer par la plus grande difficulté à les ioniser comparativement aux doigts d'or. D'autre part, NCp7 est un doigt de zinc de type CCHC, ainsi il n'y a qu'un seul disulfure intramoléculaire qui peut être formé et éventuellement un disulfure intermoléculaire, mais ce dernier n'a pas été mis en évidence par Farrell *et al.*³ Ainsi, une des cystéines reste probablement sous sa forme réduite et il peut y avoir complexation de l'or(I) sur cette dernière. Dans ce cas, le deuxième ligand pourrait provenir de l'histidine ou de la méthionine présents dans la séquence peptidique. Il a d'ailleurs déjà été montré que l'or était capable de se coordonner à ces ligands.^{11,12,31} La réaction entre les complexes d'or(III) et NCp7 est réalisée avec des quantités équimolaires des deux espèces. On peut donc envisager que tout le peptide n'a pas été oxydé par l'or(III) et qu'une partie des adduits Au^I/doigts de zinc proviennent de l'action uniquement de l'or(I) formé en solution. Tout ceci peut expliquer la présence d'adduits Au^I/doigt de zinc observés par Farrell *et al.* alors qu'ils se trouvent en milieu non réducteur et non uniquement des disulfures comme nous l'avons observé en fin de réaction avec Zn^{II}-LZR. Cependant, les analyses menées par Farrell *et al.* sont trop lacunaires et des analyses complémentaires seraient nécessaires notamment pour justifier l'existence de l'espèce Au^I/NCp7 avec un ratio 4:1.

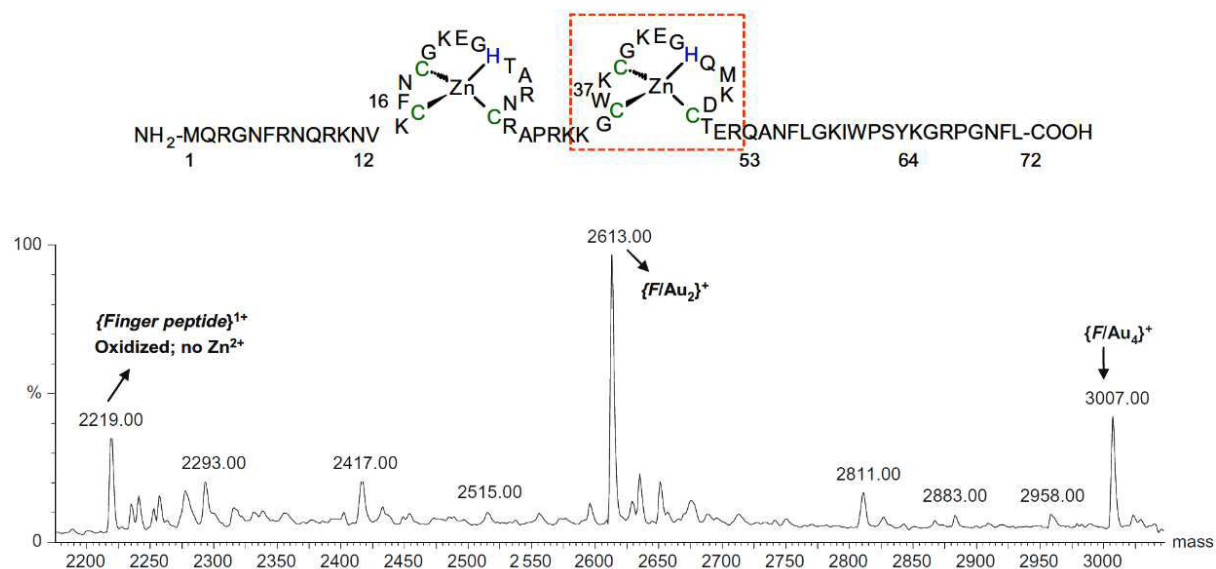


Figure 66 : En haut, séquence de la protéine de la nucléocapside du VIH (NCp7), la séquence du peptide utilisé par Farrell *et al.*³ est encadrée en rouge. En bas, spectre déconvolué montrant les pics des adduits or/peptides 2:1 et 4:1 et le peptide oxydé.

Casini *et al.*² ont étudié l'interaction de Zn^{II} -ZF-PARP avec Au^{III} phen et Au^{III} bipy en analysant par spectrométrie de masse des solutions où le doigt de zinc et le complexe d' Au^{III} sont présents avec des ratios 2:1. Au cours de leurs analyses, ils observent la décomplexation du zinc du peptide, la complexation de l' Au^{III} sur le doigt de zinc ainsi que la formation d'un adduit Au^{III}/Zn^{II} /peptide 1:1:1 (Figure 67). Cependant, en analysant leurs résultats, nous avons observé qu'ils avaient inversé les spectres concernant l'interaction de Zn^{II} -ZF-PARP avec Au^{III} bipy avec ceux où ils étudient l'interaction avec l'auranofine également présentée dans cet article. Les attributions données dans l'article nécessitent donc d'être contrôlées (Tableau 6).

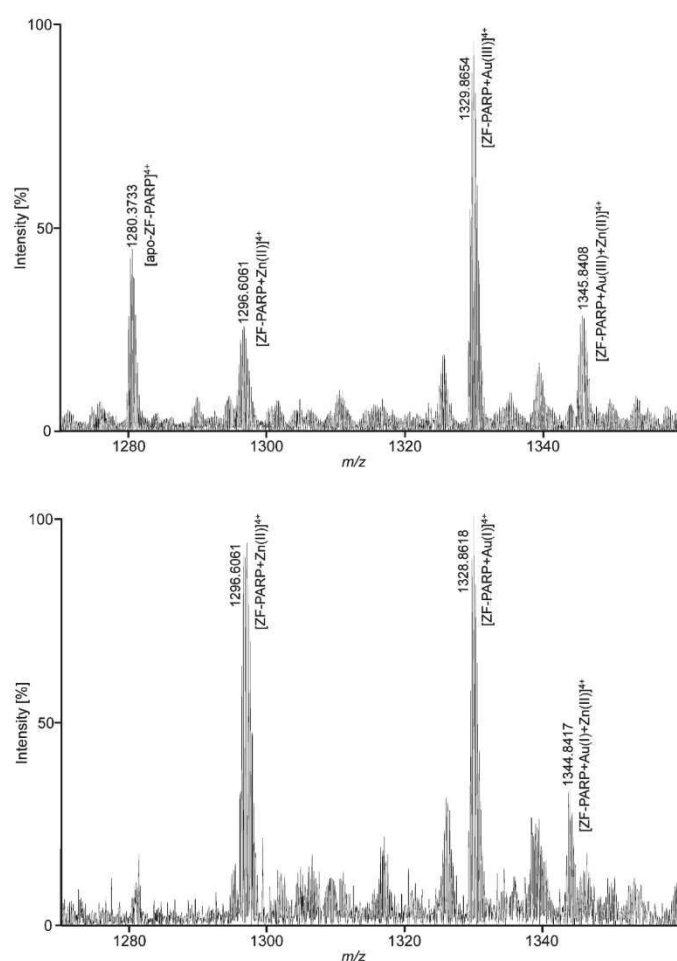


Figure 67 : Spectres ESI FT-ICR de Zn^{II}-ZF-PARP incubé avec l'auranofine pendant 24h (en haut) et avec Au^{III}bipy pendant 10 min (en bas). Les valeurs indiquées correspondent aux valeurs de m/z de l'isotope le plus intense de chaque pic de masse.

Ainsi, le pic à $m/z = 1344,8417$ correspond à un adduit Zn^{II}/Au/ZF-PARP 1:1:1 où l'or est au degré d'oxydation +III. Le pic à $m/z = 1328,8618$ correspond quant à lui à un adduit Au^{III}/ZF-PARP(S-S) 1:1 où le peptide a été oxydé sous forme de mono-disulfure et complexé par l'Au^{III}. Ainsi, de même que pour Farrell *et al.*³, on observe bien la décomplexation du zinc du peptide, l'oxydation du peptide sous la forme d'un mono-disulfure ainsi que la formation de différents adduits Au/ZF-PARP alors que la réaction a lieu en absence de thiol. Cependant, contrairement à ce que Farrell *et al.* ont pu supposer, l'or est au degré d'oxydation +III dans ces complexes peptidiques. La présence de l'adduit Zn^{II}/Au^{III}/ZF-PARP 1:1:1 est consistante avec l'hypothèse selon laquelle l'Au^{III} est capable de se complexer sur ces doigts de zinc

CCHC par le biais des quatre histidines et des quatre méthionines présentent dans la séquence.

Tableau 6 : Comparaison des valeurs théoriques et des valeurs expérimentales obtenues lors de la réaction entre Au^{III}bipy et Zn^{II}-ZF-PARP à l'état de charge 4+, d'après Casini *et al.*²

	Formule	Masse théorique	Masse expérimentale
		Charge 4+	Charge 4+
<i>apo</i> -ZF-PARP	C ₂₃₀ H ₃₅₀ N ₆₂ O ₅₉ S ₆	1280,87	-
<i>apo</i> -ZF-PARP(S-S)	C ₂₃₀ H ₃₄₈ N ₆₂ O ₅₉ S ₆	1280,37	1280,3733
Zn ^{II} -ZF-PARP	[C ₂₃₀ H ₃₅₀ N ₆₂ O ₅₉ S ₆ Zn] ²⁺	1296,86	1296,6061
Au ^{III} -ZF-PARP(S-S)	[C ₂₃₀ H ₃₄₈ N ₆₂ O ₅₉ S ₆ Au] ³⁺	1328,86	1328,8618
Au ^{III} -ZF-PARP	[C ₂₃₀ H ₃₅₀ N ₆₂ O ₅₉ S ₆ Au] ³⁺	1329,36	-
Au ^I -ZF-PARP(S-S)	[C ₂₃₀ H ₃₄₈ N ₆₂ O ₅₉ S ₆ Au] ¹⁺	1329,36	-
Au ^I -ZF-PARP	[C ₂₃₀ H ₃₅₀ N ₆₂ O ₅₉ S ₆ Au] ¹⁺	1329,86	-
Zn ^{II} -(ZF-PARP)-Au ^{III}	[C ₂₃₀ H ₃₅₀ N ₆₂ O ₅₉ S ₆ ZnAu] ⁵⁺	1345,35	-
Zn ^{II} -(ZF-PARP)-Au ^I	[C ₂₃₀ H ₃₅₀ N ₆₂ O ₅₉ S ₆ ZnAu] ³⁺	1344,84	1344,8408

Ainsi, ces résultats montrent que différents complexes d'Au^{III} à ligands azotés sont capables de décomplexer le zinc par oxydation des cystéines en monodisulfure et complexation de l'or sous sa forme réduite ou oxydée sur le doigt de zinc. Cependant, là où nous observons une seconde étape avec la formation de bisdisulfures sur notre peptide Zn^{II}-L_{ZR} à quatre cystéines, cette réaction ne peut avoir lieu pour des doigts de zinc CCHC tels que PARP-1 et NCp7. Par ailleurs, les thiosulfates ou thiosulfonates n'ont pas été observés par ces deux groupes ce qui peut être lié aux faibles concentrations en Au^{III}. Finalement, la présence d'histidines et de méthionines favorise la complexation de l'or(III) même si le site à doigt de zinc n'est pas touché. Ce qui nous indique une réactivité certainement plus complexe sur des protéines à doigts de zinc entières que sur notre peptide modèle.

Cependant, des données très importantes pour la compréhension de l'action des complexes d'Au^{III} en milieu biologique sont absentes de ces analyses. Tout d'abord, les données cinétiques manquent même si on a une estimation des temps d'incubations qui sont de 5 min pour la réaction de NCp7 avec Au^{III}Terpy et de 10 min pour la réaction de PARP-1

avec Au^{III}bipy. Ceci, nous indiquent que les cinétiques de réactions sont relativement rapide même avec des doigts de zinc CCHC. Mais, surtout, les analyses en milieu réducteur avec des thiols à des concentrations de l'ordre du millimolaire sont absentes et ne permettent donc pas de voir si la réaction est toujours possible si l'Au^{III} est réduit avant de pouvoir réagir avec le doigt de zinc CCHC comme nous l'avons observé avec un doigt de zinc CCCC.

3.4.3. Pertinence biologique

Les analyses que nous avons menées sur la réactivité d'un complexe d'Au^{III}, Au^{III}Terpy, avec un doigt de zinc, Zn^{II}-LZR, nous ont donc permis de déterminer que les complexes d'Au^{III} sont capables de cibler les doigts de zinc et de les détruire dans des conditions similaires à celles rencontrées dans la cellule. En effet, avec seulement 3 équivalents d'Au^{III}, il a été possible de décomplexer le zinc du doigt de zinc même en présence de glutathion 1 mM. Cependant, l'Au^{III} semble agir plutôt comme une prodrogue. En effet, il est rapidement réduit sous forme d'Au^I par le glutathion qui est l'espèce active capable de décomplexer le Zn^{II} des doigts de zinc avec un temps de demi-vie d'environ une heure ce qui est relativement rapide à l'échelle biologique.

Par cette réaction, on obtient un nouveau complexe peptidique L_{ZR}(S-Au^I-S, S-Au^I-S), autrement appelé doigt d'or. La présence de ces deux ions Au^I dont la géométrie, linéaire, diffère de celle du Zn^{II} et dont le rayon ionique (137 pm) est bien plus important que celui de l'ion Zn^{II} (74 pm) devrait se traduire par une modification de la structure du site. Le site à zinc des facteurs de transcription ou des protéines réparatrices de l'ADN à doigt de zinc étant nécessaire à leur fonctionnement, une telle modification structurelle expliquerait l'inhibition de l'activité des doigts de zinc par différents complexes d'Au^{III} qui a déjà été mesurée.^{2,20}

3.5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ainsi, à l'aide de notre modèle peptidique de doigt de zinc de type « zinc ribbon », Zn^{II}-L_{ZR}, nous avons pu mettre en évidence par diverses méthodes spectroscopiques que le complexe d'Au^{III}, Au^{III}Terpy, est bien capable de décomplexer le zinc du doigt de zinc avec des cinétiques rapides à l'échelle biologique. Suivant les conditions utilisées, l'Au^{III} jouait le

rôle d'oxydant des cystéines en milieu non réducteur ou était réduit en Au^I par les thiols libres et effectuait dans ce cas une réaction d'échange de métaux avec Zn^{II}.

C'est cette dernière réaction qui semble la plus pertinente d'un point de vue biologique, du fait de la présence de glutathion à de fortes concentrations dans le cytosol (de l'ordre du millimolaire) qui va réduire très rapidement les complexes d'Au^{III} à ligands azotés en Au^I. Ainsi, ces complexes d'Au^{III} seraient en réalité des prodrogues et le polymère (Au^I-glutathion)_n serait l'espèce active responsable de la décomplexation du zinc. Il pourrait donc se révéler très intéressant de développer des complexes Au^{III} à ligand azotés avec un ligand cytotoxique pour les cellules cancéreuses pour agir sur différentes cibles en même temps et accroître la cytotoxicité du complexe. Le complexe Au^{III}Terpy pourrait d'ailleurs se révéler un bon candidat car il a été montré que le ligand seul présentait une activité cytotoxique semblable à celle du complexe sur les cellules tumorales d'ovaires humains.¹ Les résultats de Casini² et Farrell³ indiquent que les complexes d'Au^{III} présentent également une forte réactivité vis-à-vis des doigts de zinc même lorsque le Zn^{II} est coordonné à trois cystéines et une histidine. Cependant, les données en conditions réductrices et les données cinétiques manquent et restent à déterminer pour ce type de doigts de zinc. De même, il pourrait être intéressant de faire ces études sur des doigts de zinc de type CCHH. En effet, ces données nous permettraient d'identifier une éventuelle sélectivité pour les doigts de zinc en fonction de la première sphère de coordination autour du zinc.

Il sera également important de déterminer la réactivité d'autres complexes d'Au^{III} à ligands soufrés ou carbonés avec les doigts de zinc. La question principale étant de savoir si l'Au^{III} possède toujours un fort potentiel oxydant, auquel cas on devrait observer le même genre de mécanisme avec les doigts de zinc, ou si ces ligands stabilisent suffisamment l'Au^{III} pour qu'il reste stable en milieu biologique, auquel cas la réactivité vis-à-vis des doigts de zinc ne serait pas aussi évidente.

Finalement, au vu de nos résultats, la réactivité des complexes d'Au^{III} sur les doigts de zinc en milieu biologique correspond finalement à la réaction d'un polymère (Au^I-SR)_n, nous allons donc étudier un complexe de ce type, l'aurothiomalate, afin d'identifier plus clairement les mécanismes impliqués au niveau moléculaire.

3.6. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Messori, L.; Abbate, F.; Marcon, G.; Orioli, P.; Fontani, M.; Mini, E.; Mazzei, T.; Carotti, S.; O'Connell, T.; Zanello, P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3541–3548.
- (2) Mendes, F.; Groessl, M.; Nazarov, A. A.; Tsybin, Y. O.; Sava, G.; Santos, I.; Dyson, P. J.; Casini, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2196–2206.
- (3) De Paula, Q. A.; Mangrum, J. B.; Farrell, N. P. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1347–1354.
- (4) Messori, L.; Orioli, P.; Tempi, C.; Marcon, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 352–360.
- (5) Hollis, L. S.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4293–4299.
- (6) Krezel, A.; Wojcik, J.; Maciejczyk, M.; Bal, W. *Chem. Commun.* **2003**, 704–705.
- (7) Bindoli, A.; Rigobello, M. P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692–1707.
- (8) Millis, K. K.; Weaver, K. H.; Rabenstein, D. L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4144–4146.
- (9) Yangyuoru, P. M.; Webb, J. W.; Shaw III, C. F. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 576–583.
- (10) Yangyuoru, P. M.; Webb, J. W.; Shaw III, C. F. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 584–593.
- (11) Glišić, B. Đ.; Rychlewska, U.; Djuran, M. I. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6887–6901.
- (12) Al-Maythalony, B. A.; Isab, A. A.; Wazeer, M. I. M.; Ibdah, A. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, *363*, 3200–3207.
- (13) Shaw III, C. F.; Cancro, M. P.; Witkiewicz, P. L.; Eldridge, J. E. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 3198–3201.
- (14) Witkiewicz, P. L.; Shaw III, C. F. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1981**, 1111–1114.
- (15) Bachman, R. E.; Bodolosky-Bettis, S. A.; Pyle, C. J.; Gray, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14303–14310.
- (16) Abram, U.; Mack, J.; Ortner, K.; Muller, M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 1011–1019.
- (17) Ahmad, S.; Isab, A. A. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 44–52.
- (18) Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261–5270.
- (19) Barngrover, B. M.; Aikens, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12590–12595.
- (20) Handel, M. L.; Defazio, A.; Watts, C. K. W.; Day, R. O.; Sutherland, R. L. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40*, 613–618.
- (21) Al-Maythalony, B. A.; Wazeer, M. I. M.; Isab, A. A. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, *363*, 3244–3253.
- (22) Casini, A.; Cinellu, M. A.; Minghetti, G.; Gabbiani, C.; Coronello, M.; Mini, E.; Messori, L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5524–5531.
- (23) Casini, A.; Hartinger, C.; Gabbiani, C.; Mini, E.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K.; Messori, L. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 564–575.
- (24) Marcon, G.; Messori, L.; Orioli, P.; Cinellu, M. A.; Minghetti, G. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4655–4661.
- (25) Messori, L.; Balerna, A.; Ascone, I.; Castellano, C.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Marchioni, C.; Jaouen, G.; Castellano, A. C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 491–499.

- (26) Shaw III, C. F.; Laib, J. E.; Savas, M. M.; Petering, D. H. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 403–408.
- (27) Munoz, A.; Petering, D. H.; Shaw III, C. F. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5655–5659.
- (28) Stillman, M. J.; Zelazowski, A. J.; Szymanska, J.; Gasyna, Z. *Inorg. Chim. Acta* **1989**, *161*, 275–279.
- (29) Stillman, M. J.; Presta, A.; Gui, Z.; Jiang, D. T. *Met.-Based Drugs* **1994**, *1*, 375–394.
- (30) Larabee, J. L.; Hocker, J. R.; Hanas, J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1943–1954.
- (31) Zou, J.; Taylor, P.; Dornan, J.; Robinson, S. P.; Walkinshaw, M. D.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2931–2934.

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DE L'INTERACTION DES COMPLEXES $(Au^I-SR)_N$ AVEC DES PEPTIDES DOIGTS DE ZINC

Sommaire :

4.1. Introduction	113
4.2. Propriétés spectroscopiques des complexes Au^I-thiolates	115
4.3. Propriétés de complexation de l'Au^ITm sur les CP1	119
4.3.1. Interaction de CP1(CCHH) avec Au^I Tm	119
4.3.2. Interaction de CP1(CCCC) avec Au^I Tm	124
4.3.2.1. Caractérisation spectroscopique des complexes Au^I_n -CP1(CCCC)	124
4.3.2.2. Structure en solution du complexe Au^I_3 -CP1(CCCC)	129
4.3.3. Interaction de CP1(CCHC) avec Au^I Tm	133
4.4. Interaction de l'Au^I avec les doigts de zinc métallés	137
4.4.1. Zn^{II} -CP1(CCHH)	137
4.4.1.1. Caractérisation des produits de la réaction entre Zn^{II} -CP1(CCHH) et Au^I Tm	137
4.4.1.2. Décomplexation du zinc par Au^I Tm : quantification et cinétique	139
4.4.2. Zn^{II} -CP1(CCHC)	142
4.4.2.1. Caractérisation des produits de la réaction entre Zn^{II} -CP1(CCHC) et Au^I Tm	142
4.4.2.2. Cinétique de décomplexation du zinc par Au^I Tm	143
4.4.3. Zn^{II} -CP1(CCCC)	143
4.4.3.1. Caractérisation des produits de la réaction entre Zn^{II} -CP1(CCCC) et Au^I Tm	143
4.4.3.2. Décomplexation du zinc par l' Au^I Tm : quantification et cinétique	146
4.4.4. Bilan	147
4.5. Influence des thiols libres sur la réactivité de l'Au^I	148
4.5.1. <i>Apo</i> -peptides	149
4.5.2. Zn^{II} -peptides	150
4.5.3. Bilan	150
4.6. Discussion	151
4.6.1. Caractéristiques spectroscopiques des complexes Au^I_n -peptide	151
4.6.2. Réactivité de l'aurothiomalate avec les doigts de zinc : pertinence biologique	

4.7. Conclusions et perspectives	156
4.8. Bibliographie	158

4.1. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les complexes d'or(III) peuvent être réduits sous la forme d'un complexe polymérique $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-SG})_n$ par le glutathion, un thiol libre présent dans la cellule. Le complexe ainsi formé réagirait avec les doigts de zinc. Nous avons donc cherché, dans ce chapitre, à mieux comprendre la réactivité au niveau moléculaire des complexes $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-SR})_n$ avec les doigts de zinc. Pour cela, nous avons utilisé l'aurothiomalate $(\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm})$ (Figure 68), un complexe d' Au^{I} polymérique utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Ce complexe a été très étudié et a notamment permis de mettre en évidence l'inhibition de protéines à doigts de zinc par les complexes d'or lors des premiers travaux réalisés par Handel *et al.*¹ Par la suite, les travaux d'Hanas *et al.*² sur l'interaction de Sp1-3, un peptide doigt de zinc de type $\beta\beta\alpha$, avec l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ ont permis de conforter l'idée selon laquelle l'ion aureux inhibe les doigts de zinc. En effet, ils ont pu mettre en évidence par spectrométrie de masse que ce complexe d'or(I) est capable de décomplexer l'ion Zn^{2+} , conduisant ainsi à la formation d'un complexe peptidique $\text{Au}^{\text{I}}\text{-Sp1-3}$ avec un ratio 1:1 avec un rapport des constantes de complexation pour l'or et pour le zinc $K_d(\text{Au}^{\text{I}})/K_d(\text{Zn}^{\text{II}})$ évalué à 4,2 par spectrométrie de masse.

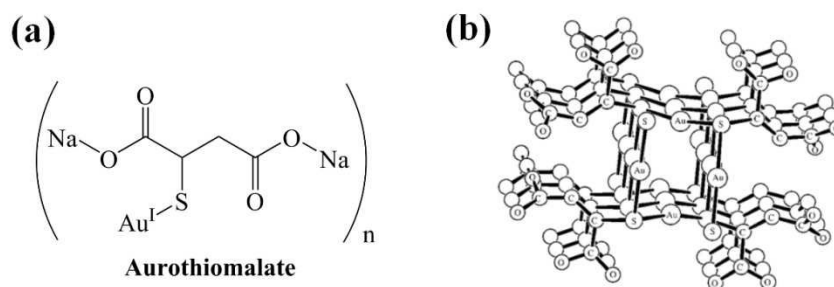


Figure 68 : (a) Formule chimique du complexe polymérique aurothiomalate utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. (b) Structure cristallographique de l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$, d'après Bau.³

Comme nous l'avons décrit en introduction, les doigts de zinc peuvent présenter différentes sphères de coordination autour du zinc suivant la formule : $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{Cys})_{4-x}(\text{His})_x$, avec $x = 0, 1$ ou 2 . L'or(I) étant mou, il formera des complexes plus stables avec des ligands mous, donc avec les cystéines plutôt qu'avec les histidines dans le cas présent. De plus, l'or(I) a

tendance à former des espèces polymériques avec les thiolates. Ainsi, des différences de comportement peuvent être envisagées pour les doigts de zinc à deux, trois et quatre cystéines. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la possibilité de substituer le zinc par l'or(I) dans les doigts de zinc en étudiant les éventuelles conséquences structurales d'une telle substitution et les différences de comportement que peuvent présenter les différents doigts de zinc. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des peptides qui présentent la même séquence peptidique sauf au niveau des ligands du zinc afin de s'affranchir des différences de réactivités liées au repliement ou à la séquence. Nous avons donc choisi d'utiliser les trois dérivés des peptides CP1 développés par Berg : CP1(CCHH), CP1(CCHC) et CP1(CCCC) (Figure 69).

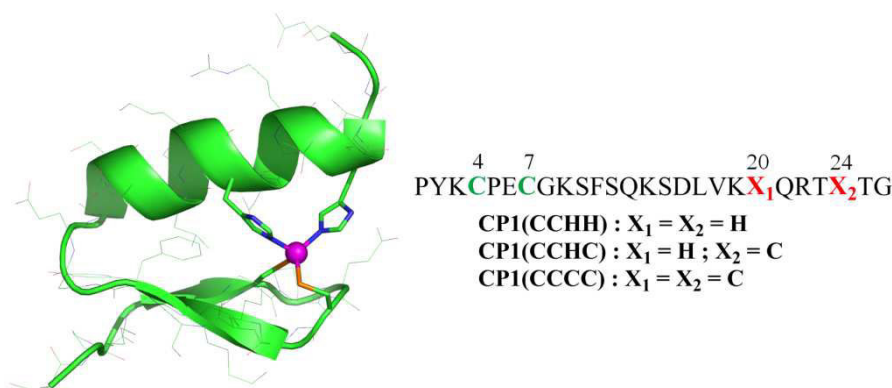


Figure 69 : Structure ¹H RMN de Zn^{II}-CP1(CCHH) et séquence peptidique des différents peptides CP1 développés par Berg *et al.*^{4,5}

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer les espèces formées au cours de la réaction entre les peptides CP1 et l'aurothiomalate par spectroscopie d'absorption UV-Vis, dichroïsme circulaire et spectrométrie de masse en faisant réagir les complexes d'or(I) avec les peptides libres réduits de façon à caractériser les espèces qui peuvent se former entre les peptides et l'or(I). Puis, nous avons étudié la réactivité des peptides CP1 métallés au zinc avec ce complexe d'or(I) de façon à déterminer la nature des complexes or(I)-peptides éventuellement formés, la quantité de complexe d'or(I) nécessaire pour décomplexer le zinc ainsi que la cinétique de déplacement du zinc. Nous avons également étudié l'influence de la présence de thiols pour cette réaction de substitution.

4.2. PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DES COMPLEXES AU^I-THIOLATES

Dans un premier temps nous avons cherché à étudier les propriétés de coordination de l'aurothiomalate sur les peptides CP1 non métallés. Du fait du peu d'études existantes sur l'interaction des doigts de zinc avec l'aurothiomalate, très peu de données sont connues sur les propriétés spectroscopiques résultant de la coordination de l'or(I) sur ces peptides. On peut toutefois citer les travaux menés par Barrios *et al.* sur l'interaction du chlorure de triéthylphosphine d'or(I) (Et₃PAu^ICl), un analogue de l'auranofine, avec les peptides CP1.⁶ Ces auteurs ont proposé que, lorsqu'il est mis en présence de ces peptides, Et₃PAu^ICl perd ses deux ligands pour former des complexes linéaires CysS-Au^I-SCys. Toutefois, cette étude est très lacunaire et les caractérisations sont trop incomplètes pour réellement se prononcer sur la nature des espèces formées. Cependant, la formation de complexes entre l'or(I) et les peptides CP1 a pu être mise en évidence par l'augmentation de l'absorbance entre 240 et 400 nm qui a été attribuée à des bandes de transfert de charge du ligand vers le métal LMCT (Figure 22). La présence de telles bandes d'absorption a également été constatée par Peacock *et al.*⁷ lors de la complexation de Et₃PAu^ICl par le peptide TRIL23C, qui s'auto-assemble sous la forme de

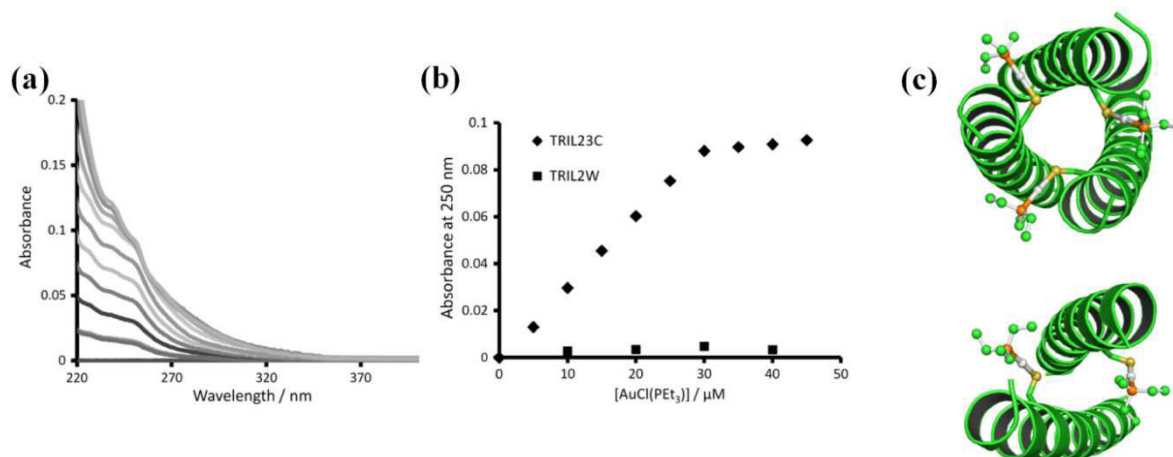


Figure 70 : (a) Titrage par absorption UV-Vis de TRIL23C (30 μM) par Et₃PAu^ICl en tampon phosphate 10 mM pH 8. (b) Suivi de l'absorbance à 250 nm en fonction de la concentration en Et₃PAu^ICl. (c) Modèles proposés pour la coordination de [Au^I(PEt₃)]⁺ sur la cystéine de TRIL23C quand celui-ci est sous sa forme trimérique ou dimérique.⁷

dimères ou de trimères, conduisant à la formation de complexes CysS-Au^I-PEt₃ sur chacun des monomères (Figure 70). Cependant, ces données proviennent d'un complexe d'or(I) possédant un ligand phosphine π -accepteur pour lequel des transitions de transfert de charge du métal vers le ligand MLCT peuvent être observées à 235 nm pour Et₃PAu^ICl et 251 nm pour [Au^I(PEt₃)₂]⁺.⁸

Les complexes Au^I-thiolates quant à eux ne possèdent pas de telles bandes MLCT. En revanche, ces complexes Au^I-thiolates peuvent être caractérisés par la présence de transitions de transfert de charge LMCT RS→Au^I observables par spectroscopie d'absorption UV-Vis dans la région UV du spectre.^{8,9} Ceci a notamment été mis en évidence sur le complexe (Bu₄N)[Au^I(SH)₂] qui présente des bandes LMCT à 234 et 250 nm (Figure 71(a)).⁹ On retrouve également des bandes de transfert de charge similaires pour l'aurothiomalate et le complexe (Au^ISG)_n mais situées à 236 et 273 nm (Figure 71(b)). En plus de ces bandes LMCT, les complexes d'or(I) polymériques, de même que les clusters d'or, peuvent également présenter des interactions Au^I-Au^I dues à une hybridation entre les orbitales 6s/6p vides et les orbitales 5d pleines. Ces interactions sont visibles par la présence de bandes d'absorption dues à des transitions interbandes de l'orbitale occupée de plus haute énergie (HOMO) 5d vers les orbitales vides de plus basses énergies (LUMO) 6sp présentes à des énergies similaires aux LMCT.^{8,10} Dans le cas des clusters d'or, on observe également des transitions intrabandes de l'orbitale HOMO 6s vers l'orbitale LUMO 6sp à plus basses énergies (Figure 72 désigné par les flèches rouges).¹⁰ Il est également important de noter qu'une corrélation existe entre la taille du cluster, et donc le nombre d'interaction or-or, et le déplacement bathochrome des bandes d'absorptions correspondant aux transitions intrabandes (Figure 72).¹⁰

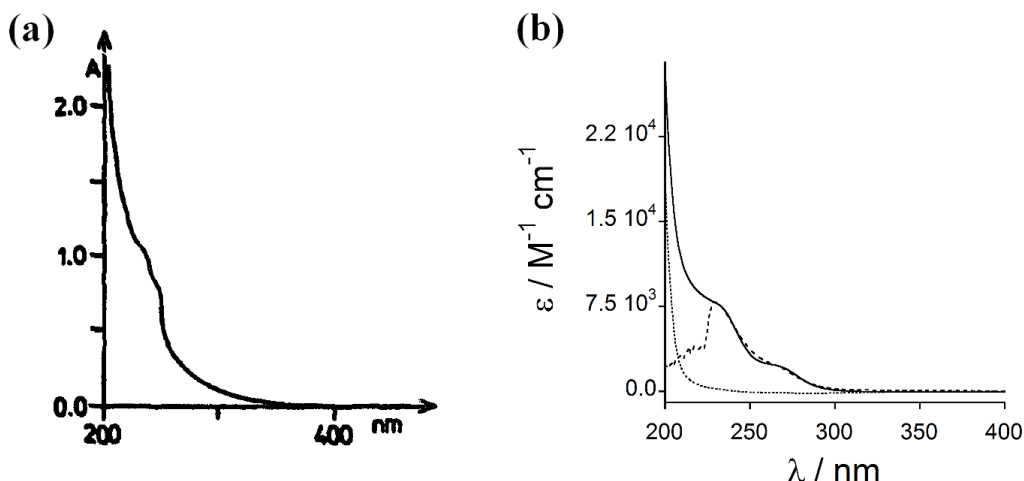


Figure 71 : Spectres d'absorption UV-Vis (a) du complexe $(\text{Bu}_4\text{N})[\text{Au}^{\text{I}}(\text{SH})_2]$ ($375 \mu\text{M}$) dans l'acétonitrile sec, sous argon et à température ambiante (trajet optique = 1 cm)⁹; (b) de l'acide thiomalique (pointillés), l'aurothiomalate (trait plein) et le complexe $(\text{Au}^{\text{I}}\text{SG})_n$ (tirets) en tampon phosphate 20 mM à pH $7,0$ et 298 K .

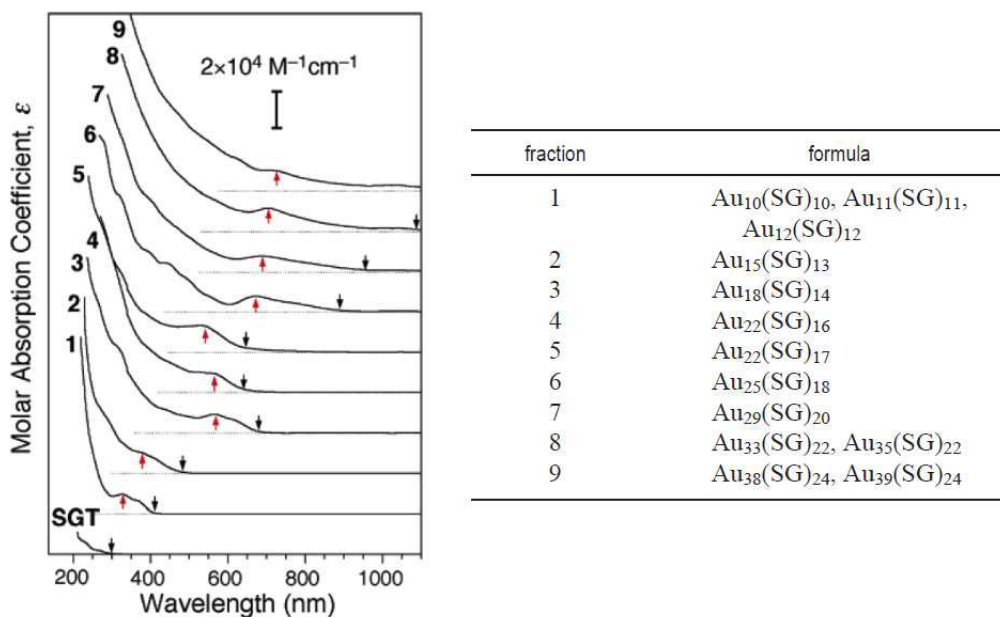


Figure 72 : A gauche, spectres d'absorption UV-Vis de l'aurothiomalate (SGT) et des clusters or-glutathion 1-9 de tailles croissantes. Les flèches rouges indiquent les transitions interbandes $5d \rightarrow 6sp$ et les transitions intrabandes $6s \rightarrow 6sp$, les flèches noires indiquent la fin de ces bandes. A droite, composition chimiques des clusters d'or 1-9.¹⁰

Des données supplémentaires peuvent être obtenues par dichroïsme circulaire. En effet, il a été montré que les complexes polymériques $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-cystéine})_n$ possèdent, en CD, des bandes intenses à des longueurs d'onde assez élevées, vers $280 (-)$, $340 (+)$ et $360 (-)$ nm, qui

pourraient résulter de transitions Au^I-Au^I interbandes et intrabandes (Figure 73).¹¹ Il est important de noter que ce complexe n'est pas stable en solution et finit par précipiter, ceci a alors été attribué à la formation d'un polymère solide très stable. Cependant, au moment de la publication (1977), le caractère polymérique des complexes (Au^I-thiolates)_n n'était pas encore connu, la structure cristallographique de l'aurothiomalate montrant clairement sa structure polymérique ne datant que de 1998.³ Or, ces complexes polymériques (Au^I-thiolates)_n sont parfaitement solubles en solution aqueuse. Ainsi, il semblerait que la formation de ce précipité soit en fait le résultat de l'agrégation d'or et de cystéines formant une structure de masse importante, autrement dit un cluster. Ceci est en accord avec la forte intensité des bandes observées et le fait que les transitions soient à des énergies comparables à celles des cluster Au_n(SG)_m de petite taille (n = 10-15 et m = 10-13). Dans le cas où ni des transitions de transfert de charge ni des transitions interbandes ou intrabandes ne seraient visibles par CD, l'analyse des spectres obtenus permettra tout de même d'avoir des informations sur les changements structuraux provoqués par l'aurothiomalate. Ceci nous permettra donc de déterminer si l'action de l'aurothiomalate sur les doigts de zinc entraîne leur déstructuration potentiellement à même d'inhiber leur activité. Ainsi, dans leur article sur l'interaction de l'Au^ITm avec les peptides doigts de zinc C2H2, Hanas *et al.*² n'ont pas cherché à identifier la présence de bandes après 250 nm. Mais le spectre du complexe Au^I-Sp1-3 (Figure 73) leur a permis de conclure que le peptide se replie sous une conformation différente de celle de Zn^{II}-Sp1-3 et n'adopte clairement pas une structure de type « random coil » comme Sp1-3 à pH 2,2. On observe également l'augmentation du signal vers 218 nm vers des valeurs positives qui pourraient correspondre à une bande de transfert de charge CysS→Au^I sans que ce soit commenté par les auteurs.

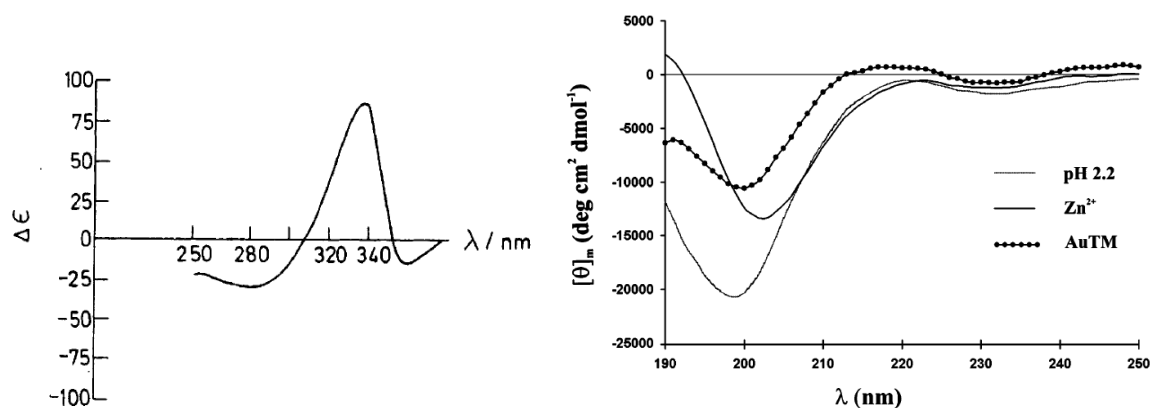


Figure 73 : Spectre de dichroïsme circulaire d'un complexe cystéinato-or(I) obtenu en solution, à gauche, et du peptide Sp1-3 libre à pH 2,2 ; complexé au Zn²⁺ ou à l'Au^ITm à pH 6,8 et à 298 K, à droite.

4.3. PROPRIETES DE COMPLEXATION DE L'AU^ITM SUR LES CP1

4.3.1. Interaction de CP1(CCHH) avec Au^ITm

Dans un premier temps, nous allons étudier la réactivité du peptide CP1(CCHH) avec l'aurothiomalate en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et 298 K. Dans ce chapitre, toutes les réactions seront réalisées sous atmosphère inerte en boîte à gants de façon à éviter toute oxydation à l'air des cystéines. Nous commençons par ce peptide car il s'agit du cas le plus simple à expliquer pour se familiariser avec les caractéristiques spectroscopiques des complexes Au^I-CP1 formés. Nous avons réalisé un titrage de CP1(CCHH) (14 μM) par l'aurothiomalate que nous avons suivi par spectroscopie d'absorption UV-Vis. On observe alors l'apparition de bandes à 203 et 230 nm attribuées à des transitions de transfert de charge LMCT CysS→Au^I (Figure 74(a)). Ces bandes augmentent de façon linéaire jusqu'à atteindre un point d'inflexion après l'ajout d'environ un équivalent d'Au^ITm (Figure 74(b)) signe de la formation d'un complexe Au^I-CP1(CCHH) avec un ratio 1:1. Après un équivalent, les bandes LMCT à 203 nm continuent à augmenter de façon linéaire mais avec une pente deux fois moins importante que précédemment.

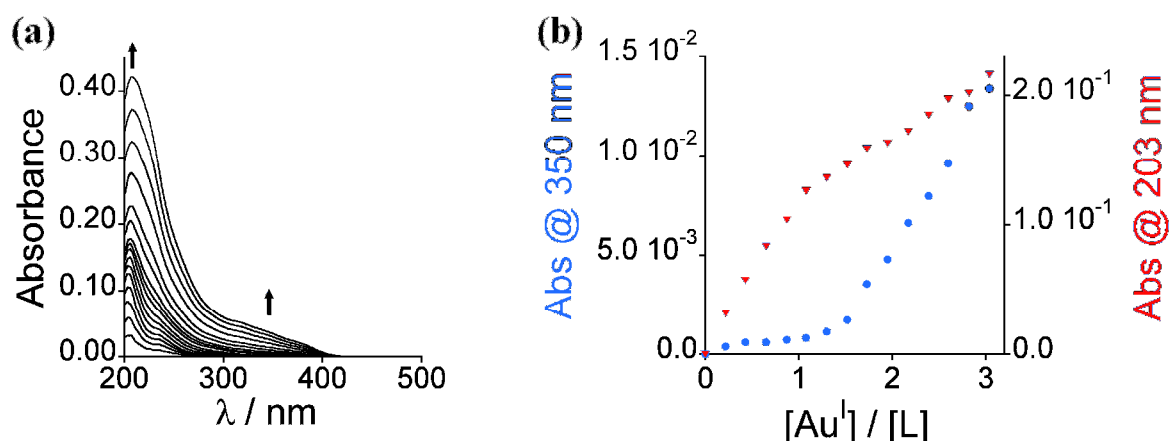


Figure 74 : (a) Titration by UV-Vis absorption of CP1(CCHH) (14 μ M) by Au^{I} Tm (0-6,9 eq.). (b) Monitoring of the absorbance at 350 nm (in blue) and 203 nm (in red) as a function of the number of equivalents of Au^{I} Tm added. The analyses were performed in phosphate buffer (20 mM) at pH 7,0 and at 298 K. The spectra were corrected for dilution and the spectrum of the free peptide was subtracted from each spectrum. Optical path: 0,4 cm.

Dans leur article concernant l'interaction de l'aurothiomalate avec les métallothionéines, Shaw *et al.*^{12,13} ont mis en évidence que l'or(I) peut se complexer de deux manières différentes suivant les conditions. Quand la protéine est en excès par rapport à l' Au^{I} Tm, elle est capable de déplacer le ligand thiomalate du complexe d'or(I). Il y a ainsi complexation de l'or(I) par deux des cystéines de la métallothionéine pour donner une entité $\text{CysS-Au}^{\text{I}}\text{-SCys}$ avec une géométrie linéaire. Dans le cas où l'aurothiomalate est en excès par rapport à la métallothionéine, Shaw *et al.*^{12,13} ont observé que le complexe d'or(I) conserve son ligand thiomalate et se complexe à toutes les cystéines présentes dans la métallothionéine conduisant à la formation de complexes $\text{CysS-Au}^{\text{I}}$ Tm. La formation d'un tel complexe a également été mise en évidence par cristallographie pour la cathépsine K (Figure 18).¹⁴ Ainsi, la formation du complexe Au^{I} -CP1(CCHH) avec un ratio 1:1 correspond à la complexation de l'or(I) sur les cystéines 4 et 7 formant une entité $\text{CysS-Au}^{\text{I}}\text{-SCys}$ qui présente des bandes LMCT $\text{CysS} \rightarrow \text{Au}^{\text{I}}$ absorbant fortement à 203 nm.

La pente deux fois moins importante après un équivalent peut s'expliquer par la formation d'une autre espèce avec, par exemple, des entités $\text{CysS-Au}^{\text{I}}$ Tm mais elle peut aussi résulter de l'accumulation d'aurothiomalate dans la solution. Cependant, à partir d'environ 1,5 équivalent d' Au^{I} Tm ajoutés, on observe également l'apparition de nouvelles bandes d'absorption larges entre 280 et 400 nm. Ces bandes sont situées à des énergies compatibles

avec les transitions intrabandes $6s \rightarrow 6sp$ caractéristiques de la présence d'interactions $\text{Au}^{\text{I}}-\text{Au}^{\text{I}}$ observées pour les clusters d'or $\text{Au}_n(\text{SG})_m$ avec $n = 10-12$ et $m = 10-12$ (Figure 72). Si on suit l'évolution de l'absorbance à 350 nm en fonction du nombre d'équivalents d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ (Figure 74(b)), on n'observe pas la formation d'un plateau même en poursuivant le titrage jusqu'à environ 8 équivalents indiquant qu'il y a toujours complexation d'or(I) sur le peptide à ce stade. Ceci peut s'expliquer par la formation d'un cluster $\text{Au}_n^{\text{I}}\text{-peptide}_m$. Enfin, on observe un décalage entre le point d'inflexion à 203 nm indiquant la formation du complexe 1:1 à un équivalent d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ et l'apparition des bandes entre 280 et 400 nm correspondant à la formation du cluster $\text{Au}_n^{\text{I}}\text{-peptide}_m$ à 1,5 équivalent d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$, ceci semble indiquer l'existence d'une autre espèce en présence d'un faible excès d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$.

De façon à confirmer ces résultats, nous avons suivi le titrage de CP1(CCHH) (16 μM) par l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ par dichroïsme circulaire dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 75). Le spectre CD du peptide libre (Figure 75 en noir) présente une signature spectroscopique caractéristique d'un « random coil » avec une bande très négative vers 200 nm. Au cours du titrage, on observe deux phases qui présentent des signatures spectroscopiques en CD très différentes l'une de l'autre (Figure 75). Au cours de la première phase, on observe l'apparition de bandes à 214 (+), 235 (-) et 246 (+) nm dont l'intensité augmente jusqu'à atteindre un maximum après l'ajout d'un équivalent d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$. Ceci confirme la formation d'un complexe $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CP1(CCHH)}$ avec un ratio 1:1. Ces bandes sont probablement encore liées à des transferts de charge LMCT $\text{CysS} \rightarrow \text{Au}^{\text{I}}$ et sont également visibles sur le spectre CD de Sp1-3 complexé à l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ mais avec des intensités très faibles (Figure 73). De plus, bien que la bande à 200 nm soit toujours négative (Figure 75) signe que l'ajout d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ ne permet pas au peptide de se replier sous forme $\beta\beta\alpha$, on observe néanmoins que le signal à 200 nm tend vers des valeurs moins négatives. Ceci pourrait être le signe d'une structuration partielle du fait de la complexation de l'or(I) par les deux cystéines. Quand on poursuit le titrage après un équivalent d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ ajouté, on observe la décroissance de ces bandes ainsi que l'apparition de nouvelles bandes à 270 (-), 336 (+) et 384 (-) nm. Celles-ci rappellent les bandes rencontrées pour les complexes polymériques cystéinato- Au^{I} (Figure 73) et ceci confirme la formation d'entités polymériques ou clusters de formule $\text{Au}_n^{\text{I}}\text{-peptide}_m$.¹¹ L'apparition du cluster s'accompagne d'une évolution vers les valeurs négatives du CD à 200 nm, signe d'une déstructuration du peptide.

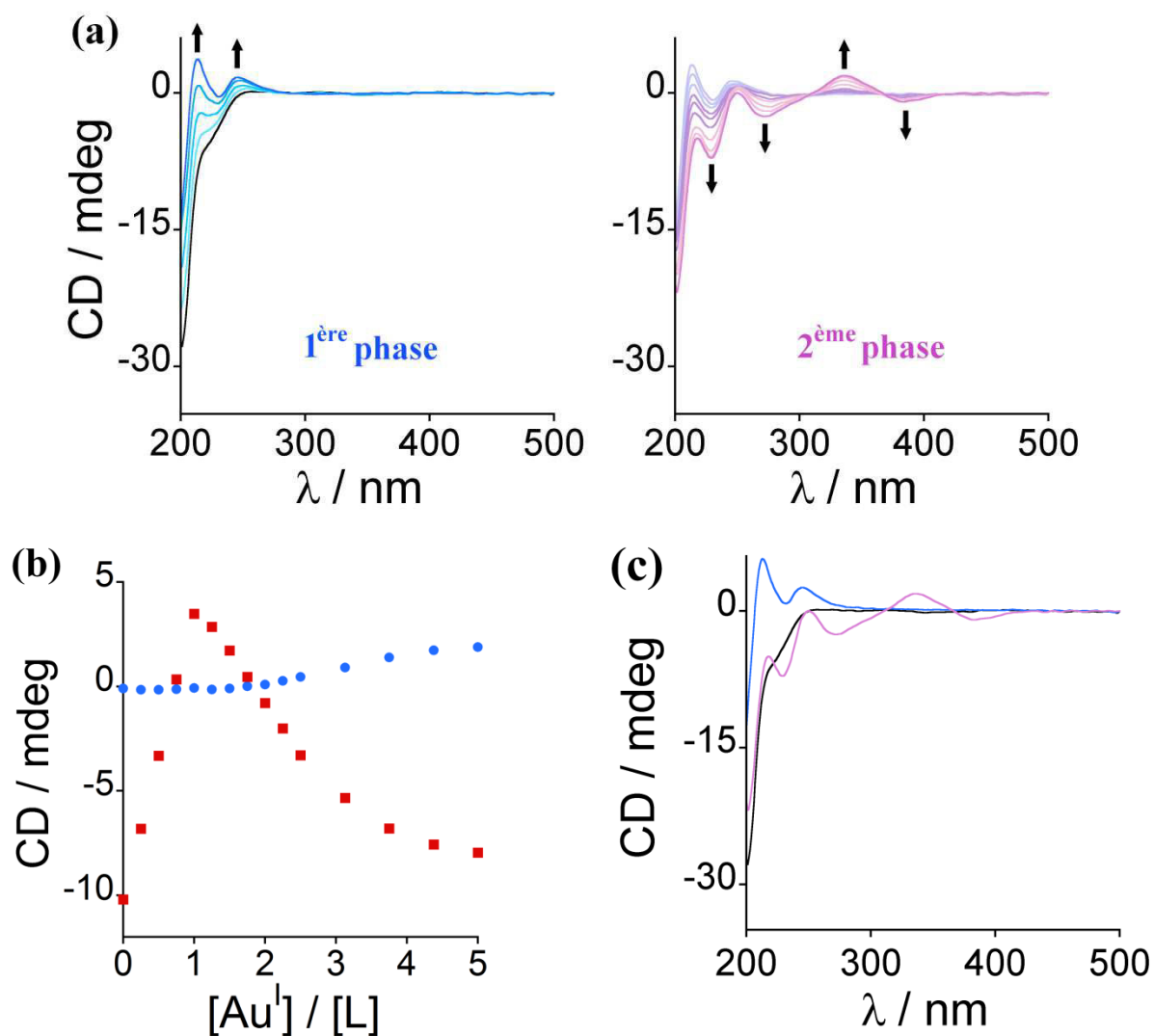


Figure 75 : Titrage de CP1(CCHH) (16 μ M) par Au^ITm par dichroïsme circulaire en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. (a) Spectres CD observés au cours de la première phase (0-1 éq. Au^ITm, à gauche) et de la deuxième phase (1,25-5 éq. Au^ITm, à droite). (b) Suivi du signal CD à 212 nm (en rouge) et 336 nm (en bleu) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm. (c) Spectres CD du peptide CP1(CCHH) non métallé (en noir), du complexe peptidique Au^I-CP1(CCHH) (en bleu) et du cluster or-peptide (en rose). Tous les spectres ont été corrigés de la dilution. Trajet optique : 0,4 cm.

Afin de vérifier la nature des espèces formées, nous avons contrôlé le mélange réactionnel par spectrométrie de masse après l'ajout de différents équivalents d'Au^ITm (0,5 ; 1 et 4 éq.) sur CP1(CCHH) (50 μ M) en tampon acétate d'ammonium pH 7,0. A 0,5 et 1 équivalent, on obtient des spectres de masse similaires (Figure 76) où on observe très clairement la présence d'une espèce majoritaire qui présente des pics de masse $m/z = 790,3$

([M+5H]⁴⁺), 1053,3 ([M+4H]³⁺) et 1579,3 ([M+3H]²⁺) avec M = [C₁₂₇H₂₀₀N₃₈O₄₀S₂Au]⁻ qui correspondent bien à la formation du complexe Au^I-CP1(CCHH) identifiée par absorption UV-Vis. On remarque aussi la présence de pics de masse de faibles intensités relatives à m/z = 876,7 ([M+6H]⁴⁺); 1168,7 ([M+5H]³⁺) ; 1752,3 ([M+4H]²⁺) avec M = [C₁₃₁H₂₀₄N₄₀O₄₂S₃Au₂]⁻ qui correspondent à la formation d'un complexe où le peptide est lié à deux ions Au^I et un thiomalate, TmAu₂-CP1(CCHH). On observe également une faible proportion d'*apo*-peptide (m/z = 740 ([M+4H]⁴⁺) ; 987,3 ([M+3H]³⁺) et 1480,3 ([M+2H]²⁺)) avec M = [C₁₂₇H₂₀₂N₃₈O₄₀S₂]. Finalement, quand quatre équivalents d'Au^ITm sont ajoutés au peptide, on n'observe plus aucun signal par spectrométrie de masse. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'une espèce de très fort poids moléculaire qui ne désorbe pas, en accord avec la formation d'un cluster en fin de titrage.

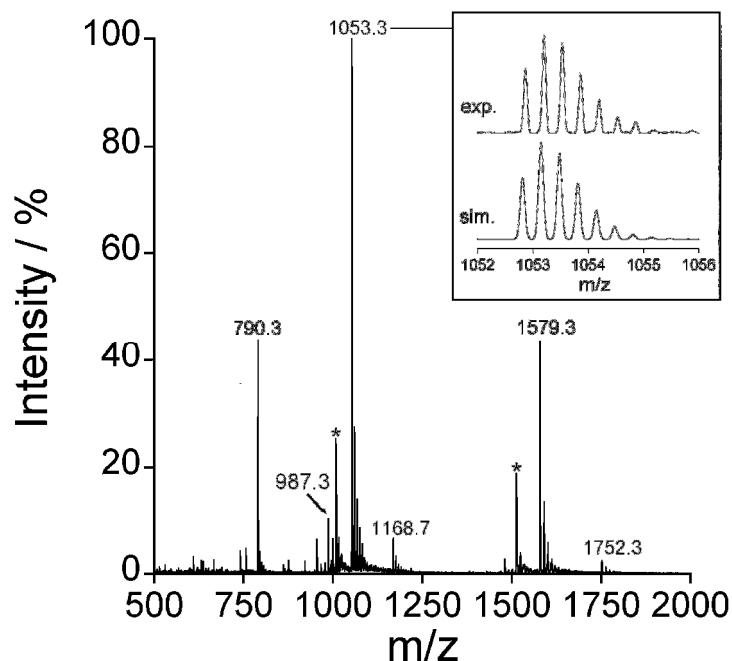


Figure 76 : Spectre de masse obtenu après réaction de CP1(CCHH) (L, 50 μ M) avec 0,5 eq d'Au^ITm en tampon acétate d'ammonium (20 mM) à pH 7,0. Les pics de masse marqués par des astérisques correspondent aux espèces [L + Zn^{II} + 1H]³⁺ et [L + Zn^{II}]²⁺ du complexe peptidique Zn^{II}-CP1(CCHH) et sont dus à la présence de zinc dans la source du spectromètre de masse. En insert, « zoom scan » expérimental (haut) et théorique (bas) du pic de masse à m/z = 1053,3 correspondant à l'espèce [L + 4H + Au^I]³⁺.

Ainsi, l'aurothiomalate est bien capable de réagir avec le peptide CP1(CCHH) pour donner de façon majoritaire un complexe Au^I-CP1(CCHH) ainsi qu'un complexe TmAu₂-

CP1(CCHH) (Figure 77). Ces complexes ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse et présentent des transitions LMCT RS→Au^I dans la région UV observables à la fois par spectroscopie d'absorption UV-Vis et CD. En présence d'un excès d'aurothiomalate, on observe la formation d'une nouvelle espèce dont la taille est trop importante pour être analysée par spectrométrie de masse et qui possède des signatures spectroscopiques en absorption UV-Vis et CD caractéristiques des transitions intrabandes (6s→6sp) observées pour les clusters or-thiولات suggérant la formation d'un cluster en fin de titrage (Figure 77).

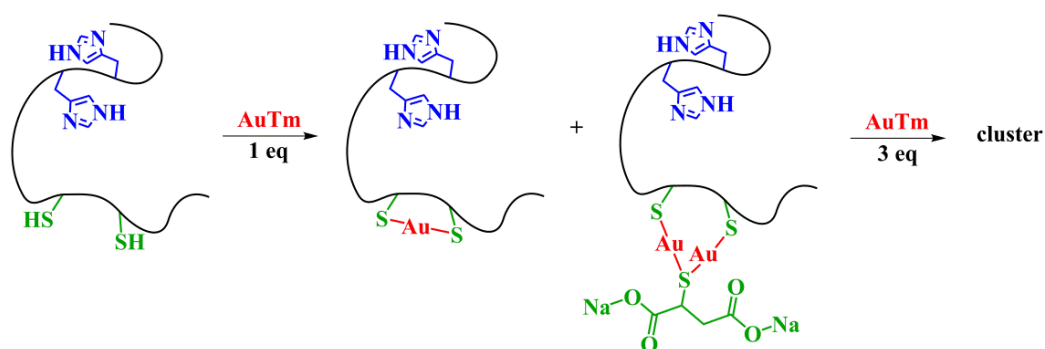


Figure 77 : Complexation de l'aurothiomalate sur le peptide CP1(CCHH) observée au cours des différents titrages.

4.3.2. Interaction de CP1(CCCC) avec Au^ITm

4.3.2.1. Caractérisation spectroscopique des complexes Au^I_n-CP1(CCCC)

Nous allons à présent nous intéresser à la caractérisation des espèces formées au cours de la réaction de l'aurothiomalate avec le peptide CP1(CCCC). Comme précédemment nous avons suivi par spectroscopie d'absorption UV-Vis le titrage de CP1(CCCC) (19 μM) par l'Au^ITm en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. On observe alors que le peptide CP1(CCCC) présente un comportement comparable à celui de CP1(CCHH) quand il est mis en présence d'Au^ITm (Figure 78). En effet, dans un premier temps, nous observons uniquement l'augmentation linéaire des bandes de transfert de charge LMCT CysS→Au^I situées à 204, 233 et 290 nm jusqu'à ce qu'environ 2 équivalents d'Au^ITm soient ajoutés sur le peptide, indiquant la formation d'un complexe Au^I-peptide avec un ratio 2:1, noté Au^I₂-CP1(CCCC). Lorsqu'on poursuit le titrage après 2 équivalents, on observe l'apparition des bandes de transitions intrabandes (6s→6sp) entre 300 et 400 nm caractéristiques de la

présence d'interactions or-or, signifiant très probablement la formation d'un cluster or-peptide. Cependant, on remarque que ces bandes sont moins intenses que précédemment ce qui pourrait être le signe de la formation de clusters de plus petite taille. On remarque également la présence de deux phases distinctes lorsqu'on suit l'évolution de l'absorbance à 203 nm après 2 équivalents. En effet, dans un premier temps, il n'y a qu'une très faible augmentation de l'absorbance entre 2 et 3 équivalents d'Au^ITm ajoutés puis on observe un nouveau point d'inflexion vers 3 équivalents d'Au^ITm avec l'absorbance qui augmente très fortement. Ainsi, l'existence de cette phase intermédiaire entre 2 et 3 équivalents d'Au^ITm pourrait signifier qu'il y a formation d'un complexe Au^I-CP1(CCCC) avec un ratio 3:1 au sein duquel il existe des interactions or-or avant que le système n'évolue vers la formation d'un cluster.

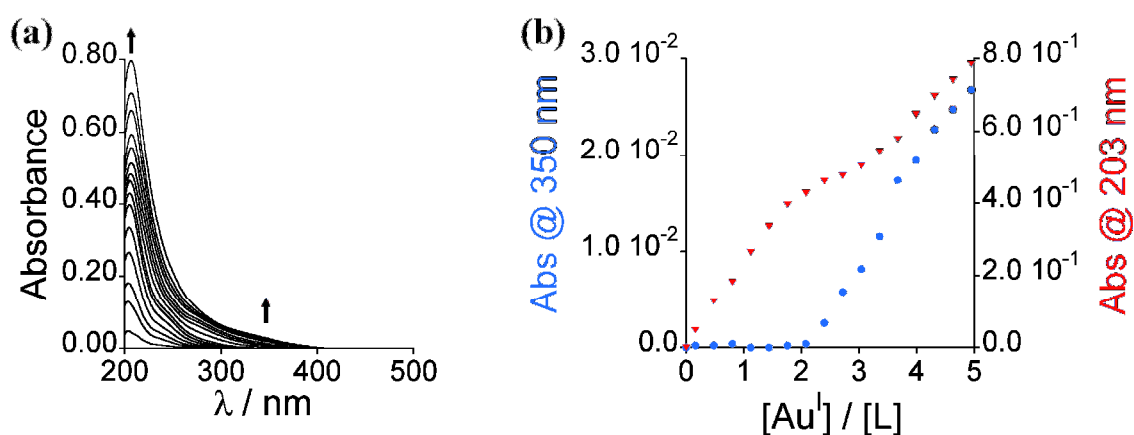


Figure 78 : (a) Titrage par absorption UV-Vis de CP1(CCCC) (19 μ M) par Au^ITm (0-4,95 eq.). (b) Suivi de l'absorbance à 350 nm (en bleu) et 204 nm (en rouge) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm ajoutés. Les analyses ont été effectuées en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et à 298 K. Les spectres ont été corrigés de la dilution et le spectre du peptide libre a été soustrait de chaque spectre. Trajet optique : 0,4 cm.

Ce titrage a également été suivi par dichroïsme circulaire (Figure 79). On observe alors très clairement l'existence de quatre phases bien distinctes de 0 à 1 eq. , 1 à 2 eq. , 2 à 3 eq. et plus de 3 équivalents d'Au^ITm avec des signatures spectroscopiques en CD très différentes (Figure 80 et Tableau 7). On observe un déplacement bathochrome des bandes les plus intenses observées sur les spectres CD à 219 nm, 248 nm, 284 nm puis 334 nm en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm. Ces bandes peuvent très probablement être attribuées à des transitions LMCT CysS \rightarrow Au^I et/ou à des transitions or-or interbandes (5d \rightarrow 6sp) et

intrabandes (6s→6sp). Ce titrage suggère la complexation successive de un puis deux puis trois ions aureux sur le peptide. En fin de titrage, des bandes à 270 (-), 334 (+) et 388 (-) nm signent la formation d'un cluster similaire à celui observé avec CP1(CCHH). Ainsi, le titrage par CD a permis de confirmer l'existence des complexes Au^I₂-CP1(CCCC) et Au^I₃-CP1(CCCC) et a permis de mettre en évidence la formation du complexe Au^I-CP1(CCCC) en début de titrage.

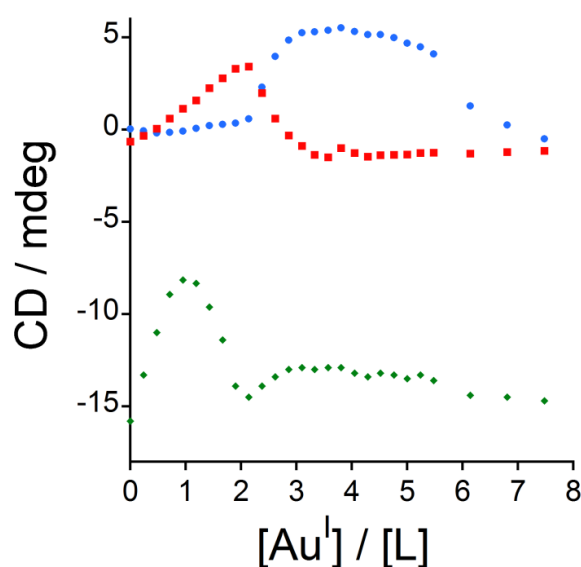


Figure 79 : Suivi du titrage par dichroïsme circulaire de CP1(CCCC) (15 μM) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^I en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. Le suivi est réalisé à 284 nm (en bleu), 243 nm (en rouge) et 208 nm (en vert). Les spectres sont corrigés de la dilution, trajet optique : 0,4 cm.

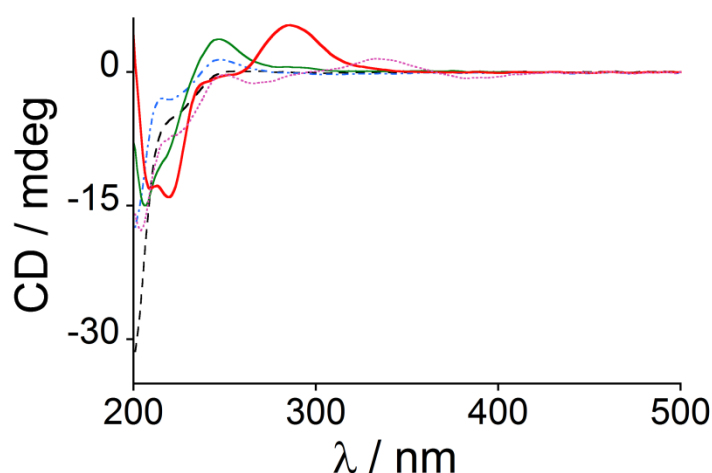


Figure 80 : Spectres CD de CP1(CCCC) (15 μ M) non métallé (en tirets noirs) ou après réaction avec l'Au^ITm : 1 (en tirets et pointillés bleus) ; 2 (en trait plein vert) ; 3 (en trait plein rouge) ou 7,5 éq. (en pointillés roses) en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. Les spectres sont corrigés de la dilution, trajet optique : 0,4 cm.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des données CD pour les complexes Au^I_n-CP1(CCCC).

Complexe peptidique	λ [nm] (+/-)
Au ^I -CP1(CCCC)	219 (-) ; 246 (+)
Au ^I ₂ -CP1(CCCC)	208 (-) ; 219 (-) ; 248 (+) ; 290 (+)
Au ^I ₃ -CP1(CCCC)	208 (-) ; 221 (-) ; 284 (+) ; 330 (+)
Cluster	205 (-) ; 225 (-) ; 250 (-) ; 270 (-) ; 334 (+) ; 388 (-)

Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé par spectrométrie de masse des échantillons contenant le peptide (50 μ M) en présence de différents équivalents d'Au^ITm (1, 2, 3 et 6 éq.) en tampon acétate d'ammonium pH 7,0. Au fur et à mesure des ajouts, les spectres de masse montrent l'apparition des complexes Au^I-CP1(CCCC), Au^I₂-CP1(CCCC) et Au^I₃-CP1(CCCC). Ainsi, à un équivalent d'Au^ITm, Au^I-CP1(CCCC) est l'espèce majoritaire et présente des pics de masse à $m/z = 773,4$ ([M+5H]⁴⁺) ; 1030,6 ([M+4H]³⁺) (Figure 81(a)) et 1545,3 ([M+3H]²⁺) avec M = [C₁₂₁H₁₉₆N₃₆O₃₈S₄Au]. A deux et trois équivalents d'Au^ITm, on observe la diminution d'intensité relative puis la disparition de ce complexe au profit de la formation du complexe Au^I₂-CP1(CCCC) qui présente des pics de masse à $m/z = 822,3$

([M+6H]⁴⁺); 1095,9 ([M+5H]³⁺) (Figure 81(b)) et 1643,2 ([M+4H]²⁺) avec M = [C₁₂₁H₁₉₄N₃₆O₃₈S₄Au₂]²⁻. Le complexe Au^I₃-CP1(CCCC) est difficilement observable par spectrométrie de masse et n'a été caractérisé que sur l'échantillon à 6 éq. d'Au^ITm avec des pics de masse à m/z = 1741,7 ([M+3H]²⁺) avec M = [C₁₂₁H₁₉₄N₃₆O₃₈S₄Au₃]⁻ (Figure 81(c)). Il se peut qu'il ne soit pas très stable dans le spectromètre ou qu'il désorbe moins bien que les complexes 1:1 et 2:1.

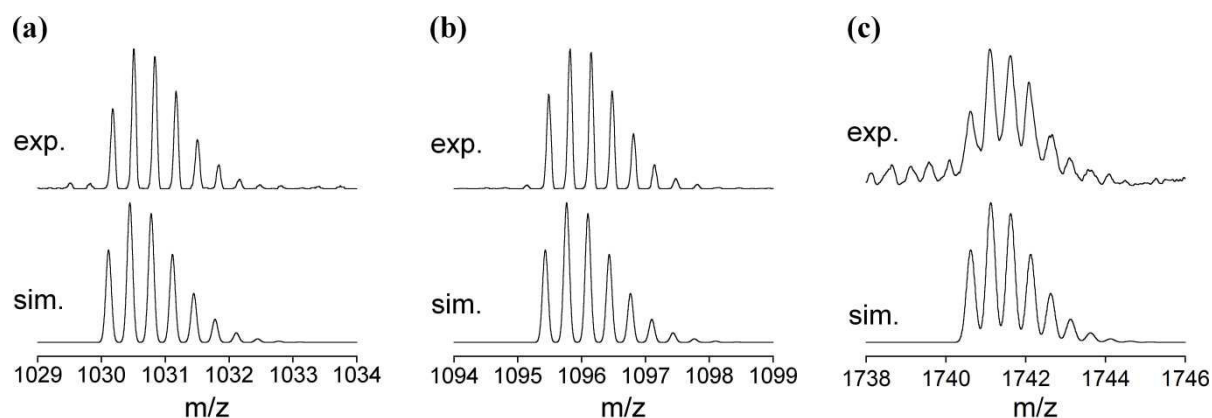


Figure 81 : « Zoom scans » des spectres ESI-MS et spectres théoriques des complexes (a) Au^I-CP1(CCCC) (m/z = 1030,2 [L + 2H + 1Au^I]³⁺), (b) Au^I₂-CP1(CCCC) (m/z = 1095,8 [L + 1H + 2Au^I]³⁺) et (c) Au^I₃-CP1(CCCC) (m/z = 1741,1 [L - 1H + 3Au^I]²⁺). Les spectres de masses ont été obtenus par réaction de CP1(CCCC) (L, 50 μM) avec (a) 1 éq., (b) 2 éq. et (c) 6 éq. d'Au^ITm en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7,0 et 298 K.

Si on s'intéresse à la signature CD des complexes Au^I_n-CP1(CCCC) entre 200 et 250 nm, on observe que Au^I-CP1(CCCC) est peu structuré et possède une signature de type « random coil » similaire à celle observée pour Au^I-CP1(CCHH). Le complexe Au^I₂-CP1(CCCC), quant à lui, possède un signal à 200 nm peu négatif et le minimum à 208 nm ainsi que l'épaule à 219 nm sont des signatures CD typiques des peptides doigts de zinc possédant un repliement ββ_α. Ceci suggère que la complexation de deux équivalents d'aurothiomalate conduit au repliement du peptide, cette structure n'est permise que si les ions aureux pontent deux cystéines éloignées dans la séquence peptidique (Figure 82). Pour le complexe Au^I₃-CP1(CCCC), le signal observé à 200 nm est positif ce qui confirme le repliement progressif du peptide. Ce dernier complexe est très stable comme l'atteste le plateau observé à toutes les longueurs d'onde après l'ajout de 3 équivalents d'Au^ITm. Ce n'est qu'après avoir ajouté 6 équivalents d'Au^ITm que le complexe évolue fortement vers la formation du cluster. On

observe alors que le signal à 200 nm tend de nouveau vers des valeurs négatives signifiant la perte de repliement du peptide. On en déduit alors le schéma de complexation représenté en Figure 82.

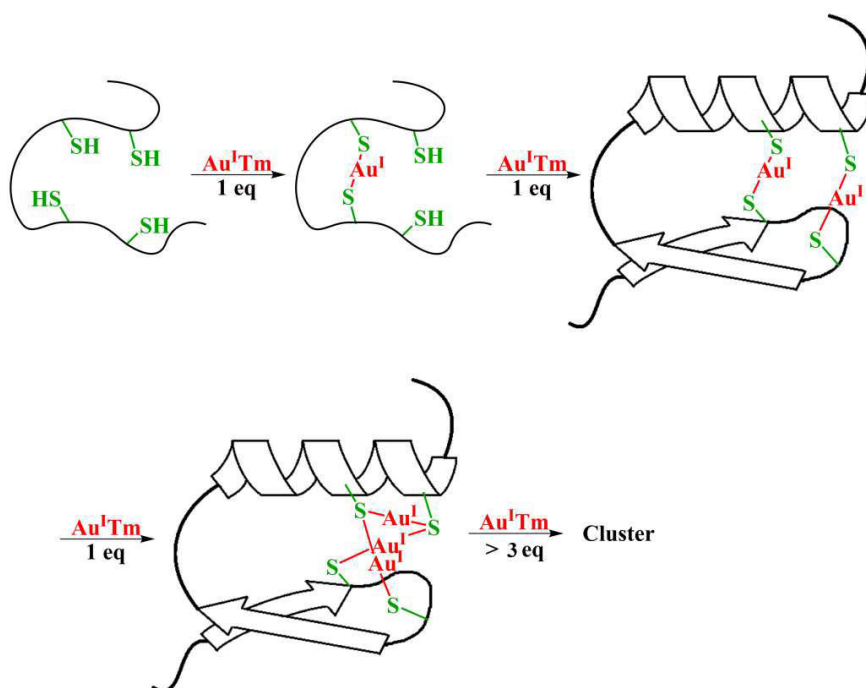


Figure 82 : Complexation de l'aurothiomalate sur le peptide CP1(CCCC).

4.3.2.2. *Structure en solution du complexe Au^I_3 -CP1(CCCC)*

D'après les données obtenues par CD, le peptide est replié pour les complexes peptidiques Au^I_2 -CP1(CCCC) et Au^I_3 -CP1(CCCC). Nous avons donc cherché à obtenir des informations structurales par RMN. Nous avons d'abord effectué un titrage en dissolvant le peptide (2,14 mM dans D_2O) dans un tube Young (pH ajusté à 6,23) puis en ajoutant l'aurothiomalate lentement sous argon. Ce titrage a révélé la formation préférentielle d'une espèce qui est totalement formée à partir de trois équivalents d'AuTm, suggérant qu'aux fortes concentrations utilisées pour la RMN, le complexe Au^I_3 -CP1(CCCC) s'accumule au dépend des autres complexes. Pour confirmer cela, un échantillon a été préparé avec le peptide (2.14 mM) et 3 équivalents d'AuTm. Le complexe formé a été dilué et sa signature CD correspond bien au complexe Au^I_3 -CP1(CCCC). Le spectre 1H RMN 1D de ce complexe présente des pics relativement fins et bien définis dans la région des protons NH et aromatiques (6,5 à 9,2 ppm) attestant d'un repliement bien défini du complexe. Nous avons

ensuite procédé à l'analyse en solution du complexe grâce à des spectres TOCSY, NOESY et COSY, à l'instar de ce que nous avons présenté dans le chapitre 1 pour Zn^{II}-L_{ZR}. Le spectre NOESY de ce complexe présente de nombreuses tâches de corrélations dipolaires révélatrices d'interactions à faibles distances entre les acides aminés et donc confirmant le repliement du peptide. L'attribution des déplacements chimiques et la détermination des distances H-H et des dièdres ont été réalisées par Olivier Sénèque à l'aide des différents spectres obtenus.

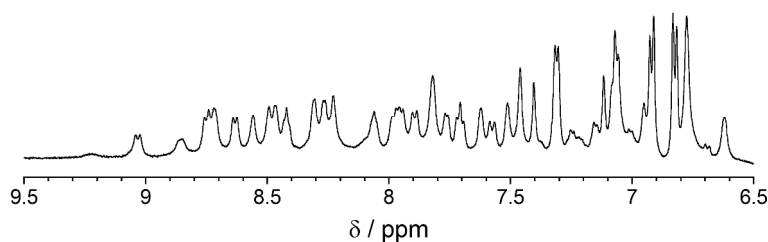


Figure 83 : Spectre 1D ¹H RMN de Au¹³-CP1(CCCC) dans la région des protons NH et aromatiques (500 MHz, 298 K, H₂O/D₂O 9:1, pH 6,23).

Dans un premier temps, la structure a été calculée avec XPLOR¹⁵ sans inclure les atomes d'or. La superposition des 10 structures de plus basses énergies obtenues est représentée en Figure 84(a). Ces structures se superposent presque parfaitement et révèlent que le peptide adopte un repliement similaire au repliement ββ α observé pour les peptides Zn^{II}-CP1 (Figure 84(e)). En effet, on retrouve bien l'hélice α en partie C-terminale du peptide ainsi que les feuillets β antiparallèles. Le cœur hydrophobe composé de Tyr2, Phe11 et Leu17 caractéristique de ces peptides est également formé. On remarque toutefois des variations de positions du squelette peptidique au niveau du coude contenant les deux premières cystéines et au niveau de la partie C-terminale.

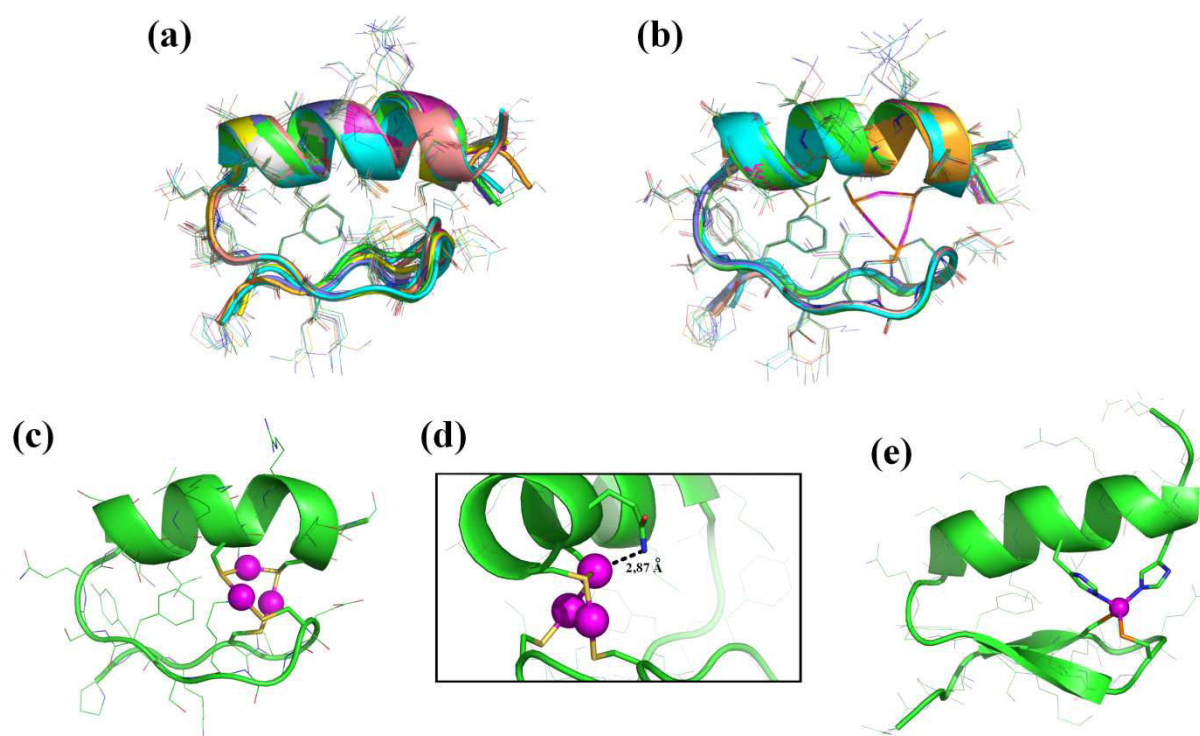


Figure 84 : (a-d) Structure en solution de $\text{Au}^{\text{I}}_3\text{-CP1(CCCC)}$ obtenue d'après les spectres TOCSY, NOESY et COSY. (a) Superposition des 10 structures de plus basse énergie calculées en utilisant XPLOR¹⁵ sans inclure les ions aureux dans le calcul. (b) Superposition des 10 structures de plus basse énergie calculées en utilisant XPLOR¹⁵ en incluant les ions aureux dans le calcul. (c) et (d) Deux vues de la structure de plus basse énergie de la configuration 8 du complexe $\text{Au}^{\text{I}}_3\text{-CP1(CCCC)}$. (e) Structure ^1H RMN de $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1(CCHH)}$ présentant le repliement $\beta\alpha$.

Dans un second temps, les trois ions Au^{I} ont été inclus dans le calcul des structures. D'après les données recueillies sur Cambridge Structural Database, on retrouve généralement dans les complexes or-thiolate des distances or-soufre de $2,30 \pm 0,03 \text{ \AA}$ avec des angles de liaison de $109,5^\circ$ pour C-S-Au^{I} et 180° pour $\text{S-Au}^{\text{I}}\text{-S}$. Ainsi, 16 configurations sont alors possibles pour complexer trois ions Au^{I} avec les quatre thiolates des cystéines (Figure 85). Parmi ces 16 configurations, 12 présentent des enchaînements linéaires $\text{S-Au}^{\text{I}}\text{-S-Au}^{\text{I}}\text{-S-Au}^{\text{I}}\text{-S}$ (configurations 1-12) et pour les quatre dernières, trois ions Au^{I} sont complexés sur un même soufre pour donner un enchaînement pyramidal $\text{S-(Au}^{\text{I}}\text{-S)}_3$. De façon à tenir compte des possibles interactions $\text{Au}^{\text{I}}\text{-Au}^{\text{I}}$, nous avons également imposé dans le calcul XPLOR des contraintes de distance de type NOE comprises entre 3.5 et 6.5 \AA pour deux Au voisins dans un enchaînement Au-S-Au . Ces valeurs limites sont larges de façon à laisser suffisamment de latitude pour que les distances or-or puissent varier au cours de la modélisation. Pour chacune

des 16 configurations, 50 structures ont été calculées. Nous avons retenu les critères suivants pour l'acceptation des structures : les différences de valeurs de NOE sont inférieures à 0,3 Å, les différences d'angles dièdres Φ et χ^1 inférieures à 5°, des distances Au^I-Au^I comprises entre 2,25 et 2,35 Å et des distances S-Au^I et des angles S-Au^I-S et Au^I-S-Au^I respectés à 0,03 Å et 5° près, respectivement. Après calculs, toutes les configurations sauf la configuration 8 ont été rejetées sur la base de ces critères (Tableau 8).

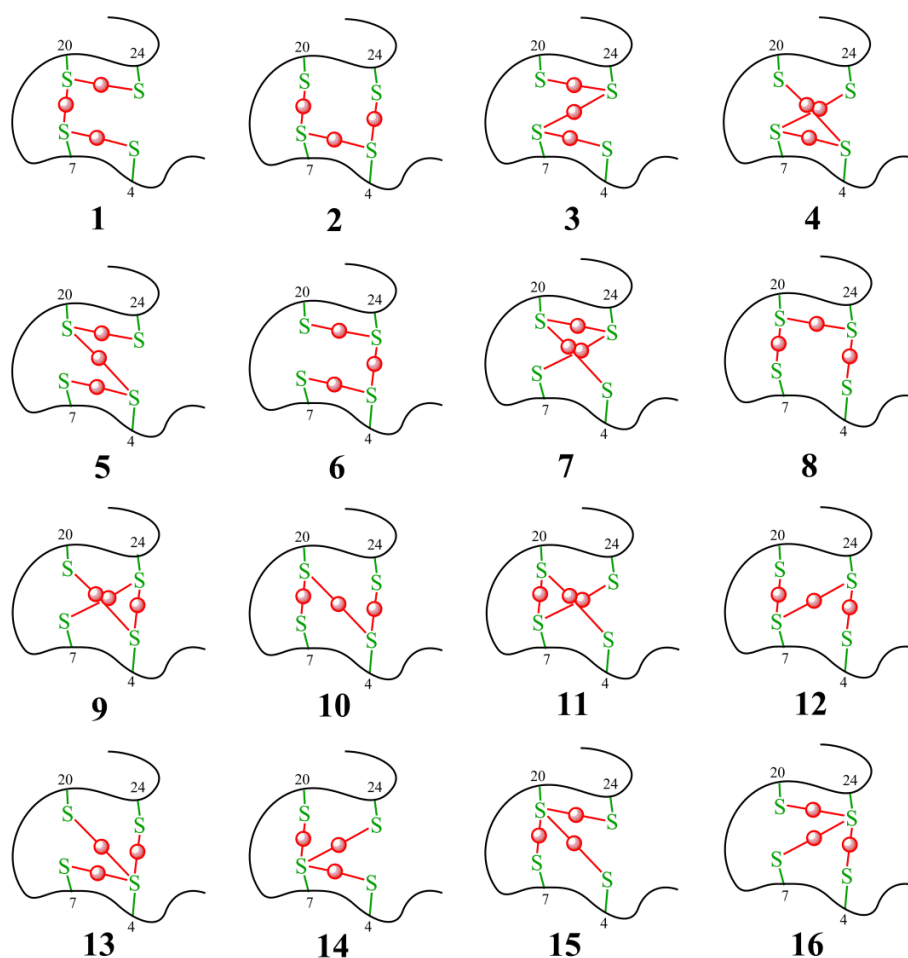


Figure 85 : Représentation des 16 configurations possibles pour placer trois Au^I au sein du peptide CP1(CCCC). Les ions Au^I sont représentés par des cercles rouges, les cystéines sont représentées avec le numéro de leur emplacement dans la séquence peptidique.

La Figure 84(b) montre la superposition des 10 structures de plus basses énergies obtenues pour la configuration 8 (S4-Au^I-S24-Au^I-S20-Au^I-S7). Les 10 structures se superposent parfaitement et adoptent toujours un repliement $\beta\beta\alpha$. La Figure 84(c) montre la structure de plus basse énergie obtenue pour Au^I₃-CP1(CCCC) et permet de mieux visualiser

le repliement du peptide. La présence des trois Au^I impose différentes torsions au peptide par rapport à un repliement $\beta\beta\alpha$ classique. La boucle en épingle à cheveux est distordue et l'hélice est moins régulière au niveau du dernier tour C-terminal qui dévie du repliement canonique des hélices α . Malgré tout, le cœur hydrophobe est parfaitement formé. Le léger déplacement du cœur hydrophobe par rapport à Zn^{II}-CP1(CCHH) est dû à l'absence d'histidine en position 20 qui fait normalement partie du cœur hydrophobe sur les doigts de zinc classiques C2H2.¹⁶ En ce qui concerne les trois Au^I, ils sont très proches les uns des autres (Tableau 8) et forment un mini-cluster au sein du peptide qui doit stabiliser le complexe du fait de la présence d'interactions aurophiles. Finalement, on remarque que la chaîne latérale de Gln21 est orientée de telle sorte que le doublet π de l'azote de son groupement amide interagisse à faible distance (2,87 Å) avec l'or(I) situé entre les cystéines 20 et 24 contribuant également à la stabilisation du complexe Au^I₃-CP1(CCCC) (Figure 84 (d)).

Tableau 8 : Données obtenues pour la structure en solution des différentes configurations (Figure 85) du complexe Au^I₃-CP1(CCCC).

	Distances Au ^I -Au ^I (Å)	Distances Au ^I -S (Å)	Energie totale (unités arbitraires)
1	3,20 ; 2,84 ; 3,88	2,22-2,31	509-534
2	3,27 ; 3,42 ; 5,69	2,21-2,26	400-412
3	2,85 ; 2,82 ; 4,05	2,21-2,36	771-825
4	3,20 ; 2,84 ; 3,88	2,21-2,34	660-713
5	3,06 ; 3,21 ; 4,98	2,21-2,33	472-604
6	2,94 ; 3,18 ; 4,32	2,20-2,32	505-527
7	3,00 ; 2,95 ; 3,18	2,25-2,31	683-724
8	2,95 ; 3,20 ; 3,55	2,26-2,32	419-438
9	2,74 ; 3,09 ; 3,22	2,23-2,32	599-829
10	3,38 ; 3,05 ; 5,03	2,21-2,34	436-453
11	3,15 ; 3,07 ; 3,30	2,22-2,28	637-670
12	2,89 ; 3,62 ; 5,84	2,20-2,32	595-619
13	3,06 ; 3,82 ; 2,95	2,18-2,34	546-582
14	3,30 ; 3,33 ; 4,38	2,17-2,23	642-664
15	3,07 ; 3,32 ; 3,84	2,19-2,32	571-590
16	2,69 ; 2,70 ; 3,30	2,19-2,43	862-894

4.3.3. Interaction de CP1(CCHC) avec Au^ITm

Nous avons analysé la complexation de l'Au^ITm avec le complexe CP1(CCHC) (20 μ M) en réalisant un titrage en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K suivi par absorption

UV-Vis. On observe alors un comportement assez similaire à celui observé pour CP1(CCCC) avec les bandes LMCT CysS→Au^I à 202 et 231 nm qui augmentent linéairement jusqu'à 2 équivalents d'aurothiomalate puis semblent atteindre un plateau entre 2 et 2,7 équivalents d'Au^ITm avant d'augmenter de nouveau très fortement. Après qu'environ 2 équivalents d'Au^ITm soient ajoutés au peptide CP1(CCHC), on observe l'apparition des transitions interbandes (5d→6sp) et/ou intrabandes (6s→6sp) entre 300 et 400 nm caractéristiques de la présence d'interactions or-or. Si on suit l'absorbance à 350 nm, on remarque quatre phases différentes : jusqu'à 2 équivalents, l'absorbance à cette longueur d'onde est nulle, puis le signal augmente fortement jusqu'à environ 5 équivalents avant d'atteindre un plateau à partir d'environ 5,5 équivalents, on remarque aussi qu'il y a une légère inflexion de l'absorbance entre 3,5 et 5,5 équivalents. Ces résultats semblent indiquer qu'il y a formation d'un complexe Au^I₂-CP1(CCHC) puis un cluster en fin de titrage avec éventuellement des espèces intermédiaires qu'il est impossible d'identifier simplement par ce titrage.

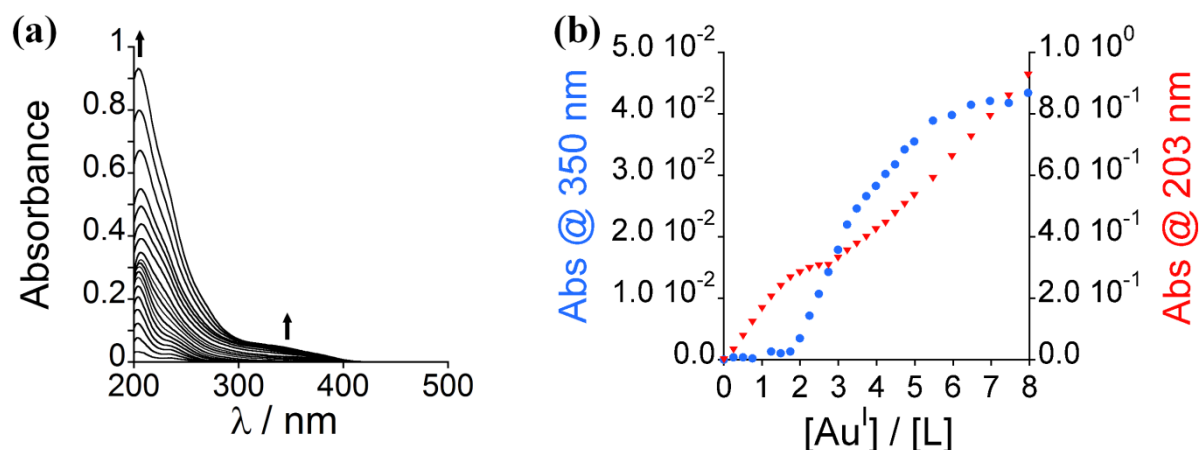


Figure 86 : (a) Titrage par absorption UV-Vis de CP1(CCHC) (20 μM) par Au^ITm. (b) Suivi de l'absorbance à 350 nm (en bleu) et 203 nm (en rouge) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm ajoutés. Les analyses ont été effectuées en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et à 298 K. Les spectres ont été corrigés de la dilution et le spectre du peptide libre a été soustrait de chaque spectre. Trajet optique : 0,4 cm.

L'analyse par dichroïsme circulaire montre clairement que les complexes formés ont une signature très similaire à celle rencontrée avec CP1(CCHH) (Figure 87). En effet, on observe une fois encore la formation d'un complexe Au^I-CP1(CCHC) 1:1 identifié par les bandes à 212 (+), 232 (-) et 246 (+) nm dont l'intensité augmente jusqu'à environ 1 équivalent

d'Au^ITm ajouté. Et, en fin de titrage, on observe la formation du cluster avec ses bandes caractéristiques à 250 (-), 270 (-), 338 (+) et 388 (-) nm. De plus, le signal vers 200 nm diminue en intensité mais reste négatif pendant tout le titrage, ce qui indique que la complexation d'Au^ITm ne conduit pas au repliement du peptide. Cependant, contrairement à ce qui était observé pour CP1(CCHH), les bandes caractéristiques du cluster ne commencent à apparaître qu'à partir de 3 équivalents d'Au^ITm ajoutés, suggérant l'existence d'une ou plusieurs espèces intermédiaires avant la formation du cluster. En effet, lorsqu'on suit l'évolution du système à 234 nm, on observe deux phases intermédiaires entre 1 et 1,7 équivalents d'Au^ITm ajoutés où le signal diminue très peu puis entre 1,7 et 3 équivalents où le signal diminue très fortement. Ceci pourrait suggérer la formation de complexes Au_n^I-CP1(CCHC) avec des ratios 2:1 et 3:1. Cependant, il n'y a pas de déplacement bathochrome des bandes de transition LMCT CysS→Au^I et/ou de transitions or-or interbandes (5d→6sp) et intrabandes (6s→6sp) pouvant le confirmer comme le montre le spectre de CP1(CCHC) en présence de 3 équivalents d'Au^ITm (Figure 87).

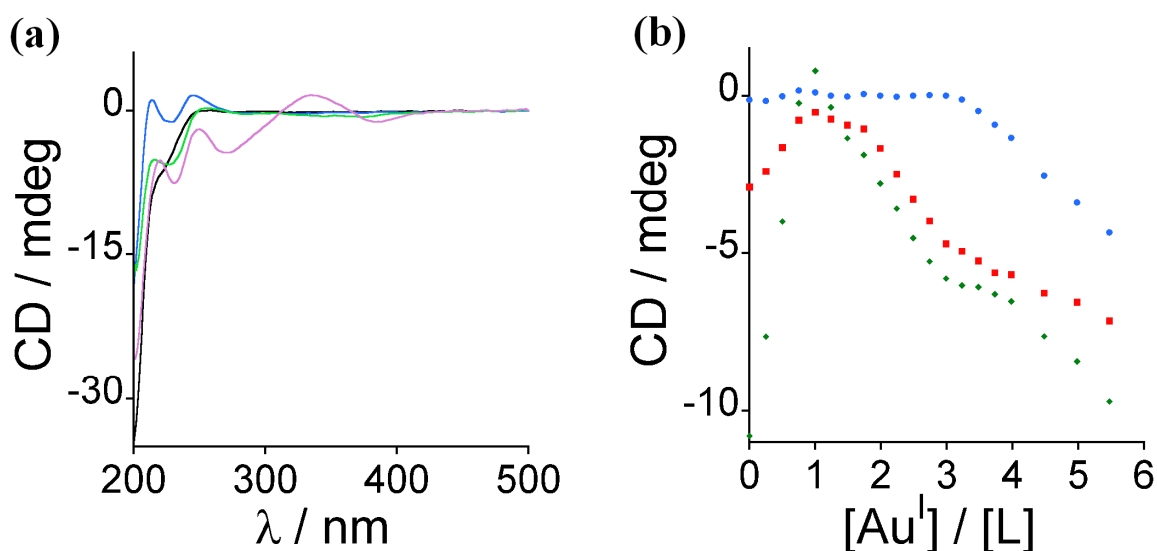


Figure 87 : (a) Spectres CD de l'*apo*-CP1(CCHC) (20 μM, en noir) ou après réaction avec 1 éq. (en bleu), 3 éq. (en vert) ou 5,5 éq. (en rose) d'Au^ITm. (b) Suivi du titrage à 268 nm (en bleu), 234 nm (en rouge) et 212 nm (en vert). Les analyses ont été effectuées en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et à 298 K. Les spectres ont été corrigés de la dilution. Trajet optique : 0,4 cm.

Ainsi, la réaction d'un équivalent d'aurothiomalate avec le peptide CP1(CCHC) conduit à la formation d'un complexe Au^I/CP1(CCHC) 1:1 qui présente des bandes LMCT CysS→Au^I

dans la région UV observables à la fois par spectroscopie d'absorption UV-Vis et CD. En présence d'un excès d'Au^ITm ($n > 3$ éq.), on observe la formation d'un cluster. Les analyses révèlent également la formation de complexes Au^I/CP1(CCHC) avec des ratios 2:1 et 3:1 sans qu'aucun repliement du peptide ne soit observable. Ces résultats n'ont pas encore été confirmés par des analyses par spectrométrie de masse et il est donc difficile de conclure quant à la nature des complexes formés. Compte tenu des analyses que nous avons faites précédemment sur CP1(CCHH) et CP1(CCCC), nous pouvons toutefois envisager que le complexe Au^I/CP1(CCHC) 1:1 corresponde à la complexation d'un Au^I pontant les cystéines 4 et 7 (Figure 88, voie du haut). Le complexe Au^I/CP1(CCHC) 2:1 correspondrait ainsi à la complexation d'un Au^ITm supplémentaire sur la cystéine 24 sans perte de son ligand thiomalate, formant le complexe CysS-Au^I-Tm. Finalement, le complexe Au^I/CP1(CCHC) 3:1 observé à 3 équivalents d'aurothiomalate pourrait correspondre à un enchaînement de type S4-Au^I-S7-Au^I-Tm-Au^I-S24 (Figure 88). Pour chacune de ces espèces, on peut également envisager qu'elle soit simplement le résultat de la complexation d'un équivalent d'Au^ITm sur une des cystéines libres sans déplacement du ligand thiomalate, conduisant à la formation de trois complexes CysS-Au^I-Tm (Figure 88, voie du bas). D'après les travaux réalisés par Shaw *et al.*¹² sur les métallothionéines, cette hypothèse semble peu vraisemblable pour les complexes Au^I/CP1(CCHC) 1:1 et 2:1 mais est tout à fait acceptable pour le complexe Au^I/CP1(CCHC) 3:1.

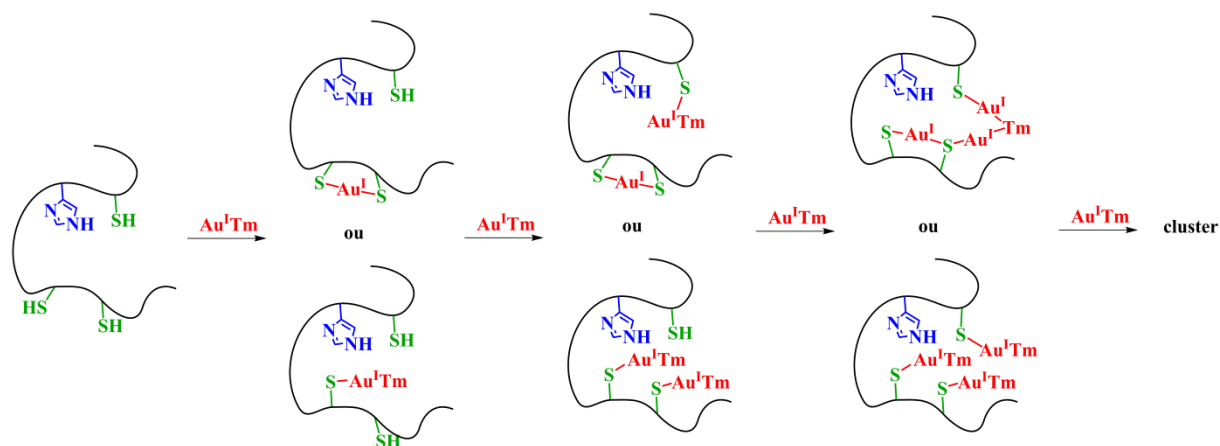


Figure 88 : Hypothèse de complexation de l'Au^ITm sur CP1(CCHC).

4.4. INTERACTION DE L'Au^I AVEC LES DOIGTS DE ZINC METALLES

A présent que nous avons caractérisé les espèces pouvant être formées par réaction de l'Au^ITm sur les peptides doigts de zinc CP1(CCHH), CP1(CCHC) et CP1(CCCC) et identifié leurs caractéristiques spectroscopiques, nous allons étudier la réactivité de ce complexe sur ces mêmes peptides lorsqu'ils sont métallés au zinc. Ces peptides possèdent des constantes de complexation apparentes fortes pour le zinc du même ordre de grandeur que L_{ZR} avec log K_{app} = 14,9 et 15,0 à pH 7,0 pour CP1(CCHH) et CP1(CCHC) respectivement et plus faible pour CP1(CCCC) avec log K_{app} = 12,6 à pH 7,0. Ainsi, le zinc pourrait avoir un rôle protecteur vis-à-vis de l'aurothiomalate pour ces peptides. D'après les résultats obtenus par Hanas *et al.* ainsi que ceux que nous avons obtenus au cours du chapitre précédent, l'Au^ITm devrait être capable de se substituer à l'ion Zn²⁺ pour ces peptides. Au cours de cette partie nous allons donc chercher à identifier la nature des produits formés au cours de la réaction entre les complexes peptidiques Zn^{II}-CP1 et l'Au^ITm en nous basant sur les résultats obtenus par CD pour les peptides libres, à quantifier le zinc libéré en solution sous l'action de l'Au^ITm et nous chercherons à déterminer les cinétiques de décomplexation du zinc de façon à vérifier si les temps de réaction sont compatibles avec une inhibition *in vivo* de ces doigts de zinc par l'Au^ITm.

4.4.1. Zn^{II}-CP1(CCHH)

4.4.1.1. Caractérisation des produits de la réaction entre Zn^{II}-CP1(CCHH) et Au^ITm

Dans un premier temps nous avons cherché à identifier les espèces formées au cours de la réaction entre Zn^{II}-CP1(CCHH) et l'aurothiomalate. Pour cela, nous avons réalisé des titrages par absorption UV-Vis et CD de Zn^{II}-CP1(CCHH) (20 ou 28 μM) par l'aurothiomalate en tampon phosphate (20 mM) à pH 7,0 et 298 K en laissant suffisamment de temps entre chaque ajout pour que le système soit équilibré (Figure 89).

On observe par absorption UV-Vis l'augmentation de l'absorbance entre 200 et 300 nm en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm. Cependant, on remarque que ces absorbances correspondant aux transitions de transfert de charge LMCT CysS→Métal présentent des maxima à 210 et 240 nm (Figure 89(a)). Ces absorbances diffèrent de celles observées

précédemment à 203 et 230 nm quand il y a complexation d'Au^I sur l'*apo*-peptide. Ceci s'explique par le fait que les complexes Zn^{II}-CP1(CCHH) et Au^I_n-CP1(CCHH) possèdent des bandes de transfert de charge LMCT CysS→Métal qui se superposent dans la région UV du spectre.¹⁶ Il n'est donc pas possible d'observer directement ni la décomplexation du zinc ni la complexation de l'Au^I à ces longueurs d'ondes. On observe également l'augmentation des bandes de transitions interbandes et intrabandes situées entre 300 et 400 nm dès le début du titrage (Figure 89(b)). Ainsi, le cluster Au^I_n-CP1(CCHH) se forme dès les premiers ajouts quand le complexe peptidique Zn^{II}-CP1(CCHH) réagit avec l'aurothiomalate.

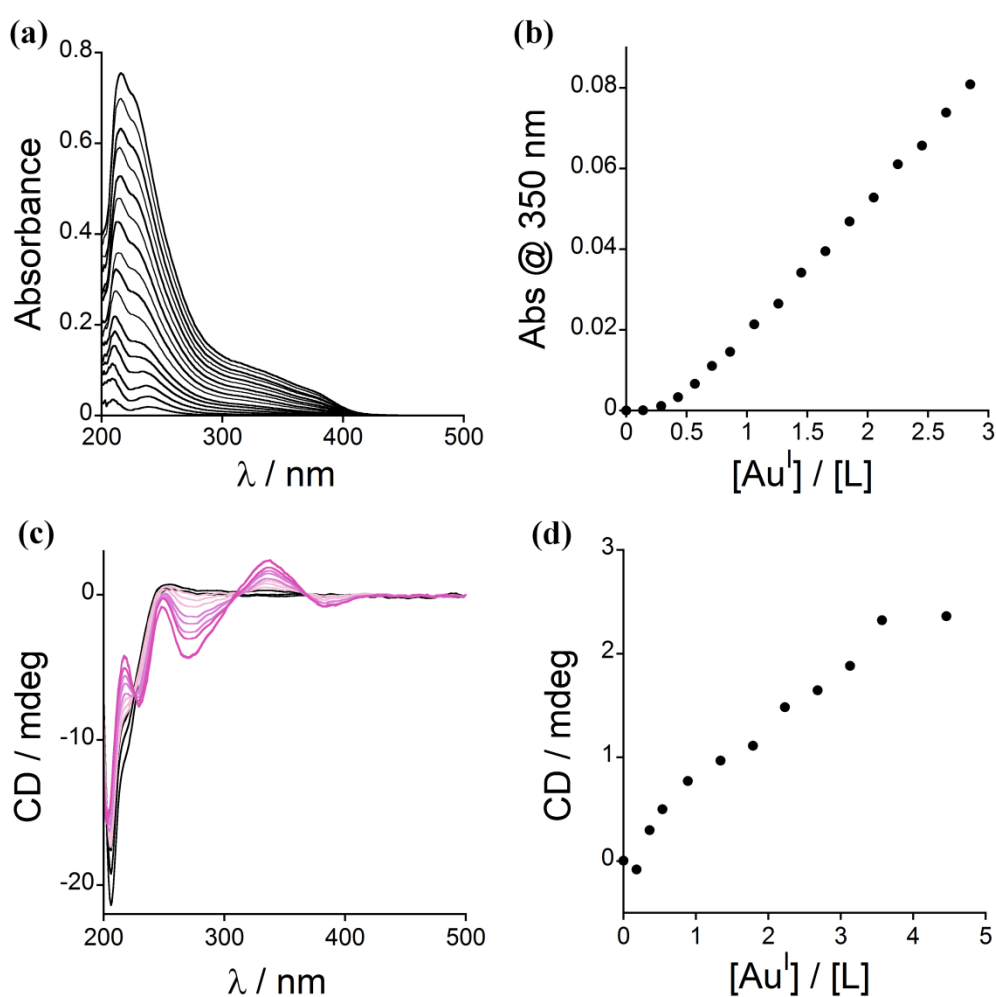


Figure 89 : Titrages UV (a) et CD (c) de Zn^{II}-CP1(CCHH) ((a) 28 μM et (c) 20 μM) par Au^ITm en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. (b et d) Suivi du titrage (b) UV à 350 nm et (d) CD à 336 nm en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm. Les spectres sont corrigés de la dilution, trajets optiques : 1,0 cm (a et b) et 0,4 cm (c et d). Le spectre de Zn^{II}-CP1(CCHH) a été soustrait des spectres UV-Vis.

Nous avons ensuite réalisé ce même titrage par dichroïsme circulaire (Figure 89(c)). Zn^{II}-CP1(CCHH) présente des bandes négatives à 206 et 220 nm caractéristiques des peptides doigts de zinc qui ont un repliement de type ββα. Au cours du titrage, ces bandes perdent en intensité, signe de la décomplexation du zinc de Zn^{II}-CP1(CCHH). On observe également l'apparition puis l'augmentation des bandes à 270 (-), 336 (+) et 384 (-) nm caractéristiques de la formation du cluster Au^I_n-CP1(CCHH) dès les premiers ajouts d'Au^ITm sur le complexe peptidique (Figure 89(d)). La présence de points isodichroïques à 225, 310 et 366 nm à partir du troisième ajout nous indique que seul le cluster est formé majoritairement au cours de la réaction. Ceci est corroboré par l'absence des bandes positives de transfert de charge CysS→Au^I à 214 et 246 nm caractéristiques de la formation de Au^I-CP1(CCHH) tout à long du titrage. Ces résultats ont également été confirmés par spectrométrie de masse. En effet, seuls les pics de masse m/z = 757,0 ([M+4H]⁴⁺); 1008,9 ([M+3H]³⁺) et 1512,8 ([M+2H]²⁺), avec M = C₁₂₇H₂₀₀N₄₀O₃₈S₂Zn, correspondant à Zn^{II}-CP1(CCHH) sont observés quand ce dernier réagit avec l'Au^ITm en défaut (0,5 et 1 éq.). Les pics de masses correspondant aux espèces Au^I-CP1(CCHH) et TmAu^I₂-CP1(CCHH) ne sont jamais identifiés au cours du titrage alors qu'ils étaient parfaitement identifiables au cours du titrage de l'*apo*-peptide. Quand l'aurothiomalate est en excès (2 ou 4 éq.), on observe la perte totale de signal attestant la formation du cluster.

4.4.1.2. Décomplexation du zinc par Au^ITm : quantification et cinétique

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que la réaction de l'aurothiomalate avec Zn^{II}-CP1(CCHH) conduit à la formation du cluster Au^I_n-CP1(CCHH) et à la décomplexation du zinc. Il est important à présent de déterminer la cinétique de décomplexation de Zn^{II} du peptide ainsi que la quantité de zinc relarguée. Nous avons donc choisi d'étudier la décomplexation de l'ion Zn²⁺ à l'aide d'un indicateur colorimétrique, le 4-(2-pyridylazo)résorcinol (PAR), suivi par absorption UV-Vis. En effet, PAR est un ligand de l'ion zinc capable de former un complexe 2:1 avec ce dernier, Zn^{II}(PAR)₂ (Figure 90).¹⁷ Ce complexe présente un maximum d'absorption à 494 nm tandis que le ligand PAR, sous sa forme libre, présente un maximum d'absorption à 407 nm (Figure 92). Nous avons pu déterminer à l'aide d'une courbe d'étalonnage que le complexe Zn^{II}(PAR)₂ possède un coefficient d'extinction molaire Δε = 24300 M⁻¹.cm⁻¹. Il a d'ailleurs déjà été montré sur différentes protéines à zinc que PAR permet de déterminer la concentration en ion Zn²⁺ en

solution quand celle-ci est de l'ordre du micromolaire et de suivre les cinétiques de décomplexation du zinc.¹⁷⁻²¹ De plus, ce chromophore ne réagit pas en présence d'Au^ITm et a notamment été utilisé pour mesurer la cinétique de déplacement des ions Zn²⁺ de la métallothionéine en présence de ce complexe d'or(I).²⁰

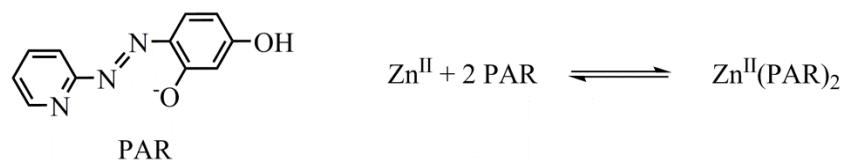


Figure 90 : Formule chimique du 4-(2-pyridylazo)résorcinol (PAR) et équation de sa réaction avec l'ion Zn²⁺.

Nous avons ainsi déterminé la cinétique de déplacement du zinc par l'aurothiomalate à l'aide de PAR. Pour cela, nous avons suivi l'évolution de l'absorbance à 494 nm au cours du temps quand le complexe peptidique Zn^{II}-CP1(CCHH) (5 μM) était mis en présence d'un équivalent d'Au^ITm (Figure 91(b)). On observe l'augmentation de l'absorbance à 494 nm aussitôt après l'ajout d'Au^ITm. On laisse alors le système évoluer jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Ceci nous a permis de déterminer que l'aurothiomalate conduit à la décomplexation de 95% de Zn^{II} de CP1(CCHH) en 22 minutes avec un temps de demi-vie, $t_{1/2} < 2$ min.

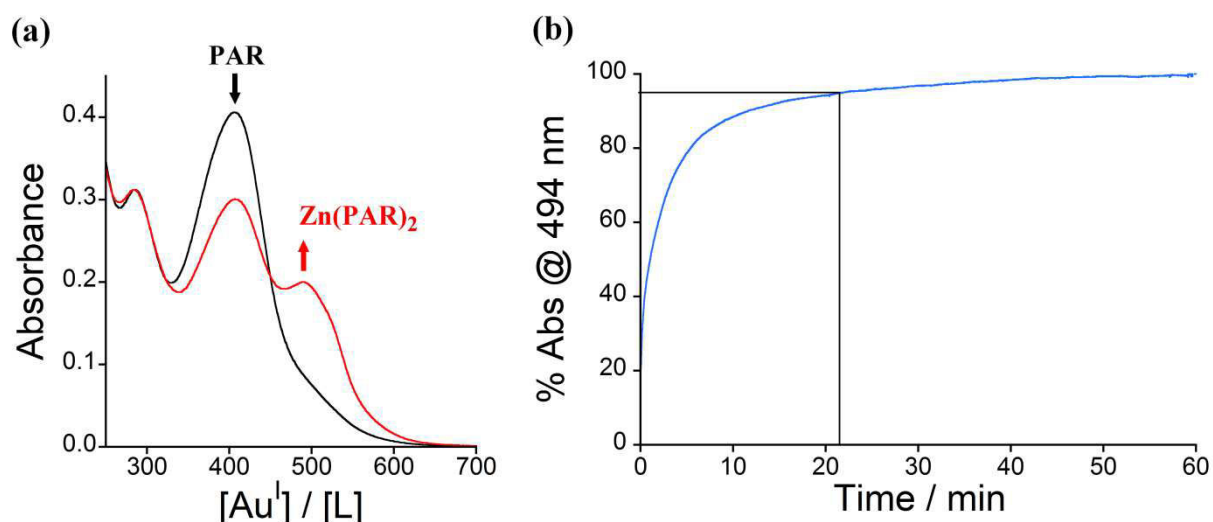


Figure 91 : (a) Spectres d'absorption UV-Vis de PAR (100 μM, en noir) avec 5 μM de Zn^{II}Cl₂ en tampon Pi 20 mM à pH 7,0 et 298 K. (b) Décomplexation du zinc par l'aurothiomalate

(1 éq.) de Zn^{II} -CP1(CCHH) ($5 \mu M$) suivie en fonction du temps. Le suivi est réalisé en présence de PAR ($50 \mu M$) en tampon HEPES 20 mM à pH 7,0 et 298 K par mesure de l'absorbance à 494 nm. Trajet optique = 1 cm.

Nous allons à présent déterminer la quantité de zinc décomplexé au cours de la réaction entre Zn^{II} -CP1(CCHH) et l'aurothiomalate. Pour cela, on réalise un titrage de Zn^{II} -CP1(CCHH) ($5,3 \mu M$) par l' Au^I Tm en présence de PAR ($50 \mu M$) en laissant le système s'équilibrer entre chaque ajout. On observe alors au fur et à mesure des ajouts d' Au^I Tm la diminution de la bande d'absorbance à 407 nm correspondant au PAR libre au profit de l'augmentation de la bande d'absorbance à 494 nm signifiant la formation du complexe $Zn^{II}(PAR)_2$ jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint après qu'environ 1,3 éq. d' Au^I Tm soit ajouté au milieu réactionnel (Figure 92). La mesure de l'absorbance à 494 nm nous permet également de déterminer qu'un équivalent d'aurothiomalate permet de décomplexer quantitativement le zinc de CP1(CCHH) (Figure 92(b)).

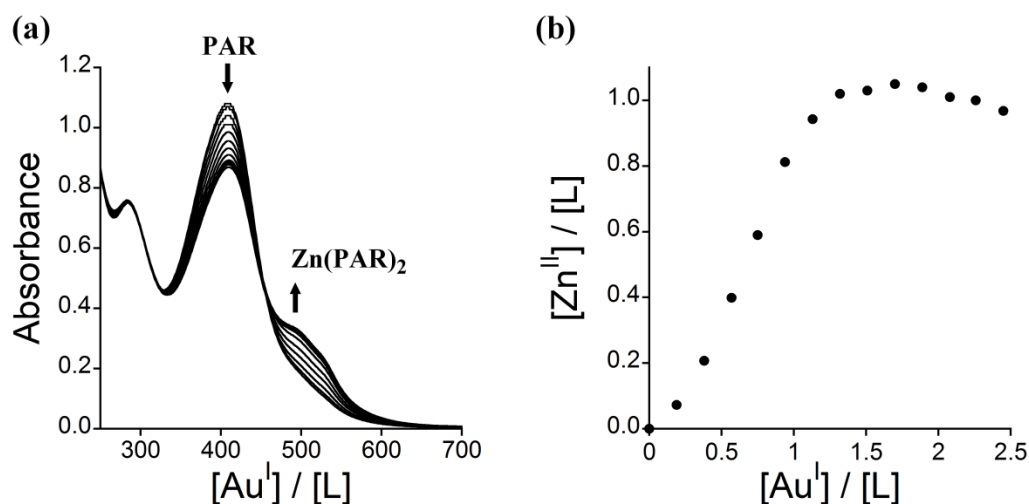


Figure 92 : (a) Titrage par absorption UV-Vis de Zn^{II} -CP1(CCHH) ($5,3 \mu M$) par l' Au^I Tm en présence de 4-(2-pyridylazo)résorcinol (PAR, $50 \mu M$) en tampon Pi 20 mM à pH 7,0 et 298 K. (b) Nombre d'équivalents de Zn^{II} décomplexés de CP1(CCHH) en fonction du nombre d'équivalents d' Au^I Tm ajoutés, obtenu d'après le suivi de la formation du complexe $Zn^{II}(PAR)_2$ à 494 nm. Les spectres sont corrigés de la dilution, trajet optique = 1 cm.

4.4.2. Zn^{II}-CP1(CCHC)

4.4.2.1. Caractérisation des produits de la réaction entre Zn^{II}-CP1(CCHC) et Au^ITm

De la même manière, nous avons caractérisé les produits obtenus lors de la réaction de Zn^{II}-CP1(CCHC) avec l'aurothiomalate par dichroïsme circulaire (Figure 93). On observe de nouveau la perte d'intensité des bandes à 207 et 215 nm indiquant la décomplexation du zinc du peptide au cours des ajouts d'Au^ITm. Au début du titrage, on observe l'augmentation de la bande à 250 nm jusqu'à ajout de deux équivalents d'Au^ITm (Figure 93). Cette bande pourrait traduire la présence de transferts de charge CysS→Au^I. Cependant, elle est légèrement décalée vers le rouge par rapport à celle correspondant à la formation du complexe Au^I-CP1(CCHC) dont le maximum se situe à 246 nm (Figure 87). Ainsi, la présence de cette bande pourrait correspondre soit à l'un des complexes Au^I/CP1(CCHC) 2:1 et 3:1 que nous avons évoqués lors du titrage de l'*apo*-peptide soit à un mélange entre le complexe Au^I-CP1(CCHC) et le cluster. Une fois encore des analyses complémentaires par spectrométrie de masse seront nécessaires afin de pouvoir clairement identifier cette espèce. Après 2 équ., la bande à 250 nm diminue d'intensité et on observe la formation du cluster à partir de 3 équ. avec la présence de points isodichroïques à 231, 310 et 372 nm.

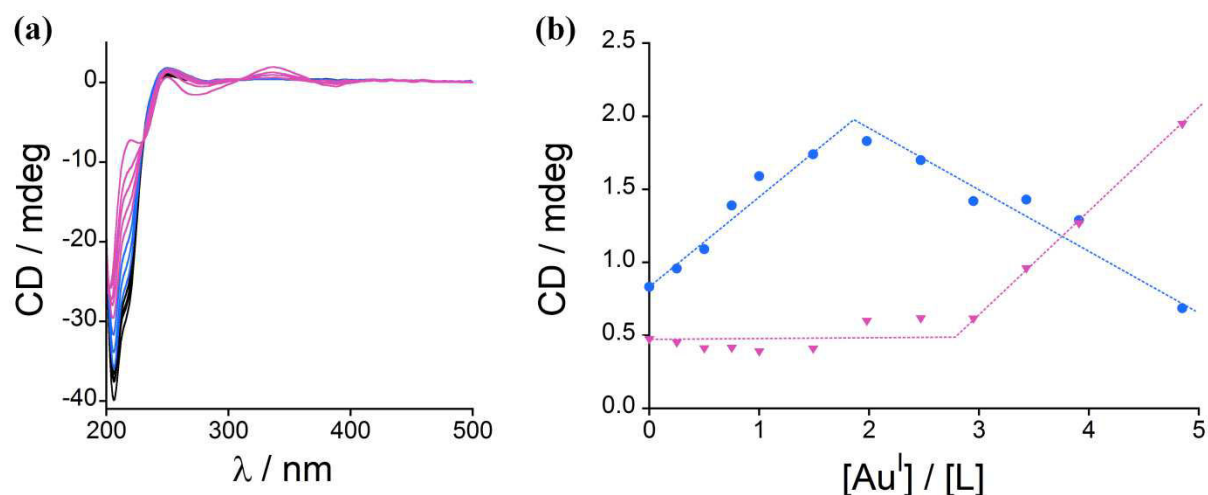


Figure 93 : (a) Titrage CD de Zn^{II}-CP1(CCHC) (20 μ M) par Au^ITm en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. (b) Suivi du titrage à 250 nm (en bleu) et 336 nm (en rose) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm. Les spectres sont corrigés de la dilution, trajets optiques : 0,4 cm.

4.4.2.2. Cinétique de décomplexation du zinc par Au^ITm

De la même manière que pour Zn^{II}-CP1(CCHH), nous avons déterminé la cinétique de décomplexation de Zn²⁺ de CP1(CCHC) en présence d'Au^ITm à l'aide de PAR (Figure 94). Le suivi de l'augmentation de l'absorbance de Zn^{II}(PAR)₂ en fonction du temps, nous permet de déterminer que l'aurothiomalate conduit à la décomplexation de 95% de Zn^{II} de CP1(CCHC) en 23 minutes avec un temps de demi-vie, $t_{1/2} < 1$ min, soit des temps très voisins de ceux que nous avons observés pour CP1(CCHH).

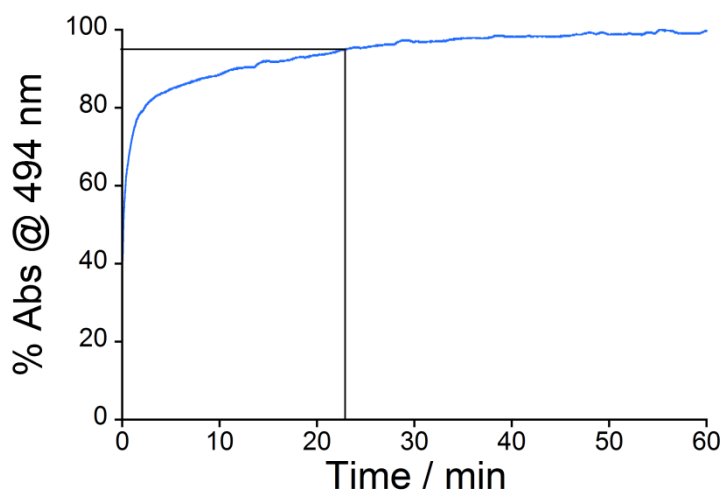


Figure 94 : Décomplexation du zinc de Zn^{II}-CP1(CCHC) (5 μM) par l'aurothiomalate (1 éq.) suivie en fonction du temps. Le suivi est réalisé en présence de PAR (50 μM) en tampon Pi 20 mM à pH 7,0 et 298 K par mesure de l'absorbance à 494 nm. Trajet optique = 1 cm.

4.4.3. Zn^{II}-CP1(CCCC)

4.4.3.1. Caractérisation des produits de la réaction entre Zn^{II}-CP1(CCCC) et Au^ITm

Au cours du titrage de Zn^{II}-CP1(CCCC) par l'aurothiomalate, on distingue trois phases différentes (Figure 95). Tout comme pour les deux précédents peptides, l'espèce Au^I-CP1(CCCC) n'est jamais observée. Au cours de la première phase du titrage, qui a lieu entre 0 et 1,8 éq. d'Au^ITm, on observe la baisse d'intensité de la bande à 208 nm, significatif de la décomplexation du zinc, et l'augmentation des bandes à 248 et 290 nm indiquant la formation concomitante du complexe Au^I₂-CP1(CCCC). Entre 1,8 et 3,2 éq. d'Au^ITm, on observe la décroissance du signal à 248 nm et l'augmentation du signal à 284 nm avec la présence d'un

point isodichroïque à 266 nm. Ainsi, l'ajout d'Au^ITm sur Au^I₂-CP1(CCCC) conduit à la formation du complexe Au^I₃-CP1(CCCC) tout comme nous l'avons observé pour l'*apo*-peptide. Les spectres enregistrés en présence de 1,8 et 3,2 éq. d'Au^ITm se superposent parfaitement à ceux obtenus pour Au^I₂-CP1(CCCC) et Au^I₃-CP1(CCCC) obtenus par titrage direct (Figure 96). Ceci confirme bien la nature des complexes formés. De plus, l'absence de signal supplémentaire à 208 nm pour ces spectres, nous indique, qu'à 1,8 éq. d'Au^ITm, tout le zinc est décomplexé. Finalement, en présence d'un excès d'Au^ITm, on observe la décroissance de la bande à 284 nm et l'apparition d'une bande vers 334 nm indiquant que le cluster Au^I_n-CP1(CCCC)_n commence à se former après ajout d'environ 3,6 éq. d'Au^ITm.

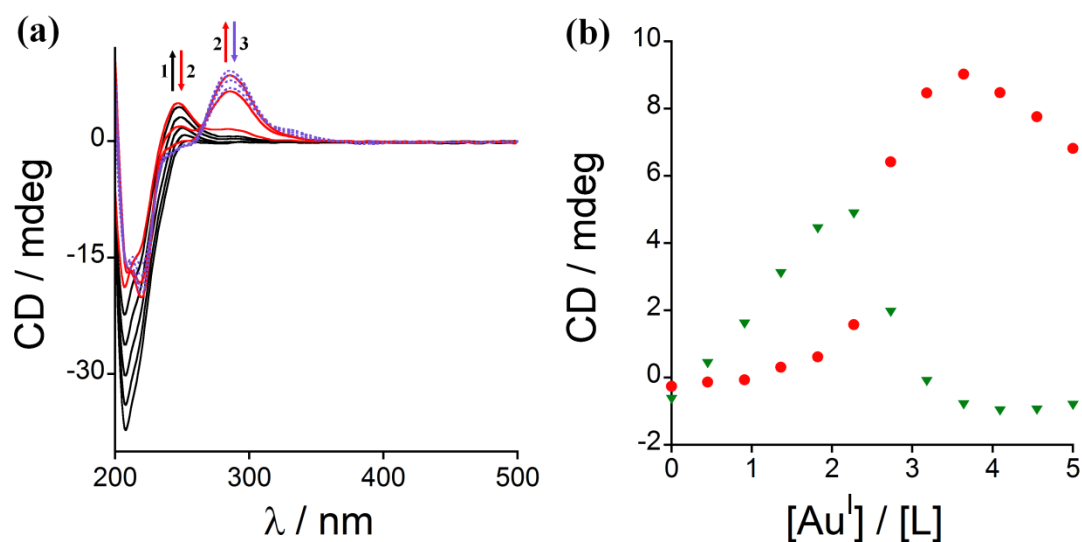


Figure 95 : (a) Titrage CD de Zn^{II}-CP1(CCCC) (20 μM) par Au^ITm en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. (b) Suivi du titrage à 248 nm (en vert) et 284 nm (en rouge) en fonction du nombre d'équivalents d'Au^ITm. Les spectres sont corrigés de la dilution, trajets optiques : 0,4 cm.

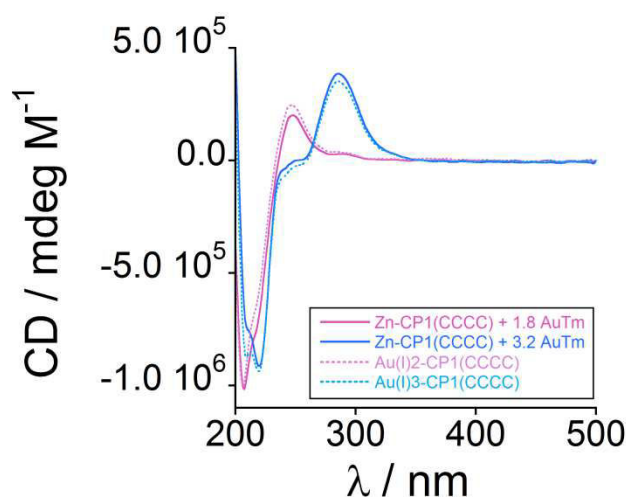


Figure 96 : Spectres CD obtenus après réaction de Zn^{II}-CP1(CCCC) (~ 20 µM) avec l'Au^ITm (1,8 éq. en rose et 3,2 éq. en bleu en traits pleins). Ces spectres sont superposés à ceux des complexes Au^I_n-CP1 (n = 2 en rose et n = 3 en bleu) caractérisés dans la partie précédente (en pointillés). Les réactions ont été réalisées en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. Les spectres ont été corrigés de la dilution ; trajet optique = 0,4 cm.

L'analyse par spectrométrie de masse des échantillons de Zn^{II}-CP1(CCCC) mis en présence de différents équivalents d'Au^ITm (1,0 ; 2,0 ; 3,0 et 6,0 éq.) nous a permis de confirmer ces résultats. A savoir, la diminution progressive de l'intensité relative des pics de masses correspondant à Zn^{II}-CP1(CCCC) ($m/z = 740,6 [M+6H]^{4+}$; $986,3 [M+5H]^{3+}$; $1479,2 [M+4H]^{2+}$ avec $M = [C_{121}H_{194}N_{36}O_{38}S_4Zn]^{2-}$) au profit de la formation du complexe Au^I₂-CP1(CCCC) ($822,4 [M+6H]^{4+}$; $1095,8 [M+5H]^{3+}$; $1643,2 [M+4H]^{2+}$ avec $M = [C_{121}H_{194}N_{36}O_{38}S_4Au_2]^{2-}$) (Figure 97). Quand le complexe réagit avec trois équivalents d'Au^ITm, le complexe Au^I₂-CP1(CCCC) est majoritaire et, pour le complexe Zn^{II}-CP1(CCCC), on n'observe plus que le pic de masse $m/z = 986,3 [M+5H]^{3+}$ avec une faible intensité. Ceci nous indique donc que l'aurothiomalate est bien capable de décomplexer tout le zinc du peptide. Finalement à 6,0 équivalents, une forte diminution de l'intensité des pics signe la formation du cluster.

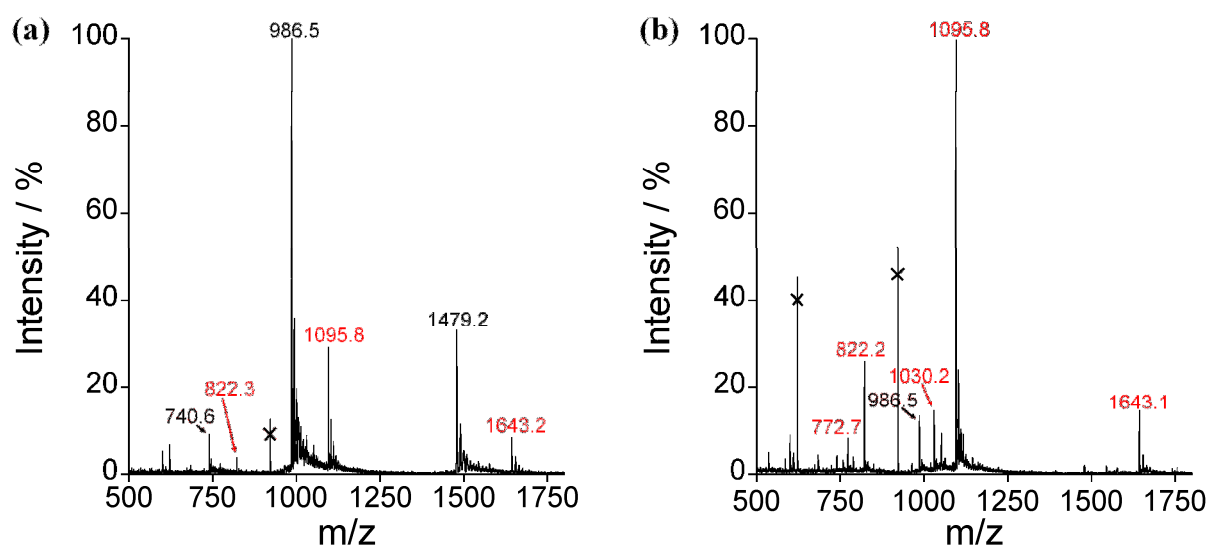


Figure 97 : Spectres de masse obtenu après réaction de Zn^{II}-CP1(CCCC) (L, 50 μ M) avec (a) 1 eq. et (b) 3 eq. d'Au^ITm en tampon acétate d'ammonium (20 mM) à pH 7,0. Les pics de masse à m/z = 740,6 ; 986,5 et 1479,2 correspondent aux pics chargés 4+, 3+ et 2+ du complexe Zn^{II}-CP1(CCCC). Les pics de masse à m/z = 772,7 et 1030,2 correspondent aux pics chargés 4+ et 3+ du complexe Au^I-CP1(CCCC) et les pics de masse à m/z = 822,3 ; 1095,8 et 1643,2 correspondent aux pics chargés 4+, 3+ et 2+ du complexe Au₂-CP1(CCCC).

4.4.3.2. Décomplexation du zinc par l'Au^ITm : quantification et cinétique

Nous avons déterminé la cinétique de décomplexation de l'ion Zn²⁺ de CP1(CCCC) en présence d'Au^ITm à l'aide de PAR (Figure 98). Les résultats obtenus révèlent une cinétique de décomplexation du Zn^{II} identique à celle obtenue précédemment avec la décomplexation de 95% de Zn^{II} de CP1(CCCC) par l'Au^ITm en 22 minutes. Le temps de demi-vie n'a pas pu être déterminé ici car il a lieu pendant le temps de mélange. La quantification du zinc libéré avec PAR confirme que l'échange est total pour 2 équivalents d'Au^ITm.

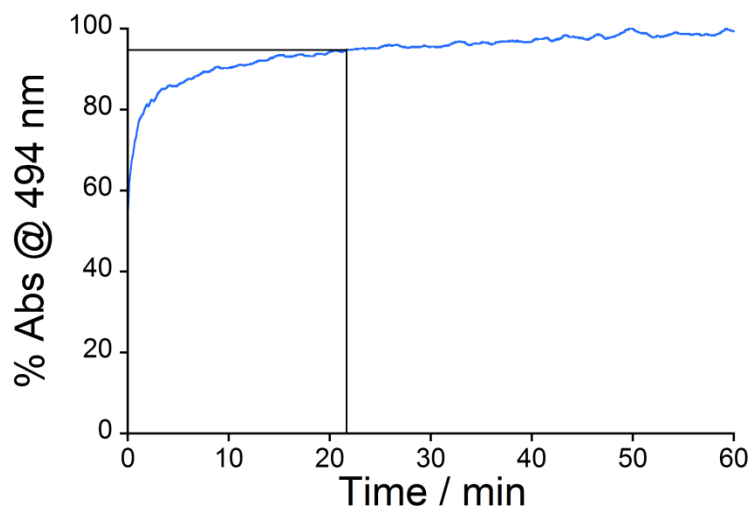


Figure 98 : Décomplexation du zinc par l'aurothiomalate (1 éq.) de (a) Zn^{II} -CP1(CCHC) (5 μ M) et (b) Zn^{II} -CP1(CCCC) (5 μ M) suivie en fonction du temps. Le suivi est réalisé en présence de PAR (50 μ M) en tampon Pi 20 mM à pH 7,0 et 298 K par mesure de l'absorbance à 494 nm. Trajet optique = 1 cm.

4.4.4. Bilan

Au cours de cette partie, nous avons pu mettre en évidence que l'aurothiomalate est bien capable de décomplexer le zinc des peptides CP1. Ainsi la réaction entre les peptides doigts de zinc métallés et l'aurothiomalate, en quantités stœchiométriques, conduit à la décomplexation du zinc des peptides CP1 de manière quantitative avec des temps de demi-vie courts (de l'ordre de la minute). Ces temps de demi-vie sont tout à fait comparables au temps nécessaire à l'organisme pour synthétiser une protéine²² et suggèrent qu'une inhibition *in vivo* des protéines à doigts de zinc par l'Au^ITm est possible. Suite à la décomplexation du zinc, différents produits sont obtenus suivant la nature des ligands du zinc. En effet, la réaction de Zn^{II} -CP1(CCHH) et Zn^{II} -CP1(CCHC) avec peu d'équivalents d'aurothiomalate conduit à la formation de leur cluster d'or respectifs (Figure 99(a)). Ainsi, ces peptides ont perdu tout repliement de type $\beta\beta\alpha$ et la complexation de l'aurothiomalate *in vivo* conduirait à une perte totale d'activité du doigt de zinc. En revanche, la réaction de l'aurothiomalate avec Zn^{II} -CP1(CCCC) conduit à la formation des complexes Au^I_2 -CP1(CCCC) puis Au^I_3 -CP1(CCCC) qui possèdent tous deux un repliement de type $\beta\beta\alpha$ proche de celui du doigt de zinc initial (Figure 99). En présence d'un excès d'Au^ITm ($n_{\text{éq}} > 3,6$), le cluster Au^I_n -CP1(CCCC) commence à se former.

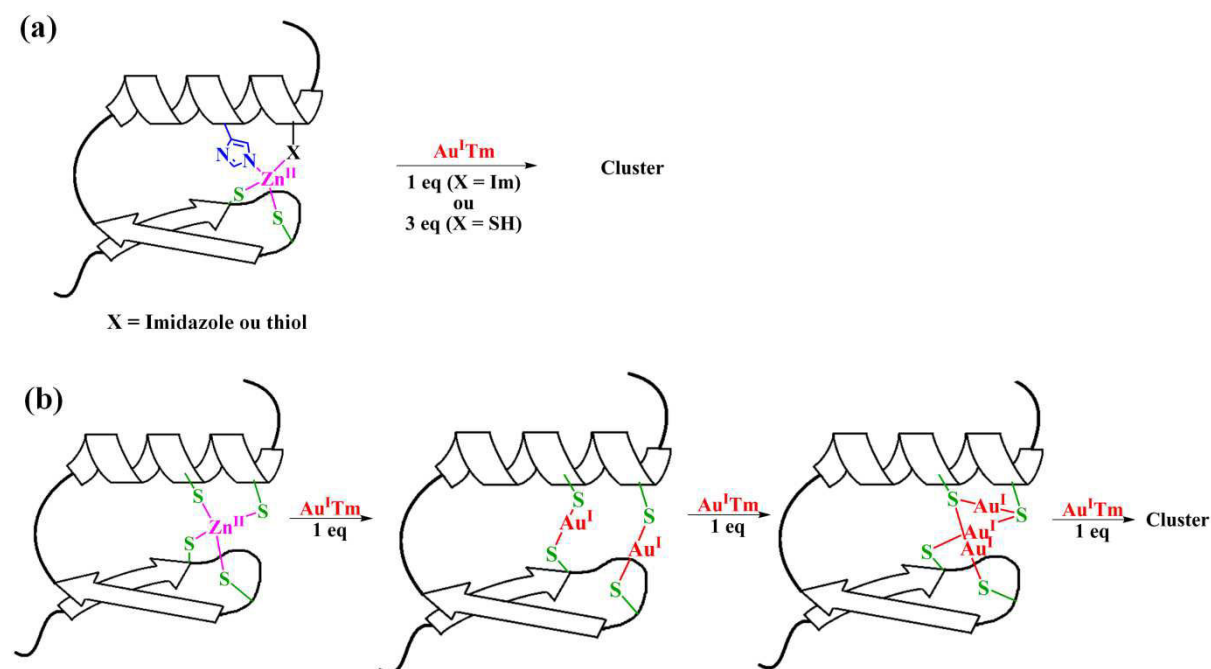


Figure 99 : Réaction de décomplexation de l'ion Zn^{2+} par le complexe $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ sur les complexes peptidiques (a) $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1}(\text{CCHH})$ et $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1}(\text{CCHC})$ et (b) $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1}(\text{CCCC})$.

On remarque que la décomplexation du zinc de $\text{CP1}(\text{CCCC})$ est plus rapide que pour $\text{CP1}(\text{CCHH})$ et $\text{CP1}(\text{CCHC})$. Ceci est probablement lié à une plus grande accessibilité des sulfures du site à zinc pour $\text{CP1}(\text{CCCC})$ par rapport aux deux autres peptides.

4.5. INFLUENCE DES THIOLS LIBRES SUR LA REACTIVITE DE L' Au^{I}

Dans le chapitre précédent nous avons pu voir que la réactivité de l' Au^{III} était totalement modifiée lorsqu'on se plaçait dans des conditions biomimétiques, c'est-à-dire en présence de thiols libres. Dans ces conditions, nous avons pu mettre en évidence que le complexe $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-SG})_n$ formé était capable de décomplexer le zinc de $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$. Nous avons donc réalisé quelques analyses préliminaires visant à vérifier que l'aurothiomalate est également capable de décomplexer le zinc des peptides CP1 quelle que soit la nature des ligands autour du métal. Pour cela, nous avons analysé par CD la réaction entre les différents peptides ($\sim 20 \mu\text{M}$) métallés ou non au zinc avec l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ en présence de βME 1 mM en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K.

4.5.1. Apo-peptides

Pour les trois peptides libres, on observe uniquement la formation des complexes Au^I-peptides 1:1 pour CP1(CCHH) et CP1(CCHC) comme l'atteste l'apparition des bandes LMCT vers 210 et 250 nm tandis que c'est le complexe Au^I₂-CP1(CCCC) qui est formé pour CP1(CCCC) comme l'atteste la bande à 248 nm (Figure 100). Cependant, ces complexes nécessitent l'ajout d'un excès d'Au^ITm pour être complètement formés à savoir environ 2 éq. d'Au^ITm pour CP1(CCHH) et CP1(CCHC) et environ 6 éq. d'Au^ITm pour CP1(CCCC) (Figure 100(d)). Une fois que ces complexes Au^I-peptide sont formés, le système n'évolue plus. Ainsi, il n'y a ni formation de cluster ni formation du complexe Au^I₃-CP1(CCCC) contrairement à ce que nous avons pu observer précédemment.

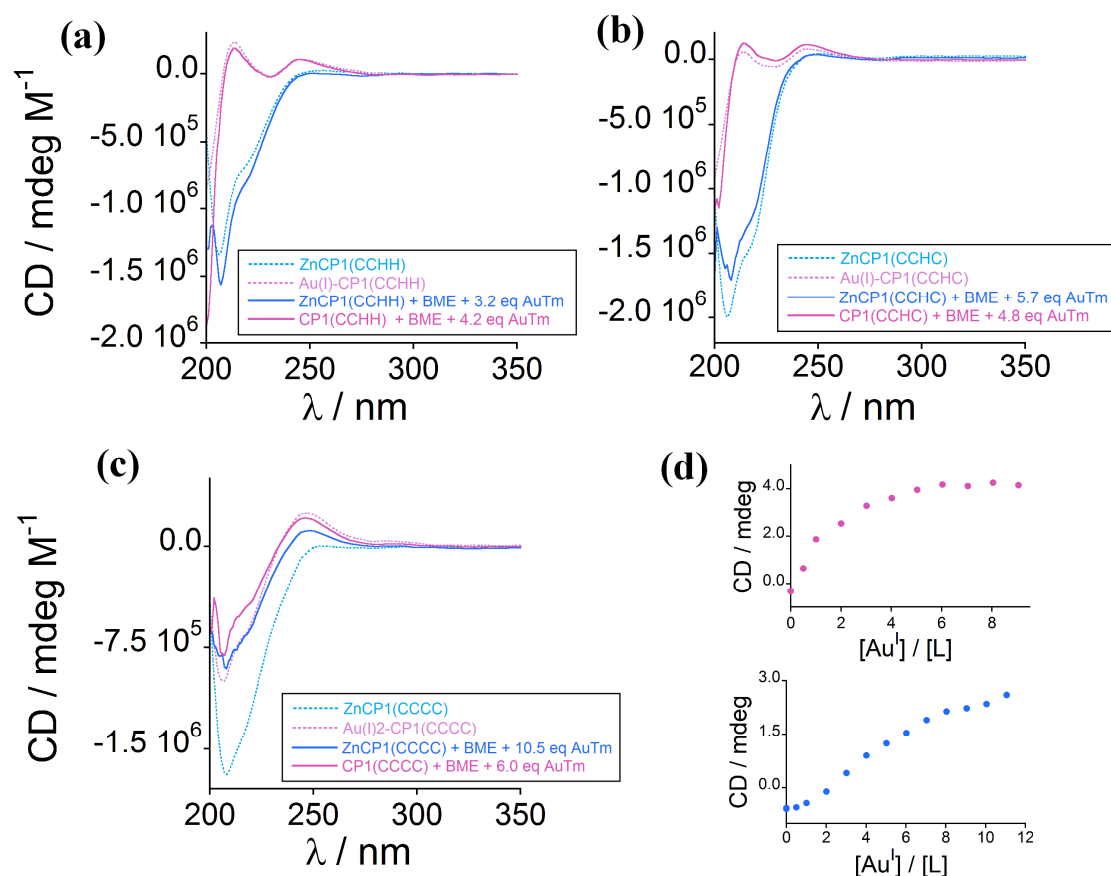


Figure 100 : Spectres CD obtenus après réaction des peptides CP1(CCHH) (a), CP1(CCHC) (b) et CP1(CCCC) (c) (~ 20 μM) non métallé (en rose) ou métallés au zinc (1eq) (en bleu) avec l'Au^ITm en présence de βME (1 mM). Les réactions ont été réalisées en tampon phosphate 20 mM à pH 7,0 et 298 K. (d) Suivi à 248 nm du titrage de CP1(CCCC) (20 μM, en rose) et de Zn^{II}-CP1(CCCC) (20 μM, en bleu) par l'aurothiomalate en

présence de β ME (1 mM). Les spectres ont été corrigés de la dilution ; trajet optique = 0,4 cm. Les spectres CD ont été obtenus par ajouts successifs d'environ 0,5 ou 1 éq. d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ avec un temps d'incubation pour les peptides métallés au zinc d'une heure entre chaque ajouts pour (a) et (b) et de 15 min pour (c et d).

4.5.2. Zn^{II} -peptides

Quand on fait réagir les complexes peptidiques $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1(CCHH)}$ et $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1(CCHC)}$ avec $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ en présence de β ME, on n'observe aucune réaction même en présence d'un excès d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ (Figure 100(a et b)). Ce résultat est cohérent avec les résultats précédents. En effet, nous avons vu, en absence de β ME, pour ces deux complexes peptidiques que la décomplexation du zinc par $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ conduit à la formation de leurs clusters d'or respectifs. La formation de ces clusters constitue donc la force motrice permettant la décomplexation du zinc par l'aurothiomalate. Or, le β ME étant capable de complexer l' Au^{I} , la formation du cluster entre en compétition avec la formation de $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-}\beta\text{ME})_n$ et nous venons de voir que le β ME empêche la formation de ces clusters pour les peptides libres. Ceci nous indique que les clusters ne sont pas suffisamment stables pour être formés en présence de β ME. La décomplexation du zinc par l'aurothiomalate est donc rendue impossible du fait de la présence de β ME en solution.

Pour $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1(CCCC)}$ (20 μM), par contre, on observe l'augmentation de l'intensité de la bande LMCT $\text{CysS}\rightarrow\text{Au}^{\text{I}}$ à 248 nm indiquant la formation du complexe $\text{Au}_2^{\text{I}}\text{-CP1(CCCC)}$ (Figure 100(c et d)). Cependant, même après ajout de 10,5 éq. d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$, la bande à 248 nm n'atteint pas de plateau indiquant que ce complexe n'est pas totalement formé. Ainsi, le complexe $\text{Au}_2^{\text{I}}\text{-CP1(CCCC)}$ est suffisamment stable pour que sa formation soit toujours possible quand il y a réaction de l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ avec $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1(CCCC)}$ en présence de β ME mais un fort excès d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ est nécessaire pour y parvenir.

4.5.3. Bilan

Ainsi, nous avons cherché à évaluer la réactivité de l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ en présence d'un fort excès de thiols. Pour cela, nous avons analysé l'interaction de nos peptides (20 μM) avec l' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ en présence de β ME (1 mM). Nous avons obtenu des résultats très différents de ceux obtenus en absence de thiol. En effet, la présence de β ME limite la complexation de l' Au^{I} sur les

peptides libres et seuls les complexes $\text{Au}^{\text{I}}/\text{CP1}$ les plus stables sont observés, c'est-à-dire ceux avec un ratio 1:1 pour $\text{CP1}(\text{CCHH})$ et $\text{CP1}(\text{CCHC})$ et ceux avec un ratio 2:1 pour $\text{CP1}(\text{CCCC})$. Et ni $\text{Au}^{\text{I}}_3\text{-CP1}(\text{CCCC})$ ni les clusters ne sont observés.

Pour les complexes peptidiques $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1}(\text{CCHH})$ et $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1}(\text{CCHC})$, la décomplexation du zinc par l'aurothiomalate ne se produit pas en présence de βME (1 mM). Dans ces conditions, l'aurothiomalate n'a pu réagir qu'avec $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-CP1}(\text{CCCC})$ conduisant à la décomplexation du zinc et à la formation du complexe $\text{Au}^{\text{I}}_2\text{-CP1}(\text{CCCC})$, c'est-à-dire la même espèce que celle formée lors de la réaction de $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ avec $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ en présence de βME . Il faut toutefois noter que cette réaction nécessite un grand nombre d'équivalents d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ et que même à 10,5 éq. la formation du complexe $\text{Au}^{\text{I}}_2\text{-CP1}(\text{CCCC})$ ne semble pas terminée. Ainsi, ces résultats nous indiquent qu'il existerait dans la cellule une sélectivité des complexes $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-SR})_n$ pour les doigts de zinc à quatre cystéines. De plus, les clusters $\text{Au}^{\text{I}}_n\text{-CP1}_m$ ne peuvent exister en milieu biologiques et n'ont donc aucune pertinence biologique.

4.6. DISCUSSION

4.6.1. Caractéristiques spectroscopiques des complexes Au^{I}_n -peptide

Au cours de ce chapitre, nous avons pu voir que l'aurothiomalate était capable de se coordonner aux peptides doigt de zinc $\text{CP1}(\text{CCHH})$, $\text{CP1}(\text{CCHC})$ et $\text{CP1}(\text{CCCC})$ en perdant son ligand thiomalate pour former des complexes linéaires $\text{S-Au}^{\text{I}}\text{-S}$ avec les cystéines de ces peptides. Ainsi, nous avons pu observer la formation de différents complexes $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CP1}$ que nous avons pu identifier en combinant des analyses par spectroscopies d'absorption UV-Vis et CD complétées par spectrométrie de masse.

Comme nous l'avions mentionné dans l'introduction, les données spectroscopiques sur les complexes Au^{I} -protéines sont quasiment inexistantes. Et jusqu'à présent seules des bandes de transfert de charge de type LMCT ou MLCT visibles par absorption UV-Vis avaient pu être identifiées pour les complexes $\text{or}(\text{I})$ -peptide quand l'ion aureux est complexé à une cystéine et, soit à une autre cystéine⁶, soit à une phosphine⁷. Bien que des calculs théoriques soient nécessaires pour parfaitement attribuer les différentes données spectroscopiques, nos analyses par absorption UV-Vis et CD complétées par spectrométrie de masse nous ont

permis d'identifier les bandes spectrales spécifiques de l'apparition de différentes espèces Au^I:doigt de zinc à des longueurs d'ondes très similaires pour les trois peptides étudiés.

Ainsi, en absorption UV-Vis, on distingue deux types de signaux. En présence d'un ou deux équivalents d'Au^ITm, on identifie deux bandes à 203 et 230 nm qui, d'après les études menées sur les complexes Au^I-thiolates, correspondent à des transitions de transfert de charge LMCT CysS→Au^I et indiquent la complexation d'un Au^I sans son ligand thiomalate sur les cystéines des peptides CP1 avec la formation d'entités CysS-Au^I-SCys. Une fois que toutes les cystéines sont complexées par un Au^I, on voit l'apparition de nouvelles bandes entre 300 et 400 nm qu'on peut assigner à des transitions Au^I-Au^I comme celles qu'on rencontre pour les clusters or-thiolates. Il existe une corrélation entre l'augmentation de la taille des clusters et le déplacement bathochrome des transitions intrabandes (6s→6sp) (Figure 72).¹⁰ D'après les longueurs d'ondes, les clusters Au^I-doigts de zinc ne contiennent pas plus de 12 Au^I et 12 ligands thiolates soient 3, 4 ou 6 peptides pour CP1(CCCC), CP1(CCHC) et CP1(CCHH) respectivement.

En CD, nous avons pu discriminer plus précisément la plupart des espèces Au^I:doigt de zinc qui présentent des signatures spectroscopiques très différentes (Tableau 9). Ainsi, les complexes Au^I-CP1 1:1 où l'Au^I se coordonne à deux cystéines présentent des bandes dichroïques vers 215 et 246 nm qui peuvent être associées à des transitions de transferts de charges LMCT. Au fur et à mesure des ajouts d'Au^ITm, on observe, tout comme en UV-Vis, le déplacement bathochrome des bandes dichroïques jusqu'à 270 (-), 336 (+) et 387 (-) nm pour les clusters Au^I_n-CP1_m. Finalement, pour CP1(CCCC) nous avons également identifié des signatures CD différentes pour deux composés de tailles intermédiaires à 248 (+) et 290 (+) nm pour Au^I₂-CP1(CCCC) et 284 (+) et 330 (+) nm pour Au^I₃-CP1(CCCC). C'est la première fois à notre connaissance que de telles signatures spectrales en CD sont rapportées pour des complexes Au^I:protéines.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des signatures CD des différentes espèces formées entre les peptides CP1 et l'aurothiomalate.

Complexe peptidique		λ [nm] (+/-)
Au ^I -CP1	(CCHH)	214 (+) ; 235 (-) ; 246 (+)
	(CCHC)	212 (+) ; 232 (-) ; 246 (+)
	(CCCC)	219 (-) ; 246 (+)
Au ₂ ^I -CP1	(CCCC)	208 (-) ; 219 (-) ; 248 (+) ; 290 (+)
Au ₃ ^I -CP1	(CCCC)	208 (-) ; 221 (-) ; 284 (+) ; 330 (+)
Cluster	(CCHH)	202 (-) ; 216 (-) ; 229(-) ; 250 (+) ; 270 (-) ; 336 (+) ; 384 (-)
	(CCHC)	200 (-) ; 222 (-) ; 234 (-) ; 250 (-) , 270 (-) , 338 (+) et 388 (-)
	(CCCC)	205 (-) ; 225 (-) ; 250 (-) ; 270 (-) ; 334 (+) ; 388 (-)

Les données que nous avons récoltées lors de l'analyse par CD nous permettront d'avoir une première approximation quant à la stœchiométrie des complexes Au^I:doigts de zinc formés. Ainsi, les spectres CD du complexe peptidique Au^I-Sp1-3 présentés par Hanas révèlent la présence de bandes de faibles intensités vers 218 (+), 230 (-) et 245 (+) nm (Figure 73).² Ces bandes coïncident tout à fait avec les bandes que nous avons identifiées comme correspondant à la coordination d'un équivalent d'Au^I sous forme CysS-Au^I-SCys sur le peptide et confirment donc la formation d'un complexe Au^I-Sp1-3 identifié par leurs analyses par spectrométrie de masse. De même, dans le chapitre précédent, le spectre CD obtenu après réaction de l'Au^{III}Terpy (60 μ M) avec Zn^{II}-L_{ZR} (20 μ M) en présence de β ME (1 mM) présentait des bandes à 208 nm (+), 228 nm (-) et 244 nm (+) (Figure 62). Ces bandes sont similaires à celles que nous avons obtenues lors de la complexation de l'Au^I avec les doigts de zinc CP1 et confirment que l'Au^I est complexé au peptide L_{ZR} sous forme CysS-Au^I-SCys suite à la réduction de l'Au^{III} par le β ME.

4.6.2. Réactivité de l'aurothiomalate avec les doigts de zinc : pertinence biologique

Les analyses que nous avons pu mener nous ont permis de déterminer que, en absence de thiols, l'aurothiomalate est capable de se complexer aux complexes peptidiques Zn^{II}-CP1(CCHH), Zn^{II}-CP1(CCHC) et Zn^{II}-CP1(CCCC) (20 μM) conduisant à la décomplexation du zinc de façon rapide ($t_{1/2}$ de l'ordre de la minute) et quantitative. Ces réactions conduisent à la formation de clusters pour Zn^{II}-CP1(CCHH) et Zn^{II}-CP1(CCHC) et à la formation des complexes Au^I₂-CP1(CCCC) et Au^I₃-CP1(CCCC) pour Zn^{II}-CP1(CCCC). Cependant, en présence de βME (1 mM), la réactivité de ces complexes est fortement réduite. Ainsi, pour Zn^{II}-CP1(CCHH) et Zn^{II}-CP1(CCHC), plus aucune décomplexation du zinc n'est observée tandis que pour Zn^{II}-CP1(CCCC) un grand nombre d'équivalents d'Au^ITm sont nécessaires pour que la réaction ait lieu.

Ces résultats diffèrent en partie de ceux obtenus par Hanas *et al.*² Pour leurs analyses, ils utilisent un autre peptide modèle de type C₂H₂ possédant deux cystéines et deux histidines coordonnées au zinc, Sp1-3. La réaction de l'aurothiomalate sur Sp1-3 conduit à la formation d'un complexe Au^I-Sp1-3 avec un ratio 1:1 correspondant à la formation d'un complexe CysS-Au^I-SCys au sein du peptide comme l'attestent les bandes en CD identifiées dans la partie précédente. Contrairement à nos résultats avec CP1(CCHH), le complexe Au^I-Sp1-3 avec un ratio 1:1 est observé même quand le peptide est métallé au zinc (Figure 101).² Les bandes à 270 (-), 336(+) et 384 (-) nm correspondant à la formation d'un cluster ne sont jamais observées. Ceci est dû au fait qu'ils ne travaillent pas sous argon et utilisent donc un réducteur, le dithiothréitol (DTT) à 90 μM. Ce dithiol joue ainsi le même rôle que le βME et capte l'or(I) excédentaire. Ainsi, ces résultats confirment que la formation de clusters ne peut avoir lieu en présence de thiols libres en solution. Cependant, contrairement à ce que nous avons pu observer avec CP1(CCHH), l'aurothiomalate est toujours capable de réagir avec Zn^{II}-Sp1-3 dans ces conditions et Hanas *et al.* observent la décomplexation du zinc et la complexation concomitante de l'Au^I sur leur peptide (Figure 101).

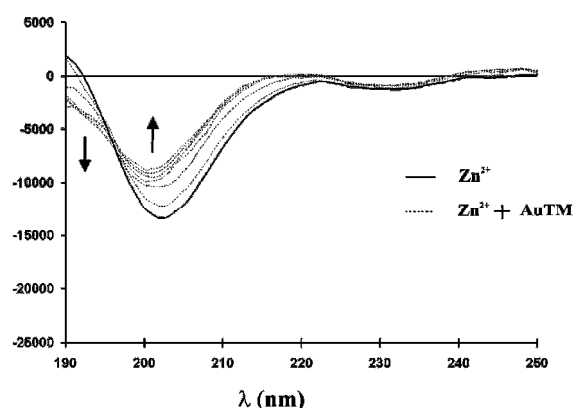


Figure 101 : Titration suivi par CD de Zn^{II} -Sp1-3 (25 μM) par $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ (5, 15, 25, 30, 38 et 48 μM) en tampon acétate d'ammonium 5 mM pH 6,8 et 5 % méthanol et en présence de DTT 90 μM . Un temps d'incubation de 5 min est laissé après chaque ajout avant enregistrement du spectre.²

De la même manière, les résultats obtenus pour Zn^{II} -CP1(CCCC) diffèrent de ceux que nous avons obtenus suite à la réaction de Zn^{II} - L_{ZR} avec $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ en présence de βME . Dans les deux cas, c'est la même espèce, $(\text{Au}^{\text{I}}-\beta\text{ME})_n$, qui réagit avec le complexe peptidique, on observe alors la décomplexation du zinc par ce complexe d'or(I) conduisant à la formation d'un complexe Au^{I}_2 -doigt de zinc. Cependant, alors que nous avons déterminé que trois équivalents d' $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ permettaient la décomplexation totale du zinc de Zn^{II} - L_{ZR} , pour Zn^{II} -CP1(CCCC), 10 équivalents d' $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ ne sont pas suffisants pour que la réaction soit complète. Or, L_{ZR} possède une constante apparente de complexation pour le zinc trois ordres de grandeur supérieure à celle de CP1(CCCC) ($\log K_{\text{app}} = 15,4$ et $12,6$ respectivement à pH 7,0). Ainsi, la différence de réactivité des deux peptides n'est pas liée à ce facteur. Par contre, lors de la réaction de Zn^{II} - L_{ZR} avec $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ en présence de βME , il y a formation du complexe $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{Terpy})_n$ ($n = 1$ ou 2). La terpyridine est un bon ligand (polydente) du zinc – bien meilleur que βME – qui permet sans doute de déplacer les équilibres en solution dans le sens du remplacement du zinc par l'or. De la même manière, le DTT est un dithiol qui lie bien mieux le zinc que βME , ce qui explique qu'Hanas *et al.*² observent la décomplexation du zinc de Sp1-3 par l'aurothiomalate malgré la présence de thiols en solution. Pour confirmer cela, nous avons réalisé des travaux préliminaires sur la réaction des complexes Zn^{II} -CP1 avec $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ en présence de βME (1 mM) et nous avons observé par CD la formation de complexes Au^{I} -CP1(CCHH), Au^{I} -CP1(CCHC) et Au^{I} -CP1(CCCC) de manière quantitative. Ceci prouve bien que Au^{I} peut chasser le zinc des doigts de zinc même en présence d'un

excès de thiols à condition que des compétiteurs pour le zinc tirent l'équilibre vers la libération de celui-ci.

Dans la cellule, de nombreuses molécules ou protéines peuvent jouer ce rôle de chélatant du zinc. Ainsi, malgré la présence de thiols en fortes concentrations, l'aurothiomalate devrait pouvoir décomplexer le zinc des protéines à doigts de zinc, et ce, de manière rapide, comme nous l'avons observé.

4.7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre étude nous a permis de montrer que les complexes polymériques (Au^I-SR)_n avec l'exemple de l'Au^ITm sont capables de se complexer avec les peptides CP1(CCHH), CP1(CCHC) et CP1(CCCC) libres conduisant à la formation de différents complexes Au^I/CP1 qui ont pu être identifiés grâce à la mise en œuvre de diverses techniques d'investigation. Nous avons ainsi pu mettre en lumière différentes caractéristiques spectroscopiques en fonction du nombre d'Au^I coordonnés au peptide et de la présence ou non d'interaction Au^I-Au^I. La spectroscopie CD s'est d'ailleurs révélée très puissante pour déterminer à la fois la stœchiométrie et la structure des complexes peptidiques formés.

Nous avons également mis en évidence qu'en l'absence de thiols libres en solution l'Au^ITm conduisait à la décomplexation du zinc des trois complexes peptidiques, et cela dans des temps relativement courts à l'échelle biologique. Nous avons pu identifier les produits issus de la compétition entre l'or et le zinc d'après les données spectroscopiques que nous avons obtenues lors de la complexation de l'Au^ITm sur les peptides libres et distinguer ainsi deux types de produits formés en fonction de la présence ou non d'histidines dans la première sphère de coordination. Ainsi, dans le cas de CP1(CCHH) et CP1(CCHC), on observe la perte totale de repliement du peptide due à la formation de clusters Au^I_n-peptide_m. Il serait intéressant de déterminer la taille de ces assemblages à partir d'expériences de diffusion de la lumière. Par contre, dans le cas de CP1(CCCC), on observe la formation de deux complexes, Au^I₂-CP1(CCCC) et Au^I₃-CP1(CCCC), possédant un repliement proche d'un repliement ββα. Nous avons notamment pu caractériser Au^I₃-CP1(CCCC) par ¹H 2D RMN. Nous avons ainsi pu montrer l'existence d'un cluster à trois or(I) au sein du peptide. La présence de ce cluster

permet au peptide de se replier de façon très similaire aux doigts de zinc C2H2 natifs avec l'hélice α , les feuillets β et le cœur hydrophobe qui sont conservés sur ce complexe peptidique. Se pose alors la question de savoir si ces doigts d'or sont toujours capables d'interagir avec l'ADN. Il serait donc très intéressant d'étudier cette interaction et les effets qu'elle pourrait engendrer dans la cellule.

D'après les résultats que nous avons obtenus en présence de thiols libres, cette différence de réactivité entre les doigts de zinc CP1(CCHH) et CP1(CCHC) d'un côté et CP1(CCCC) de l'autre se traduirait par une sélectivité de l'aurothiomalate pour les doigts de zinc à quatre cystéines qui sont les seuls pour lesquels nous avons observé une réactivité dans ces conditions. Cependant, d'après les travaux de Hanas *et al.*² ainsi que les analyses que nous avons réalisées pour l' Au^{III} Terpy en présence de β ME, la présence de chélatants, nombreux dans la cellule permettrait de favoriser la décomplexation du zinc par l' Au^{I} . Il conviendrait donc d'étudier la réactivité de ce complexe d'or(I) avec ces trois peptides avec une molécule chélatante du zinc, telle que la terpyridine de façon à le vérifier. De plus, l'étude de la réactivité de ce complexe d'or(I) avec d'autres modèles de doigts de zinc nous permettra d'identifier les critères influençant leur réactivité vis-à-vis des complexes $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-SR})_n$ tels que les constantes de complexation pour le zinc, le repliement du peptide, la présence dans la séquence peptidique en dehors de la sphère de coordination du zinc d'acides aminés pouvant complexer l' Au^{I} . Ces études sur l'interaction des doigts de zinc avec l'aurothiomalate n'en sont encore qu'au début et il sera important de les compléter par des mesures cinétiques afin de s'assurer que de telles réactions peuvent avoir lieu *in vivo*.

4.8. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Handel, M. L.; Defazio, A.; Watts, C. K. W.; Day, R. O.; Sutherland, R. L. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40*, 613–618.
- (2) Larabee, J. L.; Hocker, J. R.; Hanas, J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1943–1954.
- (3) Bau, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9380–9381.
- (4) Krizek, B. A.; Amann, B. T.; Kilfoil, V. J.; Merkle, D. L.; Berg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518–4523.
- (5) Krizek, B. A.; Merkle, D. L.; Berg, J. M. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 937–940.
- (6) Franzman, M. A.; Barrios, A. M. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 3928–3930.
- (7) Peacock, A. F. A.; Bullen, G. A.; Gethings, L. A.; Williams, J. P.; Kriel, F. H.; Coates, J. J. *Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 298–305.
- (8) Vogler, A.; Kunkely, H. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *219–221*, 489–507.
- (9) Kunkely, H.; Vogler, A. *J. Photochem. Photobiol., A* **1997**, *105*, 7–10.
- (10) Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261–5270.
- (11) Brown, D. H.; McKinlay, G.; Smith, W. E. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1977**, 1874–1879.
- (12) Laib, J. E.; Shaw III, C. F.; Petering, D. H.; Eidsness, M. K.; Elder, R. C.; Garvey, J. S. *Biochemistry* **1985**, *24*, 1977–1986.
- (13) Shaw III, C. F. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2589–2600.
- (14) Weidauer, E.; Yasuda, Y.; Biswal, B. K.; Cherny, M.; James, M. N. G.; Bromme, D. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 331–336.
- (15) Brünger, A. T. *X-Plor Version 3.1: A System for X-Ray Crystallography and NMR*; Yale University Press: New Heaven, CT, 1992.
- (16) Sénèque, O.; Latour, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17760–17774.
- (17) McCall, K. A.; Fierke, C. A. *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 307–315.
- (18) Zimmermann, M.; Clarke, O.; Gulbis, J. M.; Keizer, D. W.; Jarvis, R. S.; Cobbett, C. S.; Hinds, M. G.; Xiao, Z.; Wedd, A. G. *Biochemistry* **2009**, *48*, 11640–11654.
- (19) Lee, J.-W.; Helmann, J. D. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23567–23578.
- (20) Shaw III, C. F.; Laib, J. E.; Savas, M. M.; Petering, D. H. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 403–408.
- (21) Bourlès, E.; Isaac, M.; Lebrun, C.; Latour, J.-M.; Sénèque, O. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13762–13772.
- (22) Young, R.; Bremer, H. *Biochem. J.* **1976**, *160*, 185–194.

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Sommaire :

5.1. Conclusions générales	160
5.2. Perspectives	162
5.3. Bibliographie	165

5.1. CONCLUSIONS GENERALES

L'or a été très largement utilisé à des fins curatives dès l'antiquité. De nos jours, son utilisation est devenue beaucoup plus restreinte du fait des nombreux effets secondaires observés chez les patients soumis à des traitements prolongés par chrysothérapie. Ainsi, seul l'aurothiomalate, un complexe d'or(I), est encore utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins, de nouvelles applications thérapeutiques (VIH, malaria ou cancer) des complexes d'or(I) ou d'or(III) sont aujourd'hui à l'étude. Plus particulièrement, différents complexes d'or ont montré des propriétés cytotoxiques très importantes vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Cependant, les mécanismes d'action des complexes d'or(I) et d'or(III) sont encore méconnus. De nombreux travaux ont désigné la thiorédoxine réductase comme étant la cible principale de ces complexes d'or expliquant leurs activités anti-arthritiques et anti-cancéreuses. Mais d'autres voies d'actions semblent également impliquées, parmi lesquelles figure l'inhibition par les complexes d'or de facteurs de transcription possédant des sites doigts de zinc. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à déterminer les réactions pouvant avoir lieu entre les complexes d'or(III) et d'or(I) des peptides doigts de zinc en nous focalisant sur les produits formés ainsi que les cinétiques de ces réactions.

Pour réaliser ces études nous avons utilisé des peptides doigts de zinc permettant de visualiser l'action des complexes d'or(I/III) uniquement sur le site à zinc. A cette occasion, nous avons développé un nouveau peptide modèle de doigt de zinc « zinc ribbon », L_{ZR} . Ce peptide reprend le design précédemment développé au laboratoire qui consiste en un peptide cyclique sur lequel on branche une queue peptidique linéaire. L_{ZR} forme des complexes uniques 1:1 avec Zn^{2+} et Fe^{2+} avec des constantes de complexation élevées ($\log K_{app} = 15,4$ et $10,0$ à pH 7,0 respectivement). Les complexes peptidiques permettent ainsi de reproduire très fidèlement le repliement de type « zinc ribbon » comme l'a montré notre étude RMN du complexe $Zn^{II}-L_{ZR}$ en solution. Le complexe $Fe-L_{ZR}$ est capable de cycler entre les états Fe^{II} et Fe^{III} et constitue l'un des très rares modèles fonctionnels de rubrédoxine à avoir été publié à ce jour.

Concernant l'or(III), nous avons étudié la réaction du complexe Au^{III}Terpy avec le modèle de doigt de zinc « zinc ribbon ». Concernant l'or(I), l'étude a été réalisée avec le complexe Au^ITm et les peptides doigts de zinc de la famille CP1. Ces réactions ont été étudiées en absence et en présence de thiols libres, censés mimer le glutathion des cellules.

La conclusion majeure de ce travail est que les sels d'or étudiés, à l'état d'oxydation +I ou +III, sont capables d'éjecter le zinc des doigts de zinc qu'il y ait des thiols libres ou non.

Nous avons cependant pu montrer que la réactivité des complexes d'or avec les doigts de zinc dépend de différents critères comprenant :

- (i) **L'état d'oxydation de l'or lorsqu'il réagit directement avec le site à zinc.** Ainsi, la réaction de l'or(III) avec les doigts de zinc est une réaction d'oxydo-réduction qui conduit à l'oxydation des cystéines sous forme de disulfures et à la décomplexation du zinc. Cette réaction est très rapide, de l'ordre de la seconde. Au contraire, l'or(I) se substitue au zinc au sein des doigts de zinc, sans oxyder les cystéines, et conduit à la formation de différents adduits Au^I/doigt de zinc. La réaction, bien qu'un peu plus lente, de l'ordre de quelques minutes, reste très rapide à l'échelle de temps biologique.
- (ii) **La nature des ligands présents au sein de la première sphère de coordination du zinc.** Ce point a été étudié avec Au^ITm. Les peptides doigts de zinc réagissent avec l'or(I) pour former des complexes avec des entités S-Au^I-S. En présence d'un fort excès d'or(I), des clusters Au^I_n-peptide_m peuvent se former. Les doigts de zinc à deux et trois cystéines CP1(CCHH) et CP1(CCHC) se déstructurent en liant l'or alors que le peptide CP1(CCCC) peut former des complexes avec deux et trois ions or(I) qui sont repliés. Même si nous ne l'avons pas évoqué précédemment, des expériences préliminaires de complexation entre L_{ZR} et Au^ITm ont montré la formation de complexes structurés. Il semble donc que les doigts de zinc à quatre cystéines soient capables de garder une certaine structure en complexant l'or(I). Concernant les cinétiques de réaction, nous n'avons pas noté de véritable différence entre les trois types de doigts de zinc.
- (iii) **La présence de thiols libres en solution mimant le rôle du glutathion dans la cellule.** Les thiols libres présents à des concentrations importantes (1 mM contre environ 20 μM pour les peptides) conduisent à une modification radicale de la

réactivité des complexes d'or. En effet, les thiols libres réagissent plus vite avec $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ qu'avec les doigts de zinc, entraînant la réduction de l' $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ sous forme de polymères $(\text{Au}^{\text{I}}\text{-SR})_n$. Ceci empêche donc la réaction directe entre l'or(III) et les doigts de zinc. Cependant, le polymère d'or(I) formé peut réagir avec les doigts de zinc. En présence de thiols libres, la réaction avec l'or(I) est également perturbée puisque ceux-ci défavorisent la complexation de l'or(I) par le peptide et en particulier inhibent la formation des clusters qui est une force motrice pour l'éjection du zinc.

Nous avons également suggéré que la réactivité des complexes à doigts de zinc pouvait être influencée par d'autres critères :

- (iv) **La présence d'histidines ou de méthionines susceptibles de complexer l'or en dehors de la première sphère de coordination du zinc.** Nous avons pu l'identifier pour ZF-PARP-1 qui possède quatre histidines et quatre méthionines susceptibles de complexer l'or(III).¹ Une telle interaction expliquerait la formation d'un adduit $\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Au}^{\text{III}}/\text{ZF-PARP-1}$ 1:1:1. Ces résultats impliqueraient donc que l'inhibition des doigts de zinc pourrait se faire par d'autres acides aminés que ceux impliqués dans la complexation du zinc.
- (v) **La présence de molécules chélatantes du Zn^{2+} en solution qui permettrait de favoriser la substitution du zinc par l'or(I).** Nos résultats semblent montrer que la présence de molécules chélatantes pour le zinc comme la terpyridine permettent de déplacer l'équilibre de substitution du zinc par l'or(I) et de contrebalancer l'effet des thiols libres. Il est donc probable qu'au sein d'une cellule qui contient de nombreuses molécules capables de complexer le zinc, l'or(I) arrive à substituer le zinc au sein des doigts de zinc. Une quantification précise des constantes d'équilibre entre les complexes de zinc et d'or serait intéressante.

5.2. PERSPECTIVES

Ces études constituent une première approche sur l'évaluation de la réactivité des complexes d'or aux degrés d'oxydation +I et +III avec les doigts de zinc et sur l'évaluation des cinétiques de décomplexation du zinc par ces complexes. Cependant, les études que nous

avons menées n'ont porté que sur un seul type de doigt de zinc pour chacun des complexes étudiés. Il serait donc important de continuer ces études en utilisant d'autres modèles de doigts de zinc. En effet, les doigts de zinc adoptent différents types de repliements. Ceci peut conduire à des différences d'accessibilité des cystéines et modifier les cinétiques de décomplexation du zinc par les complexes d'or aux degrés d'oxydation +I ou +III. Notamment pour les complexes d'or(III), nous avons pu déterminer que la réaction de décomplexation du zinc de Zn^{II} -L_{ZR} en présence de thiols libres se fait en 45 minutes. Or, d'après la structure en solution de Zn^{II} -L_{ZR}, les cystéines de ce peptide ne présentent qu'une très faible surface accessible aux solvants. Ainsi, un peptide possédant des cystéines plus accessibles aux solvants pourraient présenter des cinétiques de réaction directe avec Au^{III} Terpy ou de substitution du zinc par l'or(I) plus grandes. Nous avons réalisé des études préliminaires sur ce sujet avec Zn^{II} -CP1(CCCC) qui ont montré que celui-ci perdait son zinc en quelques secondes seulement dans des conditions similaires à celles utilisées pour Zn^{II} -L_{ZR}. Ces études nécessitent d'être approfondies et les peptides Zn^{II} -L_{HSP} et Zn^{II} -L_{TC} développés au laboratoire permettront également de compléter ces analyses.

Concernant les complexes d'or(I), l'étude de leur réactivité avec des doigts de zinc possédant d'autres repliements peut également s'avérer intéressante afin de vérifier les données concernant l'influence de la première sphère de coordination autour du zinc sur la réactivité et la nature des complexes formés. Pour le premier point, il serait intéressant de développer un doigt de zinc mimant le site à zinc de PARP-1 qui possède des ligands CCHC et adopte un repliement de type « treble clef » autour du métal. Ainsi, l'analyse de la réactivité de ce doigt de zinc avec l'or(I) pourra facilement être comparée à celle de Zn^{II} -L_{TC} qui adopte le même repliement et dont le métal n'est complexé que par des cystéines. La nature des espèces formées au cours de ces réactions devraient être facilement identifiables par dichroïsme circulaire en nous basant sur les données obtenues sur les adduits Au^I -CP1.

Il faudrait également étudier la réactivité d'autres complexes d'or(III). En effet, des complexes possédant des ligands soufrés et carbonés ont été développés de façon à améliorer la stabilité des complexes d'or(III) vis-à-vis des molécules réductrices présentes dans les cellules. Plus particulièrement, les complexes d' Au^{III} portant un ligand carbène N-hétérocyclique sont connus pour être stables vis-à-vis du glutathion.^{2,3} Ainsi, la réactivité de

ces complexes d'or(III) vis-à-vis des doigts de zinc pourrait être radicalement différente et nécessite d'être étudiée.

Finalement, ces premiers travaux sur l'interaction des complexes d'or ouvrent la voie à des recherches portant sur l'étude de la toxicité des nanoparticules d'or. En effet ces dernières sont de plus en plus étudiées en vue de leur application à des fins thérapeutiques ou de diagnostics.⁴⁻¹⁰ Cependant, très peu de recherches portent sur l'analyse de leur toxicité. Comme nous l'avons vu en introduction les nanoparticules d'or (2-100 nm) de formule générale Au_n-SR_m présentent une organisation en deux parties bien distinctes à savoir, un cœur, composé uniquement d'atomes Au^0 reliés entre eux par des liaisons covalentes et une enveloppe, composée d'ensembles (Au^I-SR) reliés au cœur par des interactions aurophiles (Figure 4).¹¹⁻¹⁵ Compte-tenu du caractère métastable des nanoparticules, on peut envisager un relargage progressif d'ions aureux et leur complexation aux peptides doigts de zinc. Les caractérisations que nous avons menées nous permettront d'étudier ce phénomène. Enfin, il pourrait aussi se produire des réactions de transulfuration entre les thiols de l'enveloppe de la nanoparticule et les doigts de zinc. Nous pourrions étudier ce type de réaction.

5.3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Mendes, F.; Groessl, M.; Nazarov, A. A.; Tsybin, Y. O.; Sava, G.; Santos, I.; Dyson, P. J.; Casini, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2196–2206.
- (2) Tiekink, E. R. T. *Inflammopharmacol.* **2008**, *16*.
- (3) Che, C.-M.; Sun, R. W.-Y. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9554–9560.
- (4) Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A. M.; Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1721–1730.
- (5) Boisselier, E.; Astruc, D. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759–1782.
- (6) Copley, C. M.; Chen, J.; Cho, E. C.; Wang, L. V.; Xia, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 44–56.
- (7) Llevot, A.; Astruc, D. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 242–257.
- (8) Dreaden, E. C.; Mackey, M. A.; Huang, X.; Kang, B.; El-Sayed, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3391–3404.
- (9) Sperling, R. A.; Rivera gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1896–1908.
- (10) Wilson, R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2028–2045.
- (11) Hakkinen, H. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 443–455.
- (12) Matthiesen, J. E.; Jose, D.; Sorensen, C. M.; Klabunde, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9376–9379.
- (13) Qian, H.; Zhu, M.; Wu, Z.; Jin, R. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1470–1479.
- (14) Qian, H.; Eckenhoff, W. T.; Bier, M. E.; Pintauer, T.; Jin, R. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 10735–10739.
- (15) Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261–5270.

CHAPITRE 6 : PARTIE EXPERIMENTALE

Sommaire :

6.1. Materials and methods	169
6.2. Design and characterization of a new peptidic model of « zinc ribbon », Zn^{II}-L_{ZR}	170
6.2.1. L _{ZR} synthesis	170
6.2.1.1. Synthesis of the linear precursor:	170
6.2.1.2. Alloc removal:	170
6.2.1.3. Resin cleavage:	170
6.2.1.4. Cyclization:	171
6.2.1.5. Removal of side-chain protecting groups:	171
6.2.1.6. Purification:	171
6.2.2. UV-Vis and CD titrations.	171
6.2.3. Determination of the apparent binding constants L _{ZR} with Zn ²⁺ and Fe ²⁺ .	172
6.2.4. NMR solution structure determination.	173
6.2.4.1. NMR spectroscopy:	173
6.2.4.2. Structure calculation:	173
6.2.5. UV-Vis and CD spectra of Fe ^{III} -L _{ZR} .	174
6.2.6. Redox cycling of iron substituted L _{ZR} .	174
6.2.7. Electrochemistry.	174
6.2.8. Mössbauer spectroscopy.	175
6.2.9. EPR spectroscopy.	175
6.3. Interaction of Au^{III}Terpy salts with Zinc fingers peptides	176
6.3.1. Zn ^{II} -L _{ZR} stock solutions.	176
6.3.2. UV-Vis and CD titrations of Zn ^{II} -L _{ZR} by Au ^{III} Terpy.	176
6.3.3. UV-Vis titration of Au ^{III} Terpy by Zn ^{II} -L _{ZR} .	176
6.3.4. HPLC titration of Zn ^{II} -L _{ZR} by Au ^{III} Terpy.	176
6.3.5. Stopped-flow kinetics measurements.	177
6.3.6. UV-Vis and HPLC monitoring of the reactivity of Au ^{III} Terpy with Zn ^{II} -L _{ZR} in the presence of βME or GSH.	177
6.4. Interaction of Au^ITm with Zinc fingers peptides	177
6.4.1. Synthesis of CP1 peptides:	177
6.4.2. Preparation of stock solutions of zinc complexes and <i>apo</i> -peptides.	178
6.4.3. UV-Vis and CD Au ^I Tm direct titrations.	179
6.4.4. CD Au ^I Tm / Zn ²⁺ competitions studies.	179

6.4.5. Monitoring of Zn ²⁺ release with PAR.	179
6.4.6. NMR solution structure determination of Au ^I ₃ -CP1(CCCC).	180
6.4.6.1. NMR spectroscopy:	180
6.4.6.2. Structure calculation:	180
6.5. Bibliographie	181

6.1. MATERIALS AND METHODS

N- α -Fmoc-protected amino acids, PyBOP and resin were obtained from Novabiochem, except Alloc-Lys(Fmoc)-OH which was synthesized according to Boturyn *et al.*¹ Other reagents for peptide synthesis, solvents, buffers and metal salts were purchased from Sigma-Aldrich except for Au^{III}Terpy which was synthesized according to Lippard *et al.*² HPLC analyses and purifications were performed on a VWR LaPrep system. ESI-MS analyses were performed on a Thermo LXQ spectrometer. UV-Vis spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer. CD spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan spectropolarimeter or on a Biologic MOS-450 AF-CD spectropolarimeter. Stopped-flow kinetics measurements were performed using a Bio-Logic SFM-400 stopped-flow device, coupled with a MOS-450 AF-CD spectrometer. UV-Vis and CD spectrometers are equipped with a thermo-regulated cell holder. NMR experiments were recorded on a 500 MHz Bruker avance spectrometer equipped with a BBI probe with a triple-axis gradient field. All buffer or metal solutions were prepared with MilliQ water (Millipore) and purged with argon. Buffer solutions were treated with Chelex 100 resin (Biorad) to remove metal traces. Zn^{II}(ClO₄)₂, Zn^{II}Cl₂ (99.999%), Co^{II}SO₄ (99.999%), (NH₄)₂Fe^{II}(SO₄)₂.6H₂O (99%) and Au^{III}Terpy stock solutions were prepared by dissolving the metal salt in water and conserved at room temperature (under argon atmosphere for (NH₄)₂Fe^{II}(SO₄)₂.6H₂O) or at -20°C for Au^{III}Terpy. Their precise concentration was determined by colorimetric EDTA titration³ except for Au^{III}Terpy for which its concentration was determined by measuring its absorbance at 367 nm ($\epsilon = 11.10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Au^ITm, 8 H₂O was prepared freshly by dissolving it in water.

6.2. DESIGN AND CHARACTERIZATION OF A NEW PEPTIDIC MODEL OF « ZINC RIBBON », Zn^{II} -L_{ZR}

6.2.1. L_{ZR} synthesis

6.2.1.1. *Synthesis of the linear precursor:*

The linear precursor of L_{ZR} with protected side chains was assembled manually by solid-phase peptide synthesis on 2-chlorotrityl chloride resin (substitution 0.51 mmol/g, 600 mg) using Fmoc chemistry. Attachment of the first amino acid was performed by reacting the resin in DCM with Fmoc-Cys(Trt)-OH (264 mg, 450 μmol) and DIEA (300 μL) for 30 minutes. After washing with DCM, the resin was treated with DCM/MeOH/DIEA 17:2:1 (10 mL). Other couplings were performed with N-α-Fmoc-protected amino acids (3 eq.), PyBOP (3 eq.) and DIEA (pH ≈ 8-9) in DMF (30 minutes). Each coupling was followed by DMF/pyridine/Ac₂O 7:2:1 treatment. Fmoc deprotection was achieved with DMF/piperidine 4:1 (3 × 3 minutes).

6.2.1.2. *Alloc removal:*

The Alloc protecting group was removed by reacting the beads with Pd(PPh₃)₄ (1 eq.) and PhSiH₃ (25 eq.) in dry DCM under argon for 1 hour. The reaction was repeated once. Then the beads were washed with DCM (×2), DMF (×2), DMF/H₂O 99:1, DMF (×2), DMF/DIEA 200:1, DMF (×2), DMF/sodium diethyldithiocarbamate 200:1 (w/w), DMF (×2), DCM (×2).

6.2.1.3. *Resin cleavage:*

The peptide was cleaved from the resin by repeated treatments with DCM/TFA 99:1 for 2 minutes until the beads became dark red (4×10 mL). Each washing was neutralized with pyridine/MeOH 1:5 (5 mL). The combined washings were concentrated under reduced pressure and precipitated with DCM/petroleum ether. The solid was dissolved in DCM and pyridinium salts were extracted with water. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness.

6.2.1.4. Cyclization:

The linear peptide with unprotected Lys main-chain NH₂ and C-ter COOH was reacted in dilute DCM solution (0.25 mM) with PyBOP (3 eq.) and DIEA (pH ≈ 8-9) overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. The oily residue was precipitated with DCM/petroleum ether to yield the cyclic peptide as a powder.

6.2.1.5. Removal of side-chain protecting groups:

Removal of side-chain protecting groups was performed in TFA/TIS/H₂O/DTT (18 mL:0.6 mL:0.6 mL:650 mg). After 2 hours on stirring, the solution was evaporated to yield a yellow oil which was precipitated with Et₂O.

6.2.1.6. Purification:

The solid residue was dissolved in water/acetonitrile and purified by RP-HPLC (PurospherStar RP18e 5 μm C18 particles, 50 mm × 25 mm, solvent A = H₂O/TFA 99.9:0.1, solvent B = CH₃CN/H₂O/TFA 90:10:0.1, flow rate 30 mL/min, gradient 5 to 70% B in 28 minutes) to yield the desired peptide as a white powder after freeze-drying. Analytical RP-HPLC (PurospherStar RP18e 5 μm C18 particle, 150 mm × 4.6 mm, gradient 5 to 100% B in 18 minutes) were performed at 1.0 mL/min with UV monitoring at 214 nm. t_R(analytical) = 11.26 min. ESI-MS: m/z calculated: 980.44 [M+2H⁺]²⁺, 653.96 [M+3H⁺]³⁺, found: 980.5(2) [M+2H⁺]²⁺, 654.3(2) [M+3H⁺]³⁺.

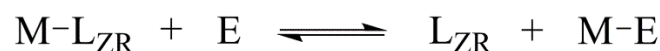
6.2.2. UV-Vis and CD titrations.

All solutions were prepared in a glovebox (MBRAUN) under argon atmosphere. L_{ZR} was dissolved in BisTris/KCl, HEPES or phosphate buffer in the glovebox. Its concentration was determined by measuring cysteine-free thiol concentration using Ellman's reagent.⁴ TCEP was added to the peptide solution (250 μM) to prevent the formation of disulfide during long lasting titrations. The binding constant of TCEP with Zn²⁺ is very weak (β₁₁ = 2.91)⁵ compared to those of the peptides used in this study. Thus, TCEP does not interfere with the peptide. Titrations were performed at 298 K under argon atmosphere in a glovebox (MBRAUN) by adding aliquots of the metal ion stock solution to a rubber-sealed quartz cell

(0.4 cm or 1 cm path length) containing the peptide solution. UV-Vis spectra were recorded every 1 nm at a scan rate of 240 nm/min (480 nm/min for Fe²⁺ titration). The CD signal was recorded every 1 nm with a 2 s signal averaging for each point. Each spectrum is recorded 2 times and averaged.

6.2.3. Determination of the apparent binding constants L_{ZR} with Zn²⁺ and Fe²⁺.

The apparent binding constants of L_{ZR} with Zn²⁺ and Fe²⁺ at pH 7.0 were determined by competition experiment monitored at 298 K under argon atmosphere by UV-Vis at 230 nm and 320 nm respectively. The competitors (E) chose for these experiments were TPEN for Zn²⁺ and EGTA or HEDTA for Fe²⁺. Experiments were performed by adding 1 equivalent of degassed metal ion stock solution to a degassed solution of L_{ZR} (25 μM) and E (1 eq.) in 100 mM phosphate or HEPES buffer pH 7.0 at the time $t = 0$. The evolution of the competition was then monitored by UV-Vis by following the increase of the absorbance at the chosen wavelength until a plateau was reached. At this time, we observed the following equilibrium:



Then, 1 eq. of degassed metal ion was added to the sample to obtain the maximum absorbance of $M-L_{ZR}$ and to determine the percentage of metal ion bound to the peptide at 1 equivalent. The spectra were corrected for dilution. The UV-Vis absorbance against the metal ion / peptide ratio ($r = [M]_t/[L_{ZR}]_t$) was fitted to the equilibrium mentioned above leading to the determination of K :

$$K = \frac{K_{ML_{ZR}}}{K_{ME}} = \frac{[ML_{ZR}][E]}{[ME][L_{ZR}]}$$

The apparent binding constants of the competitors K_{ME} were calculated at pH 7.0 from the published⁶ pK_a and $\log \beta_{11}$ values: Zn^{II}-TPEN ($pK_a = 2.95, 3.32, 4.85, 7.19$; $\log \beta_{11} = 16.4$), Fe^{II}-EGTA ($pK_a = 1.93, 2.70, 8.79, 9.40$; $\log \beta_{11} = 11.8$) and Fe^{II}-HEDTA ($pK_a = 1.60, 2.61, 5.38, 9.87$; $\log \beta_{11} = 12.2$). All protonation constants were corrected upward by 0.11 to account for 0.1 M ionic strength as recommended by Martell and Smith.^{6,7}

6.2.4. NMR solution structure determination.

6.2.4.1. NMR spectroscopy:

Samples were prepared by adding 1.1 molar equivalent of $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{ClO}_4)_2$ to the peptide ($\approx 2\text{mM}$) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1. The pH was adjusted with NaOH or HCl. Samples in D_2O were prepared by dissolution in D_2O of the freeze-dried of the $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ samples. ^1H NMR spectra were recorded at 298 K with 12 ppm windows and 32K data points in the time domain. 2D ^1H NMR spectra were recorded at 298 K by using Watergate^{8,9} solvent suppression. 2D spectra were acquired in phase-sensitive mode with TPPI for quadrature detection in the indirect dimension using 2048x512 matrices over 5000 Hz spectral width. TOCSY experiments were performed using a MLEV-17 spin-lock sequence with a mixing time of 70 ms. NOESY experiments were recorded with mixing time of 300 ms. Soft-COSY experiments (512x128) were acquired using 20 ms self-refocusing 270° selective pulses with a Gaussian envelope and a 100 Hz spectral width. All spectra were processed using XWINNMR and referenced to internal DSS.

6.2.4.2. Structure calculation:

Cross peaks in NOESY spectra were integrated using XWINNMR and converted to H-H distances. Pro3 and Pro17 $\text{H}\alpha/\text{H}\beta 1$ (2.36 Å), $^{\text{D}}\text{Pro}16$ $\text{H}\alpha/\text{H}\beta 2$ (2.36 Å) and Trp15 Z2/E1 (2.88 Å) were used as references for distance calibrations. Multiplicity was taken into account and corrections were applied when needed for non-stereospecifically assigned methylenes.¹⁰ Upper distances restraints were set to 2.7 Å, 3.5 Å, 5.0 Å and 7.0 Å for distances ≤ 2.5 Å, ≤ 3.3 Å, ≤ 4.8 Å and ≥ 4.8 Å, respectively. $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ and $^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta}$ coupling constants were measured on 1D ^1H NMR spectra or by soft-COSY experiments. ϕ dihedral restraints were derived from $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$. Stereospecific assignment of cysteine β -methylene protons and χ^1 dihedral restraints were derived from $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ and NOE pattern.¹¹ All peptide bond ω angles were set to trans (the peptide bond angle between the Lys side-chain and the Gly residue of the tail was also set to trans in agreement with the observed NOEs). Solution structures were calculated using the program X-PLOR 3.851 following standard refinement protocols starting from random structures with r^6 averaging.¹² The non-bonded interactions were modelled by the PARALLHDG force field. In house modifications were incorporated in the topology and

parameter files (topallhdg.pro and parallhdg.pro) to account for the cyclic structure, for the link between the Lys side chain of the cycle and the tail, and for the metal binding to the four cysteines in a tetrahedral geometry with a 2.33 Å Zn-S distance, a 109.4° S-Zn-S angle and a 105° Zn-S-C_β angle. No NOE violations greater than 0.3 Å and no dihedral angle violations greater than 5° were found in the ten lowest energy structures selected for analysis. A second independent calculation was performed with the same set of restraints but without the metal in the topology file to check if the structure was not influenced by the zinc binding to the four cysteines.

6.2.5. UV-Vis and CD spectra of Fe^{III}-L_{ZR}.

L_{ZR} was dissolved in HEPES 20 mM pH 7.5 under argon atmosphere. Its concentration was determined by measuring cysteine-free thiol concentration using Ellman's reagent.⁴ TCEP was added to the peptide solution of the peptide solution (500 μM) to prevent the formation of disulfide and the release of Fe^{III}. Fe-L_{ZR} was prepared in its reduced form by adding anaerobically 1.1 equivalent of ammonium ferrous sulphate hexahydrate to a rubber-sealed quartz cell (1 cm path length) containing the peptide solution (~50 μM, HEPES 20 mM pH 7.5, TCEP 500 μM) and was then exposed to air to oxidize Fe^{II} into Fe^{III}. The reaction was monitored by UV-visible at 491 nm until the absorbance reached a plateau. UV-Vis and CD spectra were recorded as previously mentioned.

6.2.6. Redox cycling of iron substituted L_{ZR}.

The sample was prepared as mentioned before except that TCEP was initially 1.0 mM. Cycles consist of Fe^{II}-L_{ZR} oxidation into Fe^{III}-L_{ZR} with air O₂ and Fe^{III}-L_{ZR} reduction by argon purge followed by adding dithionite (~ 2 eq.). The redox cycling was monitored by UV-visible at 491 nm.

6.2.7. Electrochemistry.

Electrochemistry was performed in an anaerobic chamber (Jacomex, France) with a residual concentration of O₂ below 1.5 ppm, using an Autolab PGSTAT 128N potentiostat with a standard 3-cell electrode, using a platinum grid as counter electrode and a saturated calomel

electrode as reference electrode. The working electrode was a gold disc (diameter 1 mm) that we cleaned by repetitively cycling in a 0.1 M H₂SO₄ aqueous solution and then left to incubate overnight in a 1 mM ethanolic solution of *p*-mercaptobenzoic acid. We checked that the intensity of the oxidation wave is proportional to the square root of the scan rate, thereby showing that we address species that diffuse freely in solution. We determined a diffusion coefficient of about $1.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for the L_{ZR}^I complex, compatible with that found for small proteins such as cytochrome c₆.¹³

6.2.8. Mössbauer spectroscopy.

⁵⁷Fe Mössbauer spectra have been recorded at 4.2 K either on a low field Mössbauer spectrometer equipped with a Janis SVT-400 cryostat or on a strong-field Mössbauer spectrometer equipped with an Oxford Instruments Spectromag 4000 cryostat containing an 8 T split-pair superconducting magnet. Both spectrometers were operated in a constant acceleration mode in transmission geometry. The isomer shifts are referenced against that of iron metal at room temperature. The analysis of the data was performed with the software package WMOSS (WEB Research, Edina, MN, www.wmoss.org). The ⁵⁷Fe^{II}-L_{ZR} (1.17 mM, HEPES 20 mM pH 7.5) sample was prepared in the glovebox by mixing 0.9 eq. of ⁵⁷Fe(SO₄)₂(NH₄)₂·6H₂O with L_{ZR} and adjusting the pH to 7.5. For the Mössbauer measurements of the oxidized form, a ⁵⁷Fe^{III}-L_{ZR} sample (1.72 mM, HEPES 100 mM pH 7.55, TCEP 17.2 mM) was prepared and exposed to air. The samples were then frozen into liquid nitrogen.

6.2.9. EPR spectroscopy.

Spectra were recorded on a Bruker EMX (9.5 GHz) EPR spectrometer equipped with an ESR 900 helium flow cryostat (Oxford Instruments) between 4.9 and 20 K under non-saturating conditions. No resonances were detected above 250 mT. Fe^{III}-L_{ZR} (500 μM, HEPES 20 mM pH 7.5) was prepared as previously described in an EPR tube and was then frozen into liquid nitrogen.

6.3. INTERACTION OF Au^{III}TERPY SALTS WITH ZINC FINGERS PEPTIDES

6.3.1. Zn^{II}-L_{ZR} stock solutions.

For all the experiments, the peptide was dissolved in water under argon atmosphere. Its concentration was determined by measuring cysteine-free thiol concentration using Ellman's reagent⁴ and confirmed by a zinc titration. Then, a fresh stock solution of Zn^{II}-L_{ZR} was prepared by diluting the peptide at the desired concentration and adding 1 eq. of Zn^{II}Cl₂ in phosphate buffer 20 mM at pH 7.0 under argon atmosphere.

6.3.2. UV-Vis and CD titrations of Zn^{II}-L_{ZR} by Au^{III}Terpy.

Titrations were performed at 298 K by adding aliquots of the Au^{III}Terpy stock solution to a rubber-sealed quartz cell (1 cm or 0.4 cm path-length) containing a Zn^{II}-L_{ZR} 20 μM solution in phosphate buffer (20 mM pH 7.0). UV-Vis spectra were recorded every 1 nm at a scan rate of 480 nm/min. The CD signal was recorded every 1 nm between 200 and 244 nm and every 2 nm between 244 and 500 nm with a 2 s signal averaging for each point. Each spectrum is recorded 2 times and averaged. Spectra were corrected for dilution.

6.3.3. UV-Vis titration of Au^{III}Terpy by Zn^{II}-L_{ZR}.

Titrations were performed at 298 K by adding aliquots of the Zn^{II}-L_{ZR} stock solution (220 μM) to a rubber-sealed quartz cell (1 cm path-length) containing a solution of Au^{III}Terpy 32 μM in phosphate buffer (20 mM pH 7.0). UV-Vis spectra were recorded ~45 minutes after each adding of Zn^{II}-L_{ZR}. Spectra were corrected for dilution.

6.3.4. HPLC titration of Zn^{II}-L_{ZR} by Au^{III}Terpy.

The stock solution of Zn^{II}-L_{ZR} (20 μM) was separated in different aliquots of 400 μL. The appropriate volume of Au^{III}Terpy was then added leading to the desired Zn^{II}-L_{ZR}/Au^{III}Terpy ratios. The solution was agitated and then thiourea (50 mM) was added prior to the injection of 300 μL of the sample in HPLC. Peaks were assigned by ESI/MS analysis and comparison

with known products when possible. In the acidic conditions used, Zn^{II} is released from the peptide but not Au^{I} . The experiment has been performed both under argon atmosphere in a glovebox (MBRAUN) and in air atmosphere leading to the same results.

6.3.5. Stopped-flow kinetics measurements.

β ME and GSH stock solutions were prepared by diluting or dissolving the thiols in phosphate buffer 20 mM pH 7.0. Their concentrations were controlled using Ellman's reagent.⁴ The kinetics of the reaction of $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ (1.5 μM) with $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$, β ME or GSH (28.6, 42.9, 57.1, 71.4 and 85.7 μM) were monitored by following the decreasing of the $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ absorbance at 366 nm using a cell with a 1 cm path-length. The kinetic traces were fitted with a single exponential. Plots of the observed first order rate constant k^{obs} against $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}]$ yielded the second order rate constant k .

6.3.6. UV-Vis and HPLC monitoring of the reactivity of $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ with $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ in the presence of β ME or GSH.

β ME and GSH stock solutions were prepared as mentioned above. The $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ complex was diluted to 20 μM in phosphate buffer (20 mM pH 7.0) containing a free thiol (β ME or GSH, 1 mM). The reaction was monitored by UV-Vis (β ME and GSH) and HPLC (β ME only) after addition of $\text{Au}^{\text{III}}\text{Terpy}$ (~60 μM). The sample was maintained at 298 K. For UV-Vis, the absorbance (path-length = 0.4 cm) was recorded every minute over 255 minutes (4h15) for β ME and every minute over 10 minutes and then every 5 minutes over 16 hours for GSH. For HPLC, different aliquots of 300 μL were injected after 30 seconds, 16 minutes, 45 minutes of reaction. Peaks were assigned by ESI/MS analysis.

6.4. INTERACTION OF $\text{Au}^{\text{I}}\text{Tm}$ WITH ZINC FINGERS PEPTIDES

6.4.1. Synthesis of CP1 peptides:

CP1(CCHH), CP1(CCHC) and CP1(CCCC) were assembled on a CEM Corporation Liberty1 microwave peptide synthesizer by solid-phase peptide synthesis on NovaPEG Rink Amide

resin (substitution 0.37 mmol/g, 270 mg) using Fmoc chemistry. Fmoc removal was performed by two successive washing with 20 % piperidine in DMF at room temperature (0 W microwave power, 30 s and 3 min). Couplings 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 DMF, 10 eq.) for 30 min at room temperature (0 W). The pseudoproline dipeptide Fmoc-Phe-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH was used to introduce the FS motif and was introduced manually as previously described.¹⁴ Resin cleavage and removal of side-chain protecting groups were performed in TFA/TIS/H₂O/DTT (18 mL:0.6 mL:0.6 mL:650 mg). After 2 hours on stirring, the solution was evaporated to yield a yellow oil which was precipitated with Et₂O. The peptides were purified by RP-HPLC (PurospherStar RP18e 5 μ m C18 particles, 50 mm \times 25 mm, solvent A) H₂O/TFA 99.9:0.1, solvent B) CH₃CN/H₂O/TFA 90:10:0.1, flow rate 30 mL/min, gradient 5-70% B in 28 min). Analytical RP-HPLC (PurospherStar RP18e 5 μ m C18 particles, 150 mm \times 4.6 mm, gradient 5-50% B in 28 min) were performed at 1.0 mL/min with UV monitoring at 214 nm. CP1(CCHH): t_{R} (analytical)) 15.7 min; ESI-MS m/z) 1480.9 [M + 2H]²⁺, 987.5 [M + 3H]³⁺, 740.9 [M + 4H]⁴⁺ (calcd 1480.72 [M + 2H]²⁺, 987.48 [M + 3H]³⁺, 740.86 [M + 4H]⁴⁺). CP1(CCHC): t_{R} (analytical)) 16.4 min; ESI-MS m/z) 1464.0 [M + 2H]²⁺, 976.4 [M + 3H]³⁺, 732.5 [M + 4H]⁴⁺ (calcd 1463.72 [M + 2H]²⁺, 976.15 [M + 3H]³⁺, 732.36 [M + 4H]⁴⁺). CP1(CCCC): t_{R} (analytical)) 17.0 min; ESI-MS m/z) 2892.5 [M + H]⁺, 1446.8 [M + 2H]²⁺, 964.9 [M + 3H]³⁺, 723.9 [M + 4H]⁴⁺ (calcd 2892.36 [M + H]⁺, 1446.68 [M + 2H]²⁺, 964.79 [M + 3H]³⁺, 723.84 [M + 4H]⁴⁺).

6.4.2. Preparation of stock solutions of zinc complexes and *apo*-peptides.

For all the experiments, the CP1 peptides were dissolved in water in a glovebox (MBRAUN) under argon atmosphere. Their precise concentrations were determined by measuring cysteine-free thiol concentration using Ellman's reagent⁴ and a zinc titration. The solution of *apo*-peptide was stored in a glovebox during a week. For the zinc complexes, a fresh stock solution was prepared by diluting the *apo*-peptide at the desired concentration and adding 1 eq. of Zn^{II}Cl₂ in phosphate buffer 20 mM at pH 7.0 in a glovebox under argon atmosphere.

6.4.3. UV-Vis and CD Au^ITm direct titrations.

Titration experiments were performed at 298 K under argon atmosphere in a glovebox (MBRAUN) by adding aliquots of the Au^ITm or stock solution to a rubber-sealed quartz cell (0.4 cm path length) containing the peptide solution (20 μM, in phosphate buffer 20 mM at pH 7.0). UV-Vis spectra were recorded every 1 nm at a scan rate of 480 nm/min. The CD signal was recorded every 1 nm between 200 and 244 nm and every 2 nm between 244 and 500 nm with a 2 s signal averaging for each point. Each spectrum is recorded 2 times and averaged.

6.4.4. CD Au^ITm / Zn²⁺ competitions studies.

Competition experiments were performed at 298 K under argon atmosphere in a glovebox (MBRAUN) by adding aliquots of the Au^ITm stock solution to a rubber-sealed quartz cell (0.4 cm path length) containing the complex solution (20 μM, in phosphate buffer 20 mM at pH 7.0) and waiting the appropriate time (~ 20 min) between each addition. The CD signal was recorded every 1 nm between 200 and 244 nm and every 2 nm between 244 and 500 nm with a 2 s signal averaging for each point. Each spectrum is recorded 2 times and averaged.

6.4.5. Monitoring of Zn²⁺ release with PAR.

The Zn^{II}-CP1 complex was diluted to 5 μM in phosphate buffer (20 mM, pH 7.0) containing 50 μM PAR in a rubber-sealed quartz cell (1 cm path length) equipped with a magnetic stirring bar. The sample was maintained under stirring at 298 K. The absorbance at 494 nm was followed every 1 s immediately after adding 1 eq. of Au^ITm until a plateau was reached. The operation was repeated until no further change in the absorbance was observed.

Zn²⁺ release was also monitored by titration at 298 K by adding aliquots of 0.2 eq. of the Au^ITm stock solution in a glovebox to a Zn^{II}-CP1 solution (5 μM, Pi 20 mM, pH 7.0) containing PAR (50 μM) and waiting the appropriate time (~ 20 min) between each addition. UV-Vis spectra were recorded every 0.80 nm at a scan rate of 480 nm/min.

6.4.6. NMR solution structure determination of Au^I₃-CP1(CCCC).

6.4.6.1. NMR spectroscopy:

The sample was prepared under argon atmosphere by dissolving CP1(CCCC) (2.14 mM) in H₂O/D₂O 9:1 in a Young NMR tube. The pH was adjusted at pH 6.23 with NaOD and DCl. The peptide was then metallated by slowly adding 3 molar equivalents of Au^ITm, 8 H₂O under argon atmosphere. The solution was sonicated between each addition to dissolve possible Au-S aggregates. The Au^I / CP1(CCCC) stoichiometry was controlled by CD analysis. ¹H NMR and 2D ¹H NMR spectra were recorded as previously described for Zn^{II}-L_{ZR}.

6.4.6.2. Structure calculation:

Structure calculations were performed as previously described for Zn^{II}-L_{ZR}. A first calculation was performed with the same set of restraints but without the metal in the topology file to check that gold ions binding does not bias the peptide fold derived from NMR constraints. Then, in house modifications were incorporated in the topology and parameter files (topallhdg.pro and parallhdg.pro) to account for the binding of the three gold(I) ions to the four cysteines with a 2.30 Å Au-S distance, a 180° S-Au-S angle and a 105° Au-S-C_β angle. 16 sets of calculations were performed with the 16 topologies described in the Chapter 3 for the S₄Au₃ core, i.e. S-Au-S-Au-S-Au-S or S(-Au-S)₃. Au···Au distances were constrained to the range 3.3-6.5 Å using NOE statements. For each set of calculations, structures displaying S-Au bonds out of the 2.25–2.35 Å range, NOE violations > 0.3 Å and φ or χ¹ angles violations > 5° were rejected. Only one set corresponding to the S(Cys⁴)-Au-S(Cys²⁴)-Au-S(Cys²⁰)-Au-S(Cys⁷) yielded structures satisfying these criterions. The 10 lowest energy structures of this set were selected for analysis.

6.5. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Boturnyn, D.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787–2790.
- (2) Hollis, L. S.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4293–4299.
- (3) Schwarzenbach, G.; Flaschka, H. A.; Irving, H. M. N. H. *Complexometric Titrations*; 2nd ed.; Methuen: London, 1969.
- (4) Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 49–60.
- (5) Krezel, A.; Latajka, R.; Bujacz, G. D.; Bal, W. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 1994–2003.
- (6) Smith, R. M.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J. *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*; NIST Standard Reference Database; National Institute of Standards and Technology: Gaithersbyrg, 2001.
- (7) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical stability constants*; Plenum Press: New York, 1974; Vol. 1.
- (8) Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–665.
- (9) Sklenar, V.; Piotto, M.; Leppik, R.; Saudek, V. *J. Magn. Reson. A* **1993**, *102*, 241–245.
- (10) Fletcher, C. M.; Jones, D. N. M.; Diamond, R.; Neuhaus, D. *J. Biomol. Nmr* **1996**, *8*, 292–310.
- (11) Wagner, G.; Braun, W.; Havel, T. F.; Schaumann, T.; Go, N.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 611–639.
- (12) Brünger, A. T. *X-Plor Version 3.1: A System for X-Ray Crystallography and NMR*; Yale University Press: New Heaven, CT, 1992.
- (13) Fourmond, V.; Lagoutte, B.; Setif, P.; Leibl, W.; Demaille, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9201–9209.
- (14) Sénèque, O.; Bonnet, E.; Joumas, F. L.; Latour, J.-M. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 4798–4810.

CHAPITRE 7 : ANNEXES

Sommaire :

7.1. Données RMN de Zn^{II}-L_{ZR}	184
7.2. Données RMN de Au^{I}₃-CP1(CCCC)	188
7.3. Articles publiés	196

7.1. DONNEES RMN DE Zn^{II} -L_{ZR}

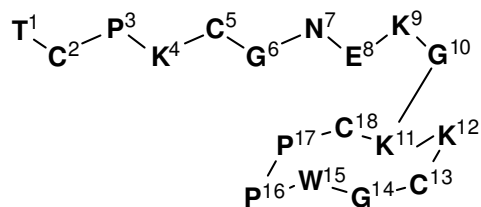


Figure 102 : Numérotation des acides aminés pour les données RMN de L_{ZR}.

Tableau 10 : Déplacements chimiques, δ (ppm), 1H RMN pour Zn^{II} -L_{ZR} dans H₂O/D₂O 9:1 (pH 6,3) à 298 K.^a

Residue	HN	H α	H β	Others
Ac		2.08		
THR 1	8.21	4.36	3.81	CH ₃ (γ): 1.04
CYS 2	8.87	4.69	3.23 (<i>pro-S</i>), 3.35 (<i>pro-R</i>)	
PRO 3	-	4.45	1.87 (<i>pro-R</i>), 2.30 (<i>pro-S</i>)	CH ₂ (γ): 1.77, 2.16; CH ₂ (δ): 4.07, 4.25
LYS 4	8.96	4.19	1.74, 1.61	CH ₂ (γ): 0.71; CH ₂ (δ): 1.01; CH ₂ (ϵ): 1.94
CYS 5	8.63	4.99	2.60 (<i>pro-S</i>), 3.26 (<i>pro-R</i>)	
GLY 6	7.83	3.78, 4.21		
ASN 7	8.92	4.67	2.89, 3.07	NH ₂ (δ), 7.74
GLU 8	9.16	4.59	1.96, 2.13	CH ₂ (γ): 2.33, 2.42
LYS 9	7.91	4.25	1.87	CH ₂ (γ): 1.47; CH ₂ (δ): 1.69; CH ₂ (ϵ): 2.99
GLY 10	8.46	3.85		
LYS 11	8.83	4.25	1.83, 1.89	CH ₂ (γ): 1.47; CH ₂ (δ): 1.61; CH ₂ (ϵ): 3.11, 3.47; NH(ζ): 8.08
LYS 12	9.19	4.38	1.77, 1.95	CH ₂ (γ): 1.40; CH ₂ (δ): 1.64; CH ₂ (ϵ): 2.99
CYS 13	8.98	5.01	2.72 (<i>pro-S</i>), 3.30 (<i>pro-R</i>)	
GLY 14	7.37	3.88, 4.21		
TRP 15	9.04	4.92	3.27	CH(δ_1): 7.32; CH(ϵ_1): 10.24; CH(ζ_2): 7.51; CH(η_2): 7.25; CH(ζ_3): 7.19; NH(ϵ_3), 7.75
^D PRO 16	-	4.13	1.56 (<i>pro-S</i>), 1.96 (<i>pro-R</i>)	CH ₂ (γ): 1.03, 1.70; CH ₂ (δ): 2.49, 3.47
PRO 17	-	4.57	2.09 (<i>pro-R</i>), 2.19 (<i>pro-S</i>)	CH ₂ (γ): 1.87, 2.06; CH ₂ (δ): 3.58, 3.89
CYS 18	8.19	4.39	3.20 (<i>pro-S</i>), 3.52 (<i>pro-R</i>)	

^a Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport à l'étalon interne DSS.

Tableau 11 : Constantes de couplages $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ (Hz) pour $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (pH 6,3) à 298 K.

THR 1 7.3	CYS 2 3.7	LYS 4 9.2	CYS 5 9.7	ASN 7 3.9	GLU 8 7.5	LYS 9 6.6	LYS 11 5.1	LYS 12 9.0
CYS 13 9.0	TRP 15 5.9	CYS 18 5.1						

Tableau 12 : Constantes de couplages $^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta}$ (Hz) pour $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$ dans D_2O à 298 K.

CYS 2		CYS 5		CYS 13		CYS 18	
<i>pro-R</i>	<i>pro-S</i>	<i>pro-R</i>	<i>pro-S</i>	<i>pro-R</i>	<i>pro-S</i>	<i>pro-R</i>	<i>Pro-S</i>
12.4	6.0	< 5	< 5	< 5	< 5	12.9	4.6

Tableau 13 : Distances NOE (\AA) utilisées pour les calculs avec XPLOR pour $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_{\text{ZR}}$.

THR 1	HB	THR 1	HA	2.60	GLY 10	HN	GLY 10	HA*	2.47
THR 1	HG2*	THR 1	HA	3.22	GLY 10	HN	LYS 11	HB*	3.73
THR 1	HN	THR 1	HA	2.85	LYS 11	HN	LYS 9	HA	3.94
THR 1	HN	THR 1	HB	2.54	LYS 11	HN	GLY 10	HA*	4.52
THR 1	HN	THR 1	HG2*	3.90	LYS 11	HZ1	GLY 10	HA*	2.50
THR 1	HG2*	GLU 8	HA	3.95	LYS 11	HZ1	GLY 10	HN	3.88
CYS 2	HN	THR 1	HA	2.13	LYS 11	HD*	LYS 11	HE*	2.77
CYS 2	HN	THR 1	HB	2.94	LYS 11	HG*	LYS 11	HA	3.00
CYS 2	HN	THR 1	HG2*	3.60	LYS 11	HG*	LYS 11	HE*	3.33
CYS 2	HB1	CYS 2	HA	2.99	LYS 11	HN	LYS 11	HA	2.85
CYS 2	HB2	CYS 2	HA	2.50	LYS 11	HN	LYS 11	HB*	2.74
CYS 2	HN	CYS 2	HA	2.70	LYS 11	HN	LYS 11	HD*	3.53
CYS 2	HN	CYS 2	HB1	2.36	LYS 11	HN	LYS 11	HG*	2.55
CYS 2	HN	CYS 2	HB2	2.43	LYS 11	HZ1	LYS 11	HB*	3.83
CYS 2	HN	PRO 3	HD*	3.69	LYS 11	HZ1	LYS 11	HD*	3.01
CYS 2	HN	ASN 7	HB2	3.63	LYS 11	HZ1	LYS 11	HE*	2.62
CYS 2	HN	GLU 8	HA	3.31	LYS 11	HZ1	LYS 11	HG*	3.03
PRO 3	HD*	CYS 2	HA	2.69	LYS 11	HZ1	LYS 11	HN	3.96
LYS 4	HN	CYS 2	HA	3.18	LYS 11	HN	LYS 12	HN	2.69
LYS 4	HN	PRO 3	HA	3.46	LYS 11	HN	CYS 18	HA	2.07
LYS 4	HN	PRO 3	HB*	3.85	LYS 11	HN	CYS 18	HB1	4.66
LYS 4	HN	PRO 3	HD*	3.96	LYS 11	HN	CYS 18	HB2	3.89
LYS 4	HB*	LYS 4	HA	2.60	LYS 12	HN	LYS 11	HA	3.24
LYS 4	HD*	LYS 4	HA	2.85	LYS 12	HN	LYS 11	HG*	5.44
LYS 4	HN	LYS 4	HA	2.47	LYS 12	HB*	LYS 12	HA	2.54
LYS 4	HN	LYS 4	HB*	2.72	LYS 12	HG*	LYS 12	HA	3.21
LYS 4	HN	LYS 4	HD*	4.24	LYS 12	HN	LYS 12	HA	2.72
LYS 4	HN	LYS 4	HG*	3.22	LYS 12	HN	LYS 12	HB*	2.54
LYS 4	HB*	TRP 15	HB*	3.36	LYS 12	HN	LYS 12	HG*	3.24
LYS 4	HG*	TRP 15	HB*	3.23	LYS 12	HN	CYS 18	HB1	3.53
CYS 5	HN	CYS 2	HB1	2.86	CYS 13	HN	LYS 12	HA	3.11
CYS 5	HN	LYS 4	HB*	2.68	CYS 13	HN	LYS 12	HB*	2.67
CYS 5	HN	LYS 4	HG*	4.18	CYS 13	HN	LYS 12	HG*	4.03
CYS 5	HN	LYS 4	HN	2.25	CYS 13	HN	LYS 12	HN	2.45
CYS 5	HB*	CYS 5	HA	2.25	CYS 13	HB*	CYS 13	HA	2.39
CYS 5	HN	CYS 5	HA	2.76	CYS 13	HN	CYS 13	HA	2.85
CYS 5	HN	CYS 5	HB*	2.80	CYS 13	HN	CYS 13	HB*	3.06
CYS 5	HN	GLY 6	HA*	3.33	CYS 13	HN	GLY 14	HA*	4.26
GLY 6	HN	THR 1	HG2*	4.81	CYS 13	HN	CYS 18	HB1	3.19
GLY 6	HN	CYS 2	HB1	2.59	GLY 14	HN	LYS 12	HA	3.57
GLY 6	HN	CYS 2	HB2	2.99	GLY 14	HN	CYS 13	HA	3.11

Tableau 14 : Contraintes d'angle dièdre (°) utilisées pour les calculs avec XPLOR pour Zn^{II}-L_{ZR}.

THR	1	C	CYS	2	N	CYS	2	CA	CYS	2	C	-65	-90	-40
PRO	3	C	LYS	4	N	LYS	4	CA	LYS	4	C	-120	-160	-80
LYS	4	C	CYS	5	N	CYS	5	CA	CYS	5	C	-120	-160	-80
GLY	6	C	ASN	7	N	ASN	7	CA	ASN	7	C	-65	-90	-40
CYS	18	C	LYS	11	N	LYS	11	CA	LYS	11	C	-65	-90	-40
LYS	11	C	LYS	12	N	LYS	12	CA	LYS	12	C	-120	-160	-80
LYS	12	C	CYS	13	N	CYS	13	CA	CYS	13	C	-120	-160	-80
GLY	14	C	TRP	15	N	TRP	15	CA	TRP	15	C	-65	-90	-40
PRO	17	C	CYS	18	N	CYS	18	CA	CYS	18	C	-65	-90	-40
CYS	2	N	CYS	2	CA	CYS	2	CB	CYS	2	SG	180	150	210
CYS	5	N	CYS	5	CA	CYS	5	CB	CYS	5	SG	60	30	90
CYS	13	N	CYS	13	CA	CYS	13	CB	CYS	13	SG	60	30	90
CYS	18	N	CYS	18	CA	CYS	18	CB	CYS	18	SG	180	150	210

7.2. DONNEES RMN DE AU^I₃-CP1(CCCC)



Figure 103 : Numérotation des acides aminés pour les données RMN de CP1(CCCC).

Tableau 15 : Déplacements chimiques, δ (ppm), ¹H RMN pour Au^I₃-CP1(CCCC) dans H₂O/D₂O 9:1 (pH 6,3) à 298 K. ^a

Residue	HN	H α	H β	Others
PRO 1		4.32	1.90, 2.34	CH ₂ (γ): 1.89, 1.99; CH ₂ (δ): 3.36
TYR 2	8.94	4.62	2.64, 3.05	CH(δ): 7.01; CH(ϵ): 6.91
LYS 3	8.85	5.45	1.55	CH ₂ (γ): 1.10, 1.18; CH ₂ (δ): 1.58; CH ₂ (ϵ): 2.92
CYS 4	8.81	4.68	3.18, 3.91	
PRO 5		4.38	2.07, 2.40	CH ₂ (γ): 2.06, 2.18; CH ₂ (δ): 4.08, 4.19
GLU 6	8.72	4.47	2.54, 2.65	CH ₂ (γ): 2.36
CYS 7	8.04	4.91	2.83, 3.67	
GLY 8	8.15	3.81, 4.14		
LYS 9	8.40	4.18	1.83, 2.18	CH ₂ (γ): 0.93; CH ₂ (δ): 1.69; CH ₂ (ϵ): 2.72
SER 10	8.07	5.17	3.61	
PHE 11	9.13	4.77	2.78, 3.31	CH(δ): 7.40; CH(ϵ): 7.16; CH ₃ (ζ): 7.80
SER 12	7.98	4.05	3.64	
GLN 13	7.99	4.88	1.95, 2.23	CH ₂ (γ): 6.87, 7.56
LYS 14	8.65	3.13	1.43	CH ₂ (γ): 0.84, 1.09; CH ₂ (δ): 1.41; CH ₂ (ϵ): 2.78
SER 15	8.59	3.91	3.78	
ASP 16	6.87	4.44	2.91, 2.97	
LEU 17	6.70	2.31	1.00, 1.90	CH(γ): 1.19; CH ₃ (δ): 0,79
VAL 18	7.91	3.58	1.82	CH ₃ (γ): 0.85, 0.89
LYS 19	7.60	4.00	1.88	CH ₂ (γ): 1.45; CH ₂ (δ): 1.71; CH ₂ (ϵ): 3.03
CYS 20	7.71	4.38	3.23, 3.31	
GLN 21	8.32	3.82	1.86	CH ₂ (γ): 2.59
ARG 22	8.56	4.19	1.84, 1.93	CH ₂ (γ): 1.83, 1.68; CH ₂ (δ): 3.10; NH(ϵ): 7.15
THR 23	7.66	4.65	4.34	CH ₃ (γ): 1.23
CYS 24	8.36	4.73	4.03, 4.47	
THR 25	7.85	4.33	4.33	CH ₃ (γ): 1.16
GLY 26	8.52	3.93, 3.97		

^a Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport à l'étalon interne DSS.

Tableau 16 : Distances NOE (Å) utilisées pour les calculs avec XPLOR pour Au^I₃-CP1(CCCC).

AUL	27	AU1	AUL	28	AU1	3.50	0.00	6.50
AUL	27	AU1	AUL	29	AU1	3.50	0.00	6.50
AUL	28	AU1	AUL	29	AU1	3.50	0.00	6.50
TYR	2	HN	TYR	2	HD*	4.56	2.86	0.44
LYS	3	HN	TYR	2	HA	2.26	0.56	0.44
LYS	3	HN	TYR	2	HB*	3.37	1.67	1.63
LYS	3	HN	TYR	2	HD*	3.86	2.16	1.14
LYS	3	HN	LYS	3	HA	2.67	0.97	0.83
LYS	3	HN	LYS	3	HB*	2.51	0.81	0.99
LYS	3	HN	LYS	3	HG*	3.32	1.62	1.68
LYS	3	HN	LEU	17	HD*	3.94	2.24	1.06
CYS	4	HN	LYS	3	HA	2.31	0.61	0.39
CYS	4	HN	LYS	3	HB*	4.26	2.56	0.74
CYS	4	HN	LYS	3	HG*	3.58	1.88	1.42
CYS	4	HN	CYS	4	HA	2.97	1.27	0.53
CYS	4	HN	CYS	4	HB2	2.68	0.98	0.82
CYS	4	HN	CYS	4	HB1	2.59	0.89	0.91
CYS	4	HN	PRO	5	HD*	3.40	1.70	1.60
CYS	4	HN	LYS	9	HN	3.54	1.84	1.46
CYS	4	HN	SER	10	HA	2.84	1.14	0.66
CYS	4	HN	SER	10	HB*	4.55	2.85	0.45
CYS	4	HN	PHE	11	HD*	3.71	2.01	1.29
CYS	4	HN	PHE	11	HE*	3.24	1.54	0.26
CYS	4	HN	LEU	17	HD*	4.17	2.47	0.83
GLU	6	HN	CYS	4	HA	3.30	1.60	1.70
GLU	6	HN	CYS	4	HB2	3.73	2.03	1.27
GLU	6	HN	CYS	4	HB1	3.63	1.93	1.37
GLU	6	HN	PRO	5	HA	3.34	1.64	1.66
GLU	6	HN	PRO	5	HB*	3.31	1.61	1.69
GLU	6	HN	PRO	5	HD*	3.08	1.38	0.42
GLU	6	HN	PRO	5	HG*	3.54	1.84	1.46
GLU	6	HN	GLU	6	HA	2.71	1.01	0.79
GLU	6	HN	GLU	6	HB*	2.58	0.88	0.92
GLU	6	HN	CYS	7	HN	2.59	0.89	0.91
GLU	6	HN	GLY	8	HN	3.21	1.51	0.29
CYS	7	HN	CYS	4	HB2	3.35	1.65	1.65
CYS	7	HN	CYS	4	HB1	3.30	1.60	1.70
CYS	7	HN	GLU	6	HA	3.15	1.45	0.35
CYS	7	HN	GLU	6	HB*	2.68	0.98	0.82
CYS	7	HN	GLU	6	HG*	3.45	1.75	1.55
CYS	7	HN	CYS	7	HA	2.72	1.02	0.78
CYS	7	HN	CYS	7	HB1	2.94	1.24	0.56
CYS	7	HN	CYS	7	HB2	3.10	1.40	0.40
GLY	8	HN	CYS	4	HB2	3.32	1.62	1.68
GLY	8	HN	CYS	4	HB1	3.00	1.30	0.50
GLY	8	HN	CYS	7	HA	3.46	1.76	1.54
GLY	8	HN	CYS	7	HN	2.36	0.66	0.34
GLY	8	HN	GLY	8	HA2	2.31	0.61	0.39
GLY	8	HN	GLY	8	HA1	2.37	0.67	0.33
LYS	9	HN	CYS	4	HB2	3.33	1.63	1.67
LYS	9	HN	CYS	4	HB1	3.13	1.43	0.37
LYS	9	HN	CYS	7	HA	3.72	2.02	1.28
LYS	9	HN	CYS	7	HB1	3.65	1.95	1.35
LYS	9	HN	CYS	7	HB2	3.50	1.80	1.50
LYS	9	HN	GLY	8	HA2	3.34	1.64	1.66
LYS	9	HN	GLY	8	HN	2.83	1.13	0.67

Chapitre 6 : Annexes

LYS	9	HN	LYS	9	HA	2.52	0.82	0.98
LYS	9	HN	LYS	9	HB*	2.50	0.80	1.00
LYS	9	HN	LYS	9	HG*	3.07	1.37	0.43
LYS	9	HN	SER	10	HN	3.36	1.66	1.64
LYS	9	HN	PHE	11	HE*	3.94	2.24	1.06
SER	10	HN	LYS	3	HA	3.72	2.02	1.28
SER	10	HN	LYS	9	HA	2.19	0.49	0.51
SER	10	HN	LYS	9	HB*	2.95	1.25	0.55
SER	10	HN	LYS	9	HG*	3.01	1.31	0.49
SER	10	HN	SER	10	HA	2.88	1.18	0.62
SER	10	HN	SER	10	HB*	2.79	1.09	0.71
PHE	11	HN	TYR	2	HB*	3.59	1.89	1.41
PHE	11	HN	LYS	3	HA	2.87	1.17	0.63
PHE	11	HN	LYS	3	HB*	4.19	2.49	0.81
PHE	11	HN	CYS	4	HN	3.30	1.60	1.70
PHE	11	HN	SER	10	HA	2.24	0.54	0.46
PHE	11	HN	SER	10	HB*	3.17	1.47	0.33
PHE	11	HN	SER	10	HN	3.56	1.86	1.44
PHE	11	HN	PHE	11	HA	3.09	1.39	0.41
PHE	11	HN	PHE	11	HB*	3.00	1.30	0.50
PHE	11	HN	PHE	11	HD*	2.94	1.24	0.56
PHE	11	HN	PHE	11	HE*	4.08	2.38	0.92
PHE	11	HN	LEU	17	HD*	4.69	2.99	0.31
SER	12	HN	PHE	11	HD*	4.05	2.35	0.95
SER	12	HN	SER	12	HA	3.10	1.40	0.40
GLN	13	HN	TYR	2	HD*	4.27	2.57	0.73
GLN	13	HN	TYR	2	HE*	4.15	2.45	0.85
SER	12	HN	PHE	11	HB*	3.15	1.45	0.35
GLN	13	HE2*	GLN	13	HB*	3.74	2.04	1.26
GLN	13	HE2*	GLN	13	HG*	3.88	2.18	1.12
GLN	13	HN	GLN	13	HA	2.75	1.05	0.75
GLN	13	HN	GLN	13	HB*	3.00	1.30	0.50
GLN	13	HN	GLN	13	HE2*	4.13	2.43	0.87
GLN	13	HN	GLN	13	HG*	3.00	1.30	0.50
SER	12	HN	ASP	16	HB*	3.32	1.62	1.68
LYS	14	HN	TYR	2	HD*	4.19	2.49	0.81
LYS	14	HN	TYR	2	HE*	3.68	1.98	1.32
LYS	14	HN	GLN	13	HA	2.44	0.74	0.26
LYS	14	HN	GLN	13	HB*	3.64	1.94	1.36
LYS	14	HN	GLN	13	HG*	4.52	2.82	0.48
LYS	14	HN	GLN	13	HN	5.22	3.52	1.78
LYS	14	HN	LYS	14	HA	3.14	1.44	0.36
LYS	14	HN	LYS	14	HB*	3.19	1.49	0.31
LYS	14	HN	LYS	14	HG*	2.94	1.24	0.56
SER	15	HN	GLN	13	HA	3.46	1.76	1.54
SER	15	HN	GLN	13	HB*	3.78	2.08	1.22
SER	15	HN	LYS	14	HA	3.58	1.88	1.42
SER	15	HN	LYS	14	HB*	3.64	1.94	1.36
SER	15	HN	LYS	14	HG*	3.33	1.63	1.67
SER	15	HN	SER	15	HA	2.92	1.22	0.58
SER	15	HN	SER	15	HB*	3.06	1.36	0.44
SER	15	HN	ASP	16	HN	3.18	1.48	0.32
ASP	16	HN	GLN	13	HB*	3.39	1.69	1.61
ASP	16	HN	LYS	14	HA	3.51	1.81	1.49
ASP	16	HN	SER	15	HA	3.18	1.48	0.32
ASP	16	HN	SER	15	HB*	3.49	1.79	1.51
ASP	16	HN	ASP	16	HA	2.69	0.99	0.81
ASP	16	HN	ASP	16	HB*	2.61	0.91	0.89
ASP	16	HN	LEU	17	HB*	3.36	1.66	1.64

LEU	17	HN	PHE	11	HB*	3.58	1.88	1.42
LEU	17	HN	LYS	14	HA	2.98	1.28	0.52
LEU	17	HN	SER	15	HA	4.11	2.41	0.89
LEU	17	HN	ASP	16	HA	3.19	1.49	0.31
LEU	17	HN	ASP	16	HB*	3.14	1.44	0.36
LEU	17	HN	LEU	17	HA	2.84	1.14	0.66
LEU	17	HN	LEU	17	HB*	2.55	0.85	0.95
LEU	17	HN	LEU	17	HD*	3.84	2.14	1.16
LEU	17	HN	LEU	17	HG	3.32	1.62	1.68
LEU	17	HN	VAL	18	HG*	4.16	2.46	0.84
VAL	18	HN	LYS	14	HA	3.21	1.51	0.29
VAL	18	HN	SER	15	HA	3.09	1.39	0.41
VAL	18	HN	ASP	16	HN	3.70	2.00	1.30
VAL	18	HN	LEU	17	HA	3.14	1.44	0.36
VAL	18	HN	LEU	17	HB*	3.24	1.54	0.26
VAL	18	HN	LEU	17	HN	2.78	1.08	0.72
VAL	18	HN	VAL	18	HA	2.77	1.07	0.73
VAL	18	HN	VAL	18	HB	2.29	0.59	0.41
VAL	18	HN	VAL	18	HG*	2.89	1.19	0.61
VAL	18	HN	LYS	19	HN	2.92	1.22	0.58
LYS	19	HN	SER	15	HA	3.84	2.14	1.16
LYS	19	HN	ASP	16	HA	3.13	1.43	0.37
LYS	19	HN	LEU	17	HN	4.32	2.62	0.68
LYS	19	HN	VAL	18	HA	3.32	1.62	1.68
LYS	19	HN	VAL	18	HG*	3.71	2.01	1.29
LYS	19	HN	LYS	19	HA	2.74	1.04	0.76
LYS	19	HN	LYS	19	HB*	2.37	0.67	0.33
LYS	19	HN	LYS	19	HG*	3.47	1.77	1.53
CYS	20	HN	PHE	11	HE*	4.06	2.36	0.94
CYS	20	HN	LEU	17	HA	3.31	1.61	1.69
CYS	20	HN	VAL	18	HA	3.59	1.89	1.41
CYS	20	HN	LYS	19	HA	3.45	1.75	1.55
CYS	20	HN	LYS	19	HB*	3.09	1.39	0.41
CYS	20	HN	LYS	19	HD*	4.09	2.39	0.91
CYS	20	HN	LYS	19	HG*	3.81	2.11	1.19
CYS	20	HN	CYS	20	HA	2.77	1.07	0.73
CYS	20	HN	CYS	20	HB2	2.44	0.74	0.26
CYS	20	HN	CYS	20	HB1	2.53	0.83	0.97
GLN	21	HE2*	CYS	4	HA	3.49	1.79	1.51
GLN	21	HE2*	PRO	5	HD*	3.57	1.87	1.43
GLN	21	HE21	PRO	5	HG*	5.29	3.59	1.71
GLN	21	HE2*	LEU	17	HD*	4.00	2.30	1.00
GLN	21	HE2*	LEU	17	HG	3.61	1.91	1.39
GLN	21	HN	LEU	17	HD*	5.05	3.35	1.95
GLN	21	HN	VAL	18	HA	3.20	1.50	0.30
GLN	21	HN	LYS	19	HA	4.41	2.71	0.59
GLN	21	HN	LYS	19	HN	3.45	1.75	1.55
VAL	18	HN	CYS	20	HN	3.46	1.76	1.54
GLN	21	HN	CYS	20	HA	3.16	1.46	0.34
GLN	21	HN	CYS	20	HB2	2.93	1.23	0.57
GLN	21	HN	CYS	20	HB1	2.80	1.10	0.70
GLN	21	HN	CYS	20	HN	2.79	1.09	0.71
GLN	21	HE2*	GLN	21	HG*	3.27	1.57	0.23
GLN	21	HE2*	GLN	21	HA	4.15	2.45	0.85
GLN	21	HE2*	GLN	21	HG*	3.11	1.41	0.39
GLN	21	HN	GLN	21	HA	2.93	1.23	0.57
GLN	21	HN	GLN	21	HB*	2.66	0.96	0.84
GLN	21	HN	GLN	21	HE2*	4.10	2.40	0.90
GLN	21	HN	GLN	21	HG*	2.77	1.07	0.73

Chapitre 6 : Annexes

ARG	22	HN	VAL	18	HA	3.41	1.71	1.59
ARG	22	HN	LYS	19	HA	3.19	1.49	0.31
ARG	22	HN	GLN	21	HA	3.42	1.72	1.58
ARG	22	HN	GLN	21	HB*	3.30	1.60	1.70
ARG	22	HN	GLN	21	HN	2.86	1.16	0.64
ARG	22	HE	ARG	22	HB*	2.87	1.17	0.63
ARG	22	HN	ARG	22	HA	2.76	1.06	0.74
ARG	22	HN	ARG	22	HB*	2.89	1.19	0.61
ARG	22	HN	ARG	22	HD*	3.74	2.04	1.26
ARG	22	HN	ARG	22	HG*	3.35	1.65	1.65
ARG	22	HN	THR	23	HG2*	4.38	2.68	0.62
ARG	22	HN	THR	23	HN	2.77	1.07	0.73
THR	23	HN	ARG	22	HA	3.33	1.63	1.67
THR	23	HN	ARG	22	HB*	2.52	0.82	0.98
THR	23	HN	ARG	22	HG*	4.60	2.90	0.40
THR	23	HN	THR	23	HA	2.57	0.87	0.93
THR	23	HN	THR	23	HB	2.93	1.23	0.57
THR	23	HN	THR	23	HG2*	3.30	1.60	1.70
THR	23	HN	CYS	24	HB1	3.35	1.65	1.65
THR	23	HN	CYS	24	HB2	3.46	1.76	1.54
CYS	24	HN	CYS	7	HB1	3.15	1.45	0.35
CYS	24	HN	CYS	7	HB2	3.46	1.76	1.54
CYS	24	HN	THR	23	HA	3.01	1.31	0.49
CYS	24	HN	THR	23	HB	2.87	1.17	0.63
CYS	24	HN	THR	23	HG2*	4.21	2.51	0.79
CYS	24	HN	THR	23	HN	2.43	0.73	0.27
CYS	24	HN	CYS	24	HA	2.73	1.03	0.77
CYS	24	HN	CYS	24	HB1	2.60	0.90	0.90
CYS	24	HN	CYS	24	HB2	2.59	0.89	0.91
CYS	24	HN	THR	25	HG2*	4.20	2.50	0.80
CYS	24	HN	THR	25	HN	3.40	1.70	1.60
THR	25	HN	GLU	6	HB*	3.30	1.60	1.70
THR	25	HN	GLU	6	HG*	3.80	2.10	1.20
THR	25	HN	CYS	24	HA	2.51	0.81	0.99
THR	25	HN	CYS	24	HB1	3.24	1.54	0.26
THR	25	HN	CYS	24	HB2	3.02	1.32	0.48
THR	25	HN	THR	25	HB	2.50	0.80	1.00
THR	25	HN	THR	25	HG2*	3.21	1.51	0.29
GLY	26	HN	THR	25	HG2*	3.94	2.24	1.06
GLY	26	HN	THR	25	HN	2.86	1.16	0.64
GLY	26	HN	GLY	26	HA*	2.30	0.60	0.40
PRO	1	HB2	SER	12	HB*	2.86	1.16	0.64
PRO	1	HB1	SER	12	HB*	3.58	1.88	1.42
TYR	2	HD*	PRO	1	HA	3.16	1.46	0.34
TYR	2	HE*	PRO	1	HA	3.50	1.80	1.50
TYR	2	HB*	TYR	2	HA	2.95	1.25	0.55
TYR	2	HD*	TYR	2	HA	2.92	1.22	0.58
TYR	2	HD*	TYR	2	HB*	2.65	0.95	0.85
TYR	2	HE*	TYR	2	HA	3.65	1.95	1.35
TYR	2	HE*	TYR	2	HB*	3.31	1.61	1.69
TYR	2	HD*	PHE	11	HB*	3.45	1.75	1.55
TYR	2	HD*	GLN	13	HA	3.19	1.49	0.31
TYR	2	HE*	GLN	13	HA	2.88	1.18	0.62
TYR	2	HD*	LYS	14	HA	3.23	1.53	0.27
TYR	2	HD*	LYS	14	HD*	3.69	1.99	1.31
TYR	2	HD*	LYS	14	HG*	3.38	1.68	1.62
TYR	2	HE*	LYS	14	HA	3.73	2.03	1.27
TYR	2	HE*	LYS	14	HD*	3.57	1.87	1.43
TYR	2	HE*	LYS	14	HG*	3.40	1.70	1.60

TYR	2	HD*	LEU	17	HB*	4.42	2.72	0.58
TYR	2	HD*	LEU	17	HD*	4.27	2.57	0.73
TYR	2	HE*	LEU	17	HD*	5.17	3.47	1.83
LYS	3	HB*	LYS	3	HA	2.66	0.96	0.84
LYS	3	HG*	LYS	3	HA	2.97	1.27	0.53
LYS	3	HB*	SER	10	HA	3.17	1.47	0.33
LYS	3	HB*	SER	10	HB*	3.99	2.29	1.01
LYS	3	HG*	SER	10	HA	3.25	1.55	0.25
CYS	4	HB2	CYS	4	HA	2.55	0.85	0.95
CYS	4	HB1	CYS	4	HA	2.59	0.89	0.91
CYS	4	HB2	PRO	5	HD*	3.01	1.31	0.49
PRO	5	HD*	CYS	4	HA	2.31	0.61	0.39
GLU	6	HB*	GLU	6	HA	2.54	0.84	0.96
GLU	6	HB*	CYS	24	HA	3.33	1.63	1.67
CYS	7	HB1	CYS	7	HA	2.48	0.78	0.22
CYS	7	HB2	CYS	7	HA	2.43	0.73	0.27
CYS	7	HB2	CYS	20	HA	3.47	1.77	1.53
CYS	7	HB1	CYS	24	HA	2.74	1.04	0.76
CYS	7	HB2	CYS	24	HA	2.81	1.11	0.69
CYS	7	HB2	CYS	24	HB2	3.13	1.43	0.37
LYS	9	HG*	LYS	9	HA	2.72	1.02	0.78
SER	10	HA	LYS	3	HA	2.16	0.46	0.54
SER	10	HB*	LYS	3	HA	3.35	1.65	1.65
SER	10	HB*	SER	10	HA	2.67	0.97	0.83
PHE	11	HD*	TYR	2	HB*	3.55	1.85	1.45
PHE	11	HD*	LYS	3	HA	3.29	1.59	0.21
PHE	11	HE*	LYS	3	HA	4.09	2.39	0.91
PHE	11	HE*	CYS	4	HA	3.76	2.06	1.24
PHE	11	HE*	CYS	4	HB2	3.00	1.30	0.50
PHE	11	HE*	CYS	4	HB1	3.02	1.32	0.48
PHE	11	HZ	CYS	4	HB2	3.23	1.53	0.27
PHE	11	HZ	CYS	4	HB1	3.55	1.85	1.45
PHE	11	HD*	LYS	9	HG*	3.89	2.19	1.11
PHE	11	HD*	LYS	9	HB*	4.01	3.21	0.99
PHE	11	HE*	LYS	9	HB*	3.46	1.76	1.54
PHE	11	HE*	LYS	9	HE*	3.00	1.30	0.50
PHE	11	HE*	LYS	9	HG*	3.14	1.44	0.36
PHE	11	HZ	LYS	9	HB*	3.48	1.78	1.52
PHE	11	HZ	LYS	9	HE*	3.03	1.33	0.47
PHE	11	HZ	LYS	9	HG*	3.17	1.47	0.33
PHE	11	HD*	SER	10	HA	3.19	1.49	0.31
PHE	11	HE*	SER	10	HA	3.90	2.20	1.10
PHE	11	HB*	PHE	11	HA	2.54	0.84	0.96
PHE	11	HD*	PHE	11	HA	2.96	1.26	0.54
PHE	11	HD*	PHE	11	HB*	2.60	0.90	0.90
PHE	11	HD*	ASP	16	HA	3.80	2.10	1.20
PHE	11	HD*	ASP	16	HB*	2.84	1.14	0.66
PHE	11	HD*	LEU	17	HA	3.19	1.49	0.31
PHE	11	HD*	LEU	17	HB*	2.99	1.29	0.51
PHE	11	HD*	LEU	17	HD*	3.73	2.03	1.27
PHE	11	HD*	LEU	17	HG	3.45	1.75	1.55
PHE	11	HE*	LEU	17	HA	3.30	1.60	1.70
PHE	11	HE*	LEU	17	HB*	3.53	1.83	1.47
PHE	11	HE*	LEU	17	HD*	3.78	2.08	1.22
PHE	11	HE*	LEU	17	HG	3.71	2.01	1.29
PHE	11	HZ	LEU	17	HA	3.31	1.61	1.69
PHE	11	HZ	LEU	17	HD*	4.22	2.52	0.78
PHE	11	HE*	CYS	20	HA	3.76	2.06	1.24
PHE	11	HE*	CYS	20	HB2	2.92	1.22	0.58

Chapitre 6 : Annexes

PHE	11	HE*	CYS	20	HB1	2.93	1.23	0.57
PHE	11	HZ	CYS	20	HB2	3.04	1.34	0.46
PHE	11	HZ	CYS	20	HB1	2.88	1.18	0.62
GLN	13	HB*	GLN	13	HA	2.60	0.90	0.90
GLN	13	HG*	GLN	13	HA	2.84	1.14	0.66
LYS	14	HD*	LYS	14	HA	2.77	1.07	0.73
ASP	16	HB*	ASP	16	HA	2.58	0.88	0.92
LEU	17	HD*	TYR	2	HA	4.28	2.58	0.72
LEU	17	HD*	TYR	2	HB*	3.38	1.68	1.62
LEU	17	HD*	LYS	3	HA	4.56	2.86	0.44
LEU	17	HD*	CYS	4	HA	3.47	1.77	1.53
LEU	17	HD*	CYS	4	HB2	3.10	1.40	0.40
LEU	17	HD*	PRO	5	HD*	3.91	2.21	1.09
LEU	17	HD*	SER	10	HA	4.91	3.21	2.09
LEU	17	HB*	PHE	11	HB*	3.72	2.02	1.28
LEU	17	HD*	PHE	11	HB*	3.60	1.90	1.40
LEU	17	HB*	LYS	14	HA	2.53	0.83	0.97
LEU	17	HB*	LEU	17	HA	2.83	1.13	0.67
LEU	17	HD*	LEU	17	HA	3.21	1.51	0.29
LEU	17	HD*	LEU	17	HB*	3.63	1.93	1.37
LEU	17	HG	LEU	17	HA	2.46	0.76	0.24
LEU	17	HD*	VAL	18	HA	3.97	2.27	1.03
LEU	17	HD*	GLN	21	HA	4.14	2.44	0.86
LEU	17	HD*	GLN	21	HG*	4.08	2.38	0.92
VAL	18	HB	SER	15	HA	2.43	0.73	0.27
VAL	18	HG*	SER	15	HA	3.37	1.67	1.63
VAL	18	HG*	VAL	18	HA	2.86	1.16	0.64
VAL	18	HG*	VAL	18	HB	2.68	0.98	0.82
VAL	18	HG*	LYS	19	HA	3.77	2.07	1.23
LYS	19	HB*	ASP	16	HA	2.68	0.98	0.82
LYS	19	HB*	LYS	19	HA	2.42	0.72	0.28
LYS	19	HD*	LYS	19	HA	3.09	1.39	0.41
LYS	19	HD*	LYS	19	HE*	3.33	1.63	1.67
LYS	19	HG*	LYS	19	HA	2.89	1.19	0.61
LYS	19	HG*	LYS	19	HE*	3.48	1.78	1.52
CYS	20	HB2	CYS	20	HA	2.56	0.86	0.94
CYS	20	HB1	CYS	20	HA	2.55	0.85	0.95
GLN	21	HB*	VAL	18	HA	2.55	0.85	0.95
LEU	17	HA	CYS	20	HB2	2.88	1.18	0.62
GLN	21	HB*	GLN	21	HA	2.48	0.78	0.22
GLN	21	HG*	GLN	21	HA	2.60	0.90	0.90
ARG	22	HB*	LYS	19	HA	3.03	1.33	0.47
ARG	22	HD*	LYS	19	HA	3.84	2.14	1.16
ARG	22	HB*	ARG	22	HD*	2.70	1.00	0.80
ARG	22	HB*	ARG	22	HA	2.71	1.01	0.79
ARG	22	HG*	ARG	22	HA	2.95	1.25	0.55
ARG	22	HG*	ARG	22	HD*	3.16	1.46	0.34
THR	23	HG2*	CYS	7	HA	3.91	2.21	1.09
THR	23	HB	THR	23	HA	2.27	0.57	0.43
THR	23	HG2*	THR	23	HA	2.85	1.15	0.65
THR	25	HG2*	THR	23	HA	3.83	2.13	1.17
THR	23	HB	CYS	20	HA	3.32	1.62	1.68
CYS	7	HB1	CYS	24	HB1	2.95	1.25	0.55
CYS	7	HB1	CYS	20	HA	3.47	1.77	1.53
CYS	7	HB1	CYS	24	HB2	2.58	0.88	0.92
CYS	7	HB1	THR	23	HB	4.83	3.13	2.17

Tableau 17 : Contraintes d'angle dièdre (°) utilisées pour les calculs avec XPLOR pour Au^I₃-CP1(CCCC).

TYR	2	C	LYS	3	N	LYS	3	CA	LYS	3	C	-120	-160	-80
LYS	3	C	CYS	4	N	CYS	4	CA	CYS	4	C	-65	-90	-40
PRO	5	C	GLU	6	N	GLU	6	CA	GLU	6	C	-120	-160	-80
GLY	8	C	LYS	9	N	LYS	9	CA	LYS	9	C	-65	-90	-40
LYS	9	C	SER	10	N	SER	10	CA	SER	10	C	-120	-160	-80
SER	10	C	PHE	11	N	PHE	11	CA	PHE	11	C	-120	-160	-80
GLN	13	C	LYS	14	N	LYS	14	CA	LYS	14	C	-65	-90	-40
LYS	14	C	SER	15	N	SER	15	CA	SER	15	C	-65	-90	-40
ASP	16	C	LEU	17	N	LEU	17	CA	LEU	17	C	-65	-90	-40
VAL	18	C	LYS	19	N	LYS	19	CA	LYS	19	C	-65	-90	-40
LYS	19	C	CYS	20	N	CYS	20	CA	CYS	20	C	-65	-90	-40
CYS	20	C	GLN	21	N	GLN	21	CA	GLN	21	C	-65	-90	-40
GLN	21	C	ARG	22	N	ARG	22	CA	ARG	22	C	-65	-90	-40
ARG	22	C	THR	23	N	THR	23	CA	THR	23	C	-120	-160	-80
THR	23	C	CYS	24	N	CYS	24	CA	CYS	24	C	-65	-90	-40
CYS	4	N	CYS	4	CA	CYS	4	CB	CYS	4	SG	180	150	210
CYS	7	N	CYS	7	CA	CYS	7	CB	CYS	7	SG	60	30	90
CYS	20	N	CYS	20	CA	CYS	20	CB	CYS	20	SG	180	150	210
CYS	24	N	CYS	24	CA	CYS	24	CB	CYS	24	SG	180	150	210

7.3. ARTICLES PUBLIES

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de trois articles publiés ou acceptés au moment de la soutenance.

On the Design of Zinc-Finger Models with Cyclic Peptides Bearing a Linear Tail

Aurélié Jacques, Bastien Mettra, Vincent Lebrun, Jean-Marc Latour,* and Olivier Sénèque*[^a]

Abstract: Cyclic peptides with a linear tail (CPLT) have been successfully used to model two zinc fingers (ZFs) adopting the treble-clef- and loosened zinc-ribbon folds. In this article, we examine the factors that may influence the design of such ZF models: mutations in the sequence, size of the cycle, and size of the tail. For this purpose, several peptides derived from the CPLT-based models of the treble-clef- and loosened zinc-ribbon ZF were synthesized and studied. CPLT-based

models appear to be robust toward mutations, accommodate various cycle sizes, and are sensible to the size of the linking region of the tail located between the cycle and the coordinating amino acids. Based on these criteria, we describe the design of a new CPLT-based model for the zinc-ribbon ZFs,

Keywords: amino acids • metalloproteins • NMR spectroscopy • peptides • structural biology • zinc

L_{ZR} , and compare it to a linear analogue, L_{ZR}^{lin} . The model complex $Zn \cdot L_{ZR}$ is able to fold correctly around the metal ion contrary to $Zn \cdot L_{ZR}^{lin}$, suggesting that CPLT-based models are more likely to yield structurally meaningful models of ZF sites than linear peptide models. Finally, we draw some rules that could allow the design of new CPLT-based metallopeptides with a controlled fold.

Introduction

Zinc fingers (ZFs) commonly refer to protein domains in which a zinc ion is coordinated by four cysteine and histidine side chains in a tetrahedral geometry. These sites correspond to the general formula $Zn(Cys)_{4-x}(His)_x$ (in which $x = 0, 1, \text{ or } 2$). ZF proteins are ubiquitous in living organisms^[1–3] and generally play a structural role ensuring the proper folding and the function of the protein.^[4–7] Most of the ZFs can be classified into a reduced number of families according to the fold of the peptide chain around the zinc ion.^[5,7] The three main fold groups, which encompass a high number of ZFs, are the classical $\beta\beta\alpha$ -, the treble-clef-, and the zinc-ribbon families. Classical $\beta\beta\alpha$ ZFs are composed of a β -hairpin and a α -helix with two cysteines in the β -hairpin and either two histidines or one histidine and one cysteine in the helix.^[4,5,8–11] Most of the time these ZFs are encountered in transcription factors with their helix binding to the major groove of DNA. In treble-clef ZFs (Figure 1 A), the zinc ion is generally coordinated by four cysteines of two CXXC

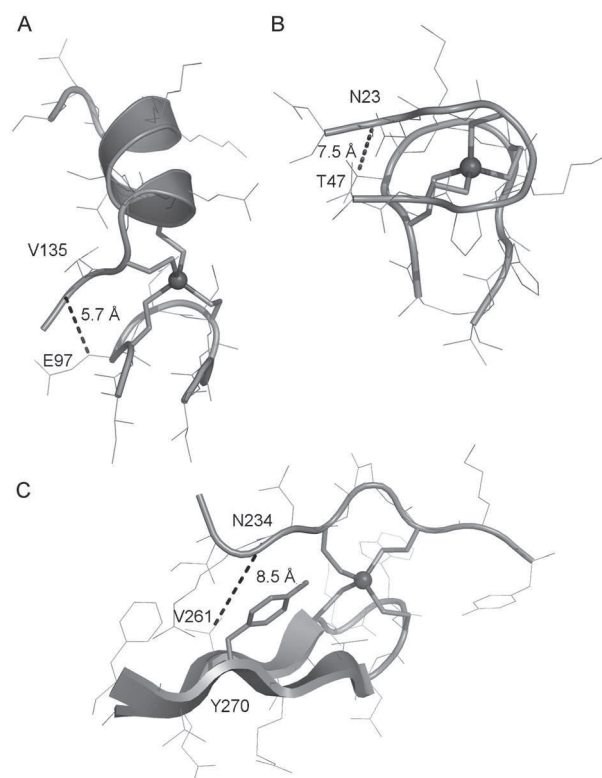


Figure 1. A) Treble-clef ZF site of *Bacillus subtilis* PerR (pdb 2FE3).^[52] B) Zinc-ribbon ZF of *Thermococcus celer* RNA polymerase II subunit 9 (pdb 1QYP).^[53] C) Loosened zinc-ribbon ZF site of *Thermotoga maritima* Hsp33 (pdb 1VQ0).^[54] The tyrosine of the β -hairpin that is hydrogen-bonded to one of the zinc-binding cysteines is highlighted, see main text.

[a] A. Jacques, B. Mettra, V. Lebrun, Dr. J.-M. Latour, Dr. O. Sénèque
Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
Equipe de Physicochimie des Métaux en Biologie
UMR 5249 CNRS/CEA-DSV-IRTSV/
Université Joseph Fourier
17 rue des Martyrs, Grenoble 38054 (France)
Fax: (+33) 4-38-78-54-65
E-mail: jean-marc.latour@cea.fr
olivier.seneque@cea.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201204167>.

motifs located in a loop and in the N-terminal turn of a α -helix.^[5,12] Treble-clef ZFs with a (Cys)₃(His) coordination set also exist. Treble-clef ZFs are most often encountered of protein/protein or protein/DNA interaction domains. Zinc-ribbon ZFs (Figure 1B) are made up of two β -hairpin-like loops each containing a CXXC motif to bind Zn²⁺.^[5] These loops adopt a very similar fold and are nearly perpendicular to each other. Such ZFs are often found in proteins involved in the translation/transcription machinery that includes transcription factors and RNA polymerases,^[4,13] but they also serve as simple structural elements in several proteins whose function is not related to DNA or RNA binding. Some zinc-ribbon ZFs possess a (Cys)₃(His) binding set instead of a (Cys)₄ one.

In the latest classification of ZF sites, Andreini et al. have raised the question of the relation between their fold type and their function.^[7] ZF sites are mainly structural sites but zinc-bound cysteines are reactive toward electrophiles or metal ions and this makes ZF a likely therapeutic target.^[14–19] In addition, some proteins use a ZF site as an active site. For instance, the protein Ada repairs methylation of DNA phosphoesters^[20–22] by transferring the methyl group to one of the zinc-bound cysteine of a Zn(Cys)₄ site (type I shuffled zinc-ribbon^[7]) and the protein Hsp33, a holdase involved in the bacterial defense against oxidative stress, senses an HOCl stress^[23] thanks to a Zn(Cys)₄ (loosened zinc-ribbon^[7]), also. It is not yet known if the reactivity of such ZF sites depends on their fold type and clearly this has to be investigated. To better understand the properties of ZF sites in proteins, model complexes appear attractive because they are smaller than an entire protein and thus, they allow detailed and precise investigations at the molecular level. The pioneering work of Berg et al. on model peptides of classical $\beta\beta\alpha$ ZFs has highlighted the importance of such an approach to get more insight about the properties of ZFs.^[24–26] This has prompted many groups to use small linear peptides modeling a single ZF site to understand the thermodynamics^[27–36] and the kinetics^[37–39] of metal binding, the thermodynamics of metal-induced folding,^[40–42] or the reactivity^[43–47] of ZFs. Most of these studies were performed with linear peptides corresponding to the classical $\beta\beta\alpha$ ZF or the HIV nucleocapsid p7 ZF. However, due to their topology, some other ZF have folds that cannot be reproduced with short linear peptides and therefore other designs of models are needed to investigate the properties of these ZFs.

Reactive-oxygen species (ROS) such as H₂O₂, O₂^{•-}, HO[•], or HOCl are commonly produced in living organisms and they react with cysteines as a means of signaling or defense against ROS. This reactivity has been extensively studied and is now rationalized.^[48–51] However, whereas ROS interaction with ZFs has been reported in a few instances, no in-depth studies have been conducted and no rationale has yet emerged. A possible reason lies in the fact that the reactivity of ZFs with ROS may depend on several factors such as the ZF fold-type, the number of Cys/His residues in the coordination set, and the surrounding amino acids or the dy-

namic properties of the ZF. Therefore, structurally relevant models of various fold groups of ZFs are needed to distinguish between these factors. We have initiated a research program aimed at delineating the reactivity of cysteines of ZFs with various ROS to assess if ZFs are actual targets of ROS and if they can be used by cells to detect, signal, or destroy ROS. To obtain biologically relevant information, our strategy consists in designing models that closely reproduce the structural properties of the ZF domain of the particular fold we want to mimic, and then study its reactivity. For this purpose, we use model peptides of reduced size (ca. 20–30 amino acids) that allow detailed structural, mechanistic and kinetic studies at the molecular level.

We have previously designed two small peptidic models of a treble-clef ZF (Figure 1A) and of a loosened zinc-ribbon ZF, as termed by Andreini et al.^[7] (Figure 1C). The former, L_{TC},^[55] was designed after the treble-clef ZF site of the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR^[52,56] and the latter, L_{HSP},^[57] after the ZF site of Hsp33.^[58,59] These proteins were chosen because the involvement of their ZF site in H₂O₂ sensing was under discussion when we started this project. These models are made up of a cyclic peptide with a linear tail (CPLT). Indeed, we noticed that in these two ZFs (but also in many other ZFs) one of the pair of cysteines (CXXC motif) is located in a β -hairpin-like loop. Therefore, we decided to use a cyclic peptide to fold this loop in a proper way. The cycle of the CPLT-based models incorporates the amino acid sequence of the β -hairpin-like loop and a D-Pro-L-Pro template. Robinson et al. have shown that in such a cycle, the D-Pro-L-Pro template forms a type II' β -turn with its two surrounding amino acids. This turn forces the other amino acids to adopt a conformation close to a β -hairpin loop.^[60–62] To introduce the two other zinc-binding amino acids (a CXXC motif in treble-clef ZFs and a CXC in the loosened ZF site of Hsp33), we chose to graft a linear peptide (the tail) on a lysine or a glutamate side chain of the cycle. The CPLT-based models L_{TC} and L_{HSP} form very tight 1:1 complexes with Zn²⁺.^[55,57,63] Compared to the native ZF sites, these model complexes successfully reproduce 1) the peptide fold around zinc, 2) the relative orientations of the cysteine side chains, and 3) the hydrogen-bond network involving the coordinating sulfurs.^[55,57] In this article we will discuss some factors (amino acid composition, length of the cycle and of the tail) that might influence the folding of CPLT-based ZF models to assess what is important for the successful design of structurally relevant ZF models. Based on this, we will propose a CPLT-based model for the zinc-ribbon ZFs and compare it to a linear model peptide of identical sequence. We will also discuss the interest of CPLT over linear peptides in the structural modeling of ZF sites.

Results

Influence of the amino acid composition on CPLT-based models: The robustness of the CPLT-based models toward mutations in their amino acid sequence was investigated

with L_{TC} . The ZF site of *Bacillus subtilis* PerR is composed of a β -hairpin-like loop (C⁹⁶ENCGK¹⁰¹) that provides the first CXXC Zn-binding motif and a coil (V¹³⁵CQECSKKNH¹⁴⁵) that is mostly helical and contains the second CXXC motif (Figure 1A). These two elements are anchored on a parallel/antiparallel three stranded β -sheet ($\uparrow\uparrow\downarrow$). To model this site, L_{TC} bears an 8 amino acids cycle that incorporates the sequence of the β -hairpin-like loop (Figure 2A) and the sequence of the helix was grafted

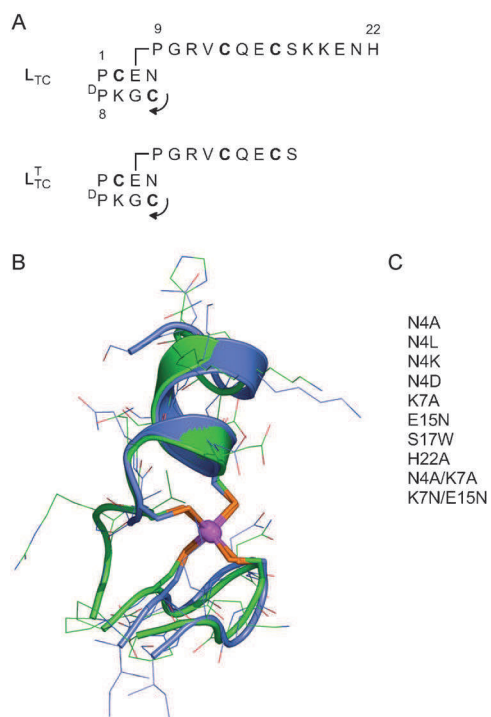


Figure 2. CPLT-based model of treble-clef ZFs. A) Sequence of L_{TC} and L_{TC}^T . The numbering of amino acids in the cycle and the linear tail are indicated. The arrow indicates the N to C direction in the cycle. B) Superimposition of the NMR solution structure of the $Zn \cdot L_{TC}$ complex^[55] (green) and the crystallographic structure of the ZF site of *Bacillus subtilis* PerR (blue, pdb 2FE3).^[52] C) List of mutations introduced in the sequence of L_{TC} .

on the side chain of the glutamate of the cycle with a PGR linker.^[55] Its zinc complex $Zn \cdot L_{TC}$ adopts the treble-clef fold and reproduces almost perfectly all the structural features of the ZF site of PerR (Figure 2B) including a hydrogen-bond network that involves the four cysteine sulfurs. Several peptides based on the sequence of L_{TC} , but with mutations either in the cycle or in the tail, were synthesized to assess if mutations can change some of the properties (structure, metal binding, or reactivity) of $Zn \cdot L_{TC}$ (Figure 2C): 1) In $Zn \cdot L_{TC}$, the side-chain NH_2 of Asn4 is hydrogen-bonded to the Cys16 sulfur. Mutants incorporating a lysine, a glutamate, an alanine, or a leucine were synthesized to monitor the impact of this hydrogen bond on the structure of the complex and its reactivity. 2) In the crystal structure of PerR,^[52] a salt bridge is observed between the lysine of the

β -hairpin like-loop and the glutamate in the first turn of the helix, which correspond to Lys7 and Glu15 in L_{TC} . The NMR data of $Zn \cdot L_{TC}$ does not allow us to draw conclusions regarding the presence of this salt bridge in the model complex. These amino acids were mutated to examine if they have an influence on the fold. 3) A tryptophan was also introduced in place of Ser17 to introduce a fluorescent probe to monitor metal binding. 4) The final C-terminal histidine was mutated for reactivity studies. Variants with a double mutation (two in the cycle or one in the cycle and the other in the tail) were also synthesized to check the robustness of the design. All these peptides form only 1:1 complexes with Zn^{2+} (see Figure S1 in the Supporting Information). Their circular dichroism (CD) spectra present the characteristic features of the parent $Zn \cdot L_{TC}$ complex with a strong negative band at 222 nm and a shoulder near 206 nm^[55] (Figure 3A) suggesting a fold similar to that of $Zn \cdot L_{TC}$. This was confirmed by ¹H NMR spectroscopy: both their chemical shifts and their nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY) patterns are nearly identical. As an example, Figure 3B compares the chemical shifts of $Zn \cdot L_{TC}$, $Zn \cdot L_{TC}^-$ (N4K), $Zn \cdot L_{TC}$ (N4A/K7A), and the random coil. The HN and H α chemical shifts of the mutants are nearly identical to that of the parent complex (within $|\Delta\delta| < 0.2$ ppm for most of the resonances) and differ markedly from those of the random coil. This shows that amino acid mutations do not affect the structure of the complex and thus the CPLT design appears to be robust. More specifically, neither mutations at position 4 (which remove one hydrogen bond with

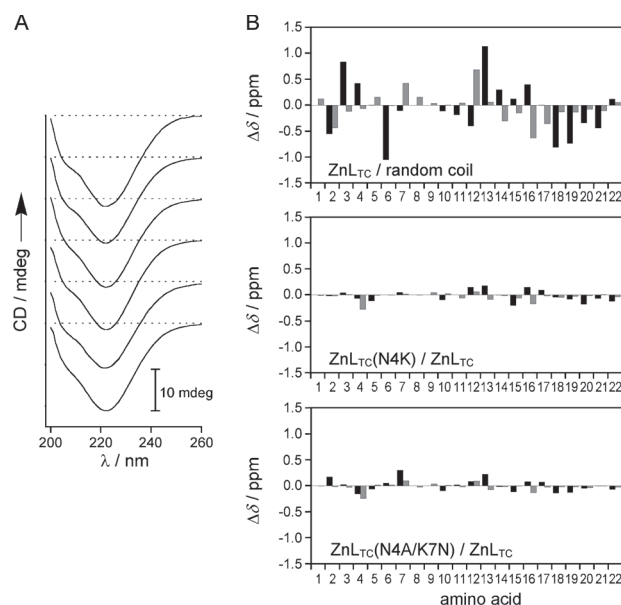


Figure 3. A) Examples of CD spectra of zinc complexes formed with several variants of L_{TC} . From top to bottom: L_{TC} , L_{TC} (N4L), L_{TC} (N4D), L_{TC} (N4K), L_{TC} (H22A), L_{TC} (N4A/K7A). Spectra were recorded in 0.4 cm path length cell containing a 20 μ M solution of the zinc complex in phosphate buffer (20 mM), pH 7.0, 298 K. The dotted line on each spectrum corresponds to zero CD intensity. B) Chemical shift difference between (top) $Zn \cdot L_{TC}$ and random coil,^[64] (middle) $Zn \cdot L_{TC}$ (N4K) and $Zn \cdot L_{TC}$ and (bottom) $Zn \cdot L_{TC}$ (N4A/K7A) and $Zn \cdot L_{TC}$ (HN: black; H α : grey).

the Zn(Cys)₄ core) nor mutations at positions 7 and 15 (which may preclude possible salt bridging between the β -hairpin-like loop and the helix) impact the structure. The fold of the model seems to depend only on the binding of the cysteines to the metal ion. In addition, as expected, the introduction of a tryptophan at position 17 allows Zn²⁺ binding to be monitored by fluorescence (see Figure S2 of the Supporting Information). The study of the influence of these mutations on the reactivity is underway.

Influence of the CPLT size: *Size of the cycle:* To obtain a model with a reduced number of amino acids, L_{TC} was designed with the minimal set of amino acids in the cycle needed to reproduce the β -hairpin-like loop. Hence, an 8 amino acid cycle was chosen that incorporates the six residues of the loop (CENCGK) plus the D-Pro-L-Pro template. On the contrary, L_{HSP} was built on a 12 amino acids cycle (Figure 4A). The ZF site of *Thermotoga maritima* Hsp33 is

Size of the tail: Concerning the size of the tail, two fragments are to be considered: 1) the terminal extension after the CX_nC Zn-binding motif and 2) the linking sequence between the cycle and the Zn-binding motif of the tail. The influence of the first one was investigated with L_{TC}. Earlier, we have reported a truncated version of L_{TC},^[55] namely L_{TC}^T (Figure 2A), which was designed to reduce as much as possible the size of the treble-clef model. L_{TC}^T lacks the five C-terminal amino acids of the linear tail (KKENH) that fold into an helix in Zn·L_{TC}. L_{TC}^T behaves like L_{TC} regarding its metal-binding properties with only a ≈ 10 times lower affinity for Zn²⁺ as a difference.^[65] From the structural point of view, Zn·L_{TC}^T adopts the treble-clef fold and its structure is almost identical to that of Zn·L_{TC}. This indicates that the terminal extension of the tail beyond the pair of cysteines is not necessary for the proper folding of the peptide. We have also investigated the influence of the size of the sequence between the cycle and the Zn-binding motif located in the tail with CPLT designed to model the ZF site of Hsp33. In the structure of *Thermotoga maritima* Hsp33,^[54] the backbone carbonyl of the Asn234, C-side of the CXC motif, is close (3.7 Å) to the aromatic side chain of the β -hairpin tyrosine (Tyr270) suggesting the presence of π - π contacts that could stabilize the structure. In addition, the side chain of Val261 (β -hairpin) points toward Asn234 and the distance between Val261 C β and Asn234 CO is approximately 8.5 Å (Figure 1C). Therefore, position 261 appeared to be a good candidate for the introduction of the branching point between the cycle and the tail. Owing to the orientation of the tail, a lysine had to be used. A lysine side chain in extended conformation corresponds to approximately 5 Å. To fill the 8.5 Å gap, at least one amino acid (corresponding to 3.7 Å in an extended conformation) was needed between the branching lysine and the carbonyl of position 234 of the coil. Therefore, we synthesized three peptides, L_{HSP}, L4 and L5, having three, two, and one amino acids as the linker, respectively (Figure 4A). As for L_{HSP}, UV/Vis and CD titrations show that L4 and L5 form 1:1 complexes with Zn²⁺ up to 1.0 equiv Zn²⁺ (see Figures S3 and S4 in the Supporting Information). The UV/Vis titrations display an increase of the extinction coefficient $\Delta\epsilon$ of 22900 and 24900 M⁻¹ cm⁻¹ at 209 nm for L4 and L5, respectively; this is in good agreement with the formation of Zn(Cys)₄ complexes.^[55,57,63] However, contrary to L_{HSP}, these titrations do not show a clean plateau for the UV/Vis and CD signals after 1.0 equivalent of Zn²⁺, suggesting the formation of a complex of different stoichiometry in the presence of excess Zn²⁺. Nevertheless, the 1:1 complex seems to remain the major species. A similar behavior was previously described for L_{HSP}^{lin} (Figure 4A), which corresponds to the non-cyclized variant of L_{HSP}.^[57] Regarding the structural properties of Zn·L_{HSP}, Zn·L4, and Zn·L5, their ¹H NMR spectra are compared in Figure 5. The 1D ¹H NMR spectrum of Zn·L_{HSP} displays narrow resonances, which show that it is folded in a unique conformation, and its NOESY spectrum presents numerous cross-peaks that have allowed us to determine its struc-

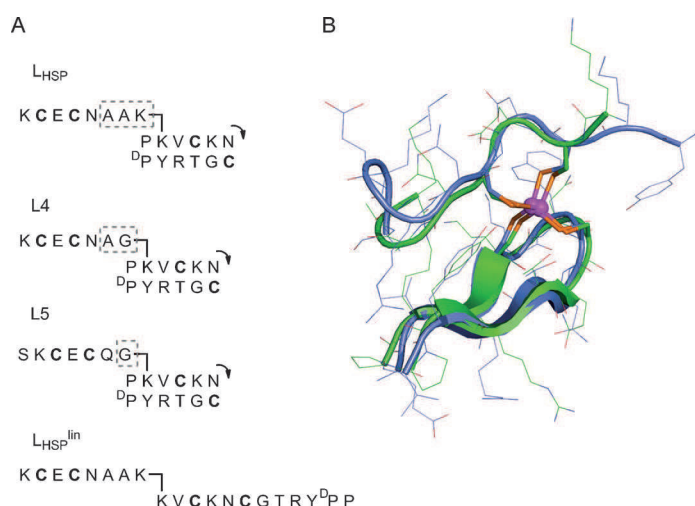


Figure 4. CPLT-based models of loosened zinc-ribbon ZFs. A) Sequences of the L_{HSP}, L4 and L5. The arrows indicate the N to C direction in the cycle. The dashed box highlights the linker. B) Superimposition of the NMR solution structure of the Zn·L_{HSP} complex^[57] (green) and the crystallographic structure of the ZF site of *Thermotoga maritima* Hsp33 (blue, pdb 1VQ0).^[54]

composed of a long β -hairpin (G²⁵⁹EVVCKWCNTRYVF²⁷²) and an extended coil (Y²²⁹KCDCNR²³⁵) each containing one pair of cysteines (Figure 1C).^[54] Noteworthy, the crystal structure of Hsp33 shows a hydrogen bond between the hydroxyl group of Tyr270, located in the β -hairpin, and Cys233 S γ , which is located in the coil.^[54,57,58] To use the smallest cycle as possible but also to incorporate this tyrosine, a 12 amino acid cycle comprising 10 amino acids of the β -hairpin (from V²⁶¹ to Y²⁷⁰) plus the D-Pro-L-Pro template was designed. The fold of L_{HSP} around Zn²⁺ is very close to that of Hsp33, the β -hairpin is correctly folded and the TyrOH...S hydrogen bond is present (Figure 4B). Hence, considering Zn·L_{TC} and Zn·L_{HSP} this shows that CPLT-based models accommodate at least 8 and 12 amino acids cycles, corresponding to 6 and 10 amino acids β -hairpin loops.

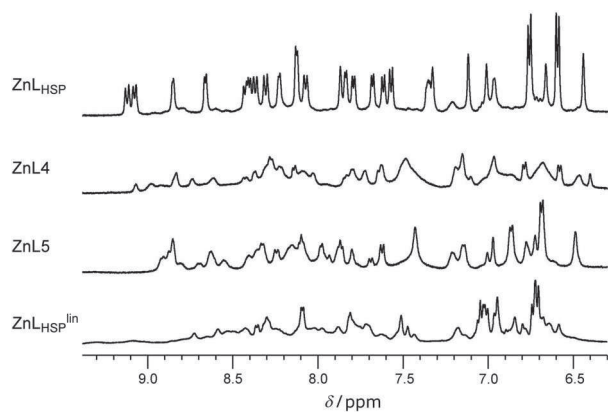


Figure 5. NH and aromatic region of the ^1H NMR spectra (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH 6.2, 298 K) of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$, $\text{Zn}\cdot\text{L}_4$, $\text{Zn}\cdot\text{L}_5$, and $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}^{\text{lin}}$ generated by addition of Zn^{2+} (1.0 equiv) to the peptide.

ture.^[57] In strong contrast, the ^1H NMR spectra of $\text{Zn}\cdot\text{L}_4$ and $\text{Zn}\cdot\text{L}_5$ show broad resonances, some of them being split as attested by total correlation spectroscopy (TOCSY) and NOESY experiments. This reveals the dynamic conformational behavior of these two complexes, which adopt multiple conformations that are in equilibrium. Therefore, the shortened-linking motif in L_4 and L_5 compared with L_{HSP} does not allow the zinc complexes to fold in a unique conformation. This indicates that the length of the linker finely tunes the conformational behavior of the complexes and that it has to be long enough to not preclude the correct positioning of the tail and the cycle. In treble-clef ZFs of PerR,^[52] the distance between the C β atom of amino acid Glu97 of the β -hairpin-like Zn-binding loop and Val135 NH, which precedes the C¹³⁶QEC¹³⁹ motif of the helical coil, is approximately 5.7 Å (Figure 1A). Glu97, whose side chain points roughly toward Val135, was chosen as the grafting point for the tail and a three amino acid linker (PGR) was large enough to fill the 5.7 Å gap and suitable to allow sufficient flexibility for L_{TC} to fold properly around zinc.

Modeling the zinc-ribbon ZF: peptide design and synthesis:

To create a model for zinc-ribbon ZFs, we selected the ZF domain of *Thermococcus celer* RNA polymerase II subunit 9 (RPB9) as a prototype of zinc-ribbon ZFs.^[53] In this ZF, the two canonical β -hairpin-like Zn-binding loops of the zinc ribbon correspond to C⁴⁶TKCGH⁵¹ and C¹⁸PKCGN²³ sequences and they are anchored on an antiparallel/antiparallel ($\downarrow\uparrow\downarrow$) β -sheet (Figure 6). Such a topology, contrary to the parallel/antiparallel ($\uparrow\uparrow\downarrow$) β -sheet of some treble-clef ZFs, allows both CPLT and linear peptide models to be considered. For the CPLT-based model (L_{ZR} , Figure 6), we decided to use the smallest cycle as possible. Since no amino acid located outside the C⁴⁶TKCGH⁵¹ loop interacts with the $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ core in the structure of RPB9, an 8 amino acid cycle (cyclo(PCKKCGW^{DP})) was chosen to mimic this loop. His51 was also changed into a tryptophan to avoid possible scrambling between $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ and $\text{Zn}(\text{Cys})_3(\text{His})$ coordination modes. In RPB9, the side chain of Thr47 points roughly

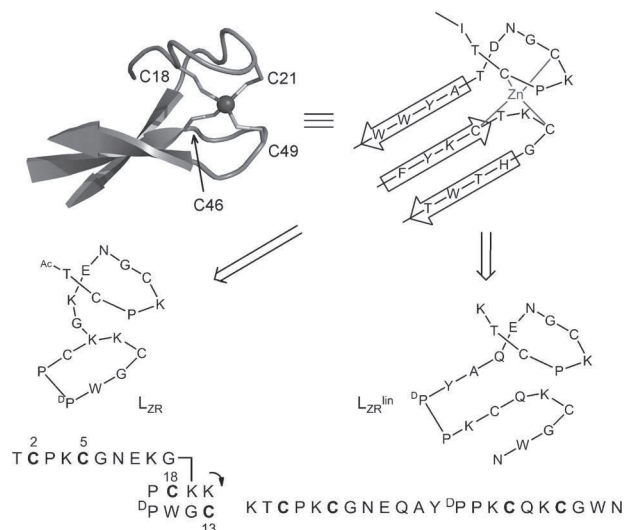
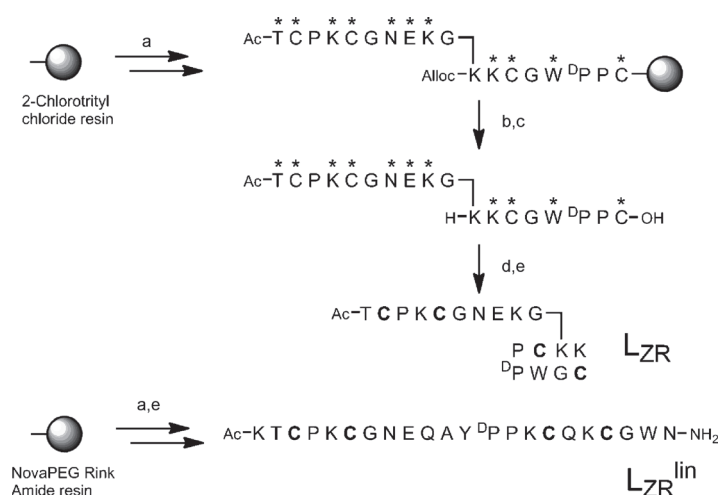


Figure 6. Part of the crystallographic structure of the subunit 9 of *Thermococcus celer* RNA polymerase II (RPB9) showing the zinc-ribbon ZF (top left), its schematic representation (top right) and the two model peptides, L_{ZR} and $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ (bottom). The arrow on L_{ZR} indicates the N-to-C direction in the cycle. Both peptides are acetylated at the N-terminus and $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ is amidated at the C-terminus.

in the direction of the Asn23 residue of the other loop and the distance between Thr47 C β and Asn23 CO is approximately 7.5 Å (Figure 1B). Thus, this position was chosen to introduce the grafting point for the tail and, for this purpose, this threonine was changed into a lysine in the sequence of L_{ZR} . The tail is composed of the sequence of the other β -hairpin-like loop (CPKCGN) to which a three amino acid linker (EKG) was added, whose length was well-adapted to fill the 7.5 Å gap between Thr47 C β and Asn23 CO; this information was based on the experience gained with the previously designed CPLT models, L_{TC} and L_{HSP} . Finally, a threonine was added at the N-terminal end of the tail (TCPKCGNEKG). The 18-mer model peptide L_{ZR} was synthesized as previously described for L_{HSP} ^[57] according to Scheme 1 by using Alloc-Lys(Fmoc)-OH^[66] (Alloc = allyloxycarbonyl; Fmoc = 9-fluorenylmethoxycarbonyl) to graft the tail. The synthetic pathway requires the acetylation of the N-terminal threonine to liberate a single free amino group for cyclization after alloc removal. However, we noticed that L_{ZR} encounters a N \rightarrow O-acetyl shift on the N-terminal threonine during the prolonged TFA treatment, which is necessary for the removal of the side-chain protecting groups in the last step of the synthesis.^[67] This treatment should not exceed 1.5 h to reduce the amount of O-acetylated byproduct.

For the linear model $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ (Figure 6), we decided to link the T¹⁷CPKCGNDTAY²⁷ and K⁴⁵CTKCGH⁵¹ fragments of RPB9 with a D-Pro-L-Pro template to create a type II' β -turn between these segments and mimic their anchoring on a β -sheet in RPB9.^[68] A lysine was added at the N-terminus to prevent any N \rightarrow O acetyl shift on the N-terminal threonine. For the reason mentioned above, His51 of RPB9 was substituted for tryptophan in $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ and an asparagine was



Scheme 1. Synthesis of L_{ZR} and L_{ZR}^{lin} . a) Fmoc SPPS; b) $[Pd(PPh_3)_4]$, $PhSiH_3$, CH_2Cl_2 ; c) CH_2Cl_2/TFA (99:1); d) 0.25 mM, PyBOP, DIEA, CH_2Cl_2 ; e) TFA/TIS/ H_2O /DTT. * denotes the standard side-chain protecting groups.

added at the C-terminus. To anticipate possible difficulties during the synthesis (peptide aggregation and aspartimide formation), two threonines and one aspartate were changed into two glutamines and a glutamate, respectively. The 22-mer linear model L_{ZR}^{lin} , acylated at N-ter and amidated C-ter, was synthesized on resin by solid-phase peptide synthesis (Scheme 1). L_{ZR} and L_{ZR}^{lin} were obtained on a 100 mg scale after HPLC purification (>95% purity) corresponding to approximately 35% overall yield.

Characterization of the Zn^{2+} and Co^{2+} complexes of the zinc-ribbon model peptides: The Zn^{2+} -binding properties of L_{ZR} and L_{ZR}^{lin} were investigated by a combination of UV/Vis absorption and CD spectroscopies. Titrations of both peptides with Zn^{2+} in phosphate buffer at pH 7.0 show the linear increase of Cys-S \rightarrow Zn^{2+} ligand-to-metal charge transfer (LMCT) bands around 207 nm (See Figure S5 in the Supporting Information and Table 1) until a plateau is reached at one equivalent of Zn^{2+} ; this suggests the formation of a unique 1:1 Zn-L complex for both peptides. The intensity of the LMCT bands is similar to that of other model complexes with a $Zn(Cys)_4$ core.^[55,57,63] CD titrations also show saturation at one equivalent of Zn^{2+} . The CD spectra of the *apo*-peptides are typical of unstructured peptides with large negative CD intensity around 200 nm (Figure 7A). Upon addition of Zn^{2+} , the signal at 200 nm shifts towards positive CD values suggesting that the peptides become

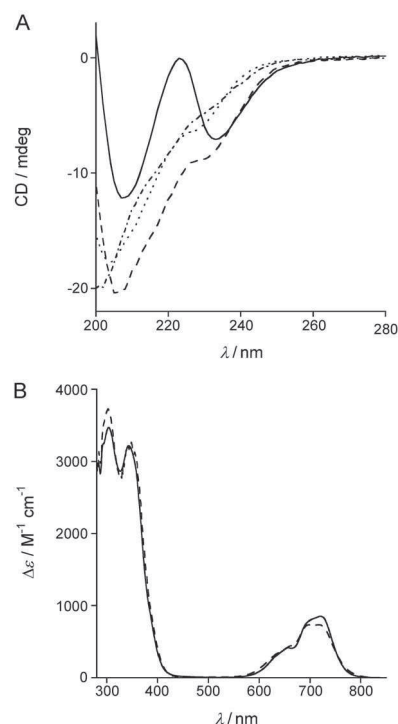


Figure 7. A) CD spectra of the *apo*-peptides L_{ZR} (dotted) and L_{ZR}^{lin} (dashed and dotted), and of the zinc complexes $Zn\cdot L_{ZR}$ (solid) and $Zn\cdot L_{ZR}^{lin}$ (dashed) (25 μ M) in phosphate buffer (20 mM), pH 7.0 containing tris-carboxyethylphosphine (TCEP; 250 μ M), 298 K. B) UV/Vis spectra of $Co\cdot L_{ZR}$ (solid) and $Co\cdot L_{ZR}^{lin}$ (dashed) after subtraction of the spectrum of the *apo*-peptide.

more structured. The CD spectra of the two Zn^{2+} complexes differ markedly (Figure 7A) but owing to the different amino acid sequences of the peptides and to the possible LMCT contributions to CD signal, it is not possible to draw any conclusion concerning their relative folds. The apparent Zn^{2+} binding constants (K_{app}) of L_{ZR} and L_{ZR}^{lin} at pH 7.0 (Table 1) were determined by competition experiments with tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as previously described.^[55,63] $Zn\cdot L_{ZR}$ is approximately 100 times more stable than $Zn\cdot L_{ZR}^{lin}$. Both peptides also form 1:1 complexes with Co^{2+} . Noteworthy, the UV/Vis absorptions of $Co\cdot L_{ZR}$ and $Co\cdot L_{ZR}^{lin}$ are very similar with Cys-S \rightarrow Co^{2+} LMCT bands around 300 and 345 nm and *d-d* transition bands centered at approximately 700 nm, whose positions and intensities are typical of tetrahedral $Co(Cys)_4$ sites (Figure 7B and Table 1).^[28,32,40,41,55,57]

Table 1. UV/Vis characterizations and apparent binding constants of the M-L complexes (K_{app} in M^{-1}) at pH 7.0 and 298 K.

Metal ion	Peptide	$\log K_{app}$	λ [nm] ($\Delta\epsilon$ [$M^{-1} cm^{-1}$])
Co^{2+}	L_{ZR}	–	304 (3470), 343 (3220), 625 (260), 654 (420), 691 (745), 721 (850)
	L_{ZR}^{lin}	–	302 (3730), 348 (3270), 625 (280), 655 (420), 694 (732), 718 (736)
Zn^{2+}	L_{ZR}	15.4 (4)	207 (18400), 225 (13600, sh)
	L_{ZR}^{lin}	13.3 (4)	207 (21000), 225 (18400)

Solution structure of $Zn\cdot L_{ZR}$ and $Zn\cdot L_{ZR}^{lin}$: The solution structure of the zinc complexes was investigated by ¹H NMR spectroscopy. The ¹H NMR spectrum of $Zn\cdot L_{ZR}^{lin}$ presents well dispersed NH signals over the range $\delta = 6.5$ –9.2 ppm,

which is indicative of a folded peptide but most of the resonances are broad (Figure 8) and multiple resonances are observed for most hydrogen atoms of the peptide. This is par-

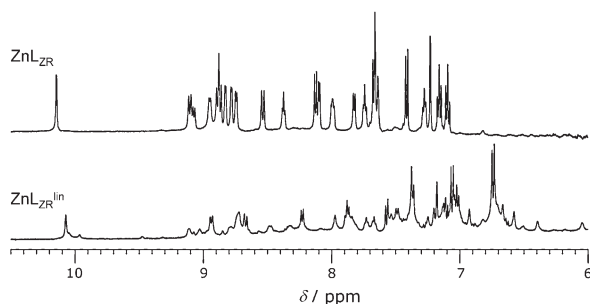


Figure 8. NH and aromatic region of the ^1H NMR spectra (500 MHz, 298 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 6.3) of A) $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ and B) $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$.

ticularly clear in the 1D ^1H NMR spectrum, which displays at least three resonances for the indole-NH of the tryptophan side-chain. Therefore, in solution $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ adopts multiple conformations in rather slow equilibrium on the NMR timescale. This precludes further NMR characterization and structure determination. On the contrary, the ^1H NMR spectrum of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ presents narrow and well-resolved resonances with a single resonance for each hydrogen atom of the peptide, NH signals spreading over the range $\delta = 7.3\text{--}9.2$ ppm (Figure 8), and several $J_{\text{NH,H}\alpha}$ out of the 6–8 Hz range. This attests to a unique and well-defined conformation for the complex. The resonances of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ were attributed on the basis of TOCSY, COSY, and NOESY spectra. Several NOE correlations between the side chains of the cycle and of the tail are observed (e.g., Trp15 with Pro3 and Lys4, or Lys12 with Asn7; see Figure 6 or Scheme S1 in the Supporting Information for the assigned numbering of the amino acids) indicating a compact fold around the zinc ion. The structure of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ was calculated by using XPLOR^[69] with 167 distance constraints (61 intrasidue, 57 sequential, 41 medium and long range) and 13 dihedral angle constraints derived from NMR spectra (see the Supporting Information). As shown in Figure 9A with the superimposition of the 10 lowest-energy structures selected for analysis, the backbone of the cycle and the loop encompassing the two cysteines of the tail are well-structured. Figure 9B shows the lowest-energy structure and confirms that the peptide adopts the zinc-ribbon fold with the two characteristic loops perpendicular to each other. Figure 9 compares the structure of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ with the zinc-ribbon ZFs of RPB9^[53] (Figure 9C) and of Zn-loaded *Clostridium pasteurianum* rubredoxin,^[70] another protein with a metal site adopting the typical zinc-ribbon fold (Figure 9D). In both cases, an excellent superimposition is obtained: the $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ reproduces the backbone fold around zinc quite well but also the rotamers of the four zinc-bound cysteines. It is also worth noting that the six $\text{NH}\cdots\text{S}$ hydrogen bonds that are typical of the zinc-ribbon fold are present in the model complex (Figure 9B).^[53,70–72]

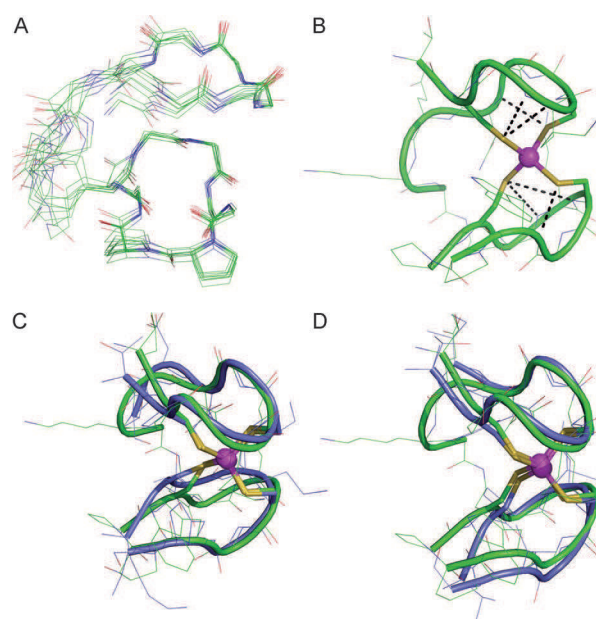


Figure 9. Solution structure of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (pH 6.3, 298 K) deduced from NMR studies. A) Superimposition of the 10 lowest-energy structures calculated using XPLOR.^[69] All side chains except those of the $^{\text{D}}$ Pro-Pro motif and that of the lysine serving as branching point between the cycle and the tail were removed for clarity. B) Lowest-energy structure with the six $\text{NH}\cdots\text{S}$ hydrogen bonds displayed as black dashed lines. C) Superimposition of the lowest-energy structure of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (green) with the zinc-ribbon domains of the subunit 9 of *Thermococcus celer* RNA polymerase II (blue, pdb 1QYP)^[53] and (D) *Clostridium pasteurianum* Zn-loaded rubredoxin (blue, pdb 1IRN).^[70]

Discussion

Comparison between CPLT and linear peptide models: *Conformational stability:* L_{ZR} and $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ constitute our first attempts for the modeling of the zinc-ribbon ZF with CPLT and linear peptides, respectively, and they offer the opportunity to compare both designs without any optimization of the sequence. Both L_{ZR} and $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ form 1:1 complexes with Zn^{2+} and Co^{2+} . The UV/Vis signature of the $\text{Co}(\text{Cys})_4$ complexes strongly depends on the fold around the metal ion.^[73] For instance, the $d\text{--}d$ transitions of $\text{Co}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ (treble-clef fold),^[55] $\text{Co}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ (loosened zinc-ribbon fold)^[57] or $\text{Co}\cdot\text{GGG}\text{-Cys}_4$ ^[41] (unstructured; the sequence of GGG-Cys₄ is KLCEGGCGGCGGCGGW) display very different patterns, whereas $\text{Co}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$, $\text{Co}\cdot\text{L}_{\text{TC}}^{\text{T}}$ and proteins having treble-clef sites loaded with Co^{2+} display the same $d\text{--}d$ pattern.^[55] Noteworthy, the UV/Vis spectra of the two Co^{2+} complexes are very similar suggesting that they have the same local environment around the metal ion. However, the conformational behaviors of the whole peptide differ markedly between $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ and $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ as shown by using ^1H NMR spectroscopic experiments. Whereas $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ is well-folded in a unique conformation, $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ shows a dynamic behavior with an equilibrium between multiple conformations that precludes any structure determination. A similar trend was observed when $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ and $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}^{\text{lin}}$ are compared, the

latter showing also a dynamic behavior (see their ^1H NMR spectra in Figure 5) contrary to the former, which is held in the conformation displayed in Figure 4B. These results show that metal binding is not sufficient to fold correctly linear peptides having almost the same sequence as the CPLT-based models. Therefore, CPLT are more prone to constrain metal complexes in a single conformation than linear peptides and thus cyclization of the peptides matters. We have shown that, in solution, the cycle of *apo*-L_{TC} adopts two conformations in fast exchange at the NMR timescale and that Zn^{2+} binding folds the peptide and locks the cycle into the unique conformation displayed in Figure 2B.^[55] A similar behavior was reported for the cyclodecapeptide *c*(GMTCSGCSRP), which was designed to mimic the metal-binding loop of the copper chaperone Atx1. In the *apo*-peptide, the RPGM motif is folded into a type II β -turn but the rest of the sequence remains flexible. Hg^{2+} binding to the two cysteines brings the cycle into a unique conformation;^[74] this shows that the metal binding rigidifies the cyclic peptides. Our interpretation is that cyclization by a D-Pro-L-Pro template in CPLT-based models limits the conformational space available for the β -hairpin-like loop; the metal binding locks the cycle into a single conformation and, provided that the tail has the proper length, coordination of the two remaining cysteines also freezes the tail in a unique conformation.

Thermodynamic stability of the complexes: The apparent binding constant of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ is $10^{15.4}\text{M}^{-1}$ at pH 7.0, that is, two orders of magnitude higher than that of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ ($10^{13.3}\text{M}^{-1}$). The same trend was observed when comparing L_{HSP} and $\text{L}_{\text{HSP}}^{\text{lin}}$: the 1:1 Zn^{2+} and Co^{2+} complexes of the CPLT are approximately one order of magnitude higher than that of the linear analogue.^[57] The precise reason for this higher affinity of the CPLT-based models remains unclear. However, bare zinc-tetrathiolate cores (i.e., without hydrogen bonds involving the coordinated thiolates) are intrinsically unstable and $\text{NH}\cdots\text{S}$ hydrogen bonds and electrostatic interactions with lysine or arginine side-chains are required to stabilize them.^[75–78] It is likely that these $\text{NH}\cdots\text{S}$ hydrogen bonds are more numerous in the well-folded CPLT-based models than in the flexible linear peptide therefore conferring a higher stability to the former. We have also shown that other interactions can stabilize the peptide–metal complex: in the treble-clef model $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ complex, the above-mentioned charge–dipole interaction between the $[\text{Zn}(\text{Cys})_4]^{2-}$ core and the helix provides a 1.2 kcal mol^{-1} stabilization^[55] and in classical $\beta\beta\alpha$ zinc finger, the proper packing of the hydrophobic core provides a 5.7 kcal mol^{-1} stabilization.^[63] Indeed, in the structure of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$, hydrophobic interactions are observed between the indole group of the tryptophan and, on one side, the D-Pro16, and on the other side, Lys4 of the linear tail (see Figure S6 of the Supporting Information). Such interactions are probably not present in the more dynamic complex $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$. Therefore, the ability of CPLT-based models to form complexes of higher stability seems to be related to a better folding ability and a higher conforma-

tional stability that allows the formation of more stabilizing interactions.

Design of new CPLT-based models: During the past decades, model compounds have proved useful in understanding the properties of metal sites in proteins. Their small size allows characterization at the molecular level that is difficult with an entire protein. Regarding this, models based on peptides appear very attractive because, similar to proteins, they are soluble in water and they can provide exactly the same ligands to the metal ion as the protein. A good peptidic model may also include second coordination-sphere elements. The difficulty in the use of peptides as models resides in the control of their structure. Linear peptides may be suited to model very small protein domains such as the $\beta\beta\alpha$ ZF but when the coordinating residues are far away in the sequence, the situation is more complicated and linear peptides fail to fold properly, resulting in a poor control of the coordination properties and of the structure of the complex. The CPLT design is very interesting to model ZF sites in which tens of amino acids separate the two pairs of zinc-binding amino acids (36 in the treble-clef ZF of PerR, 30 in the loosened zinc-ribbon of Hsp33 and 25 in the zinc-ribbon ZF of RPB9). This design allows a considerable shortcut in the sequence. Small peptidic models of ZFs have allowed us to gain new insights about the reactivity of ZFs.^[79,80] For instance, we were able to demonstrate that the kinetics of their oxidation by H_2O_2 is linked to their dynamic behavior in solution.^[80] However, the reactivity of ZFs is still not well understood and many questions remain. Do all ZFs having the same $\text{Zn}(\text{Cys})_{4-x}(\text{His})_x$ coordination react the same way regardless of their fold or does the fold impact the reactivity? Do amino acids neighboring the $\text{Zn}(\text{Cys})_{4-x}(\text{His})_x$ core tune the reactivity by hydrogen bonds, electrostatic effects, steric hindrance, or general acid or base catalysis? More models with different folds and amino acid sequences are required to clarify these points. In this respect, CPLT-based models that are robust enough from a structural point of view to accommodate mutations around the coordinating amino acids are attractive to investigate this question. Indeed, it is likely that CPLT can be used to model any metalloprotein site in which the metallic center is bound by amino acids located, on the one hand, in a β -hairpin-like loop and, on the other hand, in a coil regardless of its structure. The three CPLT-based models that we have designed so far have provided us with some rules for the successful design of new CPLT-based models. Here are the steps to follow: 1) In the pdb structure of the metal site to be modeled, search for amino acids of the β -hairpin-like loop and of the coil that are 5 to 10 Å apart to identify amino acid positions in the two fragments that can be used to link them. The $\text{C}\alpha$ – $\text{C}\beta$ bond of the amino acid at the position selected in the β -hairpin-like loop has to point roughly toward the coil. This position will be used to introduce the branching amino acid of the cycle. 2) Depending on which end of the coil is close to the selected amino acid in the β -hairpin-like loop, choose either a glutamate (for N-ter) or a lysine

(for C-ter) as the branching amino acid. 3) For the cycle, choose the minimal set of amino acid in the β -hairpin-like sequence that is appropriate to include the branching amino acid and also amino acids that interact by hydrogen bonds or hydrophobic contacts with the metal-binding side chains of the coil. Use a D-Pro-L-Pro template to cyclize the selected sequence. Robinson et al. have shown that β -hairpin composed of 5 to 13 amino acids may be properly folded by cyclization with a D-Pro-L-Pro template.^[60–62] We have synthesized CPLT with 8 and 12 amino acid cycle but our feeling is that CPLT based on cycles ranging from 8 to 14 amino acids are possible. 4) Choose a linker that is long enough to fill the gap between the β -hairpin-like loop and the coil and to give enough freedom to the tail to adopt the correct geometry around the metal ion. We believe that molecular modeling should be useful to optimize the size of the linker. Note that, in the case in which a glutamate is used as the branching amino acid, glycine should be avoided at the N-terminus of the linker because it causes the formation of glutarimide.^[81] Following this, new CPLTs may be designed to complete our family of ZF models with the (Cys)₃(His) variant of the treble-clef- and zinc-ribbon sites and to create models of other the ZF types. For instance, models of the type I- and type II-shuffled zinc-ribbon ZFs defined by Andreini et al.^[7] or models of loosened zinc-ribbon sites with the coil perpendicular to the β -hairpin,^[82,83] contrary to Hsp33-type loosened zinc-ribbon ZF whose coil is parallel to the β -hairpin, may be designed with CPLT. In addition to ZF sites, CPLT may be used to model electron-transfer sites such as the Fe(Cys)₄ site of rubredoxin^[70,72,84,85] or the [2Fe2S](Cys)₂(His)₂ Rieske sites.^[86] These sites adopt the zinc-ribbon fold and may be modeled with peptides resembling L_{ZR}. Such a model could be used to better understand the properties of these sites or could be used as small electron-transfer building-blocks for use in more complex systems. Finally, we believe that the CPLT design may be used to engineer de novo mononuclear Fe, Cu, or Mn sites of controlled structure.

Conclusion

In this study, we have investigated the factors that are important to develop successful CPLT-based models of ZF sites by varying the sequence of the L_{TC} and L_{HSP} two CPLTs previously designed to model the treble-clef- and the loosened zinc-ribbon ZFs. We have shown that the structural properties of Zn²⁺ complexes of CPLT are not affected by mutations of amino acids other than metal-binding ones and we have tried to delineate how sensitive this design is to the size of its components (cycle and tail). We have shown that the length of the linker between the cycle and the pair of coordinating amino acids in the tail is critical for the structural properties of the CPLT-based models. This has allowed us to design a new CPLT-based model for zinc-ribbon ZFs and to compare it with a linear peptide. Only the former was able to fold in a unique conformation that reproduces almost per-

fectly the structural characteristics of zinc-ribbon ZFs. In addition, the CPLT-based model binds Zn²⁺ tighter than the linear one. This demonstrates the interest of the CPLT design over linear peptides for the structural modeling of ZF sites. Work is now in progress to model ZFs adopting other folds and to create CPLTs able to model the redox properties of iron or copper sites.

Experimental Section

Materials and methods: *N*- α -Fmoc-protected amino acids, benzotriazole-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), and resins were obtained from Novabiochem, except Alloc-Lys(Fmoc)-OH, which was synthesized according to Boturyn et al.^[66] Other reagents for peptide synthesis, solvents, buffers and metal salts were purchased from Sigma–Aldrich. HPLC analyses and purifications were performed on a VWR LaPrep system. ESI-MS analyses were performed on a Thermo LXQ spectrometer. UV/Vis spectra were recorded on a Perkin–Elmer Lambda 35 spectrophotometer. CD spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan spectropolarimeter. UV/Vis and CD spectrometers were equipped with a thermo-regulated cell holder. NMR experiments were recorded on a 500 MHz Bruker avance spectrometer equipped with a BBI probe with a triple-axis gradient field. All buffer or metal solutions were prepared with MilliQ water (Millipore) and purged with argon. Buffer solutions were treated with Chelex 100 resin (Biorad) to remove metal traces. Stock solutions of Zn(ClO₄)₂, ZnCl₂, CoSO₄ were prepared by dissolving the metal salt in water. Their precise concentration was determined by colorimetric EDTA titration.^[87]

Peptide synthesis: L_{TC} mutants (N4A, N4L, N4K, N4D, K7A, E15N, S17W, H22A, N4A/K7A, K7N/E15N), L4, L5 and L_{ZR} were synthesized manually as reported previously.^[55,57] Briefly, the linear precursor with protected side chains was assembled manually by solid-phase peptide synthesis on Sieber Amide resin for L_{TC} mutants and on 2-chlorotrityl chloride resin for L4, L5 and L_{ZR} by using Fmoc chemistry with PyBOP coupling. To create the branching point between the cycle and the linear tail, Fmoc-Glu-OAll (for L_{TC} mutants; All = allyl) and Alloc-Lys(Fmoc)-OH (for the other peptides) was used during the synthesis of the precursor. In the case of L4, L5 and L_{ZR}, the linear precursor was acetylated at the N-terminus. After removal of the alloc protecting group and cleavage from the resin, cyclization was performed in a dilute solution of CH₂Cl₂ (0.5 mM) with PyBOP coupling. Removal of the protecting groups on the side chains was performed in a mixture of trifluoroacetic acid (TFA), triisopropylsilane (TIS), H₂O, and dithiothreitol (DTT). L_{ZR}^{lin} was assembled on a CEM Corporation Liberty1 microwave peptide synthesizer by solid-phase peptide synthesis on NovaPEG Rink Amide resin (substitution 0.45 mmol g⁻¹, 241.5 mg) by using Fmoc chemistry. Fmoc removal was performed by two successive washing with 20% piperidine in *N,N*-dimethylformamide (DMF) at 70 °C (40 W microwave power, 30 s and 3 min). Couplings were performed with *N*- α -Fmoc-protected amino acids (0.2 M in DMF, 5 equiv), PyBOP (0.5 M in DMF, 5 equiv) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA; 2 M in DMF, 10 equiv) for 5 min (10 min for Fmoc-D-Pro-OH) at 70 °C (25 W), except couplings of Fmoc-Cys(Trt)-OH, which were performed at room temperature for 15 min (without microwave), followed by 5 min at 50 °C (25 W microwave power). Each coupling was followed by a capping treatment performed with 1% Ac₂O in DMF with DIEA (2 M in DMF, 10 equiv) for 30 s at 65 °C (40 W) then for 30 s at room temperature (without microwave). Resin cleavage and removal of the side-chain protecting groups were performed in TFA/TIS/H₂O/DTT (18 mL:0.6 mL:0.6 mL:650 mg). After 2 h of stirring, the solution was evaporated to yield a yellow oil which was precipitated with Et₂O. The crude peptides were purified by RP-HPLC (PurospherStar RP18e 5 μ m C18 particles, 50 mm \times 25 mm, solvent A = H₂O/TFA 99.9:0.1, solvent B = CH₃CN/H₂O/TFA 90:10:0.1, flow rate 30 mL min⁻¹, gradient 5 to 70% B in 28 min) to yield the desired peptide as a white powder after freeze-drying. Analytical RP-HPLC (PurospherStar RP18e

Table 2. Analytical HPLC and ESI-MS characterizations of the peptides.

Peptide	t_R [min]	m/z (found/calculated)	
		$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$
L _{TC} (N4A)	9.44	1191.0/1191.04	794.3/794.36
L _{TC} (N4L)	9.38	1212.1/1212.06	808.4/808.37
L _{TC} (N4K)	9.08	1219.6/1219.56	813.4/813.37
L _{TC} (N4D)	10.15	1213.0/1213.03	809.0/809.02
L _{TC} (K7A)	10.12	1183.8/1184.01	798.6/798.67
L _{TC} (E15N)	9.58	1205.0/1205.04	803.8/803.69
L _{TC} (S17W)	9.90	1262.1/1262.06	841.6/841.71
L _{TC} (H22A)	9.56	1179.4/1179.52	786.6/786.68
L _{TC} (N4A/K7A)	10.43	1162.3/1162.51	775.2/775.33
L _{TC} (K7N/E15N)	9.20	1197.9/1198.01	799.0/799.01
L4	9.40	1083.4/1083.48	722.6/722.65
L5	9.60	1062.0/1061.98	708.3/708.32
L _{ZR}	11.25	980.5/980.44	654.0/653.96
L _{ZR} ⁱⁿ	9.71	1252.5/1252.67	842.0/842.05

5 µm C18 particle, 150 mm × 4.6 mm, gradient 5 to 100% B in 18 min) were performed at 1.0 mL min⁻¹ with UV monitoring at 214 nm. Analytical HPLC and ESI-MS characterizations are given in Table 2.

UV/Vis and CD titrations: All titrations were performed under inert atmosphere in rubber-sealed quartz cells as previously described.^[55,63] Zn²⁺ apparent binding constants were measured by competition experiments with TPEN or EDTA as previously described.^[55,63]

NMR Spectroscopy and structure calculations: All of the NMR experiments were performed as previously described.^[55,57] The NMR characterizations of Zn-L_{ZR} are provided in the Supporting Information. The structure of Zn-L_{ZR} was calculated as described previously by using the program XPLOR 3.851^[69] with H–H distance constraints derived from NOESY spectra (300 ms mixing time) and ϕ and χ^1 dihedral restraints derived from 1D ¹H NMR spectra or from 2D soft-COSY experiments. Structures selected for analysis had no NOE violations greater than 0.3 Å and no dihedral angle violations greater than 5°.

Acknowledgements

The authors thank Colette Lebrun for ESI-MS analyses. Aurélie Jacques held a doctoral fellowship from the Region Rhône-Alpes. The Agence Nationale de la Recherche is acknowledged for financial support (ANR-06-JCJC-0018).

- [1] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 196.
- [2] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 3173.
- [3] W. Maret, Y. Li, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4682.
- [4] J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 39.
- [5] S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 532.
- [6] R. Gamsjaeger, C. K. Liew, F. E. Loughlin, M. Crossley, J. P. Mackay, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 63.
- [7] C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, *Plos One* **2011**, *6*, e26325.
- [8] M. S. Lee, G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case, P. E. Wright, *Science* **1989**, *245*, 635.
- [9] G. Parraga, S. J. Horvath, A. Eisen, W. E. Taylor, L. Hood, E. T. Young, R. E. Klevit, *Science* **1988**, *241*, 1489.
- [10] J. Burdach, M. R. O'Connell, J. P. Mackay, M. Crossley, *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 199.
- [11] A. Klug, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 213.
- [12] N. V. Grishin, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1703.

- [13] P. Cramer, D. A. Bushnell, J. H. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, R. D. Kornberg, *Science* **2000**, *288*, 640.
- [14] S. M. Quintal, Q. A. dePaula, N. P. Farrell, *Metallomics* **2011**, *3*, 121.
- [15] M. J. Huang, A. Maynard, J. A. Turpin, L. Graham, G. M. Janini, D. G. Covell, W. G. Rice, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1371.
- [16] L. M. M. Jenkins, S. R. Durell, A. T. Maynard, S. J. Stahl, J. K. Inman, E. Appella, P. Legault, J. G. Omichinski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11964.
- [17] L. M. M. Jenkins, T. Hara, S. R. Durell, R. Hayashi, J. K. Inman, J. P. Piquemal, N. Gresh, E. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11067.
- [18] L. M. M. Jenkins, D. E. Ott, R. Hayashi, L. V. Coren, D. Y. Wang, Q. Xu, M. L. Schito, J. K. Inman, D. H. Appella, E. Appella, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 887.
- [19] W. G. Rice, J. G. Supko, L. Malspeis, R. W. Buckheit, D. Clanton, M. Bu, L. Graham, C. A. Schaeffer, J. A. Turpin, J. Domagala, R. Gogliotti, J. P. Bader, S. M. Halliday, L. Coren, R. C. Sowder, L. O. Arthur, L. E. Henderson, *Science* **1995**, *270*, 1194.
- [20] L. C. Myers, M. P. Terranova, A. E. Ferentz, G. Wagner, G. L. Verdine, *Science* **1993**, *261*, 1164.
- [21] L. C. Myers, G. L. Verdine, G. Wagner, *Biochemistry* **1993**, *32*, 14089.
- [22] C. He, J. C. Hus, L. J. Sun, P. Zhou, D. P. G. Norman, V. Dotsch, H. Wei, J. D. Gross, W. S. Lane, G. Wagner, G. L. Verdine, *Mol. Cell* **2005**, *20*, 117.
- [23] J. Winter, M. Ilbert, P. C. F. Graf, D. Ozcelik, U. Jakob, *Cell* **2008**, *135*, 691.
- [24] A. D. Frankel, J. M. Berg, C. O. Pabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4841.
- [25] J. M. Berg, D. L. Merkle, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3759.
- [26] B. A. Krizek, B. T. Amann, V. J. Kilfoil, D. L. Merkle, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518.
- [27] B. A. Krizek, J. M. Berg, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2984.
- [28] B. A. Krizek, D. L. Merkle, J. M. Berg, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 937.
- [29] M. J. Lachenmann, J. E. Ladbury, N. B. Phillips, N. Narayana, X. Q. Qian, A. S. Stern, M. A. Weiss, *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 969.
- [30] W. C. Bal, T. Schwerdtle, A. Hartwig, *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 242.
- [31] E. Kopera, T. Schwerdtle, A. Hartwig, W. Bal, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1452.
- [32] A. K. Petros, A. R. Reddi, M. L. Kennedy, A. G. Hyslop, B. R. Gibney, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9941.
- [33] E. Bombarda, N. Morellet, H. Cherradi, B. Spiess, S. Bouaziz, E. Grell, B. P. Roques, Y. Mely, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 659.
- [34] Y. Hori, K. Suzuki, Y. Okuno, M. Nagaoka, S. Futaki, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7648.
- [35] A. Nomura, Y. Sugiura, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3693.
- [36] M. Imanishi, K. Matsumura, S. Tsuji, T. Nakaya, S. Negi, S. Futaki, Y. Sugiura, *Biochemistry* **2012**, *51*, 3342.
- [37] J. C. Buchsbaum, J. M. Berg, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *297*, 217.
- [38] E. Bombarda, E. Grell, B. P. Roques, Y. Mely, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 208.
- [39] U. Heinz, M. Kiefer, A. Tholey, H. W. Adolph, *J. Biol. Chem.* **2004**, *280*, 3197.
- [40] A. R. Reddi, B. R. Gibney, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3745.
- [41] A. R. Reddi, T. R. Guzman, R. M. Breece, D. L. Tiemey, B. R. Gibney, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12815.
- [42] A. M. Rich, E. Bombarda, A. D. Schenk, P. E. Lee, E. H. Cox, A. M. Spuches, L. D. Hudson, B. Kieffer, D. E. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10405.
- [43] P. C. Roehm, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13083.
- [44] K. Piatek, T. Schwerdtle, A. Hartwig, W. Bal, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 600.

- [45] J. Smirnova, L. Zhukova, A. Witkiewicz-Kucharczyk, E. Kopera, J. Oledzki, A. Wyslouch-Cieszyńska, P. Palumaa, A. Hartwig, W. Bal, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 386.
- [46] S. J. Lee, J. L. Michalek, A. N. Besold, S. E. Rokita, S. L. J. Michel, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 5442.
- [47] S. J. Lee, S. L. J. Michel, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 1211.
- [48] J. A. Imlay, *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 395.
- [49] B. D'Autreaux, M. B. Toledano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 813.
- [50] C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *45*, 549.
- [51] C. C. Winterbourn, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 278.
- [52] D. Traoré, A. El Ghazouani, S. Ilango, J. Dupuy, L. Jacquamet, J.-L. Ferrer, C. Caux-Thang, V. Duarte, J.-M. Latour, *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 1211.
- [53] B. Wang, D. N. M. Jones, B. P. Kaine, M. A. Weiss, *Structure* **1998**, *6*, 555.
- [54] L. Jaroszewski, R. Schwarzenbacher, D. McMullan, P. Abdubek, S. Agarwalla, E. Ambing, H. Axelrod, T. Biorac, J. M. Canaves, H. J. Chiu, A. M. Deacon, M. DiDonato, M. A. Elsliger, A. Godzik, C. Grittini, S. K. Grzechnik, J. Hale, E. Hampton, G. W. Han, J. Haugen, M. Hornsby, H. E. Klock, E. Koesema, A. Kreusch, P. Kuhn, S. A. Lesley, M. D. Miller, K. Moy, E. Nigoghossian, J. Paulsen, K. Quijano, R. Reyes, C. Rife, G. Spraggon, R. C. Stevens, H. van den Bedem, J. Velasquez, J. Vincent, A. White, G. Wolf, Q. P. Xu, K. O. Hodgson, J. Wooley, I. A. Wilson, *Proteins* **2005**, *61*, 669.
- [55] O. Sénèque, E. Bonnet, F. L. Joumas, J.-M. Latour, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4798.
- [56] V. Duarte, J. M. Latour, *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 316.
- [57] O. Sénèque, E. Bourlès, V. Lebrun, E. Bonnet, P. Dumy, J.-M. Latour, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6994; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6888.
- [58] I. Janda, Y. Devedjiev, U. Derewenda, Z. Dauter, J. Bielnicki, D. R. Cooper, P. C. F. Graf, A. Joachimiak, U. Jakob, Z. S. Derewenda, *Structure* **2004**, *12*, 1901.
- [59] C. Kumsta, U. Jakob, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4666.
- [60] M. Favre, K. Moehle, L. Y. Jiang, B. Pfeiffer, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2679.
- [61] Z. Athanassiou, R. L. A. Dias, K. Moehle, N. Dobson, G. Varani, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6906.
- [62] R. L. A. Dias, R. Fasan, K. Moehle, A. Renard, D. Obrecht, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2726.
- [63] O. Sénèque, J.-M. Latour, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17760.
- [64] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [65] This was attributed to the loss of a charge/dipole interaction between the $[\text{Zn}(\text{Cys})_4]^{2-}$ core and the helix in Zn-L_{TC} compared with Zn-L_{TC} .
- [66] D. Boturyn, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787.
- [67] L. A. Carpino, E. Krause, C. D. Sferdean, M. Bienert, M. Beyersmann, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1361.
- [68] B. Chatterjee, I. Saha, S. Raghobama, S. Aravinda, R. Rai, N. Sharmala, P. Balaram, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6192.
- [69] A. T. Brünger, *A system for X-ray Crystallography and NMR. X-PLOR, version 3.1*, Yale University Press, New Haven, **1992**.
- [70] Z. Dauter, K. S. Wilson, L. C. Sieker, J. M. Moulis, J. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8836.
- [71] E. Adman, K. D. Watenpaugh, L. H. Jensen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4854.
- [72] J. Meyer, J. M. Moulis, *Rubredoxin, in Handbook of Metalloproteins, Vol. 1 & 2*, Wiley, Chichester, **2001**.
- [73] D. Maganas, S. Sottini, P. Kyritsis, E. J. J. Groenen, F. Neese, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 8741.
- [74] O. Sénèque, S. Crouzy, D. Boturyn, P. Dumy, M. Ferrand, P. Delangle, *Chem. Commun.* **2004**, 770.
- [75] T. Dudev, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6759.
- [76] A. T. Maynard, D. G. Covell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1047.
- [77] D. Picot, G. Ohanessian, G. Frison, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1445.
- [78] T. Simonson, N. Calimet, *Proteins* **2002**, *49*, 37.
- [79] E. Bourlès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13762.
- [80] M. Isaac, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3409.
- [81] J. M. Zhu, R. E. Marchant, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 690.
- [82] Y. N. Sun, F. Xue, Y. Guo, M. Ma, N. Hao, X. J. C. Zhang, Z. Y. Lou, X. M. Li, Z. H. Rao, *J. Virol.* **2009**, *83*, 10931.
- [83] J. F. W. Petersen, M. M. Cherney, H. D. Liebig, T. Skern, E. Kuechler, M. N. G. James, *EMBO J.* **1999**, *18*, 5463.
- [84] W. Lovenberg, B. E. Sobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 193.
- [85] W. Lovenberg, W. M. Williams, *Biochemistry* **1969**, *8*, 141.
- [86] C. J. Carrell, H. M. Zhang, W. A. Cramer, J. L. Smith, *Structure* **1997**, *5*, 1613.
- [87] G. Schwarzenbach, H. Flaschka, H. M. N. H. Irving, *Complexometric titrations*, 2nd ed., Methuen, London, **1969**.

Received: November 21, 2012
Published online: February 21, 2013

A cyclic peptide-based redox-active model of rubredoxin†

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2915

Received 21st January 2013,
Accepted 15th February 2013

DOI: 10.1039/c3cc40517f

www.rsc.org/chemcomm

Aurélié Jacques,^a Martin Clémancey,^a Geneviève Blondin,^a Vincent Fourmond,^b Jean-Marc Latour^{*a} and Olivier Sénéque^{*a}

A model of rubredoxin based on a cyclic peptide with a linear tail is presented. This model reproduces almost perfectly the fold, the spectroscopic characterizations and the redox activity of rubredoxins.

Metal ions are essential protein cofactors and it is estimated that metalloproteins constitute about one third of the proteome.¹ The properties of these metal centers are far from being totally understood. In this respect, model compounds have proven to be an efficient tool to improve our understanding of their properties. Models based on small organic ligands have been extensively used for this purpose during the past 40 years but they are limited to investigate mostly the influence of the first coordination sphere of the metal. In order to go deeper into the understanding of the properties of metal sites of metalloproteins, more elaborated models soluble in water and incorporating second sphere elements (*i.e.* hydrogen bonding of the metal ligand) are now required. Therefore, peptide-based models are attractive but the *de novo* design of metallopeptides of controlled fold and function using a limited number of amino acids still remains a challenge even for simple monometallic proteins such as rubredoxins (Rds).

Rds are small β -sheet proteins involved in electron transfer. Their active site comprises a Fe^{II}/Fe^{III} ion bound by four cysteines located in two β -hairpin-like loops of sequence CXXCXX that are perpendicular to each other in the so-called zinc ribbon fold.² Most Rds have 45 to 60 amino acids according to the UniProt Knowledgebase.³ Several strategies have been reported in the literature to model Rd active sites but most of them met limited success. Using monodentate arylthiolate, Fe(SR)₄ complexes in the Fe^{II} state⁴ or the Fe^{III} state⁵

could be obtained in organic solvents only and no redox cycling was reported. Water soluble models were described that are based on short peptides (4–11 amino acids) incorporating two cysteines.⁶ These peptides form stable 1:2 Fe^{II}-peptide complexes but the corresponding Fe^{III} complexes are not stable in aqueous media. Proteins such as the immunoglobulin binding B1 domain of *Streptococcal* protein G⁷ or *Escherichia coli* thioredoxin⁸ were also used as templates to engineer Fe(Cys)₄ sites by introducing cysteines at selected positions. With the former protein an Fe(Cys)₄ centre was obtained in the Fe^{III} state presenting however a limited stability and characterization of the Fe^{II} state was not reported. With the latter, both Fe^{II} and Fe^{III} states of the so-called Trx[Rd] model were characterized with spectroscopic properties resembling those of Rd. The Fe(Cys)₄ site was capable of undergoing three redox cycles in the presence of β -mercaptoethanol. However, these redox cycles are not fully reversible and the Fe(Cys)₄ site progressively decomposes during each air exposure. Finally, the best functional model of Rd was provided by RM1, a *de novo* 40 amino acid protein – *i.e.* a length close to that of the shortest Rds – that incorporates an Fe(Cys)₄ site and stabilizes both Fe^{II} and Fe^{III} states in water. RM1 has a redox potential of +55 mV vs. SHE and is capable of undergoing 15 redox cycles in the presence of β -mercaptoethanol consisting of partial reduction ($\approx 30\%$) of the Fe^{III} tetrathiolate core and re-oxidation by O₂.⁹

In this communication, we describe an 18 amino acid peptide model of the Fe(Cys)₄ site of the Rd from *Clostridium pasteurianum* (*Cp*) that has been the most studied in the biochemical literature. This model which is made of a cyclic peptide with a linear tail reproduces almost perfectly the fold and the spectroscopic features of *Cp* Rd and allows redox cycling between the Fe^{II} and Fe^{III} states.

Peptide L_{ZR} (Fig. 1) was designed to model zinc fingers adopting the zinc ribbon fold.¹⁰ It incorporates one of the two metal binding loops in an 8 amino acid cycle and the other in a linear tail grafted onto a lysine side chain of the cycle. We have recently shown that the complex Zn·L_{ZR} reproduces almost perfectly the structure of zinc ribbon sites including that of zinc-loaded Rd (Fig. 1).¹⁰ This prompted us to investigate the ability of L_{ZR} to bind Fe^{II} and Fe^{III} to assess to which extent this peptide can form complexes that reproduce the electronic structure of metal centers with an open d-shell.

^a Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Equipe de Physicochimie des Métaux en Biologie, CEA/iRTSV/LCBM, UMR 5249 CNRS/Université Joseph Fourier/CEA-Grenoble, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.
E-mail: olivier.seneque@cea.fr, jean-marc.latour@cea.fr; Fax: +33 438785465; Tel: +33 438782144

^b Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, CNRS – Aix Marseille Université, UMR 7281, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedures, UV-Vis Fe^{II} titration, Mössbauer spectra, absorbance monitoring of the stability of Fe^{III}-L_{ZR} and a plot of the current peak against (scan rate)^{1/2} for cyclic voltammetry. See DOI: 10.1039/c3cc40517f

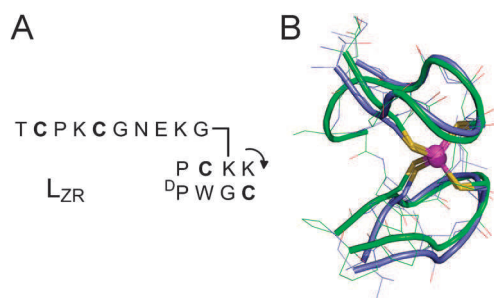


Fig. 1 (A) Sequence of L_{ZR}¹⁰ and (B) NMR solution structure of Zn-L_{ZR} at pH 6.3, 298 K (green) superimposed on the metal site of the crystallographic structure of Zn-loaded Cp rubredoxin (pdb 1IRN,² blue).

The Fe^{II} binding properties of L_{ZR} were studied using UV-Vis absorption and CD spectroscopies in HEPES buffer, pH 7.5. L_{ZR} forms a 1:1 complex with Fe^{II} (Fig. S2 of ESI†) and competition experiments with HEDTA revealed that Fe²⁺ is tightly bound to L_{ZR} at pH 7.0 with a log *K*_{app} value of 10.0 (3). The UV-vis spectrum of Fe^{II}·L_{ZR} is characterized by Cys-S → Fe^{II} LMCT absorption bands at 312 and 332 nm (Fig. 2A and Table 1). The CD spectrum of Fe^{II}·L_{ZR} displays a negative band at 314 nm and a positive band at 334 nm (Fig. 2B). Both UV-Vis and CD transitions are identical to that of reduced Cp Rd.¹¹ Mössbauer spectra of Fe^{II}·L_{ZR} (Fig. 3, left panel) and the derived *S* = 2 spin Hamiltonian parameters (Table 1) are also very close to those of reduced Cp Rd.¹² All these spectroscopic data show that the electronic structure of Fe^{II}·L_{ZR} matches quite satisfactorily that of reduced Cp Rd.

When a solution of Fe^{II}·L_{ZR} (50 μM) in HEPES buffer is exposed to air in the presence of TCEP (*tris*(2-carboxyethyl)-phosphine), a red color slowly develops. The UV-Vis spectrum of the corresponding solution (Fig. 2A) displays intense bands at 360 and 491 nm with a shoulder at 570 nm. The energy and intensity of these absorptions (Table 1) are comparable to those of oxidized Rds^{13,14} and are characteristic of Cys-S₂ → Fe^{III} LMCT transitions in tetrahedral Fe^{III}-tetrathiolate complexes.¹⁵ The EPR spectrum (Fig. 2C) is typical of a high-spin Fe^{III} (*S* = 5/2) species with a zero-field splitting higher than the energy of the EPR transition. The resonance at *g*_{eff} = 9.17

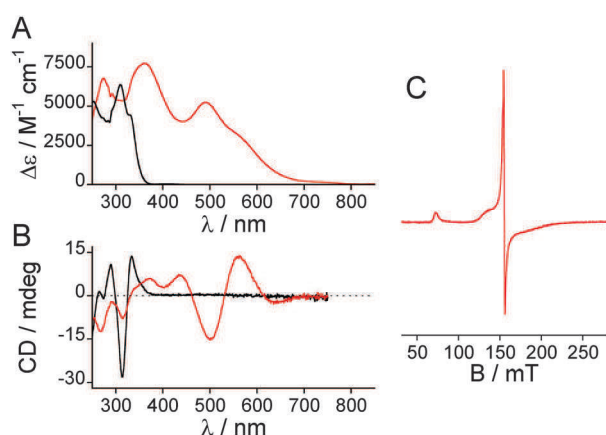


Fig. 2 UV-Vis absorption (A), CD (B) and X-band EPR (C) spectra of Fe^{II}·L_{ZR} (black) and Fe^{III}·L_{ZR} (red) in HEPES buffer (20 mM)/TCEP (750 μM) pH 7.5. UV-Vis absorption and CD spectra of Fe·L_{ZR} (45 μM) were recorded at 298 K. The spectrum of the apo-peptide has been subtracted from the absorption spectra. The X-band EPR spectrum of Fe^{III}·L_{ZR} (500 μM) was recorded at 4.9 K (microwave power: 0.503 mW, freq.: 9.3859 GHz, mod. freq.: 100 kHz, mod. ampl.: 0.5 mT).

arises from the ground state Kramers doublet and the three resonances at *g*_{eff} = 4.95, 4.32 and 3.70 from the first excited Kramers doublet as indicated by the temperature dependence of the spectrum. These values are consistent with that of a fairly rhombic center *E/D* ≈ 0.22 and a positive *D* value. The right panel of Fig. 3 shows field-applied Mössbauer spectra of Fe^{III}·L_{ZR} after subtraction of 41% of the Fe^{II}·L_{ZR} component and 6% of an iron-oxo contaminant (see Fig. S3 of ESI† for experimental spectra). Under the higher concentration conditions required for preparing Mössbauer samples, a fully oxidized sample could not be obtained because the air-oxidation is slow and because the Fe^{III} complex reverted back to Fe^{II}·L_{ZR} with the high TCEP concentration used to prepare the sample.† The spectra of Fe^{III}·L_{ZR} can be simulated with an *S* = 5/2 spin Hamiltonian with parameters (Table 1) very close to those of oxidized Cp Rd. These data indicate (i) that air oxidation of Fe^{II}·L_{ZR} indeed produces Fe^{III}·L_{ZR} and (ii) that the electronic structure of the ferric peptide matches almost perfectly that of oxidized Cp Rd.^{14,16}

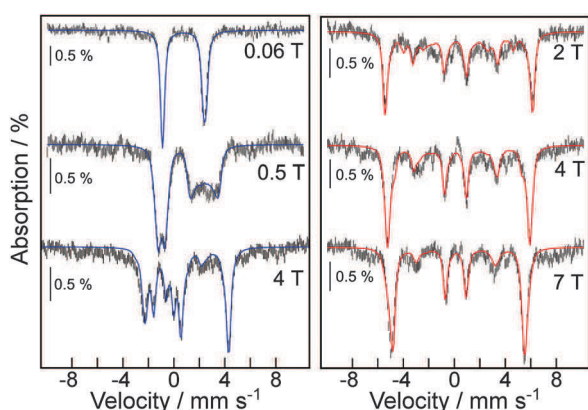
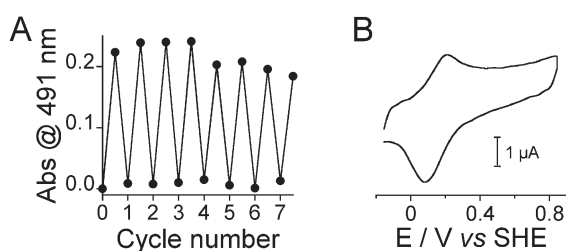
A major issue of modelling electron transfer proteins is to reproduce their ability to cycle repeatedly between their reduced and oxidized states, which is difficult to obtain as detailed above. Hence, we investigated further the redox properties of Fe^{II}·L_{ZR} and the stability of the oxidized peptide. When generated by air-oxidation in the presence of 750 μM TCEP, Fe^{III}·L_{ZR} is stable for 8 hours with a loss of less than 5% of the absorption at 491 nm over this period after which it decomposes irreversibly (see Fig. S4 of ESI†). As expected, it is less stable when prepared by air oxidation of Fe^{II}·L_{ZR} in the absence of TCEP.† Indeed, the 491 nm absorption increases up to a value corresponding to only ca. 30% of Fe^{III}·L_{ZR} and then decreases slowly. We also tested the ability of Fe·L_{ZR} to undergo successive and reversible redox cycles. For this purpose, a 45 μM solution of Fe^{II}·L_{ZR} was prepared in HEPES 20 mM, pH 7.5, containing 1 mM TCEP. The solution was aerated until the absorption at 491 nm characteristic of the formation of the Fe^{III} complex had nearly reached its maximum (≈95% Fe^{III} for the first oxidation) and then the solution was degassed and dithionite was added resulting in an instantaneous bleaching of the 491 nm absorption and reappearance of the characteristic absorptions of Fe^{II}·L_{ZR}. The process could be repeated at least 7 times (Fig. 4A) before precipitation occurred (after dithionite addition).

The redox potential of the Fe^{II}·L_{ZR}/Fe^{III}·L_{ZR} couple was measured by cyclic voltammetry in HEPES buffer, pH 7.2, under an inert atmosphere (Fig. 4B). Fe^{II}·L_{ZR} displays a quasi-reversible oxidation system at *E*⁰ = 144 mV vs. SHE (Δ*E*_p = 140 mV). This potential is higher than those of Rds which display redox potentials between -100 mV and +50 mV vs. SHE.¹⁴ This is in agreement with a more hydrophilic environment (Lys, Asn) around the Fe(Cys)₄ site in Fe^{II}·L_{ZR} compared to Rds which bear hydrophobic amino acids around the iron core. Polar side chains are likely to change the electrostatic potential and the distribution of water molecules around the metal centre and increase the redox potential.¹⁸ Accordingly, rubrerythrins and related proteins, which possess an Fe(Cys)₄ center with surrounding polar amino acids (Asn, His), have redox potentials in the 180–280 mV range.¹⁹

In conclusion our “zinc ribbon peptide” composed of only 18 amino acids is able to give both ferrous and ferric complexes that reproduce the two redox forms of Cp Rd in a very satisfying manner. Moreover, cycling between the two redox forms has been achieved

Table 1 Compared spectroscopic data and spin Hamiltonian parameters of Fe-L_{ZR} complexes and reduced and oxidized forms of Cp rubredoxin

		Fe ^{II} -L _{ZR}	Reduced Cp Rd	Fe ^{III} -L _{ZR}	Oxidized Cp Rd
UV-Vis absorption	λ/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	312 (6360), 332 (4410)	311, 331 (ref. 11)	360 (7730), 491 (5250), 570 (2900), 700 (220)	350 (7000), 380 (7700), 490 (6600), 570 (3200), 750 (350) ¹³
CD	λ/nm (+/-)	314 (-), 334 (+)	314 (-), 335 (+) (ref. 11)	436 (+), 500 (-), 557 (+), 640 (-)	437 (+), 500 (-), 560 (+), 635 (-) (ref. 11)
EPR	g_{eff}	—	—	9.17, 4.32	9.4, 4.3 (ref. 14 and 16)
Mössbauer	$\delta/\text{mm s}^{-1}$	0.69	0.70 (ref. 17)	0.24	0.24 (ref. 17)
	$\Delta E_{\text{Q}}/\text{mm s}^{-1}$	-3.24	-3.25	-0.5	-0.5
	g_x, g_y, g_z	2.11, 2.19, 2.0	2.11, 2.19, 2.0	2.0, 2.0, 2.0	2.0, 2.0, 2.0
	D/cm^{-1}	+7.6	+7.6	+1.9	+1.9
	E/D	0.28	0.28	0.23	0.23
	η	0.84	0.65	0.13	0.2
	$A_x, A_y, A_z/\text{T}$	-18.8, -8.3, -33	-20.1, -8.3, -30.1	-15.8, -15.6, -19.9	-16, -15.9, -16.9

**Fig. 3** Mössbauer spectra (vertical bars) of a ⁵⁷Fe-enriched sample of Fe^{II}-L_{ZR} (left panel) and Fe^{III}-L_{ZR} (right panel). Spectra were recorded at 4.2 K with magnetic fields ranging from 0.06 T to 7 T applied parallel to the γ -beam. Simulations (solid lines) were obtained assuming $S = 2$ for Fe^{II}-L_{ZR}, or $S = 5/2$ for Fe^{III}-L_{ZR}, iron site with parameters shown in Table 1.**Fig. 4** (A) Redox cycling of Fe-L_{ZR} (45 μM) in HEPES buffer (20 mM), pH 7.5, monitored by absorption at 491 nm. Cycles consist of successive (i) exposure of the Fe^{II} complex to O₂ to form the Fe^{III} complex and (ii) argon purge and dithionite reduction to restore the Fe^{II} complex. (B) Cyclic voltammetry of Fe^{II}-L_{ZR} in HEPES buffer (20 mM), pH 7.2 (100 mM NaCl, scan rate 3 V s⁻¹), at 298 K.

with limited decomposition. This compares very favorably both with smaller models (≤ 11 amino acids) that are unable to stabilize the ferric state and with the protein-based models able to cycle between the ferrous and ferric states^{8,9} but made of 40 or more amino acids. Owing to this limited size, which allows easy structural and spectroscopic characterization, our cyclic peptide-based model of zinc ribbon sites appears to be a promising tool to investigate the influence of amino acid composition on the redox potential of the Fe^{II}/Fe^{III} couple and the chemical stability of the ferrous or ferric state.

Funding for this project was provided by a grant from la Région Rhône-Alpes (doctoral fellowship for AJ).

Notes and references

† Auto-oxidation of the Fe^{III}-L_{ZR} complex leads to disulfide formation and release of Fe^{II}. TCEP reduces disulfides and allows reformation of Fe^{II}-L_{ZR}.

- 1 K. J. Waldron, J. C. Rutherford, D. Ford and N. J. Robinson, *Nature*, 2009, **460**, 823; C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, G. L. Holliday and J. M. Thornton, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 1205.
- 2 Z. Dauter, K. S. Wilson, L. C. Sieker, J.-M. Moulis and J. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 8836.
- 3 <http://www.uniprot.org>.
- 4 M. S. Gebhard, S. A. Koch, M. Millar, F. J. Devlin, P. J. Stephens and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 1640.
- 5 L. E. Maelia, M. Millar and S. A. Koch, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 4594; M. Millar, J. F. Lee, T. Osullivan, S. A. Koch and R. Fikar, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **243**, 333.
- 6 A. Lombardi, D. Marasco, O. Maglio, L. Di Costanzo, F. Nasti and V. Pavone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 11922; W. Y. Sun, N. Ueyama and A. Nakamura, *Biopolymers*, 1998, **46**, 1.
- 7 E. Farinas and L. Regan, *Protein Sci.*, 1998, **7**, 1939.
- 8 D. E. Benson, M. S. Wisz, W. T. Liu and H. W. Hellinga, *Biochemistry*, 1998, **37**, 7070.
- 9 V. Nanda, M. M. Rosenblatt, A. Osyczka, H. Kono, Z. Getahun, P. L. Dutton, J. G. Saven and W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5804.
- 10 A. Jacques, B. Mettra, V. Lebrun, J.-M. Latour and O. Sénéque, *Chem.-Eur. J.*, 2013, DOI: 10.1002/chem.201204167.
- 11 W. A. Eaton and W. Lovenberg, in *Iron-Sulfur Proteins*, ed. W. Lovenberg, Academic Press, New York, 1973, p. 131.
- 12 V. V. Vrajmasu, E. L. Bominaar, J. Meyer and E. Munck, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 6358.
- 13 Z. G. Xiao, M. J. Lavery, M. Ayhan, S. D. B. Scrofani, M. C. J. Wilce, J. M. Guss, P. A. Tregloan, G. N. George and A. G. Wedd, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 4135.
- 14 J. Meyer and J.-M. Moulis, *Rubredoxin*, in *Handbook of Metalloproteins*, Wiley, Chichester, 2001.
- 15 M. D. Lowery, J. A. Guckert, M. S. Gebhard and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 3012.
- 16 B. Börger and D. Suter, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 9821.
- 17 P. Wegner, M. Bever, V. Schünemann, A. X. Trautwein, C. Schmidt, H. Bonisch, M. Gnida and W. Meyer-Klaucke, *Hyperfine Interact.*, 2004, **156**, 293.
- 18 M. K. Eidsness, A. E. Burden, K. A. Richie, D. M. Kurtz, R. A. Scott, E. T. Smith, T. Ichiye, B. Beard, T. P. Min and C. H. Kang, *Biochemistry*, 1999, **38**, 14803; C. E. Ergenekan, D. Thomas, J. T. Fischer, M. L. Tan, M. K. Eidsness, C. H. Kang and T. Ichiye, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 2818; M. Sulpizi, S. Raugi, J. VandeVondele, P. Carloni and M. Sprik, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 3969.
- 19 A. J. Pierik, R. B. G. Wolbert, G. L. Portier, M. Verhagen and W. R. Hagen, *Eur. J. Biochem.*, 1993, **212**, 237; A. F. Pinto, S. Todorovic, P. Hildebrandt, M. Yamazaki, F. Amano, S. Igimi, C. V. Romao and M. Teixeira, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 501.

Cite this: *Dalton Trans.*, 2014, **43**,
3922

Peptide-based FeS₄ complexes: the zinc ribbon fold is unsurpassed to stabilize both the Fe^{II} and Fe^{III} states†

Aurélien Jacques,^{a,b} Jean-Marc Latour*^c and Olivier Sénéque*^a

Whereas Zn(Cys)₄ zinc fingers exist with different protein folds, only the zinc ribbon fold is found in rubredoxin Fe(Cys)₄ sites. To assess the significance of this observation, we have investigated the binding and stability of Fe²⁺ and Fe³⁺ ions by a set of four peptides designed to model Zn(Cys)₄ zinc fingers with various folds, *i.e.* zinc ribbon, treble clef and a loosened zinc ribbon fold. All peptides were shown by means of UV-Vis and CD spectroscopies to form stable 1 : 1 Fe^{II}/peptide complexes with binding constants higher than 10⁷ M⁻¹ at pH 7. Their oxidation into Fe^{III} complexes and the stability of the latter were compared. The UV-Vis absorption and CD spectroscopic properties of the Fe^{II} and Fe^{III} complexes were analysed with respect to the structures of the zinc analogues in order to get insight into the local arrangement of the Fe(Cys)₄ core around the metal ion. The chemical stability of these complexes was rationalized according to the shielding from the solvent provided by the various peptide folds to the FeS₄ core. In addition, we showed that whereas UV-visible spectra inform only on the FeS₄, the information derived from the corresponding CD spectra extend to the C_β orientation and the peptide fold. The results presented here demonstrate that while the zinc ribbon fold is not strictly required to obtain a Fe(Cys)₄ site, it affords a drastically superior protection of the site toward external redox agents. This finding brings new clues to engineer stable and redox-active Fe(Cys)₄ sites in *de novo* proteins.

Received 8th November 2013,
Accepted 22nd December 2013

DOI: 10.1039/c3dt53157k

www.rsc.org/dalton

Introduction

Iron-cysteinate ligation is found in all families of iron proteins, heme enzymes (cytochrome P450), non-heme enzymes (superoxide reductase) and iron-sulphur proteins. The most simple of these arrangements is the tetrahedral tetracysteinate Fe(Cys)₄ ligation (without additional cofactors) that is present in the electron carrier rubredoxin^{1–4} and as an electron relay in rubrerythrin^{5,6} and some superoxide reductases.⁷ However, these latter sites are scarce, which contrasts with their zinc counterparts. Indeed, Zn(Cys)₄ sites are one of the three types of zinc finger (ZF) sites together with Zn(Cys)₃(His) and Zn(Cys)₂(His)₂ sites where one and two cysteines are replaced by histidines, respectively. ZF proteins are ubiquitous, being present in the three domains of life.⁸ They represent *ca.* 8% of

human proteome with all three types of ZFs nearly equally present.⁹ In ZF domains, the protein backbone adopts various folds though the metal ion remains in a tetrahedral geometry. During the past few years, several tentative classifications of ZFs according to their fold have emerged in the literature.^{10–14} In the latest classification proposed by Andreini *et al.*, which tries to link the structure and the function of zinc sites, Zn(Cys)₄ ZFs are found in the most populated fold class, namely the zinc ribbon, treble-clef, zinc necklace folds but also in less populated fold classes such as the loosened zinc ribbon and the shuffled zinc ribbon folds.¹⁴ Zn(Cys)₄ ZFs have both structural and functional (catalytic¹⁵ or redox switch¹⁶ sites) roles, the latter being associated with cysteine reactivity. In proteins with an Fe(Cys)₄ site, the iron ion cycles between Fe^{II} and Fe^{III} states but remains in a tetrahedral geometry. In rubredoxin and rubrerythrin, the protein backbone adopts the canonical zinc ribbon fold around the metal ion, characterized by two loops – each containing a pair of cysteines in a CXXC motif (X standing for any amino acid) – perpendicular to each other and displaying a nearly C₂ symmetry.^{3,10,14,17} In superoxide reductase, the fold around the Fe(Cys)₄ centre can be viewed as a distorted zinc ribbon with one of the loops incorporating a CC motif instead of a CXXC motif.⁷ The Fe^{II}/Fe^{III} redox potentials of these proteins span a large 450 mV range with those of

^aCNRS, UMR 5249, LCBM, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France.

E-mail: olivier.seneque@cea.fr; Fax: +(33) 438785465; Tel: +(33) 438782144

^bUniv. Grenoble Alpes, LCBM, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France^cCEA, DSV/IRTSV/CBM, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France.

E-mail: jean-marc.latour@cea.fr

†Electronic supplementary information (ESI) available: UV-Vis absorption monitoring of Fe^{III}-L_{ZR} reduction under argon and of the stability of Fe^{III}-L_{TC}. See DOI: 10.1039/c3dt53157k

rubredoxins and superoxide reductase $[-100 \text{ mV}; +50 \text{ mV}]^{4,18}$ lower than those of rubrerythrins $[+180 \text{ mV}; +350 \text{ mV}]^{4,19-21}$. It is highly likely that the fold of the protein around the $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ site plays a major role in tuning these potentials.

The *de novo* design of proteins with new functionalities is a challenging and expanding research area. Redox active *de novo* proteins can be designed by incorporation of a metal site such as for instance electron transfer sites. However, this requires a good knowledge and analysis of the properties of these metal sites in native proteins in order to limit the number of tries in the design process. Concerning $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ sites, understanding the factors (hydrophobicity, water accessibility, hydrogen bond network, dipolar interactions, *etc.*) that govern the redox potential of rubredoxins is essential. Although rubredoxins with various amino acid sequences and mutants have been the subject of extensive spectroscopic and electrochemical characterizations as well as calculations, these factors are still not well understood and work is still needed for this purpose.²²⁻²⁸ *de novo* proteins are generally created by assembling together several peptide fragments that are known to adopt a specific fold and by optimizing interactions between the fragments in order to get the targeted overall fold. For instance, assembly of sequences prone to fold into helices and loops allow creating 3 and 4 helix-bundle proteins.²⁹⁻³² Incorporation of a metal site in such an assembly may provide a local structural environment for the metal ion that is different from that encountered in native proteins. For instance, the local environment of $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ in a helix-bundle may significantly differ from that in the zinc ribbon fold of rubredoxin with different cysteine side chain orientations and a different hydrogen bond network. Since Nature has used only the zinc ribbon fold to stabilize $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ sites, it is not known if stable redox-active $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ sites can be obtained with other folds. In this respect, it is worth noting that the *de novo* design of proteins incorporating a stable and redox active $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ centre has met limited success with only one successful example in which the peptide adopts the zinc ribbon fold around the iron ion.^{17,33,34} This may

suggest that the zinc ribbon fold is strictly required to stabilize the $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ centres. Hence it is essential to get more insights into the relation between the structure of $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ sites and their stability, which may be helpful to design *de novo* proteins incorporating such a site.

We have recently introduced a new peptide design combining a linear tail to a cyclic peptide (CPLT) to model the most frequent ZFs. This family of peptides allows the structural modelling of treble clef,³⁵ zinc ribbon³⁶ and loosened zinc ribbon³⁷ ZFs with almost perfect reproduction of (i) the peptide backbone fold, (ii) the relative orientation of the cysteine side chains around the zinc ion and (iii) the hydrogen bond network that involves the zinc-bound sulphurs. Moreover we have recently reported that the peptide designed to model zinc ribbon ZFs is able to form stable $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Cys})_4$ and $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Cys})_4$ complexes with spectroscopic properties that match those of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin (*Cp Rd*).³⁸ These complexes are stable enough to display redox cycling between the Fe^{II} and the Fe^{III} states but with a redox potential (+144 mV) higher than that of rubredoxin. In this article, we address the influence of the peptide fold and dynamics on the stability of $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ sites. We describe and compare the Fe^{2+} binding properties and stabilities of the Fe^{3+} complexes with those of three other peptides having different folds or dynamics. These studies show that whereas these peptides can harbour a $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ site as the zinc ribbon model, the latter protects it more efficiently from external redox partners.

Results

Peptides

The peptides used in this study are L_{ZR} ,³⁶ L_{TC} ³⁵ and L_{HSP} ,³⁷ three CPLT designed to model the zinc ribbon, the treble clef and the loosened zinc ribbon ZFs, respectively. Their sequences are displayed in Fig. 1A. All these peptides form very stable 1:1 complexes with Zn^{2+} ($K_{\text{Zn}} > 10^{14}$ at pH 7,

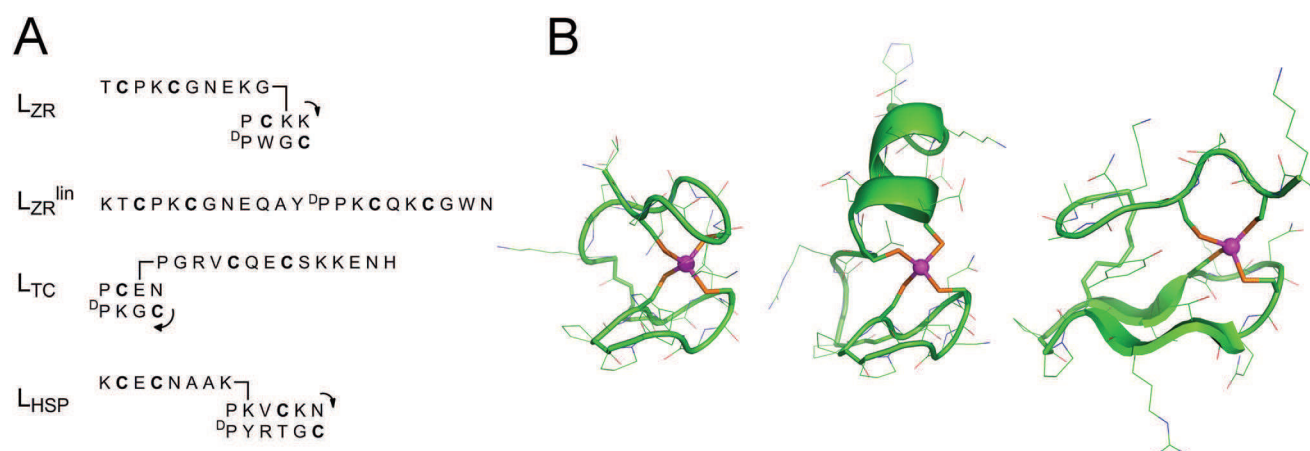


Fig. 1 (A) Peptides used in this study. The arrows indicate the N to C direction in the cycle. (B) NMR solution structures of Zn-L_{ZR} ,³⁶ Zn-L_{TC} ³⁵ and Zn-L_{HSP} ³⁷ (from left to right) in water at pH 6.3.

Table 1 UV-Vis absorption and CD characterizations and binding constants of the M-L complexes (298 K)

Metal ion	Peptide	log K_{app} (pH 7.0)	UV-Vis absorption λ /nm ($\Delta\epsilon$ /M ⁻¹ cm ⁻¹)	CD λ /nm (+/-)
Fe ²⁺	L _{ZR}	10.0 (3)	312 (6360), 335 (sh)	314 (-), 334 (+), 355 (+)
	L _{ZR} ^{lin}	7.5 (3)	314 (6610), 335 (sh)	316 (-), 335 (+), 355 (+)
	L _{TC}	7.4 (3)	313 (6760)	307 (-), 328 (+), 350 (-)
	L _{HSP}	7.4 (3)	312 (7630), 335 (sh)	312 (-), 334 (+), 355 (+)
Fe ³⁺	L _{ZR}	—	360 (7730), 491 (5250), 570 (2900, sh), 700 (220, sh)	435 (+), 498 (-), 556 (+), 636 (-)
	L _{ZR} ^{lin}	—	357 (8440), 486 (5700), 585 (3030, sh), 700 (440, sh)	430 (+), 499 (-), 574 (+), 653 (+)
	L _{TC}	—	364 (9490), 497 (5610), 610 (2540, sh), 685 (610, sh)	442 (-), 492 (+), 535 (+), 623 (-)
	L _{HSP}	—	—	—
Zn ²⁺	L _{ZR}	15.4 (4) ³⁶	—	—
	L _{ZR} ^{lin}	13.3 (4) ³⁶	—	—
	L _{TC}	14.7 (1) ³⁵	—	—
	L _{HSP}	14.6 (1) ²⁸	—	—
Fe ²⁺	Cp Rd	—	311, 331 ^{a,27}	314 (-), 335 (+), 355 (+) ³⁹
Fe ³⁺	Cp Rd	—	350 (7000), 380 (770), 490 (6600), 570 (3200), 750 (350) ⁴¹	437 (+), 500 (-), 560 (+), 635 (-) ³⁹

^a Lovenberg *et al.* have reported the extinction coefficients of the oxidized ($\epsilon_{380} = 10\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{490} = 8850\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and reduced ($\epsilon_{311} = 10\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{331} = 6300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) forms of Cp rubredoxin², but Wedd *et al.* have shown that those of oxidized rubredoxin were overestimated by ca. 30% but without re-measuring those of reduced rubredoxin.⁴¹ Therefore, the extinction coefficient of reduced rubredoxin might be overestimated in the same extent.

Table 1) whose structures determined in water solution at pH 6.3 (Fig. 1B) perfectly model the corresponding ZF fold. In addition, L_{ZR}^{lin}, a linear analogue of L_{ZR}, was also used in this study. As L_{ZR}, this peptide forms also stable 1 : 1 complexes with Zn²⁺ and Co²⁺ but it shows a different structural behaviour.³⁶ Comparison of the UV-Vis absorptions of the Co-L_{ZR} and Co-L_{ZR}^{lin} complexes provides evidence for a similar local environment around the metal ion but ¹H NMR and CD analyses of the Zn-L_{ZR} and Zn-L_{ZR}^{lin} complexes reveal that Zn-L_{ZR}^{lin} presents a dynamic conformational behaviour with equilibrium between multiple conformations that preclude structure determination contrary to Zn-L_{ZR}. All these peptides were synthesized as described previously.³⁵⁻³⁷

Iron(II) complexes

The Fe²⁺ binding properties of the L_{ZR}^{lin}, L_{TC} and L_{HSP} peptides were investigated by UV-Vis absorption and CD spectroscopies and compared to those of L_{ZR}. For all four peptides, the UV-Vis absorption monitoring of Fe²⁺ titrations shows a linear increase of absorption bands around 310 nm that plateau at 1.0 equivalent Fe²⁺ vs. peptide suggesting the formation of a 1 : 1 complex only (Fig. 2). These absorption bands correspond to Cys-S→Fe²⁺ ligand to metal charge transfer (LMCT) bands and indicate the formation of Fe^{II}-tetrathiolate centres as in Cp Rd.^{4,39} The UV-Vis absorption spectrum of Fe^{II}-L_{ZR}^{lin} closely resembles that of Cp Rd (see Fig. S1 of ESI†) and Fe^{II}-L_{ZR} with an absorption maximum at 314 nm and a shoulder at ca. 332 nm. The spectrum of Fe^{II}-L_{HSP} is very similar with a maximum at 312 nm, but a less pronounced shoulder around 335 nm. The UV-visible spectrum of Fe^{II}-L_{TC} also displays a maximum absorption in the same region (310 nm) but it is less structured. Indeed, the shoulder at around 330 nm is absent and a weaker one is discernible at ca. 350 (Fig. 3A). Finally, we have determined the formation constants $K = [\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}]/[\text{L}][\text{Fe}^{2+}]$ of the four complexes at pH 7.0 by competition experiments using EGTA or HEDTA as previously

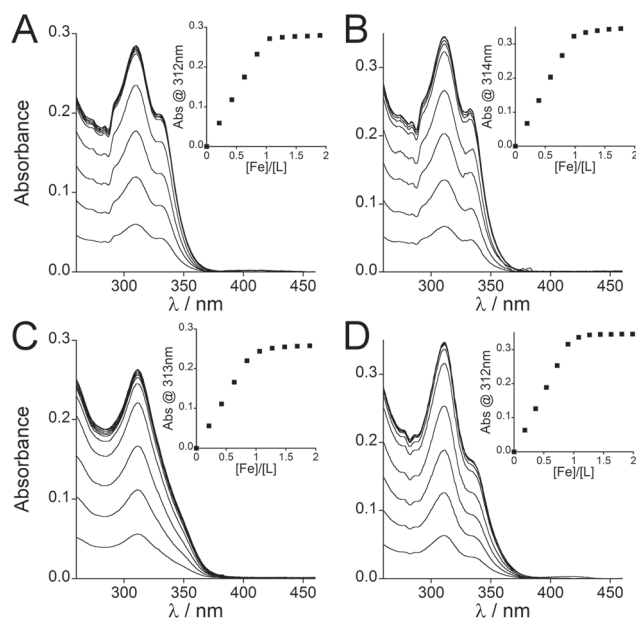


Fig. 2 UV-Vis absorption titrations under an inert atmosphere of (A) L_{ZR} (44 μ M), (B) L_{ZR}^{lin} (51 μ M), (C) L_{TC} (41 μ M) and (D) L_{HSP} (46 μ M) by Fe²⁺ in HEPES/NaOH buffer 20 mM pH 7.5, TCEP 250 μ M, 298 K (path length = 1.0 cm). The insets show the evolution of the absorbance at λ_{max} (\sim 310 nm) against the Fe²⁺/peptide ratio. All spectra were corrected for dilution and the spectrum of the apo-peptide was subtracted from each spectrum.

described (Table 1).^{35,40} There is a sizeable difference between Fe^{II}-L_{ZR} with a K value of $10^{10.0}\text{ M}^{-1}$ and the three others for which $K \approx 10^{7.5}\text{ M}^{-1}$. This shows that even small departures from the zinc ribbon fold have a significant effect on the stability of the Fe^{II} complex.

The CD spectra of the four Fe^{II}-L complexes are displayed in Fig. 3B. As for UV-Vis absorption, the spectra of Fe^{II}-L_{ZR} and Fe^{II}-L_{ZR}^{lin} complexes match that of Cp Rd (see Fig. S2 of ESI†) with a negative band at \sim 315 nm and positive bands at

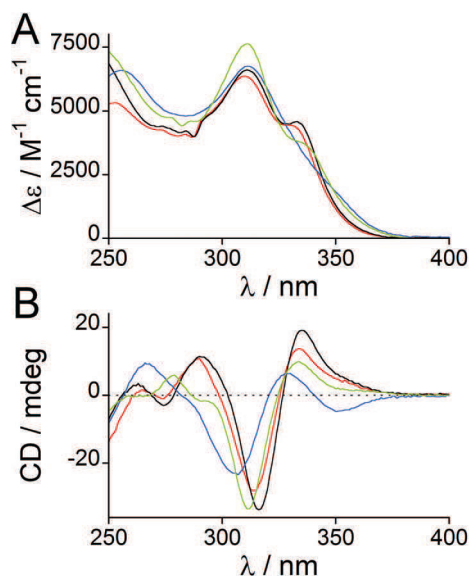


Fig. 3 Comparison of UV-Vis absorption (A) and CD (B) spectra of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (red), $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ (black), $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ (blue) and $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ (green) in HEPES/NaOH buffer 20 mM pH 7.5, TCEP 250 μM , 298 K. The spectrum of the *apo*-peptide was subtracted from each absorption spectrum. Complex concentration was 49 μM , 48 μM and 37 μM for L_{ZR} , $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ and L_{TC} , respectively.

~ 333 nm and ~ 350 nm (shoulder).³⁹ As seen in Fig. 3, that of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ markedly differs with shifted bands and a low energy band at 350 nm that is negative, whereas it is positive for the other complexes. Finally, though slightly shifted, the spectrum of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ mostly resembles that of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ and *Cp Rd* with, in particular, a positive low energy band around 355 nm. These results show that all four peptides are able to form stable 1 : 1 complexes with Fe^{2+} with all cysteines bound to the metal but their spectroscopic properties differ slightly.

Iron(III) complexes

Solutions of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}$ complexes were aerated in order to determine if stable $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}$ complexes can be formed with the four peptides. To make valuable comparisons of Fe^{III} stability, the oxidation of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (which is the most stable peptide) was further investigated to establish reliable experimental conditions and to identify important mechanistic features. Upon oxygenation of a solution $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (45 μM) in HEPES buffer (100 mM, pH 7.5) containing 750 μM tris(carboxyethyl)-phosphine (TCEP), a red colour develops. The UV-Vis spectrum shows the progressive appearance of new bands at 360 and 491 nm with a shoulder at 570 nm (Fig. 4A and Table 1). These bands are characteristic of $\text{Cys}\cdot\text{S}_{\text{p}\sigma}\rightarrow\text{Fe}^{3+}$ LMCT transitions in tetrahedral Fe^{III} -tetrathiolate complexes⁴² and closely resemble those of oxidized *Cp Rd* (Table 1 and Fig. S1 of ESI†).^{4,41} Other spectroscopic characterizations including CD (Fig. 4B and Table 1), EPR and Mössbauer spectroscopies³⁸ are also very similar to those of *Cp Rd* (see Fig. S2 of ESI† for CD) and confirm the oxidation of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ into $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ with a high-spin Fe^{III} -tetrathiolate centre. Under these conditions, complete

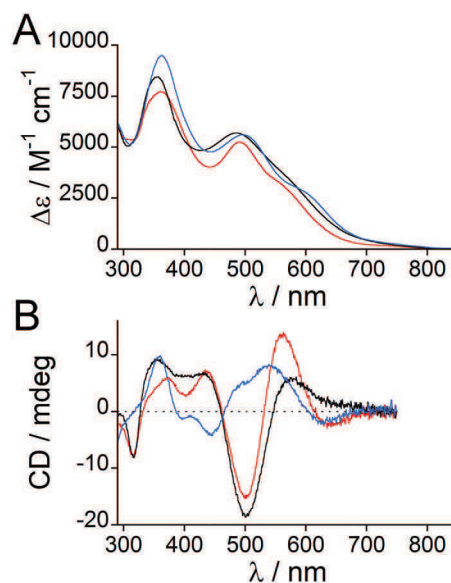


Fig. 4 Comparison of UV-Vis absorption (A) and CD (B) spectra of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (red), $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ (black) and $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ (blue) in HEPES/NaOH buffer 20 mM pH 7.5, TCEP 750 μM , 298 K. The spectrum of the *apo*-peptide was subtracted from each absorption spectrum. Complex concentration was 49 μM , 48 μM and 37 μM for L_{ZR} , $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ and L_{TC} , respectively. Note that $\sim 20\%$ decomposition of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ and $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ occurred during long lasting recording of CD spectra (scanning from 290 nm to 750 nm).

oxidation takes *ca.* 30 minutes and the characteristic absorptions of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ can be observed for 8 hours with a loss of less than 5% of the intensity at 491 nm over this period.³⁸ Then, $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ decomposes irreversibly and HPLC and ESI/MS analyses of the solution after decomposition evidence the formation of two disulfides in the peptide. When a lower concentration of TCEP is used, the time during which $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ is maintained in solution is reduced. When the solution of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ prepared by air oxidation of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ in the presence of excess TCEP is degassed with argon, the absorption bands characteristic of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ slowly disappear with the concomitant appearance of bands at 312 nm and 335 nm, characteristic of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (Fig. S3 of ESI†). Isosbestic points at 322 nm attest to a clean reduction process. Re-oxygenation of this solution restores $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$. Four oxidation–reduction cycles were possible before irreversible decomposition of the complex (Fig. S3 of ESI†).[‡] Without TCEP, upon aeration of a $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ solution, the LMCT bands characteristic of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ progressively disappear but the 491 nm absorption increases up to a value corresponding to the formation of only *ca.* 30% of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ and then decreases. This suggests an apparent lower stability for the Fe^{III} complex in the absence of TCEP. Indeed, all this shows that TCEP helps maintain the complex in a $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ steady state until it is consumed. Direct titration of L_{ZR} by a solution of FeCl_3 in methanol, with or without TCEP,

[‡] Reduction of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ to $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ under argon is slow. However, it could be accelerated by reacting $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ with dithionite under argon. Under these conditions, seven oxidation–reduction cycles were possible before precipitation occurs after addition of dithionite.³⁸

did not yield $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$. Broad absorption bands extending up to 700 nm, possibly corresponding to iron oxide/hydroxide, and bands at 312 nm and 335 nm, characteristic of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$, were observed instead of the signature of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$.[§] These observations can be accounted for by a reduction of Fe^{3+} by the cysteines instead of the formation of the awaited $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ complex. The resulting Fe^{2+} ions are then complexed by the remaining non-oxidized L_{ZR} , forming the $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ complex.

Oxidation of other $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}$ complexes was performed by air bubbling into a solution containing 750 μM TCEP for comparison purposes with $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$. $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ is oxidized into a $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ complex in 5 to 10 minutes compared to *ca.* 30 minutes for $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$. Its UV-Vis absorption and CD spectra are very similar to that of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (Fig. 4). However, the apparent steady-state stability of this complex is lower and it starts to decompose after a few minutes. Complete oxidation of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ by air bubbling is also faster (*ca.* 10 min) than that of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$. The oxidized complex, $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$, presents a UV-Vis absorption spectrum with maxima at 364 nm and 497 nm, close to those of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ but with a more red-shifted shoulder at 610 nm *vs.* 570 nm for $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (Fig. 4A). Its CD spectrum differs markedly from that of $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ (Fig. 4B). This complex is also apparently less stable under the same conditions and starts to decompose after 12 min (Fig. S4 of ESI[†]). Finally, when a solution of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ is aerated, a red colour appears instantaneously but vanishes in a few seconds, precluding the recording of absorption and CD spectra. All these observations indicate that the four $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}$ peptides can be oxidized into Fe^{III} complexes but the oxidation rates, the spectroscopic properties of the resulting complexes and their stabilities are markedly different.

Discussion

Local structure around the iron ion

Fig. 3 shows that the UV-Vis absorption spectra of all Fe^{II} peptides are strongly similar, but it reveals that their CD spectra exhibit more variations than that of the L_{TC} peptide departing strongly from the others. The same behaviour is observed for the Fe^{III} peptides in Fig. 4. The UV-Vis absorption spectra are dominated by the $\text{Cys}\cdot\text{S}\rightarrow\text{Fe}^{2+/3+}$ LMCT transitions pattern, whereas in the CD spectra these transitions are modulated by the stereochemistry around the FeS_4 core. Therefore CD may constitute a good probe for the local arrangement of the cysteine side chains around the iron ion. To further investigate this possibility, we have compared in Fig. 5 the $\text{Zn}(\text{SC}_\beta)_4$ core (including not only the zinc ion and four sulphur atoms but also the β -carbon atoms) of Zn-loaded Cp Rd³, $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$,³⁶ $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ ³⁷ and $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$,³⁵ using $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ as the reference. Examination of the three structures shows that all FeS_4 cores superimpose almost perfectly, in full agreement with their very similar UV-visible spectra. By contrast, quite different situations are noted for the cysteine β carbons.

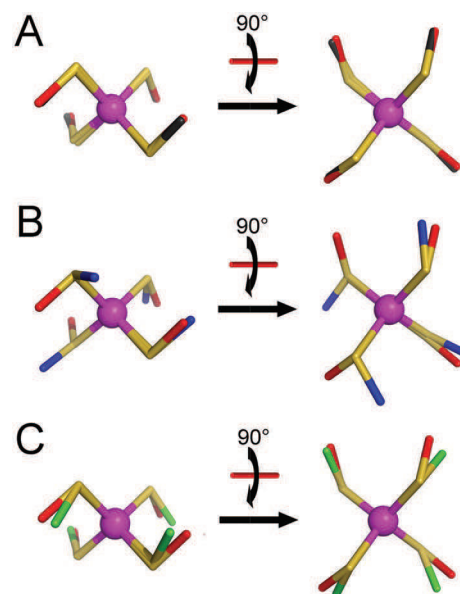


Fig. 5 Comparison of the $\text{Zn}(\text{SC}_\beta)_4$ cores of the structure of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ ³⁶ (red) with (A) Zn-loaded Cp Rd³ (black), (B) $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ ³⁵ (blue) and (C) $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ ³⁷ (green).

As displayed in Fig. 5A, the $\text{Zn}(\text{SC}_\beta)_4$ core of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ is almost superimposable on that of Zn-loaded Cp Rd. Together with the similarity of CD spectra of the reduced and oxidized forms of $\text{Fe}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ and Cp Rd, this shows that the cysteine side chains in $\text{Fe}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ adopt the same local arrangement around the metal ion as in Cp Rd with a pseudo D_{2d} symmetry for the $\text{Fe}(\text{SC}_\beta)_4$ core. Fig. 5B compares the local arrangement of the $\text{Zn}(\text{SC}_\beta)_4$ cores in $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ with its loosened zinc ribbon fold and in $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$. A slight displacement of the β -carbon atoms is apparent pointing to a slight distortion although the global folds of the zinc complexes differ markedly (Fig. 1B). Interestingly, the CD spectra of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ are very similar. In contrast, the CD spectra of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ and $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ are at variance with those of reduced and oxidized $\text{Fe}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$, respectively, in line with their quite different structures. Indeed, in the treble clef fold, the local geometry of the $\text{Zn}(\text{SC}_\beta)_4$ core is different from that in the zinc ribbon fold of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ with a loss of the pseudo D_{2d} symmetry (Fig. 5C). It thus appears that CD spectra discriminate between the different local arrangements of the cysteine side chains around the iron ion.

Thermodynamic stability of the iron(II) complexes

Fe^{2+} binding by peptides incorporating a $(\text{Cys})_{4-x}(\text{His})_x$ ($x = 0, 1, 2$) coordination set has been evidenced either by chemical or biochemical studies,^{43–47} but measurements of Fe^{2+} binding constants are scarce. K values of $10^{5.6} \text{ M}^{-1}$ at pH 7.0 were reported for CP1(CCHH) and CP1(CCHC), two consensus peptides designed to model $(\text{Cys})_2(\text{His})_2$ and $(\text{Cys})_3(\text{His})$ classical $\beta\alpha$ ZFs.⁴⁶ A K value of $10^{4.8} \text{ M}^{-1}$ at pH 7.0 was also reported for IGA, a linear peptide with the sequence KLCEGGCIGC-GACGGW which contains a $(\text{Cys})_4$ coordination set and was

[§]Quantification of the absorption at 312 nm yields ≈ 10 –15% formation of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$.

designed after the sequence of [4Fe-4S] clusters binding domains.⁴⁷

The results presented here show that higher binding constants ($K > 10^7 \text{ M}^{-1}$ at pH 7.0) can be obtained with small peptides. The Zn^{2+} and Fe^{2+} binding constants at pH 7.0 for L_{ZR} , $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$, L_{TC} and L_{HSP} are compared in Table 1. Concerning the zinc complexes, the lowest binding constant was measured for $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ ($\log K = 13.3$ vs. 15.4, 14.7 and 14.6 for L_{ZR} , L_{TC} and L_{HSP} , respectively). The difference between L_{ZR} and $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ was ascribed to a more stable conformation of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ ($\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ is dynamic from a conformational point of view whereas $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$ is frozen in a unique conformation) which allows stronger second sphere interactions like $\text{NH}\cdots\text{S}$ hydrogen bonds or CH/π interactions between the tryptophan of the cycle and a lysine side chain of the tail of L_{ZR} .³⁶ Indeed, we have previously demonstrated that second sphere interactions like hydrophobic⁴⁰ or charge/dipole³⁵ interactions can provide substantial stabilization to the zinc-peptide complexes. Well-folded and conformationally stable complexes $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ and $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ have also a higher formation constant than $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$. So both the second sphere interactions of the site and its conformational stability play a significant role in tuning the affinity of the peptide for the metal.

In $\text{M}(\text{SR})_4$ complexes, sulphur lone pairs contribute to both ligand–ligand and ligand–metal interactions and the stereochemistry around the metal ion influences the energetics of the metal–ligand interaction. It was calculated that the D_{2d} symmetry like the one encountered in rubredoxin corresponds to a global energy minimum for $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{SR})_4$ complexes.⁴⁸ It is thus quite consistent that L_{ZR} providing a quasi-perfect D_{2d} symmetric environment exhibits a higher binding constant for Fe^{2+} ($\log K = 10$). The lower affinity observed for $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$, L_{TC} and L_{HSP} ($\log K \approx 7.5$) may thus reflect a lower stabilization due to both peptide folding (weaker 2nd sphere interactions and/or greater conformational mobility) and distortion of the D_{2d} symmetry (1st coordination sphere interactions between Fe^{2+} d orbitals and sulphur lone pairs). Therefore, it seems that a Fe^{2+} binding constant near 10^{10} M^{-1} can be reached with well folded peptides having the zinc ribbon fold but still significant binding constants ($>10^7 \text{ M}^{-1}$) can also be obtained with peptides constraining the $\text{Fe}(\text{SC}_\beta)_4$ core in a symmetry lower than the optimal D_{2d} symmetry.

Chemical stability and peptide fold

$\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}$ complexes can be formed by air oxidation of the $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}$ complexes. Complete oxidation takes *ca.* 30 minutes, 10 minutes and a few seconds for $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$, $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$, respectively. The precise mechanism of oxidation is not known but it must involve electron transfer between the FeS_4 centre and O_2 . The stabilities of the $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}$ complexes differ also markedly. $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}$ complexes tend to decompose with formation of disulfides and reduction of the metal ion. However, TCEP, a fast phosphine-based thiol reducing agent, allows maintaining the complex in the Fe^{III} steady-state. Under the same conditions (50 μM complex and 750 μM TCEP), the $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}$ steady-state is maintained for 8 hours, 12 minutes and a

few seconds for $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ and $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$, respectively, until TCEP is totally consumed. Here again, the decomposition mechanism is not known and may involve an equilibrium between the $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{RS}^-)_4$ and $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{RS}^-)(\text{RS}^-)_3$ forms. However, the whole process which leads to reduction into Fe^{II} and formation of a disulphide requires an electron transfer to a redox partner. It is noteworthy that the resistance to oxidation of $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}$ complexes and the apparent steady-state stability of the $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}$ complexes follow the same trend with an increasing stability of the Fe^{II} and Fe^{III} complexes in the series $\text{Fe}\cdot\text{L}_{\text{HSP}} < \text{Fe}\cdot\text{L}_{\text{TC}} < \text{Fe}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$. Since both processes require a redox partner, we hypothesized that the stabilities of the $\text{Fe}\cdot\text{L}$ complexes could depend on the accessibility of the FeS_4 core to other molecules and, thus, possibly on the fold of the peptide around the FeS_4 core. Using Pymol,⁴⁹ we have calculated the solvent accessible surface (SAS) for the ZnS_4 core in the NMR solution structures of zinc complexes $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$,³⁶ $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ ³⁵ and $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$.³⁷ First, SAS calculations were performed on the set of 10 lowest energy structures obtained during the solution structure determination process using X-PLOR⁵⁰ based on H–H distances and angular constraints derived from NMR data. This set was called the “native” set, with side chains corresponding to the peptide sequences given in Fig. 1. In addition, in order to estimate the relative influence of the peptide backbone and the side chains, we have calculated the SAS using the same set of structures but replacing all amino acids except cysteines by alanines (“all-Ala” set, methyl as side chains) or glycines (“all-Gly” set, no side chain). The results are presented in Table 2. The SAS for the “native” set increases in the series $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}} < \text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}} < \text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$. Although the SAS increases when the side chains are shortened (“all-Ala” set) and removed (“all-Gly” set), the SAS order is conserved whatever the set: $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}} < \text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}} < \text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$. This means that the fold of the backbone is mainly responsible for the shielding of the FeS_4 core. This SAS order correlates well with our observations concerning both the sensitivity of the Fe^{II} peptide toward air oxidation and the apparent stability of the Fe^{III} peptide: the more accessible the FeS_4 core, the more reactive it is. Hence, among the folds studied here, the zinc ribbon fold provides the highest protection to the ZnS_4 core and the loosened zinc ribbon the lowest.

Table 2 Solvent accessible surface (\AA^2) of the ZnS_4 core in the $\text{Zn}\cdot\text{L}$ complexes, calculated using Pymol⁴⁹ based on the NMR solution structures of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$,³⁶ $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ ³⁵ and $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$ ³⁷

	“native” set ^a	“all-Ala” set ^b	“all-Gly” set ^c
$\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{ZR}}$	4.4 ± 3.6	10.7 ± 1.5	23.4 ± 1.6
$\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$	11.1 ± 4.9	24.3 ± 3.9	42.6 ± 3.8
$\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{HSP}}$	18.6 ± 5.0	39.4 ± 3.4	55.8 ± 2.8

^a Calculations performed using the set of 10 lowest energy structures of the $\text{Zn}\cdot\text{L}$ complexes derived from NMR data^{35–37} with the peptide sequences displayed in Fig. 1. ^b Calculations performed on the same structures but with all amino acids except cysteines changed into alanines using Pymol. ^c Calculations performed on the same structures but with all amino acids except cysteines changed into glycines using Pymol.

This could explain why Nature has chosen the zinc ribbon fold to stabilize the FeS_4 core in rubredoxin and why the tentative introduction of a $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ site on the surface of *Streptococcal* protein G³³ or *Escherichia coli* thioredoxin³⁴ was partly unsuccessful (the engineered site did not adopt the zinc ribbon fold and was thus probably much too exposed to the solvent). Regarding all the results discussed here, we anticipate that thermodynamically and chemically stable $\text{Fe}^{\text{II/III}}(\text{Cys})_4$ sites may be engineered in *de novo* proteins, whatever the local arrangement of the cysteines around the iron ion, provided they are buried deep enough in the interior of the protein and shielded from the solvent (for instance, in helix bundles). The comparative behaviour of Fe-L_{ZR} and $\text{Fe-L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$ complexes also highlights that the dynamics of such *de novo* proteins around the iron centre should also be limited to thermodynamic and chemical stability purposes.

Conclusions

In this article, we have described the Fe^{2+} binding properties of a family of peptides designed to model ZF with various folds. All four peptides are able to form stable 1:1 $\text{Fe}^{\text{II}}\cdot\text{L}$ complexes that can be oxidized into $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{L}$ complexes upon air oxidation. This shows that the zinc ribbon fold is not strictly required to form the oxidized state.

The rate of oxidation of the Fe^{II} complexes and the stability of the Fe^{III} complexes vary markedly depending on the peptide fold. We were able to correlate the shielding of the FeS_4 core provided by the peptide fold around the metal ion with the observed oxidation rate of Fe^{II} complexes and stability of Fe^{III} complexes. Among the zinc ribbon, treble clef and loosened zinc ribbon folds, the first provides the highest protection to the FeS_4 core and the last the weakest protection. These observations indicate that the zinc ribbon fold does not bring any intrinsic stability to the $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Cys})_4$ site since the smaller variation causes the larger instability. Rather, it offers the maximum steric protection against interaction with potential redox partners that will lead eventually to oxidation of the peptide cysteines.

We showed that the UV-Vis absorption and CD spectra of these complexes can be analyzed regarding the local arrangement of the cysteines around the metal ion. Whereas the UV-visible spectrum in the $\text{Cys-S}\rightarrow\text{Fe}^{2+/3+}$ LMCT region probes the FeS_4 core, the CD spectrum in the same region is sensitive to the orientation of the cysteine C_β and therefore constitutes an interesting probe for the peptide fold around the $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ site. Further work is needed along this line to establish precise correlations between CD features and structural properties.

The work presented here has identified that the advantage of using the zinc ribbon fold for rubredoxins is not only by providing a stronger affinity but also a better isolation from potential redox agents. This finding will prove useful for the design of *de novo* proteins incorporating a stable redox-active $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ site.

Experimental

Material and methods

N- α -Fmoc-protected amino acids, PyBOP and resins were obtained from Novabiochem, except Alloc-Lys(Fmoc)-OH which was synthesized according to Boturny *et al.*⁵¹ Other reagents for peptide synthesis, solvents, buffers and metal salts were purchased from Sigma-Aldrich. HPLC analyses and purifications were performed on a VWR LaPrep system. ESI-MS analyses were performed on a Thermo LXQ spectrometer. UV-Vis absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer. CD spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan spectropolarimeter or on a Biologic MOS-450 AF-CD spectropolarimeter. UV-Vis and CD spectrometers are equipped with a thermo-regulated cell holder. Anaerobic manipulations were performed under argon in a glovebox (MBraun) and rubber-sealed cells (Hellma) were used for spectroscopic measurements out of the glovebox. All buffer or metal solutions were prepared with MilliQ water (Millipore) and purged with argon. Buffer solutions were treated with Chelex 100 resin (Biorad) to remove metal traces.

Peptide synthesis

Peptides L_{ZR} ,³⁶ $\text{L}_{\text{ZR}}^{\text{lin}}$,³⁶ L_{TC} ³⁵ and L_{HSP} ³⁷ were synthesized by standard Fmoc solid phase synthesis procedures with PyBOP activation as previously reported. Briefly, for cyclic peptides with a linear tail, a linear precursor was synthesized on resin. It contains a glutamate or a lysine protected with an allyl or an alloc group, respectively, as branching amino acid for the tail. Then, the allyl or alloc protecting group was selectively removed using Pd^0 and the peptide was cleaved from the resin under mild acidic conditions to yield a precursor with only one free amine and carboxylate functions. This precursor was cyclized in solution with PyBOP and then, side chain protecting groups were removed using a mixture of TFA and scavengers. All peptides were purified by reverse phase HPLC. The identity and purity of the peptides were checked by analytical HPLC and ESI/MS analyses.

Absorption titrations

All titrations were performed under an inert atmosphere in rubber-sealed quartz cells as previously described,^{35,40} except that all solutions were prepared in a glovebox under an argon atmosphere. Additions of $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2$ solutions in the cell were also performed in the glovebox. Fe^{2+} apparent binding constants were measured by competition experiments with EGTA or HEDTA in 100 mM HEPES buffer pH 7.0 as previously described for Zn^{2+} but with UV-Vis monitoring of the LMCT bands around 320 nm.^{35,40} The K_{app} values of EGTA and HEDTA for Fe^{2+} were calculated using published⁸ values of $\text{p}K_{\text{a}}$ and $\log \beta_{11}(\text{Fe}^{2+})$: EGTA ($\text{p}K_{\text{a}} = 1.93, 2.70, 8.79, 9.40$; $\log \beta_{11} = 11.8$) and HEDTA ($\text{p}K_{\text{a}} = 1.60, 2.61, 5.38, 9.87$; $\log \beta_{11} = 12.2$). All protonation constants were corrected upward by 0.11 to account for 0.1 M ionic strength as stated by Martell and Smith.^{52,53}

Preparation of Fe^{III} samples

Solutions of Fe^{II}-L complexes were prepared in rubber-sealed cuvettes using a glovebox by addition of 0.9 eq. Fe(SO₄)₃(NH₄)₂ to a solution of peptide in HEPES buffer (20 mM, pH 7.0) containing TCEP (750 μM). After the initial recording of an absorption spectrum, solutions were oxygenated by bubbling air. Oxidation of the Fe^{II}-L complexes and stability of the Fe^{III}-L complexes were monitored by absorption spectroscopy. CD spectra of fresh Fe^{III}-L samples were recorded after complete oxidation of the Fe^{II}-L complexes.

Acknowledgements

Funding for this project was provided by the Région Rhône-Alpes (CIBLE 10 015762, doctoral fellowship for AJ) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-JCJC-0018). JML and OS also acknowledge the partial support of Labex ARCANE (ANR-11-LABX-0003-01).

Notes and references

- W. Lovenberg and W. M. Williams, *Biochemistry*, 1969, **8**, 141–148.
- W. Lovenberg and B. E. Sobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1965, **54**, 193–199.
- Z. Dauter, K. S. Wilson, L. C. Sieker, J. M. Moulis and J. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 8836–8840.
- J. Meyer and J. M. Moulis, in *Handbook of Metalloproteins*, eds. A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Wiley, Chichester, 2001, vol. 1 & 2, pp. 505–517.
- H. L. Lumpio, N. V. Shenvi, A. O. Summers, G. Voordouw and D. M. Kurtz, *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 101–108.
- F. deMare, D. M. Kurtz and P. Nordlund, *Nat. Struct. Biol.*, 1996, **3**, 539–546.
- A. V. Coelho, P. Matias, V. Fulop, A. Thompson, A. Gonzalez and M. A. Carrondo, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1997, **2**, 680–689.
- C. Andreini, L. Banci, I. Bertini and A. Rosato, *J. Proteome Res.*, 2006, **5**, 3173–3178.
- C. Andreini, L. Banci, I. Bertini and A. Rosato, *J. Proteome Res.*, 2006, **5**, 196–201.
- S. S. Krishna, I. Majumdar and N. V. Grishin, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 532–550.
- J. M. Matthews and M. Sunde, *IUBMB Life*, 2002, **54**, 351–355.
- R. Gamsjaeger, C. K. Liew, F. E. Loughlin, M. Crossley and J. P. Mackay, *Trends Biochem. Sci.*, 2007, **32**, 63–70.
- J. L. Michalek, A. N. Besold and S. L. J. Michel, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 12619–12632.
- C. Andreini, I. Bertini and G. Cavallaro, *PLoS One*, 2011, **6**, e26325.
- L. C. Myers, M. P. Terranova, A. E. Ferentz, G. Wagner and G. L. Verdine, *Science*, 1993, **261**, 1164–1167.
- C. Kumsta and U. Jakob, *Biochemistry*, 2009, **48**, 4666–4676.
- V. Nanda, M. M. Rosenblatt, A. Osyczka, H. Kono, Z. Getahun, P. L. Dutton, J. G. Saven and W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5804–5805.
- P. Tavares, J. Wunderlich, S. Lloyd, J. Legall, J. Moura and I. Moura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **208**, 680–687.
- J. Legall, B. Prickril, I. Moura, A. Xavier, J. Moura and B. Huynh, *Biochemistry*, 1988, **27**, 1636–1642.
- A. Pierik, R. Wolbert, G. Portier, M. Verhagen and W. Hagen, *Eur. J. Biochem.*, 1993, **212**, 237–245.
- A. F. Pinto, S. Todorovic, P. Hildebrandt, M. Yamazaki, F. Amano, S. Igimi, C. V. Romao and M. Teixeira, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 501–510.
- M. Ayhan, Z. G. Xiao, M. J. Lavery, A. M. Hamer, K. W. Nugent, S. D. B. Scrofani, M. Guss and A. G. Wedd, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 5902–5911.
- D. W. Low and M. G. Hill, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 11536–11537.
- M. K. Eidsness, A. E. Burden, K. A. Richie, D. M. Kurtz, R. A. Scott, E. T. Smith, T. Ichiye, B. Beard, T. P. Min and C. H. Kang, *Biochemistry*, 1999, **38**, 14803–14809.
- C. E. Ergenekan, D. Thomas, J. T. Fischer, M. L. Tan, M. K. Eidsness, C. H. Kang and T. Ichiye, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 2818–2829.
- M. Sulpizi, S. Raugei, J. VandeVondele, P. Carloni and M. Sprik, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 3969–3976.
- Y. Luo, C. E. Ergenekan, J. T. Fischer, M.-L. Tan and T. Ichiye, *Biophys. J.*, 2010, **98**, 560–568.
- B. S. Perrin and T. Ichiye, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, **18**, 103–110.
- L. Baltzer, H. Nilsson and J. Nilsson, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 3153–3163.
- Y. Lu, N. Yeung, N. Sieracki and N. M. Marshall, *Nature*, 2009, **460**, 855–862.
- N. Koga, R. Tatsumi-Koga, G. Liu, R. Xiao, T. B. Acton, G. T. Montelione and D. Baker, *Nature*, 2012, **491**, 222–228.
- M. L. Zastrow and V. L. Pecoraro, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 2565–2588.
- E. Farinas and L. Regan, *Protein Sci.*, 1998, **7**, 1939–1946.
- D. E. Benson, M. S. Wisz, W. T. Liu and H. W. Hellinga, *Biochemistry*, 1998, **37**, 7070–7076.
- O. Sèneque, E. Bonnet, F. L. Joumas and J.-M. Latour, *Chem.-Eur. J.*, 2009, **15**, 4798–4810.
- A. Jacques, B. Mettra, V. Lebrun, J.-M. Latour and O. Sèneque, *Chem.-Eur. J.*, 2013, **19**, 3921–3931.
- O. Sèneque, E. Bourlès, V. Lebrun, E. Bonnet, P. Dumy and J.-M. Latour, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 6888–6891.
- A. Jacques, M. Clémancey, G. Blondin, V. Fourmond, J.-M. Latour and O. Sèneque, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2915–2917.
- W. A. Eaton and W. Lovenberg, in *Iron-Sulfur Proteins*, ed. W. Lovenberg, Academic Press, New York, 1973, vol. 2, pp. 131–162.
- O. Sèneque and J.-M. Latour, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 17760–17774.

- 41 Z. G. Xiao, M. J. Lavery, M. Ayhan, S. D. B. Scrofani, M. C. J. Wilce, J. M. Guss, P. A. Tregloan, G. N. George and A. G. Wedd, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 4135–4150.
- 42 M. Lowery, J. Guckert, M. Gebhard and E. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 3012–3013.
- 43 J. Omichinski, C. Trainor, T. Evans, A. Gronenborn, G. Clore and G. Felsenfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1993, **90**, 1676–1680.
- 44 A. N. Besold, A. A. Oluyadi and S. L. J. Michel, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 4721–4728.
- 45 R. C. diTargiani, S. J. Lee, S. Wassink and S. L. J. Michel, *Biochemistry*, 2006, **45**, 13641–13649.
- 46 B. Krizek and J. Berg, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 2984–2986.
- 47 A. K. Petros, A. R. Reddi, M. L. Kennedy, A. G. Hyslop and B. R. Gibney, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 9941–9958.
- 48 V. V. Vrajmasu, E. Munck and E. L. Bominaar, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 4862–4866.
- 49 The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC, 2002.
- 50 A. T. Brünger, *A system for X-ray Crystallography and NMR. X-PLOR, version 3.1*, Yale University Press, New Haven, 1992.
- 51 D. Boturyn and P. Dumy, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 2787–2790.
- 52 R. M. Smith, A. E. Martell and R. J. Motekaitis, *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database. NIST Standard Reference Database 46*, 2001.
- 53 A. E. Martell and R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1974.

RESUME

Les complexes d'or(I) tels que l'auranofine et l'aurothiomalate ont été utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde depuis plusieurs décennies. Plus récemment, de nombreux complexes d'or(I) et d'or(III) ont révélé des activités anti-cancéreuses *in vitro* importantes. Cependant, du fait de la forte affinité de l'or pour les thiols et les sélénols, ces complexes interagissent dans les cellules avec de nombreuses protéines de façon non spécifique. Ce qui explique les effets secondaires observés chez les patients soumis à des traitements prolongés de chrysothérapie et rend plus difficile la compréhension des mécanismes d'actions de ces complexes. Parmi les cibles thérapeutiques proposées, les protéines à doigts de zinc représentent des cibles très intéressantes. En effet, ces protéines sont très abondantes (environ 8 % du protéome humain) et se retrouvent dans des processus clés de la machinerie cellulaire (régulation de gènes, transcription, apoptose, réparation de l'ADN, résistance au stress oxydant...). Ces protéines possèdent un site $\text{Zn}(\text{Cys})_{4-x}(\text{His})_x$ ($x = 0-2$) où le zinc permet d'assurer le bon repliement de la protéine et son bon fonctionnement. Nous nous sommes donc intéressés à déterminer l'interaction de complexes d'or(I) et d'or(III) avec les protéines doigts de zinc à l'aide de modèles peptidiques de ces sites à zinc. Nous avons caractérisé les produits issus de la réaction entre les peptides et l'or et déterminé les cinétiques de déplacement du zinc par l'or.

SUMMARY

Gold(I) complexes such as auranofine and aurothiomalate have been used as therapeutic agents for the treatment of rheumatoid arthritis for several decades. More recently, several gold(I) and gold(III) complexes have shown important *in vitro* anticancer properties. However, because of the high affinity of gold for sulfur and selenium ligands, these complexes interact with lots of proteins in a non-specific manner. This explains some of the side effects observed in patients treated with gold complexes and also why the mechanism of action of these complexes remains misunderstood. Among all the therapeutic target of gold salts that has been proposed, zinc fingers proteins are very interesting targets. Indeed, these proteins are very abundant (ca. 8 % of human proteome) and are involved in key processes of the cell (genes regulation, transcription, apoptosis, DNA repair, resistance to oxidant stress...). These proteins contains a $\text{Zn}(\text{Cys})_{4-x}(\text{His})_x$ ($x = 0-2$) center where zinc assure the proper fold and function of the protein. We were interested to study the interaction of some gold(I) and gold(III) complexes with zinc finger proteins by using peptidic models these zinc sites. By using different spectroscopic methods, we have characterized the products obtained by reaction between the zinc fingers and the gold salts and determined the kinetics of zinc displacement by gold.