



Doigts de zinc et stress oxydant : réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet et l'acide hypochloreux

Vincent Lebrun

► To cite this version:

Vincent Lebrun. Doigts de zinc et stress oxydant : réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet et l'acide hypochloreux. Chimie inorganique. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV068 . tel-01555893v2

HAL Id: tel-01555893

<https://theses.hal.science/tel-01555893v2>

Submitted on 5 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**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Vincent LEBRUN

Thèse dirigée par **Jean-Marc LATOUR** et **Olivier SÉNÈQUE**

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

Doigts de zinc et stress oxydant : réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet et de l'acide hypochloreux

Thèse soutenue publiquement le **18 novembre 2014**,
devant le jury composé de :

Madame Isabelle ARTAUD

Directrice de recherche CNRS, Université Paris Descartes (*Paris*), Rapporteur

Madame Christelle HUREAU

Chargée de recherche CNRS, Université Paul Sabatier (*Toulouse*), Rapporteur

Madame Carole DUBOC

Directrice de recherche CNRS, Université Joseph Fourier (*Grenoble*),
Présidente

Madame Tamar KOHN

Professeur, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (*Lausanne, Suisse*),
Examinatrice

Monsieur Jean-Marc LATOUR

Directeur de recherche CEA, CEA Grenoble, Directeur de Thèse

Monsieur Olivier SÉNÈQUE

Chargé de recherche CNRS, CEA Grenoble, Directeur de Thèse



*À ma famille,
Émeline,
mes amis.*

Remerciements

Je voudrais commencer ce manuscrit en exprimant ma gratitude envers les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à cette thèse, ainsi que celles qui m'ont accompagnées durant ces trois ans. Cette thèse a été une expérience très riche à tous points de vue, et je vous en suis, à toutes et à tous, sincèrement reconnaissant.

En ce sens, je voudrais commencer par remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse. Votre encadrement, très complémentaire et constructif, m'a été très bénéfique. Je ne peux pas faire une liste exhaustive de tout ce que vous m'avez apporté, ni de tout ce pour quoi je vous suis reconnaissant. Je m'efforcerai donc de faire aussi court que possible. D'abord, je vous remercie très sincèrement pour la patiente dont vous avez fait preuve pendant ma laborieuse rédaction.

Mon premier immense merci est pour Olivier Sénèque. Tu m'as consacré énormément de temps, m'a appris énormément de choses et tu m'as fait confiance en m'associant à tes projets. Je t'en suis très reconnaissant. Merci pour m'avoir autant aidé lors de la rédaction du manuscrit, pour qu'il puisse être fini à temps ! Travailler avec toi au quotidien pendant ma thèse, mon stage de Master 2, et ces quatre petites semaines de 2007, a été aussi enrichissant que plaisant (et drôle !). Pour avoir toujours été là, pour m'avoir soutenu, pour toutes ces discussions, merci !

Mon deuxième immense merci est pour Jean-Marc Latour. Tu as toujours été disponible, tu m'as fait part de tes nombreux conseils et remarques avisés. De par ta vision large, ton expérience, ta rigueur, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Bon, d'accord, sur la rigueur, j'ai encore beaucoup à faire... mais c'était pire avant ! En tout cas, merci pour tout !

Merci à Isabelle Artaud et Christelle Hureau, qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse, mais surtout, qui ont bien voulu en être les rapporteurs. Merci de m'accorder votre temps, et surtout, d'affronter ma prose. Bon courage...

Merci à Carole Duboc d'avoir accepté d'être présidente de mon jury et d'avoir, depuis deux ans, suivi l'avancée de ces travaux en tant que jurée de comité de suivi de thèse. D'ailleurs, merci aussi à Jean-Luc Ravanat d'avoir été le deuxième juré de ce comité. J'ai apprécié les discussions qui ont eu lieu lors de ces réunions, et je vous en remercie tous les deux.

Merci à Tamar Kohn d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie aussi Stéphane Ménage de m'avoir permis de faire ma thèse dans le laboratoire qu'il dirige. Bien que nous n'ayons pas souvent eu à se voir, tu as toujours été là quand j'en avais besoin. Merci.

Je remercie très chaleureusement Valentin Chabert. Ce fut un vrai plaisir de t'encadrer pendant ton stage de Master 2, ne serait-ce que pour ta bonne humeur, ton enthousiasme et ton humour. Le seul problème c'est que maintenant, je me demande avec qui d'autre on pourra « chanter » un mélange de Brassens, Daft Punk et Rae Jepsen ...

Ma gratitude va aussi, bien évidemment, à mes collaborateurs : Colette Lebrun pour les spectres ESI-MS, Christine Saint-Pierre pour les spectres MALDI, Jean-Luc Ravanat pour la LC-MS, Pascal Delangle pour l'accès au robot de synthèse peptidique, Vincent Forge et Vincent Artero pour l'accès au spectrophotomètre Infra-rouge, et l'équipe de Nathan McClenaghan (dont Arnaud Tron et Luca Scarpantonio) pour les mesures de phosphorescence de l'oxygène singulet et surtout pour m'avoir accueilli à Bordeaux et m'avoir montré les manipes.

Merci à Catherine Bougault, qui m'a tutoré pour la partie Enseignement de ma thèse. Tu as été très disponible pour moi, nous avons eu des discussions très intéressantes, et tu m'as donné de très bons conseils. Pour tout cela pour ton écoute et pour ta gentillesse, merci beaucoup. Je voudrais aussi remercier les personnes avec qui j'ai travaillé lors des enseignements. Patrick, Myriam, Elise, Hélène, Isabelle. Vous avez fait que ce « monitorat » fut une très bonne expérience pour moi. Je vous en remercie chaleureusement.

Je tiens à remercier toute l'équipe Physico-chimique des Métaux en Biologie aussi chaleureusement qu'elle m'a accueillie. Ce fut tous les jours un vrai plaisir de venir au labo... et je ne dis pas ça que pour le petit déjeuner du vendredi matin !

Merci d'abord aux thésards et post-docs. Éric, Aurélie, Manon, Michaël, Sylvie (Dr. Raibaut) et Ramki, merci pour votre bonne humeur, votre écoute, votre soutien. Merci pour tous ces supers moments, ces fou-rires, et parfois, parfois... des discussions scientifiques.

Merci aux étudiants de passage courts. Angélique, Tanguy, William, Mylène, Patricia, Alexandra, Fany et Cédric, nous ne nous sommes pas vu bien longtemps mais le temps passé avec vous fut très agréables, et je vous en remercie.

Je voudrais remercier les permanents du groupe. Geneviève, Victor, Martin, Christelle, Patrick, Claude et Ricardo, merci à vous tous. Dès le début, vous avez toujours été là, amicaux et bienveillants. J'ai pris beaucoup de plaisir en votre compagnie : autour des cafés, à courir au bord des berges, à discuter RPE, île de la Réunion ou bricolage (Mais non Patrick, personne ne

sait que je parle de toi...) etc. Pour tous ces très bons moments, merci ! Je tiens à préciser, Geneviève, que j'ai beaucoup apprécié ton écoute, ton soutien et tes conseils pendant la phase de rédaction.

Un merci tout particulier à Jean-Louis Oddou. Finalement, nous n'avons passé que peu de temps ensemble, et pourtant, sans toi, les choses ne se seraient pas passées ainsi. En effet, c'est grâce à toi que j'ai pu faire mon stage en 2007 avec Olivier et Jean-Marc. Jean-Louis, je te remercie très sincèrement pour m'avoir offert cette occasion. Ce stage a été fondamental pour moi, et je suis convaincu que sans lui, je n'en serais pas là aujourd'hui.

En plus des membres de l'équipe, je remercie plus largement les membres du laboratoire. Même si je n'étais pas très souvent aux bâtiments K et K', vous m'avez toujours accueilli chaleureusement. Alice, Charlène, Lucie, Lucile, Laurianne, Thibault, Stéphanie, Denis, Déborah, Béatrice, Pierre, les Nicolas, Patrice, Julien, Alexandre, les Stéphanes, Fabien, Yohann, les Vincent, Olivier, Sandrine, et j'en oublie certainement... merci pour votre accueil dans le laboratoire.

Finalement, j'ai pris beaucoup de plaisir à côtoyer tous les collègues de l'INAC du bâtiment C5. Lionel, Adrien, Florence, Yves, les Pascales, Marie, Maria, Valentin, Matthieu, Bastien, Christelle, Zohra, Stéphanie, Jean-Luc, Colette, Christine, Timothé, Vincent, Serge, Jacques, Pierre, et bien-sûr, Martial et Aurélie. Merci à tous pour votre accueil, votre bonne humeur, et les échanges scientifiques (et moins scientifiques) que l'on a pu avoir au détour des couloirs du C5.

Finalement, je remercie du fond du cœur mon entourage proche. Vous, Emeline et ma famille, m'avez encouragé à me lancer dans cette thèse et avez toujours été à mes côtés. Notamment Emeline, merci de n'avoir cessé de me soutenir, alors que tu as été au premier rang de mon humeur pendant ces longs mois de rédaction. Merci ! Plus généralement, je tiens à remercier aussi tou-te-s mes ami-e-s.

À vous qui m'avez accompagné toutes ces années, Merci !

Doigts de zinc et stress oxydant : réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet et de l'acide hypochloreux

Table des matières	1
--------------------------	---

Introduction	7
--------------------	---

Partie A : Réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de HOCl

<i>Chapitre A : Réactivité du modèle du site de Hsp33 vis-à-vis de HOCl.....</i>	<i>69</i>
--	-----------

Partie B : Réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de $^1\text{O}_2$

<i>Préambule B.I : Quelques précisions d'ordre méthodologique.....</i>	<i>99</i>
--	-----------

<i>Chapitre B.II : Réactivité d'un modèle de site clé de sol vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.....</i>	<i>105</i>
--	------------

<i>Chapitre B.III : Réactivité d'un modèle de site $\beta\beta\alpha$ classique vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.....</i>	<i>131</i>
--	------------

<i>Chapitre B.IV : Réactivité des modèles de sites ZAS vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.....</i>	<i>155</i>
--	------------

<i>Discussion B.V : Discussion générale sur l'oxydation des doigts de zinc par $^1\text{O}_2$.....</i>	<i>189</i>
---	------------

Conclusions	199
-------------------	-----

Partie Expérimentale.....	205
---------------------------	-----

Abréviations

DCDMSi : Dichloro,diméthylsilane

DCM : Dichlorométhane

DEDTC : Diéthylthiocarbamate

DIEA : N,N'-diisopropyléthylamine

DMF : Diméthylformamide

EDTA : Acide éthane-1,2-diamino-*N,N,N',N'*-tetraacétique.

EGTA : Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthylether)-*N,N,N',N'*-tetraacétique.

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

ESI : Ionisation par électronébulisation (*electrospray ionisation* en anglais)

FAD : Flavine adénine dinucléotide

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GluC : Glutamate C-carboxy-peptidase

HEDTA : Acide *N*-(2-hydroxyéthyl)-éthane-1,2-diamino-*N,N',N'*-tetraacétique.

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

LC-MS : HPLC couplée à la spectrométrie de masse

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NTA : Acide aminotriacétique

PyBOP : (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium

TCEP : tris(2-carboxyléthyl)phosphine

TEA : Triéthylamine

TPEN : *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylméthyl)éthylènediamine

Introduction

Introduction

1. LE STRESS OXYDANT	7
1.1. Les Espèces Réactives de l'Oxygène.....	7
1.2. Protections contre les ERO	11
1.3. Les interrupteurs redox	12
2. LES DOIGTS DE ZINC	14
2.1. Propriétés générales.....	14
2.2. La réactivité de doigts de zinc est impliquée dans des processus biologiques.....	16
2.3. Vers une rationalisation de la réactivité des doigts de zinc	24
3. L'ACIDE HYPOCHLOREUX	33
3.1. Généralités	33
3.2 Les cibles biologiques de HOCl.....	35
3.3. Des senseurs de HOCl à base de méthionine.....	35
3.4. Oxydation des thiols libres par HOCl.....	36
3.4 Oxydation des sites doigt de zinc par HOCl	36
4. L'OXYGENE SINGULET	38
4.1. Production de $^1\text{O}_2$	39
4.2. Comportement de $^1\text{O}_2$ dans la cellule	43
4.3. Eviter la photo-production de $^1\text{O}_2$ dans la cellule.....	44
4.4. Les effets biologiques de $^1\text{O}_2$	45
4.5. Cibles cellulaires de $^1\text{O}_2$	46
4.6. Réactivité des thiols libres avec $^1\text{O}_2$	48
4.7 Oxydation de thiols libres par $^1\text{O}_2$: produits et vitesses.....	51
4.8. Réactivité des thiols avec $^1\text{O}_2$, dans les complexes métalliques	54
4.9. Des résultats peu extrapolables aux doigts de zinc.....	58
4.10 Études sur la réactivité de doigts de zinc vis-à-vis de $^1\text{O}_2$	59
5. LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL DE THESE	61

1. Le stress oxydant

1.1. Les Espèces Réactives de l'Oxygène

Pour les organismes aérobies, le dioxygène (ou oxygène moléculaire, O_2) est une molécule à double tranchant. Puisque le dioxygène est l'accepteur final des électrons dans la chaîne respiratoire, il est nécessaire à leur survie. D'un autre côté, le dioxygène est un oxydant puissant, d'un point de vue thermodynamique. Par chance, à cause de sa structure électronique à l'état fondamental (état fondamental triplet), le dioxygène ne réagit pas rapidement avec la plupart des molécules biologiques. L'oxygène moléculaire cause donc peu de dégâts dans les milieux biologiques. Néanmoins, l'oxygène peut être converti en espèces délétères pour les organismes vivants, appelées communément Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) puisqu'elles dérivent de l'oxygène. La production de ces ERO est constitutive des organismes aérobies. Il en existe deux types, selon la nature de l'« activation » du dioxygène (Figure i.1). Les espèces de type I sont celles qui proviennent d'une activation chimique de O_2 , c'est à dire, d'une réduction partielle de O_2 . Les plus connues sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$). De plus, notons que ce terme « type I » désigne aussi les espèces qui en dérivent, comme $HOCl$, qui est produit à partir de H_2O_2 . Le type II, quant à lui, désigne les espèces qui découlent d'une activation physique de O_2 , autrement dit, ses états électroniques excités, dont fait partie l'oxygène singulet.

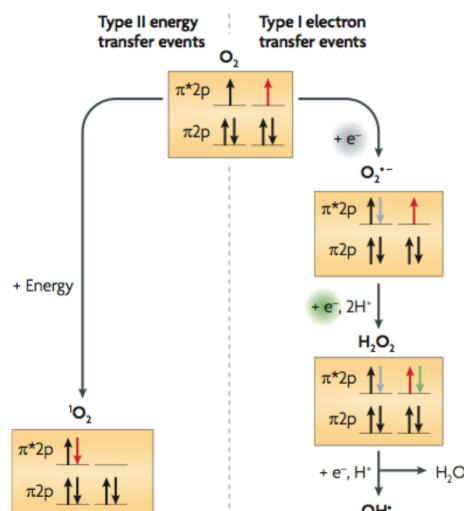


Figure i.1 : Les deux types d'activation du dioxygène : les ERO de type I proviennent d'un gain d'électron, tandis que celles de type II proviennent d'un gain d'énergie. (Figure de la revue de Ziegelhoffer et coll.^[1])

La production d'oxygène singulet est un phénomène qui impacte fortement tous les organismes photo-synthétiques.^[1-3] Une des sources d'ERO de type I est commune à tous les organismes aérobies : la chaîne respiratoire (Figure i.2). En effet, il peut y avoir des « fuites » d'électrons de la chaîne respiratoire, ce qui conduit à la libération d'espèces issues de la réduction partielle du dioxygène. Cette production mitochondriale convertirait jusqu'à 5% du dioxygène consommé en anion superoxyde.^[4] Néanmoins, ces chiffres sont controversés : ce serait une surestimation, étant donné que les méthodes utilisées favorisent la production d'anion superoxyde.

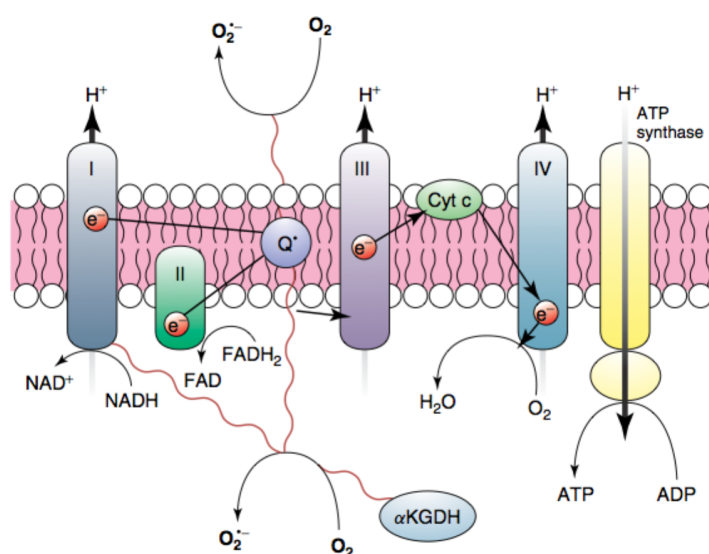


Figure i.2 : La fuite d'électrons de la chaîne respiratoire produit des espèces partiellement réduites du dioxygène (ERO de type I). (Winterbourn Encyclop Rad Chem Biol and Mat, 2012^[5])

Les différentes ERO sont liées. En effet, dans la cellule, une ERO peut réagir avec une molécule biologique pour former une nouvelle espèce oxydante (Figure i.3). On peut noter, de ce point de vue, que l'anion superoxyde a un rôle central dans ces phénomènes. D'abord, c'est la première ERO de type I à être formée : elle est issue de la réduction de O₂ par un électron. Cette espèce, donne rapidement du peroxyde d'hydrogène ou du peroxynitrite, qui sont eux-mêmes les précurseurs d'autres ERO (Schéma i.1).

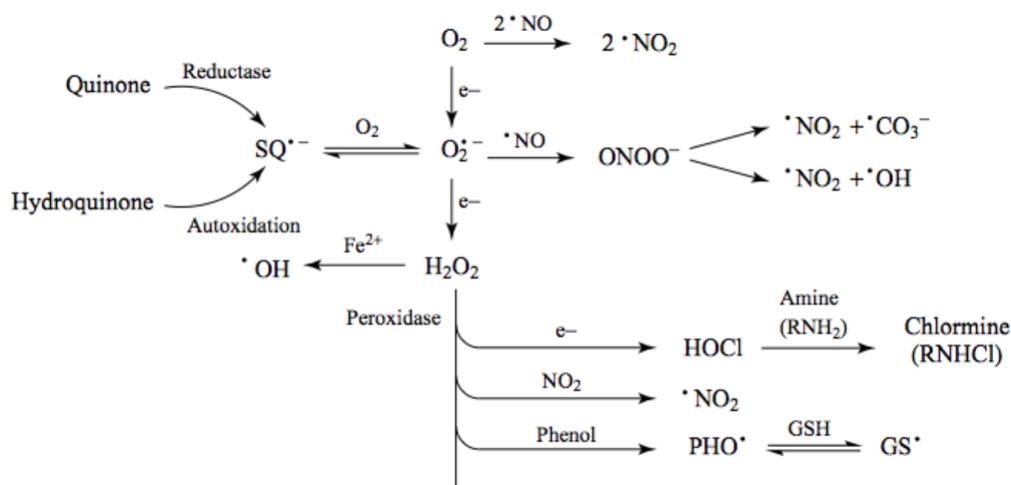


Schéma i.1 : Principales interactions entre les espèces réactives de l'oxygène. (Figure du chapitre de Winterbourn^[5])

La production d'ERO que nous venons de présenter correspond à des processus parasites. En revanche, la possibilité de générer des espèces oxydantes, potentiellement toxiques, a été mise à profit par de nombreux organismes. Une classe d'enzyme, les NADPH oxydases (NOX), catalyse le transfert d'électrons depuis le NADPH vers le dioxygène pour produire de l'anion superoxyde. Ces NOX sont présentes chez les animaux, les plantes, les champignons, et y accomplissent différentes fonctions physiologiques. Chez les mammifères, cette production est nécessaire dans certaines voies de signalisation cellulaire, et dans la défense contre les organismes pathogènes. C'est le rôle central des ERO dans la défense immunitaire qui nous intéressera ici.

En effet, en première ligne du système immunitaire, se trouvent les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles).

Elles ont pour rôle de détruire les organismes pathogènes en les phagocytant : c'est à dire qu'elles englobent la cellule cible pour former le phagosome, un organelle dans lequel est enfermé l'envahisseur. Ce confinement de la bactérie a deux avantages^[6]. Le premier est d'augmenter l'efficacité du système de défense par effet de concentration locale (accumulation de molécules bactéricides dans un petit volume). Le deuxième est d'éviter les dommages collatéraux puisque les cellules à proximité ne sont pas exposées aux molécules oxydantes. En effet, la mort de l'organisme phagocyté serait due en grande partie à l'exposition à des espèces oxydantes en forte concentration. Les espèces oxydantes sont générées très rapidement après que le phagosome a été formé. Ce phénomène est appelé « explosion oxydante » (*oxidative burst* en anglais). Même si d'autres mécanismes participent à l'élimination du pathogène, celui-ci est le principal : l'utilisation d'inhibiteurs de cette

« explosion oxydante » diminue de 80% la vitesse d'élimination de *Staphylococcus aureus* par des neutrophiles humains.^[4]

C'est la NOX-2 (isoforme 2 de la NOX) qui est à la base de cette « explosion oxydante ». La NOX-2 traverse la membrane du phagosome. Elle génère rapidement de l'anion superoxyde à l'intérieur du phagosome : le NADPH est consommé à l'intérieur de la cellule, il transfère deux électrons au FAD, qui sont ensuite transférés un à un, via deux hèmes, au dioxygène pour former deux molécules de $O_2^{\bullet-}$. Il a été calculé que la NOX-2 pouvait consommer l'oxygène dissout dans le neutrophile ($\sim 50\mu M$) en moins d'une seconde^[7], d'où le terme d'explosion. Cependant, ce n'est pas le superoxyde seul qui tue le pathogène, mais le cocktail d'espèces plus réactives qu'il génère. Notamment, $O_2^{\bullet-}$ se dismute pour former H_2O_2 (et O_2).^[8] Ce peroxyde d'hydrogène est consommé par les myéloperoxydases qui génèrent de l'acide hypochloreux (HOCl) (Figure i.3), un oxydant très réactif. Il y a d'autres espèces oxydantes présentes dans le phagosome (NO, NO_3^- , NO_2 , H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $HO\bullet$)^[9], mais c'est à HOCl qu'on attribut le plus fort effet bactéricide^[4].

Certains individus ont une maladie génétique qui conduit à une NOX inactive. Ces patients sont souvent atteints d'infections. Ceci souligne l'importance de l'« explosion oxydative » dans notre système de défense.^[4]

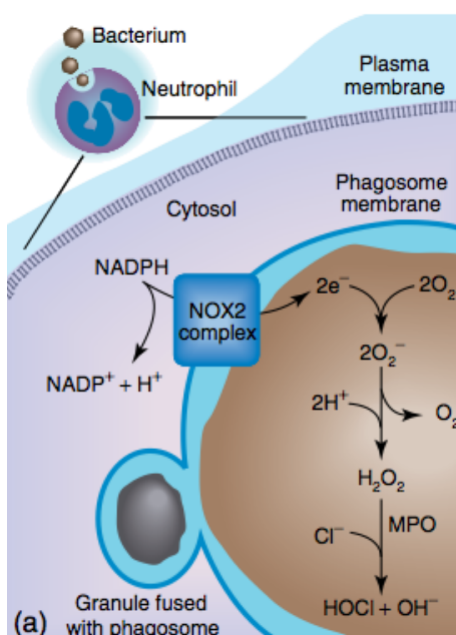


Figure i.3 : La NADPH est à la base de la génération d'espèces oxydantes bactéricides dans les phagosomes. Explication dans le texte. (Figure du chapitre de Winterbourn dans Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials^[5])

1.2. Protections contre les ERO

Ces ERO pouvant endommager les macro-molécules biologiques, les cellules doivent se protéger de leurs effets cytotoxiques. Les organismes ont donc développé plusieurs lignes de défense contre ces ERO.

La première d'entre elle est constituée de petites molécules, comme l'ascorbate (vitamine E) et le glutathion, qui peuvent servir de « leurre/bouclier » : subir l'oxydation des ERO à la place de molécules importantes (protéines, ADN, etc). L'ascorbate réagit préférentiellement avec des espèces radicalaires. De plus, il est liposoluble. Le glutathion réagit avec les électrophiles ($2e^-$) et des espèces radicalaires (Schéma i.2). Le glutathion sert aussi à maintenir un certain potentiel rédox, qui permet notamment de maintenir les thiols exposés au solvant dans leur état réduit.

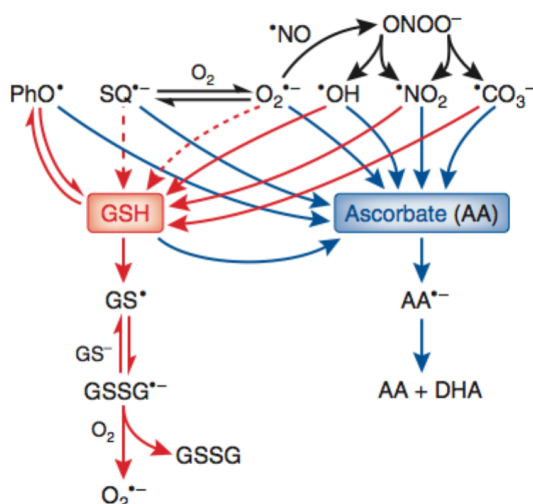


Schéma i.2 : Effet protecteur du glutathion (GSH) et de l'ascorbate contre les espèces réactives de l'oxygène.^[5]

La deuxième ligne de défense est constituée de protéines exprimées de manière constitutive. Certaines sont conçues pour réagir rapidement (plus vite que les petites molécules) avec les ERO. C'est le cas, par exemple, des peroxyrédoxines qui détruisent H_2O_2 en utilisant une paire de cystéines : la première cystéine attaque le peroxyde pour former un acide sulfénique, qui est ensuite attaqué par la deuxième cystéine pour former un disulfure (Schéma i.3). Les peroxyrédoxines réagissent avec H_2O_2 avec une vitesse de l'ordre de 10^5 - 10^7 $M^{-1}.s^{-1}$.^[10] Il existe aussi des protéines, comme les SOD (super-oxide dismutases) et les catalases, qui possèdent un site métallique pour détruire les ERO. Nous ne détaillerons pas ces enzymes ici car nous nous concentrerons sur les protéines dont la réactivité est basée sur des thiols. D'autres protéines encore, vont réparer les dommages des ERO, en catalysant, par

exemple, la réduction des ponts disulfures qui se forment lors d'un stress oxydant. C'est le cas de la thiorédoxine et la glutarédoxine.

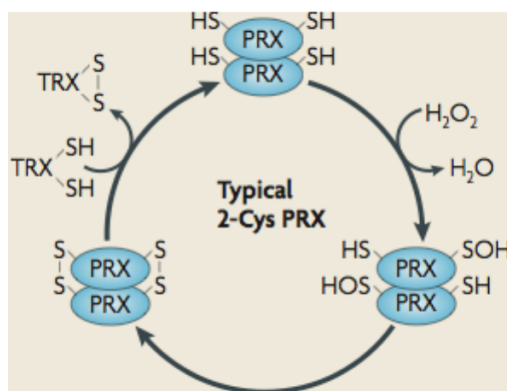


Schéma i.3 : Cycle catalytique d'une peroxyrédoxine (PRX) : destruction de H_2O_2 , puis réduction par une thiorédoxine (TRX). (Figure de d'Autréaux et coll.^[11])

Les thiols oxydés de ces deux enzymes sont à leur tour réduits. La thiorédoxine oxydée est réduite par une thiorédoxine réductase, qui utilise alors le NADPH pour se réduire. La glutarédoxine oxydée est réduite par le glutathion. Le disulfure de glutathion ainsi formé est finalement réduit par la glutathion réductase, utilisant elle aussi le NADPH comme donneur d'électrons.^[12]

Néanmoins, si le stress persiste ou s'il est trop important, ces défenses exprimées de manière constitutive peuvent ne pas suffire. Il faut donc que la cellule puisse induire une réponse adaptée au stress qu'elle subit en exprimant des gènes de défense spécifiques. Cela nécessite d'avoir recours à des senseurs, c'est à dire des protéines capables de détecter la présence d'une ou plusieurs ERO et de transmettre cette information.

1.3. Les interrupteurs redox

Nous avons vu des protéines ayant un thiol réagissant très rapidement avec les ERO pour former un acide sulfénique, qui réagit avec un autre thiol pour former un pont disulfure. Or, de tels ponts disulfures servent fréquemment d'élément structural dans les protéines. Ainsi, le va et vient thiols réduits <---> disulfure peut servir de force motrice, de contrainte, pour faire changer la conformation d'une protéine. Or, le passage d'un état à l'autre se fait (i) par l'oxydation d'un thiol par une ERO, et dans l'autre sens (ii) par la réduction du pont disulfure par une thiorédoxine ou une glutarédoxine.

Ceci est communément appelé un interrupteur rédox (*redox switch* en anglais) : il détecte la présence d'un stress oxydant (oxydation d'une cystéine) et le traduit en information structurale (changement de conformation). Cette information peut ensuite être transmise (gain/perte d'interaction avec un partenaire). Mais le retour aux conditions « normales » (réductrices) induit le chemin inverse : réduction du disulfure, et retour à la structure de départ.

L'un des exemples les mieux décrits est le facteur de transcription procaryote OxyR. Ce dernier est spécifiquement activé par H_2O_2 . Lorsque sa forme réduite inactive est oxydée par H_2O_2 ($k \sim 10^5\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), un acide sulfénique est formé sur la cystéine 199. Il est ensuite attaqué par la cystéine 208, qui est à $17\text{\AA}$ de la cystéine 199 dans la forme réduite. Le pont disulfure ainsi formé induit un fort changement structural. Dans cette conformation, OxyR interagit avec l'ARN polymérase, et induit la transcription des gènes de défense pour la destruction de H_2O_2 et la réparation des dommages que cet oxydant a causés. Le disulfure est ensuite réduit par la glutarédoxine, ce qui induit le retour de OxyR à sa structure de départ, et donc, la perte de l'interaction avec l'ARN polymérase.^[12] (Schéma i.4)

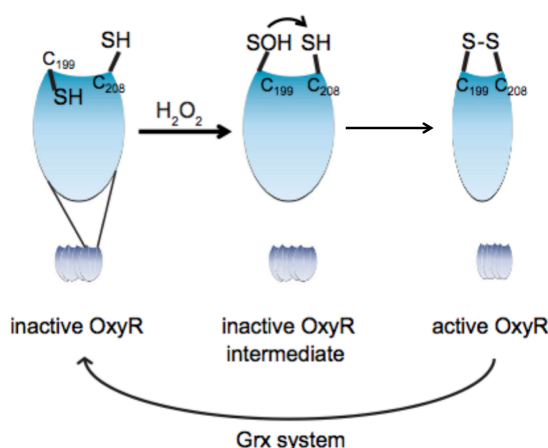


Schéma i.4 : OxyR est un interrupteur rédox. (Figure de Cremers et coll.^[12])

D'autres exemples similaires, basés sur des thiols libres, ont été identifiés chez les procaryotes et les eucaryotes (système Orp1/Yap1, SarZ, CprK, etc).^[11,12]

Cependant, il y a d'autres sites où l'on peut trouver des cystéines dont l'oxydation cause un changement structural. Dans ces sites il y a de deux à quatre cystéines liées à un métal, l'ion Zn^{2+} . Ces sites, appelés doigts de zinc, servent à structurer un domaine et sont très répandus.^[13] Ces sites ont longtemps été considérés comme purement structuraux et inertes du point de vue chimique : il était courant de lire dans la littérature biochimique que le zinc protégeait les cystéines sans que cela ait vraiment été démontré. Puis, des exemples de sites doigt de zinc réactif ont été décrits.^[14] Depuis quelques années, l'idée que certains sites doigt

de zinc pouvaient servir d'interrupteurs rédox a émergé. L'idée a même été lancée que ces exemples ne sont peut-être pas si isolés, et que les doigts de zinc pourraient, de manière plus générale, jouer un rôle dans la détection du stress oxydant.^[14,15]

Quelle est la pertinence de cette hypothèse ? S'il y a des doigts de zinc « réactifs » et des doigts de zinc « inertes », quels sont les facteurs qui rendent leurs réactivités différentes ?

Regardons d'abord plus en détail ce que sont ces doigts de zinc.

2. Les doigts de zinc

2.1. Propriétés générales

Le zinc est un élément essentiel à la vie. Il est notamment présent dans de nombreuses protéines, impliquées dans des fonctions très diverses. Des protéines à zinc sont retrouvées dans toutes les grandes classes du vivant (bactéries, archaebactéries et eucaryotes).^[13] Le protéome des eucaryotes est plus riche en protéines à zinc que les bactéries et les archaebactéries : 8,8% contre 5-6%. La raison de cette différence est que, chez les eucaryotes, un grand nombre de protéines possédant un site doigt de zinc.^[13]

L'appellation « doigt de zinc » désigne une famille de sites protéiques où la liaison d'un ion Zn^{2+} sert à la structuration d'un domaine. Le plus souvent, ces domaines sont impliqués dans l'interaction avec une autre protéine ou un acide nucléique. Des protéines à doigt de zinc sont retrouvées dans toutes les grandes classes du vivant (bactéries, archaebactéries et eucaryotes)^[16].

L'ion Zn^{2+} y est tétracoordonné en géométrie tétraédrique par des cystéines et des histidines. La formule générale de ces sites est $Zn(Cys)_{4-x}(His)_x$ (avec $x= 0, 1$ ou 2), ce qui veut dire qu'il y a trois formules possibles de sites doigt de zinc (Schéma i.5). Puisque le zinc est ici chargé $2+$, que les imidazoles sont neutres et que les cystéinates sont chargés $1-$, ces trois formules correspondent à des complexes de charges différentes (Schéma i.5).

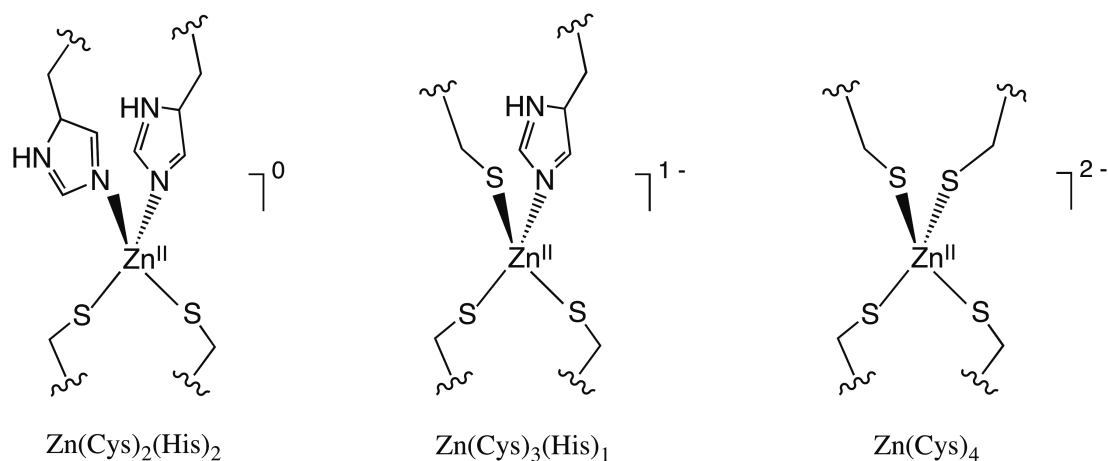


Schéma i.5 : Sphère de coordination de Zn^{2+} pour les trois formules de sites doigt de zinc.

Les premières classifications de doigts de zinc se sont uniquement basées sur les ligands du zinc et leur géométrie, c'est à dire uniquement sur la première sphère de coordination. Cependant, cela conduit à regrouper des sites de structures et de fonctions très différentes. Les classifications récentes de doigts de zinc se basent sur les éléments de structure auxquels appartiennent les ligands du zinc^[16,17]. Autrement dit, les sites sont classés en fonction du repliement de la chaîne principale autour du zinc.

Les repliements les plus répandus sont les repliements *clé de sol* (*treble clef*, en anglais), $\beta\beta\alpha$ classique et *zinc ribbon*. (Figure i.4) Les doigts de zinc *clé de sol* et $\beta\beta\alpha$ classique sont constitués d'une épingle β et d'une hélice α , chacun portant une paire de ligands du zinc. Cependant, alors que ces deux éléments forment un angle dans les doigts de zinc *clé de sol*, ils sont parallèles dans le cas des doigts de zinc $\beta\beta\alpha$ classique. Le repliement *zinc ribbon* est constitué de deux épingles β , dont les plans sont parallèles et dont les directions forment un angle de 90° . Chacune des épingles porte une paire de ligands du zinc. Le repliement *loosened zinc ribbon* est une variante du *zinc ribbon* (Figure i.4.D). Il correspond à un *zinc ribbon* ayant perdu une épingle : remplacée par un fragment étendu, sans structure canonique. Ce repliement est très peu fréquent.^[16]

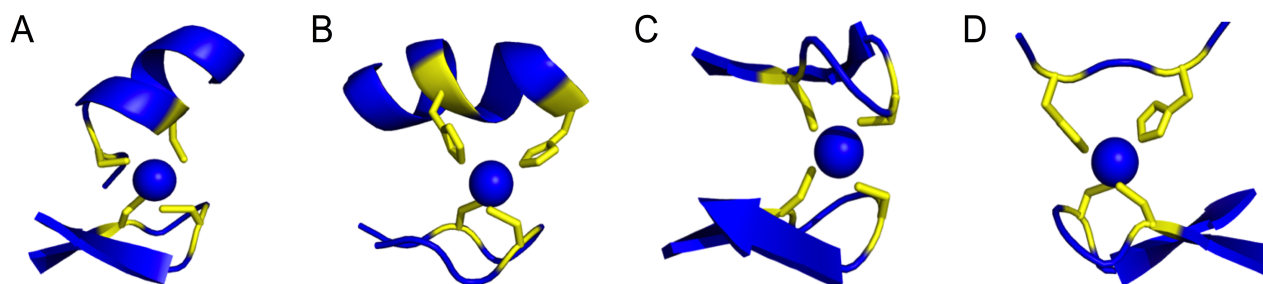


Figure i.4 : Les repliements courants de doigts de zinc : *clé de sol* (A), $\beta\beta\alpha$ classique (B), *zinc ribbon* (C) et *loosened zinc ribbon* (D). (images de Andreini et coll.^[16])

Ces différents repliements ne favorisent pas les mêmes types de site: tandis que les $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$ sont très fréquents dans les repliements $\beta\beta\alpha$ classiques, les repliements *zinc ribbon* et les *clé de sol* accommodent le plus souvent associés à des sites $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. Ceci est dû au fait que certains motifs d'acides aminés, lorsqu'ils sont liés au zinc, adoptent une conformation préférentielle (épingle β , hélice α , etc...). Par exemple un motif CXXC lié au zinc a tendance à former une boucle similaire à celle des épingles β alors qu'un motif HXXXH favorise la formation d'une hélice. Aussi, notons que dans les familles de doigts de zinc les plus répandues, deux cystéines d'une paire sont le plus souvent séparées par deux acides aminés. La famille qui fait exception est celle des *loosened zinc ribbons*. Dans cette famille, les deux ligands du zinc portés par le fragment étendu sont espacés d'un seul acide aminé (~80% des cas). Rappelons que ce repliement est peu fréquent.^[16] Le nombre d'acides aminés séparant deux ligands du zinc est important pour le repliement, comme le montre la différence entre les sites *zinc ribbon* et *loosened zinc ribbon*, mais aussi pour la réactivité, comme nous le verrons dans le Chapitre A.

Ainsi, même si un repliement accommode des sites de différentes formules, il y a tout de même une certaine corrélation formule-repliement.

Les doigts de zinc assurent un rôle structural essentiel pour de nombreuses protéines. Néanmoins, dans certains cas, les cystéines de ces sites peuvent aussi avoir un rôle réactif.

2.2. La réactivité de doigts de zinc est impliquée dans des processus biologiques

Dans la littérature émerge un autre rôle pour les doigts de zinc : un rôle réactif. En effet, les cystéines liées au zinc sont des nucléophiles qui peuvent potentiellement participer à des processus biologiques, comme c'est le cas des thiols libres.

L'une des premières protéines pour laquelle une telle réactivité a été démontrée dans un processus physiologique est la protéine Ada, caractérisée chez *Escherichia coli*^[18]. C'est un facteur de transcription impliqué dans la résistance au stress alkylant. Cette protéine possède un doigt de zinc à quatre cystéines dans son domaine N-terminal. Ce dernier est capable de réparer une alkylation de l'ADN.

La chaîne de l'ADN est constituée de nucléosides liés entre eux par des groupements phosphodiester. Ces derniers peuvent être alkylés lorsque les cellules sont exposées à des agents alkylants comme la N-méthyl,N-nitroso-urée.^[18] Par cette méthylation le groupement phosphodiester de l'ADN est ainsi modifié en méthyl phosphotriester. Ce type de modification

de modification est très toxique pour la cellule. L'exposition de *E. coli* à de petites doses d'agents alkylants induit une réponse adaptative qui lui permet de survivre à des doses habituellement mortelles. Cette adaptation est due à l'expression du régulon de résistance à la méthylation *ada*.^[19] Dans ce régulon, on trouve des enzymes de réparation des méthylations, comme AlkB, mais comprend aussi la protéine Ada.

Ada est une méthyltransférase : le groupement méthyl porté par le groupement phosphotriester est transféré sur le soufre d'un thiolate du site à zinc, ce qui forme une méthyl-cystéine et restaure le phosphodiester de l'ADN (Schéma i.6).

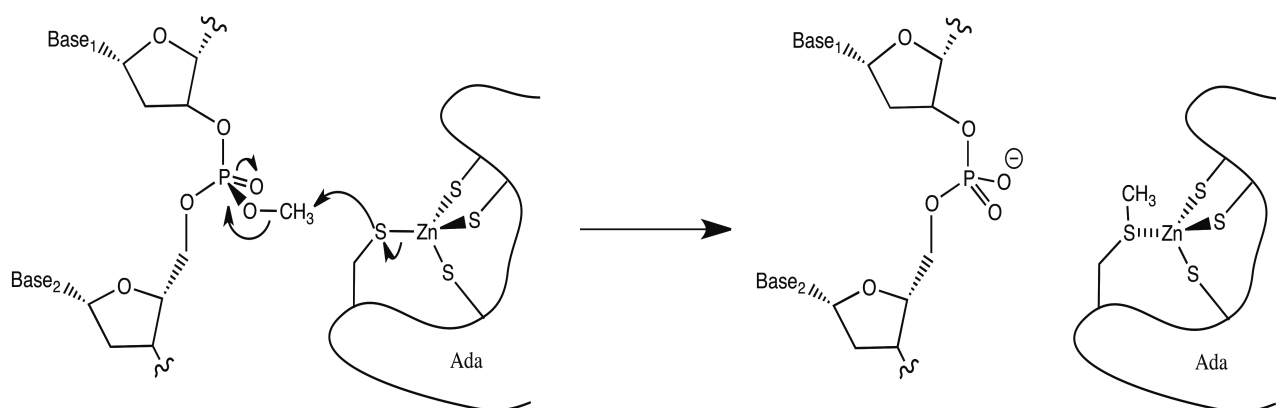


Schéma i.6 : Mécanisme du transfert de méthyl d'un phosphotriester sur un thiolate du site à zinc de Ada.

Ada a aussi une activité de déméthylation de la 6-méthoxy-guanosine, via une cystéine libre dans le domaine C-ter de la protéine^[18,19]. Cette activité ne sera pas décrite ici.

Ce mécanisme de réparation n'est pas catalytique : le site de Ada ne peut enlever qu'un groupement méthyl, la protéine Ada est donc décrite comme une méthyltransférase sacrificielle.^[18] La cystéine qui fait l'attaque nucléophile sur le méthyl du phosphotriester appelée la « cystéine active ». Durant plusieurs années, c'est la cystéine 69 qui était proposée dans ce rôle. Néanmoins, des données plus récentes^[19], basées sur des études RMN (signaux NOE), des études par spectrométrie de masse et une structure cristallographique d'un complexe ADN-Ada après réaction (Figure i.5), ont montré que c'est en fait la cystéine 38 qui réalise cette déméthylation.

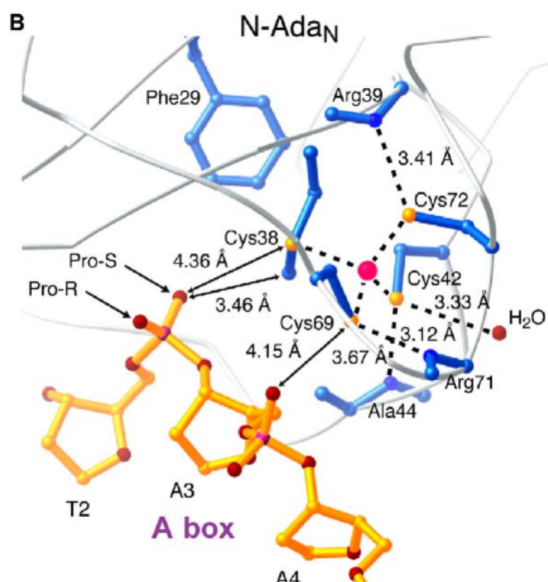


Figure i.5 : Structure cristallographique du complexe Ada-ADN après le transfert de méthyle. Les distances entre les chaînes latérales de Ada (bleu) proches de l'ADN (orange) sont indiquées. (Figure de He et coll.^[19])

Le site à zinc avec la cystéine 38 méthylée n'est plus capable de faire une deuxième déméthylation. Néanmoins, la méthylation du site à zinc de Ada a une conséquence très importante sur son interaction avec l'ADN. En effet, par rapport à sa forme initiale, Ada méthylée est 1000 fois plus spécifique pour les régions promotrices des gènes qu'elle contrôle^[20]. Ainsi, la méthylation de la cystéine 38 de Ada induit la transcription des gènes de réponse au stress alkylant (Figure i.6).

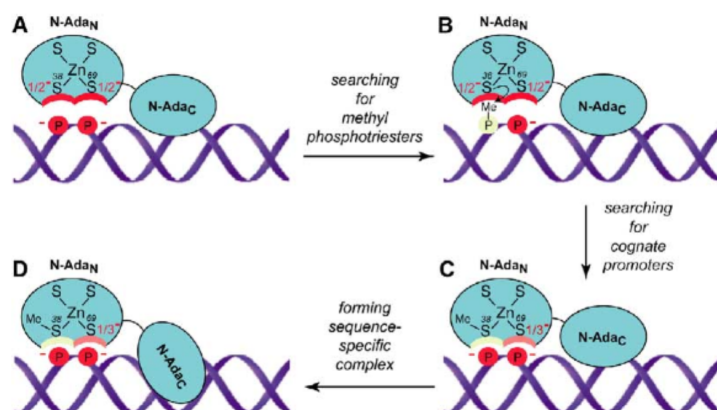


Figure i.6 : Activation de Ada par le transfert du groupement méthyle sur la cystéine 38. (A) Ada interagit avec l'ADN et se déplace le long de la chaîne, jusqu'à rencontrer un phosphotriester (B). Le méthyle est alors transféré sur le soufre de la cystéine 38. Ada se déplace sur l'ADN (C) et va se fixer sur le promoteur de l'un de ses 27 gènes cibles (dont fait partie son propre gène). (Figure de He et coll.^[19])

La nucléophilie des cystéines d'un doigt de zinc peut donc être utilisée par les protéines pour faire du transfert d'alkyl. Comme illustré ici, ceci permet de réparer des dommages à l'ADN, et surtout, d'induire l'expression d'une réponse génétique contre le stress

alkylant. De manière similaire, la réactivité des doigts de zinc peut aussi être utilisée pour détecter et signaler un autre stress : le stress oxydant.

Nous avons décrit plus haut des systèmes appelés interrupteurs rédox : l'activité est régulée par l'oxydation réversible des cystéines en disulfures. Étant donné que les doigts de zinc sont des sites structuraux (s'ils sont détruits, le domaine se déstructure) et qu'ils sont composés d'au moins deux cystéines, le concept d'interrupteur redox est donc transposable aux doigts de zinc (Schéma i.7).

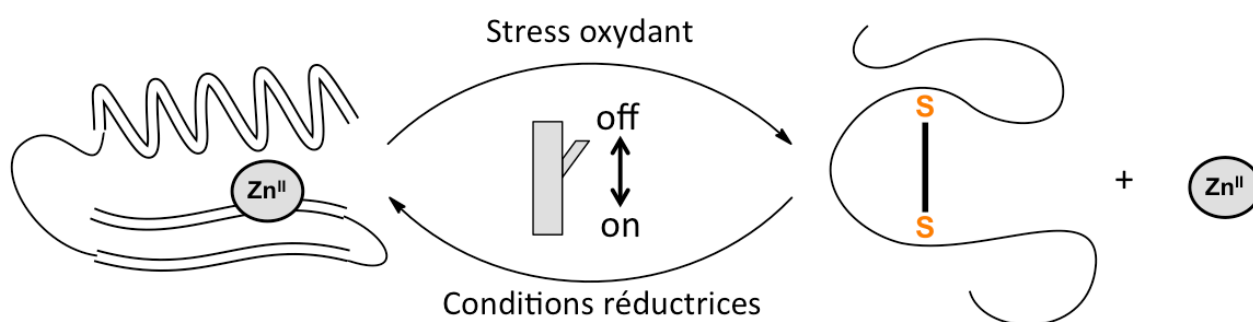


Schéma i.7 : Le concept d'interrupteur redox appliqué aux doigts de zinc.

Peu de doigts de zinc ont été décrits comme des interrupteurs rédox, et parmi eux, peu ont été étudiés en détail. L'un des exemples les mieux caractérisés est la protéine RsrA, un facteur anti-sigma.

Le facteur sigma R (σ^R) est un facteur de transcription extracytoplasmique, dont l'activation par une variation de l'environnement, conduit à l'expression de gènes cibles.^[21,22] Il est responsable de l'induction d'une réponse génétique contre le diamide, une molécule oxydant les thiols en disulfures. Parmi les gènes exprimés, on trouve des thioredoxines. Cependant, en absence de stress oxydant, σ^R est inhibé par son anti-facteur sigma, RsrA (Régulateur du facteur Sigma R). RsrA régule l'activité de σ^R en se liant directement à lui.^[21] Cette interaction empêche σ^R d'interagir avec l'ARN polymérase, donc, de promouvoir l'expression de ses gènes cibles. L'interaction entre RsrA et σ^R se fait principalement au niveau du domaine doigt de zinc. Ce site a zinc, de formule $\text{Zn}(\text{Cys})_3(\text{His})_1$ est oxydé par le diamide en disulfures, ce qui provoque le relargage du zinc et un changement structural, rompant l'interaction RsrA- σ^R . σ^R peut alors induire la réponse génétique contre ce stress (Schéma i.8)^[14]. Cependant, après retour en conditions réductrices, les disulfures de RsrA sont réduits, il peut alors reformer son site doigt de zinc et séquestrer à nouveau σ^R . (Schéma i.8)

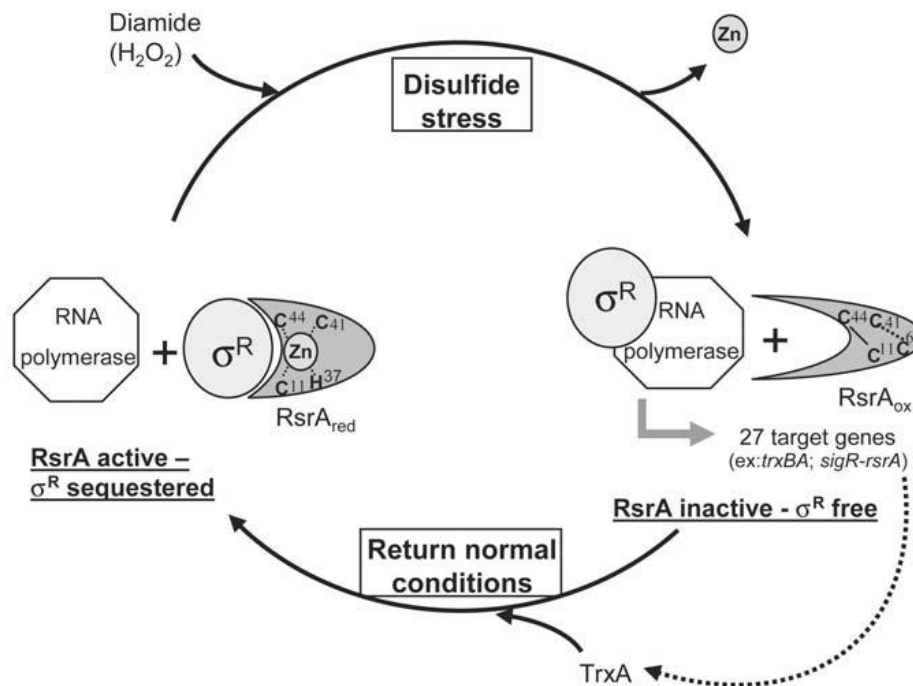


Schéma i.8 : Mécanisme de régulation du facteur sigma R par son anti-facteur sigma, RsrA. (extrait de Ilbert M. et al. [23]). Description dans le texte.

Ce système RsrA- σ^R a d'abord été découvert chez *Streptomyces coelicolor* mais est conservé chez les actinomycètes. De plus, des systèmes très proches sont présents chez les bactéries^[24], notamment le système ChrR- σ^E (*Rhodobacter sphaeroides*) qui est impliqué dans la réponse à l'oxygène singulet.

RsrA- σ^R et ChrR- σ^E seront décrits plus en détails au début du Chapitre B.IV.

Dans Ada et RsrA, la modification des cystéines du doigt de zinc déclenche l'expression d'une réponse génétique au stress ayant causé cette modification. La transmission du signal se fait via la modification d'une interaction impliquant la protéine à doigt de zinc.

En revanche, d'autres proposent que l'oxydation des doigts de zinc puisse déclencher une voie de signalisation, mais par un mécanisme moins direct. Ce mécanisme n'impliquerait plus la modification d'interactions que ce doigt de zinc avait avec une autre protéine (RsrA- σ^E) ou l'ADN (Ada-ADN), mais le zinc. En effet, ce signal serait déclenché par les ions Zn^{2+} libérés par l'oxydation des doigts de zinc : ce zinc irait inhiber le site actif de Protéine Tyrosine Phosphatases (PTPases) impliquées dans des voies de signalisation (Schéma i.9).^[25]

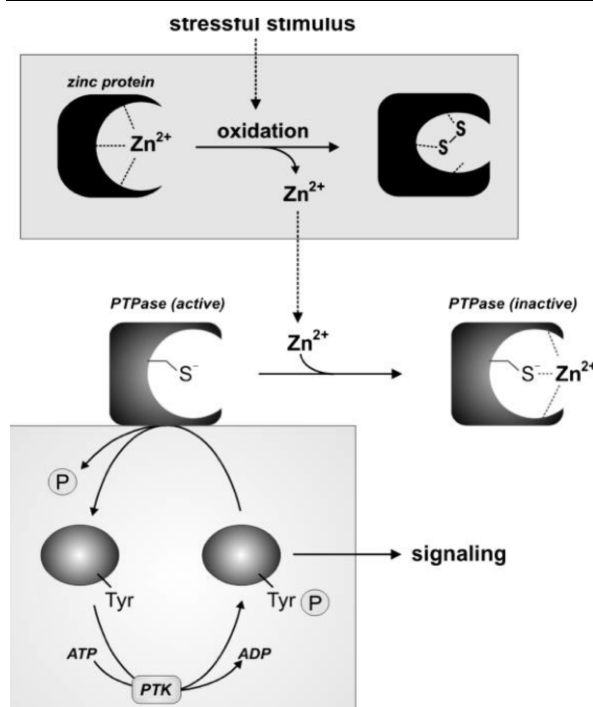


Schéma i.9 : Possible voie de signalisation déclenchée par le relargage de Zn^{2+} suite à l'oxydation de sites doigt de zinc, telle qu'illustrée par Kroncke et Klotz^[15].

Néanmoins, cette voie est assez peu probable : le site actif de la Protéine Tyrosine Phosphatase (PTPase) possède une cystéine libre déprotonée, et donc, très réactive vis-à-vis des oxydants. Ainsi, en présence d'un stress oxydant, cette cystéine est plus susceptible d'être oxydée que les cystéines des doigts de zinc. Alors, la voie de signalisation déclenchée par la perte d'activité PTPase ne reflèterait pas l'oxydation des doigts de zinc, mais celle du site actif de la PTPase.

Ainsi, les doigts de zinc, en tant qu'interrupteurs redox peuvent permettre de déclencher une voie de signalisation, afin d'induire une réponse contre un stress oxydant. Néanmoins, à côté de la signalisation, cette propriété d'interrupteur redox peut servir à déclencher autre chose que de la signalisation.

Ces exemples illustrent le déclenchement d'une voie de signalisation via l'oxydation d'un doigt de zinc. Un mécanisme similaire pourrait servir à activer directement une protéine. C'est le cas de la protéine Hsp33.

Cette protéine est impliquée dans la résistance bactérienne face au stress oxydant et au stress thermique. Elle possède un homologue dans quasiment tous les organismes procaryotes dont le génome a été séquencé, avec un motif conservé C-X-C-X₍₂₇₋₃₂₎-C-X₂-C

correspondant au domaine doigt de zinc.^[14] Elle est exprimée de manière constitutive, mais sa concentration peut doubler (jusqu'à 3 μ M) lors d'un stress thermique.^[26] De plus, la protéine n'est active que dans ces conditions de stress : c'est une chaperonne d'un type particulier, une holdase, qui se lie aux protéines en cours de déstructuration, et les empêche de s'agréger. Elle ne permet pas de replier une protéine qui s'est partiellement déstructurée, contrairement aux chaperonnes classiques. Ces dernières, comme le système DnaK/DnaJ/GrpE, consomment de l'ATP pour restructurer les protéines. L'activité de Hsp33 est indépendante de l'ATP. L'activité de ces deux types de chaperonnes est donc complémentaire : en condition de stress oxydant, la concentration d'ATP chute^[27], il n'est plus disponible pour les chaperonnes ATP-dépendantes. Elles ne peuvent plus empêcher que les protéines se déplient et s'agrègent. C'est justement dans ces conditions que Hsp33 est active. Lors de retour en conditions « normales » (réductrices), la concentration d'ATP augmente, et les protéines protégées par Hsp33 sont alors prises en charge par les chaperonnes ATP-dépendantes afin de leur rendre leur conformation native. De plus, le retour à ces conditions conduit à l'inactivation de Hsp33.

Ce passage entre la forme active et la forme inactive est contrôlé par l'état d'oxydation du site à zinc de Hsp33. En conditions normales, les cystéines sont réduites et liées au zinc. Lors d'un stress oxydant, l'oxydation des cystéines du site à zinc en disulfures conduit au relargage de Zn²⁺ et au dépliage du domaine C-terminal. Ce changement structural permet la formation de l'homo-dimère, la forme active de Hsp33. Lors du retour aux conditions normales, les disulfures précédemment formés sont réduits, ce qui permet aux cystéines de reformer le site doigt de zinc, remplaçant Hsp33 dans sa forme inactive. Hsp33 est donc un interrupteur redox.

Ces passages entre les formes actives et inactives de la protéine, ainsi que son travail de concert avec les chaperonnes ATP-dépendantes sont illustrées Schéma i.10.

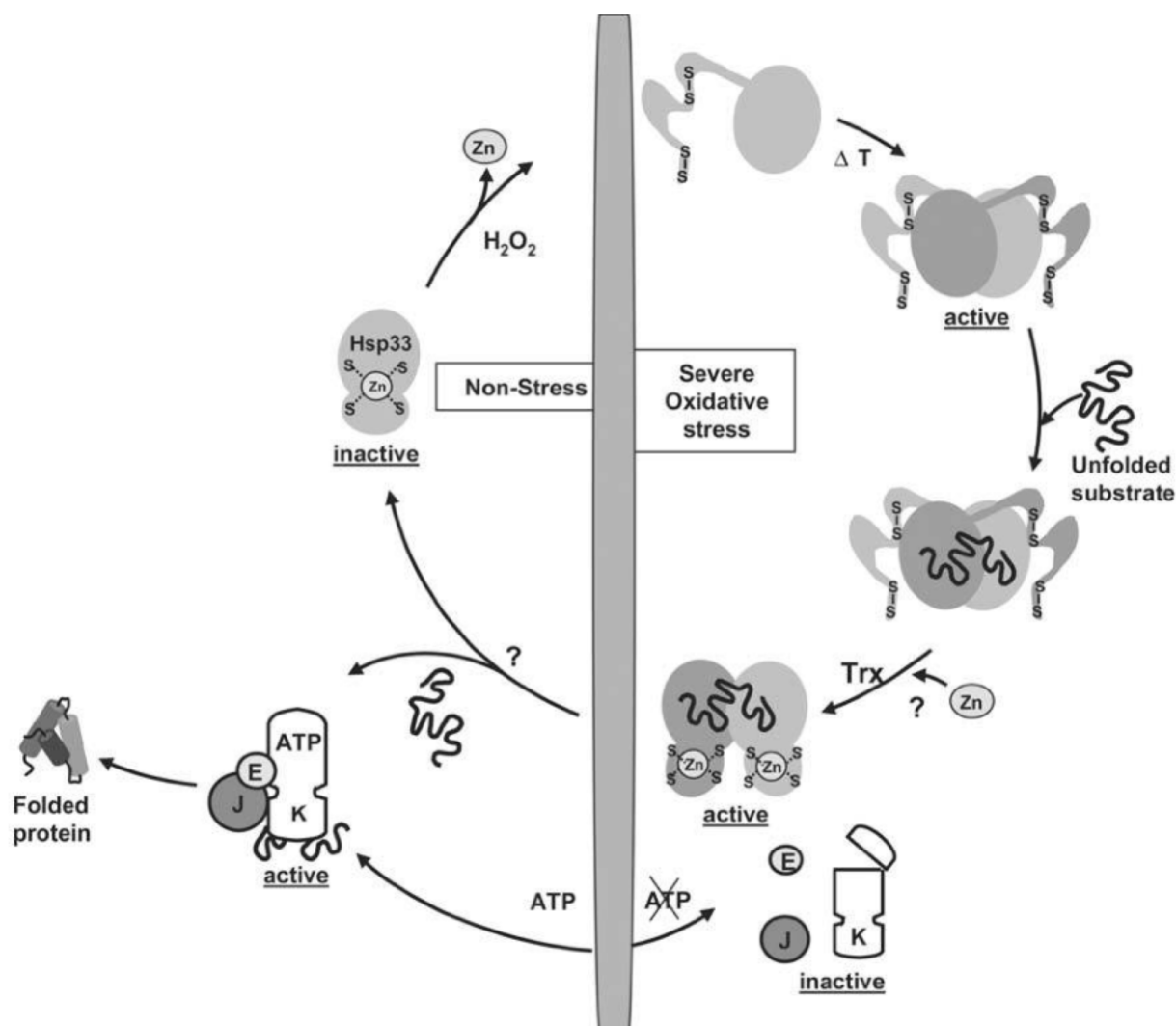


Schéma i.10 : Hsp33, une chaperonne qui protège les protéines de l'aggrégation en conditions de stress thermique et oxydant. Description dans le texte. (Figure de Ilbert et coll.^[14])

Lorsque Hsp33 a été caractérisée par l'équipe de Jakob comme un interrupteur rédox, l'oxydant proposé comme étant l'activateur physiologique était H_2O_2 .^[26] Plus tard, cette même équipe a montré que pour activer Hsp33 avec H_2O_2 , il est nécessaire que l'oxydation se fasse à température élevée.^[28] Enfin, cette équipe a montré que Hsp33 pouvait être activée par un faible excès de HOCl, très rapidement, et ce, quelle que soit la température.^[29] Cette équipe a également montré par des études *in vivo* que Hsp33 était nécessaire à la bactérie pour résister à HOCl.^[29] D'un point de vue biologique, on peut noter que HOCl seul conduit à l'agrégation des protéines, comme la combinaison du stress thermique et H_2O_2 .

La structure du site à zinc de Hsp33, ainsi que ce qui est connu de son oxydation, seront présentés en détails dans l'introduction du Chapitre A.

Ces exemples montrent bien que la réactivité des doigts de zinc peut être impliquées dans des processus biologiques, notamment la lutte contre le stress oxydant. Cependant, on peut remarquer que ces exemples sont peu nombreux au regard de la grande quantité de

protéines possédant un site doigt de zinc. On peut se demander alors : pourquoi ces doigts de zinc sont réactifs, et pas les autres ? Quels sont les facteurs qui contrôlent, modulent, la réactivité de ces sites ?

Pour répondre à ces questions, et donc, mieux comprendre la réactivité des doigts de zinc, plusieurs études, avec des approches différentes, ont été menées. Le paragraphe suivant a pour but d'en présenter les informations principales.

2.3. Vers une rationalisation de la réactivité des doigts de zinc

La réactivité des doigts de zinc est basée sur la nucléophilie des thiolates liés à l'ion Zn^{II} . Les premières études qui ont cherché à comprendre le mécanisme de la réaction et à déterminer les paramètres qui l'influencent se sont d'abord basées sur la réaction d'alkylation de thiolates dans des complexes inorganiques. L'équipe de Lippard a utilisé un complexe tétra-phénylthiolate de Zn^{II} pour mimer la réaction de transfert d'alkyl de Ada (Schéma i.11).^[30,31]

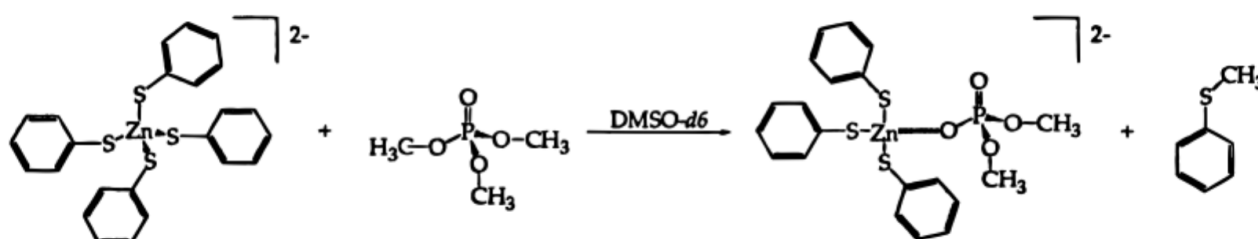


Schéma i.11 : Mécanisme de la réaction étudiée par l'équipe de Lippard pour le transfert de méthyle depuis un phosphotriester sur un thiolate lié au zinc. (Wilker et coll.^[31])

Deux autres complexes ont été préparés, où un et deux thiolates ont été remplacés par des groupements méthylimidazole. La vitesse du transfert d'alkyl a été mesurée avec trois complexes. Il en ressort une tendance : la vitesse croît avec le nombre de thiolates coordonnés $k(\text{ZnS}_4) > k(\text{ZnS}_3\text{N}) > k(\text{ZnS}_2\text{N}_2)$.^[30] Le complexe ZnS_4 réagit ~ 10 fois plus vite que ZnS_3N et plus de 1000 fois plus vite que ZnS_2N_2 . De plus, le thiolate libre réagit aussi vite que le complexe (ZnS_4) .^[30] Cela explique que le site de Ada possédant une activité méthyltransférase est de formule $\text{Zn}(\text{Cys})_4$, et non $\text{Zn}(\text{Cys})_3(\text{His})$ ou $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$.^[30] De plus, ce modèle a permis d'étudier le mécanisme de la réaction : leurs résultats montrent que la réaction s'opère selon un mécanisme dissociatif.^[31]

Par la suite, d'autres alkylations ont été étudiées avec de nombreux complexes différents, dont des complexes contenant un ligand de type tripode de type scorpionate.^{[32][33]} Ces études ont confirmé la tendance de réactivité $k(\text{ZnS}_4) > k(\text{ZnS}_3\text{N}) > k(\text{ZnS}_2\text{N}_2)$.^[32]

Nous n'irons pas dans le détail de chaque étude, mais nous contenterons de présenter les principales avancées qu'ont permis ces complexes avec un ligand tripode. D'abord, l'équipe de Frison s'est intéressée à la réactivité des sites doigt de zinc par des calculs théoriques. Ils ont étudié une série de complexes et leur réaction d'alkylation pour comprendre comment la nucléophilie d'un thiolate lié au zinc est affectée par la nature des trois autres ligands du zinc (Schéma i.12).^[34-36]

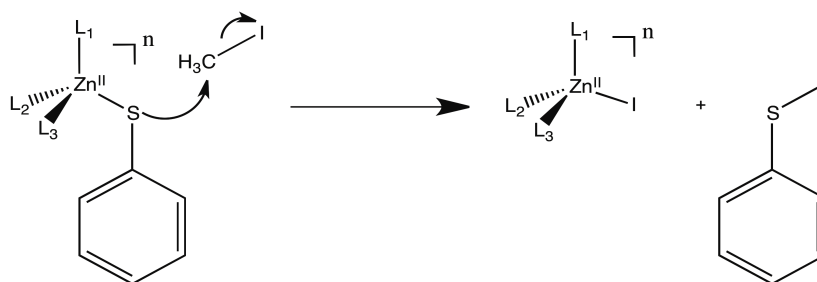


Schéma i.12 : L'attaque nucléophile du thiphénolate lié au zinc sur l'iodure de méthyle est influencée par la nature des ligands L_1 , L_2 et L_3 .

La barrière d'énergie libre (ΔG) de cette réaction (Schéma i.12) a été calculée pour 16 complexes différents, dont les ligands sont soit liés au zinc par un soufre (thioimidazole, alkylthiolate, thioéther), soit par un azote (pyrazole). Les résultats de cette étude montrent que la nature des atomes liés au zinc ne suffit pas à décrire la nucléophilie du complexe. Par exemple, la barrière énergétique peut être plus faible pour un complexe ZnN_2S_2 que pour un complexe ZnNS_3 ou un ZnS_4 . Ainsi, la tendance de réactivité $\text{ZnS}_4 > \text{ZnS}_3\text{N} > \text{ZS}_2\text{N}_2$ n'est pas une règle stricte, et qu'il y a d'autres facteurs qui influencent la nucléophilie du complexe.

D'abord, cette nucléophilie dépend de la charge globale du complexe. Plus ce complexe est chargé négativement, plus il est réactif. Ensuite la nature du ligand est importante. Les auteurs ont ainsi pu classer les ligands selon une échelle : de ceux qui induisent les complexes les plus nucléophiles à ceux qui induisent des complexes peu nucléophiles (Figure i.7)

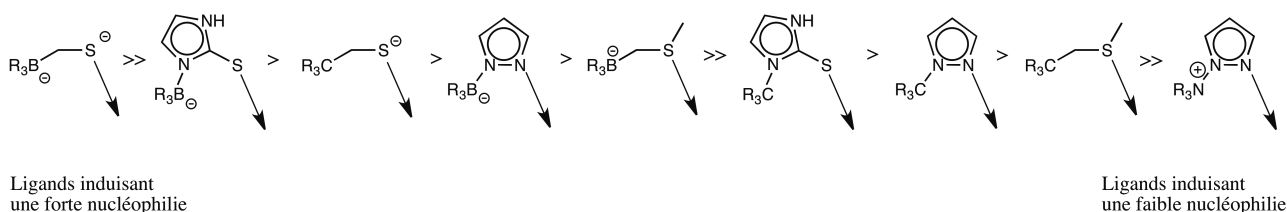


Figure i.7 : Classement des ligands (L_1 , L_2 L_3) selon un échelle d'induction de nucléophilie du thiolate lié au zinc.^[36]

Ainsi, plus un ligand est électro-donneur, plus le thiolate lié sera nucléophile : la charge partielle du zinc est abaissée, ce qui conduit le thiolate « d'intérêt » à donner moins de densité électronique au zinc, et donc, d'être plus nucléophile.

Smith et coll. ont publié la première mesure de l'effet d'une liaison hydrogène, impliquant le soufre lié au zinc, sur la réactivité de ce thiolate.^[33] Ces résultats ont été confirmés par Rheingold et coll. très peu de temps après.^[37]

Le complexe utilisé est proche de celui schématisé Schéma i.12, avec L_1, L_2, L_3 = ligand scorpionate (N_2O) et un thiophénolate avec un groupement *ortho*-N-Acétyl. Il s'établit une liaison H entre l'azote et le soufre. Ainsi, la comparaison entre ce complexe et celui contenant un simple phénylthiolate permet de mesurer l'effet de la liaison sur la vitesse d'alkylation du thiolate par l'iodure de méthyle. Ces mesures ont été faites avec deux ligands scorpionate différents, dans l'acétonitrile et le chloroforme. La vitesse d'alkylation est diminuée jusqu'à de 5 à 200 fois par la présence de la liaison hydrogène.^[33]

Il avait déjà été suggéré que les liaisons hydrogène diminuent la réactivité des thiolates de doigts de zinc, et que cela pourrait expliquer que, pour la protéine Ada, c'est la cystéine 38 qui n'est pas impliquée dans une liaison H qui est active, et pas les autres. Néanmoins, cela n'avait jamais été prouvé. Cette étude de Smith et coll. en apporte une preuve expérimentale, mais surtout, plus généralement, elle montre que la reproduction des liaisons hydrogène d'un site doigt de zinc est importante pour la modélisation de leur réactivité.

Ces études ont mesuré la nucléophilie à travers des réactions d'alkylation, néanmoins, cela peut se faire au travers de réaction d'oxydation. En ce sens, la réaction la plus étudiée est l'oxydation par H_2O_2 , car elle est simple et est pertinente d'un point de vue biologique.

L'oxydation d'un thiolate par H_2O_2 conduit à la formation d'un acide sulfénique. Ce dernier réagit très rapidement avec les thiols/thiolates à proximité pour former un pont disulfure et libérer un anion hydroxyde (Schéma i.13). Néanmoins, cet acide sulfénique peut se déprotonner, pour former un sulfénate. Ce dernier est un nucléophile, capable d'attaquer une molécule de H_2O_2 conduisant à la formation d'un sulfinate.^[38,39]

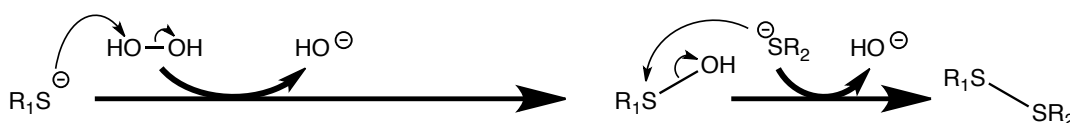


Schéma i.13 : L'oxydation d'un thiolate par H_2O_2 forme un acide sulfénique, qui réagit rapidement avec un second thiolate pour former un disulfure.

Enescu et collaborateurs ont modélisé l'oxydation de sites de doigts de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{S}^-)_x(\text{Im})_y$ par H_2O_2 à l'aide de calculs DFT.^[40] Ils ont montré que l'énergie d'activation pour la réaction augmente quand le nombre de thiolates liés au zinc diminue (16.0, 20.0 et 20.9 kcal.mol⁻¹ pour les sites ZnS_4 , ZnNS_3 et ZnN_2S_2 , respectivement. Leurs calculs montrent que le mécanisme est de type associatif. Un élément très important qui ressort de leurs calculs est que la barrière d'activation pour la réaction d'un thiolate sur l'acide sulfénique est quasiment nulle (≤ 1 kcal.mol⁻¹), prédisant une réaction extrêmement rapide (de l'ordre de la vitesse de diffusion).

Artaud et collaborateurs ont étudié l'oxydation de complexes modèles de doigts de zinc de type ZnN_2S_2 où les donneurs azotés sont des amines secondaires, des imines ou des amidates.^[41] L'exposition de ces complexes à H_2O_2 produit des espèces bis-sulfonates. Pour la plupart, ces ligands oxydés ne sont plus capables de lier le zinc. Il faut noter que ces réactions ont été étudiées en solvant organique (DMF anhydre), ce qui peut conduire à une réactivité différente de celle observée avec des protéines et expliquer que des sulfonates sont obtenus au lieu de disulfures.

Il existe des études menées directement avec les protéines. Les résultats obtenus sont donc plus facilement extrapolables à ce qui peut se passer en conditions biologiques. De plus, ces études permettent de relier l'oxydation d'un site à son effet biologique : la modification de la structure et/ou de l'activité biologique.

Par exemple, l'équipe de Michel a étudié l'oxydation de ZIF268 par H_2O_2 et O_2 .^[42] ZIF268 est un facteur de croissance utilisé ici comme un archétype de motif doigt $\beta\beta\alpha$ classique $((\text{Cys})_2(\text{His})_2)$. En effet, dans sa séquence, on retrouve un motif $\beta\beta\alpha$ classique répété trois fois.

Lorsque les trois sites à zinc sont occupés par Zn^{2+} , la protéine se lie à sa séquence cible d'ADN (Figure i.8). Ceci est aussi observé si l'ion Zn^{2+} est substitué par Fe^{2+} . L'exposition de ce complexe à H_2O_2 conduit à l'oxydation rapide des cystéines des doigts de zinc, à l'expulsion de l'ion métallique et à la rupture de l'interaction ZIF268-ADN.

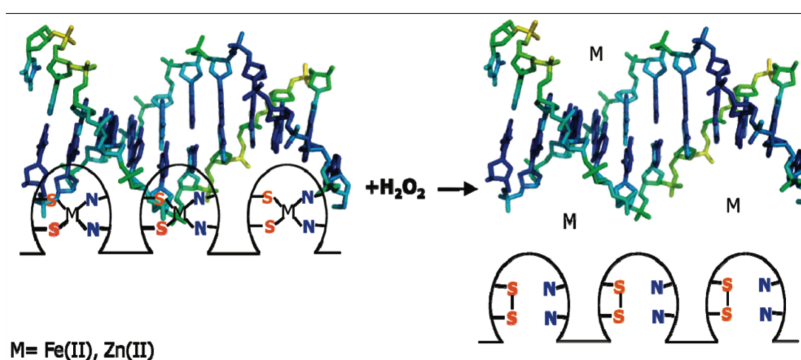


Figure i.8 : L'oxydation de ZIF268 complexé à l'ADN par H_2O_2 conduit à la rupture du complexe protéine-ADN, via l'oxydation des cystéines du site à zinc. (Figure de Lee et coll.^[42])

Parallèlement, cette équipe s'est aussi intéressée à la substitution du zinc par un autre métal. La protéine TTP (tris-tetraproline), qui fixe des ARN riches en adényle et uracyle, possède deux sites doigt de zinc $(Cys)_3(His)_1$. Elle est oxydée plus rapidement (par H_2O_2 et O_2) lorsqu'elle est métallée avec Fe^{2+} qu'avec Zn^{2+} .^[43]

Il est intéressant de noter que, dans leurs conditions, les auteurs observent que les sites de la TTP sont oxydés plus lentement que ceux de ZIF268.^[42] Ceci contraste avec la tendance généralement observée concernant la plus grande réactivité des sites $Zn(Cys)_3(His)_1$ par rapport aux sites $Zn(Cys)_2(His)_2$. Néanmoins, l'équipe de Michel utilise un protocole compliqué pour évaluer la fraction de peptide oxydé. Après un certain temps de réaction entre la protéine et un excès H_2O_2 , le milieu réactionnel est acidifié par HCl (1 M), purifié par HPLC, métallé avec Co^{2+} et comparé par absorption UV-Vis à un échantillon réduit. Nous nous demandons s'il ne peut pas y avoir des oxydations parasites (par O_2 catalysée par Co^{2+} ou par HOCl généré par H_2O_2 en milieu HCl) qui interféreraient. L'équipe de Michel nous a récemment envoyé la protéine TTP pour mesurer les cinétiques d'oxydation par H_2O_2 avec les méthodes mises au point au laboratoire (voir plus bas).

Une autre limitation de ce système est qu'on ne peut mesurer que la quantité globale de sites oxydés. On ne peut savoir si cela correspond à des protéines totalement oxydées et des protéines totalement réduites, ou seulement des protéines partiellement oxydées.

Il y a donc des inconvénients à travailler avec des protéines entières :

- la production et la purification peuvent être longues et difficiles
- problèmes de solubilité (précipitation)
- conditions restreintes (nature du tampon et des sels, température, pH, etc)
- séparation et quantification des produits d'oxydation difficiles
- dans certains cas, plusieurs sites métalliques sont présents dans une protéine, ce qui complique les études spectroscopiques.

Les complexes peptidiques représentent un compromis entre les complexes inorganiques classiques, simples mais peu proches des doigts de zinc, et les protéines qui sont les véritables objets d'intérêt, mais qui sont difficiles à étudier. En effet, l'utilisation de peptides modèles permet de reproduire la structure de la chaîne principale ainsi que la première et la seconde sphères de coordination du Zn^{2+} du site doigt de zinc mimé. De plus, ils sont solubles dans l'eau, et robustes aux conditions expérimentales. Leur taille modeste (une vingtaine d'acides aminés) permet des caractérisations détaillées et rapides.

Puisque la seconde sphère de coordination dépend de la structure de la chaîne principale, un peptide modèle ne peut reproduire la réactivité que d'une famille de doigts de zinc. Il faut donc développer une gamme de peptides afin de modéliser correctement les différentes familles de doigt de zinc.

Le premier complexe peptidique modélisant un doigt de zinc a été conçu par l'équipe de Berg^[44]. Ce peptide, appelé CP1, reproduit la structure des doigts de zinc $\beta\beta\alpha$ classiques. Sa séquence est issue de l'alignement de toutes les séquences de $\beta\beta\alpha$ connues à l'époque. À chaque position, l'acide aminé le plus fréquemment rencontré a été introduit. Ce peptide CP1 est un parfait modèle de site $\beta\beta\alpha$ classique.

L'équipe de Wilcox a étudié la réactivité d'un peptide très proche vis-à-vis de H_2O_2 et O_2 .^[45] Cette étude a montré que la complexation du zinc par le peptide protège fortement les cystéines de l'oxydation par O_2 : seulement 5% de complexe oxydé après 24h de réaction (bullage de O_2 dans une solution de complexe à $66\mu\text{M}$). Dans les mêmes conditions, le peptide libre est totalement oxydé. Que ce soit avec O_2 ou H_2O_2 , l'oxydation du complexe de zinc conduit uniquement à la formation de disulfure, contrairement au complexe de Ni^{II} , qui conduit à un mélange de disulfure et de thiosulfinate. En plus de favoriser la formation de thiosulfinate, le complexe de Ni^{II} s'oxyde aussi plus rapidement que le complexe de Zn^{II} . Cette réactivité plus grande d'un complexe de Ni^{II} comparé à son équivalent de Zn^{II} a aussi été observé pour l'alkylation d'un autre complexe inorganique.^[46]

Au laboratoire, avant le début de cette thèse, la réactivité de trois modèles peptidiques vis-à-vis de H_2O_2 avait été étudiée^[38,47]. Ces modèles sont ZnCP1 , ZnL_{TC} et ZnL_{Hsp} (Figure i.9). ZnL_{TC} est un modèle de site *clé de sol*, et a été conçu d'après celui de la protéine PerR.^[48] Quant à ZnL_{Hsp} , c'est un modèle du site à zinc de Hsp33.^[49]

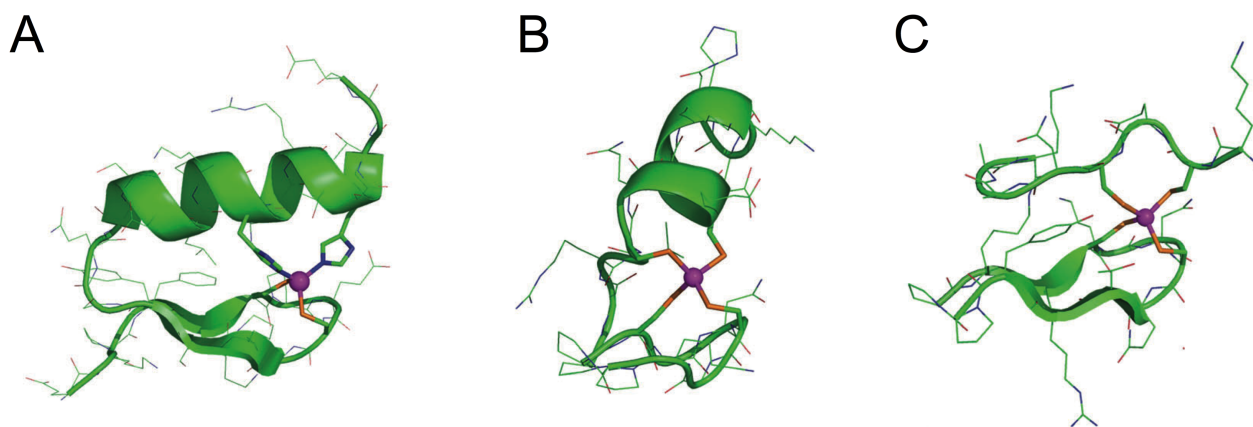


Figure i.9 : Modèles disponibles au laboratoire au début de cette thèse : ZnCP1 (A), ZnL_{TC} (B) et ZnL_{Hsp} (C).

Lorsque ces complexes peptidiques sont oxydés, à pH 7, par H₂O₂ ou O₂, il ne se forme que des espèces disulfures. De plus, les mesures cinétiques confirment le rôle protecteur du zinc : les formes libres de L_{TC} et L_{Hsp} sont oxydées 20 à 60 fois plus vite par H₂O₂ que leur complexe de zinc.^[38]

Au niveau du mécanisme réactionnel, les études cinétiques ont confirmé que l'oxydation d'un doigt de zinc à quatre cystéines par H₂O₂ se fait de manière séquentielle (Schéma i.14) : une première molécule de H₂O₂ oxyde le site à zinc pour former une espèce mono-disulfure, selon un mécanisme similaire à celui décrit plus haut pour les thiols libres. L'un des deux cystéinates restant attaque une seconde molécule de H₂O₂, formant le deuxième pont disulfure. L'espèce finale est une espèce bis-disulfure. Cette dernière espèce n'est plus capable d'interagir avec Zn²⁺.

Notons que dans le cas d'un modèle de type Zn(Cys)₂(His)₂, il n'y a qu'une seule étape d'oxydation.

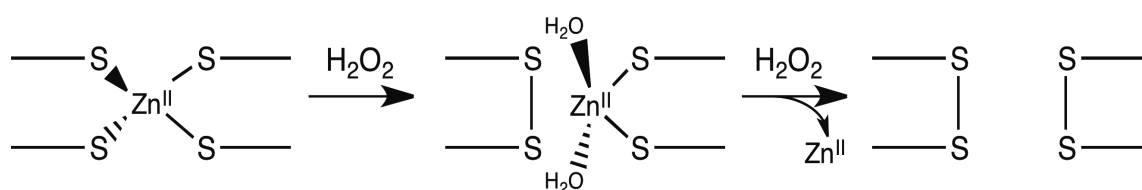


Schéma i.14 : Oxydation séquentielle d'un site à quatre cystéines par H₂O₂. Le site à zinc est d'abord oxydé en un mono-disulfure, puis en un bis-disulfure.

L'intermédiaire mono-disulfure, est présenté de manière simplifiée dans le Schéma i.14. Ce peptide est fait en équilibre entre trois formes en solution, comme représenté dans le Schéma i.15.

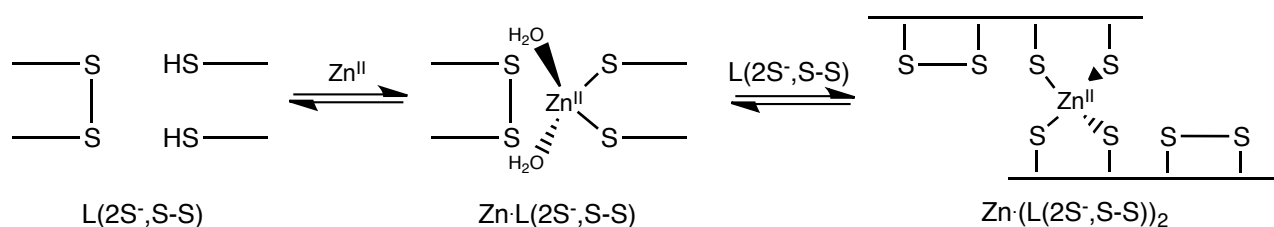


Schéma i.15 : En présence de zinc, l'intermédiaire mono-disulfure de L(2S⁻,S-S), est en équilibre entre plusieurs formes.

Pour chacune de ces deux oxydations, l'étape cinétiquement déterminante est l'attaque du thiolate sur l'oxydant (HOCl ou H₂O₂), c'est à dire, la formation de l'acide sulfénique. En effet, comme nous l'avons mentionné, l'étape suivante est extrêmement rapide : lorsqu'un acide sulfénique formé dans un site doigt de zinc réagit avec un thiolate avec une barrière énergétique quasi-nulle.^[40]

Dans les trois formes de mono-disulfure (Schéma i.15), les cystéinates n'ont pas la même réactivité (liaison au Zn²⁺, accessibilité, environnement). Cela peut poser problème pour les études cinétiques : si la première étape d'oxydation (passage du complexe réduit au mono-disulfure) n'est pas cinétiquement déterminante, alors, le suivi cinétique de la réaction sera la résultante des deux étapes d'oxydation. Or, puisque les différentes formes de mono-disulfure sont en équilibre en solution (Schéma i.15) et que chacune peut s'oxyder à une vitesse différente, le modèle cinétique devient trop complexe pour être simulé. Un moyen de contourner ce problème est d'utiliser un complexant du zinc, avec une affinité pour Zn²⁺ beaucoup plus faible que celle du peptide réduite, mais plus forte que celle du mono-disulfure. C'est le cas de l'EGTA. Ainsi, le mono-disulfure généré par la première étape d'oxydation se retrouve entièrement libre, et, puisque le peptide libre s'oxyde plus vite que le complexe, la première étape devient cinétiquement déterminante. Ceci permet d'avoir une d'oxydation qui peut être décrite par un modèle cinétique simple.^[38]

Les vitesses d'oxydation des modèles par H₂O₂ ont ainsi été obtenues (Tableau i.1). En plus des modèles « natifs » présentés, des mutants ont été utilisés. C'est la première sphère de coordination qui varie d'un mutant à l'autre. Ainsi, ces mutants, où le nombre de cystéines et d'histidines autour du zinc varie, permettent d'étudier l'effet de l'augmentation du nombre de cystéines autour du zinc pour un même repliement.^[47]

Peptide	Formule du site	k (M ⁻¹ .s ⁻¹) à 25°C
ZnCP1-Δ8	Zn(Cys) ₂ (His) ₂	0,029
ZnCP1	Zn(Cys) ₂ (His) ₂	0,0083
	Zn(Cys) ₃ (His) ₁	0,231
	Zn(Cys) ₄	1,45
ZnL _{Hsp}	Zn(Cys) ₂ (His) ₂	0,037
	Zn(Cys) ₃ (His) ₁ (2 mutants)	0,110-0,145
	Zn(Cys) ₄	0,107

ZnL _{Hsp} linéaire	Zn(Cys) ₄	0,384
ZnL _{TC}	Zn(Cys) ₄	0,23

Tableau i.1 : vitesses d'oxydation des modèles de doigts de zinc par H₂O₂. [47]

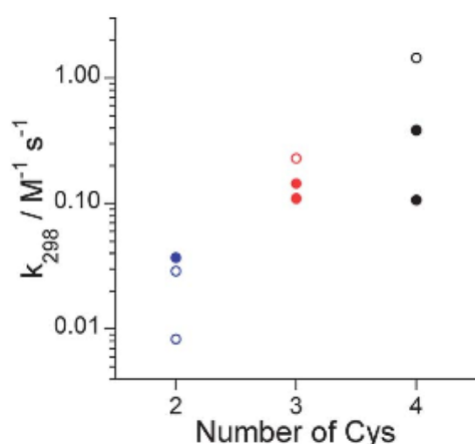


Figure i.10 : Vitesse d'oxydation des modèles de type ZnCP1 (cercle ouvert) et ZnL_{Hsp} (cercle plein) à 25°C, en fonction du nombre de cystéines dans la sphère de coordination du zinc : Zn(Cys)₂(His)₂ (bleu), Zn(Cys)₃(His)₁ (rouge) et Zn(Cys)₄ (noir).

Les constantes de vitesses mesurées à 298 K (Tableau i.1) montrent une tendance générale : la vitesse d'oxydation par H₂O₂ augmente avec le nombre de cystéines liées au zinc. Il y a cependant pour un même nombre de cystéines des variations importantes de cette vitesse et des sites à trois cystéines peuvent être oxydés plus rapidement que certains sites à quatre cystéines. L'étude des paramètres d'activation de la réaction montre que l'enthalpie d'activation est plus importante pour les sites Zn(Cys)₂(His)₂ ($\Delta H^\ddagger > 60$ kJ.mol⁻¹) que pour les sites Zn(Cys)₃(His) et Zn(Cys)₄ ($\Delta H^\ddagger < 55$ kJ.mol⁻¹). Pour tous ces sites, l'entropie d'activation est très défavorable. Elle varie cependant fortement en fonction des complexes. Les complexes qui ont l'entropie d'activation la moins défavorable sont ceux qui sont le moins bien structurés. La raison de ceci n'est pas évidente à déterminer. On peut envisager un rôle des

liaisons hydrogène avec les soufres (les structures des doigts de zinc ayant une conformation bien définie montrent autour des soufres l'existence d'un réseau de nombreuses liaisons hydrogène avec des NH du squelette peptidique ou des OH ou NH de chaînes latérales) et un effet des molécules d'eau qui solvatent le peptide (un peptide non structuré devra compenser le manque de liaisons hydrogènes intramoléculaires par des liaisons avec des molécules d'eau).

Il ressort des différentes études sur la réactivité des doigts de zinc que celle-ci est influencée par (i) le type de site, c'est-à-dire le nombre de thiolates liés au zinc, (ii) les liaisons hydrogène autour des soufres et (iii) l'accessibilité du site.^{[50][51]} Ces trois éléments sont directement liés au repliement que le peptide adopte autour du zinc. Il est donc important de développer des modèles ayant des repliements différents, et donc des caractéristiques différentes, pour mieux comprendre la réactivité des doigts de zinc. Nous mettrons cela en évidence à travers les résultats obtenus pendant cette thèse.

La principale conclusion des études menées au laboratoire sur plusieurs modèles de doigts de zinc, est que ceux-ci réagissent trop lentement avec H_2O_2 pour être des cibles de cet oxydant *in vivo*. En revanche, l'exemple de Hsp33 montre qu'il est possible que l'oxydation des doigts de zinc est possible en biologie, mais avec des oxydants plus puissants. C'est pourquoi nous nous tournons maintenant vers la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de HOCl et $^1\text{O}_2$.

3. L'acide hypochloreux

3.1. Généralités

Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'acide hypochloreux (HOCl) est généré à partir de H_2O_2 et Cl^- par les myéloperoxydases, selon le mécanisme schématisé ci-dessous (Schéma i.15). Les myéloperoxydases sont des protéines à fer hémique. Le mécanisme de production de HOCl à partir de H_2O_2 et Cl^- est représenté Schéma i.15. La forme Fe^{III} réagit avec H_2O_2 pour former une espèce à haut degré d'oxydation $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (composé I). Ce dernier oxyde un chlorure, ce qui donne ClO^- et régénère la protéine dans sa forme Fe^{III} de départ.

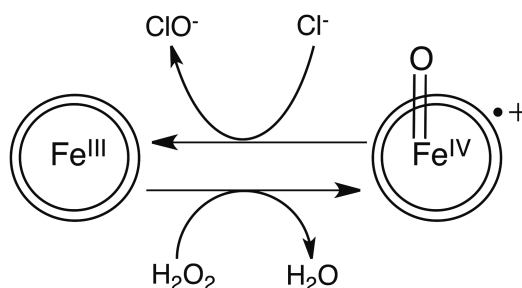


Schéma i.15 : Cycle catalytique de production de ClO^- à partir de Cl^- et H_2O_2 par la myéloperoxydase.

À côté de ces enzymes à fer, il existe aussi des chloro- et bromo- peroxydases à vanadium. [52] Nous ne les détaillerons pas ici.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'acide hypochloreux (HOCl) est considéré comme l'espèce ayant le plus fort effet bactéricide chez les cellules phagocytaires. Plusieurs éléments vont en ce sens.

D'abord, l'ion chlorure, nécessaire à la production de HOCl , joue un rôle important dans les neutrophiles. En effet, la concentration intracellulaire d'ions chlorures dans les neutrophiles au repos est grande : environ 80-100mM^[53] contre 4-60mM dans les autres cellules^[54]. Lorsque ces neutrophiles sont activés, cette concentration diminue d'environ 50% car ces ions sont excrétés vers le phagosome, à travers différents canaux (Schéma i.16)^[6]. La capacité de mobilisation des ions Cl^- par le phagosome est illustrée Schéma i.16. Le flux d'électrons généré par la NOX 2 est compensé par l'entrée passive de cations (H^+ et K^+). L'activation de la voie énergivore de H^+ (par la V-ATPase) viendrait compenser l'entrée massive d'ions Cl^- .

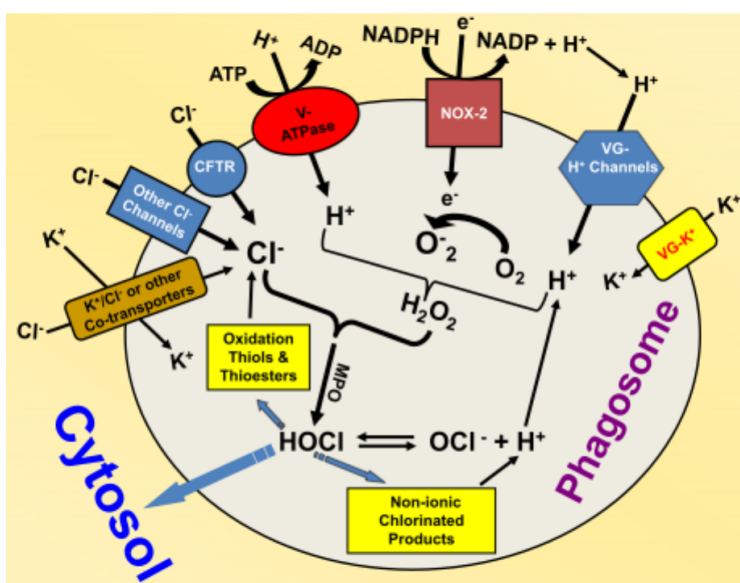


Schéma i.16 : Mobilisation des ions chlorures et leur utilisation par le phagosome des neutrophiles. (Schéma de Aiken et coll.^[6])

Ainsi, les neutrophiles assurent un approvisionnement important d'ions Cl^- aux phagosomes, ce qui leur permet de générer d'importantes quantités de HOCl grâce aux myéloperoxydases. Il a été calculé qu'au moins 12% de l'oxygène consommé par le neutrophile est converti en HOCl .^[4]

On estime que les myéloperoxydases représentent ~25% des protéines que le neutrophile exporte dans le phagosome.^[7]

Finalement, l'importance des myéloperoxydases est observable au niveau clinique : des neutrophiles isolés à partir du sang de patients déficients en myéloperoxydases, sont peu efficaces à tuer de nombreux micro-organismes. De plus, des neutrophiles de patients normaux, traités avec des inhibiteurs de myéloperoxydases, se montrent aussi moins efficaces dans la destruction de pathogènes.^[4]

Néanmoins, ces données *in vitro* doivent être relativisées : il semble que l'organisme soit capable de compenser une déficience en myéloperoxydase. En effet, des patients possédant une NOX fonctionnelle et une déficience en myéloperoxydases ne sont pas beaucoup plus victimes d'infections que ces individus sains.^[4]

3.2 Les cibles biologiques de HOCl

HOCl est capable d'oxyder de nombreuses bio-molécules, dont l'ADN. Néanmoins, du fait de leur abondance cellulaire et de leur rapidité de réaction avec HOCl , les cibles principales de cet oxydant sont les protéines et le glutathion. HOCl réagit principalement avec les soufres des cystéines et méthionines pour donner des disulfures S-S ou des produits oxygénés (sulfinates, sulfonates, sulfoxydes, etc), avec le noyau aromatique des tyrosines dans une réaction de chloration, ou avec des amines (de la chaîne latérale des lysines par exemple) pour donner des chloramines. Ces chloramines sont elles-mêmes des espèces oxydantes capables de réagir avec certains composants cellulaires comme les thiols des cystéines ou du glutathion. ^[5]

3.3. Des senseurs de HOCl à base de méthionine

Des protéines impliquées dans la détection de l'acide hypochloreux ont été identifiées ces dernières années : RclR^[55], NemR^[56] et HypT^[57].

HypT utilise la fonction thioéther des méthionines pour détecter HOCl . Ceci signifie qu'en milieu biologique, les méthionines figurent parmi les premières cibles de HOCl . On ne

connaît pas la vitesse d'oxydation de ces protéines par HOCl. Néanmoins, Armesto et collaborateurs ont montré que la méthionine libre est oxydée en sulfoxyde par HOCl à une vitesse de $k = 8,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.^[58] Cette vitesse est très grande et s'approche de la limite de diffusion.

Quant à RclR et NermR, elles utilisent des cystéines pour détecter HOCl.

3.4. Oxydation des thiols libres par HOCl

Le mécanisme d'oxydation d'un thiolate par l'acide hypochloreux est similaire à celui présenté pour H_2O_2 , mais présente une étape supplémentaire. Ce mécanisme a fait l'objet de controverses. Nous nous en tiendrons ici à la récente discussion de Nagy et Ashby^[39], à partir de leurs résultats sur l'oxydation de la cystéine. L'attaque nucléophile du thiolate se fait sur l'atome de chlore, pour donner un chlorure de sulfényle et un anion hydroxyde. Le chlorure de sulfényle ainsi formé, est très rapidement attaqué par un nucléophile. Dans un solvant aqueux, l'hydrolyse est immédiate^[39], ce qui libère un chlorure, et forme un acide sulfénique, qui peut alors donner un disulfure, comme dans le cas de l'oxydation par H_2O_2 (Schéma i.17).

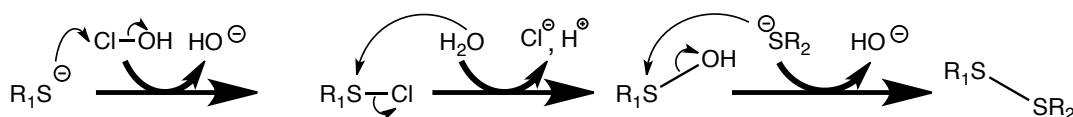


Schéma i.17 : Mécanisme d'oxydation d'un thiolate par HOCl.

Puisque l'hydrolyse du chlorure de sulfényle est très rapide (dans l'eau) et que la réaction de l'acide sulfénique avec un thiolate est limitée par la diffusion, l'étape cinétiquement déterminante est l'attaque du thiolate sur HOCl.

Armesto et collaborateurs ont mesuré par des méthodes directes (cinétique rapide) la vitesse de cette étape. Pour un cystéinate libre, elle est de $1,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.^[58] Cette valeur a été confirmée par l'équipe de Ashby.^[39]

3.4 Oxydation des sites doigt de zinc par HOCl

A ce jour, la seule mesure expérimentale de la vitesse d'oxydation par HOCl d'une protéine possédant un doigt de zinc est celle de l'alcool déshydrogénase. Elle a premièrement été mesurée en se servant de l'activité de la protéine comme indicateur de l'oxydation : k_2

$k_{ADH/HOCl} = 4.10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.^[59] Mais récemment, des mesures plus directes ont été réalisées en suivant la consommation d'un compétiteur : un dérivé de méthionine fluorescent. La vitesse ainsi déterminée est : $k_{2 ADH/HOCl} = 3,3 \pm 0,9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.^[60] Cependant, cette protéine possède deux sites à zinc : un site structural, de formule ZnCys_4 , et un site catalytique de formule $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_1(\text{H}_2\text{O})$. Bien que les auteurs attribuent cette vitesse à celle de l'oxydation du site catalytique, on ne peut en être certain : la constante cinétique mesurée correspond à la réaction de la protéine entière avec HOCl. On ne connaît pas les contributions de chaque site à zinc et des autres chaînes latérales oxydables (méthionines par exemple) de la protéine. De plus, d'après la composition des sites à zinc, 3 équivalents de NaOCl par monomère de ADH devraient suffire pour oxyder ces deux sites et conduire au relargage de 2 équivalents de Zn^{II} (par monomère). Or, dans ces conditions, les auteurs n'observent que 0,3 équivalent de zinc expulsé, ce qui indique que les sites à zinc de ADH ne sont pas les seules cibles primaires de HOCl, et donc, que la vitesse mesurée ne peut être attribuée uniquement à l'oxydation d'un site à zinc.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la protéine Hsp33 a récemment été décrite comme un senseur de HOCl.^[29] Cette protéine est essentielle pour que les bactéries résistent à un stress HOCl. Cependant, la vitesse d'oxydation de son site à zinc par HOCl demeure inconnue, et le mécanisme d'activation présente quelques zones d'ombres comme nous le verrons au Chapitre A.

Une autre protéine a été proposée comme étant activée par HOCl, sans l'être par H_2O_2 . Cette protéine est la Pro-Matrilysine MMP-7. Elle possède un site à zinc, qui n'est pas un doigt de zinc mais s'en rapproche, puisque sa formule est $\text{Zn}(\text{Cys})_1(\text{His})_3$. Il est proposé que la cystéine de ce site soit oxydée par HOCl en sulfinat. Sous cette forme oxydée la cystéine se décoordonne du zinc, permettant la protéolyse du fragment qui la contient, générant ainsi la forme active de la protéine avec un site $\text{Zn}(\text{His})_3(\text{H}_2\text{O})$ (Schéma i.18).^[61]

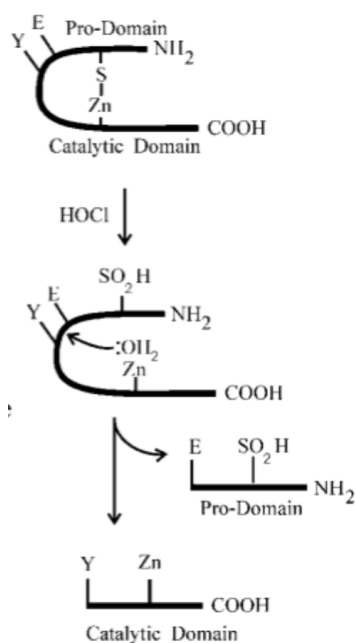


Schéma i.18 : Activation de la MMP-7 par HOCl (Figure de Fu et coll.^[61]). La cystéine du site à zinc est oxydée en acide sulfonique par deux molécules de HOCl. Cette cystéine oxydée ne coordonne plus le zinc.

Ainsi, dans l'hypothèse où un site doigt de zinc peut jouer le rôle de senseur de HOCl, comme c'est proposé pour Hsp33^[29], sa vitesse d'oxydation devrait être au moins aussi rapide que celle de la méthionine.

Le rôle biologique de HOCl a été mis en évidence ces dernières années. Cependant, les données moléculaires concernant sa réactivité vis-à-vis des protéines manquent cruellement pour mieux comprendre son implication dans les processus biologiques. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier en détail sa réactivité vis-à-vis des doigts de zinc, comme nous le verrons dans le Chapitre A.

4. L'oxygène singulet

Le dioxygène, aussi appelé oxygène moléculaire, possède une structure électronique particulière. En effet, alors que l'état singulet ($S=0$) est très courant, le dioxygène à l'état fondamental possède un spin triplet ($S=1$). Ceci est la raison pour laquelle le dioxygène, malgré un potentiel redox élevé, réagit lentement avec la plupart des molécules biologiques : ces réactions ne respectent pas la loi de Wigner de conservation de spin. Aussi, dans les réactions chimiques, le dioxygène se comporte comme une espèce radicalaire. Néanmoins, les

deux premiers états électroniques excités de O_2 , avec un spin singulet, sont relativement bas en énergie : à 94 et 157 kJ.mol^{-1} de l'état fondamental (Schéma i.19). Ces états sont facilement accessibles et sont produits en milieu biologique^[62]. De ces deux états excités, le plus bas en énergie, $^1\Delta_g$, est appelé communément oxygène singulet 1O_2 .

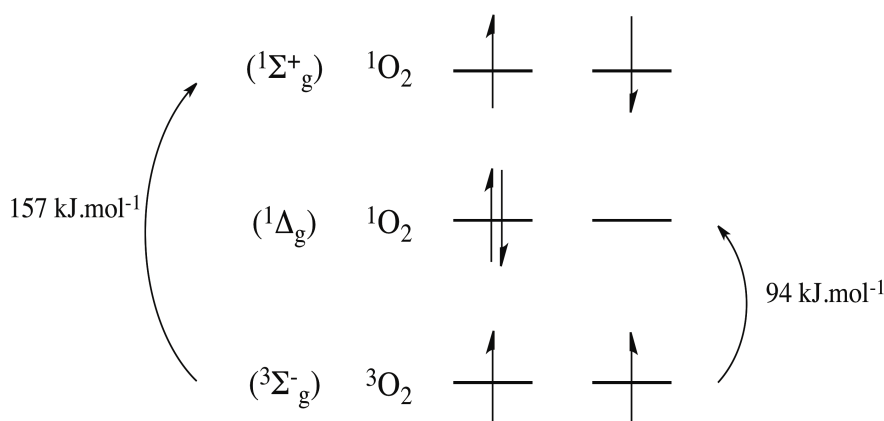


Schéma i.19 : Structures électroniques simplifiées du dioxygène et de ses deux états excités de plus basse énergie. Seuls les électrons répartis sur les orbitales (π^*2p_x) et (π^*2p_y) sont représentés.

4.1. Production de 1O_2

L'oxygène singulet peut être produit de manière photo-physique. La transition optique ($(^3\Sigma^-_g) \rightarrow (^1\Delta_g)$ par absorption d'un photon à 1270nm) est très difficile puisqu'elle est interdite de spin. En revanche, cette transition peut se faire aisément via un transfert d'énergie depuis l'état excité d'une molécule, appelée photo-sensibilisateur.

Le principe est simple : le photo-sensibilisateur, en absorbant un photon, passe de l'état fondamental S_0 à un état excité S_1 (Schéma i.20). Ce dernier peut alors se désexciter de manière radiative ou non, ou peut passer à un état triplet T_1 par croisement inter-système. C'est principalement cet état-là qui va transmettre son énergie au dioxygène pour former de l'oxygène singulet. En réalité, il y a des exceptions à cette règle : certaines molécules possèdent un état singulet excité S_1 pouvant sensibiliser O_2 sans passer par un état triplet T_1 .^[63] (Schéma i.20) Quoi qu'il en soit, l'important est que via ce processus, certains chromophores sont capables de produire de l'oxygène singulet en solution de manière très efficace. En biologie, plusieurs familles de molécules peuvent jouer ce rôle de photo-sensibilisateur : flavines, diverses vitamines^[64], précurseurs de porphyrine^[65], mais surtout, le plus important de ce point de vue, le photosystème II^[1,2,66]. Cette voie photo-physique est responsable de la forte production de 1O_2 chez les plantes lorsqu'elles sont soumises à une

lumière intense, et chez les animaux, notamment au niveau de la peau lorsqu'elle est soumise à des radiations UV.

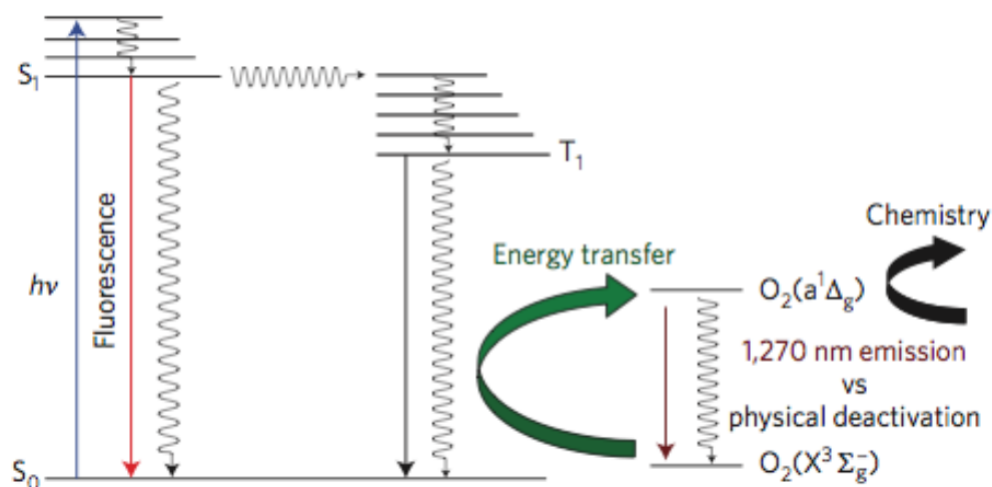


Schéma i.20 : Génération d'oxygène singulet médiée par un photo-sensibilisateur. Schéma directement extrait de l'article de Kuimova et coll.^[67] Description dans le texte.

Le Schéma i.20 montre uniquement la production de la forme $^1\Delta_g$, mais, celle de $^1\Sigma_g^+$ est aussi une réalité. Mais, contrairement à la transition $(^1\Delta_g) \rightarrow (^3\Sigma_g^-)$, la transition $(^1\Sigma_g^+) \rightarrow (^1\Delta_g)$ est autorisée du point de vue du spin. Il en résulte que cette dernière relaxation est (i) 5 à 6 ordres de grandeur plus rapide que $(^1\Sigma_g^+) \rightarrow (^1\Delta_g)$ ^[68], et (ii) est quasiment quantitative. Ainsi, en solution, il est généralement admis que tout le $^1\Sigma_g^+$ produit relaxe en $^1\Delta_g$ bien avant que ces molécules réagissent avec les solutés. Dès lors, pour la génération d'oxygène singulet en solution, on ignorera totalement la forme $^1\Sigma_g^+$. Par conséquent, dans toute la suite, le terme 1O_2 désignera uniquement l'état $^1\Delta_g$ du dioxygène.

Le Schéma i.20 représente aussi un phénomène qui distingue 1O_2 des autres ERO : puisque 1O_2 est un état électronique excité de O_2 , il n'est pas stable et se désexcite rapidement en solution. 1O_2 a une durée de vie très courte : $\sim 3,5\mu s$ dans H_2O . Cette désexcitation rapide est due aux liaisons O-H de l'eau, et si on la remplace par de l'eau lourde (D_2O), le temps de vie de 1O_2 est alors étendu à $\sim 67\mu s$.^[68,69]

La production de 1O_2 par photo-sensibilisation s'arrête donc immédiatement après la fin de l'irradiation. Autrement dit, ici, le stress s'arrête quand la production de 1O_2 prend fin, ce qui est assez différent d'un stress chimique qui prend fin une fois que tout l'oxydant est consommé/détruit.

La production de 1O_2 par cette voie a donc lieu naturellement dans les systèmes biologiques exposés à la lumière, mais peut aussi être utilisée de manière artificielle. D'abord, à des fins d'études scientifiques, afin de mieux comprendre le rôle de 1O_2 en biologie, mais

aussi à des fins médicales. En effet, depuis une centaine d'année, des photo-sensibilisateurs sont utilisés afin de détruire des cellules indésirables (parasites, champignon, cellules cancéreuses, bactéries^[70], etc...). À cet égard, le bleu de méthylène a été largement utilisé^[71]. Cette technique est appelée thérapie photo-dynamique (TPD).

À coté de cette voie photo-physique, des voies purement chimiques de production de $^1\text{O}_2$ existent.

Dès les années 70, la présence d'oxygène singulet dans les granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) a été mise en évidence^[72]. Cependant, les méthodes utilisées lors de ces études ont été rapidement critiquées^[73].

L'origine de cet $^1\text{O}_2$ serait la réaction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur l'acide hypochloreux (HOCl)^[74] (Schéma i.21): l'acide hypochloreux/hypobromeux est produit par enzymatiquement à partir de peroxyde d'hydrogène. Il y aurait donc une accumulation locale de H_2O_2 et de HOCl/HOBr , ce qui permettrait à ces deux espèces de réagir pour former de l'eau, redonner l'halogénure de départ, et de l'oxygène singulet.

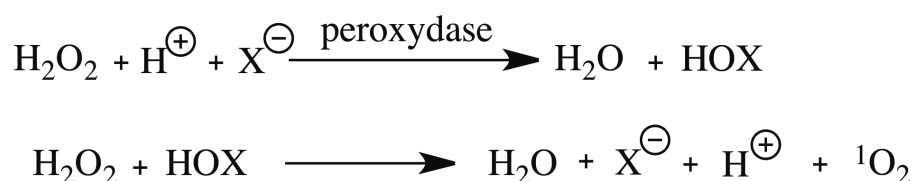


Schéma i.21 : Schéma illustrant l'hypothèse de Kanofsky et collaborateurs^[75] pour la production d'oxygène singulet par réaction d'un acide hypohalogéneux sur le peroxyde d'hydrogène. $\text{X}^- = \text{Br}^-$ ou Cl^-

Des systèmes *in vitro*, ont montré que cette hypothèse est plausible, et ce, avec différents types de peroxydases : myéloperoxydase, éosinophile peroxydase^[76], chloro- et bromo- peroxydase à vanadium^[77].

Néanmoins, l'importance de cette réaction dans ces neutrophiles est controversée : des études détectent des quantités importantes de $^1\text{O}_2$ (~20% du dioxygène consommé aurait été converti en $^1\text{O}_2$)^[78] tandis que d'autres n'en détectent pas^[4,75]. Une étude similaire menée sur des éosinophiles a mis en évidence la production de $^1\text{O}_2$, même si elle ne représente qu'environ 0,4% du dioxygène consommé par ces cellules^[79]. Les auteurs notent que dans les éosinophiles il y a une concentration élevée d'éosinophile peroxydase, qui produit HOBr et non HOCl ^[75], et qu'en même temps HOBr réagit avec H_2O_2 plus vite que ne le fait HOCl ^[74]. La production d'oxygène singulet selon le Schéma i.21 serait donc plus probable au sein des éosinophiles qu'au sein des neutrophiles.

Pour résumer, de manière générale, cette production de $^1\text{O}_2$ au sein des neutrophiles et éosinophiles est considérée comme étant faible^[7].

Il a aussi été récemment proposé que l'oxygène singulet^[80] et l'acide hypochloreux^[81] sont nécessaires à la formation du filet extracellulaire des neutrophiles (qu'ils forment en expulsant leur ADN hors de la cellule). Cependant, comme on vient de le voir, $^1\text{O}_2$ peut provenir de HOCl, il est donc difficile de différencier clairement les rôles de chacun, à l'échelle de la cellule. De plus, les facteurs influençant la formation de ces filets restent mal compris : par exemple, à faible dose, l'acide urique inhibe la formation d'ERO par la NADPH oxydase, et donc, la formation des « filets »^[82]. En revanche, à forte dose, cet acide urique déclenche l'excrétion de ces pièges, indépendamment de l'activité de la NADPH oxydase. Le rôle de $^1\text{O}_2$ dans la formation des filets extracellulaires de neutrophiles n'est pas clair, et est même contesté^[83].

Un autre système chimique capable de produire $^1\text{O}_2$, tout à fait pertinent du point de vue biologique, a été décrit récemment par Massari et coll.^[84] : la réaction du peroxynitrite sur le glyoxal (Schéma i.22) conduit à la formation d'oxygène singulet.

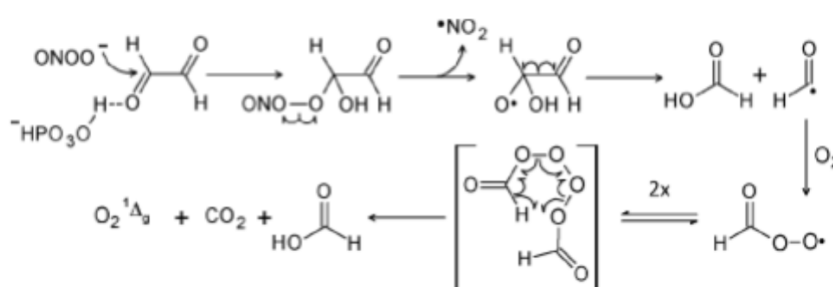


Schéma i.22 : Mécanisme proposé pour la formation de $^1\text{O}_2$ par réaction de peroxynitrite sur le glyoxal (emprunté directement de la publication de Massari et al.)^[84].

Enfin, les cascades de peroxydation des lipides pourraient aussi faire partie des sources cellulaires de génération de $^1\text{O}_2$: Di Mascio et coll. ont montré que la réaction du peroxyde d'acide linoléique avec le peroxynitrite produit de l'oxygène singulet (via des intermédiaires radicalaires).^[85]

Ainsi, des voies biologiques de génération de $^1\text{O}_2$ existent. Certaines sont dépendantes de la lumière, d'autre pas, comme résumé par Glaeser et coll.^[3] dans le cas des micro-organismes (Figure i.11).

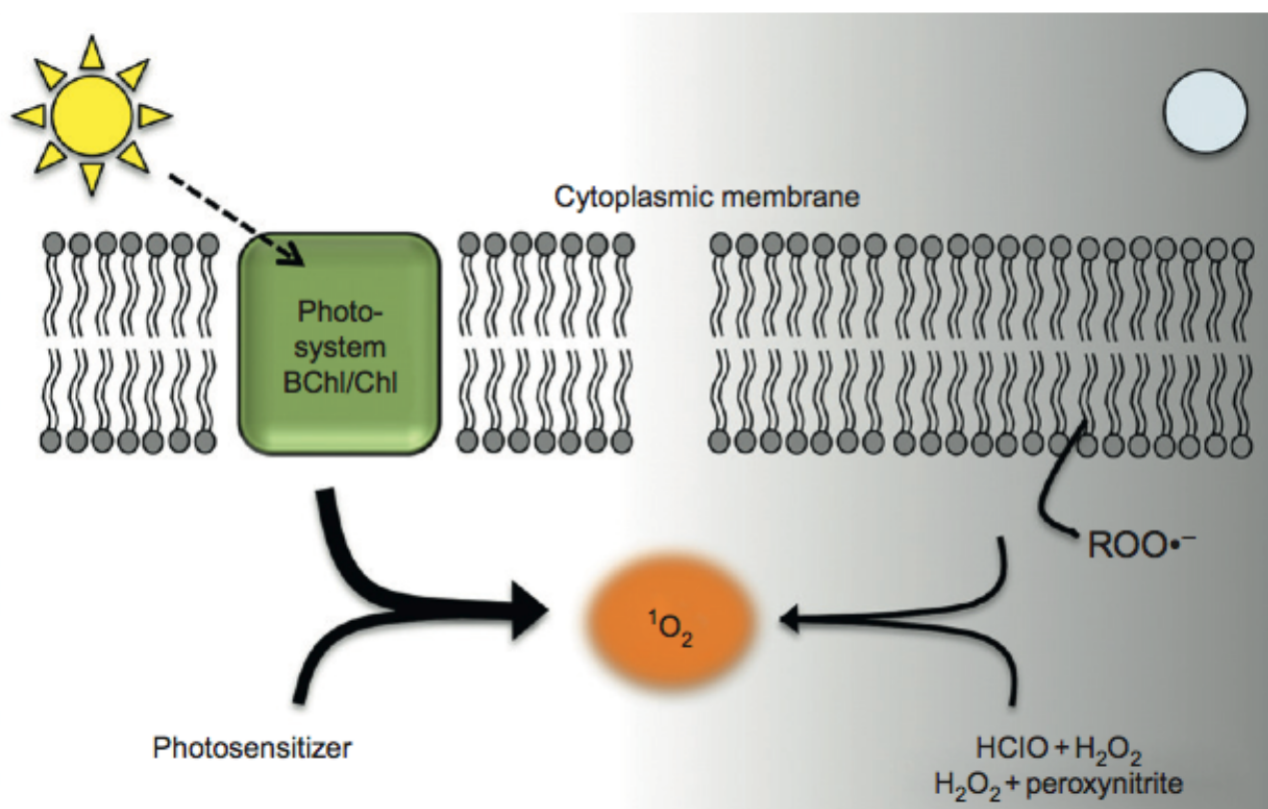


Figure i.11 : Glaeser et collaborateurs^[3] illustrent ainsi les voies de génération de $^1\text{O}_2$, dépendante de la lumière (à gauche) ou non (à droite), chez les micro-organismes.

4.2. Comportement de $^1\text{O}_2$ dans la cellule

Dans un milieu cellulaire, le temps de vie de $^1\text{O}_2$ se trouve sensiblement diminué : environ $\sim 2\mu\text{s}$ dans une cellule normale (contre $3,5\mu\text{s}$ dans H_2O pure), et environ $\sim 25\mu\text{s}$ dans une cellule cultivée en milieu D_2O (contre $67\mu\text{s}$ dans D_2O pure)^[62]. De plus, le micro-environnement influe fortement sur le temps de vie de $^1\text{O}_2$, il varie donc en fonction de la localisation subcellulaire de $^1\text{O}_2$.^[86] Par exemple, une viscosité locale importante diminue la probabilité de rencontre entre deux molécules, ce qui conduit à un temps de vie de $^1\text{O}_2$ plus grand que dans un volume où la viscosité est faible. Un temps de vie intra-cellulaire de $\sim 2\mu\text{s}$ par rapport aux $\sim 3,5\mu\text{s}$ dans l'eau signifie que, dans la cellule, seulement 40-45% du $^1\text{O}_2$ produit est désactivé par une autre espèce que l'eau (protéines, etc...), et ce, par les voies de désactivation physiques et chimiques. De plus, avec un temps de vie de $\sim 2\mu\text{s}$, Peter Ogilby^[62] a estimé que, dans la cellule, le $^1\text{O}_2$ peut parcourir jusqu'à $\sim 155\text{nm}$ depuis son lieu de production. Ceci contraste donc avec l'idée reçue que l'oxygène singulet est tellement réactif qu'il n'est pas sélectif : étant donné sa distance de diffusion, il peut entrer en collision avec de nombreuses molécules avant d'être finalement désactivé ou de réagir (chimiquement).

Le fait que l'oxygène singulet, une fois produit dans la cellule, ne peut parcourir que 100-200nm implique cependant que son rayon d'action est limité. Autrement dit, son effet sur la cellule (cytotoxicité notamment) dépend fortement de la localisation intracellulaire de la source de $^1\text{O}_2$. Ceci explique que des études ont observé que la mort cellulaire dépend de la localisation cellulaire du photo-sensibilisateur utilisé^[62]. Néanmoins, si cet espace de production d'oxygène singulet est proche d'une membrane, il est important de savoir que $^1\text{O}_2$ est capable de la traverser^[87].

4.3. Eviter la photo-production de $^1\text{O}_2$ dans la cellule

Les organismes photosynthétiques sont les êtres vivants les plus soumis à l'oxygène singulet, notamment à cause de la chlorophylle (Chl). En effet, c'est principalement l'état excité triplet de la chlorophylle ($^3\text{Chl}^*$) qui est responsable de la production de $^1\text{O}_2$ chez les plantes^[66]. Cette production se fait principalement au niveau des complexes tels que les antennes collectrices et le centre réactionnel du photosystème II (PSII) (le photosystème I ne semble pas produire de $^1\text{O}_2$ de manière significative). Lorsque l'intensité lumineuse est trop importante, les états excités de ces molécules ne sont plus désactivés assez rapidement par la chaîne photosynthétique. Cela conduit à l'accumulation d'états excités, avec des temps de vie parfois suffisamment longs pour interagir avec O_2 . Dans le cas de la chlorophylle, l'état excité singulet $^1\text{Chl}^*$ a un temps de vie d'environ 10^{-8}s , tandis que celui de $^3\text{Chl}^*$ est de $\sim 10^{-3}\text{s}$. Cet état triplet a donc le temps d'interagir avec O_2 pour former $^1\text{O}_2$.

Les antennes sont des complexes composés de protéine, de chlorophylles et de caroténoïdes (dont le β -carotène). Ces caroténoïdes désactivent l'état triplet très efficacement via un mécanisme physique. L'efficacité de cette voie vient de la proximité caroténoïde-chlorophylle, qui est assurée par l'interaction du caroténoïde avec la protéine qui coordonne le pigment.^[66]

Chez les cyanobactéries, le mécanisme est différent. La Protéine Orange à Caroténoïde est une petite protéine soluble qui encapsule un caroténoïde. Cette protéine est orange lorsqu'elle est à l'abri de la lumière. En revanche, lorsqu'elle est exposée à une lumière bleu-vert, elle devient rouge. Au niveau moléculaire cela correspond à un changement de la structure au niveau de la protéine et au niveau du caroténoïde. Sous cette forme, la protéine va interagir avec le phycobilisome (complexe qui collecte l'énergie lumineuse), et augmente la dissipation thermique de l'énergie captée. Ainsi, cette protéine limite la quantité d'énergie arrivant jusqu'au centre photosynthétique, ce qui limite la production accidentelle de $^1\text{O}_2$.^[88]

Ainsi, en évitant l'accumulation des formes excitées de la chlorophylle à durée de vie longue, les organismes photosynthétiques évitent la production d'oxygène singulet.

Cependant, il peut parfois être utile non-pas d'éviter la photo-génération de $^1\text{O}_2$, mais de l'accentuer. En effet, les plantes ont su mettre à profit le fait de synthétiser des chromophores capables de photo-sensibiliser O_2 : lors de l'interaction plante-pathogène, elles sont capable de produire des phytoalexines, dont le but est de détruire les pathogènes en les exposant à $^1\text{O}_2$.^[66]

4.4. Les effets biologiques de $^1\text{O}_2$

L'oxygène singulet peut provoquer la mort cellulaire par l'accumulation de dommages. Néanmoins, les organismes vivants ont développé des méthodes de détection spécifique à $^1\text{O}_2$.

Une grande avancée dans la compréhension de la biologie de l'oxygène singulet chez la plante a été réalisée grâce à l'étude du mutant *flu* de *Arabidopsis thaliana*.^[89,90] Ce mutant accumule un précurseur de la chlorophylle, la protochlorophyllide, dans l'enveloppe du chloroplaste et dans la membrane du thylakoïde^[66]. Lorsque la plante est exposée à la lumière, une grande quantité de $^1\text{O}_2$ est générée, ce qui déclenche une mort cellulaire programmée. Le déroulement de ce programme est induit par deux protéines, *Executer1* et *Executer2*. La génération de $^1\text{O}_2$ dans un double mutant ne possédant aucune de ces protéines n'induit pas cette mort cellulaire programmée^[2]. Ceci montre que l'oxygène singulet peut induire une réponse spécifique, via une voie de signalisation particulière. Une cascade de signalisation similaire^[91] conduit à l'acclimatation de l'organisme au stress $^1\text{O}_2$. Néanmoins, le mécanisme par lequel $^1\text{O}_2$ est détecté en premier lieu reste inconnu.

En ce sens, l'équipe de Havaux^[92] a montré que les produits issus de l'oxydation du β -carotène par $^1\text{O}_2$, sont capables d'induire une réponse spécifique à $^1\text{O}_2$. Ainsi, chez les plantes, le β -carotène aurait comme rôles de désactiver physiquement la chlorophylle excitée, de désactiver physiquement $^1\text{O}_2$, et, s'il y a « un excès » de $^1\text{O}_2$, son oxydation produirait des médiateurs capables d'induire l'expression d'une réponse génétique contre $^1\text{O}_2$.

Les plantes semblent donc avoir différents niveaux de réponse au stress causé par l'oxygène singulet, comme l'a récemment résumé l'équipe de Laloi (Figure i.12).^[93]

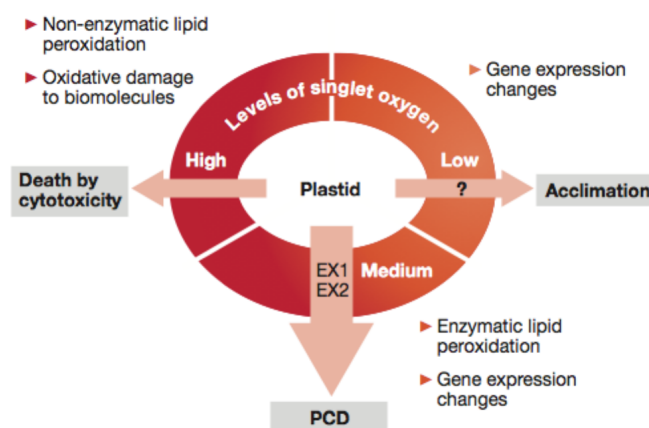


Figure i.12 : Modèle proposé quant à la réponse de la cellule végétale vis-à-vis de la quantité d'oxygène singulet produit.

(PCD = mort cellulaire programmée) (Figure de Kim et coll.^[93])

Si la protection de $^1\text{O}_2$ par le β -carotène vaut pour les plantes, il est peu probable que ce soit extrapolable aux organismes non-photo-synthétiques. En effet, il a été montré récemment que le β -carotène introduit dans des cellules de mammifères n'altère pas le temps de vie de $^1\text{O}_2$ dans ces cellules^[94]. Il en a été conclu que puisque le β -carotène n'est pas la molécule qui protège les cellules de mammifère contre $^1\text{O}_2$.

Aujourd'hui encore, la détection de l'oxygène singulet cellulaire ainsi que la signalisation de cette information restent mal comprises. Très peu de composants cellulaires mis en jeu dans ces voies ont été identifiés.

4.5. Cibles cellulaires de $^1\text{O}_2$

D'après la littérature, les principaux dommages causés par $^1\text{O}_2$ dans les cellules sont occasionnés sur les protéines et les acides nucléiques.^[95]

Ainsi, la formation de 8-oxo-guanine dans l'ADN de cellules de peau exposées aux UVA est causée majoritairement par l'oxygène singulet généré dans la cellule par cette irradiation^[65].

Néanmoins, en se basant sur l'abondance des différents constituants cellulaires et sur leur vitesse d'oxydation par $^1\text{O}_2$, Davies a estimé que la majorité (~70%) de l'oxygène singulet généré dans la cellule réagit avec des protéines^[96].

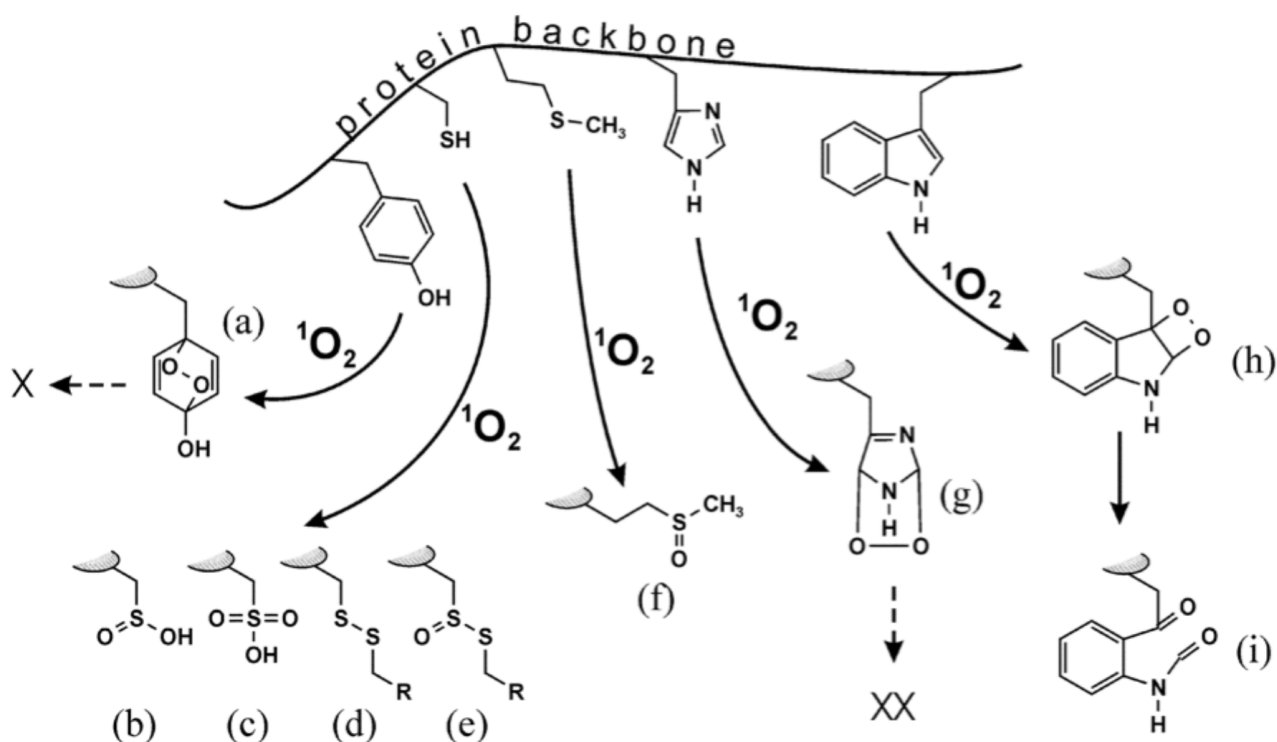


Schéma i.23 : Produits issus de l'oxydation par $^1\text{O}_2$ des chaînes latérales réagissant le plus vite avec cet oxydant (schéma issu de Klotz et coll.^[25]). Description dans le texte.

Dans les protéines, ce sont les chaînes latérales les plus riches en électrons (soufrées et aromatiques) qui réagissent le plus vite avec $^1\text{O}_2$ (Schéma i.23). La tyrosine forme d'abord l'endoperoxyde 1,4 (a), qui peut se décomposer ensuite pour former divers produits^[97]. La cystéine conduit à la formation de plusieurs produits d'oxydation : l'acide sulfinique (b), l'acide sulfonique (c), le disulfure (d) ou le thiosulfinate (e). Notons que l'acide sulfonique n'est pas un produit d'oxydation primaire : il faut au moins deux étapes d'oxydation, à partir d'un thiol, pour l'atteindre. La méthionine, en revanche, ne fait qu'un produit : le méthionine sulfoxyde. L'histidine, quant à elle, peut former deux endoperoxydes 5,7 comme (g) ou 4,7. Ils évoluent rapidement pour former des produits très variés^[97]. Enfin, le tryptophane est connu pour être l'acide aminé désactivant l'oxygène singulet le plus rapidement. S'il est oxydé par $^1\text{O}_2$, il forme d'abord un endoperoxyde 2,3 (h) appelé dioxétane. Ce dernier se décompose pour donner majoritairement la N-formylkynurenine(i).

Ainsi, la désactivation (physique et chimique) de $^1\text{O}_2$ par les protéines est due aux chaînes latérales. Ceci explique qu'une protéine totalement dépliée désactive l'oxygène singulet plus vite que dans sa forme repliée native^[98].

4.6. Réactivité des thiols libres avec 1O_2

Le Schéma i.24 présente le mécanisme probable d'oxydation d'un thiolate libre par 1O_2 , en nous basant sur ce qui est connu de la réactivité des thiols, et en faisant le parallèle avec la réactivité des thioéthers avec 1O_2 , qui a été bien étudiée.^[99]

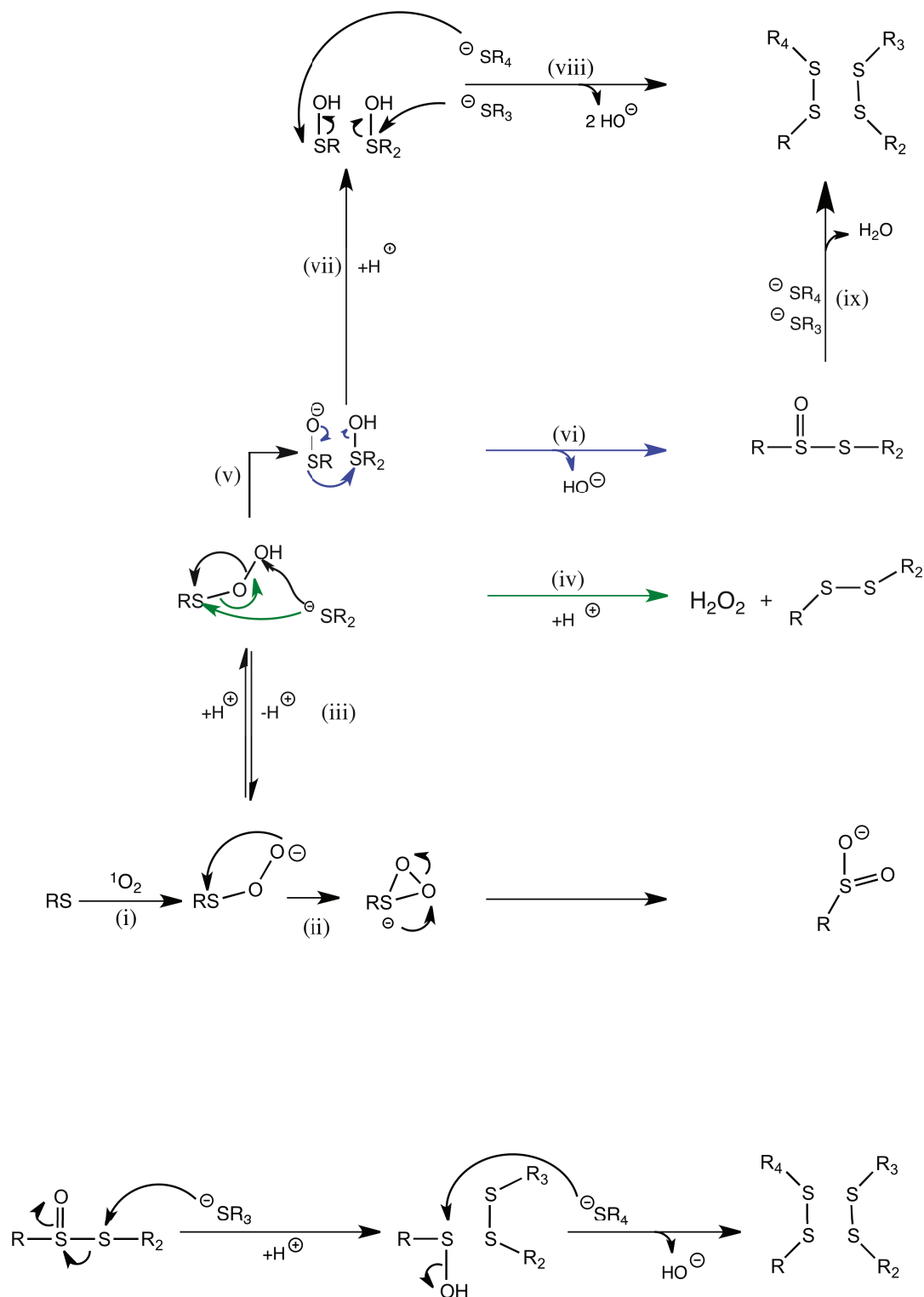


Schéma i.24 : Mécanisme réactionnel suivant l'attaque nucléophile d'un thiolate sur une molécule d'oxygène singulet (description dans le texte).

Lorsqu'un thiolate attaque une molécule d'oxygène singulet (i), il se forme un persulfénate très instable. S'il reste déprotoné, il se réarrange/s'effondre (ii) très rapidement pour former un sulfinate. En revanche, si le persulfénate se protone (iii) en acide persulfénique, il peut subir une attaque nucléophile d'un deuxième thiolate. Cette attaque peut se faire sur deux sites différents : sur le soufre (iv), ce qui forme un pont disulfure et libère une molécule de H_2O_2 , ou sur l'oxygène terminal (v), ce qui conduit à un intermédiaire instable sulfénate / acide sulfénique. Cet intermédiaire peut évoluer de deux manières, soit il se réarrange (vi) soit il se protone (vii). Le réarrangement consiste en l'attaque nucléophile du sulfénate sur l'acide sulfénique pour former un thiolsulfinate^[39,100,101]. La protonation (vii), quant à elle, mène à un dernier intermédiaire où les deux thiols initiaux sont oxydés en acides sulféniques. Chacun d'eux peut réagir avec un thiol (viii), ce qui cause le départ de deux molécules d'eau et la formation de deux ponts disulfures.

Un autre chemin réactionnel menant au bis-disulfure, illustré Schéma i.24 par la flèche (ix), est détaillé Schéma i.25. En effet, le thiosulfinate est une espèce électrophile, qui peut réagir avec un premier thiolate pour former un pont disulfure et un acide sulfénique. Ce dernier réagit avec un autre thiol pour former un pont disulfure.

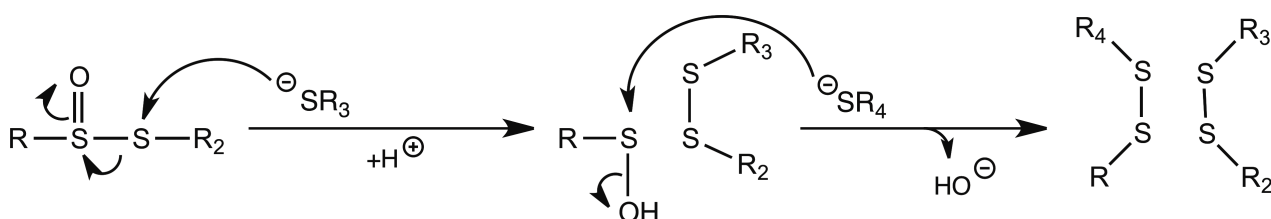


Schéma i.25 : Formation de deux ponts disulfures, à partir d'un thiosulfinate et deux thiols réduits.

Ainsi, une seule molécule d'oxygène singulet peut oxyder jusqu'à quatre thiols, ce qui correspond à la réduction complète du dioxygène en eau (réduction de O_2 par quatre électrons). Ceci est tout à fait probable dans un doigt de zinc de formule $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ puisque les quatre thiolates sont maintenus à proximité les uns des autres par la coordination au Zn^{2+} . Cependant, l'attaque d'une molécule de $^1\text{O}_2$ sur un tel site peut aussi n'oxyder qu'un ou deux thiolates, pour former les trois autres produits possibles (sulfinate, thiolsulfinate, mono-disulfure).

Nous avons considéré une autre évolution possible de l'intermédiaire persulfénate, qui se base sur une analogie avec le peroxy sulfoxyde. Le peroxy sulfoxyde est l'intermédiaire formé lors de l'oxydation d'un thioéther par $^1\text{O}_2$, et peut évoluer pour former un sulfoxyde ou une sulfone. Il est cependant proposé que cet intermédiaire peroxy sulfoxyde puisse aussi

évoluer pour redonner le thioéther de départ et le dioxygène à l'état triplet^[99]. Le mécanisme proposé pour cette réaction est illustré Schéma i.26.A. Cette proposition se base sur le fait qu'en solvant non-protique, seul 1% de la désactivation de $^1\text{O}_2$ par un thioéther se fait de manière chimique, contre près de 100% dans un solvant protique. Et puisque la vitesse totale de désactivation (physique+chimique) est la même dans les deux solvants, cela signifie que la différence se joue après la formation du peroxy sulfoxyde.

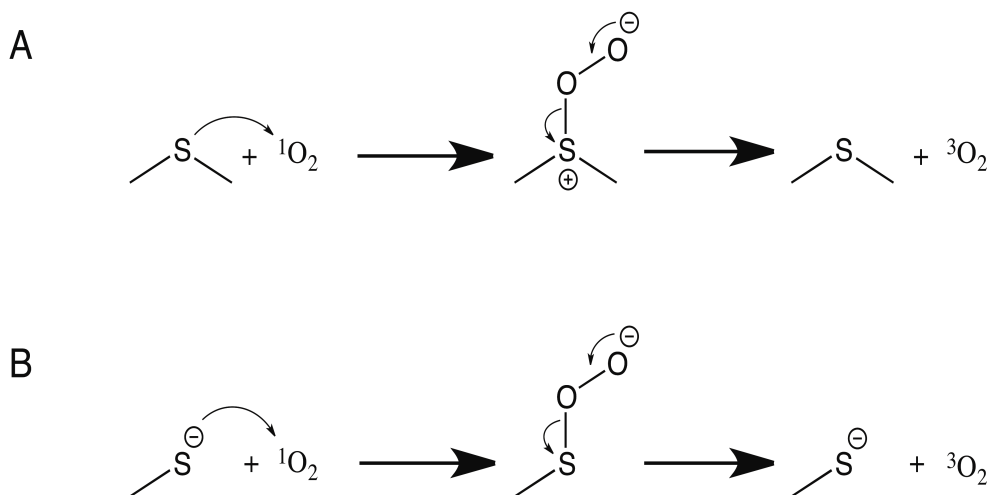


Schéma i.26 : Désactivation physique de $^1\text{O}_2$ par un thioéther (A). Par analogie, nous proposons un mécanisme de désactivation physique de $^1\text{O}_2$ par un thiolate (B).

Par analogie, il est possible que le persulfénate déprotoné suive le même chemin (Schéma i.26.B). Formellement, ce cas correspondrait à une désactivation chimique de $^1\text{O}_2$ puisque la première étape est l'attaque nucléophile du soufre sur $^1\text{O}_2$. Mais, puisqu'à la fin on retrouve le composé soufré de départ et du dioxygène à l'état fondamental, ce phénomène apparaît comme de la désactivation physique.

Dans le cas des thiols libres, la désactivation physique n'a jamais été mesurée : il est toujours dit qu'elle est négligeable devant la désactivation chimique.^[102,103] Cette différence thiol/thiéther pourrait s'expliquer par le fait que le soufre du peroxy sulfoxyde est chargé positivement alors que celui du persulfénate est neutre. Il en résulte que le soufre du peroxy sulfoxyde est beaucoup plus nucléophile que celui du persulfénate.^[104]

Néanmoins, on a mesuré de la désactivation physique de $^1\text{O}_2$ par des complexes possédant un/des thiolate(s) lié(s) au métal. Le mécanisme par lequel se fait cette désactivation physique reste inconnu.^[104]

4.7 Oxydation de thiols libres par $^1\text{O}_2$: produits et vitesses

Contrairement à ce que l'on pourrait croire, la littérature portant sur l'oxydation des thiols par $^1\text{O}_2$ n'est pas abondante. À notre connaissance, il n'y a que l'article de Sies et collaborateurs^[102] qui décrit en détail les produits de photo-oxydation d'une cystéine incluse dans un peptide : le glutathion. Deux méthodes de génération d'oxygène singulet ont été utilisées : une méthode photo-physique (rose bengal) et une méthode chimique (dégradation d'un endoperoxyde de naphtalène, le NDPO₂). Les produits obtenus sont : disulfure, thiosulfinate, acide sulfinique et acide sulfonique (Schéma i.27). Néanmoins, leurs proportions diffèrent selon la méthode de génération de $^1\text{O}_2$.

Nous séparerons ces produits en deux groupes, ceux possédant une liaison soufre-soufre (disulfure et thiosulfinate) et ceux n'en possédant pas (acides sulfiniques et sulfoniques). À cette séparation, plusieurs raisons :

- d'un point de vue biologique, l'acide sulfinique est plus difficile à réduire que les produits à liaison soufre-soufre, l'acide sulfonique l'est plus encore. La réduction d'un acide sulfinique requiert l'action d'une enzyme, la sulfirédoxine, consommatrice d'ATP.^[105] À ce jour, il n'y a pas de système biologique connu capable de réduire un acide sulfonique.
- l'acide sulfonique provient de l'oxydation du sulfinate par $^1\text{O}_2$.
- l'oxydation d'un disulfure par $^1\text{O}_2$ produit le thiosulfinate correspondant.^[106] Ainsi, dans le mélange présenté Schéma i.27, on ne peut distinguer le thiosulfinate issu de l'oxydation du glutathion de celui issu de l'oxydation du disulfure.
- ces catégories correspondent à une origine différente au niveau du premier intermédiaire réactionnel (Schéma i.24). Le disulfure et le thiosulfinate proviennent de l'acide persulfénique, tandis que le sulfinate provient du persulfénate.

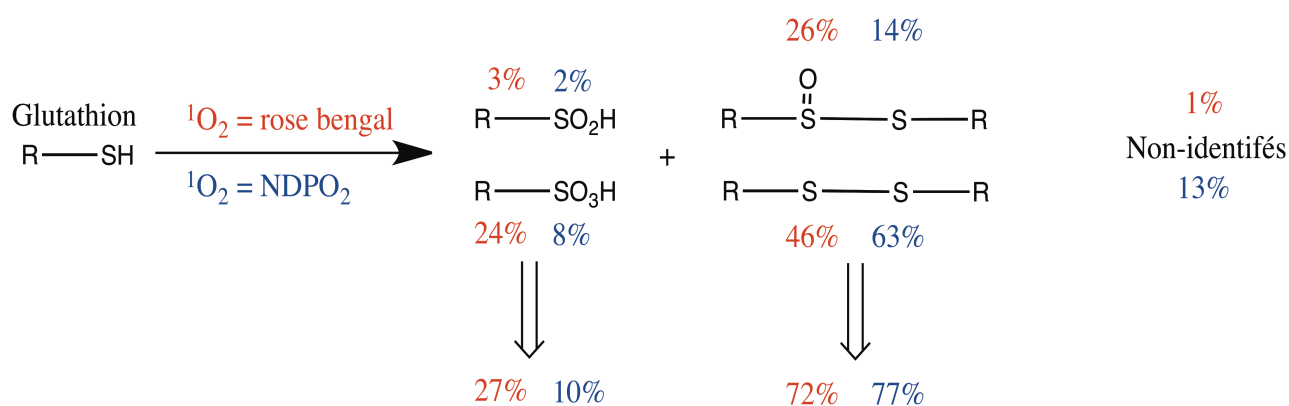


Schéma i.27 : Produits d'oxydation du glutathion par l'oxygène singulet, selon que $^1\text{O}_2$ est généré de manière photo-physique (rouge) ou chimique (bleu). Ces oxydations ont été faites dans D₂O à pD 7,4 (50 mM Pi), 37°C.^[102]

Les proportions des produits d'oxydation correspondent à des oxydations poussées : un avancement de 58% dans le cas de NDPO₂ et de 98% dans le cas du rose bengal. Ceci explique la présence importante d'acide sulfonique, et gonfle probablement la quantité de thiosulfinate.

Quelle que soit la méthode de génération d'oxygène singulet, l'oxydation d'un thiol libre produit majoritairement des produits à liaison soufre-soufre (~75%).

Finalement, dans la suite, les proportions auxquelles nous nous référerons sont celles mesurées avec le rose bengal car l'utilisation de méthodes chimiques pour générer ¹O₂ peut conduire à l'oxydation du thiol de départ, sans impliquer l'oxygène singulet. Les 13% de produits non-identifiés peuvent témoigner de telles réactions parasites.

Ainsi, l'oxydation de thiol libre par ¹O₂ produit environ 70% de produits à liaison soufre-soufre (principalement du disulfure) et environ 30% d'acide sulfinique.

Une dernière remarque que l'on peut faire sur ces produits est qu'on observe une faible accumulation d'acide sulfinique. En effet, l'oxydation utilisant le rose bengal a conduit à la formation de 24% de d'acide sulfonique et de seulement 3% d'acide sulfinique. Sachant que l'acide sulfonique provient de l'oxydation du sulfinate par ¹O₂, ceci suggère que dans ces conditions, cette réaction a une vitesse proche de celle l'oxydation du thiol par ¹O₂.

L'équipe de Ashby a montré que l'oxydation du phénylsulfinate par HOCl est plus rapide que celle du phénylthiolate par HOCl.^[107] Même si cet oxydant est différent de ¹O₂, cela montre tout de même que l'oxydation d'un sulfinate est facile, et peut être compétitive avec celle d'un thiolate. Ainsi, dans nos études, nous risquons de voir rapidement apparaître des suroxydations si la réaction est poussée.

Nous avons rassemblé toutes les vitesses d'oxydation de thiols libres (d'intérêt biologique) par ¹O₂ dans le Tableau i.2.

À pH physiologique, une cystéine libre est donc oxydée par ¹O₂ à une vitesse de l'ordre de 10⁶-10⁷ M⁻¹.s⁻¹. Les différences de vitesse entre les différents thiols s'expliquent surtout par des pKa différents : en effet le Tableau i.3 montre que ces trois espèces (cystéine, N-acétylcystéine, et glutathion), dans leur forme déprotonée, réagissent avec des vitesses très similaires (~2.10⁸ M⁻¹.s⁻¹). Ainsi, puisque la forme déprotonée réagit environ 10⁴ fois plus vite que la forme protonée, la vitesse varie énormément avec le pH. Une cystéine à faible pKa réagira donc, à pH physiologique, plus vite qu'une cystéine à haut pKa.

Composé	$k_T (=k_Q+k_R)$ ($10^6\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_R ($10^6\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	Conditions	Source
cystéine	8,3	8,3*	37°C, D ₂ O, pD 7,4	a
	8,9	8,9*	D ₂ O, pD 7	b
	50		D ₂ O/EtOH 1:1 + Pi pH 7	c
N-acétyl-cystéine	0,6	0,6	37°C, D ₂ O, pD 7,4	a
	2,5	2,5*	D ₂ O, pD 7	b
GSH	2,4		37°C, D ₂ O, pD 7,4	a
	2,9	2,9*	D ₂ O, pD 7	b

Tableau i.2 : Vitesses d'oxydation de thiols libres d'intérêt biologique par $^1\text{O}_2$. Si la température n'est pas indiquée, c'est que les mesures ont été prises à température ambiante. GSH = glutathion ; * = en considérant qu'il n'y a pas de désactivation physique, $k_T=k_R$; (Sources : a = Devasagayan et collaborateurs^[102] ; b = Rougee et collaborateurs^[103] ; c = Michaeli et Feitelson^[108])

Composé	k_T (pH 7) ($10^6\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_T (-SH) ($10^6\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_T (-S ⁻) ($10^6\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
cystéine	8,9	<0,04	150
N-acétyl-cystéine	2,5	<0,04	210
GSH	2,9	<0,04	190

Tableau i.3 : Comparaison des vitesses d'oxydation par $^1\text{O}_2$ d'une cystéine protonée, déprotonée, à pH 7. (correspond à la source b du Tableau i.2).

Ceci explique que certaines enzymes (cathepsines^[109], caspase 3^[110]) sont rapidement inactivées par $^1\text{O}_2$. En effet, leur site actif possède une cystéine activée, possédant un bas pKa, et donc, majoritairement déprotonée à pH physiologique. Ces dernières peuvent donc réagir rapidement avec $^1\text{O}_2$.

Finalement, du fait que le glutathion réagit rapidement avec $^1\text{O}_2$ et que sa concentration cellulaire est de l'ordre du mM, il a été proposé qu'il joue un rôle important dans la défense cellulaire contre l'oxygène singulet^[102].

4.8. Réactivité des thiols avec $^1\text{O}_2$ dans les complexes métalliques

Les réactions décrites ci-dessous sont toutes celles dont les produits d'oxydation ont été identifiés dans la littérature.

L'équipe de Darensbourg a été la première à décrire ce type de réaction, et ce avec des complexes de nickel (Schéma i.28) et de palladium (Figure i.29)^[111,112]. Dans les deux cas, les complexes sont de même nature : le métal est tétra-coordonné, dans une géométrie plan carré, par deux amines tertiaires et deux thiolates (N_2S_2). Ces ligands sont relativement contraints.

L'oxydation de ces complexes (**a1**, **b1** et **c1**) conduit à la formation de produits de type sulfénate et sulfinate. Il a été montré que les produits mono-sulfénate (**a2**, **b2** et **c2**) proviennent d'une réaction bi-moléculaire : un complexe réagit avec $^1\text{O}_2$ pour former un intermédiaire de type persulfénate. Celui-ci, en milieu protique (MeOH) peut se protoner pour donner un acide persulfénique, qui peut être attaqué par le thiolate d'un autre complexe, conduisant à la rupture de la liaison O-O et à la formation de deux sulfénates. Ainsi, l'oxydation d'un complexe par une molécule de $^1\text{O}_2$ conduit à la formation de deux espèces mono-sulfénates. Cependant, si le deuxième thiolate vient du ligand du premier complexe, alors, cela conduit à la formation d'une espèce portant deux sulfénates (**a3**).

Cette nécessaire protonation du persulfénate pour former le mono-disulfure est illustrée par le complexe (**c1**) (Schéma i.29). Lorsqu'il est oxydé par $^1\text{O}_2$ dans un solvant protique, il conduit majoritairement au mono-sulfénate (**c2**), alors que dans un solvant aprotique, ce produit n'est pas détecté. À la place, le produit d'oxydation majoritaire est le mono-sulfinate (**c3**)

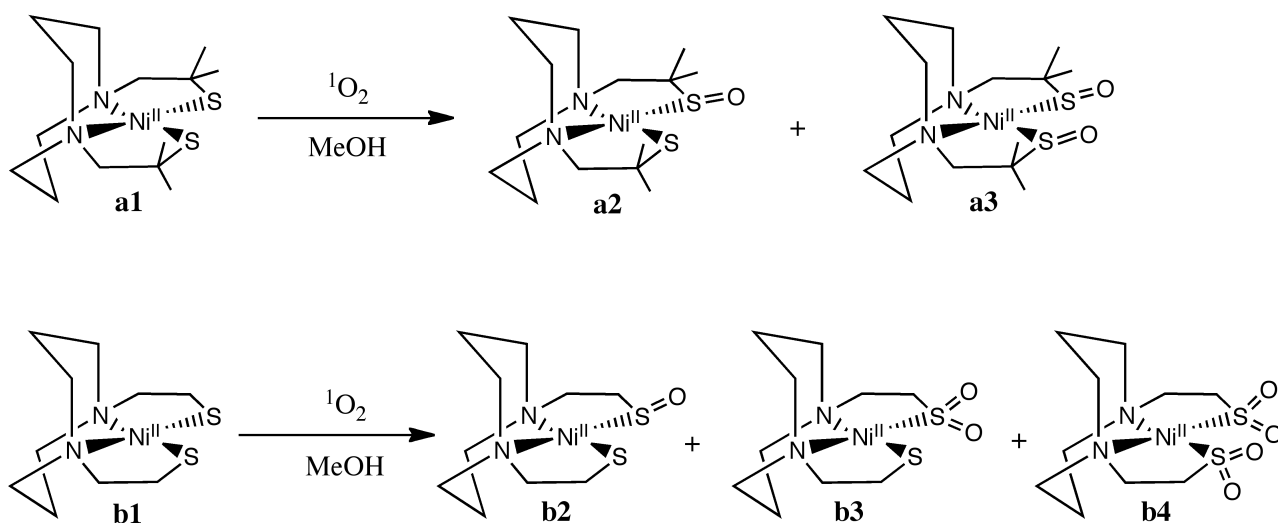


Schéma i.28 : Réactivité de bis-thiolate de nickel de Darensbourg^[111] vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.

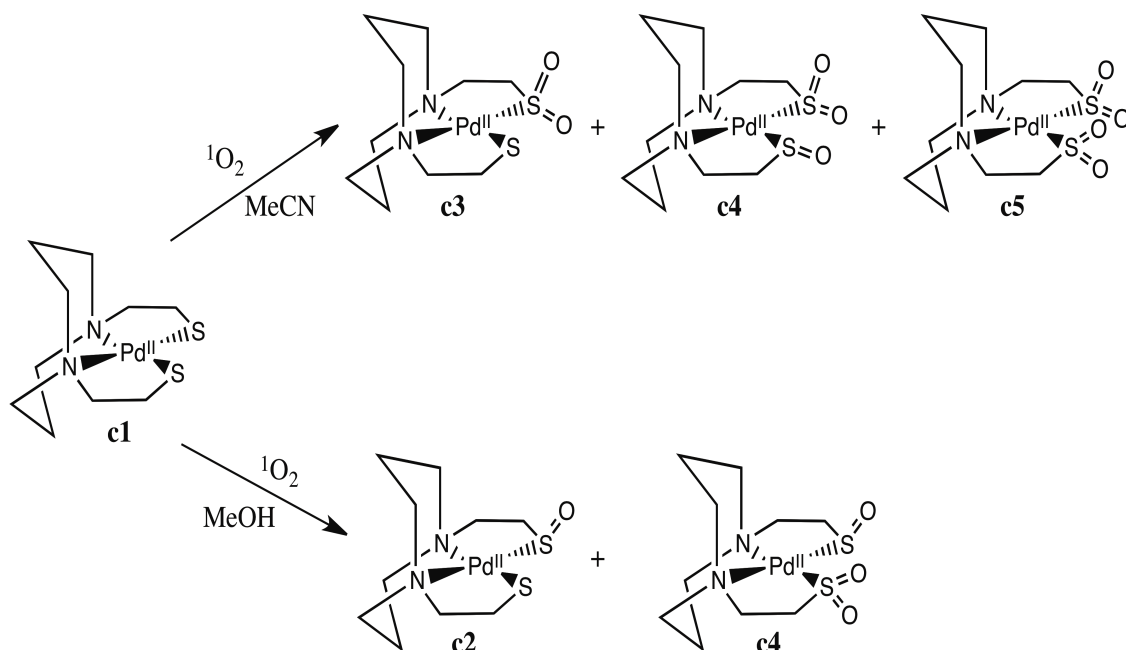


Schéma i.29 : Réactivité du complexe bis-thiolate de palladium de Darensbourg^[112] vis-à-vis de ¹O₂.

L'équipe de Selke a aussi travaillé dans ce domaine, mais avec d'autres complexes. Nous allons commencer par nous pencher sur leurs complexes de cobalt (III) ne contenant qu'un seul thiolate.^[113,114](Schéma i.30) Dans ces complexes, le Co^{III} est hexacoordiné (géométrie octaédrique) par deux éthylènediamine, et un 3-amino-éthylène-1-thiolate (série **d**) ou un ortho-amino-phénylthiolate (série **e**). Ces systèmes sont très proches, et pourtant, ils ne donnent pas tout à fait les mêmes produits lors de l'oxydation par ¹O₂ (dans l'eau). L'oxydation du complexe **d1** conduit uniquement au mono-sulfénate **d2**. En revanche, l'oxydation du complexe **e1** conduit au mono-sulfénate **e2** et au mono-sulfinate **e3**.

Ces deux systèmes sont très proches, mais, ils varient au regard du soufre, et donc, de l'intermédiaire persulfénate/acide persulfénique : l'encombrement stérique du groupement phényle gêne les réactions bi-moléculaires (transfert d'oxygène). Ainsi, l'effondrement du persulfénate en mono-sulfinate est favorisé dans le cas du complexe **e1**. Notons cependant que le phényle pourrait jouer un second rôle en ce sens, celui d'abaisser le p*K*_a de l'acide persulfénique, ce qui augmenterait la population de persulfénate, et donc, favorise la formation de mono-sulfinate.

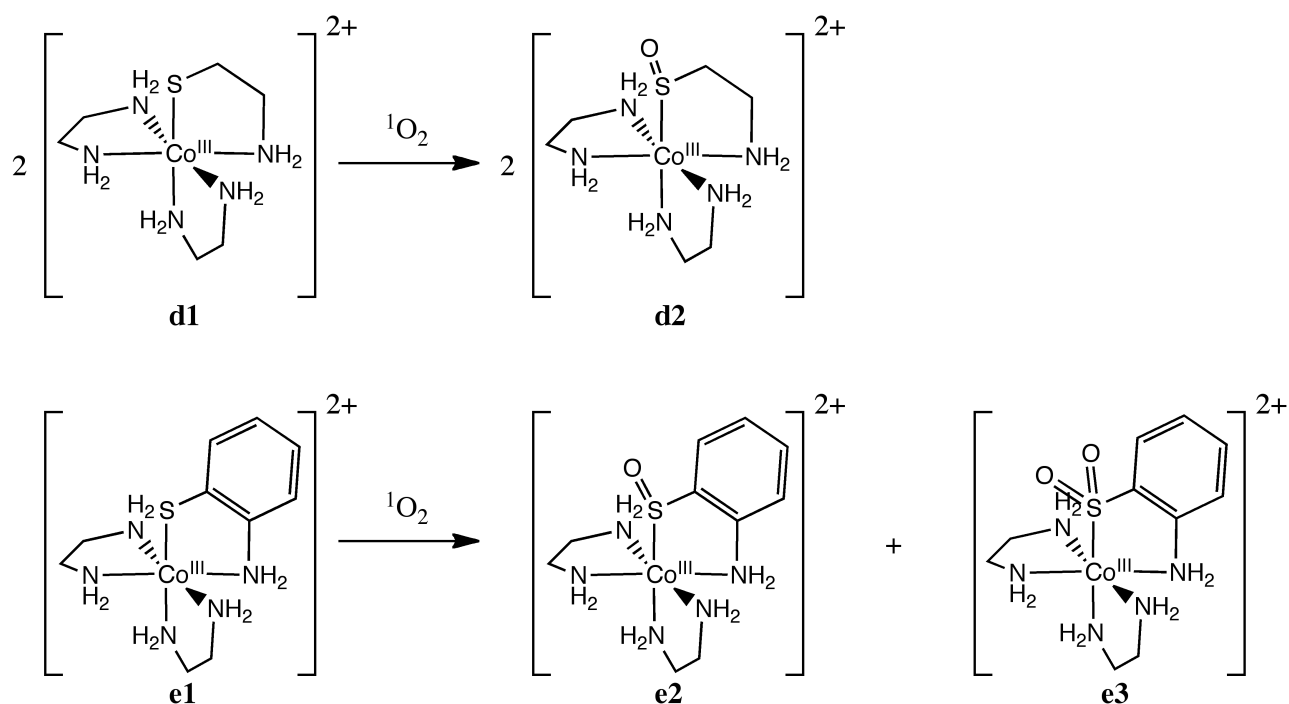


Schéma i.30 : Réactivité des complexes mono-thiolate de cobalt de Selke^[113,114] vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.

Des complexes de platine (Schéma i.31 et Schéma i.32) ont aussi été étudiés, par les équipes de Gray^[115] (**f**), de Schanze^[116] (**g**) et de Selke^[113,114,117] (**h**).

Dans le cas du complexe **f1**, bien que la présence d'eau dans le solvant permette la protonation du persulfénate, seul le mono-sulfinate est observé.

Un cas un peu atypique est celui du complexe **g1**, puisque son oxydation par $^1\text{O}_2$, bien qu'elle soit centrée sur les thiolates, ne conduit pas à des produits oxygénés du soufre mais à un dithiolène. Les auteurs suggèrent la formation d'un acide persulfénique intermédiaire qui conduit au dithiolène par une réaction d'élimination.

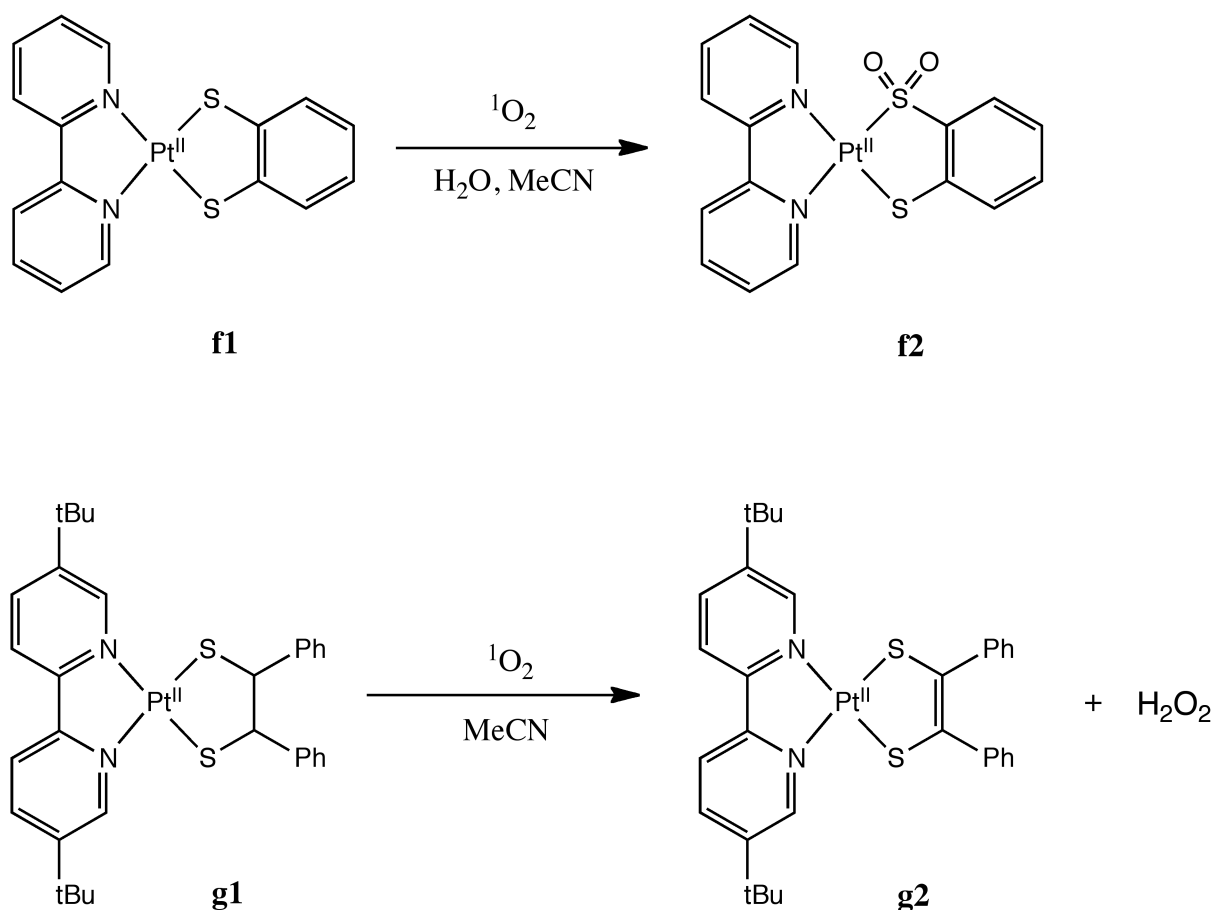


Schéma i.31 : Réactivité des complexes bis-thiolate de platine de Gray (f)^[115] et de Schanze (g)^[116] vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.

Contrairement au complexe **f1**, le complexe **h1** est oxydé par $^1\text{O}_2$ en mono-sulfénate. Ceci montre qu'ici encore, ce n'est pas le métal qui contrôle l'évolution de l'intermédiaire vers le mono-sulfénate ou le mono-sulfinate. En effet, d'après la structure des ligands, il apparaît que les thiolates de **f1** ont un $\text{p}K_a$ plus faible que celui de **h1**, et que les thiolates de **f1** sont plus encombrés que celui de **h1**. Ces deux facteurs vont favoriser la formation du sulfinate.

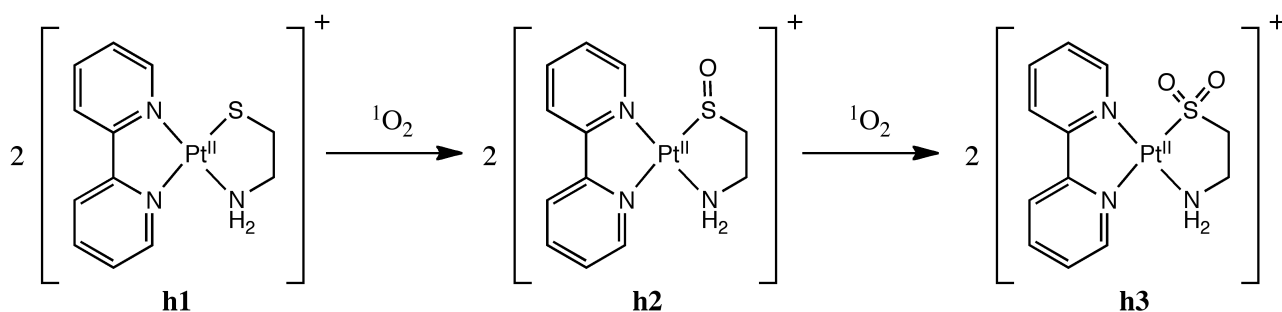


Schéma i.32 : Réactivité d'un complexe mono-thiolate de platine de Selke^[117] vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.

D'après ces exemples, on voit apparaître deux facteurs influençant l'évolution de l'intermédiaire persulfénate en produits stables : (i) l'encombrement stérique autour du soufre et (ii) le pK_a du thiolate. En effet, l'encombrement stérique empêche l'attaque (intermoléculaire) d'un thiolate sur les oxygènes de l'acide persulfénique, ce qui augmente le temps de vie de ce dernier. Le facteur (ii) joue sur l'état de protonation de l'intermédiaire. Un pK_a bas va favoriser la forme persulfénate, qui s'effondre pour donner une espèce sulfinat. Notons que l'acidité du métal influe aussi sur le pK_a de l'acide persulfénique.

Notons que dans aucun cas, et contrairement à ce qui est observé pour les thiols libres, il n'a été détecté de produits à liaison soufre-soufre avec les complexes métal-thiolate. Ceci est probablement dû au fait que ces métaux stabilisent le sulfénate, l'empêchant de réagir avec le thiolate d'un autre complexe. De plus, dans le cas des ligands bis-thiolates, ces ligands sont trop contraints pour que les soufres d'un même ligand entrent en contact. Enfin, un facteur à prendre en compte, est le fait que les métaux étudiés (Ni, Pt, Pd) ici sont relativement inertes vis-à-vis de l'échange de ligand, ce qui ne favorise pas la décooordination des sulfénates pour qu'ils réagissent avec un thiolate et donnent un disulfure.

Comme le montrent les résultats ci-dessus, la réactivité des thiols liés à un métal, vis-à-vis de 1O_2 , est différente de celle des thiols libres.

4.9. Des résultats peu extrapolables aux doigts de zinc

Les résultats obtenus en utilisant des complexes tels que décrits ci-dessus, ne sont pas extrapolables à la réactivité des doigts de zinc :

- les métaux utilisés ne sont pas le Zn^{2+} . L'effet de certains métaux est illustrée par le nickel : les complexes thiolate- Ni^{II} réagissent avec le dioxygène à l'état triplet pour former des espèces sulfinates^[45,118], à la différence des complexes de zinc qui ne forment que des disulfures.
- pour la plupart, les ligands utilisés sont des ligands rigides : ils empêchent l'attaque d'un thiolate sur une espèce réactive du soufre (acide persulfénique notamment), ce qui interdit la formation de produits à liaison soufre-soufre (disulfure, thiosulfinat). La différence de labilité entre le zinc et les métaux utilisés ci-dessus pourrait aussi jouer un rôle.

- ces complexes sont, pour le plupart, insolubles en solution aqueuse. Or, nous l'avons vu, le solvant est ici très important puisque plusieurs intermédiaires peuvent se protoner/déprotoner, ce qui contrôle les produits d'oxydation.
- il n'y a qu'un ou deux thiolates autour du métal. Or, dans les doigts de zinc, il y en a jusqu'à quatre, et cela peut être important étant donné qu'une molécule de $^1\text{O}_2$ peut oxyder jusqu'à quatre thiolates (voire mécanisme Schéma i.24).
- dans ces complexes, il n'y a pas de seconde sphère de coordination. En revanche, dans les doigts de zinc, les soufres sont souvent impliqués dans des liaisons hydrogène (avec la chaîne principale et/ou les chaînes latérales de la protéine) ce qui module leur réactivité. Ce réseau de liaisons hydrogène doit être reproduit fidèlement pour modéliser la réactivité d'un site doigt de zinc.

Ainsi, la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de $^1\text{O}_2$ est différente de celle de ces complexes. Il apparaît donc essentiel d'étudier directement la réactivité des doigts de zinc avec $^1\text{O}_2$.

4.10 Études sur la réactivité de doigts de zinc vis-à-vis de $^1\text{O}_2$

La première étude portant sur l'oxydation d'un doigt de zinc par $^1\text{O}_2$ est celle de Kröncke et collaborateurs^[119]. Ils ont étudié l'effet d'une source chimique de $^1\text{O}_2$ (un endoperoxyde d'anthracène, le NDPO₂) sur un complexe ADN-protéines. Les protéines complexées sont RVD (Récepteur de la Vitamine D) et RRX (Récepteur du Réinoïde X), sous forme d'un hétéro-dimère. Ces deux facteurs de transcription possèdent chacun un doigt de zinc de formule $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. Ainsi, ils ont montré que $^1\text{O}_2$ détruit le complexe RVD/RRX-ADN. De plus, le RVD pré-incubé avec le générateur de $^1\text{O}_2$ n'est plus capable de se lier à l'ADN. Finalement, un ajout de DTT après oxydation ne permet pas de restaurer le complexe, contrairement à l'oxydation par H_2O_2 ou $\text{NO}^\bullet$, qui sont connus pour oxyder les doigts de zinc en disulfures. Ainsi, les auteurs proposent que $^1\text{O}_2$ oxyde efficacement les doigts de zinc, que cela conduit à la destruction du domaine doigt de zinc, et que les produits formés sont des acides sulfiniques ou sulfoniques et/ou des thiosulfonates. Cependant, les produits n'ont pas été identifiés. Précisons que ces protéines n'ont pas de rôle de détection ou de signalisation du stress oxydant, mais ont été utilisées comme un modèle.

Bien que cette étude soit la première à présenter la réaction d'un doigt de zinc avec $^1\text{O}_2$, elle reste pauvre en information : pas de caractérisation des produits d'oxydations, avancement non-maîtrisé (on ne sait pas s'il y a eu de la suroxydation), etc...

ChrR est une protéine à doigt de zinc qui a été découverte chez *Rhodobacter sphaeroides*, une bactérie photosynthétique, par l'équipe de Donohue : ils l'ont caractérisée^[1,120] et ont étudié sa réactivité.^[1,24,121] Ils ont montré que cette protéine est nécessaire à l'expression de la réponse spécifique contre $^1\text{O}_2$ chez la bactérie.

Si $^1\text{O}_2$ semble être son activateur physiologique, ils ont aussi montré que d'autres stress peuvent déclencher la réponse médiée par ChrR, notamment le traitement par le tert-butyl hydroperoxyde^[24]. Or, on l'a vu, les peroxydes sont capables d'oxyder les sites doigt de zinc, ce qui suggère que la première étape de l'expression d'une réponse médiée par ChrR pourrait être l'oxydation du site doigt de zinc de ChrR. Cela a néanmoins été nuancé par Lourenço et collaborateurs^[122], puisqu'ils ont montré que les acides aminés importants pour la réponse à $^1\text{O}_2$ ne sont pas les mêmes que pour le peroxyde organique, ce qui indiquerait des mécanismes/voies d'activations différent(e)s. Mais il est très intéressant de noter que ce site est très proche de celui de RsrA, une protéine dont le doigt de zinc est déjà décrit comme un interrupteur redox^[15]. En revanche, tandis que RsrA est oxydée par H_2O_2 , ChrR, dans les mêmes conditions, n'induit pas de réponse à cet oxydant. Il semble donc que malgré leur proximité, ces deux protéines ont des réactivités différentes. Le mécanisme d'activation de ChrR ainsi que sa ressemblance à RsrA seront décrits en détails en début de Chapitre B.IV.

Tout récemment, une protéine cruciale pour l'expression d'une réponse à $^1\text{O}_2$ a été décrite chez *Chlamydomonas reinhardtii* : MBS^[123]. Cette protéine est nommée ainsi pour « Methylene Blue Sensitivity ». Les auteurs ont montré que cette protéine est conservée chez les plantes, et que son rôle y est tout aussi important. Sa surexpression élève la tolérance d'*Arabidopsis thaliana* au stress lumineux (dont le médiateur principal est $^1\text{O}_2$ ^[124]). Ils ont montré que cette protéine n'a pas d'activité de détoxification (destruction de l'oxygène singulet dans la cellule), mais seulement de signalisation. C'est une petite protéine (101 acides aminés) possédant un doigt de zinc de type $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$ ^[123]. Les auteurs précisent que le seul motif vraiment identifiable dans les séquences des homologues de MBS, est celui du doigt de zinc. En revanche, le mécanisme moléculaire par lequel elle est activée, et le mécanisme par lequel elle exerce son activité, sont encore totalement inconnus.

Ainsi, parmi les rares protéines identifiées impliquées dans la détection de $^1\text{O}_2$, il y en a deux possédant un doigt de zinc. Alors, même si l'implication directe des sites doigt de zinc dans la détection de l'oxygène singulet n'a pas été montrée, la question est de tout intérêt.

5. Les objectifs de ce travail de thèse

Comme nous venons de le voir, il y a des exemples de protéines qui possèdent un doigt de zinc et qui jouent un rôle dans la réponse cellulaire à $^1\text{O}_2$, et des exemples de sites doigt de zinc ayant un rôle d'interrupteur redox déjà décrit. Néanmoins, il n'y a pas assez de données chimiques concernant la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de $^1\text{O}_2$ pour discuter la possibilité d'un rôle des doigts de zinc quant à la détection d'oxygène singulet dans la cellule. Ces données n'ont pu être apportées ni par l'utilisation de modèles inorganiques classiques, ni par l'utilisation des protéines entières. Nous proposons d'utiliser des modèles peptidiques qui présentent les avantages majeurs de l'utilisation d'un objet de petite taille, en gardant une grande pertinence biologique.

Ces travaux de thèse visent donc à apporter quelques éléments concernant cette réactivité, afin d'en avoir une meilleure compréhension. Cela passera par la caractérisation des produits d'oxydation, la mesure de vitesses d'oxydation, la mesure de l'affinité des produits d'oxydation pour le métal. De plus, si ces produits sont toujours capables de complexer le zinc, il serait bien d'avoir une idée de la structuration du peptide. En effet, l'oxydation pourrait, ou non, n'avoir aucun effet sur la structure du doigt de zinc (Schéma i.33).

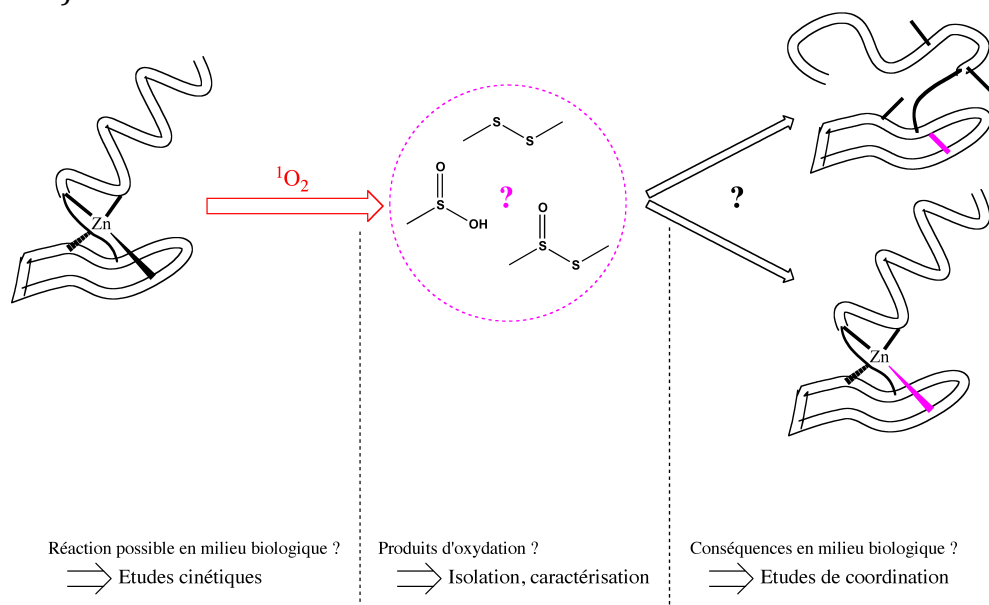


Schéma i.33 : Les objectifs du projet de thèse concernant la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de l'oxygène singulet.

En ce qui concerne la réactivité vis-à-vis de HOCl, les objectifs sont plus ciblés sur la vitesse d'oxydation. En effet, l'équipe de Jakob a montré que l'oxydation du doigt de zinc de Hsp33 par HOCl conduit à des disulfures^[29]. La conséquence de cette oxydation est évidente :

le zinc est relargué ce qui conduit au dépliement du site à zinc. En revanche, quelques questions restent sans réponse :

- Quelle est la vitesse d'oxydation d'un doigt de zinc par HOCl ?
- Cette réactivité vis-à-vis de HOCl est-elle spécifique au site à zinc de Hsp33 ?

De plus, il reste des aspects du mécanisme d'activation d'Hsp33 qui sont mal compris (présentés en détails en début de Chapitre A) et que nous aimerions éclaircir.

Références

- [1] E. C. Ziegelhoffer, T. J. Donohue, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 856–863.
- [2] B. B. Fischer, É. Hideg, A. Krieger-Liszkay, *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, 18, 2145–2162.
- [3] J. Glaeser, A. M. Nuss, B. A. Berghoff, G. Klug, *Adv. Microb. Physiol.* **2011**, 58, 141–173.
- [4] M. B. Hampton, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn, *Blood* **1998**, 92, 3007–3017.
- [5] C. C. Winterbourn, in *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.
- [6] M. L. Aiken, R. G. Painter, Y. Zhou, G. Wang, *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, 53, 2308–2317.
- [7] C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, 18, 642–660.
- [8] D. T. Sawyer, J. S. Valentine, *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 393–400.
- [9] R. S. Flannagan, G. Cosío, S. Grinstein, *Nat Rev Micro* **2009**, 7, 355–366.
- [10] W. T. Lowther, A. C. Haynes, *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, 15, 99–109.
- [11] B. D'Autréaux, M. B. Toledano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 813–824.
- [12] C. M. Cremers, U. Jakob, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 26489–26496.
- [13] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 3173–3178.
- [14] M. Ilbert, P. C. F. Graf, U. Jakob, *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, 8, 835–846.
- [15] K.-D. Kröncke, L.-O. Klotz, *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, 11, 1015–1027.
- [16] C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, *PLoS ONE* **2011**, 6, e26325.
- [17] S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 532–550.
- [18] B. Demple, B. Sedgwick, P. Robins, N. Totty, M. D. Waterfield, T. Lindahl, *PNAS* **1985**, 82, 2688–2692.
- [19] C. He, J.-C. Hus, L. J. Sun, P. Zhou, D. P. G. Norman, V. Dötsch, H. Wei, J. D. Gross, W. S. Lane, G. Wagner, et al., *Molecular Cell* **2005**, 20, 117–129.
- [20] Y. Lin, V. Dötsch, T. Wintner, K. Peariso, L. C. Myers, J. E. Penner-Hahn, G. L. Verdine, G. Wagner, *Biochemistry* **2001**, 40, 4261–4271.
- [21] J. G. Kang, M. S. B. Paget, Y. J. Seok, M. Y. Hahn, J. B. Bae, J. S. Hahn, C. Kleanthous, M. J. Buttner, J. H. Roe, *Embo J.* **1999**, 18, 4292–4298.
- [22] M. S. Paget, V. Molle, G. Cohen, Y. Aharonowitz, M. J. Buttner, *Mol. Microbiol.* **2001**, 42, 1007–1020.
- [23] M. Ilbert, P. C. F. Graf, U. Jakob, *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, 8, 835–846.
- [24] E. A. Campbell, R. Greenwell, J. R. Anthony, S. Wang, L. Lim, K. Das, H. J. Sofia, T. J. Donohue, S. A. Darst, *Mol. Cell* **2007**, 27, 793–805.
- [25] L.-O. Klotz, K.-D. Kröncke, H. Sies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 88–94.
- [26] U. Jakob, W. Muse, M. Eser, J. C. Bardwell, *Cell* **1999**, 96, 341–352.
- [27] C. Kumsta, U. Jakob, *Biochemistry* **2009**, 48, 4666–4676.
- [28] M. Ilbert, J. Horst, S. Ahrens, J. Winter, P. C. F. Graf, H. Lilie, U. Jakob, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, 14, 556–563.
- [29] J. Winter, M. Ilbert, P. C. F. Graf, D. Ozcelik, U. Jakob, *Cell* **2008**, 135, 691–701.

- [30] J. J. Wilker, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8682–8683.
- [31] J. J. Wilker, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 969–978.
- [32] M. Rombach, J. Seebacher, M. Ji, G. Zhang, G. He, M. M. Ibrahim, B. Benkmil, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4571–4575.
- [33] J. N. Smith, Z. Shirin, C. J. Carrano, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 868–869.
- [34] G. Frison, G. Ohanessian, *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 416–433.
- [35] D. Picot, G. Ohanessian, G. Frison, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 8167–8178.
- [36] D. Picot, G. Ohanessian, G. Frison, *Comptes Rendus Chimie* **2009**, *12*, 546–553.
- [37] S.-J. Chiou, C. G. Riordan, A. L. Rheingold, *PNAS* **2003**, *100*, 3695–3700.
- [38] E. Boulès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 13762–13772.
- [39] P. Nagy, M. T. Ashby, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14082–14091.
- [40] R. Kassim, C. Ramseyer, M. Enescu, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 5407–5416.
- [41] R. Alves de Sousa, E. Galardon, M. Rat, M. Giorgi, I. Artaud, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 690–697.
- [42] S. J. Lee, J. L. Michalek, A. N. Besold, S. E. Rokita, S. L. J. Michel, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 5442–5450.
- [43] S. J. Lee, S. L. J. Michel, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 1211–1219.
- [44] B. A. Krizek, B. T. Amann, V. J. Kilfoil, D. L. Merkle, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518–4523.
- [45] Y. Xu, D. E. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7375–7376.
- [46] M. Gennari, M. Retegan, S. DeBeer, J. Pécaut, F. Neese, M.-N. Collomb, C. Duboc, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 10047–10055.
- [47] M. Isaac, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3409–3420.
- [48] O. Sénèque, E. Bonnet, F. L. Joumas, J.-M. Latour, *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 4798–4810.
- [49] O. Sénèque, E. Boulès, V. Lebrun, E. Bonnet, P. Dumy, J.-M. Latour, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 6888–6891.
- [50] A. T. Maynard, D. G. Covell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1047–1058.
- [51] Y.-M. Lee, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8691–8703.
- [52] D. C. Crans, J. J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 849–902.
- [53] L. Simchowicz, P. D. Weer, *J. Gen. Physiol.* **1986**, *88*, 167–194.
- [54] S.-K. Ko, S. K. Kim, A. Share, V. M. Lynch, J. Park, W. Namkung, W. Van Rossom, N. Busschaert, P. A. Gale, J. L. Sessler, et al., *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 885–892.
- [55] B. W. Parker, E. A. Schwessinger, U. Jakob, M. J. Gray, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 32574–32584.
- [56] M. J. Gray, W.-Y. Wholey, B. W. Parker, M. Kim, U. Jakob, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 13789–13798.
- [57] A. Drazic, H. Miura, J. Peschek, Y. Le, N. C. Bach, T. Kriehuber, J. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 9493–9498.
- [58] X. L. Armesto, M. Canle L, M. I. Fernández, M. V. García, J. A. Santaballa, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1103–1109.
- [59] J. P. Crow, J. S. Beckman, J. M. McCord, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3544–3552.
- [60] N. L. Cook, D. I. Pattison, M. J. Davies, *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, *53*, 2072–2080.
- [61] X. Fu, S. Y. Kassim, W. C. Parks, J. W. Heinecke, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41279–41287.
- [62] P. R. Ogilby, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181–3209.
- [63] F. M. Cabrerizo, J. Arnbjerg, M. P. Denofrio, R. Erra-Balsells, P. R. Ogilby, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 796–798.
- [64] A. Knak, J. Regensburger, T. Maisch, W. Bäuml, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 820–829.

- [65] J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat, P. Di Mascio, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 903–911.
- [66] C. Triantaphylidès, M. Havaux, *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 219–228.
- [67] M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L. Anderson, K. Suhling, P. R. Ogilby, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 69–73.
- [68] C. Schweitzer, R. Schmidt, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685–1758.
- [69] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24*, 663–677.
- [70] X. Ragàs, M. Agut, S. Nonell, *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 770–776.
- [71] J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. de Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. de Fátima Turchiello, M. S. Baptista, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2*, 175–191.
- [72] R. C. Allen, R. L. Stjernholm, R. H. Steele, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *47*, 679–684.
- [73] A. M. Held, J. K. Hurst, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *81*, 878–885.
- [74] A. M. Held, D. J. Halko, J. K. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5732–5740.
- [75] J. R. Kanofsky, *Chemico-Biological Interactions* **1989**, *70*, 1–28.
- [76] C. Kiryu, M. Makiuchi, J. Miyazaki, T. Fujinaga, K. Kakinuma, *FEBS Lett.* **1999**, *443*, 154–158.
- [77] R. Renirie, C. Pierlot, J.-M. Aubry, A. F. Hartog, H. E. Schoemaker, P. L. Alsters, R. Wever, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 849–858.
- [78] M. J. Steinbeck, A. U. Khan, M. J. Karnovsky, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13425–13433.
- [79] J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, S. J. Weiss, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9692–9696.
- [80] Y. Nishinaka, T. Arai, S. Adachi, A. Takaori-Kondo, K. Yamashita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *413*, 75–79.
- [81] L. J. Palmer, P. R. Cooper, M. R. Ling, H. J. Wright, A. Huissoon, I. L. C. Chapple, *Clin. Exp. Immunol.* **2012**, *167*, 261–268.
- [82] Y. Arai, Y. Nishinaka, T. Arai, M. Morita, K. Mizugishi, S. Adachi, A. Takaori-Kondo, T. Watanabe, K. Yamashita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443*, 556–561.
- [83] H. Parker, C. C. Winterbourn, *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 424.
- [84] J. Massari, R. Tokikawa, D. B. Medinas, J. P. F. Angeli, P. Di Mascio, N. A. Assunção, E. J. H. Bechara, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20761–20768.
- [85] S. Miyamoto, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6172–6179.
- [86] E. Skovsen, J. W. Snyder, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8570–8573.
- [87] J. W. Snyder, E. Skovsen, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14558–14559.
- [88] A. Sedoud, R. López-Igual, A. Ur Rehman, A. Wilson, F. Perreau, C. Boulay, I. Vass, A. Krieger-Liszkay, D. Kirilovsky, *Plant Cell* **2014**, *26*, 1781–1791.
- [89] R. G. L. op den Camp, D. Przybyla, C. Ochsenbein, C. Laloi, C. Kim, A. Danon, D. Wagner, E. Hideg, C. Göbel, I. Feussner, et al., *Plant Cell* **2003**, *15*, 2320–2332.
- [90] A. Krieger-Liszkay, C. Fufezan, A. Trebst, *Photosyn. Res.* **2008**, *98*, 551–564.
- [91] H. K. Ledford, B. L. Chin, K. K. Niyogi, *Eukaryotic Cell* **2007**, *6*, 919–930.
- [92] F. Ramel, S. Birtic, C. Ginies, L. Soubigou-Taconnat, C. Triantaphylidès, M. Havaux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 5535–5540.
- [93] C. Kim, R. Meskauskiene, K. Apel, C. Laloi, *EMBO reports* **2008**, *9*, 435–439.
- [94] G. N. Bosio, T. Breitenbach, J. Parisi, M. Reigosa, F. H. Blaikie, B. W. Pedersen, E. F. F. Silva, D. O. Mártire, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 272–279.
- [95] M. J. Davies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 761–770.
- [96] M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 93–109.
- [97] D. I. Pattison, A. S. Rahmanto, M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *11*, 38–53.

- [98] R. L. Jensen, J. Arnbjerg, H. Birkedal, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7166–7173.
- [99] F. Jensen, A. Greer, E. L. Clennan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4439–4449.
- [100] E. Bourles, R. Alves de Sousa, E. Galardon, M. Giorgi, I. Artaud, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6162–6165.
- [101] E. Galardon, E. Bourles, I. Artaud, J.-C. Daran, P. Roussel, A. Tomas, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 4515–4522.
- [102] T. P. Devasagayam, A. R. Sundquist, P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **1991**, *9*, 105–116.
- [103] M. Rougee, R. V. Bensasson, E. J. Land, R. Pariente, *Photochem. Photobiol.* **1988**, *47*, 485–489.
- [104] D. Zhang, B. Hernandez, M. Selke, *Journal of Sulfur Chemistry* **2008**, *29*, 377–388.
- [105] B. Biteau, J. Labarre, M. B. Toledano, *Nature* **2003**, *425*, 980–984.
- [106] R. W. Murray, S. L. Jindal, *Photochemistry and Photobiology* **1972**, *16*, 147–151.
- [107] H. Ueki, G. Chapman, M. T. Ashby, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 1670–1676.
- [108] A. Michaeli, J. Feitelson, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 284–289.
- [109] Y. Nagaoka, K. Otsu, F. Okada, K. Sato, Y. Ohba, N. Kotani, J. Fujii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 215–223.
- [110] D. Suto, Y. Iuchi, Y. Ikeda, K. Sato, Y. Ohba, J. Fujii, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *461*, 151–158.
- [111] C. A. Grapperhaus, M. Y. Darensbourg, L. W. Sumner, D. H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1791–1792.
- [112] C. A. Grapperhaus, M. J. Maguire, T. Tuntulani, M. Y. Darensbourg, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1860–1866.
- [113] C. Galvez, D. G. Ho, A. Azod, M. Selke, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3381–3382.
- [114] B. Hernandez, Y. Wang, D. Zhang, M. Selke, *Chem. Commun.* **2006**, 997–999.
- [115] W. B. Connick, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11620–11627.
- [116] Y. Zhang, K. D. Ley, K. S. Schanze, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7102–7110.
- [117] D. Zhang, Y. Bin, L. Tallorin, F. Tse, B. Hernandez, E. V. Mathias, T. Stewart, R. Bau, M. Selke, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 1676–1678.
- [118] C. A. Grapperhaus, M. Y. Darensbourg, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 451–459.
- [119] K.-D. Kröncke, L.-O. Klotz, C. V. Suschek, H. Sies, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13294–13301.
- [120] J. R. Anthony, J. D. Newman, T. J. Donohue, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 345–360.
- [121] R. Greenwell, T.-W. Nam, T. J. Donohue, *J. Mol. Biol.* **2011**, *407*, 477–491.
- [122] R. F. Lourenço, S. L. Gomes, *Mol. Microbiol.* **2009**, *72*, 1159–1170.
- [123] N. Shao, G. Y. Duan, R. Bock, *Plant Cell* **2013**, *25*, 4209–4226.
- [124] C. Triantaphylidès, M. Krischke, F. A. Hoeberichts, B. Ksas, G. Gresser, M. Havaux, F. Van Breusegem, M. J. Mueller, *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 960–968.

Chapitre A :

Réactivité de ZnL_{Hsp}
vis-à-vis de l'acide hypochloreux

Vincent Lebrun, Emilie Bourlès, Colette Lebrun, Jean-Luc Ravanat,
Jean-Marc Latour et Olivier Sénèque

1. Table of Contents

2. INTRODUCTION.....	69
1.1. MECANISME ACTUEL D'ACTIVATION DE LA PROTEINE HSP33	69
3. RESULTATS.....	72
2.1. DEVELOPPEMENT DU MODELE DU SITE A ZINC D'HSP33.....	72
3.2. CINETIQUE D'OXYDATION DE ZnL_{HSP} PAR H_2O_2	73
3.3. PRODUITS D'OXYDATION DE ZnL_{HSP} PAR H_2O_2 ET HOCL.....	74
2.4. STABILITE DES ISOMERES BIS-DISULFURE DE L_{HSP}	78
2.5. UNE COMPETITION CINETIQUE ENTRE L'OXYDATION ET LE REARRANGEMENT DES DISULFURES	81
2.5. CINETIQUE D'OXYDATION DE ZnL_{HSP} PAR HOCL.....	82
4. DISCUSSION	89
3.1. CONFIRMATION DU MODELE PROPOSE	89
4.2. DU COMPLEXE MODELE A LA PROTEINE	92
5. CONCLUSION	95

Les résultats présentés dans ce chapitre sont le fruit d'un travail collectif, sur plusieurs années. Les auteurs à qui l'on doit chaque contribution seront précisés en temps utiles.

2. Introduction

1.1. Mécanisme actuel d'activation de la protéine Hsp33

Hsp33 confère aux bactéries une résistance au stress thermique et au stress oxydant. Plus précisément, des expériences *in vivo* ont prouvé l'implication de cette protéine dans la résistance à HOCl et à H_2O_2 (surtout lorsque ce dernier est combiné à une température élevée)^[1,2]. Des études *in vitro* ont montré que son activation est déclenchée par oxydation directe de la protéine par une espèce oxydante (HOCl ou H_2O_2). Cependant, plusieurs différences de comportement ont été observées lors de l'activation de Hsp33, selon que HOCl ou H_2O_2 était utilisé. Le mécanisme d'activation illustré Figure A.1. (A) interprète ces différences au niveau moléculaire.

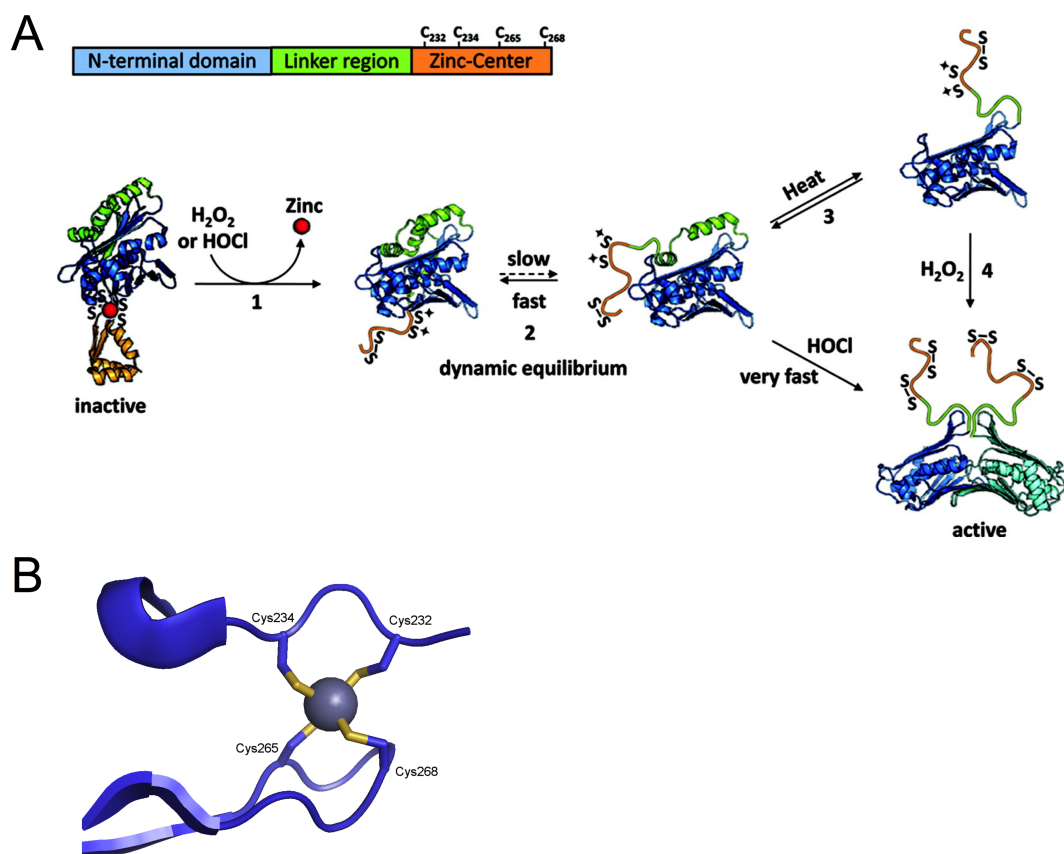


Figure A.1 : L'activité de Hsp33 est déclenchée par l'oxydation de son site à zinc. (A) Mécanisme d'activation de la protéine Hsp33 (figure issue de Kumsta *et al.*^[3]). La figure est décrite dans le texte. (B) Gros plan sur le site doigt de zinc de Hsp33. L'ion Zn^{2+} est représenté par une sphère, et les cystéines qui lui sont coordonnées, en bâton.

En l'absence de stress, oxydant ou thermique, Hsp33 est monomérique et inactive. Les quatre cystéines du site sont liées à l'ion Zn^{2+} .

(1) L'exposition à des oxydants conduit à la formation d'un premier pont disulfure, ce qui libère l'ion Zn^{2+} et déclenche le dépliement du domaine doigt de zinc (en jaune).

(2) Ce dépliement déstabilise la région adjacente thermosensible (en vert), qui est alors en équilibre dynamique entre une conformation repliée et une autre partiellement dépliée. En absence de stress thermique, l'équilibre favorise la forme repliée, où l'accès aux cystéines restantes est encombré. Ainsi, les oxydants cinétiquement lents (comme H_2O_2) ne sont pas en mesure de les oxyder, donc, d'activer Hsp33.

(3) Des conditions dénaturantes douces (température élevée par exemple) déplacent l'équilibre vers la forme dépliée, et permettent à H_2O_2 d'induire un deuxième pont disulfure, dans la paire de cystéines restantes.

(4) Cela conduit à la dimérisation de Hsp33 pour former une chaperonne à haute activité. Dans le cas de l'oxydation par HOCl, la première étape est la même qu'avec H_2O_2 . En revanche, même à basse température (5°C), l'oxydation de Hsp33 par HOCl conduit à son activation. C'est pourquoi, sur le schéma, il y a un passage direct de la forme mono-disulfure, avec le domaine thermosensible partiellement déplié, à la forme active.

Ce mécanisme s'appuie sur de nombreuses observations, notamment en ce qui concerne l'état redox des cystéines liées au zinc. Ce site doigt de zinc (Figure A.1 (B)) est constitué d'une épingle β , formée par deux feuillets β anti-parallèles, et d'une partie étendue, sans structure canonique. Chacune de ces deux composantes apporte deux ligands (cystéinates) du zinc. L'épingle β contient le motif $\text{C}_{265}\text{KWC}_{268}$ (CX_2C) et la partie linéaire contient le motif $\text{C}_{232}\text{DC}_{234}$ (CXC).

Jakob et collaborateurs^[1,2,4] ont isolé la forme active de Hsp33, après oxydation par H_2O_2 à 43°C. L'analyse en spectrométrie de masse des fragments issus de leur digestion enzymatique révèle que les disulfures pontent les cystéines Cys_{232} - Cys_{234} et Cys_{265} - Cys_{268} ^[4]. L'oxydation de Hsp33 par H_2O_2 à 30°C, en revanche, conduit à une protéine oxydée, mais sans activité. D'après l'analyse en masse d'un échantillon prélevé lorsque cette oxydation est achevée, les deux cystéines du fragment 232-236 sont oxydées (et le produit de cette oxydation peut être réduit au DTT). Cependant, un échantillon de la protéine a été prélevé alors que l'oxydation n'était pas terminée^[1]. L'analyse en masse révèle que sur le fragment 232-236, une seule des deux cystéines (232 ou 234) est oxydée. Notons que, dans cette étude, le fragment portant les cystéines 265 et 268 n'est pas détecté.

Ainsi, interprété au niveau du site à zinc, le mécanisme d'activation proposé par Jakob et collaborateurs est représenté sur le Schéma A.1 (A). La première oxydation (1) du site à zinc formerait un pont disulfure entre les cystéines 265 et 268, et la deuxième oxydation (2), les cystéines 232 et 234. La première oxydation serait rapide, et la deuxième serait l'étape cinétiquement déterminante. C'est lors de cette deuxième étape que le dépliement du domaine thermosensible par la température serait important. La protéine isolée lors de l'oxydation par H_2O_2 à 30°C, présentait un fragment 232-236 avec une seule cystéine oxydée. Cette forme a été interprétée comme étant l'intermédiaire de cette étape (2), possédant un disulfure Cys₂₆₅-Cys₂₆₈ et un acide sulfénique sur une des deux cystéines 232/234 (Schéma A.1 (B)). À 30°C, la formation du disulfure dans la paire Cys₂₃₂-Cys₂₃₄ serait lente, alors qu'elle serait rapide à 43°C.

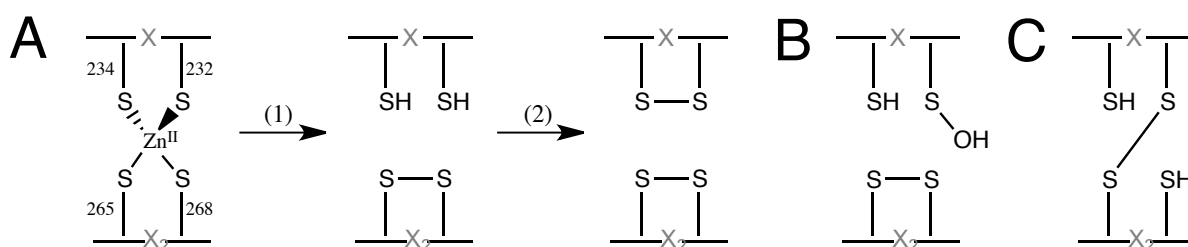


Schéma A.1 : Oxydation du site à zinc de Hsp33 menant à son activation. (A) Tandis que l'étape (1) est supposée rapide, il est proposé que l'étape (2) soit l'étape cinétiquement déterminante. Dans le cas de l'activation par H_2O_2 , ce serait cette étape qui nécessite à la fois la présence de l'oxydant et d'une température élevée. (B) Espèce observée au bout de 1h d'oxydation de Hsp33 par H_2O_2 à 30°C, d'après l'interprétation des spectres de masse. Ce serait l'intermédiaire réactionnel de l'étape (2). (C) Interprétation alternative à B.

Malgré tout, certains points ont attiré notre attention.

D'abord, ce mécanisme d'oxydation n'explique pas que l'activation par HOCl ne dépende pas de la température. En effet, l'oxydation par H_2O_2 et par HOCl suit le même mécanisme (Schéma A.1 (A)), passe par les mêmes intermédiaires. Ainsi, les effets de la température sur l'activité de la protéine devraient être les mêmes quel que soit l'oxydant. L'accessibilité des cystéines a aussi été discutée, mais là encore, étant donnée la similarité chimique de HOCl et H_2O_2 , elle ne peut pas expliquer les différences observées.

Ensuite, la proposition de l'intermédiaire réactionnel de l'étape (2) avec un acide sulfénique qui réagirait lentement avec une cystéine très proche (éloignée de seulement un acide aminé) est surprenante : cette réaction est habituellement décrite comme étant très rapide^[5]. Cette hypothèse a été émise sur la base de (i) l'observation qu'une des deux cystéines 232/234 est oxydée (acide sulfénique ou implication dans un pont disulfure), et de (ii) la supposition que les cystéines 265 et 268 sont déjà liées entre elles par un pont

disulfure. Une autre interprétation de ces données, ne reposant pas sur la supposition (ii), est que l'une des cystéines 232/234 est liée par un pont disulfure à l'une des deux cystéines 265/268 (Schéma A.1 (C)). Ceci n'a pas été envisagé par Jakob et collaborateurs.

Enfin, la formation du pont disulfure dans la paire Cys₂₃₂-Cys₂₃₄ a été identifiée comme étant un point clef dans le passage de la forme réduite à la forme active de la protéine Hsp33le. Or, le motif CXC est très rare dans les sites doigt de zinc, et le pont disulfure qu'il forme est peu stable.

Le site à zinc de Hsp33 joue donc un rôle clef dans l'activation de la protéine. De plus, il présente des caractéristiques inhabituelles. L'utilisation d'un modèle vise donc à comprendre la réactivité de ce site et la présence du motif CXC plus profondément.

3. Résultats

2.1. Développement du modèle du site à zinc d'Hsp33

Cette première étape, la conception du modèle ZnL_{Hsp} et sa caractérisation, a déjà été publiée par Sénèque et coll.^[6]. Le site à zinc de Hsp33 (Figure A.1 (B)) a pu être modélisé correctement avec un peptide cyclique avec une queue linéaire (Figure A.2 (A)). Dans le peptide L_{Hsp}, la première paire est mimée par le motif C₁₁KNC₁₄ dans un cycle dont le couple D-Pro-L-Pro induit des contraintes d'angles favorisant le repliement du cycle en feuillets β anti-parallèles^[7]. Une queue linéaire est greffée sur la chaîne latérale d'une lysine du cycle. Elle contient la deuxième paire de cystéines sous forme du motif C₂EC₄ (Figure A.2 (A)). La synthèse est décrite dans la partie expérimentale.

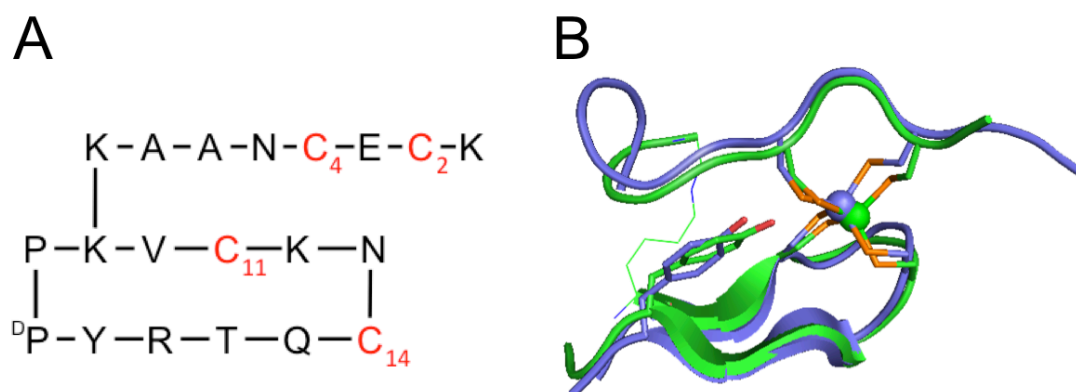


Figure A.2 : L_{Hsp}, un peptide pour modéliser le site doigt de zinc de Hsp33. (A) Séquence peptidique de L_{Hsp} avec numérotation des cystéines (en rouge) du N-ter vers le C-ter. (Remarque : la séquence de la partie linéaire est indiquée dans le sens non-conventionnel C-ter → N-ter pour être proche de la disposition du peptide dans la structure du complexe) (B) Superposition de la structure en solution (RMN ¹H) du complexe ZnL_{Hsp} et de la structure cristallographique de Hsp33 (pdb : 1VQ0).

La Figure A.2 B montre que la structure RMN de ZnL_{Hsp} et la structure cristallographique de la protéine se superposent très bien. Le complexe ZnL_{Hsp} est donc un bon modèle structural du site à zinc de Hsp33. De plus, pour bien reproduire la réactivité du site protéique, il est important de reproduire la seconde sphère de coordination du zinc : le réseau de liaisons hydrogène dans lesquelles sont impliqués les ligands (première sphère de coordination) du zinc. En effet, d'après la littérature, les liaisons hydrogène impliquant les atomes de soufre liés d'un site doigt de zinc modulent (diminuent) leur nucléophilie^[8-10]. Ici, les sept liaisons hydrogène qui impliquent les atomes de soufre du site à zinc de la protéine sont aussi présentes dans le modèle ZnL_{Hsp} , notamment celle impliquant la tyrosine, visible sur la Figure A.2 (B).

3.2. Cinétique d'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2

Afin de vérifier qu'en plus d'être un bon modèle structural de Hsp33, ZnL_{Hsp} est un bon modèle réactif, Sénèque et coll. ont mesuré la vitesse d'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 . Le mécanisme d'oxydation est présenté Figure A.3.

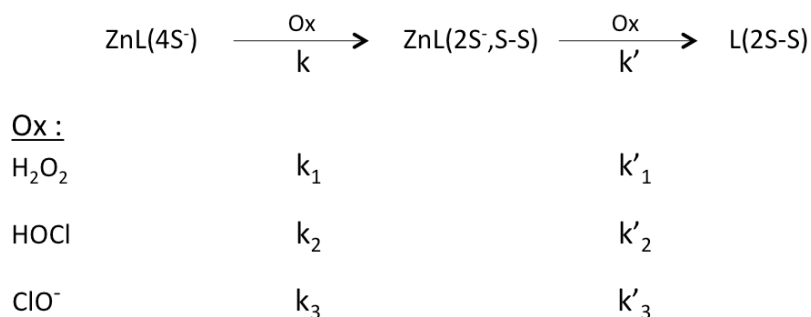


Figure A.3 : Oxydation séquentielle d'un complexe de type $\text{ZnL}(4\text{S}^-)$ en mono-disulfure, puis en bis-disulfure. Les constantes cinétiques associées à ces réactions sont indiquées, en fonction de l'oxydant impliqué.

L'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 est suffisamment lente pour être suivie par spectroscopie classique et par HPLC.

Ainsi, en suivant l'évolution d'un mélange $\text{ZnL}_{\text{Hsp}} / \text{H}_2\text{O}_2$ par HPLC (Figure A.4 (A)), il est possible de quantifier la disparition du complexe initial et l'apparition des produits d'oxydations : mono-disulfures et bis-disulfures. La caractérisation des espèces bis-disulfures est décrite plus bas. Le système a pu être simulé correctement avec un modèle cinétique $\text{A} \rightarrow \text{B} \rightarrow \text{C}$ (Figure A.4 (B)) ce qui est en accord avec le mécanisme schématisé Figure A.3. Ainsi,

Sénèque et coll. ont mesuré les constantes cinétiques d'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 à 25°C : $k_1 = 0,105(\pm 0,005) \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $k'_1 = 0,8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.^[11]

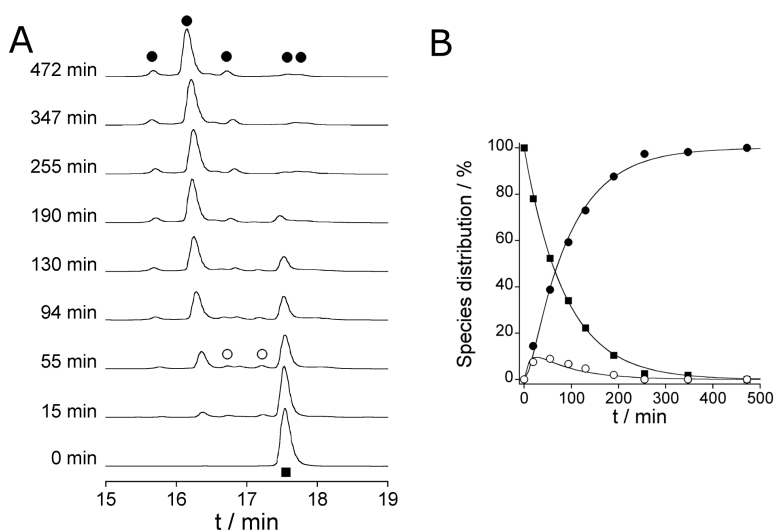


Figure A.4 : Suivi HPLC de l'oxydation de ZnL_{Hsp} (50 μM) par H_2O_2 (1,9 mM) dans tampon phosphate 50 mM pH 7,0. (A) Sur les chromatogrammes, suivi de la disparition de L_{Hsp} (■) et de l'apparition des espèces mono-disulfure (○) et bis-disulfure (●). (B) Evolution de la distribution de ces espèces au cours de l'oxydation. Les lignes représentent la simulation basée sur le modèle présenté Figure A.3, avec $k_1 = 0,105 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $k'_1 = 0,8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Cette valeur de k_1 a été confirmée par spectrophotométrie UV-Visible. En effet, un thiolate lié au Zn^{II} présente une bande de transfert de charge, du thiolate vers le zinc (LMCT), autour de 220 nm. A chaque disulfure formé, l'ion Zn^{II} perd deux thiols dans sa sphère de coordination. Ainsi, suivre l'absorbance à 220 nm d'une solution de ZnL_{Hsp} et de H_2O_2 permet de suivre directement l'oxydation des cystéines du complexe.

La vitesse d'oxydation de Hsp33 étant d'environ 0,13 à 30°C, ZnL_{Hsp} reproduit bien la réactivité du site à zinc de Hsp33^[11].

3.3. Produits d'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 et HOCl

L'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 a déjà été partiellement décrite par l'équipe^[11] : on observe l'apparition des trois isomères bis-disulfure possibles, ainsi que des dimères (deux peptides liés entre eux avec quatre ponts disulfures au total). La Figure A.5 présente le chromatogramme obtenu après oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 (en bleu). Les pics correspondant aux bis-disulfures ont des temps de rétention plus courts que celui du peptide réduit ($t_r = 17,4 \text{ min}$) : à $t_r = 12,6 \text{ min}$ (7%), $t_r = 14 \text{ min}$ (76%) et $t_r = 15,9 \text{ min}$ (7%). Les deux pics

correspondant aux espèces dimériques ont des temps de rétention plus longs que celui du peptide réduit : $t_r=19,3$ min (5%) et $t_r=20,1$ min (3%). Il reste 2% de produits non-identifiés.

D'après les mécanismes réactionnels déjà discutés, il devrait se former les mêmes produits lors de l'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl. Bien que le chromatogramme ainsi obtenu (en rouge Figure A.5) montre les mêmes pics que celui obtenu avec H_2O_2 , ils ont des intensités bien différentes. Cette fois, les pics à $t_r=12,6$, 14 et 15,9 min représentent respectivement 2, 10 et 81 % des produits d'oxydation, les dimères, 3% et les produits inconnus, 4%.

Le traitement à la TCEP (tris(carboxy-ethyl)phosphine), un agent réducteur, du mélange obtenu par oxydation du complexe par HOCl, fait disparaître tous les pics (identifiés) et restaure le pic initial. Ceci montre que les produits formés possèdent une liaison soufre-soufre (c'est-à-dire que ce sont des espèces de type disulfures ou thiosulfinate).

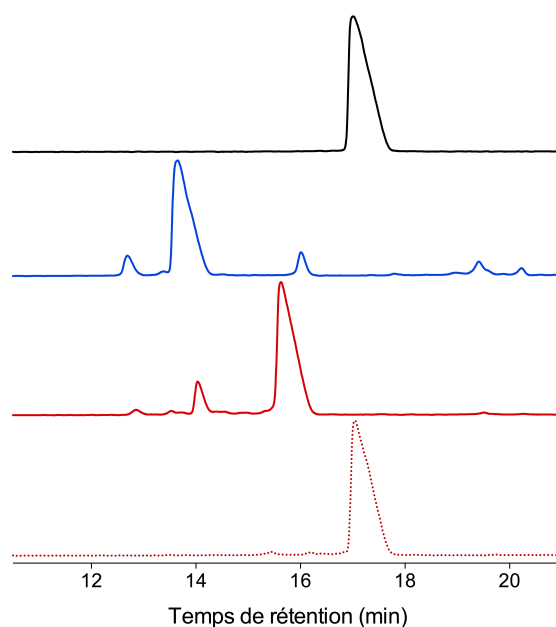


Figure A.5 : Produits issus de l'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl et H_2O_2 . Analyse par HPLC (214nm): ZnL_{Hsp} à 88 μ M dans 20mM Pi pH 7 (chromatogramme noir) est incubé avec 5,5mM de H_2O_2 pendant 13h (chromatogramme bleu). Une solution identique est oxydée par 2,4 équivalents de NaOCl, un aliquot est analysé (chromatogramme rouge) tandis qu'un autre est réduit au TCEP avant analyse (chromatogramme rouge, pointillés).

L'analyse en ESI-MS des pics isolés révèle que les trois premiers pics sont des espèces bis-disulfure (disulfures intra-moléculaires), tandis que les deux autres sont des dimères de peptides (deux peptides oxydés, liés par au moins un pont disulfure).

Dans ces espèces bis-disulfure, les 2 ponts disulfures qui impliquent les 4 cystéines sont arrangés de manières différentes. Ces 3 isomères possibles sont représentés Schéma A.2.

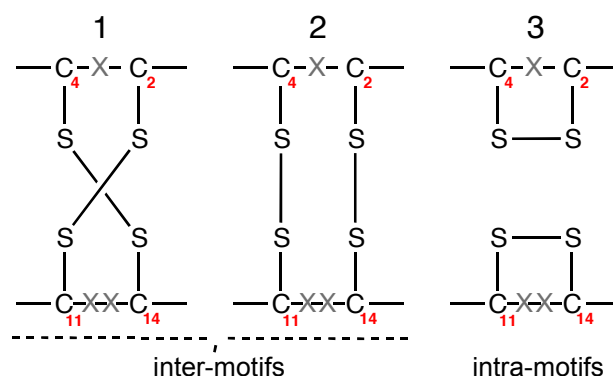


Schéma A.2 : Schéma représentant les trois isomères bis-disulfures de L_{Hsp}, numérotés de 1 à 3. Les 4 cystéines sont numérotées en rouge et sont agencées de manière à refléter leur positionnement tel qu'il est visible Figure A.2.

Ces trois isomères sont séparés en deux catégories. Dans la première, les ponts disulfures lient des cystéines appartenant à des motifs CX_nC (n=1 ou 2) différents (isomères **1** et **2**), ainsi, ces ponts disulfures sont dits inter-motifs. Dans la deuxième catégorie, les cystéines liées appartiennent au même motif CX_nC, comme dans l'isomère **3**, c'est pourquoi on les appelle ponts disulfures intra-motifs. Dans la suite, nous parlerons directement d'isomères intra ou inter-motifs (Schéma A.2).

Afin d'identifier ces différents isomères dans les produits d'oxydation, chacun des trois pics bis-disulfures a été isolé en HPLC puis digéré par la trypsine et la glutamate carboxypeptidase (Tableau A.1). Ces digestions ont été faites sur une nuit, à 37°C, dans un tampon phosphate à pH 7,7 (voir détails dans la Partie Expérimentale). L'indication des coupures attendues dans la séquence peptidique (Schéma A.3) permet de calculer la masse des différents fragments attendus.

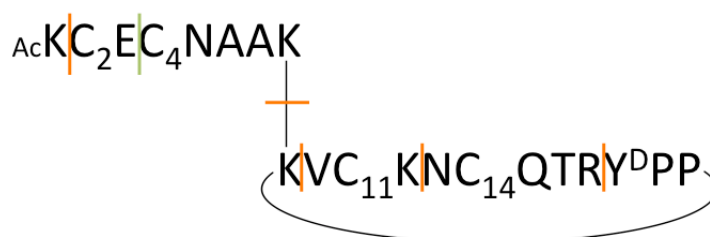


Schéma A.3 : Carte de digestion de L_{Hsp} par la trypsine et la glutamate carboxypeptidase. Les séquences du cycle et de la partie linéaire sont écrites dans le sens N-ter → C-ter. Les coupures faites par la trypsine sont indiquées en orange, et celles faites par la GluC, en vert.

Fragments	Masse exacte (g/mol)	Pic tr=12,6min	Pic tr=14min	Pic tr=15,9min
$\overline{C_2EC_4NAAK}$	735,27			736,23(+) 368,56(2+)
$\overline{VC_{11}K} \quad \overline{NC_{14}QTR}$	966,44			967,45(+) 484,17(2+)
$\overline{C_2E} \quad \overline{NC_{14}QTR}$	868,31		869,3(+) 435,1(2+)	
$\overline{C_4NAAK} \quad \overline{VC_{11}K}$	851,4		852,4(+) 426,62(2+)	
$\overline{C_2E} \quad \overline{VC_{11}K}$	596,23	597,18(+) 299,1(2+)		
$\overline{C_4NAAK} \quad \overline{NC_{14}QTR}$	1123,48	562,71(2+)		

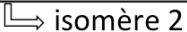
 isomère 1
 isomère 2
 isomère 3

Tableau A.1 : Identification des isomères de bis-disulfures L_{Hsp} par digestion enzymatique. Les pics à tr=12,6, 14 et 15,9 minutes ont été isolés par HPLC, puis digérés à la trypsine et à la Glutamate carboxy-peptidase, et analysés en HPLC couplée à un spectromètre de masse (LC-MS). Les pics m/z détectés sont affichés en face des fragments correspondants. Un tableau plus complet est présenté dans la partie expérimentale.

Chaque digestion est analysée en LC-MS, ce qui facilite la lecture des spectres de masse puisque les différents fragments sont séparés. Pour l'espèce bis-disulfure élue à tr=12,6 min, deux fragments comportant des cystéines ont été identifiés. Le premier est détecté en deux pics m/z de charges différentes : 597,18(+) et 299,1(2+). Ces pics expérimentaux correspondent aux pics théoriques $[M+H]^+=597,24$ et $[M+2H]^{2+}=299,12$ attendus pour le fragment où (C₂E) et (VC₁₁K) sont liés par un pont disulfure. L'autre fragment ne présente qu'un pic expérimental m/z=562,71(2+) ce qui correspond au pic théorique $[M+2H]^{2+}=562,75$ attendu pour le fragment où (C₄NAAK) et (NC₁₄QTR) sont liés par un pont disulfure. Puisque dans cette espèce bis-disulfure, les ponts disulfures lient la cystéine 2 avec la 11, et 4 avec la 14. On identifie, alors, l'espèce à tr=12,6min (Figure A.5) comme l'isomère **1** (Schéma A.2). Une démarche similaire est suivie pour identifier les deux autres espèces bis-disulfures : voir Tableau A.1.

En résumé, le pic tr=12,6 min correspond à l'isomère **1**, le pic tr=14 min à l'isomère **2** et le pic tr=15,9 min, à l'isomère **3**. (Figure A.5, Schéma A.2 et Tableau A.1)

Expérimentalement, les espèces dimériques ne sont observées qu'à des concentrations supérieures à 50µM de complexe peptidique lors de l'oxydation. En effet, elles se forment avec nos peptides car ils sont petits et très peu encombrés, ce qui permet des réarrangements de ponts disulfures inter-moléculaires. Plus la concentration en peptide est élevée, plus on favorise ces réactions bimoléculaires. En revanche, les rapports entre les isomères **1**, **2** et **3** ne sont pas modifiés par la présence ou l'absence des espèces dimériques. Ainsi, dans la suite, nous ignorerons ces espèces dimériques. Si l'on recalcule les proportions des produits en ignorant les espèces dimériques, l'oxydation de ZnL_{Hsp} par H₂O₂ forme 9% d'isomère **1**, 82%

d'isomère **2** et 9% s'isomère **3**, tandis que l'oxydation par HOCl en forme respectivement 3%, 13% et 84%.

Précédemment dans l'équipe, l'isomère **2** (inter-motifs majoritaire) avait été isolé par HPLC et étudié par RMN ^1H à une et deux dimensions. La résolution des pics indique que le peptide adopte une conformation bien définie et stable. La structure du complexe en solution avait été résolue (Figure A.6) à partir des spectres 2D (TOCSY, COSY et NOESY).

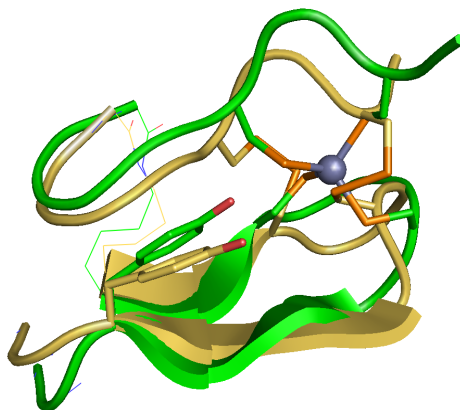


Figure A.6 : Superposition des structures RMN ^1H en solution de ZnL_{Hsp} (en vert) et de l'isomère **2** bis-disulfure L_{Hsp} (en jaune).

La superposition avec la structure de ZnL_{Hsp} (Figure A.6) montre clairement que dans l'isomère **2**, les ponts disulfures, entre les cystéines de la partie linéaire et celles du cycle, maintiennent le peptide dans une conformation proche de celle du doigt de zinc réduit. Ceci est vraisemblablement le cas pour l'isomère **1** car, comme l'isomère **2**, il possède des ponts disulfures inter-motifs.

Ceci est la raison pour laquelle, dans la suite, nous nous focaliserons sur les isomères inter-motifs (**1** et **2**) *versus* l'isomère intra-motif (**3**).

En plus des proportions des produits, une autre grande différence entre l'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl et celle par H_2O_2 , est que 2 équivalents de HOCl suffisent pour oxyder totalement ZnL_{Hsp} dans le temps de mélange, alors que l'oxydation par H_2O_2 est beaucoup plus lente, même avec de grandes concentrations d'oxydant.

2.4. Stabilité des isomères bis-disulfure de L_{Hsp}

Nous venons de voir que les oxydations de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 et par HOCl conduisent aux mêmes produits, mais en des proportions différentes. Si on regarde la distribution des

isomères inter-motifs (**1** et **2**) *versus* l'isomère intra-motif (**3**) (Figure A.7 (A)), il apparaît très clairement que l'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl forme majoritairement l'isomère intra-motifs, tandis que l'oxydation par H_2O_2 conduit majoritairement aux isomères inter-motifs. Ceci contraste nettement avec ce qui est observé pour un autre modèle, ZnL_{TC} , dont les quatre cystéines appartiennent à deux motifs CX_2C .

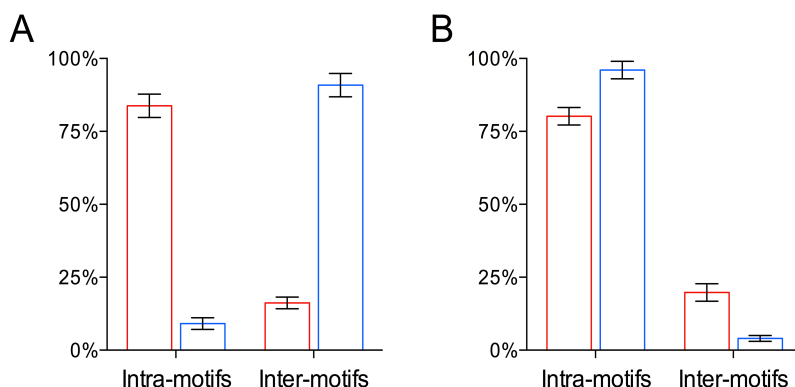


Figure A.7 : Quantification des espèces disulfures intra-motifs et inter-motifs, issues de l'oxydation de ZnL_{Hsp} (A) et de ZnL_{TC} (B) par H_2O_2 (en bleu) ou HOCl (en rouge).

Alors que les deux paires de cystéines présentent dans L_{TC} sont du type CX_2C , L_{Hsp} possède une paire CX_2C et une paire CXC . Non seulement ce motif est rare dans les sites doigt de zinc, mais le disulfure formé dans un tel motif est peu stable. En effet Zhang *et al.*^[12,13], en mesurant les stabilités relatives de différents types de ponts disulfures, ont montré que les disulfures à l'intérieur d'un motif CXC sont les moins stables d'un point de vue thermodynamique (Schéma A.4).

Notons que la cinétique k_0 (ouverture du disulfure CX_nC par une molécule de glutathion réduit, Schéma A.4) est supérieure pour un motif CXC comparé aux autres motifs : jusqu'à 190 fois celle d'un motif CX_2C . Un bon exemple est donné par la série YSRCAnC , n allant de 0 à 5. Le disulfure (intra-motifs) le moins stable est celui formé par le peptide avec 1 alanine, tandis que le plus stable est formé par celui avec deux alanines. La propension des motifs CXC à faire des disulfures inter-motifs est si forte qu'elle est utilisée en stratégie de synthèse pour faire des ponts disulfure de manière sélective^[14].

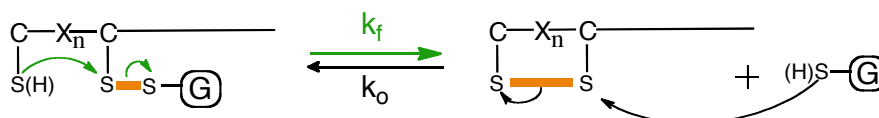


Schéma A.4 : Réactions de réarrangement d'un disulfure entre un motif CX_nC et une molécule de glutathion (**G**), observées par Zhang *et al.*^[13] et dont ils ont mesuré les cinétiques. k_f et k_o ont été mesurées pour une librairie de peptide de type YSRCX_nC où n variait de 0 à 5 et X variait en nature.

Plusieurs éléments semblent donc indiquer que l'isomère inter-motifs **2** est le produit thermodynamique tandis que l'isomère intra-motifs **3** est le produit cinétique:

- l'isomère majoritaire obtenu avec HOCl est l'isomère intra-motifs **3**
- le disulfure dans le motif CXC est peu stable
- l'oxydation du complexe par H_2O_2 est beaucoup plus lente que par HOCl
- les isomères inter-motifs **1** et **2** sont majoritaires lors de l'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2

Pour le vérifier, nous avons oxydé ZnL_{Hsp} avec les deux oxydants. Le résultat est présenté sur la Figure A.8 (B), en traits pleins (les produits ont sur cette figure des temps de rétentions différents de ceux figure A.5, car le gradient de solvant est différent, néanmoins, on reconnaît très bien la distribution des isomères bis-disulfure **1**, **2** et **3**). Pour chacune de ces oxydations, les différents produits ont été récoltés. En boîte à gants, ces produits ont été dissouts dans un tampon Pi pH 8, et mis en présence de 0,02 équivalents de cystéine libre pendant 12 heures (25°C). Ceci a permis aux différents disulfures de se réarranger (le mécanisme est représenté Figure A.8 (A)) pour former les produits dans des proportions thermodynamiques. Les chromatogrammes obtenus (Figure A.8 B) sont les mêmes que l'on parte des produits issus de l'oxydation par HOCl ou de ceux issus de l'oxydation par H_2O_2 . L'isomère intra-motifs **3** a complètement disparu, l'isomère inter-motifs **1** est présent en faible quantité (10%) et l'isomère inter-motifs **2** est très largement majoritaire (90%). Ce qui veut dire que la stabilité des isomères inter-motifs **1** et **2** est beaucoup plus grande que celle de l'isomère intra-motifs **3**. De plus l'isomère **2** est plus stable que l'isomère **1**.

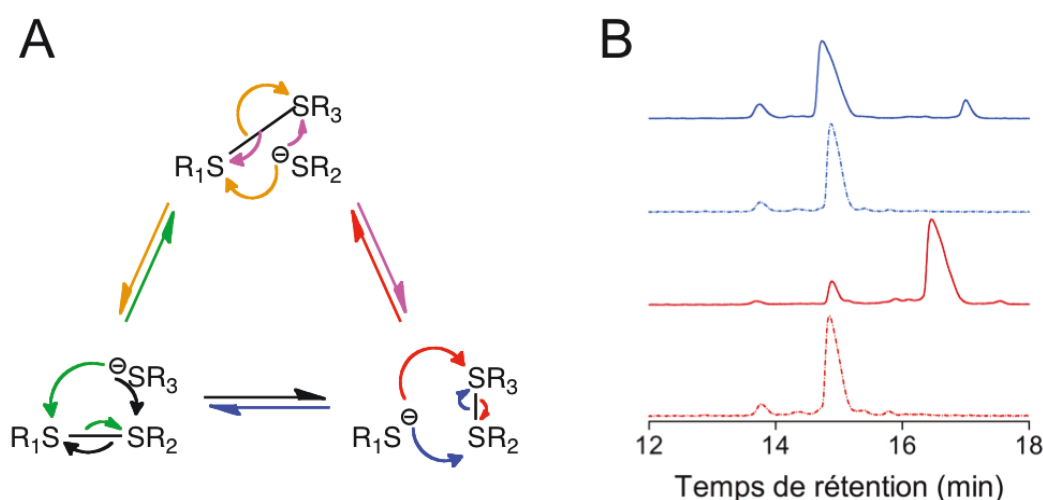


Figure A.8 : L'isomère bis-disulfure **3** est instable. (A) Schéma des mécanismes de réarrangement d'un pont disulfure entre trois thiols. (B) Après oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 (bleu, trait plein) et HOCl (rouge, trait plein), les espèces bis-disulfure ont été réarrangées en présence de thiol libre (rouge et bleu, tirets et pointillés).

Cette différence de stabilité s'explique d'abord par le disulfure dans le motif CXC, mais il peut aussi y avoir d'autres facteurs. Si l'on revient à la structure de l'isomère **2** (Figure A.6), on peut remarquer que la tyrosine a une position similaire à celle qu'elle occupe dans le complexe initial, elle reste enfouie entre le cycle et la partie linéaire. Les interactions hydrophobes sont conservées. Ces interactions stabilisent probablement les isomères inter-motifs, puisque ces interactions sont perdues dans le cas de l'isomère intra-motifs.

2.5. Une compétition cinétique entre l'oxydation et le réarrangement des disulfures

Jusqu'ici nous avons uniquement parlé des espèces bis-disulfures. Or, les réarrangements qui sont à l'œuvre dans ces équilibres, se font au niveau de l'intermédiaire mono-disulfure. En effet, l'oxydation d'un doigt de zinc de type $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ doit se faire par le même mécanisme séquentiel, que ce soit avec H_2O_2 ou HOCl (ceci est vérifié par notre étude cinétique, voir plus loin). Une première étape d'oxydation va ponter deux cystéines, et la deuxième oxydation va ponter les deux cystéines restantes. Autrement dit, avant la première oxydation, il n'y a pas de disulfure à réarranger, et après la seconde, il n'y a plus de thiolate pour induire les réarrangements.

C'est donc au niveau de l'intermédiaire mono-disulfure que se joue la compétition cinétique entre l'oxydation des cystéines et le réarrangement des ponts disulfures.

Dans la littérature, les cinétiques de réarrangement de disulfures intra-moléculaires s'échelonnent de 0,025 à 21 s^{-1} .^[12,13,15] D'un autre côté, si l'on se place dans un stress oxydant causé par 10mM de H_2O_2 à 25°C, le peptide va s'oxyder à une vitesse d'environ 10^{-3} s^{-1} et surtout, le mono-disulfure s'oxyde à $\sim 8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Ainsi, la cinétique de réarrangement des disulfures est plus grande que celle de la deuxième oxydation du peptide. Dans ces conditions, l'intermédiaire mono-disulfure se réarrange vers les isomères les plus stables plus vite qu'il ne s'oxyde. En revanche, dans le cas de l'oxydation par HOCl, la vitesse d'oxydation est probablement suffisamment rapide pour que ces réarrangements au niveau mono-disulfure ne se fasse pas.

Intéressons-nous, ensuite, au début de la réaction, c'est à dire, à l'isomère mono-disulfure généré par la première oxydation. Bien qu'il y ait six isomères possibles, nous faisons l'hypothèse que H_2O_2 et HOCl génèrent le même (majoritairement). Cette hypothèse se

base sur (i) le fait qu'ils vont attaquer les mêmes soufres (du fait de la ressemblance chimique de HOCl et H_2O_2) et (ii) le fait que l'acide sulfénique généré va évoluer de la même manière, qu'il soit généré par HOCl ou H_2O_2 .

Alors, le phénomène majoritaire que l'on observe peut être décrit très simplement (Schéma A.5) : quel que soit l'oxydant (HOCl ou H_2O_2), la première oxydation du complexe forme un disulfure dans le motif CXC. Dans le cas de HOCl, la deuxième oxydation est très rapide et conduit à l'isomère intra-motifs (3). En revanche, la deuxième oxydation par H_2O_2 est plus lente que le réarrangement des disulfures. Ainsi, le mono-disulfure est d'abord réarrangé en un mono-disulfure inter-motifs, plus stable, avant d'être oxydé en un bis-disulfure inter-motifs.

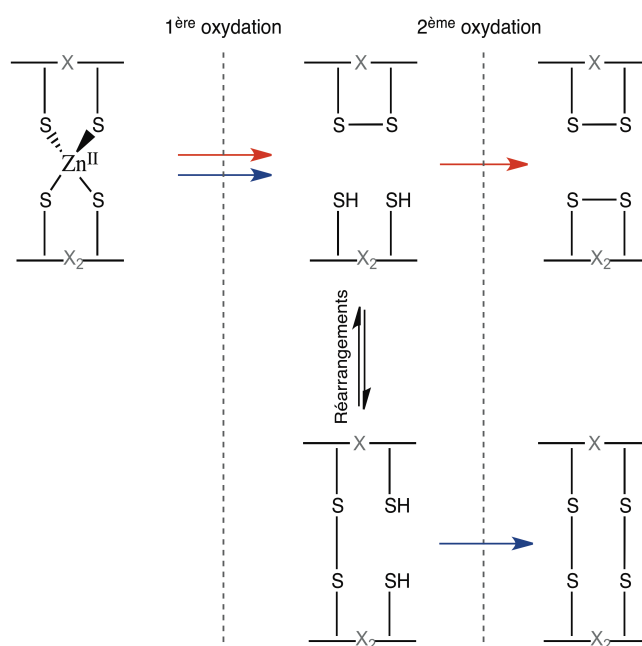


Schéma A.5 : Mécanisme simplifié illustrant notre hypothèse quant à l'origine des différences de proportions entre les produits d'oxydation de ZnL_{HSP} selon que l'oxydant soit H_2O_2 (voie bleue) ou HOCl (voie rouge).

Pour confirmer ce modèle, il nous faut vérifier que les données expérimentales d'oxydation par HOCl sont en accord avec lui. Autrement dit, il nous faut vérifier que

$$k_2 \text{ HOCl/ZnLHsp} \gg k_{\text{réarrangement disulfure}}.$$

2.5. Cinétique d'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl

L'acide hypochloreux est tellement réactif qu'il peut réagir avec d'autres chaînes latérales que celles des cystéines : les lysines et les tyrosines notamment. Il faut s'assurer que ces réactions ne sont pas compétitives de l'oxydation des soufres de notre complexe, car

sinon, cela revient à avoir un compétiteur dans le milieu, dont nous ne connaissons pas la vitesse de réaction avec HOCl. Pour ce faire, nous avons titré une solution de ZnL_{Hsp} par une solution de NaOCl (Figure A.9) en suivant la disparition de la bande de transfert de charge du thiolate vers le zinc.

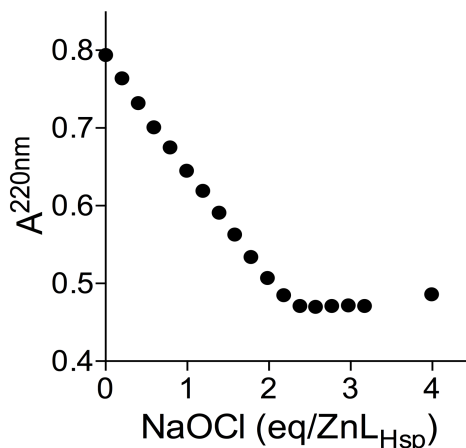


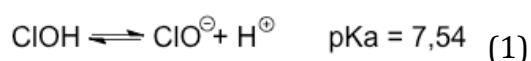
Figure A.9 : Disparition de la bande de transfert de charge à 220nm lors du titrage de ZnL_{Hsp} par NaOCl à pH 7,0 (20mM tampon phosphate).

Sur cette figure, on observe la disparition linéaire de la bande de transfert de charge du complexe jusqu'à 2 équivalents de NaOCl. L'absorbance décrit ensuite un plateau. Ceci est en accord avec l'oxydation des quatre cystéines du site à zinc par HOCl. De plus, l'absorbance à 250nm est quasi-stable (très légère augmentation) jusqu'à 2 équivalents, et augmente ensuite linéairement avec l'ajout de NaOCl. D'après Armesto *et al.*^[16], ceci peut correspondre à la bande de transfert de charge observé pour les chloramines. Dans notre titrage, les soufres du site à zinc seraient donc les premières cibles de HOCl, puis, lorsqu'ils sont oxydés, le HOCl excédentaire réagirait avec les amines du peptide (lysine). Mais, tant que la quantité de NaOCl ajoutée est inférieure à la quantité de peptide, nous ne considérerons que l'oxydation des cystéines.

Au laboratoire, il a été montré que lors de l'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 , il y a très peu d'accumulation de l'intermédiaire mono-disulfure, ce qui signifie que la deuxième oxydation se fait significativement plus vite que la première ($k_1' \gg k_1$), et donc, que l'étape cinétiquement limitante est la première^[11]. Nous avons vérifié que c'est aussi le cas pour HOCl : $k_2' > k_2$. En effet, lorsque le peptide est oxydé avec un défaut de HOCl, le chromatogramme montre que l'intermédiaire mono-disulfure est peu accumulé.

Nous avons commencé par mesurer la vitesse d'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl de manière directe. Comme précédemment, la disparition du complexe réduit lors de l'oxydation

par HOCl est mesurée directement en suivant la disparition de la bande de transfert de charge (thiolate $\rightarrow$ Zn^{II}) à 230nm au cours du temps. Ces mesures sont faites sur un appareil de cinétique rapide à écoulement bloqué (« stopped flow »). Les solutions de NaOCl et de ZnL_{Hsp}, thermostatées à 25°C, sont mélangées très rapidement juste avant de passer dans une cellule optique où l'absorbance à 230nm est suivie sur des temps très courts (de 50ms à 8s). Ces solutions sont préparées dans le même tampon phosphate 20mM, dont la force ionique est fixée à 0,62 (voir partie expérimentale). Afin d'être dans des conditions de pseudo-premier ordre, la concentration de NaOCl est au moins 20 fois plus élevée que celle du complexe. Des premiers essais à pH physiologique ont montré que la réaction était terminée en moins de 20ms, ce qui ne nous permettait pas de mesurer les cinétiques avec notre appareillage. Pour que ce suivi soit possible, il faut se mettre dans des conditions où la réaction est suffisamment lente. En solution, HOCl existe sous deux formes en équilibre^[17] :



Cette forme déprotonnée de HOCl, l'hypochlorite (ClO^-), peut aussi oxyder ZnL_{Hsp}. Néanmoins, elle est moins réactive que HOCl (généralement, de 3 à 5 ordres de grandeur)^[18,19]. Ainsi, en faisant ces mesures à haut pH : seule une très faible partie de l'acide hypochloreux sera sous forme acide, la réaction sera alors suffisamment lente pour être suivie.

Un exemple des données brutes obtenues est présenté Figure A.10.

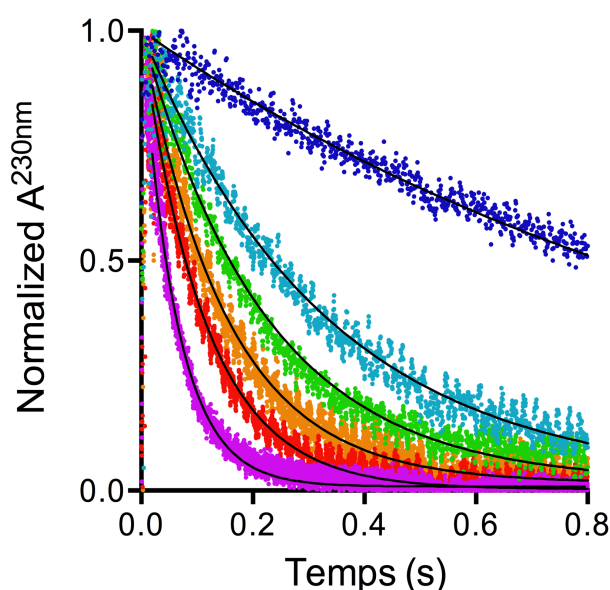


Figure A.10 : Mesure cinétique directe de l'oxydation de ZnL_{Hsp} par NaOCl à 25°C et à pH 12,6. Les points expérimentaux sont en couleur, et les simulations en mono-exponentielles, en noir.

Afin de vérifier la « robustesse » du modèle, les « tirs » en stopped flow ont été faits de deux manières différentes : soit en gardant constante la concentration de complexe et en faisant varier la concentration de NaOCl (bleus, vert), soit en gardant constant le rapport $[ZnL_{Hsp}]/[NaOCl]$ mais en diluant avec du tampon (orange, rouge, violet). Ces données ont été simulées avec une fonction mono-exponentielle (trait noir).

La Figure A.11 montre qu'il y a une dépendance linéaire des constantes de ces mono-exponentielles envers la concentration en NaOCl.

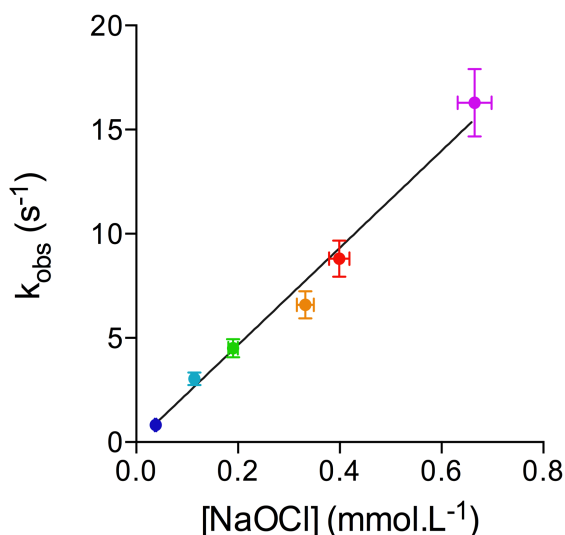


Figure A.11 : Détermination de $k_{2,3}$ apparent à pH 12,6 par régression linéaire des k_{obs} déterminés Figure A.10 à 25°C.

Ceci suggère donc que l'étape cinétiquement déterminante est un phénomène bimoléculaire. Ceci est cohérent avec notre hypothèse que cette étape est l'oxydation de ZnL_{Hsp} en mono-disulfure par une molécule d'oxydant. L'oxydation de ce mono-disulfure par une deuxième molécule d'oxydant pour former le bis-disulfure est plus rapide, et donc, peu visible sur ces suivis cinétiques.

La première oxydation est l'étape cinétiquement déterminante. Néanmoins, comme on l'a vu, elle peut être causée par HOCl et par ClO^- :

$$d[ZnL_{Hsp}]/dt_{(HOCl)} = k_2 \times [ZnL_{Hsp}] \times [HOCl] \quad (2)$$

$$d[ZnL_{Hsp}]/dt_{(ClO^-)} = k_3 \times [ZnL_{Hsp}] \times [ClO^-] \quad (3)$$

La décroissance observée correspond à la somme des deux, sans qu'on ne puisse connaître la contribution de chacun des deux oxydants. Aussi, la vitesse de la réaction s'écrit :

$$d[ZnL_{Hsp}]/dt = k_2 \times [ZnL_{Hsp}] \times [HOCl] + k_3 \times [ZnL_{Hsp}] \times [ClO^-] \quad (4)$$

$$= k_{2,3 \text{ apparent}} \times [ZnL_{Hsp}] \times [NaOCl]_{tot} \quad (5)$$

avec
$$k_{2,3 \text{ apparent}} = \frac{k_2 \times 10^{-\text{pH}} + k_3 \times 10^{-\text{pKa}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{pKa}}} \quad (6)$$

Or, étant donné que l'on se place dans des conditions de pseudo-premier ordre, on peut considérer que la concentration de NaOCl ne varie pas. L'équation (5) devient :

$$d[\text{ZnL}_{\text{Hsp}}]/dt = k_{\text{obs}} \times [\text{ZnL}_{\text{Hsp}}] \quad (7)$$

avec $k_{\text{obs}} = k_{2,3 \text{ apparent}} \times [\text{NaOCl}]_{\text{tot}} \quad (8)$

d'où $[\text{ZnL}_{\text{Hsp}}] = [\text{ZnL}_{\text{Hsp}}]_0 \times \exp(-k_{\text{obs}} \times t) \quad (9)$

De plus, puisque la variation de concentration de complexe est directement proportionnelle à la variation d'absorbance à 230nm, on a :

$$A^{230\text{nm}} = (A^{230\text{nm}_0} - b) \times \exp(-k_{\text{obs}} \times t) + A^{230\text{nm}_\infty} \quad (10)$$

Ainsi, de chaque mono-exponentielle, on obtient la constante de vitesse k_{obs} de la réaction, à une concentration de NaOCl donné, et pour un pH donné. La Figure A.11 montre que ces constantes k_{obs} s'alignent en fonction de la concentration en NaOCl à laquelle elles correspondent, en accord avec le modèle proposé. Cette pente correspond à la constante $k_{2,3 \text{ apparent}}$ qui est la constante cinétique de second ordre de l'oxydation de ZnL_{Hsp} par NaOCl à ce pH donné (ici 12,6).

Cette constante ne distingue pas l'oxydation due à HOCl et celle due à ClO^- . Cependant, en mesurant à différents pH, l'effet de la déprotonation de HOCl va se refléter dans les $k_{2,3 \text{ apparent}}$. Ces données expérimentales ont été simulées de manière satisfaisante (Figure A.12) en utilisant l'équation (6) avec les paramètres suivant : $k_2 = 9(\pm 3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_3 = 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $\text{pK}_{\text{a}}(\text{HOCl}/\text{ClO}^-) = 7,54$.

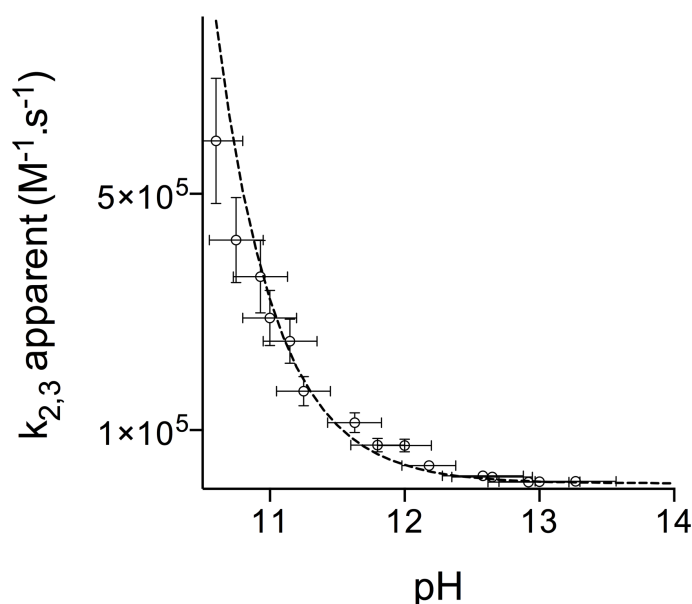


Figure A.12 : Détermination des constantes cinétiques k_2 et k_3 d'oxydation de ZnL_{Hsp} par NaOCl à 25°C. La dépendance au pH de $k_{2,3 \text{ apparent}}$ (points expérimentaux) est simulée (courbe en pointillés) en utilisant l'équation 6, avec les paramètres suivant : $k_2 = 9(\pm 3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_3 = 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $\text{p}K_{\text{a}}(\text{HOCl}/\text{ClO}^-) = 7,54$.

La constante de vitesse de réaction k_2 est très grande, cependant, elle a été mesurée à très haut pH, et n'est peut-être pas valable à pH physiologique. La réaction est trop rapide pour avoir des mesures fiables en mesure directe en dessous de pH 10,6. Aussi, pour pouvoir mesurer la vitesse d'oxydation du complexe par HOCl à pH physiologique, nous allons faire des expériences de compétition.

D'après Armesto *et al.*^[20] la constante cinétique de réaction de la méthionine avec HOCl (Schéma A.6) est $k_4 = 8,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. De plus, la méthionine réagit avec ClO^- avec une vitesse quasi-nulle, c'est pourquoi nous pouvons négliger cette réaction. Ainsi, le $k_4 \text{ apparent}$ ne tient compte que de k_4 et de l'état de protonation de HOCl, dépendant du pH de la solution.

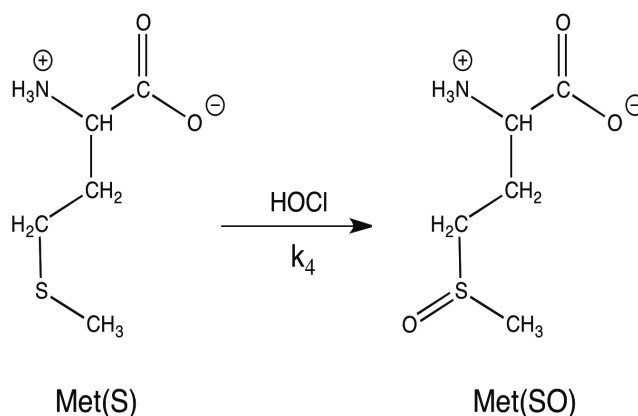


Schéma A.6 : Oxydation de la méthionine en méthionine sulfoxyde par HOCl, avec une constante cinétique k_4 .

Puisque la méthionine réagit avec une vitesse proche de celle de notre complexe, et que le produit d'oxydation de la méthionine (sulfoxyde) ne réagit pas avec le complexe ZnL_{Hsp} , nous allons pouvoir l'utiliser comme compétiteur, comme l'ont fait Peskin et Winterbourn^[21] en quantifiant les thiols oxydés.

Notre but est d'oxyder un mélange méthionine/ ZnL_{Hsp} avec des ajouts de NaOCl pour en tirer le ratio des constantes cinétiques $k_{2,3 \text{ apparent}}/k_4 \text{ apparent}$ en suivant la disparition du complexe ZnL_{Hsp} .

Des titrages similaires à celui présenté Figure A.10 ont été réalisés, en présence de méthionine. Ainsi, le NaOCl ajouté est consommé par les réactions d'oxydation de la méthionine et du complexe peptidique. Or, le NaOCl étant limitant, les réactions d'oxydation sont en compétition pour le consommer (Figure A.13).

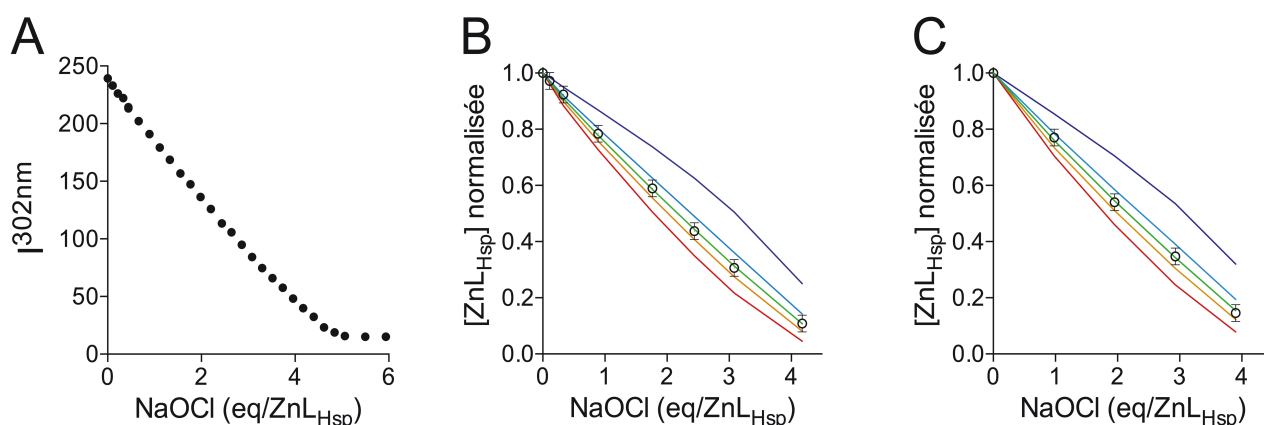


Figure A.13 : Détermination de $k_{2,3}$ à pH physiologique par oxydation compétitive avec la méthionine. (A) Titration compétitif de ZnL_{Hsp} /Méthionine 1:2,5 par NaOCl à pH 7,0 (20mM tampon phosphate), en suivant la fluorescence de la tyrosine à 302nm (excitation à 275nm). (B) Quelques points de ce titrage sont simulés (voir détails dans le texte) en faisant varier le ratio (k_2/k_4) : 0,5 (bleu), 1 (bleu clair), 1,25 (vert), 1,5 (jaune) et 2(rouge). (C) Un titrage quasi-identique est traité de la même façon, à la différence qu'il a été réalisé à pH 7,4.

Ces titrages réalisés pour des mélanges ZnL_{Hsp} /méthionine 1:2,5 à pH 7,0 et 7,4 ont été simulés avec SPECFIT. Puisqu'à ces pH une part importante de NaOCl est sous forme HOCl, et que les mesures à haut pH montrent que ZnL_{Hsp} réagit avec HOCl 10^5 fois plus vite qu'avec ClO^- , seule l'oxydation par HOCl sera considérée. Ceci revient à négliger la contribution de k_3 dans le $k_{2,3}$ apparent.

Les simulations sont basées sur un modèle à trois réactions :

$A + F \rightarrow B$ (associée à la constante cinétique $k_{2,3}$ apparent)

$B + F \rightarrow C$ (associée à la constante cinétique $k'_{2,3}$ apparent)

$D + F \rightarrow E$ (associée à la constante cinétique k_4 apparent)

A étant le complexe de départ, B l'intermédiaire mono-disulfure, C le bis-disulfure final, D la méthionine, E la méthionine sulfoxyde et F étant HOCl.

De plus, puisque F est en défaut, on a $[F]_i = [B]_f + 2 \times [C]_f + [E]_f$

La disparition du complexe initial est simulée en faisant varier les rapports entre les constantes cinétiques.

D'après ce qu'on a vu avec H_2O_2 et avec HOCl à haut pH, nous avons imposé $k'_2 = 10 \times k_2$.

Ensuite, $k_{4\text{ app}}$ a été varié de $k_{4\text{ app}} = 0,5 \times k_{2,3\text{ app}}$ à $k_{4\text{ app}} = 2 \times k_{2,3\text{ app}}$. Les simulations obtenues sont affichées en couleur sur le graphique (Figure A.13 (B et (C))).

Dans les deux cas (à pH 7 et 7,4), les simulations les plus proches des données expérimentales sont obtenues avec un rapport $k_{2,3\text{ app}} = 1,25 \times k_{4\text{ app}}$. En utilisant la valeur de k_4 déterminée par *Armesto et al*, et sachant que le pKa de HOCl est 7,54, nous calculons un k_4 apparent de $6,75 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7 et de $5,05 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,4. Avec le rapport

$k_{2,3 \text{ app}}/k_{4 \text{ app}}$, nous obtenons des valeurs de $k_{2,3 \text{ apparent}}$ de $8,4(\pm 2,5) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7 et de $6,3(\pm 1,9) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,4.

Ces valeurs sont placées sur le graphique représentant la variation de $k_{2,3 \text{ apparent}}$ en fonction du pH (Figure A.14). Ces points passent par la simulation de $k_{2,3 \text{ apparent}}$ précédemment déterminée Figure I.9 à partir des point expérimentaux de mesure directe. Ainsi, ces points déterminés à pH physiologique valident les valeurs de vitesses d'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl et ClO^- issues de l'analyse des mesures à haut pH.

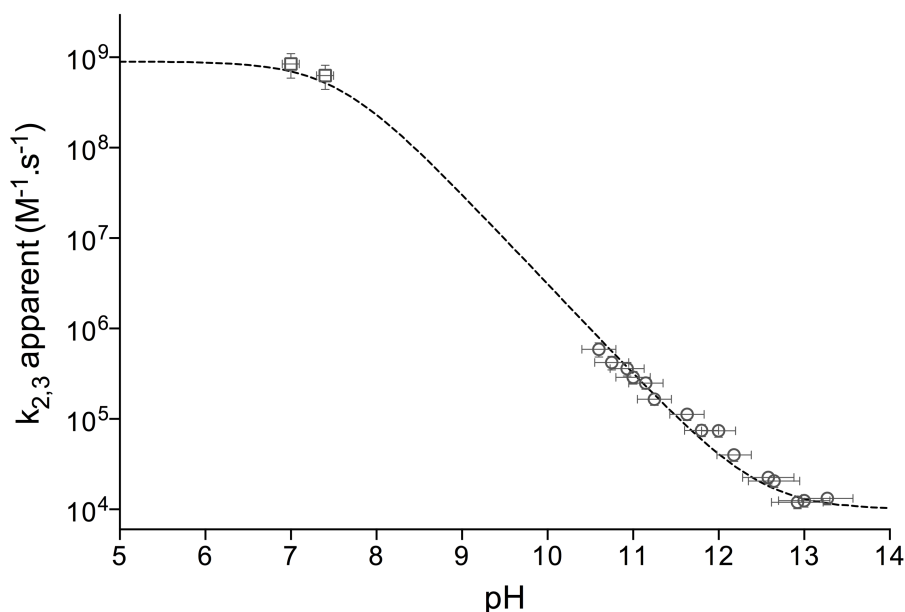


Figure A.14 : Confirmation de k_2 et k_3 par mesures indirectes à pH physiologique. Les $k_{2,3 \text{ apparent}}$ (échelle logarithmique) déterminés de manières directe (ronds) et indirecte (carrés) sont simulés (courbe en tirets) en utilisant l'équation 6 avec les paramètres précédemment déterminés : $k_2 = 9(\pm 3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_3 = 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $\text{pK}_{\text{a}}(\text{HOCl}/\text{ClO}^-) = 7,54$.

4. Discussion

3.1. Confirmation du modèle proposé

La cinétique de réaction mesurée pour l'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl (Tableau A.2) est en accord avec le modèle proposé en I.2.5 et l'appuie. En effet, si l'on se place dans un stress causé par $10 \mu\text{M}$ de HOCl, l'oxydation de ZnL_{Hsp} se ferait à $\sim 10^3 \text{ s}^{-1}$, soit ~ 1 à 2 ordres de grandeur plus rapidement que les réarrangements des disulfures.

Ainsi, le changement de proportions des isomères bis-disulfures entre l'oxydation par H_2O_2 et par HOCl peut être expliqué par une compétition entre la vitesse d'oxydation du complexe et la vitesse de réarrangement des ponts disulfures, au niveau de l'intermédiaire mono-disulfure. Le Schéma A.5 est très simpliste : il ne représente que les espèces

majoritaires observées (bis-disulfures) et supposées (mono-disulfures). Il permet d'expliquer la tendance dominante. Néanmoins, puisque les trois isomères bis-disulfures sont observés, il est très probable que les six intermédiaires mono-disulfures co-existent. Dans un peptide mono-disulfure, il y a deux thiols, pouvant attaquer le pont disulfure sur deux soufres différents. Ainsi, chaque isomère mono-disulfure est en équilibre avec quatre autres isomères mono-disulfures (Schéma A.7). La coexistence des six isomères est donc d'autant plus probable : chacun peut être généré à partir de quatre autres isomères.

Aussi, le Schéma A.8 permet de rendre compte plus fidèlement du système qu'implique l'oxydation de ZnL_{Hsp} par H_2O_2 ou HOCl.

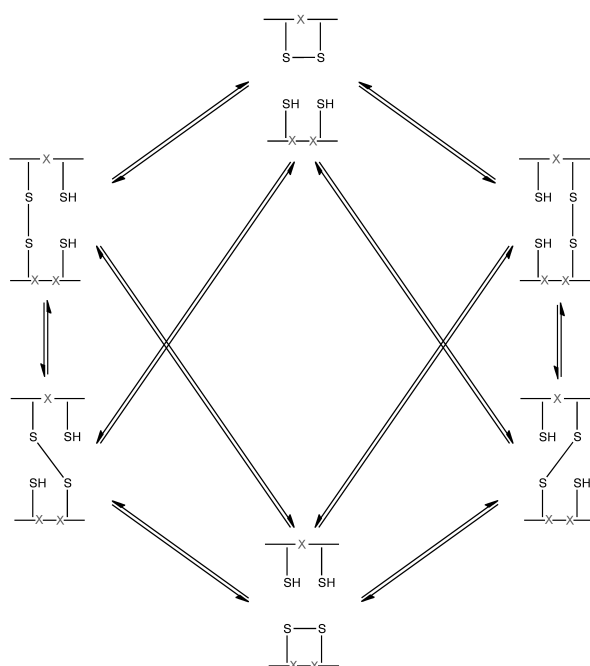


Schéma A.7 : Représentation des équilibres entre les isomères mono-disulfures d'un modèle à 4 cystéines.

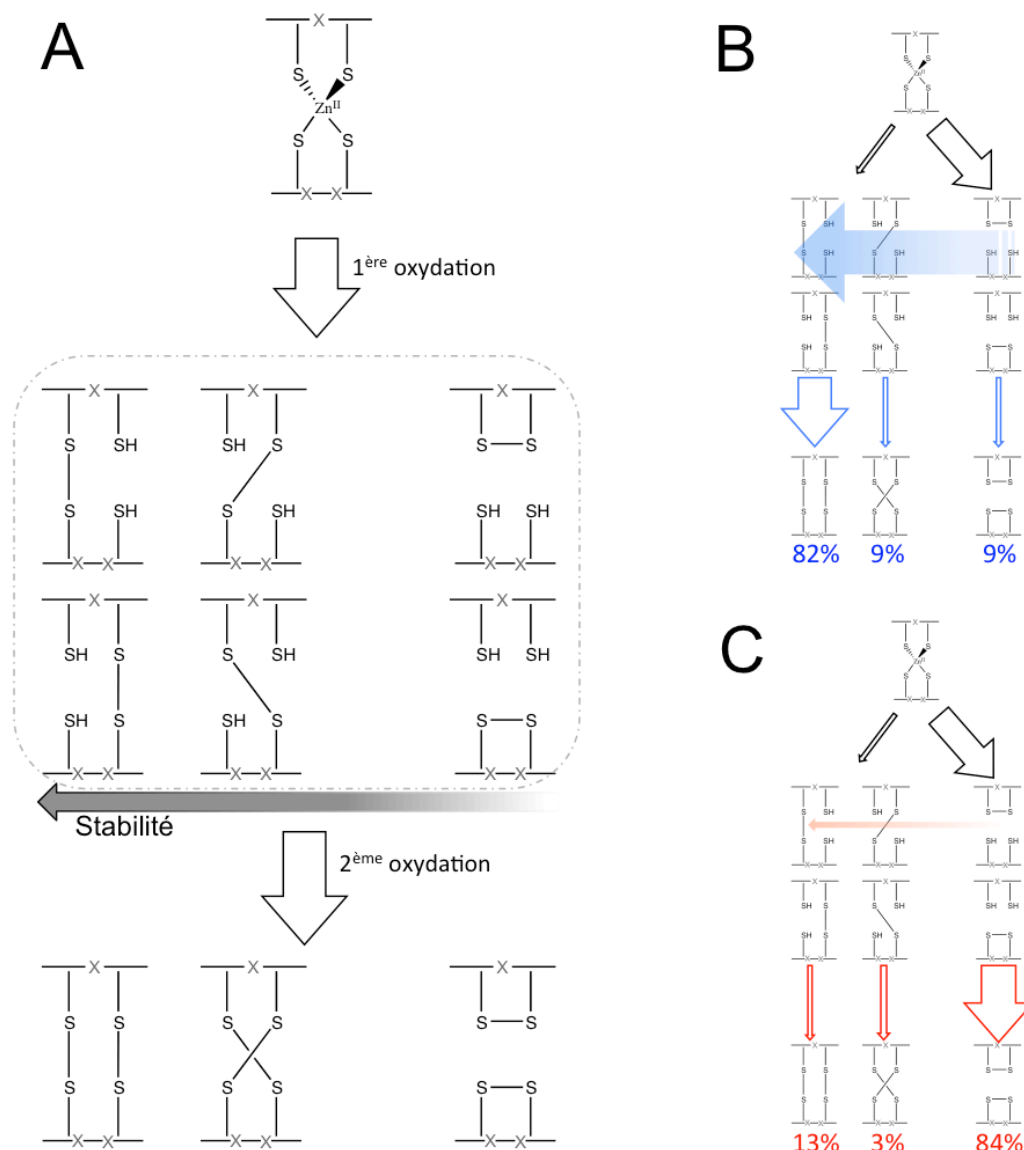


Schéma A.8 : La différence de proportions des isomères de bis-disulfures expliquée par compétition entre la cinétique d'oxydation du peptide (par HOCl ou H_2O_2) et la cinétique de réarrangement des ponts disulfures, au niveau de l'intermédiaire réactionnel mono-disulfure. Cette fois, les isomères bis-disulfures sont présentés par stabilité décroissante : de gauche à droite **2**, **1**, **3**. (A) Schéma général représentant étapes de l'oxydation de ZnL_{Hsp} , et les espèces mono-disulfures en équilibre. (B) et (C) : Interprétation des chemins réactionnels différents entre H_2O_2 (B, bleu) et HOCl (C, rouge).

Le Schéma A.8 présente l'oxydation séquentielle de ZnL_{Hsp} , en mono-disulfure puis en bis-disulfure (A). Les isomères mono-disulfures sont placés au-dessus de l'isomère bis-disulfure dont ils sont précurseurs. Puisque des thiols libres sont à proximité du pont disulfure, tous ces isomères mono-disulfures sont en équilibre les uns avec les autres (Schéma A.7). La flèche grise pointe du côté des isomères les plus stables. La première étape est supposée être la même quel que soit l'oxydant (H_2O_2 ou HOCl) : les espèces formées sont principalement les mono-disulfures intra-motifs. Dans le cas de H_2O_2 (B), la deuxième oxydation est plus lente que le réarrangement des disulfures. Ainsi, une grande partie de la

population de mono-disulfures se réarrange pour donner des mono-disulfures inter-motifs plus stables, avant que la deuxième oxydation n'opère, pour donner majoritairement des bis-disulfures inter-motifs. Dans le cas de HOCl (C), la seconde oxydation se fait très rapidement, ne laissant pas de temps à l'intermédiaire mono-disulfure pour se réarranger. Cela conduit à une majorité de bis-disulfure inter-motifs.

4.2. Du complexe modèle à la protéine

Tout d'abord, notons que la constante cinétique d'oxydation de ZnL_{Hsp} est en accord avec le rôle physiologique dernièrement attribué au site à zinc de Hsp33 : senseur de HOCl^[2] (*vide infra*).

Ensuite, cette étude utilisant un modèle révèle que la nature du site à zinc de Hsp33 est à l'origine des différences d'activation H_2O_2 versus HOCl observées. En effet, l'oxydation du modèle par ces oxydants conduit aux mêmes produits (isomère **1**, **2** et **3**), mais en des proportions très différentes.

L'isomère **2**, produit majoritaire de l'oxydation du modèle par H_2O_2 , a une structure très proche de celle du complexe initial. La partie linéaire et le cycle sont liés de manière covalente par deux ponts disulfures. Si cette disposition est transposée à Hsp33, cette contrainte structurale maintiendrait le domaine C-terminal replié. Cela s'applique aussi à l'isomère **1**.

A l'inverse, dans l'isomère **3**, les ponts disulfures lient les cystéines appartenant au même motif. Ainsi, la partie linéaire du peptide et le cycle ne sont plus maintenus proches : pas de liaison covalente, ni de coordination des cystéines au zinc. Ceci permet l'éloignement du cycle et de la partie linéaire. Transposé à la protéine, une telle disposition des ponts disulfures permettrait le dépliement complet du domaine C-terminal, nécessaire à la dimérisation et à l'activation de la protéine. Cet isomère **3** est le produit majoritaire de l'oxydation du modèle HOCl.

Ceci est en accord avec ce qu'ont observé Ilbert *et al.*^[1] en ultracentrifugation analytique : Hsp33 oxydée par H_2O_2 à 30°C sédimente sous forme de monomère, comme Hsp33 réduite, alors que Hsp33 oxydée par H_2O_2 à 43°C sédimente sous forme de dimères.

Ainsi, les différences d'activation de Hsp33 par H_2O_2 (30°C) et HOCl peuvent être expliquées par la formation d'isomères bis-disulfures différents, issus d'une compétition cinétique entre l'oxydation et le réarrangement des disulfures.

4.3. Le doigt de zinc de Hsp33 confère une réponse spécifique à HOCl par rapport à H₂O₂

Il est intéressant de noter que ZnL_{Hsp} réagit avec HOCl presque aussi vite qu'un cystéinate libre (Tableau A.2 (A)). En revanche, le complexe réagit 20 fois moins vite avec ClO⁻ qu'un cystéinate libre. Néanmoins, puisque la cystéine est en grande partie protonée à pH 7,4, le complexe ZnL_{Hsp} réagit plus vite avec HOCl que ne le fait une cystéine libre (Tableau A.2 (B)).

A		
k (M ⁻¹ .s ⁻¹)	ZnL _{Hsp}	Cys-S ⁻ libre
H ₂ O ₂	k ₁ = 0,105 ^a	18-26 ^b
HOCl	k ₂ = 9(±3).10 ⁸	12 .10 ⁸ ^c
ClO ⁻	k ₃ = 10 ⁴	19 .10 ⁴ ^c

B		
k (M ⁻¹ .s ⁻¹)	ZnL _{Hsp}	Cystéine libre
HOCl, pH 7,4	6(±2).10 ⁸	0,3-1,8 .10 ⁸ ^b

Tableau A.2 : (A) Récapitulatif des vitesses d'oxydation de ZnL_{Hsp} et du cystéinate par H₂O₂ et HOCl. (B) Comparaison des vitesses apparentes d'oxydation de la cystéine libre par HOCl à pH 7,4. (**a** : ref. ^[11] ; **b** : ref. ^[22] ; **c** : ref. ^[18,20])

Ceci est très intéressant car cette situation contraste avec ce qui a été mesuré avec H₂O₂ : où une cystéine libre réagit plus vite qu'un doigt de zinc, à pH physiologique. Ainsi, le zinc ne semble pas protéger les cystéines vis-à-vis des oxydants puissants aussi bien qu'il le fait vis-à-vis des oxydants cinétiquement lents. Cela se voit aussi lorsque l'on compare la vitesse d'oxydation d'un cystéinate libre et celle du complexe : on vient de voir que dans le cas de HOCl, ces vitesses sont très proches, alors que dans le cas de H₂O₂, une cystéine complètement déprotonée réagit environ 100 fois plus vite que notre complexe (Tableau A.2). L'ion Zn²⁺ diminue donc la réactivité des cystéines vis-à-vis de H₂O₂ plus fortement que vis-à-vis de HOCl. De plus, cet ion Zn²⁺ maintient les cystéines dans le même état (déprotoné) pour les pH au dessus de 5,5, contrairement aux thiols libres, dont l'état de protonation est très dépendant du pH.

De plus, comme nous l'avons vu dans la partie I.2.3, le motif CXC apporte une spécificité de réponse du site de Hsp33 pour HOCl vs H₂O₂ en termes de produits d'oxydation. Cette spécificité vient d'une compétition cinétique basée sur l'instabilité intrinsèque de la liaison disulfure dans une paire CXC. Et puisque, visiblement, cette isomérisation permet ou

empêche l'activation de la protéine, alors, on peut dire que le motif CXC permet que l'activation de la protéine soit sélective de l'oxydant.

On pourrait presque voir le motif CXC comme ayant un rôle sélectif, imposant un « seuil cinétique » : il y a beaucoup d'oxydants qui peuvent oxyder le site à zinc, mais seuls ceux qui oxyderont ce site plus vite que les disulfures ne se réarrangent déclencheront l'activité de la protéine.

Cette protéine bactérienne n'accepte donc d'être activée que par les « excellents » oxydants... si même les bactéries s'y mettent...

3.4. Un potentiel rôle joué par le reste du domaine doigt de zinc

Alors que nos résultats permettent une explication alternative à ce qui est observé lors de l'oxydation de Hsp33 à « basse » température (25°C), ils n'expliquent absolument pas pourquoi l'oxydation de Hsp33 par H₂O₂ à 43°C produit une chaperonne active. L'hypothèse que nous avançons est l'implication du reste du domaine doigt de zinc.

Le domaine doigt de zinc (en jaune sur Figure A.1) possède une structure instable. En effet, comme l'ont montré Won *et al.*^[23], la séquence de ce domaine n'est pas propice au repliement en une structure stable car la séquence contient très peu d'acides aminés hydrophobes. Et même s'il y bien un cœur hydrophobe entre les trois hélices α et les deux feuillets β , il est déstabilisé par plusieurs éléments (Figure A.15). D'abord, un feuillet expose complètement au solvant la chaîne latérale d'une leucine. Ensuite, les hélices α possèdent les acides aminés β -branchés, ce qui est connu pour déstabiliser les hélices. Finalement, sur la base de sa séquence d'acides aminés, le logiciel de prédiction de structure FoldIndex prédit que ce domaine est non structuré (lorsqu'on ne prend pas en compte la chélation du Zn^{II})^[2]. La chélation du zinc est donc essentielle au repliement stable de ce domaine, et le départ du métal, causé par l'oxydation des cystéines conduit très rapidement à la déstructuration du domaine.

Ainsi, il est possible qu'à 43°C, la première oxydation ponte une paire de cystéines, et que la chaleur conduise rapidement au dépliement du domaine doigt de zinc. Ce dépliement éloigne (dans l'espace) les deux paires de cystéines, ce qui empêche les thiols d'attaquer le pont disulfure. Le réarrangement des ponts disulfures serait ainsi fortement ralenti. Ensuite, la deuxième oxydation viendrait ponter les deux cystéines restantes avant que l'intermédiaire mono-disulfure ne se soit trop réarrangé, conduisant majoritairement à la protéine active.

Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une activation de Hsp33 par H_2O_2 à 30°C est possible si l'on ajoute des ions guanidiniums, déstabilisateurs de structures de protéines, dans le milieu ($1,5 \text{ mol.L}^{-1}$)^[1].

Malheureusement, cette hypothèse ne peut pas être testée en utilisant nos peptides car notre modèle est restreint. Le groupe d'Ursula Jakob a déjà isolé une version tronquée de Hsp33, se limitant uniquement au domaine doigt de zinc. Ils nous en ont envoyé un échantillon. Nous espérons que des expériences d'oxydation de ce mutant par H_2O_2 , à différentes températures, nous permettront de vérifier ou infirmer cette hypothèse.

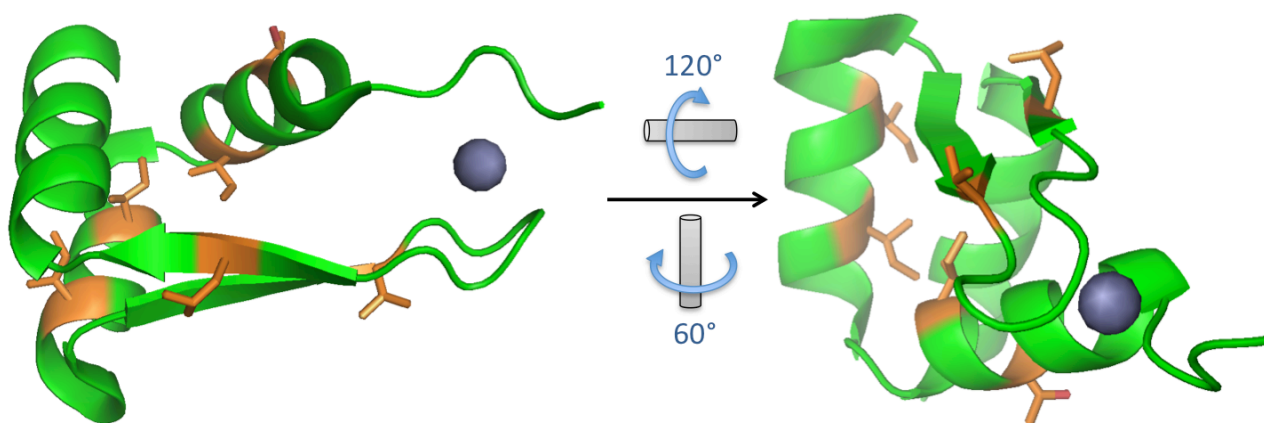


Figure A.15 : Le domaine doigt de zinc de Hsp33 (en vert) est déstabilisé par des éléments défavorables aux structures secondaires du domaine. Ces résidus sont colorés en orange, et l'ion zinc est représenté en gris. La structure cristallographique utilisée est issue de la Protein Data Bank (1VZY) et a été obtenue avec la protéine Hsp33 de *Bacillus subtilis*.

5. Conclusion

L'étude de la réactivité d'un complexe modèle vis-à-vis de l'acide hypochloreux et du peroxyde d'hydrogène a permis d'apporter une lumière nouvelle sur le mécanisme d'activation de la protéine Hsp33. En effet, cette étude montre que la compétition entre le contrôle thermodynamique et le contrôle cinétique des produits d'oxydation est, au moins en partie, à l'origine des différences observées quant à l'activité de la protéine oxydée, en fonction des conditions d'activation. De plus, cette étude présente la première mesure directe de la cinétique d'oxydation d'un site doigt de zinc par l'acide hypochloreux. Elle fait apparaître que les doigts de zinc peuvent réagir très rapidement avec HOCl, avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, soit aussi rapidement que le cystéinate libre et la méthionine. Le zinc ne semble donc pas diminuer la réactivité des thiolates vis-à-vis de HOCl, contrairement à ce qui se passe avec H_2O_2 . Il ressort de cette étude que les doigts de zinc sont

potentiellement des cibles d'un stress HOCl. Il faut maintenant confirmer cela avec d'autres doigts de zinc.

Références

- [1] M. Ilbert, J. Horst, S. Ahrens, J. Winter, P. C. F. Graf, H. Lilie, U. Jakob, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 556–563.
- [2] J. Winter, M. Ilbert, P. C. F. Graf, D. Ozcelik, U. Jakob, *Cell* **2008**, *135*, 691–701.
- [3] C. Kumsta, U. Jakob, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4666–4676.
- [4] S. Barbirz, U. Jakob, M. O. Glocker, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 18759–18766.
- [5] R. Kassim, C. Ramseyer, M. Enescu, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 5407–5416.
- [6] O. Sénèque, E. Bourlès, V. Lebrun, E. Bonnet, P. Dumy, J.-M. Latour, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 6888–6891.
- [7] M. Favre, K. Moehle, L. Jiang, B. Pfeiffer, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2679–2685.
- [8] J. N. Smith, Z. Shirin, C. J. Carrano, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 868–869.
- [9] A. T. Maynard, D. G. Covell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1047–1058.
- [10] Y.-M. Lee, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8691–8703.
- [11] E. Bourlès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 13762–13772.
- [12] R. Zhang, G. H. Snyder, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3785–3794.
- [13] R. M. Zhang, G. H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18472–18479.
- [14] C. Wu, J.-C. Leroux, M. A. Gauthier, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 1044–1049.
- [15] J. Alegre-Cebollada, P. Kosuri, J. A. Rivas-Pardo, J. M. Fernández, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 882–887.
- [16] M. I. Fernández, M. V. García, X. L. Armesto, M. Canle López, J. Arturo Santaballa, *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, *26*, 1098–1104.
- [17] J. C. Morris, *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 3798–3805.
- [18] P. Nagy, M. T. Ashby, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14082–14091.
- [19] H. Ueki, G. Chapman, M. T. Ashby, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 1670–1676.
- [20] X. L. Armesto, M. Canle L, M. I. Fernández, M. V. García, J. A. Santaballa, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1103–1109.
- [21] A. V. Peskin, C. C. Winterbourn, *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 572–579.
- [22] D. I. Pattison, M. J. Davies, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1453–1464.
- [23] H.-S. Won, L. Y. Low, R. D. Guzman, M. Martinez-Yamout, U. Jakob, H. J. Dyson, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 893–899.

Partie B :

Réactivité de modèles de doigt de zinc vis-à-vis de
l'oxygène singulet

Le premier point sensible lorsque l'on veut étudier la réactivité de l'oxygène singulet est sa génération. Dans les méthodes développées, on distingue deux voies principales de génération de l'oxygène singulet : la voie chimique et la voie photo-physique. Des efforts ont été fait dans ces deux voies pour mettre au point des systèmes compatibles avec les milieux biologiques. La voie chimique consiste en la dégradation d'un réactif qui libère du dioxygène, en partie à l'état singulet ($^1\text{O}_2$). Ce réactif peut être organique (le plus souvent un endopéroxyde de naphthalène)^[1,2] ou inorganique (dégradation de H_2O_2 en présence d'un composé minéral^[3,4] : classiquement $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HOCl}$ ^[5]) (Schéma B.I.1). L'inconvénient majeur de ces techniques est que les réactifs de départ sont des peroxydes, c'est à dire des oxydants capables d'oxyder les soufres de nos modèles doigt de zinc. Des lors, nous pourrions difficilement distinguer l'oxydation due à l'oxygène singulet de celle due au peroxyde initial.

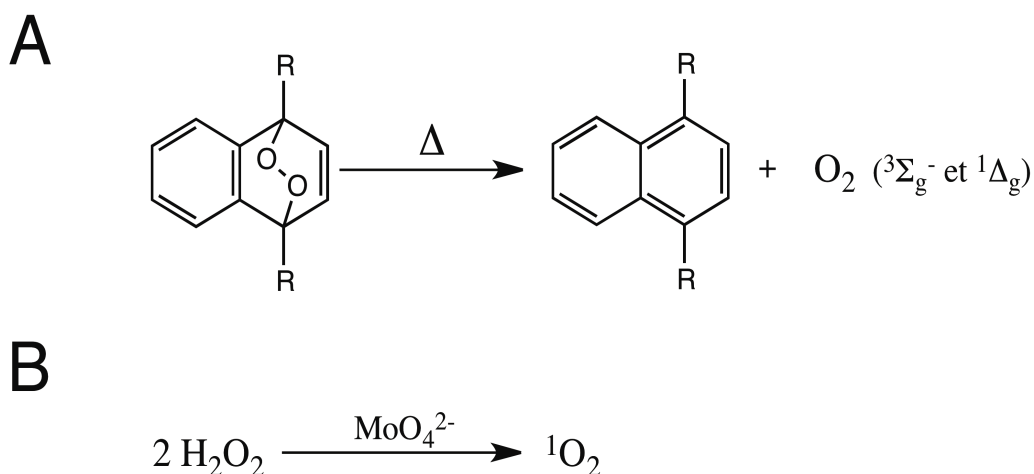


Schéma B.I.1 : Voies chimiques de production d'oxygène singulet : par décomposition d'un endopéroxyde d'anthracène (A) ou par décomposition de H_2O_2 (B).

La génération photo-physique de $^1\text{O}_2$ est très courante, notamment *via* l'utilisation d'un photo-sensibilisateur : une molécule capable d'absorber la lumière avec un bon rendement, et de transférer cette énergie au dioxygène pour former de l'oxygène singulet (Schéma B.I.2). Cette méthode est très pratique car certains photo-sensibilisateurs sont très efficaces, hydrosolubles, absorbent dans la lumière visible (ne nécessite pas de matériel compliqué), peu chers et produisent de l'oxygène singulet proprement (pas d'anion superoxyde par exemple). Une des conditions nécessaires à l'utilisation de cette méthode est la présence de dioxygène en solution. Il faut cependant que le réactif étudié ne soit pas sensible à l'oxygène triplet, ce qui est le cas doigt de zinc qui réagissent très lentement avec celui-ci^[6].

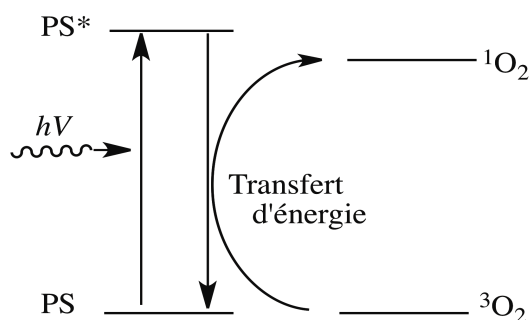


Schéma B.I.2 : Représentation simplifiée de la production d'oxygène singulet médiée par un photo-sensibilisateur. L'absorption d'un photon ($h\nu$) par un photo-sensibilisateur (PS) le fait passer dans un état excité (PS^*). Ce dernier est capable de retourner à l'état fondamental en transférant son énergie au dioxygène (3O_2) pour produire de l'oxygène singulet (1O_2).

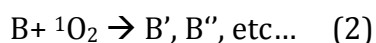
À côté de tous ces avantages, cette méthode a deux principaux inconvénients : le photo-sensibilisateur, notamment dans son état excité, peut ne pas être neutre vis-à-vis de l'objet d'étude, et d'autre part, il est très difficile de quantifier l'oxygène singulet produit.

Les interactions photo-sensibilisateur/complexe peptidique peuvent difficilement être anticipées et doivent être testées pour chaque couple possible. Cette problématique sera développée plus tard, dans une discussion à la fin du Chapitre B.II.

Dans nos études, nous nous sommes concentrés sur les produits primaires d'oxydation, c'est à dire ceux issus de l'oxydation d'un complexe par une molécule de 1O_2 . Ainsi, il faut que l'oxydation de la solution de complexe soit suffisamment poussée pour quantifier correctement les produits. D'un autre côté, il faut éviter les suroxydations. Or, puisqu'on ne peut pas facilement contrôler la quantité d'oxygène singulet produite, et puisqu'une partie importante de cet 1O_2 est désactivée par le solvant, l'avancement de la réaction est difficile à contrôler.

Il existe de nombreuses méthodes permettant de déterminer la vitesse de réaction d'une molécule avec 1O_2 . Celle que nous avons choisie, est une méthode par compétition^[7]. Elle est basée sur l'utilisation, en plus du composé étudié (A), d'un piège à 1O_2 (B) dont la vitesse d'oxydation est connue. La méthode de génération de 1O_2 reste l'utilisation d'un photo-sensibilisateur.

Lors de l'irradiation, l'oxygène singulet produit en solution oxyde A et B :



Ainsi, à chaque instant t , les vitesses de disparition de A et B s'écrivent, respectivement :

$$\frac{d[A]}{dt} = k_R(A) \times [A]_t \times [^1O_2] \quad (3)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_R(B) \times [B]_t \times [^1O_2] \quad (4)$$

Or, dans un système où A, B et PS n'interagissent pas entre elles, nous faisons l'hypothèse que le mélange est homogène. Ainsi, les molécules A et B sont soumises à la même concentration d'oxygène singulet. Ainsi, $[^1O_2]$ est le même dans les équations (3) et (4). On peut alors simplifier :

$$\frac{d[B]}{dt} \times \frac{1}{k_R(B) \times [B]_t} = \frac{d[A]}{dt} \times \frac{1}{k_R(A) \times [A]_t} \quad (5)$$

Cette équation ne dépend alors plus de la concentration d'oxygène singulet. Après intégration, nous obtenons :

$$\frac{k_R(A)}{k_R(B)} = \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]_t}}{\ln \frac{[B]_0}{[B]_t}} \quad (6)$$

Et puisque le k_R de B est connu, on obtient celui de A avec la formule :

$$k_R(A) = \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]_t}}{\ln \frac{[B]_0}{[B]_t}} \times k_R(B) \quad (7)$$

Références

- [1] C. Pierlot, S. Hajjam, C. Barthélémy, J.-M. Aubry, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **1996**, 36, 31–39.
- [2] G. R. Martinez, J.-L. Ravanat, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10212–10213.
- [3] A. U. Khan, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* **1963**, 39, 2105–2106.
- [4] J. M. Aubry, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5844–5849.
- [5] A. M. Held, D. J. Halko, J. K. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 5732–5740.
- [6] E. Bourlès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem.-Eur. J.* **2011**, 17, 13762–13772.
- [7] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, 24, 663–677.

Chapitre B.II :

Réactivité de ZnL_{TC} vis-à-vis de oxygène singulet

Vincent Lebrun, Arnaud Tron, Luca Scarpantonio, Colette Lebrun, Jean-Luc Ravanat, Nathan McClenaghan, Jean-Marc Latour et Olivier Sènèque

Chapitre B.II : Oxydation efficace et déstabilisation d'un doigt de zinc $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ par $^1\text{O}_2$

1. Communication à Angewandte Chemie	105
2. Informations supplémentaires	110
3. Discussion sur les problèmes liés à la génération de l'oxygène singulet	119
3.1. Les photo-sensibilisateurs utilisés dans cette étude	119
3.2. Interaction directe photo-sensibilisateur/modèle	120
3.3. Oxydation du complexe par le photo-sensibilisateur indépendante de $^1\text{O}_2$	121
3.4. Interaction photo-sensibilisateur/anthracène	124
3.5. Problèmes liés à la génération de $^1\text{O}_2$ par dégradation de DHPNO_2	125

Ce chapitre est constitué uniquement d'une communication à *Angewandte Chemie* parue en août 2014.^[1] Il décrit la réactivité du complexe ZnL_{TC} , un modèle de doigts de zinc « clé de sol », vis-à-vis de $^1\text{O}_2$ ainsi que la méthodologie utilisée lors de nos études avec $^1\text{O}_2$. Les limites de cette méthodologie seront discutées à la fin de ce chapitre. Elles sont liées à la génération d'oxygène singulet par photo-sensibilisation et à l'utilisation de compétiteurs pour les études cinétiques. Comme nous le verrons par la suite (Chapitre B.III), certains problèmes font que toutes les conditions expérimentales ne sont pas utilisables avec tous les modèles. Or, puisque ZnL_{TC} est compatible avec plusieurs jeux de conditions, ce modèle nous a permis de mettre au point nos conditions expérimentales et de tester leur fiabilité.

Nous avons choisi de débiter l'étude de la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de $^1\text{O}_2$ avec ce modèle car :

- c'est un modèle simple : il n'y a ni histidines, ni chaînes latérales aromatiques. Ainsi, les seuls acides aminés sensibles à $^1\text{O}_2$ sont les quatre cystéines liées au zinc.
- ce modèle était déjà bien caractérisé : sa conception, sa synthèse et sa structure ont été publiées par Sénèque et coll.^{[2][3]}. De plus, sa réactivité vis-à-vis de H_2O_2 a aussi été décrite par Sénèque et coll.^[4]

Ce modèle constitue donc un bon point de départ pour étudier la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de $^1\text{O}_2$.

1. Communication à *Angewandte Chemie*

Efficient Oxidation and Destabilization of Zn(Cys)₄ Zinc Fingers by Singlet Oxygen**

Vincent Lebrun, Arnaud Tron, Luca Scarpantonio, Colette Lebrun, Jean-Luc Ravanat, Jean-Marc Latour, Nathan D. McClenaghan* and Olivier Sénéque*

Abstract: Singlet oxygen (¹O₂) plays an important role in oxidative stress in all types of organisms, most of them being able to mount a defense against this oxidant. Recently, zinc finger proteins have been proposed to be involved in its cellular detection but the molecular basis of this process still remains unknown. We have studied the reactivity of a Zn(Cys)₄ zinc finger with ¹O₂, focusing on the products formed and the kinetics of the reaction by combinations of spectroscopic and analytical techniques. We report that the cysteines of this zinc finger are oxidized by ¹O₂ into sulfinates. The reaction of the ZnS₄ core with ¹O₂ is very fast and efficient with almost no physical quenching of ¹O₂. A dramatic (ca. 5 orders of magnitude) decrease of the Zn²⁺ binding constant was observed upon oxidation. This suggests that the Zn(Cys)₄ zinc finger proteins would release their Zn²⁺ ion and unfold upon reaction with ¹O₂ in cellular conditions and that zinc finger sites are likely targets for ¹O₂.

Singlet oxygen (¹O₂), the lowest energy excited state of molecular oxygen, is an important reactive oxygen species in biology.^[1] It is produced in all organisms, whether photosynthetic or not, by several light-dependent or -independent pathways.^[2–5] Due to its electronic structure, ¹O₂ is a strong oxidant that can damage all cell components: DNA, RNA, proteins and membranes. Various organisms possess a set of defense genes against ¹O₂ stress, the most characterized defense system being that of *R. sphaeroides*.^[2,3] In this organism, ¹O₂ response genes are regulated by the sigma factor σ^E, which is inactivated by association with its anti-σ factor ChrR, a zinc finger protein.^[6] Presence of ¹O₂ induces dissociation of the ChrR-σ^E complex and gene expression. The molecular event that causes dissociation is not yet known.

Based on the known reactivity of the building-blocks of the cell

their relative abundance, proteins are considered as the main targets of ¹O₂.^[7] Besides oxidative chemical reactions, ¹O₂ can interact with molecules by physical quenching to give ground-state triplet oxygen (³O₂). Concerning isolated amino acids, tryptophan, tyrosine and histidine, with aromatic side chains, and cysteine or methionine, with sulfur atoms, are most reactive. The chemical reaction pathway is prevalent for all these amino acids except tryptophan for which both pathways are competitive.^[7] Reaction rate of cysteine is in the range 2–9×10⁶ M⁻¹ s⁻¹. Regarding oxidation products, the cysteine of glutathione is oxidized into disulfide and thiosulfinate ester (S–S bond-containing compounds) as major products and sulfinate or sulfonate as minor products.^[8] The photooxidation of metal-bound thiolates has been investigated in few instances with Ni^{II}, Pd^{II}, Pt^{II} and Co^{III} complexes of organic non-peptidic ligands^[9–13] but never with Zn²⁺. The products are always metal-bound sulfenates or sulfinates but, in many of these cases, the rigid nature of the ligand is not favorable to disulfide formation. Therefore, these studies may not be relevant to the reactivity of zinc fingers. Concerning the interaction between ¹O₂ and zinc finger proteins, literature is scarce. It has been demonstrated that ¹O₂ generated by decomposition of an endoperoxide can inhibit DNA binding of nuclear receptors VDR and RXR which are transcription factors with treble-clef zinc fingers.^[14] However, the interaction was not elucidated at the molecular level.

Herein, we describe the reactivity of a Zn(Cys)₄ treble-clef zinc finger with ¹O₂. We show that the cysteine sulfurs are rapidly and efficiently oxidized into sulfinates that strongly destabilizes Zn²⁺ binding. Our observation suggests that ¹O₂ can target and destroy zinc finger sites of proteins in cells.

We have developed a family of peptides modeling zinc finger of various folds in order to study their reactivity with oxidants involved in oxidative stress.^[15–17] Concerning ¹O₂, we decided to explore its reactivity with Zn-L_{TC}, that models one of the most encountered ZF fold, the treble-clef. (Figure 1).^[18] L_{TC} is a cyclic peptide with a linear tail. Two cysteines (Cys 2 and 5) are located in the PCENCGK^{DP} cycle and the two others (Cys 13 and 16) in the tail that is grafted on the side chain of the glutamate in the cycle.

[*] V. Lebrun, Dr. J.-M. Latour, Dr. O. Sénéque
Univ. Grenoble Alpes, LCBM/PMB and
CEA, IRTSV/CBM/PMB and
CNRS, LCBM UMR 5249, PMB
F-38000 Grenoble (France)
E-mail: olivier.seneque@cea.fr
A. Tron, Dr. L. Scarpantonio, Dr. N. D. McClenaghan
Univ. Bordeaux and CNRS, ISM
F-33405 Talence (France)
E-mail: nathan.mcclenaghan@u-bordeaux.fr
C. Lebrun
Univ. Grenoble Alpes and CEA, INAC/SCIB/RICC
F-38000 Grenoble (France)
Dr. J.-L. Ravanat
Univ. Grenoble Alpes and CEA, INAC/SCIB/RICC
F-38000 Grenoble (France)

[**] OS and JML acknowledge the partial support of Labex ARCANÉ (ANR-11-LABX-0003-01). NMCC, AT and LS thank the European Research Council (FP7/2008-2013) grant agreement no. 208702 and Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.



Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201xxxxx>.

components (amino acids, nucleic acids and unsaturated lipids) and

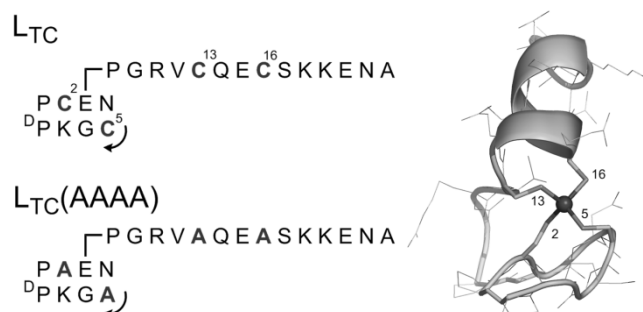


Figure 1. Sequences of peptides L_{TC}, L_{TC}(AAAA) (left) and solution structure of Zn-L_{TC} (right).^[19] Numbering of the cysteines of L_{TC} is shown.

Zn·LTC is stable to triplet oxygen in phosphate buffer (pH 7.0) but photooxidation by singlet oxygen, generated *in situ* in irradiating the Rose Bengal photosensitizer, yields several oxidation products. Irradiation time was adjusted so that unreacted Zn·LTC remains in the solution after irradiation in order to focus on primary oxidation products only. Solutions were analyzed by HPLC. A typical chromatogram is shown in Figure 2 and displays four new products after photooxidation, labeled LTC_A-D.

All these peaks were collected and analyzed by ESI-MS. LTC_C is the previously known bis-disulfide form of LTC with two disulfides into each CXXC motif^[16] because of (i) its mass spectrum which displays a peak at *m/z* 785.3 (3+) corresponding to the loss of 4 Da compared with LTC, (ii) its disappearance from the chromatogram when TCEP (*tris*(carboxyethyl)phosphine, a disulfide reducing agent) is added to the solution (Figure S1 of SI) and (iii) its retention time. LTC_A, LTC_B and LTC_D displayed the same mass spectra with a 32 Da mass increase (*m/z* 797.3 (3+)) compared with LTC (*m/z* 786.6 (3+)) suggesting the formation of products that have incorporated two oxygen atoms. Each oxidation product was digested by endopeptidases and analyzed by ESI-MS. For LTC_D, digestion by both trypsin and GluC gave a peak at *m/z* 508.0 (1-) corresponding to the addition of 32 Da to the VCQE digestion fragment. It loses 66 Da during MS/MS experiment in agreement with the loss of a SO₂H₂ fragment, thereby evidencing the formation of a sulfinate on Cys 13. Similarly, for LTC_B, sulfinate formation on Cys 16 was evidenced by a peak at 695.9 (1+) i.e. +32 Da compared with CSKKE fragment. For LTC_A, sulfinate is formed in the cycle as evidenced by a peak at 1171.5 (1+) corresponding to a +32 Da increase compared with peptide c(PCE(PGR)NCGK^{DP}). Unfortunately, as the cycle cannot be digested, it was not possible to determine which cysteine is oxidized. Nevertheless, inspection of the structure of Zn·LTC in solution as determined by NMR^[19] shows that the Cys 2 sulfur is totally shielded from solvent in contrast to Cys 5, which is highly exposed. Thus, we can infer that the sulfinate of LTC_A is on Cys 5. In all cases, peaks attributable to non-oxidized peptidic fragments were observed as detailed in the SI.

¹O₂ oxidation of Zn·LTC yields 90% sulfinate-containing peptides and 10% bis-disulfide peptides as deduced from integration of HPLC chromatograms. This results contrasts strongly with photooxidation of glutathione which yields S-S bond-containing products (disulfide or thiosulfinate ester) as major products (> 70%).^[8] The same trend was observed for photooxidation of free LTC at pD 7.0 that yields 65% disulfide- and 35% sulfinate-containing peptides (Figure S6 of SI). Therefore, binding of Zn²⁺ to the cysteines favors the formation of sulfinate over disulfide.

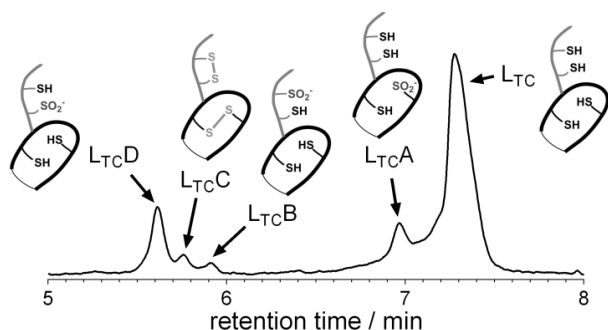


Figure 2. Chromatogram obtained after photooxidation of Zn·LTC in phosphate buffer in D₂O (pD 7.0).

In order to assess the efficiency of the oxidation of Zn·LTC by ¹O₂, kinetic studies were performed. ¹O₂ can chemically react with

Zn·LTC to yield LTC_A, LTC_B, LTC_C and LTC_D (rate constant *k_r*) or it can be physically quenched by Zn·LTC (rate constant *k_q*). The rate of total ¹O₂ removal by Zn·LTC (*k_T* = *k_r* + *k_q*) was measured by singlet oxygen luminescence quenching experiments (Figure 3A and Table 1, see SI for experimental details). Measurements of *k_r* were performed by photooxidation competition experiments between Zn·LTC and water-soluble anthracene-based ¹O₂ traps. These traps react with ¹O₂ to form stable endoperoxides (Scheme 1). In such experiments, the ratio of the rate constants *k_{r1}* and *k_{r2}* of two competitors C₁ and C₂ is given by Equation (1) where [C_i]₀ and [C_i]_f are concentrations of compound C_i before and after photooxidation, respectively.

$$\frac{k_{r1}}{k_{r2}} = \frac{\ln\left(\frac{[C_1]_f}{[C_1]_0}\right)}{\ln\left(\frac{[C_2]_f}{[C_2]_0}\right)} \quad (1)$$

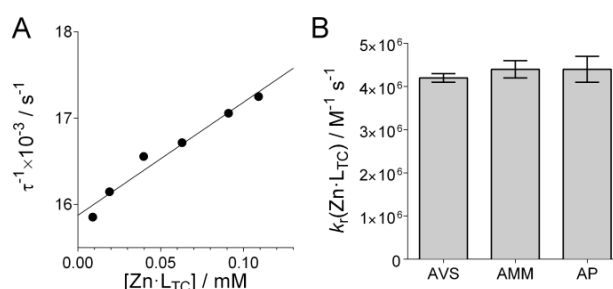
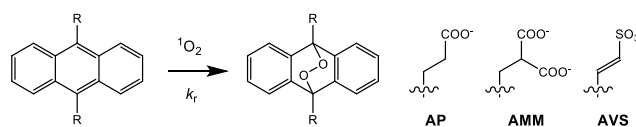


Figure 3. (A) Singlet oxygen luminescence quenching experiment for Zn·LTC: plot of (lifetime)⁻¹ vs [Zn·LTC]. (B) Evaluation of *k_r* for Zn·LTC by competition experiments with anthracene-based traps monitored by HPLC.

Table 1. Rate constants of total ¹O₂ removal (*k_T*) and chemical reaction with ¹O₂ (*k_r*) of anthracene traps and peptides in phosphate buffer (pD 7.0), 298 K.

	<i>k_T</i> × 10 ⁶ / M ⁻¹ s ⁻¹	<i>k_r</i> × 10 ⁶ / M ⁻¹ s ⁻¹
AP	17 (2)	13 (2)
AMM	13 (1)	5.4 (8)
AVS	44 (7)	2.8 (4)
Zn·LTC	14 (1)	4.3 (4)
LTC(AAAA)	11 (1)	< 0.1
EGWGK	23 (2)	4.6 (5)



Scheme 1. Structure of the anthracene-based ¹O₂ traps and their chemical reaction with ¹O₂.

Three different traps were used for these competitions experiments: AP (9,10-bis(propionate)anthracene), AMM (9,10-bis(methylmalonate)anthracene) and AVS (9,10-bis(vinylsulfonate)anthracene) (Scheme 1). AVS is more soluble in water and its synthesis is more facile than AP and AMM.^[20] We have determined the *k_r* values of these anthracene traps in our buffer conditions (phosphate pD 7.0) by measuring the quantum efficiency of their photooxidation (Table 1). Values for AP and AMM are identical within experimental error to those at pH 7.4 reported by Kuznetsova *et al.*^[21] To our knowledge, the *k_r* value of AVS was not previously reported in the literature. Among these three traps, *k_r*

increases in the order AVS < AMM < AP and spans over *ca.* one order of magnitude. HPLC was used to determine k_r for Zn-L_{TC} by competition with the anthracene traps. All three anthracene traps yielded the same value of k_r i.e. $(4.3 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Zn-L_{TC} within experimental error (Figure 3B). Hence, the chemical reaction represents *ca.* one third of the rate of total ¹O₂ removal and physical quenching *ca.* two third ($k_q \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

From the nature of the reaction products L_{TC}A, L_{TC}B, L_{TC}C and L_{TC}D, it is clear that chemical reaction involves the zinc-bound sulfurs only but physical quenching may originate from both the ZnS₄ core and its peptidic envelope. In order to assess the contribution of each component, L_{TC}(AAAA), the four Cys to Ala mutant of L_{TC} was synthesized (Figure 1). L_{TC}(AAAA) corresponds to the peptidic envelope surrounding the ZnS₄ core in Zn-L_{TC}, i.e. {Zn-L_{TC} – ZnS₄}. A value of $(11 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was measured for the k_r of L_{TC}(AAAA). No chemical reaction was observed in conditions used for the photooxidation of Zn-L_{TC} and competition with AVS showed exclusive consumption of AVS. Thus we can estimate $k_r < 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for L_{TC}(AAAA). Hence, the physical quenching measured for L_{TC}(AAAA) and Zn-L_{TC} are identical within limits of error. This means that in Zn-L_{TC}, the peptidic envelope is responsible for the physical quenching of ¹O₂ and the ZnS₄ core for the chemical reaction.

The kinetics of the reaction of isolated amino acids with ¹O₂ have been extensively studied and show that amino acids with sulfur atoms (Cys and Met) or aromatic rings (Trp, Tyr, His) are the most reactive. However, data concerning amino acids incorporated in proteins are scarce. Recently, Jensen *et al.* have reported the k_r values for tryptophan residues of various proteins in phosphate buffer (pD 7.4).^[22] These values range from $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for solvent-exposed tryptophans down to below $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for buried tryptophans. We believe that these values are overestimated by an order of magnitude and that the k_r value for solvent-exposed tryptophan would rather be *ca.* $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^[23] This was confirmed by measuring the k_r value of the tryptophan in the five amino acids peptide EGWGK. A k_r value of $(4.6 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was obtained by competition with AMM and AVS (Table 1 and SI). Therefore, the ZnS₄ core of Zn-L_{TC} reacts chemically with ¹O₂ at a rate that is similar to that of solvent-exposed tryptophans residues in proteins. Additionally, in contrast to tryptophans, zinc fingers are often exposed to solvent and thus, they appear as sensitive targets for ¹O₂.

Finally, we focused on the consequences of the reaction of the ZnS₄ core on the stability of the zinc complex in order to determine if a treble clef zinc finger would be destroyed in cellular conditions. For this purpose, Zn²⁺ binding studies were performed with the sulfinate-containing peptides L_{TC}A, L_{TC}B and L_{TC}D as previously reported for L_{TC}.^[19] Titration of L_{TC}A by Zn²⁺ in phosphate buffer (pH 7.0) was monitored by CD spectroscopy (Figure 4A). The evolution of the CD spectrum is very similar to that of the parent complex Zn-L_{TC} and attests to the formation of a 1:1 metal/peptide complex as the final species. Its CD spectrum resembles that of Zn-L_{TC} thereby suggesting that L_{TC}A folds the same way around Zn²⁺ in the 1:1 complex. However, the evolution of the CD at 205 nm and 225 nm shows a slight curvature below 1.0 eq. Zn²⁺, which was not observed with Zn-L_{TC} (Figure 4B). This indicates the presence of another complex besides the 1:1 complex and a substantial destabilization of the 1:1 complex compared with the parent peptide L_{TC}. Factor analysis performed with the program SPECFIT^[24] confirmed the existence of three absorbing species: the free peptide and the 1:1 and 1:2 complexes. In order to determine the apparent Zn²⁺ binding constants $K_{11} = [\text{Zn}(\text{L}_{\text{TC}}\text{A})]/[\text{Zn}][\text{L}_{\text{TC}}\text{A}]$ and $K_{12} = [\text{Zn}(\text{L}_{\text{TC}}\text{A})_2]/[\text{Zn}][\text{L}_{\text{TC}}\text{A}]^2$, titrations were performed in the presence of HEDTA and EGTA as competitors. Fitting these titrations with SPECFIT^[24] (Figure 4C and 4D) yielded $K_{11} = 10^{9.5(3)} \text{ M}^{-1}$ and $K_{12} = 10^{14.4(3)} \text{ M}^{-2}$. Notably, K_{11} is *ca.* 5 orders of magnitude

lower than that of Zn-L_{TC} ($10^{14.7(1)} \text{ M}^{-1}$).^[19] A similar behavior was observed for L_{TC}D with K_{11} and K_{12} values of $10^{10.3(4)} \text{ M}^{-1}$ and $10^{17.3(2)} \text{ M}^{-2}$, respectively (see SI).^[25] All this shows that oxidation of a single cysteine into a sulfinate significantly decreases the Zn²⁺ binding affinity of L_{TC} by *ca.* 4-5 orders of magnitude. It is worth noting that concentration of free zinc in cells was estimated to be buffered around 10-100 pM.^[26,27] By decreasing the affinity of a treble clef zinc finger from *ca.* 10^{15} M^{-1} down to 10^{10} M^{-1} , ¹O₂ oxidation would lead to Zn²⁺ release and unfolding of the zinc finger domain as a structural consequence.

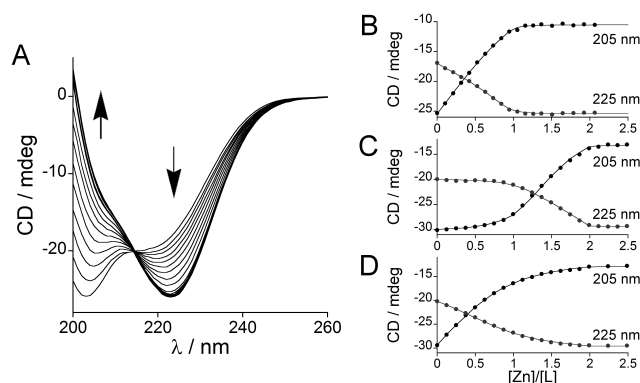


Figure 4. (A) CD titration of L_{TC}A (20 μM) by Zn²⁺. (B) Evolution of the CD at 205 nm and 225 nm against the Zn²⁺/peptide ratio for direct titration (A). (C) Evolution of the CD at 205 nm and 225 nm for the titration of L_{TC}A (23 μM) and HEDTA (23 μM) by Zn²⁺. (D) Evolution of the CD at 205 nm and 225 nm for the titration of L_{TC}A (23 μM) and EGTA (23 μM) by Zn²⁺. In (B), (C) and (D), solid lines correspond to the fits with the K_{11} and K_{12} values given in the text. Titrations were performed in phosphate buffer (20 mM, pH 7.0, 298 K). All spectra were corrected for dilution.

In conclusion, we have shown that ¹O₂ interacts exclusively by chemical reaction with the zinc-bound cysteines of Zn-L_{TC}, a Zn(Cys)₄ treble clef zinc finger model to form sulfinates with a rate constant $k_r = (4.3 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ which is competitive with that of the most reactive solvent-exposed tryptophans. Such an oxidation strongly destabilizes the zinc finger site. This study demonstrates that zinc finger proteins can be targets for ¹O₂. This also raises the possibility that some zinc fingers may be involved in ¹O₂ sensing, and the zinc finger site of ChrR^[6] appears as a likely candidate for such a role. Interestingly, a small zinc finger protein was shown to be required for induction of ¹O₂-dependent gene expression and photooxidative stress resistance in several organisms.^[28] The reactivity of other zinc fingers is now under investigation.

Keywords: singlet oxygen • metalloprotein • oxidation • cysteine • sulfinic acid

- [1] P. R. Ogilby, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3181–3209.
- [2] J. Glaeser, A. M. Nuss, B. A. Berghoff, G. Klug, in *Adv. Microb. Physiol. Vol 58* (Ed.: R.K. Poole), Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, London, **2011**, pp. 141–173.
- [3] E. C. Ziegelhoffer, T. J. Donohue, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 856–863.
- [4] L. O. Klotz, K. D. Kroncke, H. Sies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 88–94.
- [5] C. Triantaphylides, M. Havaux, *Trends Plant Sci.* **2009**, 14, 219–228.

- [6] J. D. Newman, J. R. Anthony, T. J. Donohue, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 485–499.
- [7] M. J. Davies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 761–770.
- [8] T. Devasagayam, A. Sundquist, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **1991**, *9*, 105–116.
- [9] C. A. Grapperhaus, M. J. Maguire, T. Tuntulani, M. Y. Darensbourg, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1860–1866.
- [10] Y. Zhang, K. D. Ley, K. S. Schanze, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7102–7110.
- [11] W. B. Connick, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11620–11627.
- [12] D. Zhang, Y. Bin, L. Tallorin, F. Tse, B. Hernandez, E. V. Mathias, T. Stewart, R. Bau, M. Selke, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 1676–1678.
- [13] C. Galvez, D. G. Ho, A. Azod, M. Selke, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3381–3382.
- [14] K. D. Kroncke, L. O. Klotz, C. V. Suschek, H. Sies, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13294–13301.
- [15] A. Jacques, B. Mettra, V. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Chem.-Eur. J.* **2013**, *19*, 3921–3931.
- [16] E. Bourlès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Chem-Eur J* **2011**, *17*, 13762–13772.
- [17] M. Isaac, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Chem Sci* **2012**, *3*, 3409–3420.
- [18] C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26325.
- [19] O. Sènèque, E. Bonnet, F. L. Joumas, J.-M. Latour, *Chem-Eur J* **2009**, *15*, 4798–4810.
- [20] V. Nardello, J. M. Aubry, P. Johnston, I. Bulduk, A. H. M. de Vries, P. L. Alsters, *Synlett* **2005**, 2667–2669.
- [21] N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, O. A. Yuzhakova, V. M. Negrimovskii, O. L. Kaliya, E. A. Luk'yanets, *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, *71*, 36–41.
- [22] R. L. Jensen, J. Arnbjerg, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9820–9826.
- [23] These authors measured the k_t values by competition experiments with AMM. They assumed that AMM interacts with ¹O₂ by chemical reaction without physical quenching ($k_t = k_T$) and they determined the k_T of AMM to be $5.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ which differs markedly from the k_r value in D₂O solution buffered with phosphate at pD 7.0 (see ref. 21, Table 1 and SI). This led an overestimation by a factor of 10 of the k_t values they reported for the tryptophans of various proteins.
- [24] R. Binstead, A. Zuberbühler, *SPECFIT Global Analysis System, Version 3.0*, Spectrum Software Associates, **2000**.
- [25] We did not have a sufficient amount of L_{TC}B for complete analysis but its behavior is similar to that of L_{TC}D with formation of 1:1 and 1:2 complexes. This also suggests a weakening of the 1:1 complex compared with L_{TC}.
- [26] W. Maret, Y. Li, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4682–4707.
- [27] W. Maret, *Adv. Nutr.* **2013**, *4*, 82–91.
- [28] N. Shao, G. Y. Duan, R. Bock, *Plant Cell* **2013**, *25*, 4209–4226.

2. Informations supplémentaires

Materials and Methods

N- α -Fmoc-protected amino acids for peptide synthesis, PyBOP coupling reagent and resins were obtained from Novabiochem. Other reagents for peptide synthesis, solvents, buffers and metal salts were purchased from Sigma-Aldrich. Peptide L_{TC} was synthesized as described previously.^[1,2] HPLC analyses and purifications were performed on a Agilent Infinity 1200 system or on a VWR LaPrep system. Analytical and preparative HPLC separations were performed using Chromolith (Merck) RP-18e 10-4.6mm column and XBridge Prep (Waters) C18 5 μm 150-19mm column, respectively. Mobile phase consisted in a gradient of solvent A (0.1% TFA in H_2O) and B (0.1% TFA in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1). ESI-MS analyses were performed on a Thermo LXQ spectrometer. UV-Vis spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer, a Varian Cary 50 or a Varian Cary 5000 UV-vis-NIR spectrophotometer. CD spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan spectropolarimeter. Fluorescence emission spectra were recorded on a Cary Eclipse fluorescence spectrometer. UV-Vis, CD and fluorescence spectrometers are equipped with a thermo-regulated cell holder. All buffer or metal solutions were prepared with MilliQ water (Millipore) or pure deuterium oxide (D_2O , 99.9% Eurisotop) and purged with argon. Buffer solutions were treated with Chelex 100 resin (Biorad) to remove metal traces. ZnCl_2 stock solution was prepared by dissolving the metal salt (99.999%, Sigma-Aldrich) in water. Its concentration was determined by colorimetric EDTA titration. Photo-oxidation for HPLC analyses were performed by irradiation of the solution with a 400 W (Brilliant) halogen lamp. Singlet oxygen luminescence decays were recorded in air-equilibrated D_2O solutions exciting at 532 nm with an Innolas MOPA-1, variable repetition rate (1-5000 Hz) Nd:YAG laser recording on a Horiba Jobin-Yvon Fluorolog-3 equipped with Hamamatsu H10330-45 NIR detector configured with a Fastcom P7889 100 ps multistop TDC acquisition card operating at 10 GHz. Equally, a 12 kHz Nanolase Nd:YAG laser ($\lambda_{\text{em}} = 532 \text{ nm}$) was used as an excitation source for photodegradation reactions studies, whose output power was measured before each experiment.

Preparation of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ stock solutions

Solutions of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ were prepared by adding 1.1 eq. Zn^{2+} to a solution of free peptide (1-1.5 mM) in H_2O or D_2O (exact concentration determined by Ellman's assay^[3]) and adjusting the pH to 7.0 with NaOH and HCl (or NaOD and DCl for D_2O solutions).

Photooxidation of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$

Stock solutions of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ (1-1.5 mM) and Rose Bengal (410 μM) were diluted to 50-200 μM and 0.5-2 μM final concentration, respectively, in phosphate buffer (20 mM) in D_2O (pD 7.0). The solution was equilibrated 5 min at 298 K or 278 K (to increase the concentration of dissolved O_2 when needed for high concentrations of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$) using a thermo-regulated water bath. Irradiation times were in the range 5 seconds to 2 minutes to avoid over-oxidation of the peptide. Samples were analyzed by HPLC. In order to identify disulfide-containing peptides, samples were injected twice, before and after reaction with 20-50 eq. TCEP (*tris*(2-carboxyethyl)phosphine).

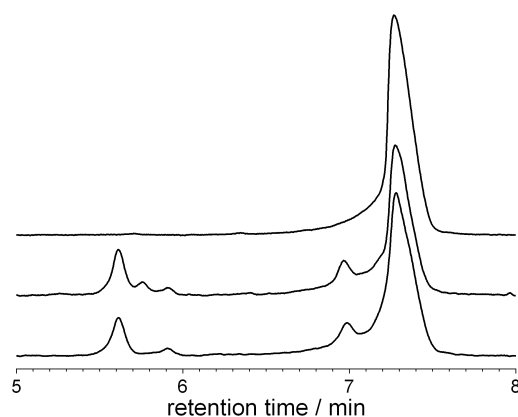


Figure S1. HPLC chromatograms of L_{TC} (top), crude photooxidization mixture (middle) and photooxidization mixture after reduction with TCEP (bottom). Note the disappearance of the peak at 5.7 min in the TCEP sample.

Identification of sulfinic-containing peptides $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$, $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ and $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$

Oxidation products of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ were isolated by HPLC and lyophilized. Isolated peptides were analyzed by ESI-MS (Figure S2 displays the HPLC analytical chromatograms of the samples used for analysis). Then, digestions with peptidases were processed as follows. Peptide powders (0.1-0.2 mg) were dissolved in 200 μL H_2O . Then, 140 μL of ammonium acetate (25 mM pH 7.0) were added to a 50 μL aliquot of the peptide solution as well as 10 μL of peptidase (Trypsin 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ or GluC 200 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Solutions were incubated at 37°C overnight and analyzed by ESI-MS ($\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ and $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$) or LC-MS ($\text{L}_{\text{TC}}\text{C}$) with and without TCEP.

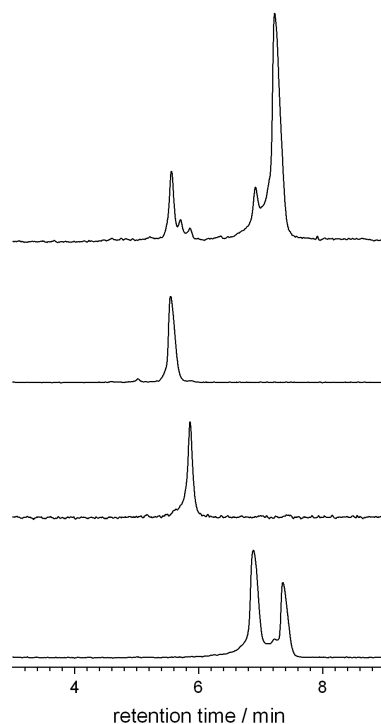


Figure S2. HPLC chromatograms of samples used for digestion and mass spectrometry analyses. From top to bottom: crude photooxidization mixture, $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ sample, $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ sample and $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ sample (this chromatogram shows that the $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ sample contains a mixture of $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ and L_{TC}).

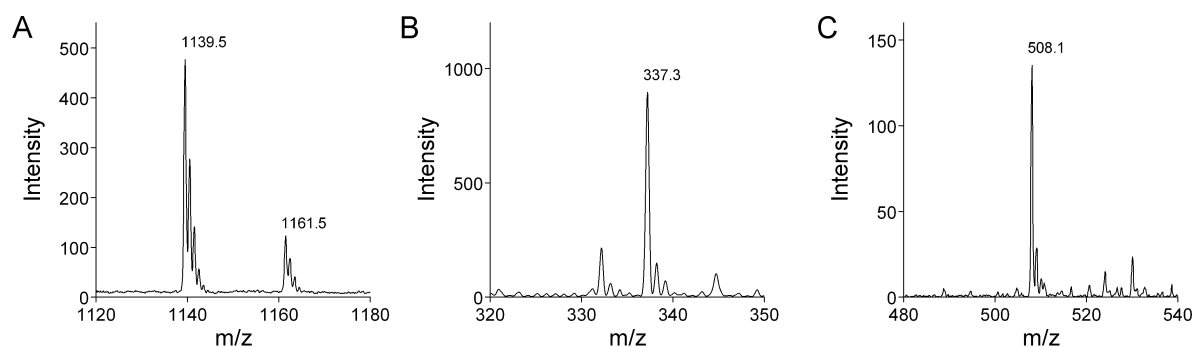


Figure S3. ESI-MS spectra of L_{TcD} digested by trypsin and GluC obtained by direct analysis of the crude digestion mixture. (A) ESI-MS spectrum (positive mode) of non-oxidized peptide c(PCE(PGR)NCGK^DPP): peaks at $m/z = 1139.5$ and 1161.5 (calculated $m/z = 1139.5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ and 1161.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{N}_{16}\text{O}_{14}\text{S}_2$). (B) ESI-MS spectrum (positive mode) of non-oxidized peptide CSK: peaks at $m/z = 337.3$ (calculated $m/z = 337.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$). (C) ESI-MS spectrum (negative mode) of peptide VCQE incorporating two additional O atoms: peak at $m/z = 508.1$ (calculated $m/z = 508.2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ for $\text{M} = \text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$).

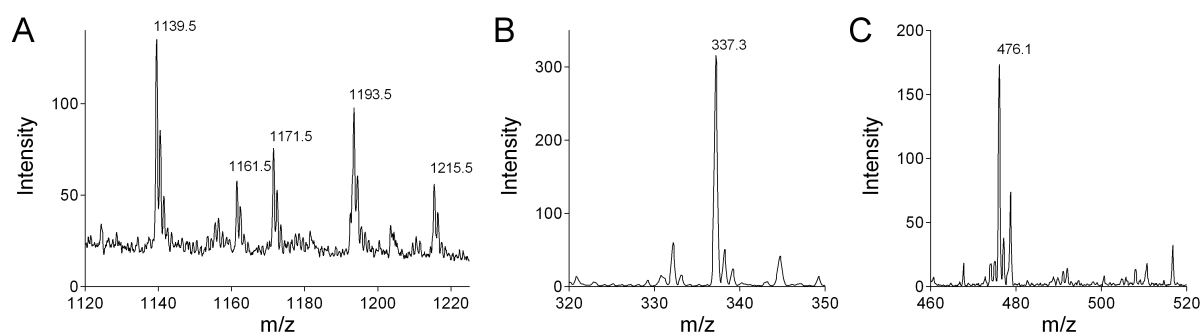


Figure S4. ESI-MS spectra of L_{TcA} digested by trypsin and GluC obtained by direct analysis of the crude digestion mixture. (A) ESI-MS spectrum (positive mode) of peptide c(PCE(PGR)NCGK^DPP) incorporating two additional O atoms: peaks at $m/z = 1171.5$, 1193.5 and 1215.5 (calculated $m/z = 1171.5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1193.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and 1215.5 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{S}_2$). The investigated sample contained a mixture of L_{TcA} and non-oxidized L_{Tc} . Peaks at 1139.5 and 1161.5 correspond to the non-oxidized peptide c(PCE(PGR)NCGK^DPP) (see Figure S3). (B) ESI-MS spectrum (positive mode) of non-oxidized peptide CSK: peaks at $m/z = 337.3$ (calculated $m/z = 337.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$). (C) ESI-MS spectrum (negative mode) of non-oxidized peptide VCQE: peak at $m/z = 776.3$ (calculated $m/z = 776.2$ $[\text{M}+\text{H}]^-$ for $\text{M} = \text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$).

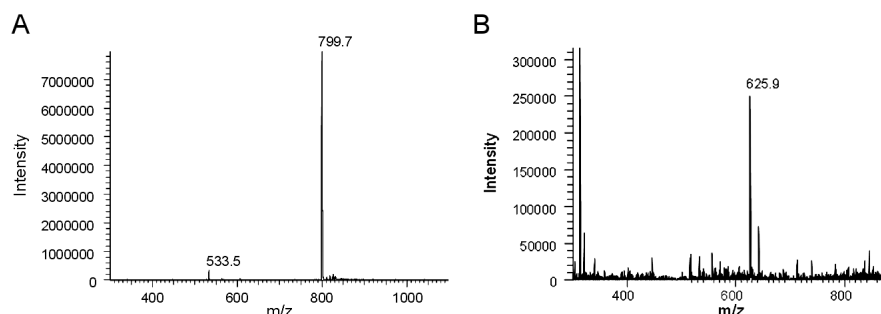


Figure S5. ESI-MS spectra of L_{TcB} digested by GluC obtained during LC/MS analysis. (A) ESI-MS spectrum (positive mode) of non-oxidized peptide c(PCE(PGRVCQE)NCGK^DPP): peaks at $m/z = 799.7$ and 533.5 (calculated $m/z = 799.8$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ and 533.6 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ for $\text{M} = \text{C}_{64}\text{H}_{103}\text{N}_{21}\text{O}_{21}\text{S}_3$). (B) ESI-MS spectrum (positive mode) of peptide CSKKE incorporating 2 additional O atoms: peak at $m/z = 625.9$ (calculated $m/z = 625.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}$).

Photooxidation of metal-free L_{TC}

Photooxidation of metal-free L_{TC} was performed as described above for Zn·L_{TC} but with (i) a higher Rose Bengal concentration (6 μM) to shorten irradiation time (6 s), (ii) 15 seconds equilibration only at 278 K after dilution and before irradiation and (iii) quenching with trifluoroacetic acid immediately after irradiation to avoid oxidation of the peptide by ³O₂. Samples were analyzed by HPLC (i) directly after irradiation (Figure S6A) and (ii) following addition of TCEP after irradiation (Figure S6B). Control experiments in the dark or with irradiation without Rose Bengal in the solution showed no oxidation of L_{TC} (Figure S6C).

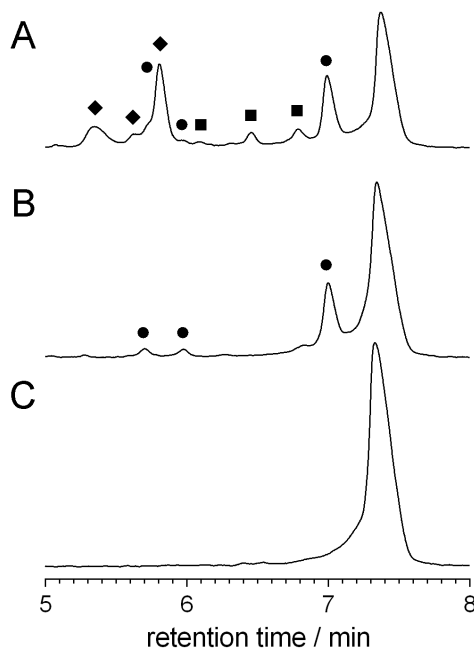


Figure S6. HPLC chromatograms for photooxidation of metal-free L_{TC}: (A) directly after irradiation, (B) following addition of TCEP and (C) control experiment. The peak on the right at 7.4 min corresponds to L_{TC}. Other peaks: ● = sulfinate-containing peptides L_{TC}A, L_{TC}B and L_{TC}D (the fourth sulfinate-containing peptide might tentatively be assigned to the small peak at 6.7 min in (B) close to L_{TC}A at 7.0 min), ♦ = bis-disulfide products, ■ = mono-disulfide products.

Determination of total ¹O₂ removal rate constants k_T

The total rate of removal of singlet oxygen upon reaction with a quencher (Q), which is either a peptide or an anthracene trap (9,10-bis(propionate)anthracene (AP), 9,10-bis(methylmalonate)anthracene (AMM) or 9,10-bis(vinylsulfonate)anthracene (AVS)) was measured by singlet oxygen luminescence decay experiments. k_T comprises contributions from both physical quenching (k_q) and chemical reactions (k_r). Time-resolved emission experiments were performed by exciting a series of D₂O solutions (phosphate buffer pD 7.0) containing the photosensitizer (Rose Bengal: R. B.) each with a different concentration of anthracene or peptide quencher, [Q], with a short (ns) laser pulse and monitoring the rate of singlet oxygen luminescence decay (1270 nm). Equation (1) was used to determine a rate constant of total ¹O₂ removal k_T , where τ and τ_0 are the lifetime of singlet oxygen luminescence decay in the presence and absence of quencher, respectively.

$$\frac{1}{\tau} = k_T[Q] + \tau_0 \quad (1)$$

The singlet oxygen decays were typically recorded on a 163 μs scale, binning data in 512 ps channels in a multichannel scaling approach. The obtained spectra were fitted using equation (2) where A is pre-exponent and τ_D and τ_R are the decay and rise time of singlet oxygen emission respectively.^[4] k_T was obtained as the slope of τ_D^{-1} vs [Q] (Figure S7 and Table 1 of the article).

$$I(t) = \frac{A}{\tau_R^{-1} - \tau_D^{-1}} \left[e\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) - e\left(-\frac{t}{\tau_R}\right) \right] \quad (2)$$

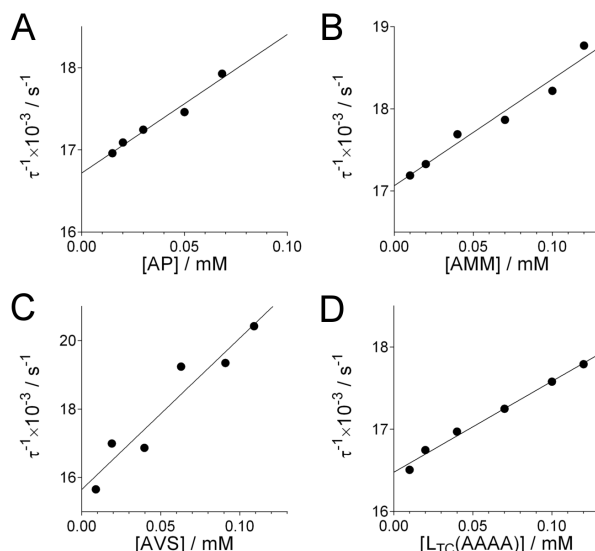


Figure S7. Total rate of singlet oxygen deexcitation as a function of quencher concentration, where quencher is AP (A), AMM (B), AVS (C) and $\text{L}_{\text{TC}}(\text{AAAA})$ (D) in aqueous buffer solution (phosphate buffer in D_2O pD 7.0). Singlet oxygen generation is sensitized by Rose Bengal at 298 K ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 1270 \text{ nm}$).

The k_T value determined for AVS ($k_T = (4.4 \pm 0.7) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) was in excellent agreement with that reported in unbuffered D_2O by Nardello *et al.* ($k_T = 4.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[5] The k_T values for AMM is lower ($k_T = (1.3 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) than that reported by Jensen *et al.* ($k_T = (5.5 \pm 0.5) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). However, when k_T was measured in unbuffered D_2O with pD adjusted at 7.0 using NaOD, we found k_T to be $(4.3 \pm 0.9) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, very close to the value of Jensen *et al.*^[6] A similar trend was observed for AP, with k_T values 4.3 times lower in buffered than in unbuffered D_2O (pD 7.0). Therefore, for AP and AMM, the k_T seems to depend on the buffer conditions. The reason for this is currently unclear (one possible explanation could be aggregation at low ionic strength). However, from the k_T and k_r (*vide infra*) values determined here, it is clear that for the three anthracene traps, physical quenching happens in water, in agreement with the results of Kuznetsova *et al.*^[7]

Determination of the rate constants k_r for the reaction of the anthracene traps with $^1\text{O}_2$

The dependence of the quantum efficiency of photooxidation of anthracenes AP, AMM and AVS on the concentration of anthracenes was studied in a buffer solution (phosphate pD 7.0) with Rose Bengal (3.7 to 4.0 μM) as $^1\text{O}_2$ sensitizer. Irradiation was performed in a standard 1 cm quartz cell. Consumption of the singlet oxygen trap was monitored by a decrease of the absorbance at 380 nm or 398 nm. Equation 3 shows the relationship between the quantum efficiency of photooxidation of a singlet oxygen trap, ϕ , with respect to the anthracene concentration, [A], and properties of the singlet

oxygen and the photosensitizer. For the Rose Bengal photosensitizer $\phi_\Delta = 0.75$, while $k_d = 1/\tau_0$ in D_2O , where τ_0 = natural luminescence lifetime of singlet oxygen emission.^[7,8] Least-squares fitting of the experimental data, according to equation 3, plotting $1/\phi$ vs $1/[A]_0$ gives a slope which is related to k_r according to equation 4.

$$\frac{1}{\phi} = \frac{1}{\phi_\Delta} \left(\frac{k_q + k_r}{k_r} + \frac{k_d}{k_r} \frac{1}{[A]} \right) \quad (3)$$

$$\text{slope} = \frac{k_d}{\phi_\Delta \times k_r} \quad (4)$$

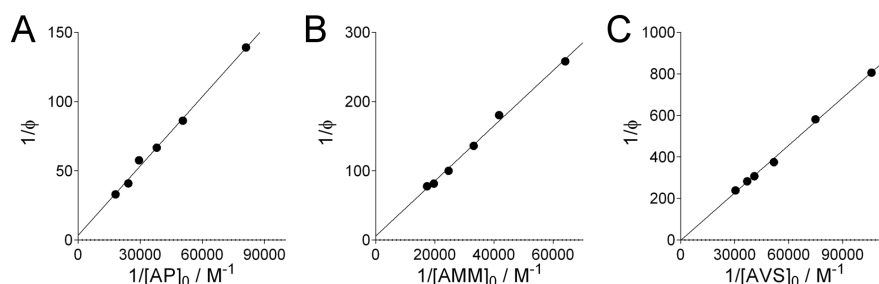


Figure S8. Plot of $1/\phi$ vs $1/[A]_0$ for photooxidation of (A) AP, (B) AMM and (C) AVS in aqueous buffer solution (phosphate buffer in D_2O pD 7.0) sensitized by Rose Bengal at 298 K ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm).

The ratios of k_r for pairs of anthracene traps were checked by HPLC. For this purpose, competitions were performed with mixtures of two or three anthracenes. These solutions were made by dilution to 50-100 μM final concentrations of stock solutions of anthracenes AP (1.11 mM), AMM (1.1 mM) and AVS (5.1 mM) in phosphate buffer (20 mM) in D_2O (pD 7.0) containing 0.8-1.6 μM Rose Bengal. Experiments were repeated with different irradiation times. The ratio k_{r1}/k_{r2} pairs of anthracene traps (A_1, A_2) was calculated with equation (5) using $[A_i]/[A_i]_0$ values determined by integration of the HPLC chromatograms before and after irradiations (Figure S9A displays a typical chromatogram).

$$\frac{k_{r1}}{k_{r2}} = \frac{\ln\left(\frac{[A_1]}{[A_1]_0}\right)}{\ln\left(\frac{[A_2]}{[A_2]_0}\right)} \quad (5)$$

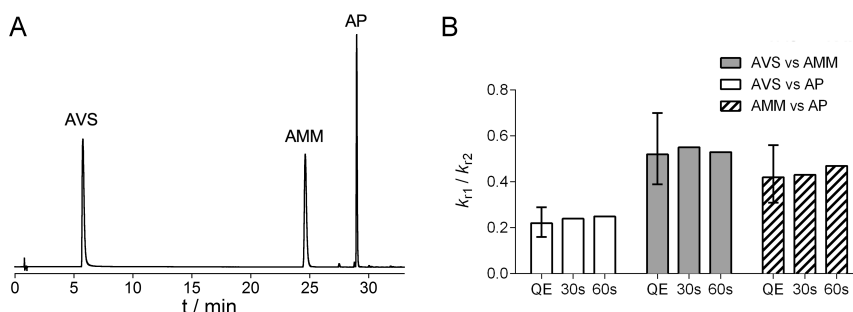


Figure S9. Measure of relative reactivity of $^1\text{O}_2$ with anthracene-based traps *via* HPLC monitoring. (A) Chromatogram ($\lambda_{\text{abs}} = 380$ nm) of a mixture of AP (90 μM), AMM (90 μM) and AVS (80 μM). (B) Plot of k_{r1}/k_{r2} for pairs of anthracene traps (A_1, A_2) after 30 or 60 s irradiations ($[\text{Rose Bengal}] = 0.8$ μM ; phosphate buffer (20 mM) in D_2O (pD 7.0)). The QE bars correspond to the ratio k_{r1}/k_{r2} deduced from quantum efficiency experiments (*vide supra* and Table 1 of the article).

Determination of the rate constants k_r for the reaction of ZnL_{TC} and $\text{L}_{\text{TC}}(\text{AAAA})$ with $^1\text{O}_2$

The rate constant k_r for chemical reaction of $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ with $^1\text{O}_2$ was determined by performing a competitive photooxidation between $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}$ or $\text{L}_{\text{TC}}(\text{AAAA})$ and anthracene traps as described above for pairs of anthracene traps. Consumption of the compounds was monitored by HPLC.

Determination of the rate constant k_r for the reaction of peptide EGW GK with $^1\text{O}_2$

The rate constant k_r for chemical reaction of EGW GK with $^1\text{O}_2$ was determined performing a competitive photooxidation between AMM and EGW GK according to Jensen *et al.*^[6] A solution containing EGW GK (42 μM), AMM (12 μM) and Rose Bengal (0.8 μM) in buffered D_2O (20mM phosphate, pD 7.0) was irradiated in a quartz cuvette. Consumption of AMM and EGW GK was monitored by recording fluorescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$) before and after each irradiation leading $k_r = 4.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Equally, similar experiments were analyzed by HPLC. Analysis of consumption of AMM and EGW GK, judged by integration of HPLC chromatograms yielded $k_r = 4.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. HPLC monitoring of competition experiments with AVS yielded $k_r = 4.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Taking these values together, a reliable value of $(4.6 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ can be used for the k_r of EGW GK. The major oxidation product of EGW GK has a UV-Vis spectrum that matches that of N-formylkynurenine, which is known from the literature to be the major photooxidation product of tryptophans in peptides.^[9–11]

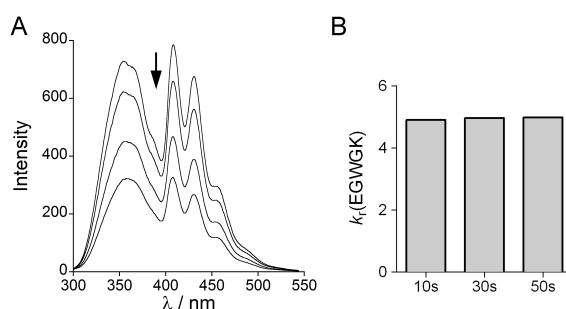


Figure S10. Reactivity of $^1\text{O}_2$ with peptide EGW GK: Fluorescence competition experiments. (A) Evolution of fluorescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) upon irradiation (0, 10, 30 and 50 s) of a mixture of EGW GK (42 μM) and AMM (12 μM) in phosphate buffer (20 mM) in D_2O (pD 7.0) containing Rose Bengal (0.8 μM). The broad emission with $\lambda_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$ corresponds to EGW GK tryptophan emission and the band with vibronic structure above 400 nm corresponds to AMM emission. (B) Plot of $k_r(\text{EGW GK})$ calculated with equation (5) for 10, 30 and 50 s irradiations.

Characterization of Zn^{2+} binding to $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$, $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ and $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$

Peptides $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$, $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ and $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ were prepared, purified by reverse-phase HPLC and lyophilized as described above for mass analysis but $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ was purified several times in order to afford a sample pure enough for these Zn^{2+} binding studies (the analytical chromatogram of the sample used is displayed on Figure S11). CD titrations were performed at 298 K under argon by adding aliquots of a degassed ZnCl_2 stock solution to a rubber-sealed quartz cell (0.4 cm path length) containing the peptide solution. Solutions of peptides (*ca.* 25 μM , the exact concentration was determined using Ellman's assay^[3]) were prepared in phosphate buffer (20 mM, pH 7.0). TCEP was added to the peptide solution (0.25 mM) to prevent the formation of disulfide during titrations. For competition experiments, EGTA, NTA or HEDTA (1-5 eq.) were added in the cuvette. For CD spectra, the signal was recorded over the 200 to 300 nm window every 1 nm with a 2 s signal averaging for each point. Each spectrum was recorded twice and averaged. The program SPECFIT^[12–16] was used to analyze the titrations, either direct or in competition with HEDTA and NTA. For $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$, direct titration shows three distinct phases (Figure S12A and S12B): (i) from 0 to 0.5 eq. Zn^{2+} , the negative band around 205 nm decreases in intensity and the

band around 215 nm shifts toward longer wavelengths with an isodichroic point at 219 nm (black); (ii) from 0.5 to 1.0 eq. Zn^{2+} , the band around 205 nm continues to decrease and the band at 222 nm shifts toward lower wavelengths and increases with an isodichroic point at 209 nm (red); (iii) above 1.0 eq. Zn^{2+} , the CD signal around 210 nm becomes less intense. In agreement with these three phases, factor analysis with SPECFIT yields four absorbing species: free $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$, 1:2 $\text{Zn}\cdot(\text{L}_{\text{TC}}\text{D})_2$ and 1:1 $\text{Zn}\cdot\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ complexes and a complex of higher $\text{Zn}/\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ ratio ($\text{Zn}_x\cdot(\text{L}_{\text{TC}}\text{D})_y$) that accumulates in excess Zn^{2+} . The titration in the presence of 3 eq. HEDTA displayed an evolution of the CD signal that corresponds to the first phase of the direct titration only until 3.5 eq. Zn^{2+} were added. Factor analysis using SPECFIT and fit of the titration up to 3.5 eq. added Zn^{2+} reveals the formation of the 1:2 complex only. For the competition with NTA, factor analysis with SPECFIT shows that free $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ and the 1:2 and 1:1 complexes are to be taken into account for $[\text{Zn}^{2+}] < [\text{L}_{\text{TC}}\text{D}] + [\text{NTA}]$. This shows that complex $\text{Zn}_x\cdot(\text{L}_{\text{TC}}\text{D})_y$ with $x > y$ has a low formation constant. Fitting the HEDTA and NTA competitions allows determining the 1:1 and 1:2 Zn^{2+} binding constants ($K_{11} = [\text{Zn}(\text{L}_{\text{TC}}\text{A})]/[\text{Zn}][\text{L}_{\text{TC}}\text{A}]$ and $K_{12} = [\text{Zn}(\text{L}_{\text{TC}}\text{A})_2]/[\text{Zn}][\text{L}_{\text{TC}}\text{A}]^2$): $\log K_{12} = 17.3$ (2) and $\log K_{11} = 10.3$ (4) (Figure S12C and S12D). Titration of $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ by Zn^{2+} is similar to that of $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ but a sufficient amount of peptide to perform was not available to perform competition experiments. The behavior of $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ is described in the article.

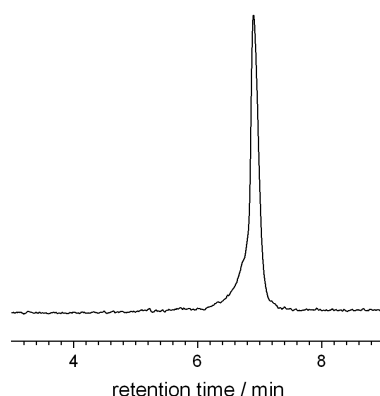


Figure S11. HPLC chromatograms of purified $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ used for Zn^{2+} binding studies. Note that $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ has been fully separated from L_{TC} in comparison with the chromatogram at the bottom of Figure S2.

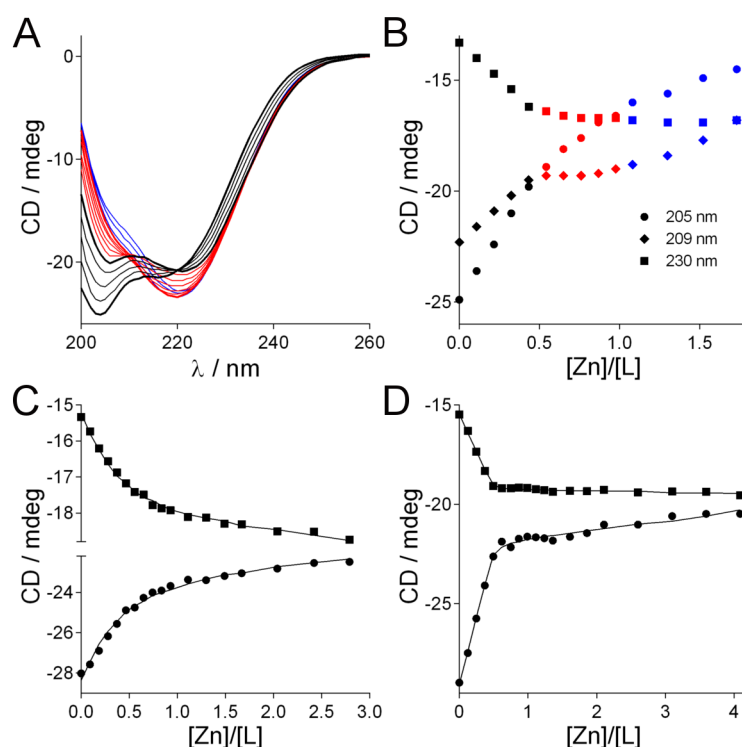


Figure S12. (A) CD titration of L_{TcD} (20 μM) by Zn^{2+} . Spectra in black, red and blue correspond to phases (i), (ii) and (iii), respectively (*vide supra*). (B) Evolution of the CD at 205 nm (dots), 218 nm (diamonds) and 230 nm (squares) against the Zn^{2+} /peptide ratio for direct titration A. (C) Evolution of the CD at 205 nm and 230 nm for the titration of L_{TcD} (25 μM) and HEDTA (76 μM) by Zn^{2+} . (D) Evolution of the CD at 205 nm and 230 nm for the titration of L_{TcD} (25 μM) and NTA (94 μM) by Zn^{2+} . In (B), (C) and (D), solid lines correspond to the fits obtained with SPECFIT that yielded $\log K_{11} = 10.3$ (4) and $\log K_{12} = 17.3$ (2). Titrations were performed in phosphate buffer (20 mM, pH 7.0, 298 K). All spectra were corrected for dilution.

References

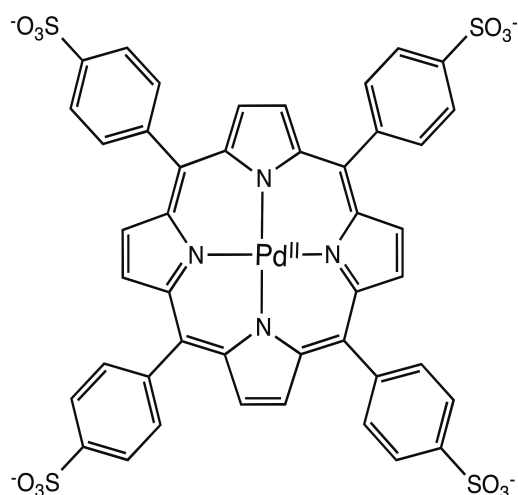
- [1] O. Sénèque, E. Bonnet, F. L. Joumas, J.-M. Latour, *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 4798–4810.
- [2] A. Jacques, B. Mettra, V. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem.-Eur. J.* **2013**, *19*, 3921–3931.
- [3] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 49–60.
- [4] D. Baumer, M. Maier, R. Engl, R. M. Szeimies, W. Baumler, *Chem. Phys.* **2002**, *285*, 309–318.
- [5] V. Nardello, J. M. Aubry, P. Johnston, I. Bulduk, A. H. M. de Vries, P. L. Alsters, *Synlett* **2005**, 2667–2669.
- [6] R. L. Jensen, J. Arnbjerg, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9820–9826.
- [7] N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, O. A. Yuzhakova, V. M. Negrimovskii, O. L. Kaliya, E. A. Luk'yanets, *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, *71*, 36–41.
- [8] D. C. Neckers, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **1989**, *47*, 1–29.
- [9] G. E. Ronsein, M. C. B. Oliveira, S. Miyamoto, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1271–1283.
- [10] M. Gracanin, C. L. Hawkins, D. I. Pattison, M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 92–102.
- [11] D. I. Pattison, A. S. Rahmanto, M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 38–53.
- [12] R. Binstead, A. Zuberbühler, *SPECFIT Global Analysis System, Version 3.0*, Spectrum Software Associates, **2000**.
- [13] H. Gampp, M. Maeder, C. Meyer, A. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 95–101.
- [14] H. Gampp, M. Maeder, C. Meyer, A. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 257–264.
- [15] H. Gampp, M. Maeder, C. Meyer, A. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 1133–1139.
- [16] H. Gampp, M. Maeder, C. Meyer, A. Zuberbühler, *Talanta* **1986**, *33*, 943–951.

3. Discussion sur les problèmes lié à la génération de l'oxygène singlet

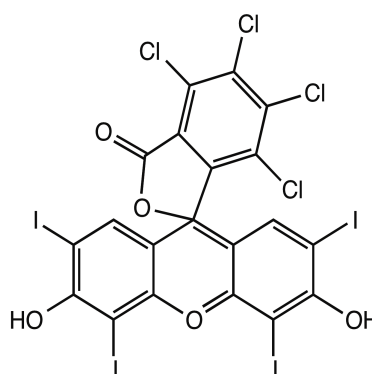
Les résultats décrits dans cette publication ont été obtenus dans des conditions mises au point pour limiter les problèmes liés à l'utilisation de photo-sensibilisateurs. Se pencher sur ces problèmes permet de mieux comprendre les limites des méthodes employées, et ce qu'elles impliquent concernant les résultats présentés.

3.1. Les photo-sensibilisateurs utilisés dans cette étude

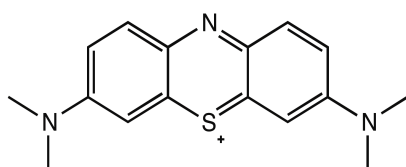
Le schéma B.II.1 représente les quatre photo-sensibilisateurs que nous avons utilisés pendant cette thèse : le rose bengal, le bleu de méthylène, une porphyrine de palladium et une phénalène.



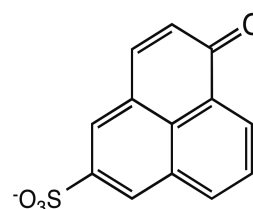
PdTTPS



Rose bengal



Bleu de méthylène



PNS

Schéma B.II.1 : Structure des quatre photo-sensibilisateurs utilisés : la porphyrine 5,10,15,20-tetrakis-phénylparasulfonate de palladium (PdTTPS), le rose bengal, le bleu de méthylène et la phénalène-1-one-5-sulfonate (PNS).

3.2 Interaction directe photo-sensibilisateur/modèle

D'abord, comme nous l'avons mentionné, il peut y avoir une interaction directe entre le photo-sensibilisateur et le complexe étudié: c'est le cas du rose bengal avec ZnCP1 , ZnL_{Hsp} et ZnL_{ZAS} , trois modèles de doigts de zinc que nous présenterons dans les chapitres suivants. En pratique, on observe la formation de précipité (flocons roses) lorsque ces complexes sont concentrées ($>200\mu\text{M}$). La fixation non-covalente du rose bengal sur une protéine a été observée sur l'albumine sérique humaine^[5] et sur la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GADPH)^[6].

des concentrations plus faibles, la précipitation n'est pas visible, et cette interaction se détecte de manière indirecte. En effet, l'avancement de la photo-oxydation n'évolue pas linéairement avec le temps d'irradiation: au bout d'un certain temps, il stagne. Ceci est cohérent avec le fait que le rose bengal lié à l'albumine sérique humaine est beaucoup moins efficace à photo-sensibiliser l'oxygène^[5]. Néanmoins, dans cette gamme de concentrations, les produits observés sont les mêmes qu'avec le bleu de méthylène, ce qui confirme que l'oxydation observée est due à $^1\text{O}_2$. Ainsi, l'utilisation du rose bengal avec ZnL_{TC} avec ZnCP1 , ZnL_{Hsp} et ZnL_{ZAS} est possible, mais loin d'être idéale. Nous n'avons cependant détecté aucune interaction entre le rose bengal et ZnL_{TC} .

La porphyrine de palladium (PdTTTPS) interagit de manière beaucoup plus marquée que le rose bengal avec les peptides. Bien que rien ne soit visible à l'œil nu, l'analyse HPLC met clairement en évidence un effet de la PdTTTPS sur ZnL_{TC} (Figure B.II.1): sur le chromatogramme du mélange ZnL_{TC} et PdTTTPS , le pic correspondant à L_{TC} a complètement disparu, et ceux correspondant à la porphyrine sont déplacés vers de plus longs temps de rétention. Cette réaction est indépendante de la lumière. Le même phénomène a été observé avec ZnCP1 . PdTTTPS n'est donc pas utilisable comme photo-sensibilisateur pour nos études.

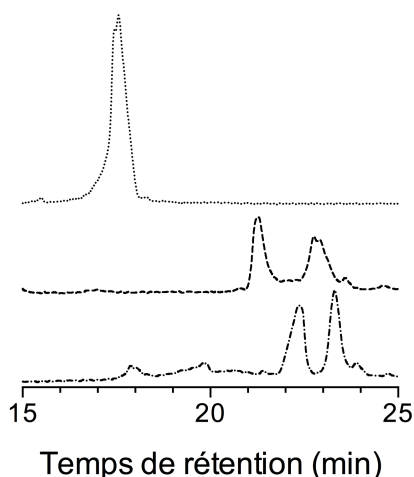


Figure B.II.1 : L'effet de PdTTPS sur ZnL_{TC} révélée par HPLC. En pointillés : ZnL_{TC} seul ; en tirets : PdTTPS seule ; tirets et pointillés : mélange PdTTPS ($7\mu\text{M}$) / ZnL_{TC} ($50\mu\text{M}$) incubé 1h à l'obscurité.

3.3. Oxydation du complexe par le photo-sensibilisateur indépendante de $^1\text{O}_2$

Ce cas est un peu extrême, mais il a l'avantage d'être simple. En plus de l'interaction directe (précipitation) ou d'un effet incompris mais très visible (cas de la PdTTPS), il peut y avoir des réactions parasites qui viennent seulement s'ajouter à l'oxydation causée par $^1\text{O}_2$. En effet, le photo-sensibilisateur absorbe un photon et passe dans un état excité PS^* (Schéma B.II.2). C'est cet état qui sensibilise le dioxygène. En revanche, cet état excité PS^* peut être impliqué dans des réactions mono-électroniques, comme c'est le cas pour $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ par exemple. Or, les thiols sont sensibles aux réactions mono-électroniques : un thiol peut céder un électron au PS^* , pour donner un radical thiyl (Schéma B.II.2). Ce dernier réagit rapidement avec un thiol ou un thiolate proche pour former un pont disulfure.

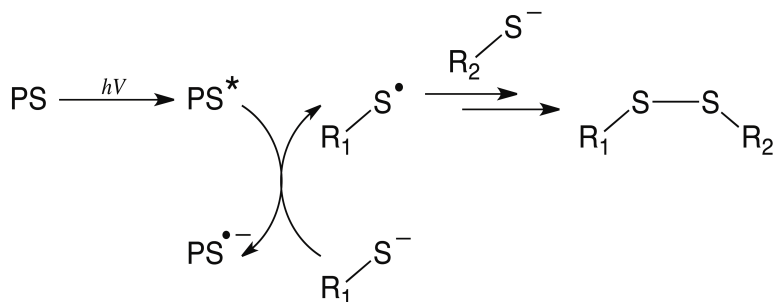


Schéma B.II.2 : Mécanisme proposé pour l'oxydation directe de ZnL_{TC} par le bleu de méthylène sous irradiation.

Ainsi, dans nos études, nous nous posons la question de l'origine des produits d'oxydation : parmi les produits détectés, identifiés, quels sont ceux qui proviennent

de l'oxydation du complexe par $^1\text{O}_2$, et quels sont ceux qui proviennent de réactions parasites ?

L'utilisation de plusieurs photo-sensibilisateurs, et dans les conditions différentes ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$), nous a permis d'identifier, dans les produits d'oxydation, les éléments constants et ceux qui varient. Par exemple, nous avons obtenu des chromatogrammes où la photo-oxydation de ZnL_{TC} n'a pas produit d'espèce mono-disulfure, même avec un avancement élevé (Figure B.II.2 (A)). À l'opposé, certaines conditions conduisaient à la formation importante d'espèces mono-disulfure et bis-disulfure (Figure B.II.2 (B)). En effet, si le milieu est composé uniquement d'eau légère, et s'il est appauvri en dioxygène, la formation de mono-disulfure est favorisée. Ceci explique que ce mono-disulfure provient de l'oxydation directe de ZnL_{TC} par PS^* , et non par $^1\text{O}_2$. De plus, on peut voir que si la solution est dégazée proprement, seules les espèces mono- et bis-disulfure se forment. Dans ce cas, on note une accumulation de mono-disulfure. La formation de bis-disulfure par réaction radicalaire avec PS^* est donc un mécanisme à deux étapes : $\text{ZnL}_{\text{TC}} \rightarrow \text{mono-disulfure} \rightarrow \text{bis-disulfure}$. Alors, puisque sur le chromatogramme Figure B.II.2 (A) on ne détecte pas de mono-disulfure, mais on détecte du bis-disulfure (toujours en même proportion par rapport aux sulfinates), ceci confirme que cette espèce provient bien de l'oxydation de ZnL_{TC} par $^1\text{O}_2$, et non par l'oxydation directe par PS^* .

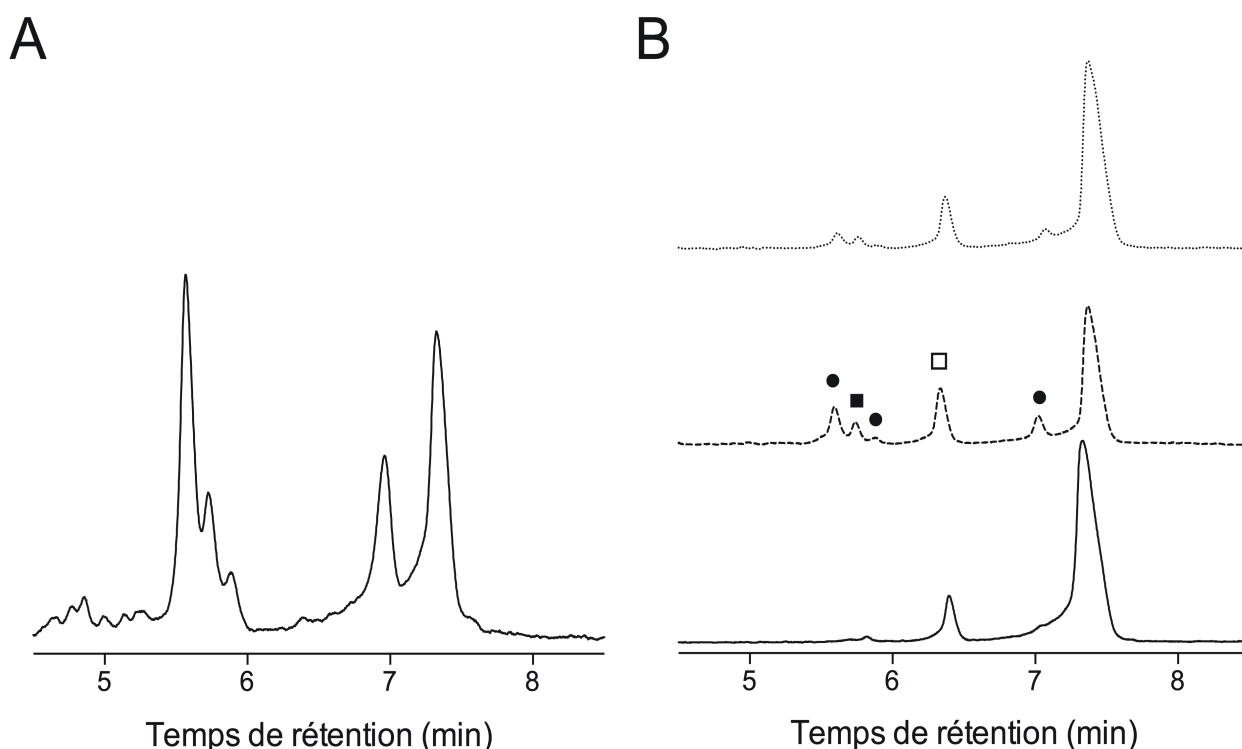


Figure B.II.2 : (A) Photo-oxydation de ZnL_{TC} ($70\mu\text{M}$) avec du rose bengal ($2\mu\text{M}$) dans D_2O tamponné avec 50mM phosphate pD 7,0. (B) L'irradiation d'un mélange ZnL_{TC} /photo-sensibilisateur conduit à la formation de mono-disulfure indépendamment de l'oxygène singulet. Une solution de ZnL_{TC} ($100\mu\text{M}$), partiellement dégazée, a été irradiée 6min en

présence de $1\mu\text{M}$ de bleu de méthylène (pointillés) ou de $1\mu\text{M}$ de rose bengal (tirets). Un mélange ZnL_{TC} ($100\mu\text{M}$)/rose bengal ($11\mu\text{M}$) est dégazé par cycles congélation sous vide/argon, avant d'être irradié 8min (trait plein). La nature des produits est indiquée sur le chromatogramme du milieu : sulfinates ($\bullet$), mono-disulfure ($\square$), dis-disulfure ($\blacksquare$).

Cette oxydation par PS^* est observée pour les trois photo-sensibilisateurs (PNS, bleu de méthylène, rose bengal), mais avec quelques différences. D'abord, celui qui en fait le moins est le rose bengal. Ensuite, cette balance « $^1\text{O}_2$ /radicalaire » du PS^* , est indépendante du pH dans le cas du rose bengal, alors qu'avec le bleu de méthylène, elle varie fortement avec le pH : plus le pH est faible, moins le transfert d'énergie entre le bleu de méthylène excité et O_2 est efficace, ce qui conduit à plus de mono-disulfure. Enfin, dans le cas du PNS, cette balance « $^1\text{O}_2$ /radicalaire » dépend fortement des conditions d'irradiations. En effet, avec notre montage habituel, les produits d'oxydation de ZnL_{TC} observés sont presque uniquement des espèces disulfure (Figure B.II.3). Dans ce cas, la lumière de la lampe halogène traverse le bain (verre) et l'éppendorf (plastique) avant d'atteindre la solution (voir partie expérimentale). En revanche, si l'irradiation est faite dans une cuve en quartz, à l'aide de néons « 365nm » (d'une boîte de révélation de plaques CCM), on retrouve des produits mono-sulfinate dans les produits d'oxydation, même s'il y a encore beaucoup de mono-disulfure.

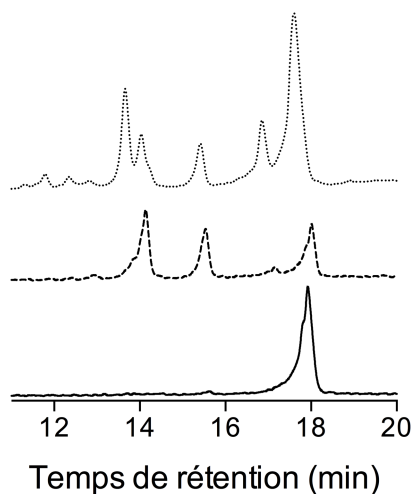


Figure B.II.3 : Oxydation de ZnL_{TC} en utilisant le PNS comme photo-sensibilisateur. Trait plein : L_{TC} ; Tirets : solution ZnL_{TC} ($100\mu\text{M}$) et PNS ($A^{366\text{nm}}=1,6$) irradiée min dans le montage habituel (H_2O , pH 7). ; Pointillés : solution ZnL_{TC} ($\sim 200\mu\text{M}$) et PNS ($A^{366\text{nm}}=0,5$) irradiée 2min directement avec deux lampes UV 365nm 15W (D_2O , pD 7).

D'après Segado et Regado^[7], la transition conduisant à l'état excité de la phenalénone capable de sensibiliser le dioxygène correspond à une transition de 3,46eV, correspondant à l'absorption d'un photon à 359nm. Il est possible que l'absorption à d'autres longueurs d'onde conduise à la formation d'états excités ne produisant pas de $^1\text{O}_2$, mais capables d'arracher un électron aux soufres du complexe. Ceci a été récemment montré par Lorente et

collaborateurs^[8] : la phenalénone est capable de photo-oxyder le tryptophane par un mécanisme radicalaire et par génération de $^1\text{O}_2$.

Cela rend le PNS inutilisable pour les analyses détectant les peptides et leurs produits (HPLC). En revanche, cela n'empêche pas son utilisation dans les mesures de temps de vie de $^1\text{O}_2$ puisque l'excitation du PNS se fait uniquement à 355nm grâce à un laser, et que ce qui est mesuré est le temps de vie de $^1\text{O}_2$, ce qui est complètement indépendant des réactions parasites.

3.4. Interaction photo-sensibilisateur/anthracène

Ces différences de « comportement » des différents photo-sensibilisateurs, observés avec ZnL_{TC} , sont aussi observées avec les anthracènes. Comme décrit dans le Chapitre III, les vitesses d'oxydation (k_R) de chaque anthracène par $^1\text{O}_2$ ont été mesurées de manière directe par l'équipe de Nathan McClenaghan. Par HPLC, nous retrouvons les rapports entre ces vitesses : un mélange de deux ou trois anthracènes et de rose bengal est irradié, est la disparition de chaque anthracène est suivi par HPLC. Les valeurs ainsi mesurées sont cohérentes avec la littérature et avec les k_R obtenus par mesure directe. Néanmoins, des compétitions identiques ont été menées avec le bleu de méthylène. Les rapports de k_R mesurés sont en désaccord complet avec les mesures précédemment décrites : les trois anthracènes disparaissent à la même vitesse. Ce désaccord entre les résultats déterminés avec le rose bengal et avec le bleu de méthylène a aussi été observé dans le cas d'une compétition ZnL_{TC} -AVS. Il apparaît donc qu'il y a une interaction entre les anthracènes et le bleu de méthylène (interaction électrostatique et/ou interaction π - π) qui empêche son utilisation pour les compétitions impliquant un anthracène.

Pour finir avec les systèmes où $^1\text{O}_2$ est produit par un photo-sensibilisateur, il semble que l'ajout d'un compétiteur (anthracène) dans le milieu ZnL/PS vienne complexifier le système. En effet, ce phénomène est visible dans les compétitions $\text{ZnCP1}/\text{anthracène}$. Nous n'entrerons pas ici dans les détails : ZnCP1 et ses produits d'oxydation seront présentés dans le Chapitre IV. Rapidement, la Figure B.II.4 présente les chromatogrammes des photo-oxydations de ZnCP1 en présence d'anthracène AVS. Elle conduisent à la formation d'un fort épaulement au pied du pic initial ($t_r=23,8\text{min}$). La formation de cet épaulement varie indépendamment des produits issus de l'oxydation de ZnCP1 par $^1\text{O}_2$. De plus, nous avons remarqué que :

- plus la concentration d'anthracène est forte, plus ce produit se forme.
- plus la concentration de photo-sensibilisateur est forte, plus ce produit se forme.
- en conditions équivalentes, le produit se forme plus avec le bleu de méthylène qu'avec le rose bengal.
- ce pic est visible sur le chromatogramme à 380nm.

Basé sur ces éléments, nous émettons l'hypothèse que ce produit inconnu est issu d'une réaction radicalaire entre l'anthracène est le complexe ZnCP1, initiée par le photo-sensibilisateur excité.

Ainsi, avec les photo-sensibilisateurs dont on dispose, nous n'avons pas pu réaliser de compétition entre ZnCP1 et un anthracène.

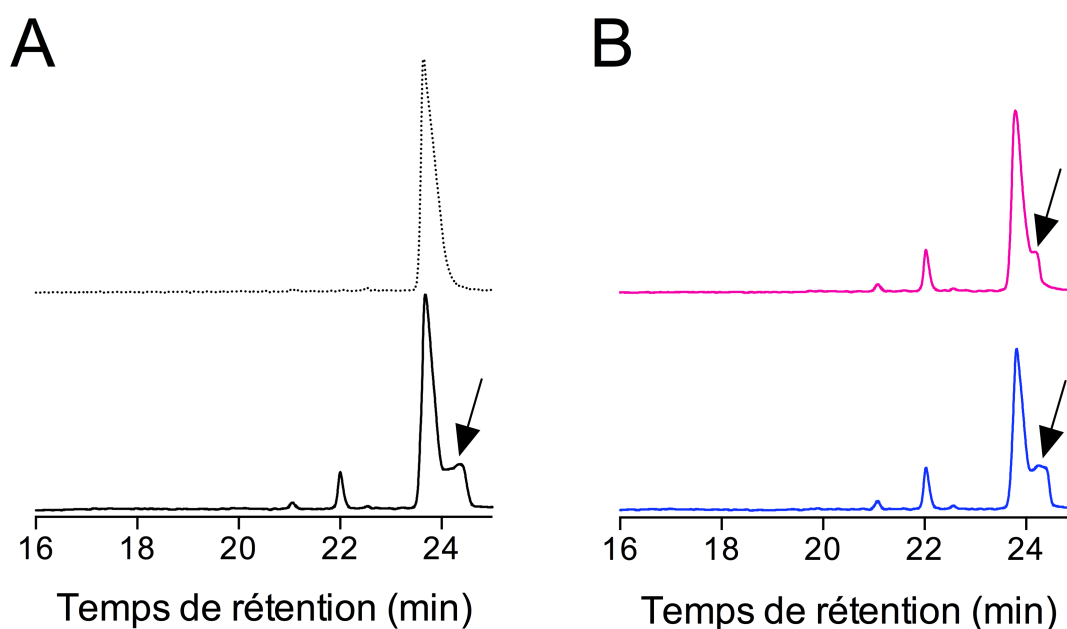


Figure B.II.4 : Formation d'un produit inconnu lors de la photo-oxydation de ZnCP1 en présence d'anthracène (chromatogrammes à 214nm). (A) Mélange ZnCP1 (90μM)/anthracène (AVS, 105μM)/bleu de méthylène (0,6μM) avant (pointillés) et après (trait plein) 3min30 d'irradiation. (B) Un mélange ZnCP1 (70μM)/anthracène (AVS, 460μM) a été irradié en présence de 1,8μM de rose bengal (trait rose, irradiation 2min) ou de 0,7μM de bleu de méthylène (trait bleu, irradiation 3min30). Le pic du produit inconnu est indiqué par une flèche.

3.5. Problèmes liés à la génération de $^1\text{O}_2$ par dégradation de DHPNO_2

Comme nous l'avons mentionné, un des moyens d'éviter les problèmes d'interaction PS-ZnL et les problèmes de réaction radicalaire est la production de $^1\text{O}_2$ par voie chimique.

La production de $^1\text{O}_2$ chimique par décomposition thermique d'un endoperoxyde de naphthalène a aussi été testée. Nous avons utilisé un naphthalène soluble dans l'eau, le N,N'-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamide (DHPN)^[9], qui nous a été donné par Jean-Luc Ravanat. Le DHPNO₂ a été généré en irradiant une solution de DHPN et de bleu de méthylène (D_2O), puis est conservé au frais (-20°C). température ambiante, le DHPNO₂ se dégrade pour re-donner le DHPN et le dioxygène de départ (en partie sous forme $^1\text{O}_2$). Ainsi, dans nos expériences, il ne devrait plus y avoir d'oxydant en solution après dégradation totale de l'endoperoxyde. Or, l'ajout de la solution d'endoperoxyde, après dégradation totale du DHPNO₂, à une solution de complexe ZnL_{TC} conduit à l'oxydation de ce dernier en espèces disulfures (Figure B.II.5). Ceci indique qu'en plus du DHPNO₂, il y a une autre espèce capable d'oxyder nos complexes, possédant une durée de vie longue. Étant donné les conditions de génération du DHPNO₂ et les produits disulfures observés, cette espèce est très probablement un peroxyde organique. Ceci est la raison pour laquelle, nous avons abandonné cette voie de génération de $^1\text{O}_2$ pour nos études.

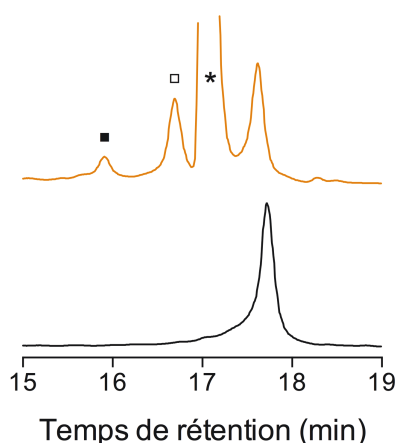


Figure B.II.5 : Oxydation de ZnL_{TC} par la solution de DHPNO₂ dégradée. Chromatogrammes : (noir) solution de L_{TC} ; (orange) solution de ZnL_{TC} (300µM) et DHPNO₂ dégradé (1,3µM). (*) DHPN, (□) mono-disulfure L_{TC} , (■) bis-disulfure L_{TC} .

Finalement, la génération de $^1\text{O}_2$ par excitation directe (absorption de photons à 1270nm par l'oxygène moléculaire) permettrait d'éviter tous ces soucis : il n'y a ni photo-sensibilisateur ni oxydant minéral ou organique en solution, seulement l'objet d'étude^[10,11]. Malheureusement, sa mise en œuvre est lourde : elle nécessite notamment un laser puissant émettant à 1270nm.

Aussi, toutes nos études ont été réalisées avec le bleu de méthylène et le rose bengal, en s'assurant à chaque fois que les réactions parasites étaient négligeables. Dans les deux chapitres suivants, qui concernent l'oxydation des modèles ZnCP1 et ZnL_{ZAS} , les conditions utilisées et les raisons de leur choix seront détaillées.

Références

- [1] V. Lebrun, A. Tron, L. Scarpantonio, C. Lebrun, J.-L. Ravanat, J.-M. Latour, N. D. McClenaghan, O. Sénèque, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 9365–9368.
- [2] O. Sénèque, E. Bonnet, F. L. Joumas, J.-M. Latour, *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 4798–4810.
- [3] A. Jacques, B. Mettra, V. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem.-Eur. J.* **2013**, *19*, 3921–3931.
- [4] E. Bourlès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 13762–13772.
- [5] E. Alarcón, A. M. Edwards, A. Aspée, C. D. Borsarelli, E. A. Lissi, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 933–943.
- [6] R. A. Lundeen, K. McNeill, *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 14215–14223.
- [7] M. Segado, M. Reguero, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 4138–4148.
- [8] C. Lorente, E. Arzoumanian, C. Castaño, E. Oliveros, A. H. Thomas, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 10718–10727.
- [9] G. R. Martinez, J.-L. Ravanat, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10212–10213.
- [10] A. A. Krasnovsky Jr., Y. V. Roumbal, A. V. Ivanov, R. V. Ambartzumian, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *430*, 260–264.
- [11] A. Sivéry, F. Anquez, C. Pierlot, J. M. Aubry, E. Courtade, *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *555*, 252–257.

Chapitre B.III :

Réactivité doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ classique vis-à-vis de oxygène singulet

Vincent Lebrun, Arnaud Tron, Colette Lebrun, Jean-Luc Ravanat, Nathan McClenaghan, Jean-Marc Latour et Olivier Sénèque

Chapitre B.III : Réactivité d'un doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ classique vis-à-vis de 1O_2

1. Introduction	131
2. Résultats	135
2.1. Produits de l'oxydation de ZnCP1 par 1O_2	135
2.2. Vitesse d'oxydation de ZnCP1 par 1O_2	139
2.3. Affinité des peptides oxydés pour le zinc	142
3. Discussion	147
3.1. Produits d'oxydation	147
3.2. Cinétique d'oxydation	149
4. Conclusion	150

1. Introduction

Dans le Chapitre B.II, nous avons décrit la réactivité d'un site de formule $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ vis-à-vis de l'oxygène singulet. Autrement dit, nous nous sommes intéressés uniquement à la réaction des thiolates liés au zinc. Or, pour beaucoup de sites doigt de zinc, les cystéines ne sont pas les seuls ligands du zinc, il y a aussi des histidines. C'est le cas des sites de la famille des $\beta\beta\alpha$ classiques, dont fait partie le premier doigt de zinc découvert : le facteur de transcription IIIa de *Xenopus laevis* [1]. Ce motif est présent dans de nombreuses protéines [2] et probablement la famille de doigt de zinc la plus étudiée [3]. La Figure B.III.1 montre la structure d'un tel site. Elle se compose de deux feuillets β anti-parallèles formant une épingle, et d'une hélice α . La cohésion entre l'hélice et les feuillets est assurée par un cœur hydrophobe (en bleu sur la structure) et un site à zinc dont la formule la plus courante est $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$: l'épingle β apportant les deux cystéines (espacées de deux acides aminés) et l'hélice α apporte les deux histidines (espacées de trois acides aminés). La séquence consensus [4] fait apparaître les acides aminés constituant ces deux composantes : Y/F-X-C-X_{2,4}-C-X₃-F-X₅-H-X₃-H.

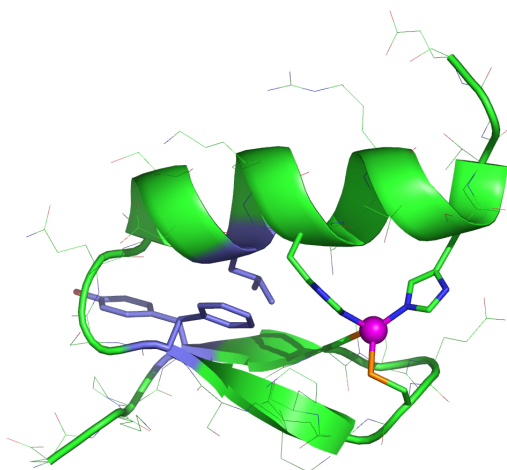


Figure B.III.1 : Structure cristallographique d'un doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ classique (PDB code : 1MEY) [5]. L'ion Zn^{2+} est représenté par une sphère rose. Les chaînes latérales composant le cœur hydrophobe sont indiquées en bleu.

Cette famille est très largement représentée dans les doigts de zinc et joue un rôle purement structural. La comparaison de la réactivité de ce complexe avec d'autres modèles de doigts de zinc a montré que ces sites sont parmi les moins réactifs avec H_2O_2 ou des alkylants, notamment car il n'y a que deux cystéines dans la sphère de coordination du zinc, or, la réactivité d'un site à zinc augmente avec le nombre de cystéines liées au zinc [6-9]. Cependant, ces études mettaient en jeu uniquement la réactivité des thiols. Or, les histidines libres sont très sensibles à l'oxygène singulet. Dans la littérature, la vitesse d'oxydation de l'histidine par $^1\text{O}_2$ (k_R) varie de manière importante : de 7.10^6 à $\approx 2.10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ [10]. L'état de

protonation du cycle imidazole module fortement sa réactivité : le cycle complètement déprotoné réagit environ 15 fois plus vite avec l'oxygène singulet que la forme imidazolium^[11]. À de telles vitesses, l'oxydation des histidines est compétitive avec celles des soufres des doigts de zinc (voir Chapitre B.II). Cependant, rappelons que ces valeurs ont été obtenues pour des histidines libres, et que les valeurs de k_R décrites dans la littérature sont très variables car elles dépendent énormément des conditions expérimentales (solvant, pH, méthode utilisée pour déterminer ce k_R). La réactivité de ZnCP1 vis-à-vis de l'oxygène singulet pourrait impliquer les cystéines et les histidines.

L'oxydation de l'histidine par $^1\text{O}_2$ détruit le cycle imidazole, conduisant à de nombreux produits d'oxydation^[12]. D'après le mécanisme (Schéma B.III.1), cette réaction passe par plusieurs intermédiaires instables, dont les premiers sont des endoperoxydes.

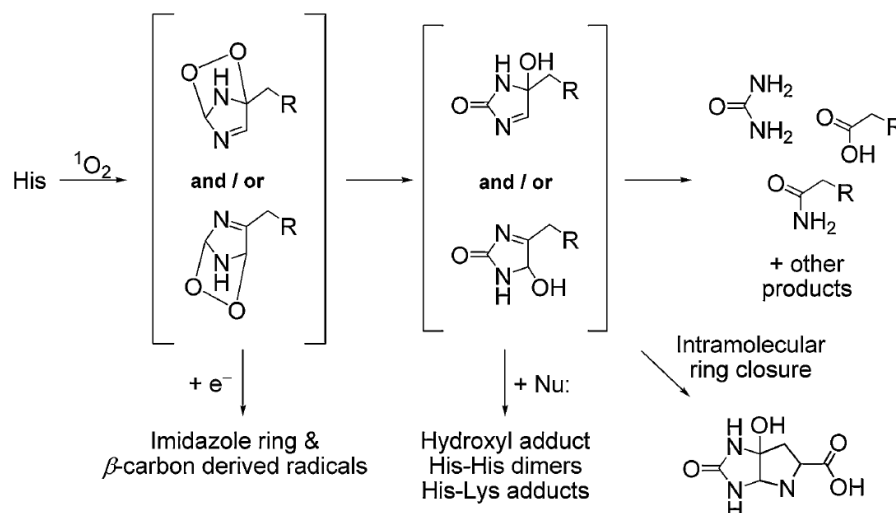


Schéma B.III.1 : Photo-oxydation de l'histidine : intermédiaires et principaux produits d'oxydation. Schéma de Pattison et al.^[13]

Les deux produits finaux majoritaires sont des chaînes latérales d'acide aspartique et d'asparagine, qui correspondent respectivement à une perte de 22 et 23 unités de masse par rapport à l'histidine initiale. Dans une moindre mesure l'aspartylurée a aussi été détectée, correspondant à un gain de 20 unités de masse par rapport à l'histidine. Cependant, nous pouvons noter que cette dernière peut être hydrolysée pour former l'acide aspartique.

De plus, comme illustré Schéma B.III.2, certains intermédiaires peuvent subir une attaque nucléophile, impliquant par exemple la chaîne latérale d'un autre acide aminé X, ce qui forme un adduit covalent entre les deux chaînes latérales His-X. Selon l'intermédiaire peroxyde, l'attaque nucléophile ne se fait pas sur le même site. En effet, si le peroxyde est porté par les carbones C4 et C7 de l'imidazole, l'attaque se fait sur le carbone C5, ce qui

conduit aux produits de type I et II (Schéma B.III.2). Si dans l'intermédiaire, le pont peroxy s'établit entre les carbones C7 et C5 de l'imidazole, l'attaque se fait sur le carbone C4, conduisant aux produits de type III et IV.

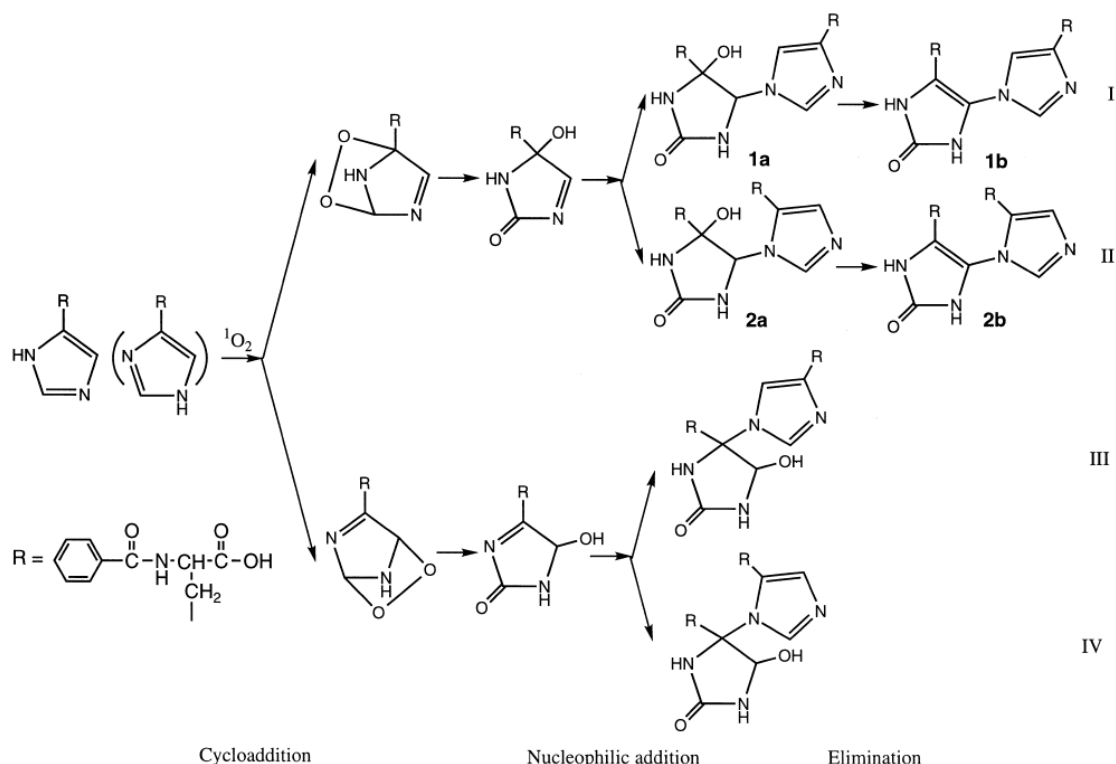


Schéma B.III.2 : Mécanisme proposé pour la formation d'adduit sur le cycle imidazole de l'histidine, provoqué par l'oxydation dudit cycle par l'oxygène singulet. Schéma de Shen et al.^[14]. Les résultats présentés correspondent à l'oxydation qui a lieu lors de l'irradiation d'une solution de N-Benzyl-Histidine et de rose bengal.

D'après ce Schéma B.III.2, si cette réaction fait intervenir deux acides aminés d'un même peptide, le bilan de matière pour le peptide est un gain d'un atome d'oxygène conjugué à une perte de deux atomes d'hydrogène (produits I et II) ou à un gain de deux atomes d'oxygène (produits III et IV). Ainsi, selon l'intermédiaire formé, le bilan de masse est de +14 ou +32 Da. Néanmoins, les auteurs précisent que dans un contexte peptidique, les composés I et II sont les plus probables à cause de l'encombrement stérique gênant l'attaque sur le carbone C4. Ça n'est donc pas surprenant que ce soit un composé de cette nature qui a été identifié dans une protéine photo-oxydée^[15]. Finalement, ces composés (I à IV) peuvent aussi évoluer, notamment en s'hydrolysant, pour arriver aux produits finaux précédemment cités (asparagine, acide aspartique, aspartylurée).

Ainsi, si l'histidine d'un peptide est oxydée par une molécule d'oxygène singulet, le produit d'oxydation sera visible en spectrométrie de masse avec une différence de +32, +20, +14, -22, ou -23 Da, par rapport au peptide initial.

ChrR possède un doigt de zinc de type $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$ et le même site a été proposé pour la protéine MBS. Ces deux protéines et leurs doigts de zinc pourraient être à la base de la détection de l'oxygène singulet chez les organismes auxquels ils appartiennent. Il apparaît donc très intéressant de voir quelle est la réactivité des sites $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$ vis-à-vis de $^1\text{O}_2$. Disposant d'un peptide modèle de ce type au laboratoire, de type $\beta\beta\alpha$ classiques, nous avons démarré l'étude avec celui-ci avant de nous lancer dans la modélisation du site doigt de zinc de ChrR.

Pour ces études nous avons utilisé un complexe modèle, le peptide CP1 développé par l'équipe de Jeremy Berg, reproduisant ces sites (structure et réactivité). La séquence de ce peptide a été conçue en alignant les séquences des domaines connus (131 à l'époque), et en prenant, pour chaque position dans la séquence, l'acide aminé le plus récurrent^[4].

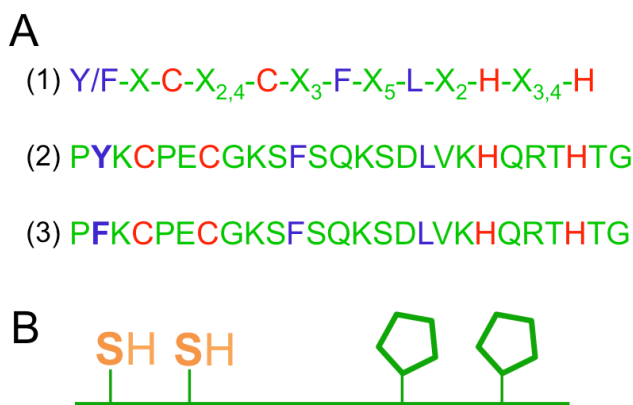


Figure B.III.2 : Doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ classique, de la séquence au modèle. (B) Séquence consensus des motifs doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ classiques. (1) Séquences peptidiques de CP1 (2) et de CP1-2YF (3). Les acides aminés composant le cœur hydrophobe sont indiqués en bleu, et ceux qui lient l'ion Zn^{2+} sont indiqués en rouge. (C) Représentation schématique de CP1 se focalisant sur les résidus liés au métal.

Pour ces études, nous voulons nous concentrer sur la réactivité des résidus liés au zinc. Le modèle CP1 original possède un cœur hydrophobe comportant une tyrosine (Figure IV.2 A). Or, le cycle aromatique de la tyrosine réagit avec l'oxygène singulet environ 5 à 10 fois plus vite que celui de la phenylalanine^[16]. Aussi, dans les études qui sont présentées ici, nous avons utilisé un mutant dont la tyrosine 2 a été mutée en phenylalanine : CP1-Y2F. Pour simplifier, lorsque nous écrirons « CP1 » dans la suite du texte, c'est à ce peptide que nous ferons référence.

2. Résultats

2.1. Produits de l'oxydation de ZnCP1 par 1O_2

Ce qui nous intéresse ici est ce qu'il se passe lorsque notre complexe peptidique est oxydé par une seule molécule de 1O_2 , c'est à dire que nous ne nous concentrerons que sur les produits primaires d'oxydation. C'est la raison pour laquelle l'oxydation n'est pas poussée, et que l'on se place dans des conditions où une quantité importante du complexe de départ n'a pas réagi.

Contrairement à ZnL_{TC}, le rose bengal co-précipite avec ZnCP1 lorsqu'ils sont à forte concentration (~1,5mM complexe, et 30μM rose bengal), ce qui montre que ces deux espèces interagissent. L'équipe de McNeill a déjà observé une interaction entre la protéine GAPDH et le Rose Bengal, alors que dans les mêmes conditions, le bleu de méthylène ne semblait pas interagir avec la GAPDH^[17]. Aussi, le bleu de méthylène ne fait pas précipiter ZnCP1. Des tests avec ZnL_{TC} ont permis de mettre en évidence que dans le D₂O tamponné avec 20mM Pi pD 8, le bleu de méthylène pouvait être utilisé comme photosensibilisateur (voir Chapitre B.V) puisque dans ces conditions les réactions radicalaires représentent moins de 5% des produits. Ce sont donc ces conditions que nous avons utilisées pour étudier l'oxydation de ZnCP1 par 1O_2 .

Après irradiation d'un tel mélange, l'analyse ESI-MS du brut d'oxydation montre des pics correspondant à un gain de 32 unités de masse par rapport au peptide réduit. En effet, pour l'espèce chargée (4+), en plus du pic $m/z=753,4(4+)$ correspondant au complexe initial ZnCP1, le spectre de masse présente un pic $m/z=761,5(4+)$. Ces 32 Da de plus sont ce que nous avons observé dans le chapitre III pour la formation d'un acide sulfinique, c'est à dire, l'ajout de deux atomes d'oxygène. Il y en a aussi un troisième, plus léger : $m/z=737,2(4+)$, correspondant à la perte de l'ion Zn^{2+} et de 2 Da, c'est à dire, CP1 disulfure. Notons que hormis les pics à +32 Da, nous n'observons pas de pics de masse pouvant correspondre à des produits issus de la photo-oxydation de l'histidine (voir plus haut).

Lorsque ce brut est analysé en HPLC (Figure B.III.3), on observe l'apparition de deux pics à des temps de rétention plus courts ($t_r=21,9$ min et $t_r=22,7$ min) que le pic correspondant au peptide de départ ($t_r=24,3$ min). Aucun de ces deux pics n'est affecté par un traitement à la TCEP, indiquant que ces produits d'oxydation ne possèdent pas de liaison soufre-soufre (disulfure ou thiosulfinate). Ces pics ont été isolés et analysés en ESI-MS. Ils présentent tous deux un gain de 32 unités de masse par rapport au peptide réduit, compatible avec la formation d'un sulfinate ou d'un couplage His-His (Schéma B.III.2).

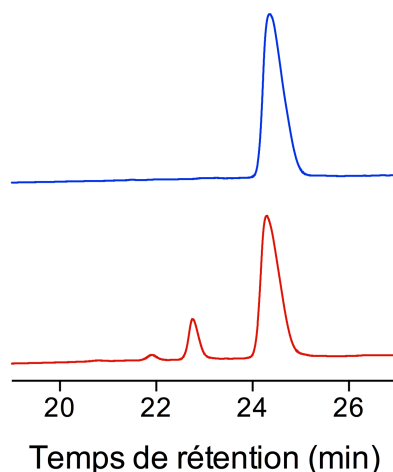


Figure B.III.3: Analyse HPLC des produits issus de l'oxydation de ZnCP1 par $^1\text{O}_2$: chromatogrammes à 214nm du mélange réactionnel avant (Bleu) après 30sec d'irradiation (Rouge). Solution de ZnCP1 (80 μM) dans 20mM Pi pD 8,0 dans D_2O , en présence de 1,6 μM de Bleu de Méthylène.

Pour aller plus loin dans l'identification de ces produits, chacun des deux pics a été isolé par HPLC, digéré par une enzyme et les fragments obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation.

La Glutamate Carboxy Peptidase (GluC) est une protéase qui hydrolyse la chaîne peptidique en C-ter de l'acide glutamique (E), mais il est courant que la réaction se fasse aussi en C-ter de l'acide aspartique. Cette réaction est plus lente, mais est observée dans nos conditions. Ainsi, d'après la séquence de CP1, la digestion de nos peptides avec cette enzyme produit les fragments suivants : PFKC₄PE (1); C₇GKSFSQKSD (2); LVKHQRTHTG (3)

Les résultats de l'analyse en spectrométrie de masse du mélange obtenu sont présentés dans le Tableau IV.1. D'après les masses obtenues en ESI-MS, il semble que le peptide a aussi été digéré en N-ter de la Glutamine mais pas en C-ter de l'aspartate. Les pics expérimentaux correspondent aux fragments obtenu d'après cette hypothèse : C₇GKSFS (A) ; QKSDLVKHQRTHTG (B).

Fragment	Etat	Masse exacte (g.mol ⁻¹)	Pics m/z détectés (ESI-MS)	
			Pic HPLC tr=21,9 min	Pic HPLC tr=22,7 min
1	Réduit	719,33		
	Dimère S-S	1436,65		480,0(3+) 719,4(2+)
	Sulfinate	751,32	752,3(+)	
2	Réduit	1085,48		
	Dimère S-S	2168,95		
	Sulfinate	1117,47		559,8(2+)
3		1174,67	588,4(2+) 1175,7(+)	588,3(2+)
A	Réduit	627,27		
	Dimère S-S	1252,52	627,3(2+) 1253,5(+)	
	Sulfinate	659,26		660,3(+)
B		1632,88	545,3(3+) 817,5(2+) 1633,8(+)	545,3(3+) 817,6(2+)

Tableau B.III.1 : Analyse en spectrométrie de masse des fragments issus de la digestion enzymatique des pics isolés (produits d'oxydation de ZnCP1). Pour les fragments contenant une cystéine (**1**, **2** et **A**), les masses théoriques calculées correspondent à trois états d'oxydation différents. La cystéine peut y être réduite, sous forme d'acide sulfinique, ou bien former un pont disulfure avec la cystéine d'un autre fragment (identique). Les pics m/z expérimentaux correspondant à un fragment portant un acide sulfinique sont surlignées en rouge.

La digestion des pics à tr=21,9min et 22,7min montre des fragments **3** et **B** à la masse attendue pour un fragment non oxydé. Cela montre qu'il n'y a pas eu de couplage His-His.

Dans la digestion de l'espèce tr=21,9min, le fragment **1** est détecté (Tableau B.III.1) avec un gain de 32 unités de masse par rapport au fragment réduit. Or ce dernier ne contient qu'une cystéine, la cystéine 4.

Par contre, dans la digestion de l'espèce tr=22,7min, ce sont les fragments **2** et **A** qui sont détectés avec un gain de 32 unités de masse par rapport aux fragments réduits. Ces derniers contiennent une seule et même cystéine, la cystéine 7.

En résumé, dans ces deux espèces oxydées, l'une des deux cystéines a été oxydée en acide sulfinique. Il s'agit de la cystéine 4 dans l'espèce à tr=21,9min et de la cystéine 7 dans l'espèce à tr=22,7min. C'est pourquoi ces peptides seront appelés respectivement CP1 C4s et CP1 C7s.

D'après les aires de ces pics en HPLC, CP1 C7s représente $87 \pm 2\%$ des sulfinates formés et CP1 C4s en représente $13 \pm 2\%$.

Du disulfure est observé dans le brut d'oxydation. Les études de réactivité de ZnCP1 vis-à-vis de H_2O_2 menées précédemment au laboratoire ont mis en évidence que le peptide réduit et le peptide disulfure ont des temps de rétention identiques. Ainsi, la Figure B.III.4 replace les produits d'oxydation identifiés sur le chromatogramme.

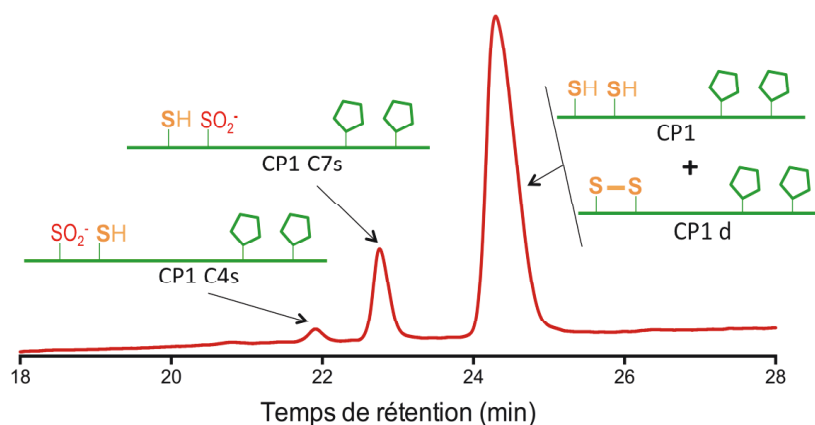


Figure B.III.4 : Attribution des pics sur le chromatogramme de la Figure IV.3.

Même en modifiant le gradient de solvants en HPLC, nous ne sommes pas parvenus à séparer le peptide CP1 réduit du mono-disulfure. Ainsi, la quantification du disulfure produit lors de l'oxydation de ZnCP1 par $^1\text{O}_2$ ne peut pas se faire simplement en mesurant l'aire sous son pic. Pour y arriver, nous avons récolté le pic « initial » (mélange de CP1 et CP1 disulfure) en sortie de HPLC, après irradiation d'un mélange ZnCP1 / Bleu de méthylène. La procédure est décrite en détail dans la partie expérimentale. La concentration d'ion Co^{2+} liée est mesurée en spectrophotométrie V-Visible (Figure B.III.5). La quantité d'ion Co^{2+} par ce mélange nous donne la quantité de peptide réduit. L'ajout de TCEP réduit le CP1 disulfure, qui peut désormais lier Co^{2+} . Ainsi, la différence d'intensité de la bande d-d du Co^{II} , avant et après ajout de TCEP, correspond à la quantité de CP1 oxydé en disulfure.

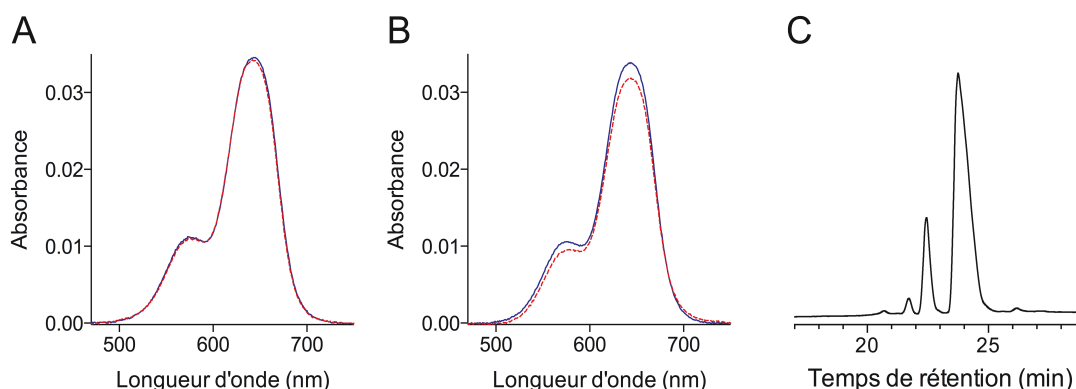


Figure B.III.5 : Quantification du disulfure formé lors de l'oxydation de ZnCP1 par $^1\text{O}_2$. Un mélange de ZnCP1 (150 μM) et de bleu de méthylène (1,5 μM), dans tampon Pi 10mM pD 8 (D_2O), est irradié 15 secondes (montage décrit en partie expérimentale). L'intégralité de la solution (600 μL), et un contrôle (non irradié), est passée en HPLC analytique (C). Le pic correspondant au mélange CP1 réduit/CP1 disulfure est récolté, lyophilisé, puis, entré en boîte à gant. Cette poudre est dissoute, mise en présence d'un excès de Co^{2+} . Le spectre UV-Vis de la solution est enregistré (rouge), puis, de la TCEP est ajoutée, avant d'enregistrer un nouveau spectre (bleu). Les spectres de la solution contrôle (A) et de la solution irradiée (B) sont présentés sur une fenêtre correspondant aux bandes d-d du Co^{2+} .

Les chromatogrammes (Figure B.III.5 C) nous donnent la quantité de sulfinates formés, et les spectres du cobalt (Figure B.III.5 B) nous donnent la quantité de disulfure formé.

L'oxydation de ZnCP1 par $^1\text{O}_2$ produit du disulfure à $25\pm 5\%$ et des mono-sulfinates à $75\pm 5\%$.

2.2. Vitesse d'oxydation de ZnCP1 par $^1\text{O}_2$

Arnaud Tron, Luca Scarpantonio et Nathan McClenaghan (Université Bordeaux 1), ont mesuré la vitesse de désactivation totale de l'oxygène singulet de ZnCP1. Cette technique est basée sur la détection de l'émission de $^1\text{O}_2$. De l'oxygène singulet est généré en solution par un flash de laser, et on enregistre la décroissance de la phosphorescence de $^1\text{O}_2$. La présence de complexe en solution diminue le temps de vie de l'oxygène singulet : ajouter du complexe dans la solution, c'est ajouter une voie de désactivation non radiative. Nos peptides désactivent l'oxygène singulet de manière physique et chimique. Dans ces expériences, notre observable est complètement indépendante de ces deux phénomènes. Ainsi, ce que nous mesurons est la somme de la désactivation chimique et de la désactivation physique. La mesure du temps de vie de $^1\text{O}_2$ est faite à différentes concentrations de complexe. L'inverse du temps de vie de $^1\text{O}_2$ évolue linéairement avec la concentration de complexe. Ainsi, par régression linéaire, nous obtenons $k_T(\text{ZnCP1}) = 1,7(\pm 0,2) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure B.III.6).

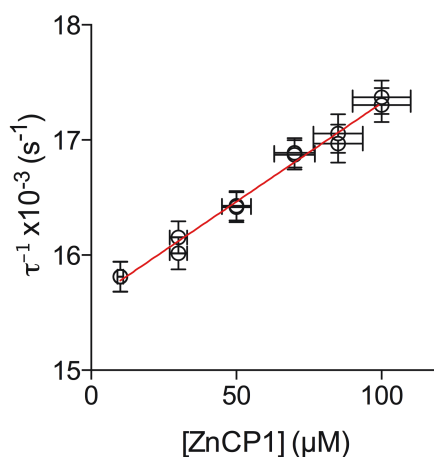


Figure B.III.6 : Mesure de la vitesse de désactivation totale de l'oxygène singulet par ZnCP1.

Comme pour ZnL_{TC} , le $k_R(\text{ZnCP1})$ est déterminé par compétition avec une référence, en quantifiant l'oxydation des deux produits par HPLC. Par contre, cette compétition se fait dans des conditions différentes de celles présentées dans le Chapitre III : elle se fait dans un

tampon Pi pD 8,0, en utilisant le bleu de méthylène comme photo-sensibilisateur et EGWKG comme compétiteur. Les raisons de ces changements sont les suivantes :

- le rose bengal interagit avec ZnCP1, nous devons donc utiliser le bleu de méthylène comme photo-sensibilisateur
- afin de limiter les réactions radicalaires dues au bleu de méthylène, le mélange est préparé dans un tampon pD 8,0.
- les expériences de compétitions anthracène/anthracène et anthracène/ZnL_{TC} ont montré que le bleu de méthylène n'est pas utilisable dans des expériences mettant en jeu les anthracènes : les résultats obtenus étaient en désaccord avec la littérature, avec les résultats obtenus par nos collaborateurs Bordelais, et avec nos résultats basés sur l'utilisation du rose bengal. ZnL_{TC} ne peut être utilisé comme compétiteur car les produits de L_{TC} et de CP1 ont la même gamme de temps de rétention. Nous avons finalement utilisé comme compétiteur le peptide EGWKG avec lequel nous n'avons pas observé d'interaction avec ZnCP1 ni avec le bleu de méthylène.

ne compétition ZnL_{TC}/EGWKG/Bleu de méthylène dans du tampon phosphate pD 8,0 a été réalisée. Les rapports de k_R obtenus sont identiques à ceux déterminés à pH 7,0 avec les anthracènes et le rose bengal, ce qui confirme que ces conditions permettent d'obtenir des valeurs fiables de k_R . Alors, une compétition entre ZnCP1 et EGWKG a été réalisée dans ces conditions (Figure B.III.7).

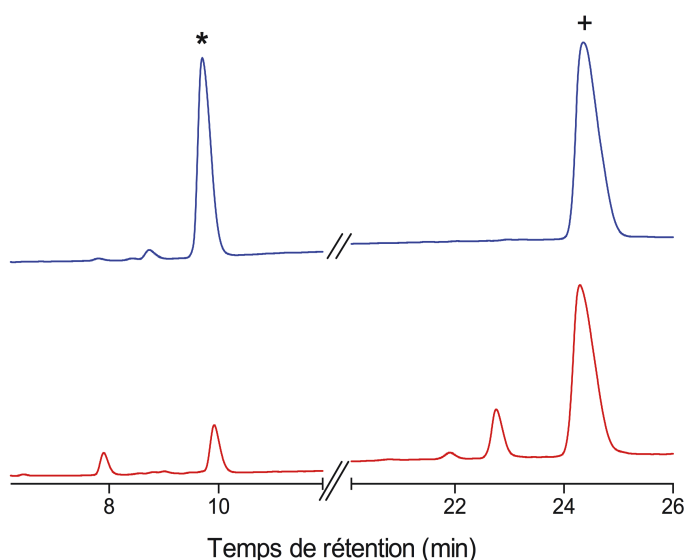


Figure B.III.7 : Compétition entre la photo-oxydation de ZnCP1 (*, 80 μ M) et EGWKG (+, 80 μ M). Ce chromatogramme (214nm) correspond aux barres gris clair du Diagramme IV.1, avant (bleu) et après 30 secondes d'irradiation dans D₂O, 20mM Pi pD 8,0 en présence de 1,6 μ M de Bleu de méthylène (rouge).

Pour déterminer le $k_R(\text{ZnCP1})$ à partir de ces aires, nous utilisons la formule présentée dans le point méthodologie en début de Partie B :

$$\frac{k_R(\text{EGWGK})}{k_R(\text{ZnCP1})} = \frac{\ln \frac{[\text{EGWGK}]_0}{[\text{EGWGK}]_t}}{\ln \frac{[\text{ZnCP1}]_0}{[\text{ZnCP1}]_t}} \quad (1)$$

Nous avons vu que la concentration de ZnCP1 n'est pas directement proportionnelle à l'aire sous le pic $t_r=24,3\text{min}$ puisque ce pic est un mélange : l'espèce disulfure a le même temps de rétention. Ainsi, pour chaque chromatogramme, il faut recalculer la quantité de CP1 réduit. Nous partons de l'hypothèse que les différents peptides (réduit et oxydés) ont le même coefficient d'extinction molaire à 214nm. Cette absorbance est principalement due aux liaisons amide. Leur nombre n'est pas changé par l'oxydation, et nous supposons que les changements apportés par l'oxydation des soufres, en sulfinate ou en disulfure, n'impacte pas l'absorption du peptide à 214nm dans les conditions de séparation HPLC (s'il y a un changement de coefficient d'absorption, celui-ci n'excède pas 5%, ce qui rentre dans l'incertitude de la mesure). Ainsi la proportionnalité entre la quantité d'un produit et l'aire sous son pic, est la même pour tous les produits.

D'abord, l'évolution de l'aire du pic « initial » nous donne la somme de la disparition du complexe initial et de l'apparition du CP1 disulfure :

$$\Delta\text{Aire}_{(\text{pic initial})} = \Delta[\text{ZnCP1}] + \Delta[\text{CP1 disulfure}] \quad (2)$$

La somme des aires des pics sulfinate (C7s et C4s) nous donne l'apparition totale des produits « sulfinate » :

$$\Delta(\text{Aire}_{(\text{CP1 C4s})} + \text{Aire}_{(\text{CP1 C7s})}) = \Delta[\text{CP1 sulfates}] \quad (3)$$

Ensuite, nous avons déterminé ci dessus que le disulfure représente 25% des produits d'oxydations, c'est à dire :

$$\Delta[\text{CP1 disulfure}] = 0,33 \times \Delta[\text{CP1 sulfates}] \quad (4)$$

Ainsi, à l'aide des équations (2) à (4), on retrouve :

$$\Delta[\text{ZnCP1}] = \Delta\text{Aire}_{(\text{pic initial})} - 0,33 \times \Delta(\text{Aire}_{(\text{CP1 C4s})} + \text{Aire}_{(\text{CP1 C7s})}) \quad (5)$$

La disparition de EGWGK est quantifiée directement en mesurant l'aire du pic de ce peptide. En utilisant le suivi HPLC des compétitions ZnCP1/EGWGK, et les équations (1) et (5), nous avons mesuré que le tryptophane de EGWGK est oxydé par 1O_2 $6,6(\pm 0,7)$ fois plus vite que ZnCP1 (Diagramme B.III.1).

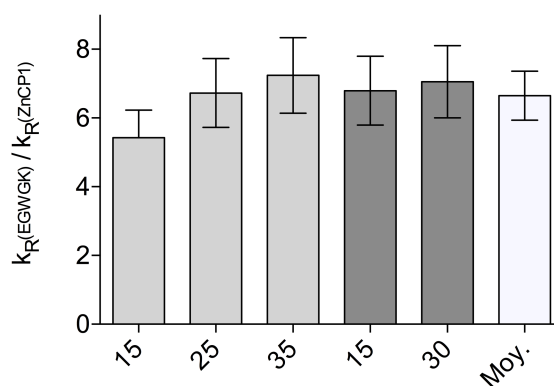


Diagramme B.III.1 : Détermination du ratio $k_R(EGWGK)/k_R(ZnCP1)$. Ce ratio a été déterminé pour deux mélanges EGWGK/ZnCP1/Bleu de méthylène à différents temps d'irradiation (indiqué en secondes). Les produits sont quantifiés comme décrit dans le texte à partir des aires des pics HPLC de EGWGK (280nm) et CP1 (214nm). La barre blanche indique la valeur moyenne $k_R(EGWGK) / k_R(ZnCP1) = 6,6(\pm 0,7)$.

Comme nous avons mesuré $k_R(EGWGK) = 4,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, nous obtenons $k_R(ZnCP1) = 0,7(\pm 0,07) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Pour rappel, l'équipe de Nathan McClenaghan a mesuré $k_T(ZnCP1) = 1,7(\pm 0,2) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La valeur du k_R est inférieure à l'incertitude sur le k_T , par conséquent, on peut considérer que la vitesse de désactivation physique $k_Q(ZnCP1) \sim k_T(ZnCP1) = 1,7(\pm 0,2) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.3. Affinité des peptides oxydés pour le zinc

Par HPLC, nous avons isolé les peptides dont une cystéine est oxydée en sulfinate. Les titrages de ces espèces avec du Zn^{2+} ont été suivis par dichroïsme circulaire (Figure B.III.8).

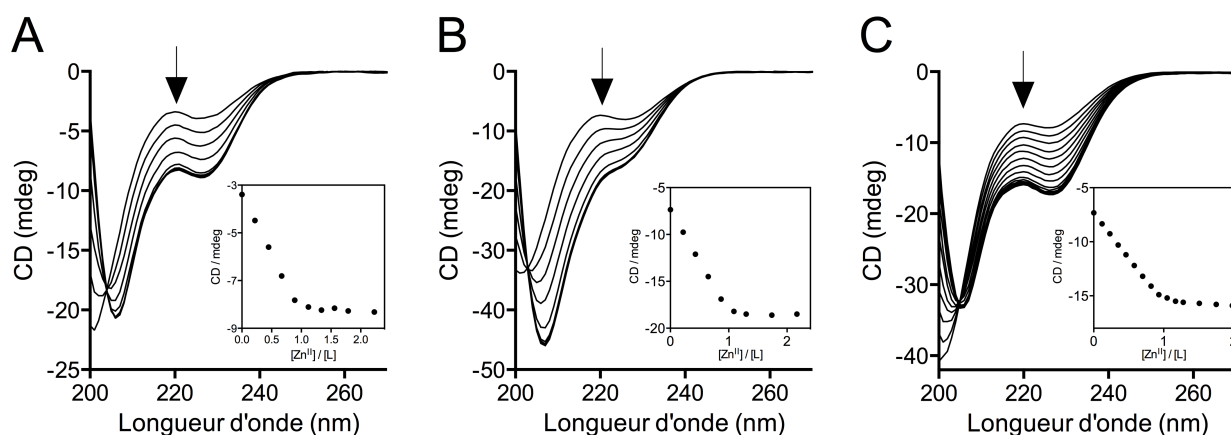


Figure B.III.8 : Suivi en dichroïsme circulaire des titrages directs, par $ZnCl_2$, de (A) CP1 (21,5 μ M), (B) CP1 C7s (20,5 μ M) et CP1 (C) C4s (20,9 μ M) dans tampon phosphate 100mM pH 7,0. Les encadrés suivent le signal CD à 220nm en fonction du ratio $[Zn^{II}]/[Peptide]$.

Le spectre CD de ces peptides change lorsque l'on ajoute du zinc ($ZnCl_2$), ce qui montre que ces peptides sont toujours capables de complexer le zinc et de se replier. Cette évolution montre une rupture de pente nette à 1 équivalent de zinc par rapport au peptide (voir les encadrés pour chaque titrage). Ainsi, comme pour le peptide L_{TC} , les espèces de CP1 avec un sulfinate sont toujours capables de former un complexe 1:1 avec le zinc (Figure B.III.8).

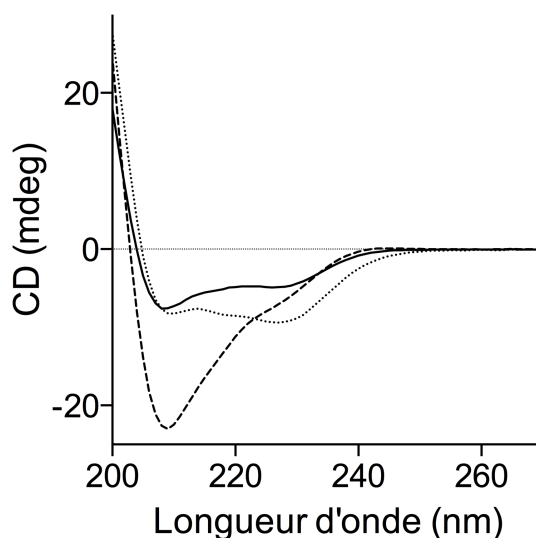


Figure B.III.9 : Changements dans le spectre CD de CP1 (trait plein), CP1 C7s (tirets) et CP1 C4s (pointillés), induits par la chélation de Zn^{II} . Ces spectres sont ceux présentés Figure B.III.8 en soustrayant à chaque fois le spectre du peptide libre.

Les changements provoqués par la complexation du zinc sur le spectre des peptides CP1, CP1 C7s et CP1 C4s sont présentés Figure B.III.9. Lorsque CP1 complexe l'ion Zn^{2+} , son spectre CD devient plus négatif dans la fenêtre 205-245nm. La variation du signal la plus intense est observée à 208nm, suivie de près par la variation du signal à 228nm. Cette tendance est très accentuée dans le cas de CP1 C7s : la complexation du zinc rend le signal à 208nm très négatif, alors que la variation à 228nm reste proche de celle observée avec CP1. Enfin, la variation de signal observée pour CP1 C4s est proche de ce que l'on a décrit pour CP1. La variation de signal est aussi intense à 208nm, mais, cette fois, c'est le signal à 228nm qui présente le plus fort changement.

Il est difficile d'en interpréter quelque chose au niveau de la structure. Tout ce qu'on peut en dire est que l'effet de l'oxydation d'une cystéine en acide sulfinique sur la structure du peptide et du complexe, diffère selon la cystéine oxydée.

Des titrages similaires en présence d'un équivalent de NTA (Figure B.III.10) permettent de déterminer la constante de complexation apparente à pH 7 de CP1 C7s et CP1 C4s pour l'ion Zn^{2+} . Ces titrages ont été simulés avec le logiciel SPECFIT en utilisant un modèle simple où Zn^{2+} est chélaté par le NTA ou par le peptide. La formation de complexes de zinc avec le tampon (Pi) est négligée dans un premier temps car sur le suivi des titrages (Figure B.III.8) la rupture de pente est nette, ce qui témoigne d'une bonne affinité du peptide pour le zinc. Le NTA forme un complexe 1:1 avec le zinc^[18], avec une constante de complexation apparente de $K=10^{7,9}$. Les peptides (CP1 C7s et CP1 C4s) forment un complexe 1:1 avec le zinc, dont la constante de complexation est laissée variable pour ajuster la simulation aux points expérimentaux. C'est ainsi qu'ont été déterminées les constantes apparentes (à pH 7) de complexation : $K = 10^{8,6}$ pour CP1 C7s et $K = 10^{8,4}$ pour CP1 C4s. Des simulations similaires ont été faites en introduisant la chélation de zinc par le phosphate (tampon). Les valeurs des constantes de complexation des peptides sont inchangées, ce qui confirme que l'affinité de ces peptides pour le zinc est suffisamment élevée pour négliger l'effet du tampon.

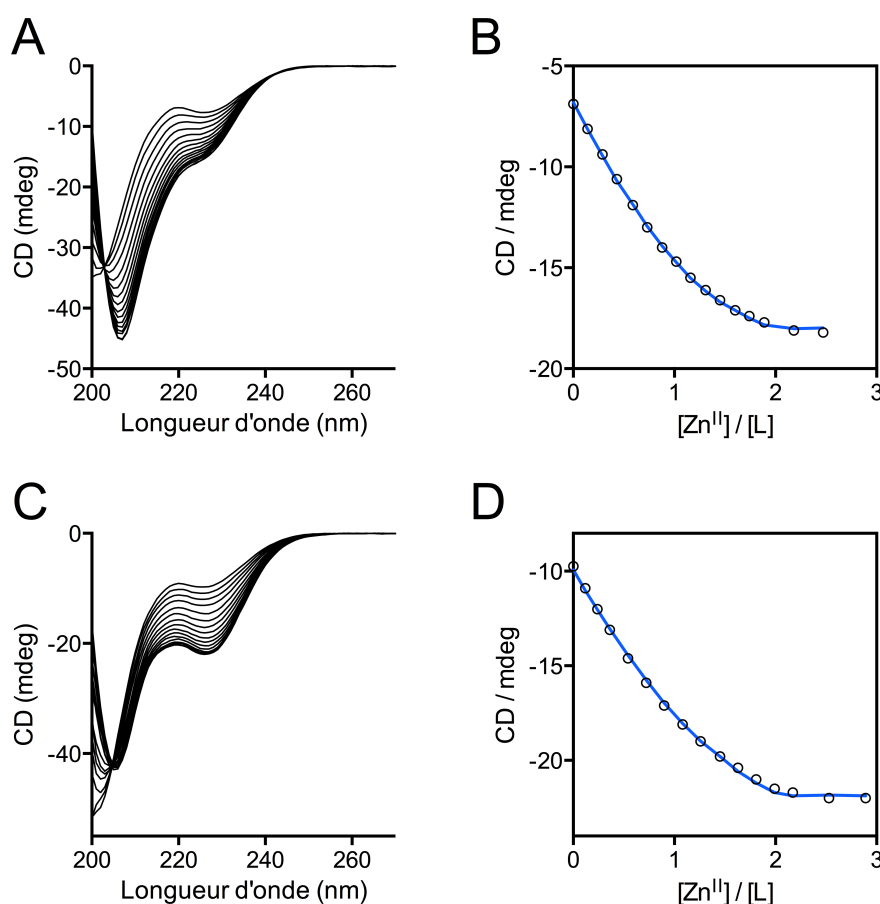


Figure B.III.10 : Titrages compétitifs de CP1 C7s (A,B) et C4s (C,D) par $ZnCl_2$, en présence d'un équivalent de NTA, dans 100mM Pi pH 7,0. A gauche (A et C) : évolution des spectres CD lors des ajouts de Zn^{II} . A droite (B et D) : suivi du titrage à 220nm et simulation (bleu). Voir le détail de la simulation dans le texte.

Nous disposons au laboratoire des deux mutants de CP1 dont une cystéine sur deux est mutée en Alanine : CP1 C7A et CP1 C4A. Ils forment eux aussi des complexes 1:1 avec l'ion Zn^{2+} (Figure B.III.11 (A) et (B)), mais dans les deux cas, la rupture de pente autour d'un équivalent n'est pas nette. Vers un équivalent de zinc, une partie non négligeable du zinc est hors du peptide. Dans ce cas, il faut prendre en compte la complexation de Zn^{2+} par le tampon phosphate ($K_{\text{app}}=10^{2,2}$ à pH 7,0, voir Partie Expérimentale) dans nos simulations.

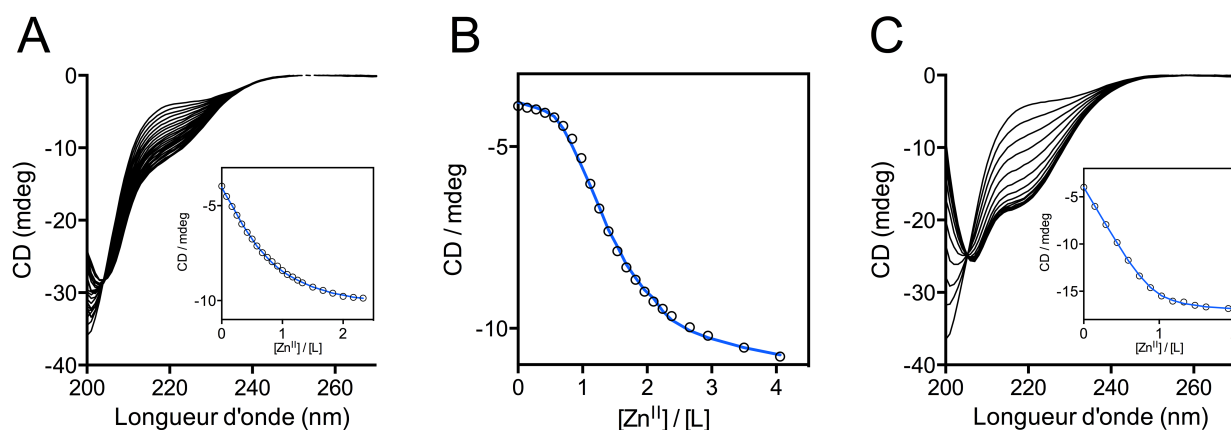


Figure B.III.11 : Titrages en dichroïsme circulaire des mutants alanine de CP1, dans 20mM Pi pH 7,0 en présence de 250 μM de TCEP. (A). Suivi CD du titrage par ZnCl_2 de CP1 C4A. L'encadré suit le signal à 228nm, simulation en bleu. (B) Suivi CD du titrage par ZnCl_2 de CP1 C7A. L'encadré suit le signal à 221nm : points expérimentaux en gris et simulation en bleu (détaillée dans le texte) (C) Titrage de CP1 C7A par ZnCl_2 en présence de 0,9 équivalent de NTA, suivi à 221nm : points expérimentaux en gris, et simulation en bleu. Les simulations sont détaillées dans le texte.

Le titrage compétitif NTA/CP1 C7A 0,9 :1 (Figure B.III.11 (C)) a été simulé (ligne bleu) avec un modèle où le zinc peut être complexé par le NTA ($K=10^{7,9}$), le phosphate inorganique ($K=10^{2,2}$), et par le peptide pour former un complexe 1:1 et un complexe 1:2. Les affinités obtenues sont de $K=10^{10,9}$ pour le complexe 1:2 et $K=10^{5,9}$ pour le complexe 1:1. Le titrage direct de CP1 C7A par ZnCl_2 a ensuite été simulé (ligne bleu de l'encadré Figure IV.11 A) en lui imposant une affinité pour le tampon de $10^{2,2}$ et une constante de complexation de $10^{10,9}$ pour le complexe peptidique 1:2. La constante de complexation du complexe 1:1 est le paramètre d'ajustement. Le logiciel retrouve une constante de complexation de $10^{5,9}$ pour le complexe peptidique 1:1, comme déterminée précédemment.

Nous n'avons pas assez de CP1 C4A pour faire un titrage compétitif. En faisant l'hypothèse que CP1 C4A se comporte comme CP1 C7A, le titrage direct de CP1 C4A en tampon phosphate a été simulé avec un modèle calqué sur celui utilisé pour les simulations des titrages de CP1 C7A (Figure B.III.11 (C)). En faisant ainsi, nous obtenons une constante de complexation de $10^{6,7}$ pour l'espèce 1:1 métal/peptide, et une constante de complexation de

10^{12} pour l'espèce 1:2. Une simulation un peu moins satisfaisante est obtenue avec un modèle comportant seulement le complexe 1:1 et le phosphate, avec une constante de complexation $10^{6,3}$.

Les spectres CD nous informent sur la structuration globale des peptides. Que ce soit les produits mono-sulfonates ou les mutants alanine, tous ces peptides sont capables de lier le zinc et de se replier. Il nous importe de savoir si le peptide arrive à adopter le repliement de type $\beta\beta\alpha$ et si cette conformation est stable. Nous avons cherché des éléments de réponse par spectroscopie RMN.

Les spectres RMN ^1H des complexes ZnCP1, ZnCP1 C7s et ZnCP1 C7A sont présentés Figure B.III.12. Les signaux des protons des liaisons amide de la chaîne principale sont fins pour ZnCP1 et pour ZnCP1 C7s, ce qui indique que ces complexes sont repliés en une conformation stable. En revanche, sur le spectre de ZnCP1 C7A, ces signaux sont larges et mal définis, ce qui indique beaucoup de mouvement de la chaîne principale, donc, pas de conformation stable.

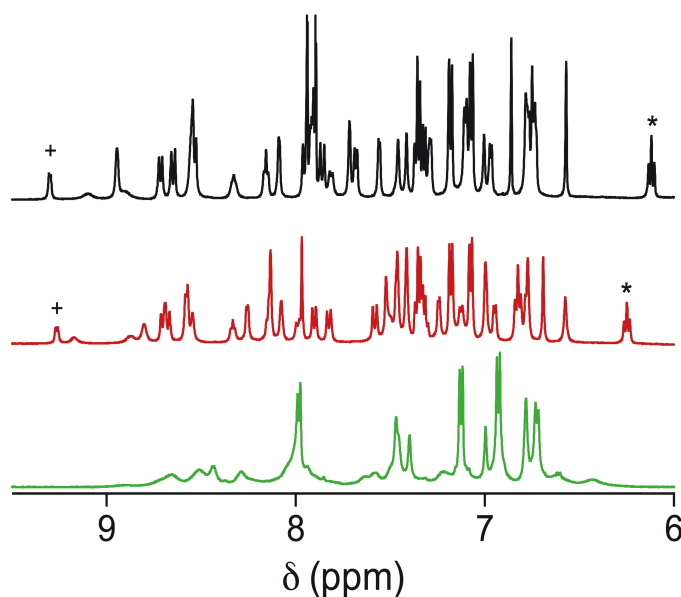


Figure B.III.12 : Spectres RMN ^1H des complexes ZnCP1 (noir), ZnCP1 C7s (rouge) et ZnCP1 C7A (vert). La fenêtre est restreinte à la zone où sont visibles les signaux N-H de la chaîne principale des peptides. Les signaux indiqués par les symboles + et * sont typiques du repliement en du peptide $\beta\beta\alpha$.

Les signaux marqués sur la Figure B.III.12 sont typiques du repliement $\beta\beta\alpha$ des peptides CP1^[19]. Le triplet indiqué par une (*) est le signal du proton, porté par le noyau aromatique de la phénylalanine 11, qui fait face au cycle imidazole de l'histidine 20. Le signal indiqué par le (+) est celui du proton amide de la cystéine 4. Il est fortement déblindé par le noyau aromatique de la phénylalanine 11. Le déplacement chimique de ces protons dépend

entièrement de la formation du cœur hydrophobe de CP1. Sur le spectre de ZnCP1 C7s (Figure B.III.12), ces protons ont des déplacements chimiques très proches de ceux qu'ils ont sur le spectre de ZnCP1. Ceci confirme que ZnCP1 C7s a bien un repliement $\beta\beta\alpha$. En revanche, sur le spectre de ZnCP1 C7A, ces signaux sont clairement absents : ce peptide n'a pas le repliement $\beta\beta\alpha$.

3. Discussion

3.1. Produits d'oxydation

Premièrement, l'oxydation d'un doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ classique $Zn(Cys)_2(His)_2$ par 1O_2 produit des espèces mono-sulfinate ($75\pm 5\%$) et disulfure ($25\pm 5\%$). Ceci signifie que les histidines de ce site à zinc ne sont pas des cibles primaires de l'oxydation dudit site par l'oxygène singulet. Ceci s'explique par l'acidité de Lewis de l'ion Zn^{2+} qui rend l'imidazole lié au zinc moins nucléophile que l'imidazole libre. Il est aussi probable que les valeurs hautes de k_R de l'histidine libre de la littérature soient un peu surestimées : les méthodes de mesure des vitesses d'oxydation par l'oxygène singulet sont complexes, et donc sujettes à de nombreux biais (solvant, erreur sur le k_R d'un compétiteur, réactions radicalaires en plus de 1O_2 , etc...). De plus, il n'est pas étonnant de voir que les thiolates liés au zinc sont plus nucléophiles que les histidines liées au zinc.

Quant à la conséquence qu'une telle oxydation peut avoir sur le doigt de zinc, il faut la discuter en terme de conservation du complexe de zinc et de sa structure.

De ce point de vue, le cas du peptide CP1 disulfure ne sera pas plus discuté : l'oxydation de deux des quatre ligands cause une chute dramatique de l'affinité pour le zinc. Les deux histidines restantes peuvent interagir avec du zinc libre, mais avec une affinité faible ($K \sim 10^5$ - 10^6), et sans induire le repliement du peptide.

En revanche, en ce qui concerne les espèces possédant un sulfinate, les choses ne sont pas aussi simples. Nous avons vu dans le cas de ZnL_{TC} (Chapitre B.II) que passer de quatre thiolates à trois thiolates et un sulfinate autour du zinc fait chuter la constante de complexation d'environ 5 ordres de grandeur. Or, ici, la sphère de coordination initiale se compose de deux thiolates et deux imidazoles. Rien ne nous dit que l'effet sur la constante de complexation sera le même.

L	Log K_{app} at pH 7.0	
	$Zn^{II}L$	$Zn^{II}(L)_2$
CP1	14,9 ^a	-
CP1 C7s	8,6	-
CP1 C4s	8,4	-
CP1 C7A	5,9	10,9
CP1 C4A	6,7	12

Tableau B.III.2 : constante de formation des complexes de zinc mesurées pour CP1, les produits mono-sulfinate CP1 C7s et CP1 C4s, et les mutants alanine CP1 C7A et CP1 C4A. a) La constante de formation de $ZnCP1$ vient de Sènèque and Latour^[20].

Les études de coordination nous ont apporté des éléments de réponse (Tableau B.III.2). L'oxydation d'une cystéine de CP1 en sulfinate fait baisser l'affinité du peptide d'environ 6,5 ordres de grandeur. Cette chute est plus importante que ce qui a été mesuré avec L_{TC} . Cependant, cette affinité reste plus grande, de 1,5-2,5 ordres de grandeur, que celle du mutant alanine correspondant. Ceci montre bien que la présence du groupement sulfinate a un effet stabilisateur important. De plus, la RMN 1H révèle que l'oxydation de la cystéine 7 du peptide en sulfinate ne détruit pas le repliement $\beta\beta\alpha$, contrairement à la mutation de cette cystéine en alanine.

Le rôle stabilisateur du sulfinate pourrait s'expliquer par deux composantes différentes. D'abord, le sulfinate peut être coordonné au zinc (voir ci-dessous). Ensuite, les oxygènes et le soufre du sulfinate peuvent être impliqués dans des liaisons hydrogène avec d'autres atomes du peptide.

Imanishi et al.^[21] ont mesuré l'affinité pour le zinc d'un peptide modèle de doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ et de ses mutants. Ce peptide f2 possède une séquence d'acides aminés différente de CP1 mais conserve les éléments essentiels au repliement $\beta\beta\alpha$. Si l'équivalent de la cystéine 7 chez f2 est mutée en aspartate, $f2(CCHH) \rightarrow f2(CDHH)$, l'affinité du peptide pour le zinc passe de $K=10^{13,6}$ à $K=10^{11}$. La perte d'affinité est faible comparée à celle que nous avons mesuré pour nos produits d'oxydation. L'aspartate et le sulfinate ayant la même longueur de chaîne, la différence ne s'explique pas par un facteur structural. En revanche, le pK_a d'un acide sulfonique est plus faible que celui d'un acide carboxylique. Aussi, on peut penser que l'acide sulfonique est moins donneur, et donc, moins bon ligand que l'aspartate.

Si l'on peut penser que le sulfinate est coordonné au zinc, par contre, nous n'avons aucune information sur le mode de coordination du sulfinate au zinc (O-lié ou S-lié). Les bandes de vibration de ces liaisons soufre-oxygène, visibles en spectroscopie infra-rouge, permettent de discriminer les différents modes de coordination possibles. Malheureusement, les tentatives d'enregistrement de spectres infra-rouges de nos complexes, en poudre et en solution, se sont soldées par des échecs. Néanmoins, dans la littérature, on ne trouve aucun exemple de complexe où un ion Zn^{2+} est S-lié à un sulfinate, mais il existe plusieurs exemple de O-liés. C'est notamment le cas d'un complexe de zinc possédant une sphère de coordination qu'on peut penser proche de celle de nos peptides avec un sulfinate : elle est composée de deux azotes (amidates) d'un thiol et d'un sulfinate O-lié^[22].

Finalement, notons aussi que les spectres CD des mutants Alanine libres (Figure B.III.11 au début des titrages) indiquent que ces peptides sont très peu structurés en absence de zinc : le signal à 225 nm est peu négatif. Ce signal étant beaucoup plus négatif sur les spectres CD des peptides libres CP1, CP1 C7s, CP1 C4s (Figure B.III.5 au début des titrages), il est vraisemblable que la mutation d'une cystéine en alanine fasse disparaître une ou plusieurs liaisons hydrogène (impliquant le soufre de la cystéine, et le soufre et/ou les oxygènes de l'acide sulfénique) qui se formaient dans le peptide libre, induisant une structuration partielle.

3.2. Cinétique d'oxydation

La vitesse de désactivation totale de $^1\text{O}_2$ par ZnCP1 est $k_T(\text{ZnCP1}) = 1,7(\pm 0,2) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est du même ordre de grandeur que la vitesse déterminée pour ZnL_{TC} ($k_T(\text{ZnL}_{\text{TC}}) = 1,4(\pm 0,1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Nous avons montré dans le chapitre B.II que les thiols (des cystéines) coordonnés au zinc ne font pas, ou très peu, de désactivation physique. Dans ZnCP1 aussi la désactivation physique pourrait venir uniquement de l'enveloppe peptidique. Cependant, il a été montré que l'histidine libre et l'imidazole sont capables de faire de la désactivation physique^[16], mais il n'y a pas d'étude similaire portant sur les imidazoles liés au zinc.

ZnL	$k/^1\text{O}_2$ (en $10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)		
	k_R	k_T	$k_{298\text{K}} \text{ H}_2\text{O}_2$ ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
ZnCP1(CCHH)	$0,7 \pm 0,07$	17 ± 2	$0,0083^a$
ZnL _{TC} (CCCC)	$4,3 \pm 0,4$	14 ± 1	$0,23^b$

Tableau B.III.3 : Vitesses d'oxydation de ZnCP1 et ZnL_{TC} par l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène. Les vitesses d'oxydation par H_2O_2 viennent de : a) *Isaac et al.*^[8] et b) *Bourlès et al.*^[23]

Malheureusement, la stratégie décrite dans le Chapitre B.II d'utiliser un mutant où les quatre ligands du zinc sont mutés en alanine n'est pas applicable ici. En effet, dans le complexe ZnCP1, plusieurs chaînes latérales sont enfouies et protégées du solvant, notamment les chaînes latérales composant le cœur hydrophobe. Ainsi, les noyaux aromatiques des phénylalanines ne sont pas exposés au solvant et font peu de désactivation physique. Or, si l'on mute les ligands (His et Cys) du zinc en alanine, le peptide n'adoptera pas de conformation et exposera toutes ces chaînes latérales hydrophobes au solvant. Elles pourront alors participer pleinement à la désactivation de l'oxygène singulet. C'est ainsi qu'est expliqué le fait qu'une protéine désactive plus $^1\text{O}_2$ dans sa forme dépliée que lorsqu'elle adopte une structure stable^[24]. Cette forme sera donc capable de faire plus de désactivation physique que le complexe ZnCP1.

Par contre, en ce qui concerne la désactivation chimique (conduisant aux produits d'oxydation) le complexe ZnCP1 réagit environ ~ 6 fois moins vite que ZnL_{TC} : $k_R(\text{ZnCP1}) = 0,7 \pm 0,07.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ contre $k_T(\text{ZnL}_{\text{TC}}) = 4,3 \pm 0,4.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Cette différence de réactivité est celle déjà observée avec H_2O_2 . Néanmoins, elle était plus marquée avec H_2O_2 puisque ZnL_{TC} réagit avec lui environ 30 fois plus vite que ZnCP1^[8,23].

4. Conclusion

L'oxydation d'un site doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ classique de formule $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$ par l'oxygène singulet est lente : $k_R(\text{ZnCP1}) = 0,7.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ soit 6 fois moins rapide qu'un site clef de sol à quatre cystéines. Seules les cystéines de ce site sont des cibles primaires pour

l'oxygène singulet. Leur oxydation donne des sulfinates, en majorité, mais aussi du disulfure. Dans un site de formule $Zn(Cys)_2(His)_2$, l'oxydation d'un thiolate en sulfinate fait chuter l'affinité du peptide pour l'ion Zn^{2+} d'environ 6,5 ordres de grandeur.

Ainsi, comparé à des sites de type $Zn(Cys)_4$, ces sites sont moins susceptibles d'être oxydés en milieu biologique, mais, cette oxydation les déstabilise plus encore.

Références

- [1] J. Miller, A. D. McLachlan, A. Klug, *EMBO J.* **1985**, *4*, 1609–1614.
- [2] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 3173–3178.
- [3] S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 532–550.
- [4] B. A. Krizek, B. T. Amann, V. J. Kilfoil, D. L. Merkle, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518–4523.
- [5] C. A. Kim, J. M. Berg, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 940–945.
- [6] D. Picot, G. Ohanessian, G. Frison, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 8167–8178.
- [7] R. Kassim, C. Ramseyer, M. Enescu, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 5407–5416.
- [8] M. Isaac, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3409–3420.
- [9] 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*, 11964–11976.
- [10] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24*, 663–677.
- [11] I. B. C. Matheson, J. Lee, *Photochem. Photobiol.* **1979**, *29*, 879–881.
- [12] M. Tomita, M. Irie, T. Kita, *Biochemistry* **1969**, *8*, 5149–5160.
- [13] D. I. Pattison, A. S. Rahmanto, M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *11*, 38–53.
- [14] H.-R. Shen, J. D. Spikes, C. J. Smith, J. Kopeček, *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2000**, *130*, 1–6.
- [15] M. Liu, Z. Zhang, J. Cheetham, D. Ren, Z. S. Zhou, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4940–4948.
- [16] A. Michaeli, J. Feitelson, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 284–289.
- [17] R. A. Lundeen, K. McNeill, *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 14215–14223.
- [18] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, **1974**.
- [19] G. Barbato, D. O. Cicero, E. Bianchi, A. Pessi, R. Bazzo, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 36–48.
- [20] O. Sènèque, J.-M. Latour, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17760–17774.
- [21] M. Imanishi, K. Matsumura, S. Tsuji, T. Nakaya, S. Negi, S. Futaki, Y. Sugiura, *Biochemistry* **2012**, *51*, 3342–3348.
- [22] E. Galardon, E. Bourles, I. Artaud, J.-C. Daran, P. Roussel, A. Tomas, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 4515–4522.

- [23] E. Bourlès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 13762–13772.
- [24] R. L. Jensen, J. Arnbjerg, H. Birkedal, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7166–7173.

Chapitre B.IV :

Réactivité des ZnL_{ZAS} vis-à-vis de l'oxygène singulet

Vincent Lebrun, Valentin Chabert, Colette Lebrun, Jean-Luc Ravanat, Jean-Marc Latour et
Olivier Sèneque

Chapitre B.IV : Développement de modèles de sites ZAS et leur réactivité vis-à-vis de H_2O_2 et $^1\text{O}_2$

1. Introduction	155
2. Résultats	157
2.1. Conception des modèles des sites doigt de zinc de ChrR et RsrA	157
2.2. Caractérisation physico-chimique des modèles	161
2.3. Réactivité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène	168
2.4. Réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet	172
3. Discussion	177
3.1. Conception du modèle et structure	177
3.2. Réactivité vis-à-vis de H_2O_2 , comparaison avec les autres modèles	178
3.3. Réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet	180
4. Conclusion	184

Ce petit projet a été développé à la fin de ma thèse. Il a été l'occasion pour moi d'encadrer Valentin Chabert durant son stage de Master 2. Valentin s'est montré enthousiaste, volontaire et impliqué dans ce projet. Je l'en remercie très chaleureusement.

1. Introduction

Les facteurs σ^E (*Rhodobacter sphaeroides*) et σ^R (*Streptomyces coelicolor*) appartiennent à la famille des facteurs σ^{70} , plus précisément, à la sous-famille du groupe IV. De ces sous-familles, celle du groupe IV est la plus large et la plus diversifiée, ce qui suggère que ses membres jouent un rôle majeur dans la transcription bactérienne^[1]. σ^E et σ^R sont responsables de l'expression d'une réponse contre le stress oxydant : oxygène singulet dans le cas de σ^E , et « stress disulfure » (l'oxydant physiologique activateur n'est pas identifié à ce jour) dans le cas de σ^R .^[2] Cependant, pour que cette réponse n'ait lieu qu'en présence d'un stress oxydant, il faut inhiber l'action de ces facteurs de transcription en conditions normales. Cette inhibition est levée par le stress oxydant, et est restaurée lors du retour aux conditions « normales ». Les acteurs de cette inhibition sont les facteurs anti-sigma, qui inhibent l'action des facteurs sigma en les séquestrant (illustré Schéma B.IV.1). σ^E et σ^R sont séquestrés, respectivement, par les facteurs anti-sigma ChrR et RsrA.

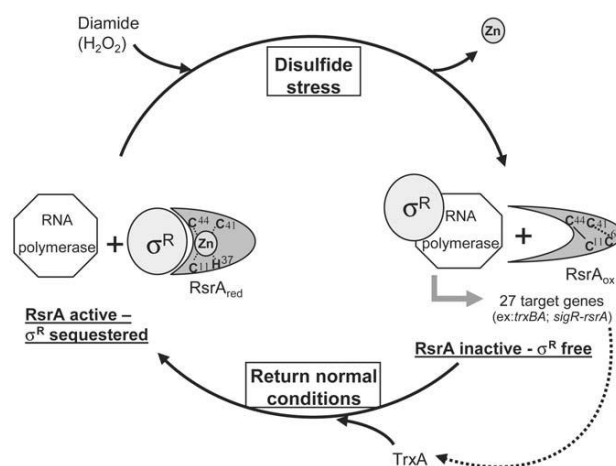


Schéma B.IV.1 : Mécanisme de régulation du facteur sigma R par son anti-facteur sigma, RsrA. (extrait de Ilbert M. et al. ^[3]). En conditions normales, le site à zinc de RsrA est formé, et σ^R est lié à RsrA, ce qui l'empêche d'interagir avec l'ARN polymérase. En présence d'oxydants, les cystéines du doigt de zinc de RsrA sont oxydées (disulfures), ce qui induit un changement de conformation de RsrA, provoquant le départ de σ^R . Ce dernier peut alors se lier à l'ARN polymérase et initier la transcription du régulon qu'il contrôle. Après retour en conditions normales, réductrices, les ponts disulfures de RsrA sont réduits, ce qui permet au site à zinc de se reformer. RsrA est de nouveau capable de séquestrer σ^R .

Pour ces deux systèmes, l'interaction entre le facteur sigma et son facteur anti-sigma se fait au niveau du domaine N-terminal du facteur anti-sigma. Ce domaine est appelé ASD (Anti-Sigma Domain)^[1]. Il est conservé dans 33% des facteurs anti- σ du groupe IV. L'ASD de RsrA

contient un ion Zn²⁺, nécessaire au bon repliement du site. Les protéines homologues de RsrA, comme ChrR, possèdent le même site, dont le motif conservé est H-X₃-C-X₂-C. Ce motif est présent dans 38% des domaines ASD, qui sont alors appelés ZAS (Zinc-binding Anti-Sigma factor)^[4].

Des deux systèmes, le mieux décrit est le système RsrA/σ^R. Des expériences *in vitro*^[5] et *in vivo*^[4] montrent que la réponse de la bactérie contre le diamide est déclenchée par l'oxydation de RsrA : les cystéines du site doigt de zinc de RsrA sont oxydées en disulfure, ce qui conduit au relargage du zinc et au dépliement du domaine. L'interaction RsrA-σ^R est alors perdue, ce qui permet au facteur σ^R d'aller recruter l'ARN-polymérase sur le promoteur du régulon (*trxB*) codant pour la thiorédoxine et la thiorédoxine-réductase^[5]. RsrA étant un substrat de la thiorédoxine, lorsque le stress oxydant diminue, le(s) disulfure(s) est/sont réduit(s), le site à zinc se reforme, ce qui permet à RsrA de séquestrer σ^R de nouveau.

Pour le système ChrR/σ^E, ce qui déclenche la rupture de l'interaction ChrR-σ^E n'est pas encore élucidé. D'abord, par analogie avec le système que l'on vient de décrire, il a été proposé que la détection de ¹O₂ dans la cellule se fasse via l'oxydation du site à zinc. Cependant, il a été montré que le domaine N-terminal seul n'est pas suffisant pour monter la réponse à ¹O₂, le domaine C-terminal est requis. Lorsque la partie C-terminale de ChrR est tronquée, ChrR est toujours capable de séquestrer σ^E. En revanche, l'exposition à l'oxygène singulet n'induit plus l'expression des gènes régulés par σ^E, suggérant que le complexe ChrR-σ^E n'a pas été rompu^[1]. De plus, des études récentes^[6-8] ont mis en évidence l'implication d'autres acteurs, notamment des protéases, nécessaires à l'activation de σ^E lors d'un stress ¹O₂. Le mécanisme d'activation de ChrR par l'oxygène singulet est donc plus complexe que celui de RsrA, et reste mal connu. Entre autres, la cible « primaire » de l'oxygène singulet n'est toujours pas identifiée.

L'hypothèse de l'oxydation du site à zinc de ChrR par ¹O₂ comme événement initial est plausible étant donné la similarité de son site à zinc avec celui de RsrA, et le rôle de cette dernière. Cette étude vise à mettre en évidence, s'il y en a, des propriétés structurales et réactionnelles particulières aux sites ZAS par rapport aux autres familles de doigt de zinc précédemment étudiées.

2. Résultats

2.1. Conception des modèles des sites doigt de zinc de ChrR et RsrA

RsrA et ChrR possèdent un site à zinc de formule Z-X_y-H-X₃-C-X₂-C, mais, chez RsrA y=25 et Z=Cys tandis que pour ChrR, y=24 et Z=His.

La Figure B.IV.I présente la structure cristallographique du complexe ChrR-σ^E[1]. Pour RsrA, il n'y a pas de structure disponible dans la littérature. Les groupes travaillant sur RsrA utilisent la structure de ChrR comme modèle. Aussi, nos modèles seront conçus à partir de la structure de ChrR.

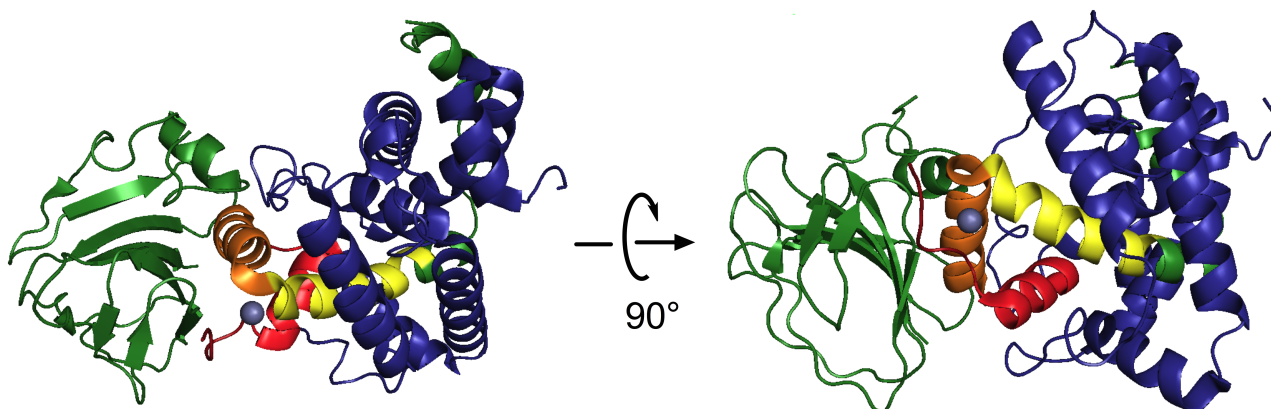


Figure B.IV.1 : Structure cristallographique du complexe *Rs* ChrR-σ^E (PDB code : 2Q1Z). Le facteur σ^E est représenté en bleu. Les trois hélices formant le site à zinc de ChrR sont colorées en rouge, orange et jaune (de N-ter en C-ter), le reste de la protéine est en vert, et le zinc est représenté par une sphère grise. Notons qu'il manque la chaîne reliant le domaine C-ter de ChrR (motif tonneau β en vert) au domaine N-ter : sur la représentation de gauche, ce lien se trouverait au haut (les deux bouts tronqués sont visibles, pointent l'un vers l'autre).

Au sein du complexe ChrR-σ^E (Figure B.IV.1), la grande majorité (~95%) des interactions ChrR/σ^E se fait au niveau du domaine N-terminal^[1], dont le doigt de zinc est un composant essentiel. L'hélice orange interagit avec le domaine C-terminal de ChrR, tandis que les deux autres ont de larges surfaces d'interaction avec le facteur sigma. De plus, le site à zinc est clairement exposé à la surface de la protéine, donc, accessible au solvant.

Ce site doigt de zinc est composé de trois hélices α, dont deux forment un coude comportant les trois acides aminés du motif ZAS, H-X₃-C-X₂-C, qui vont lier le zinc. Le dernier acide aminé coordonnant le zinc, se trouve plus loin dans la séquence, dans une partie sans repliement canonique. Entre ces trois hélices, se trouve un cœur hydrophobe formé par neuf chaînes latérales hydrophobes.

Pour bien modéliser un tel site à zinc, nous nous basons sur la séquence de la protéine. Cependant, il faut savoir quels sont les acides aminés à conserver, quels sont ceux qui devront être mutés, et ceux qui peuvent être modifiés sans qu'il y ait d'impact notable.

D'abord, concentrons-nous sur ceux qu'il faut conserver. Puisque notre modèle doit reproduire un site à zinc, il est évident que les ligands du zinc doivent être conservés (Figure B.IV.2 A). Ensuite, comme on l'a mentionné, des chaînes latérales apolaires pointent vers l'intérieur de l'espace délimité par les trois hélices, formant un cœur hydrophobe (Figure B.IV.2 B). Il assure la cohésion entre les trois hélices. Dans le Chapitre B.III, nous avons vu que le peptide CP1, en se repliant autour du zinc, forme un cœur hydrophobe, composé de trois chaînes latérales conservées. Il a été montré que ce cœur hydrophobe joue un rôle important dans la stabilité du complexe. Un mutant (CP1- $\Delta 8$) possédant une délétion en position 8, ce qui crée un décalage dans la séquence, est incapable de former ce cœur hydrophobe. L'absence de ce dernier confère au complexe ZnCP1- $\Delta 8$ des propriétés différentes du complexe parent, ZnCP1^[9]. D'abord, les spectres RMN ^1H montrent que ZnCP1- $\Delta 8$ présente une grande flexibilité, alors que la chaîne de ZnCP1 présente peu de mouvement. Ensuite, la constante de formation de ZnCP1- $\Delta 8$ est environ 10^4 fois plus faible que celle de ZnCP1. Finalement, l'échange de zinc entre le peptide et un compétiteur est environ 1700 fois plus rapide avec CP1- $\Delta 8$ qu'avec CP1. D'après Li et al.^[10], pour ces doigts de zinc, la formation du cœur hydrophobe et la chélation du zinc sont coopératives. Ainsi, la décooordination des ligands du zinc est fortement défavorisée car elle implique de déformer le cœur hydrophobe. Dès lors, garder le cœur hydrophobe de ces ZAS dans nos modèles leur confèrerait des propriétés plus fidèles aux sites protéiques originaux. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'élaborer un modèle peptidique linéaire plutôt qu'un modèle branché, plus court, mais sans cœur hydrophobe.

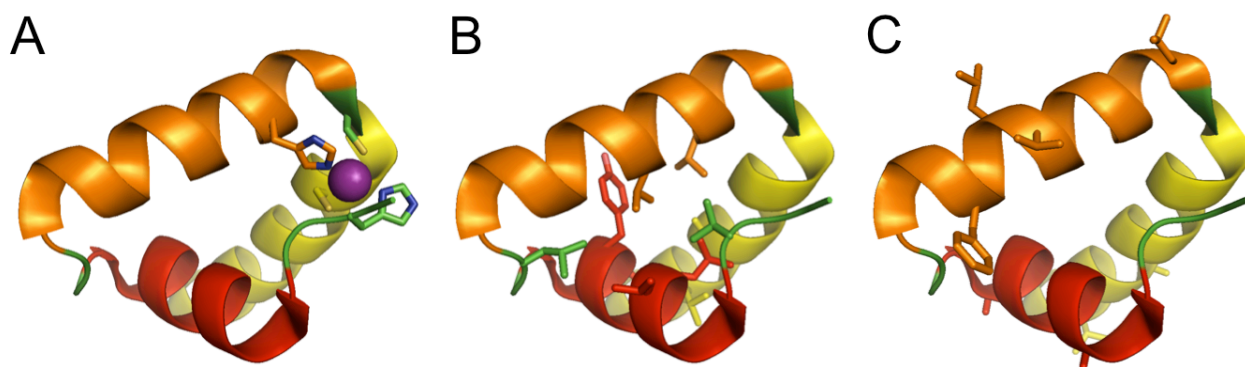


Figure B.IV.2 : Détails de la structure du doigt de zinc de la protéine ChrR dont les trois hélices alpha sont colorées différemment pour mieux les repérer. Les acides aminés représentés en bâtons permettent d'attirer l'attention sur : (A) la

sphère de coordination du zinc, (B) les chaînes latérales qui forment le cœur hydrophobe et (C) les chaînes latérales hydrophobes dirigées vers l'extérieur du motif.

Nous conservons aussi les sérines et thréonines situées à la base (N-ter) d'une hélice α : le groupe hydroxyle de la chaîne latérale d'une sérine (ou thréonine) en position i établit une liaison hydrogène avec le NH de la chaîne principale de l'acide aminé $i+3$, ce qui aide à la formation de l'hélice. Finalement, pour que le modèle reproduise correctement la réactivité du site original, il faut conserver les liaisons hydrogène impliquant les soufres des cystéines.

Les autres acides aminés peuvent, *a priori*, être mutés sans que cela nuise à la structuration du peptide. Cependant, la mutation d'un acide aminé en un autre sera toujours motivée. De plus, l'acide aminé qui sera choisi pour le remplacer devra permettre au peptide de se replier correctement et d'être soluble dans l'eau. Ainsi, l'obtention de la séquence du modèle en partant de la séquence de ChrR, s'est faite en cinq étapes de modifications, expliquées ci-dessous (le changement induit sur la séquence à chaque étape est illustré Figure B.IV.3) :

1. Le modèle ne vise à reproduire que le domaine doigt de zinc de la protéine, ce qui correspond aux acides aminés 4 à 50 de la séquence de ChrR. La séquence est tronquée en amont et en aval de cette section.
2. Pour reproduire fidèlement la sphère de coordination du zinc, les acides aminés qui forment le site métallique sont conservés. En revanche, dans la séquence de la protéine, il peut y avoir d'autres acides aminés qui sont potentiellement de bons ligands du zinc (histidines, cystéines). Cela ne pose pas forcément problème dans la protéine, mais dans un peptide court, cela pourrait conduire à la formation de complexes non désirables, lors des études de complexation. Aussi, ces ligands potentiels n'appartenant pas au site métallique d'intérêt sont mutés (ici, il n'y a que l'histidine 1).
3. Afin d'obtenir un complexe peptidique bien soluble dans l'eau (notamment à pH physiologique), les acides aminés dont la chaîne latérale est hydrophobe et pointe vers le solvant (Figure B.IV.2 (C)) sont mutés en des acides aminés polaires, préférentiellement chargés à pH neutre. En effet, pour éviter l'agrégation on donne au peptide une charge globale non-nulle. Ceci motive l'insertion prédominante de

lysines, afin que les peptides soient chargés positivement à pH neutre. De plus, il importe que ces charges soient bien réparties à la surface du modèle : en effet, un premier modèle possédant moins de lysines et plus de glutamates, et mal réparties, précipitait lors de la complexation du zinc.

4. Le domaine étant principalement formé d'hélices α , les acides aminés qui leur sont peu favorables, voire défavorables (comme les acides aminés β -branchés : isoleucine, thréonine), sont mutés par des acides aminés fréquemment retrouvés dans ce genre d'hélices, et connus pour avoir une forte propension à en former^[11].
5. Enfin, en vue de la synthèse peptidique, nous avons voulu éviter les acides aminés connus pour être problématiques en synthèse peptidique sur support solide. Par exemple, l'acide aspartique a tendance à former un aspartimide, et l'arginine peut être difficile à greffer et faire des réactions parasites. Nous les remplaçons par des acides glutamiques et des lysines. A la fin de cette étape, la séquence obtenue est celle que nous désignerons sous le nom de L_{ZAS}(HHCC).

ChrR	TIRHHVSDALLTAYAAGTLSEAFSLVVATHLSLCLDECRARAGALDAVGGSLM...
1	AcHHVSDALLTAYAAGTLSEAFSLVVATHLSLCLDECRARAGALDAVGG(NH ₂)
2	AcKHVSDALLTAYAAGTLSEAFSLVVATHLSLCLDECRARAGALDAVGG(NH ₂)
3	AcKHVSDQLLTAYAEGTLSEAYSKKVATHLSKCLDECRARAQKLDKGG(NH ₂)
4	AcKHVSDQLLKAYAEGTLSEAYSKKVAKHLSKCLDECRARAQKLDKAA(NH ₂)
5	AcKHVSKQLLKAYAEGTLSEAYSKKVAKHLSKCECKAKAQKLKAKAA(NH ₂)

Figure B.IV.3 : Elaboration de la séquence du modèle L_{ZAS}(HHCC) à partir de la séquence du doigt de zinc de la protéine Rs ChrR en cinq étapes, détaillées dans le texte. Pour chaque étape, les modifications apportées sont indiquées en gras. Les acides aminés impliqués dans la coordination du zinc sont soulignés. Les trois hélices alpha du domaine sont indiquées par des barres de couleurs (correspondant à la Figure B.IV.2).

En plus du modèle L_{ZAS}(HHCC) dont la séquence vient d'être présentée, deux mutants ont été synthétisés. Dans ces peptides, l'histidine 2 de L_{ZAS}(HHCC) est mutée en cystéine et en alanine, pour donner respectivement L_{ZAS}(CHCC) et L_{ZAS}(AHCC) (Figure B.IV.4).

Le premier, L_{ZAS}(CHCC), permettra de modéliser le site à zinc de la protéine RsrA. De plus, la comparaison de sa réactivité avec celle de L_{ZAS}(HHCC), permettra d'apprécier l'influence du nombre de cystéines dans la sphère de coordination du zinc sur la réactivité de ce motif.

Le deuxième, L_{ZAS}(AHCC), servira lors des caractérisations physico-chimiques. Par comparaison avec les deux autres modèles, il mettra en évidence ce qu'apporte le quatrième ligand (celui qui n'appartient pas au motif conservé H-X₃-C-X₂-C) en terme de stabilité.

L_{ZAS}(HHCC) AcKHVSKQLLKAYAEGTLSEAYSKKVAKHLSKCEECKAKAQKLKAKAA_(NH₂)
 L_{ZAS}(CHCC) AcKCVSKQLLKAYAEGTLSEAYSKKVAKHLSKCEECKAKAQKLKAKAA_(NH₂)
 L_{ZAS}(AHCC) AcKAVSKQLLKAYAEGTLSEAYSKKVAKHLSKCEECKAKAQKLKAKAA_(NH₂)

Figure B.IV.4 : Séquences des modèles L_{ZAS} étudiés dans ce chapitre.

Finalement, les études de ces modèles vis-à-vis de l'oxygène singulet permettront de comparer la réactivité des sites à zinc à celle des tyrosines. En effet, cet acide aminé est décrit comme étant sensible à l'oxygène singulet^[12]. S'il est oxydé au sein d'une protéine, le produit d'oxydation majoritaire est la 3,4-dihydroxyphénylalanine. Ce produit correspond à l'ajout d'un atome d'oxygène sur le phénol de la tyrosine, c'est à dire, un gain de 16 unités de masse par rapport au peptide initial.

Nos peptides L_{ZAS} possèdent deux tyrosines, dont l'une (Tyr20) devrait pointer vers le solvant (si le repliement est fidèle à la protéine), c'est à dire qu'elle est accessible aux oxydants. Ainsi, lorsque nos modèles seront photo-oxydés, nous pourrons voir si l'on détecte, ou non, des produits correspondant à l'oxydation de la tyrosine.

Mais, avant de réaliser les études de réactivité, il faut s'assurer de la pertinence de nos modèles, quant à la reproduction des sites ZAS.

2.2. Caractérisation physico-chimique des modèles

Après les étapes de synthèse et de purification, l'interaction de ces peptides avec les métaux ainsi que son effet sur la structure du peptide, ont été caractérisés par diverses spectroscopies.

Étant des modèles de sites à zinc, la complexation de l'ion Zn²⁺ par ces peptides L_{ZAS} est la première étudiée. L'ajout de Zn²⁺ dans une solution de L_{ZAS} provoque l'augmentation de l'absorbance autour de 220nm (Figure B.IV.5 (A), (B) et (C)). Ce phénomène a déjà été largement décrit. Il correspond à l'apparition d'une bande de transfert de charge (du thiolate vers le zinc) lors de la coordination du zinc par les cystéines du peptide. De 0 à 1 équivalent

Zn²⁺/L, cette augmentation est linéaire, et l'absorbance atteint un plateau après 1 équivalent (Figure B.IV.5 (D), (E) et (F)). Ceci signifie que ces peptides sont capables de complexer le zinc pour former, vraisemblablement, seulement une espèce 1:1 métal/peptide. Notons que la rupture de pente est nette pour les trois peptides, ce qui indique une constante de complexation élevée. C'était attendu pour les peptides à quatre ligands L_{ZAS}(CHCC) et L_{ZAS}(HHCC), mais plutôt surprenant pour le peptide L_{ZAS}(AHCC).

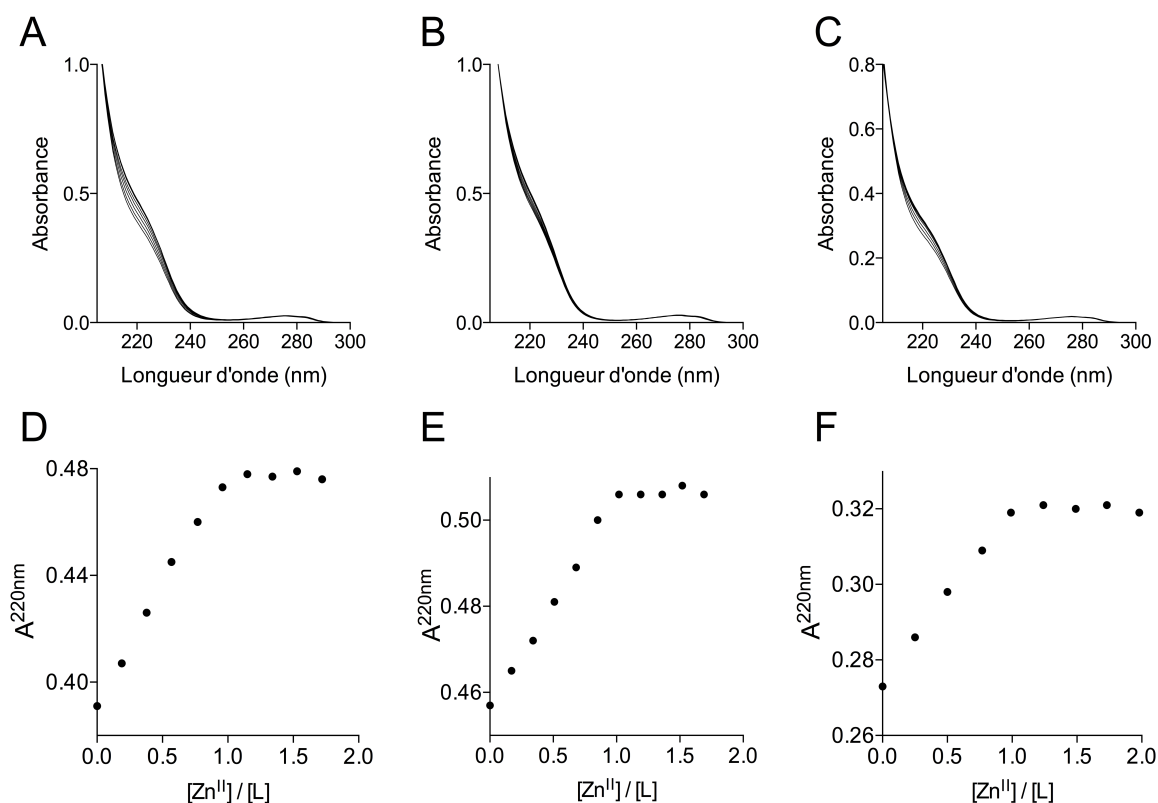


Figure B.IV.5 : Suivi en spectrophotométrie UV des titrages des peptides L_{ZAS} par ZnCl₂, en tampon phosphate 20mM pH 7,0 et en présence de 500μM de TCEP. De gauche à droite, les figures correspondent à L_{ZAS}(CHCC) (16μM), L_{ZAS}(HHCC) (19μM) et L_{ZAS}(AHCC) (13μM). L'évolution des spectres est présentée pour chaque peptide (A),(B),(C). L'apparition de la bande de transfert de charge est suivie à 220nm pour chaque peptide (D), (E) et (F).

L'intensité de cette bande de transfert de charge dépend du nombre de cystéines coordonnant le zinc. La différence de coefficient d'extinction molaire entre le complexe et le peptide libre $\Delta\epsilon^{220nm} = \epsilon^{220nm}_{ZnL} - \epsilon^{220nm}_L$, a été mesurée pour chaque peptide L_{ZAS} : $\Delta\epsilon^{220nm}$ (CHCC)= 14 000 M⁻¹.cm⁻¹, $\Delta\epsilon^{220nm}$ (HHCC)= 6450 M⁻¹.cm⁻¹ et $\Delta\epsilon^{220nm}$ (AHCC)= 9000 M⁻¹.cm⁻¹.

Ces valeurs sont cohérentes avec trois cystéines coordonnées dans ZnL_{ZAS}(CHCC) et deux cystéines coordonnées dans ZnL_{ZAS}(HHCC) et ZnL_{ZAS}(AHCC) : dans la famille CP1, $\Delta\epsilon^{220nm}$ = 6500-8700 M⁻¹.cm⁻¹ et $\Delta\epsilon^{220nm}$ = 15 500 M⁻¹.cm⁻¹ pour deux et pour trois cystéines coordonnées, respectivement [9].

Afin d'obtenir plus d'information quant à la première sphère de coordination du Zn²⁺ dans ce type de complexes, Co²⁺ est souvent utilisé^[9,13-15]. Cet ion métallique présente des

propriétés proches de celles de Zn²⁺. De plus, puisque sa couche d n'est pas pleine (d⁷) et que les transitions d-d dépendent de l'arrangement des ligands autour du métal, Co²⁺ est utilisé comme sonde spectroscopique des sites à zinc protéiques^[16].

Les titrages des peptides L_{ZAS} par [Co^{II}(H₂O)₆]²⁺ sont suivis par spectrophotométrie UV-Visible (Figure B.IV.6 (A), (B) et (C)). L'évolution des spectres lors des ajouts de Co²⁺ montre l'apparition de bandes de transfert de charge (vers 220-400nm), dues à la coordination de thiolate(s) au cobalt, et des bandes de transition d-d (dans la fenêtre 500-750nm), alors que dans nos conditions, le Co²⁺ hexahydraté n'absorbe pas entre 500 et 750nm. Le cobalt ajouté est donc complexé par les peptides L_{ZAS}.

Si l'on suit l'apparition des bandes d-d en fonction de la quantité de cobalt ajoutée (inserts A et B), les peptides L_{ZAS}(CHCC) et (HHCC) ont le même comportement : l'absorbance augmente linéairement jusqu'à 1 équivalent Co²⁺/L, puis décrit un plateau. De plus, cette évolution est identique pour les trois bandes de transition d-d. Il semble donc que ces peptides forment uniquement des complexes 1:1 Co²⁺/L.

En revanche, l'augmentation d'intensité des bandes d-d dans le titrage de L_{ZAS}(AHCC) (insert C) est différente de celle que l'on vient de décrire. D'abord, l'augmentation de A^{695nm} n'est pas tout à fait linéaire jusqu'à 1 équivalent, et, surtout, l'absorbance n'atteint de plateau que vers 1,6-2 équivalents. Néanmoins, la pente à l'origine et le plateau se coupent à 1 équivalent, ce qui semble indiquer la formation de complexe 1:1 Co²⁺/L. Mais, une autre bande d-d, à 660nm, évolue différemment de celle à 695nm (voir l'insert de la Figure B.IV.6 (C)). Ceci indique la présence de plusieurs espèces en solution. Nous ne sommes pas parvenus à déconvoluer les spectres afin d'identifier précisément les espèces en solution.

Le ligand en position 2 de L_{ZAS} est donc nécessaire pour éviter la formation de complexes de stœchiométries autres que 1:1 métal/peptide. En effet, sans lui, le complexe 1:1 a une constante de formation qui n'est pas suffisamment grande pour éviter les autres stœchiométries.

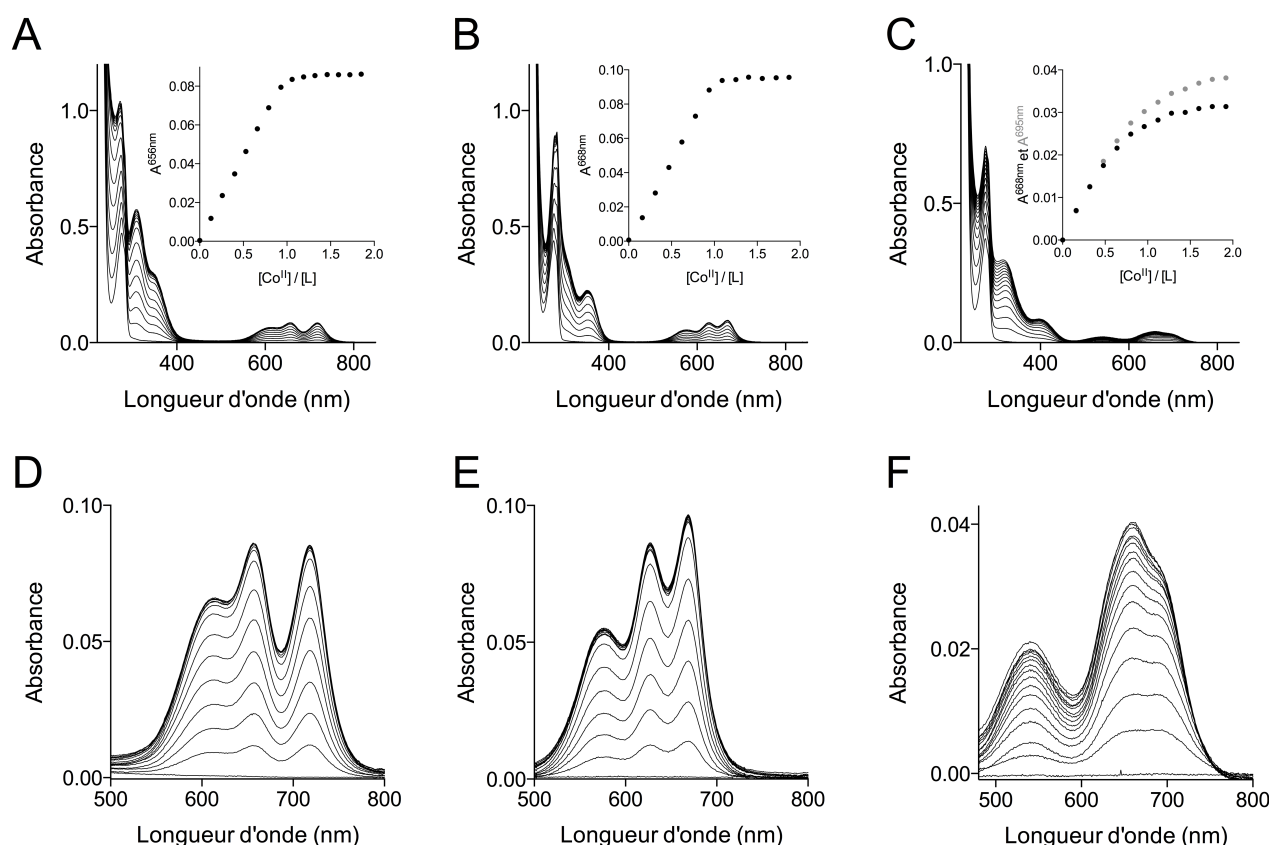


Figure B.IV.6 : Suivi en spectrophotométrie UV-Visible des titrages des peptides LZAS par Co²⁺, en tampon phosphate 20mM pH 7,0 et en présence de 500μM de TCEP. De gauche à droite, les figures correspondent à LZAS(CHCC) (130μM), LZAS(HHCC) (153μM) et LZAS(AHCC) (110μM). L'évolution des spectres est présentée pour chaque peptide (A),(B),(C) avec un suivi (insert) d'une bande de transition d-d aux alentours de 660nm. De plus, un agrandissement de la fenêtre correspondant aux bandes d-d est présenté pour chaque peptide (D), (E) et (F).

Dans la suite, nous allons nous intéresser à la géométrie du Co^{II} dans ces complexes 1:1. Or, comme il y a plusieurs espèces en mélange dans le cas de LZAS(AHCC), nous ne parlerons que des complexes formés par les peptides LZAS(CHCC) et LZAS(HHCC).

La bande d-d centrale est à $\lambda_{\text{max}}=656$ nm pour LZAS(CHCC), et à $\lambda_{\text{max}}=627$ nm LZAS(HHCC) (Figure B.IV.6 (D) et (E)), ce qui est cohérent avec 3 et 2 thiolates coordonnés, respectivement^[9,14]. De plus, le coefficient d'extinction molaire de ces bandes est supérieur à 300M⁻¹.s⁻¹ (560M⁻¹.s⁻¹ et 680M⁻¹.s⁻¹ respectivement), ce qui signifie que dans ces peptides, l'ion Co²⁺ est dans une géométrie tétraédrique.^[13]

Par analogie, ceci indique que dans les complexes ZnLZAS(CHCC) et (HHCC), le zinc est tétracoordiné par les quatre chaînes latérales Cys/His du peptide, dans une géométrie tétraédrique.

Ces peptides forment donc des complexes 1:1 avec l'ion Zn²⁺, mais, nous ne savons pas si cette complexation induit le bon repliement du peptide. Pour obtenir cette information, le

titrage des peptides par le zinc a été suivi en dichroïsme circulaire (CD) (Figure B.IV.7). Pour les trois peptides, le spectre du peptide libre indique que cette espèce est peu structurée (random coil) mais présentant un peu d'hélicité. En revanche, l'ajout de zinc induit l'apparition d'un fort signal d'hélice α . Ce signal augmente linéairement entre 0 et 1 équivalent de zinc, et atteint un plateau à 1 équivalent. De plus, les spectres présentent un point isodichroïque. Tout ceci semble indiquer qu'il n'apparaît qu'une seule nouvelle espèce lors du titrage, le complexe 1:1 Zn/L.

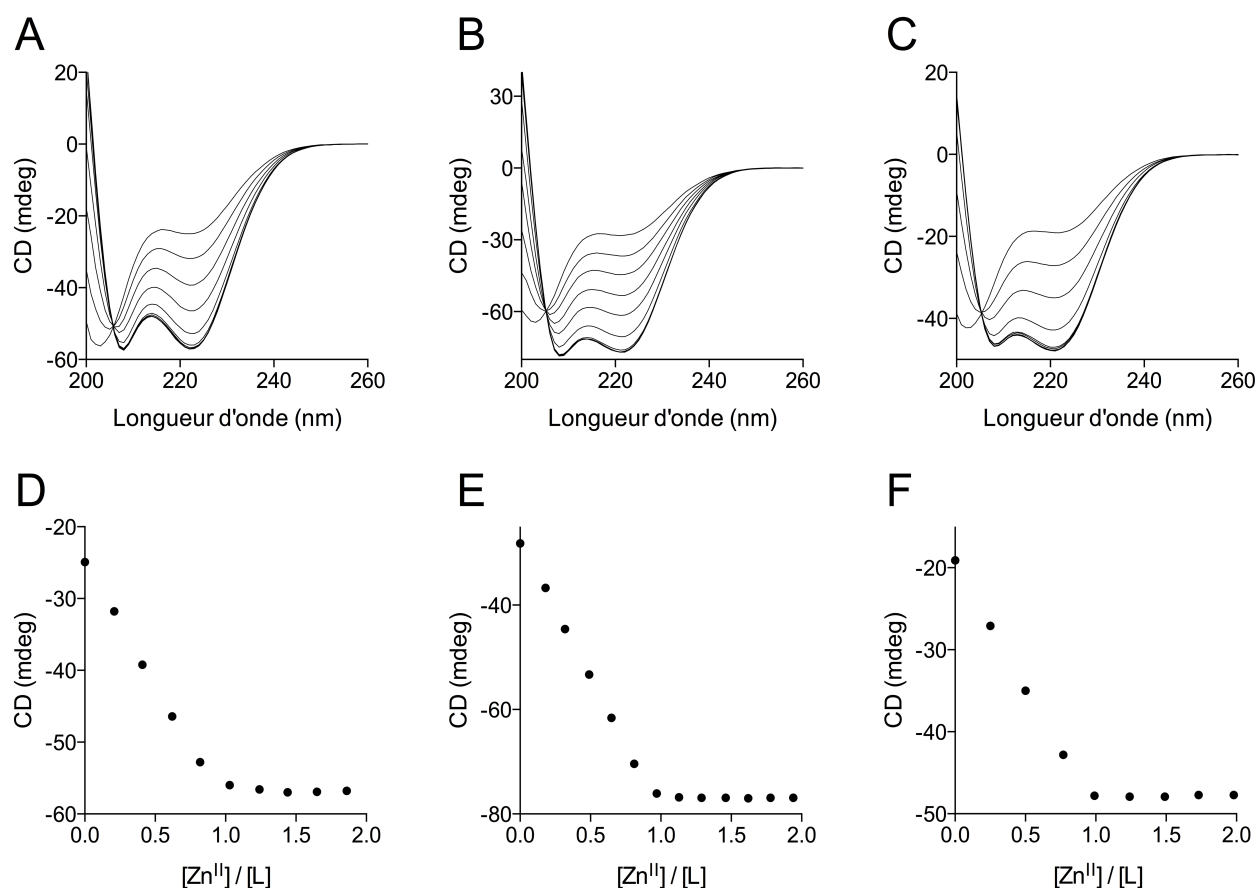


Figure B.IV.7 : Suivi en dichroïsme circulaire des titrages des peptides L_{ZAS} par ZnCl_2 , en tampon phosphate 20mM pH 7,0 et en présence de 500 μM de TCEP. De gauche à droite, les figures correspondent à $\text{L}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ (16 μM), $\text{L}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ (20 μM) et $\text{L}_{\text{ZAS}}(\text{AHCC})$ (13 μM). L'évolution des spectres est présentée pour chaque peptide (A),(B),(C). Un suivi de l'intensité autour de 220nm en fonction du nombre d'équivalents de zinc ajouté est présenté : à 223nm (D) ou à 221 (E).

Les spectres des complexes finaux ZnL_{ZAS} sont très similaires, ce qui indique qu'ils se replient de la même manière. Une autre similarité est observée sur les suivi du signal CD lors des ajouts de zinc (Figure B.IV.7 (D), (E) et (F)) : pour les trois peptides, la rupture de pente est très nette, ce qui témoigne d'une grande affinité du peptide pour le zinc. Ceci avait déjà été observé en absorption UV-Vis. Là encore, il est surprenant que le peptide $\text{L}_{\text{ZAS}}(\text{AHCC})$, ne

possédant que trois ligands du zinc, se comporte comme les deux autres, possédant un quatrième ligand. Ceci nous apprend que les trois ligands conservés H-X₃-C-X₂-C et les acides aminés du cœur hydrophobe sont suffisants pour replier correctement le domaine en présence de zinc. Il est probable que la coordination des chaînes latérales HCC forme le coude entre les hélices 2 et 3 et induise leur repliement en hélices α , ce qui pré-forme le cœur hydrophobe, que viennent compléter les chaînes latérales hydrophobes de l'hélice 1 lui induisant alors son repliement en hélice α .

Pour les peptides précédemment étudiés au laboratoire, la constante de complexation, correspondant à la formation du complexe 1:1 Zn^{II}/L, a été déterminée par compétition avec un complexant du zinc dont l'affinité est bien connue. Cependant, pour obtenir une mesure fiable, il est nécessaire de laisser au système peptide/compétiteur/zinc le temps de s'équilibrer. De plus, il faut aussi, qu'en mélange métal/peptide 1:1, la fraction de peptide métallée soit comprise entre 0.2 et 0.8^[17,18]. L'affinité de l'EDTA pour le zinc ($K_{app\ pH7} = 13,1$) est trop faible pour que, avec L_{ZAS}(CHCC) et L_{ZAS}(HHCC), notre système soit dans cette fenêtre. Nous avons donc utilisé un compétiteur plus fort, le TPEN ($K_{app\ pH7} = 14,9$). L'équilibre se fait sur un temps long. Malheureusement, pour les peptides L_{ZAS}, nous avons observé que le signal CD du peptide libre disparaît avec le temps : le signal diminue en intensité sur la totalité du spectre. Ce signal n'est pas restauré par l'ajout d'un excès de zinc : le point isodichroïque est perdu. Lorsque la concentration est supérieure à $\sim 30\mu\text{M}$, la précipitation du peptide est visible à l'œil nu. Le peptide libre a donc tendance à s'agréger, tandis que le complexe de zinc reste soluble. Ceci nous a donc empêché de déterminer la valeur des constantes de formation de nos complexes.

Toutefois, afin de l'estimer grossièrement, en évitant les problèmes d'agrégation, nous avons fait un mélange L_{ZAS}/EDTA 1:1. Les spectres CD ont été enregistrés avant et après l'ajout d'un équivalent de Zn²⁺. Les spectres obtenus sont présentés Figure B.IV.8. Dans ces conditions, les peptides L_{ZAS}(CHCC) et (HHCC) sont métalés à $\approx 95\%$, tandis qu'à peine $\approx 5\%$ du peptide L_{ZAS}(AHCC) l'est. Or, à pH 7,0, la constante de complexation du zinc par l'EDTA est de $10^{13,1}$. On en déduit que la constante de formation de ZnL_{ZAS}(AHCC) est au moins 10 fois inférieure à celle de l'EDTA ($K_{app} \leq 10^{12}$), tandis que celle des complexes ZnL_{ZAS}(CHCC) et (HHCC) est au moins 10 fois supérieure à celle de l'EDTA ($K_{app} \geq 10^{14}$).

La présence du 4^{ème} ligand du zinc, His ou Cys en position 2, est donc capitale pour l'affinité du peptide pour le zinc : sa mutation entraîne la perte d'au moins 2 ordres de grandeur de la constante de formation du complexe 1:1 Zn^{II}/L.

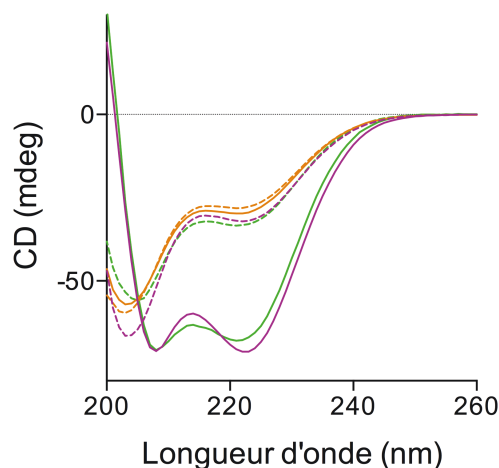


Figure B.IV.8 : Compétitions $L_{ZAS}/EDTA$ pour la chélation de Zn^{2+} . Les spectres des peptides $L_{ZAS}(CHCC)$ (violet), $L_{ZAS}(HHCC)$ (vert) et $L_{ZAS}(AHCC)$ (orange) ont été enregistrés avant (pointillés) et après (traits pleins) ajout d'un équivalent de $ZnCl_2$, en présence d'un équivalent d'EDTA.

Les spectres RMN 1H des complexes ZnL_{ZAS} ont été enregistrés. D'abord, sur les spectres 1D (Figure B.IV.9 (A)), les signaux des protons amides de la chaîne principale sont fins et bien définis pour les complexes $ZnL_{ZAS}(CHCC)$ et $(HHCC)$, ce qui indique qu'ils adoptent une conformation stable. En revanche, pour le complexe $ZnL_{ZAS}(AHCC)$, ces pics sont larges et peu résolus, ce qui résulte probablement d'un équilibre entre plusieurs conformations. Ce complexe n'a donc pas de conformation stable. La structure du complexe $ZnL_{ZAS}(CHCC)$ en solution (Figure B.IV.9 (B)) a été résolue par Olivier Sénèque à partir des spectres 2D (TOCSY, COSY et NOESY). Bien que la structure cristallographique du domaine ZAS qui nous sert de référence soit celle de ChrR, qui est de formule HHCC, elle se superpose très bien à la structure RMN de $ZnL_{ZAS}(CHCC)$ (chaîne principale) (Figure B.IV.9 (C)). La résolution de la structure de $ZnL_{ZAS}(HHCC)$ est en cours. Les déplacements chimiques indiquent déjà que le repliement global est identique.

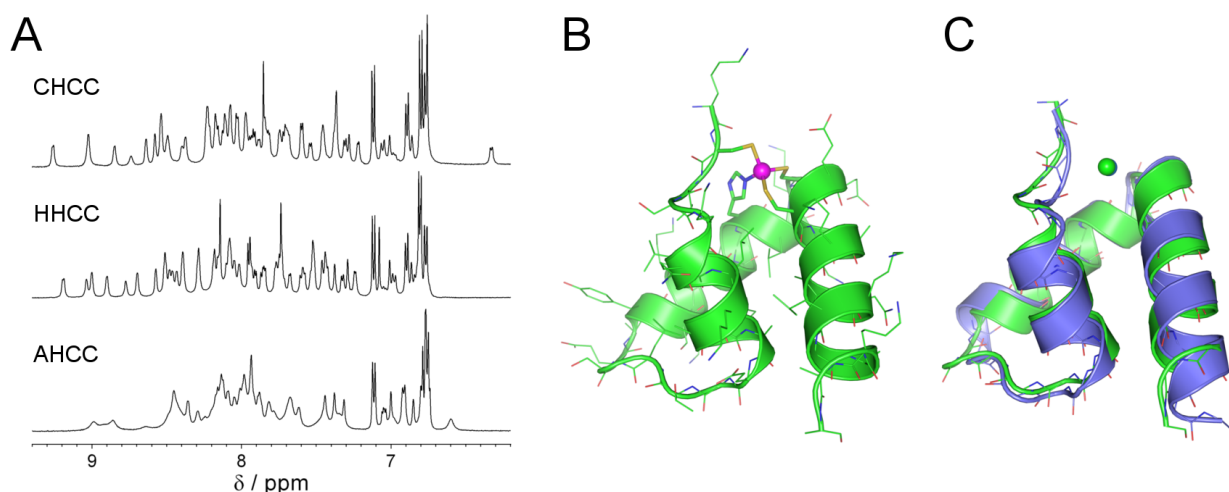


Figure B.IV.9 : RMN ^1H (500MHz) des complexes ZnL_{ZAS} . (A) Spectres RMN ^1H réduits à la fenêtre des signaux des protons NH de la chaîne principale, pour chacun des trois complexes ZnL_{ZAS} . (B) Structure du complexe $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ résolue à partir des spectres ^1H NOESY et TOCSY. (C) Superposition de la structure RMN de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ et de la structure cristallographique de ChrR (PDB code : 2Q1Z).

Finalement, comme nous l'avons déjà évoqué, les liaisons hydrogène impliquant les soufres du site à zinc de ChrR doivent être reproduites dans nos modèles.

Dans la structure cristallographique de ChrR, la liaison N-H de l'azote (N-ter) de la Cys34 pointe vers le soufre de la Cys31, et la distance N-S est de 3,45Å. Cette distance est de 3,6Å dans la structure de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$, ce qui indique que la liaison hydrogène est établie.

Les complexes $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ et $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ sont donc de bons modèles structuraux des sites doigt de zinc de type ZAS.

2.3. Réactivité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène

Nous allons ici nous baser sur des études déjà menées au laboratoire, portant sur la réactivité d'autres modèles de doigts de zinc vis-à-vis de H_2O_2 . Cette réactivité a été caractérisée en termes de produits, de mécanisme et de cinétique d'oxydation, et ce, avec les différents types de sites (2, 3 et 4 cystéines)^[19,20].

Pour un modèle à deux cystéines, la réaction est simple : l'une des deux cystéines attaque une molécule d' H_2O_2 pour former un acide sulfénique, qui se fait immédiatement attaquer par la deuxième cystéine, formant un pont disulfure. L'étape cinétiquement déterminante est la formation de l'acide sulfénique^[19]. En revanche, avec un modèle à trois cystéines, le mécanisme se complique un peu car une fois deux cystéines oxydées en disulfure, il en reste une, susceptible de s'oxyder par la suite. Bourlès et al.^[19] ont montré que l'ajout

d'EGTA dans le milieu permet de démetaliser l'espèce mono-disulfure, mais pas le complexe initial. Ainsi, l'oxydation de la troisième cystéine se fait plus rapidement que celle des deux premières (qui, cinétiquement, correspond à la formation du premier acide sulfénique). D'un point de vue cinétique cela simplifie grandement le système : seule la première oxydation, cinétiquement déterminante, est visible.

Le mode opératoire ayant permis de suivre l'oxydation des autres modèles par H_2O_2 , a été appliqué aux modèles L_{ZAS} . D'abord, un suivi cinétique de la disparition de la bande de transfert de charge thiolate- $\rightarrow\text{Zn}^{2+}$ a été effectué pour les deux modèles. Pour $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$, le signal présentait une décroissance mono-exponentielle, comme attendu pour l'oxydation d'un modèle $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$. Pour $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$, nous avons dû ajouter de l'EGTA au milieu pour simplifier le système (voir plus haut) et observer une décroissance mono-exponentielle (Figure B.IV.10 (A)).

Cependant, dans le cas de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$, l'absorbance à 220nm présentait une dérive, très visible après la fin de l'oxydation, difficilement quantifiable, faussant les mesures. Celle-ci est peut-être due à une précipitation du peptide oxydé. Aussi, nous avons utilisé un complexant colorimétrique du zinc, le PAR (voir partie expérimentale), afin de suivre l'expulsion du Zn^{2+} du peptide provoquée par l'oxydation des cystéines en disulfure (Figure B.IV.10 (B)).

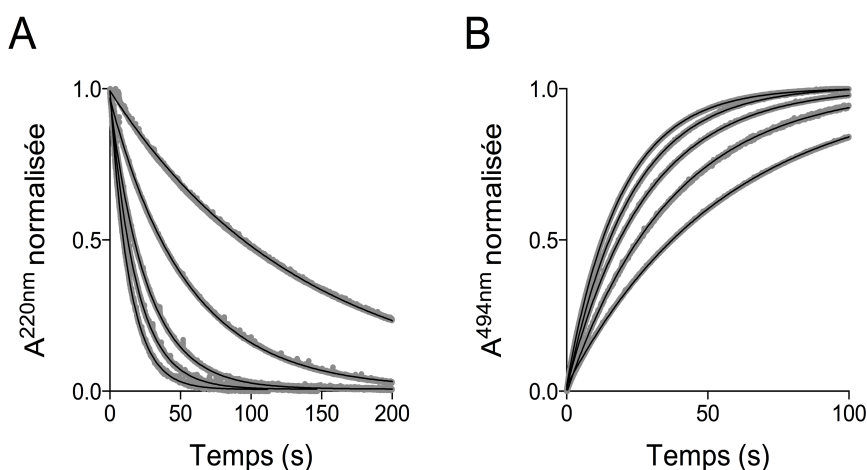


Figure B.IV.10 : Suivi de l'oxydation de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ (A) et $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ (B) par H_2O_2 (à différentes concentrations) par spectrophotométrie UV-Vis. Les peptides (20 μM) ont été oxydés à 25°C dans 20mM Pi pH 7,0, avec des concentrations de H_2O_2 allant de 1 à 30 mM. L'oxydation de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ est suivie en observant la disparition de la bande de transfert de charge (LMCT) à 220nm. Dans ce cas-là, il y a 100 μM d'EGTA dans la solution. L'oxydation de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ est suivie en observant la complexation du Zn^{2+} par le PAR, à 494nm. Les points expérimentaux sont indiqués en gris, tandis que les courbes noires correspondent aux simulations (voir texte ci-dessous).

Puisque la réaction cinétiquement déterminante (formation de l'acide sulfénique) est bimoléculaire, la vitesse de disparition du complexe initial s'écrit :

$$-\frac{d[\text{ZnL}]}{dt} = k \cdot [\text{ZnL}] \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (1)$$

Or, dans nos conditions, la concentration en H₂O₂ est au moins 50 fois supérieure à celle du complexe. Nous pouvons considérer que la concentration de H₂O₂ reste constante durant la réaction. L'équation (1) peut dès lors s'écrire :

$$-\frac{d[\text{ZnL}]}{dt} = k_{obs} \cdot [\text{ZnL}] \quad (2)$$

$$\text{avec } k_{obs} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (3)$$

Ainsi, en intégrant, nous obtenons :

$$[\text{ZnL}]_t = [\text{ZnL}]_0 \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) \quad (4)$$

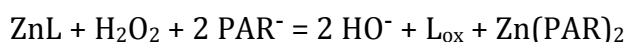
Or, puisque la concentration de complexe est directement proportionnelle à l'intensité de la bande de transfert de charge :

$$A^{220nm} = (A^{220nm}_0 - A^{220nm}_\infty) \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) + A^{220nm}_\infty \quad (5)$$

Pour ZnL_{ZAS}(HHCC), on ne suit pas directement la disparition du complexe initial, mais la libération du zinc. Or,



De plus, la formation du complexe Zn(PAR)₂ est rapide ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[21,22] devant la réaction d'oxydation. Alors, on peut écrire,



Par conséquent, la vitesse de disparition du complexe ZnL est égale à la vitesse d'apparition du complexe Zn(PAR)₂ :

$$-\frac{d[\text{ZnL}]}{dt} = k \cdot [\text{ZnL}] \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{d[\text{Zn}(\text{PAR})_2]}{dt} \quad (6)$$

Aussi, les données expérimentales sont simulées avec l'équation (7), déterminée en appliquant à l'équation (6) le même raisonnement que pour l'obtention de l'équation (5).

$$A^{494nm} = (A^{494nm}_\infty - A^{494nm}_0) \cdot \exp(k_{obs} \cdot t) + A^{494nm}_0 \quad (7)$$

Dans les deux cas (ZnL_{ZAS}(CHCC) et ZnL_{ZAS}(HHCC)), l'évolution du signal a pu être simulée par une mono-exponentielle à l'aide des équations (5) et (7).

Nos hypothèses sont confirmées par la Figure B.IV.11, où l'on voit que la constante de décroissance de l'exponentielle observée, évolue linéairement avec la concentration en H₂O₂. De plus, la pente de cette droite correspond à la constante cinétique du second ordre de la réaction à 298K :

$$\frac{k_{obs}}{[H_2O_2]} = k \quad (8)$$

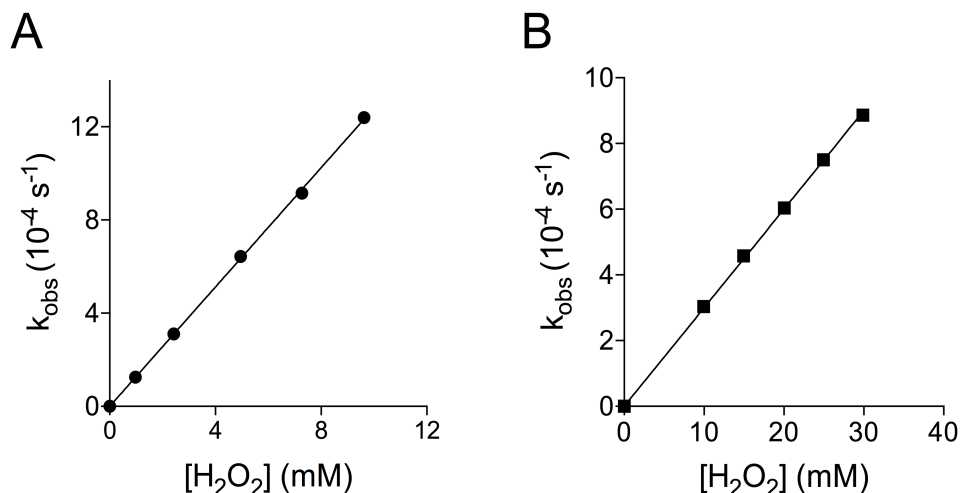


Figure B.IV.11 : Détermination de la constante cinétique d'oxydation (k_{298}) de $ZnL_{ZAS}(CHCC)$ (A) et $ZnL_{ZAS}(HHCC)$ (B) par H_2O_2 à 25°C, par régression linéaire des k_{obs} obtenus Figure B.IV.10 en fonction de la concentration en H_2O_2 .

Pour $ZnL_{ZAS}(CHCC)$ et $ZnL_{ZAS}(HHCC)$ nous obtenons, respectivement $k_{298K} = 0,13$ et $0,03 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. La valeur pour $ZnL_{ZAS}(CHCC)$ a été confirmée par un suivi au PAR, dans les conditions de mesure de $ZnL_{ZAS}(HHCC)$.

De cette manière, les constantes cinétiques d'oxydation de $ZnL_{ZAS}(CHCC)$ et $(HHCC)$ ont été déterminées pour plusieurs températures. Ces données ont permis de tracer le diagramme d'Eyring-Polanyi pour chacun des complexes, en utilisant l'équation :

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} + \left(\ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right) \quad (9)$$

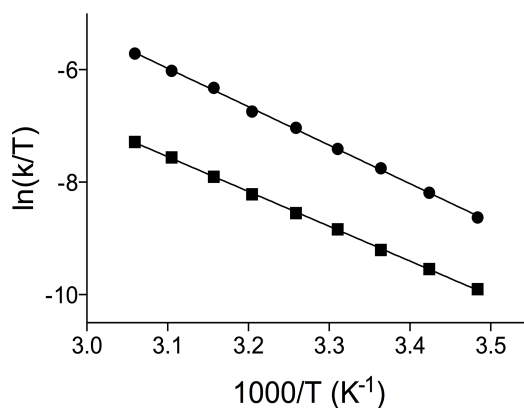


Figure B.IV.12 : Diagramme d'Eyring-Polanyi correspondant à l'oxydation de ZnL_{ZAS}(CHCC) (●) et ZnL_{ZAS}(HHCC) (■) par H₂O₂. Les points expérimentaux sont simulés avec une droite théorique d'équation (9).

De ces diagrammes, sont extraits les paramètres d'activation de la réaction d'oxydation (formation d'un acide sulfénique par réaction d'H₂O₂ sur le complexe) présentés dans le Tableau B.IV.1. Ces valeurs seront commentées plus tard dans la discussion.

	k_{298} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	$\Delta H^\ddagger$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)
ZnL _{ZAS} (HHCC)	0,03±0,003	51,4±0,4	-101±4
ZnL _{ZAS} (CHCC)	0,13±0,01	56,9±0,7	-71±3

Tableau B.IV.1 : Oxydation des ZnL_{ZAS} par H₂O₂ : cinétique à 298K et paramètres d'activation.

2.4. Réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet

Les études de réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet ont été entamées avec le modèle ZnL_{ZAS}(HHCC) car il modélise le site de ChrR. Tout d'abord le complexe peptidique a été oxydé en utilisant le rose bengal (à pD 7) comme photo-sensibilisateur. On observe, en HPLC (Figure B.IV.13), l'apparition d'un seul nouveau pic, même si l'oxydation est poussée.

Notons que nous nous sommes confrontés aux mêmes problèmes d'interaction rose bengal/ZnL qu'avec ZnCP1 : précipitation à fortes concentrations, et décoloration de la solution avec le temps, à plus faibles concentrations. Par conséquent, la suite des études a été conduite en utilisant le bleu de méthylène à pD 8.

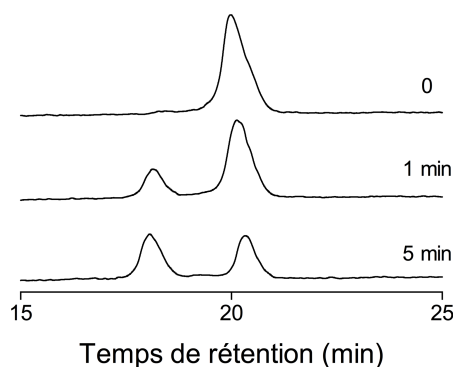


Figure B.IV.13 : (A) Oxydation de ZnL_{ZAS}(HHCC) par l'oxygène singulet suivie par HPLC. Un mélange de 60μM ZnL_{ZAS}(HHCC) et 2μM Rose bengal dans D₂O (~92%) tamponné par 20mM Pi pD 7,0. Le temps d'irradiation est indiqué au dessus de chaque chromatogramme.

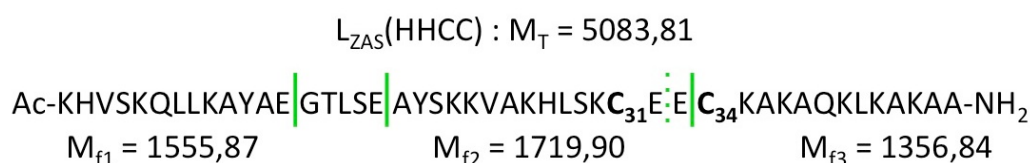
Ces deux pics ont été récoltés en HPLC et analysés en spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation (ESI-MS). Dans ces conditions, le pic le plus intense correspond au peptide chargé 7+, c'est pourquoi, dans la suite, c'est de ce pic que nous parlerons.

Pour le pic HPLC le moins retenu sur la colonne ($t_r=18,1\text{min}$), le spectre de masse montre un massif intense dont le premier pic (mono-isotopique) est $m/z=731,8(7+)$. Cela correspond à un gain de 32 unités de masse par rapport au peptide initial ($727,2(7+)$), ce qui est compatible avec l'oxydation d'une cystéine en acide sulfinique. De plus, deux autres massifs, moins intenses sont observés : $734,1(7+)$ et $736,4(7+)$, soit un gain de 48 et 64 unités de masse, respectivement. Ces produits sont vraisemblablement des sur-oxydations : de l'acide sulfinique (+2 O) en acide sulfonique (+3 O), et de l'espèce mono-sulfinate en une espèce bi-sulfinate.

Pour le pic HPLC le plus retenu sur la colonne ($t_r=20,3\text{min}$), le spectre de masse montre un pic $m/z=727,2(7+)$, correspondant au peptide initial, et deux pics moins intenses à $731,8(7+)$ et $729,3(7+)$. Nous venons de voir que le premier suggère la présence d'un sulfinate. Le deuxième correspond à un gain de 14 unités de masse, ce qui indique l'ajout d'un atome d'oxygène, et la perte de deux atomes d'hydrogène. Ce décalage étant faible, il est préférable de regarder de plus près le massif d'une espèce moins chargée. Dans ce cas, le pic de l'espèce oxydée est $m/z=1020,6(5+)$ et celui du peptide réduit est $m/z=1017,8(5+)$. La différence de masse est donc bien de 14Da. Ce bilan peut résulter de la formation d'un thiosulfinate ou de l'oxydation d'une histidine suivie d'un pontage avec une chaîne latérale nucléophile (voir l'introduction du Chapitre B.III). Un traitement du produit à la TCEP n'a pas fait disparaître ce pic, alors que ce réducteur réduit les thiosulfates en thiols. Ceci suggère qu'une partie de l'oxydation du complexe par l'oxygène singulet s'est faite sur les histidines.

Nous n'observons pas de peptide portant seulement un ajout de 16 unités de masse, ce qui suggère que les tyrosines de nos modèles n'ont pas été oxydées par l'oxygène singulet.

Bien que chaque pic HPLC soit un mélange de produits, nous avons essayé d'identifier les sites d'oxydation en digérant les pics isolés par la Glutamate carboxy-peptidase (Schéma B.IV.2). Le Tableau B.IV.2 rassemble les pics de masse détectés de chaque fragment, dans les deux pics HPLC.



	f1	f2	f3
Pic tr=18,1min	1554,6(1-) 776,8(2-)	1750,8(1-) 874,8(2-)	1403,5(1-) 1387,6(1-) 1355,7(1-)
Pic tr= 20,3min	1554,7(1-)	1719,8 (1-) 861,6(2-)	1387,7(1-) 1357,8(1+)

Tableau B.IV.2 : Analyse en spectrométrie de masse (ESI-MS) de la digestion (GluC) des produits d'oxydation de ZnL_{ZAS}(HHCC) par ¹O₂. Les pics « m/z (charge) » sont indiqués en noir lorsqu'ils correspondent au fragment initial, en rouge pour un ajout de 2 atomes d'oxygène, et en bleu pour un ajout de 3 atomes d'oxygène. Ces masses sont les maxima des massifs isotopiques.

D'abord, la masse du fragment f1 est détectée dans les deux pics HPLC. Des masses correspondant à des adduits d'oxygène sur ce fragment ne sont pas détectées. Ceci signifie que ni l'histidine 2, ni la tyrosine 11 n'ont été oxydées par ¹O₂.

Le fragment f2 est détecté dans le pic HPLC à tr=20,3min, à une masse correspondant au peptide réduit. En revanche, ce fragment n'est détecté dans le pic HPLC à tr=18,1min qu'à une masse 32 Da plus élevée que le fragment réduit. De plus, si on fragmente ce pic en spectrométrie de masse en tandem, on observe le départ de 66 Da, la masse du groupement SO₂H₂. Ainsi, dans le pic HPLC à tr=18,1min, on trouve du peptide dont la cystéine 31 est oxydée en acide sulfinique.

Le cas du fragment f3 est un peu plus complexe. D'abord, notons que chaque pic HPLC, la masse de f3 réduit et la masse de f3+32 Da sont détectées. Ceci signifie que chaque pic

HPLC est un mélange de deux peptides : la cystéine 34 est réduite dans l'un, et oxydée en acide sulfinique dans l'autre. De plus, une masse avec un ajout de 48 Da est détectée. Cette masse correspond à un acide sulfonique. Elle provient de la suroxydation de l'acide sulfinique.

Ainsi, le mélange de peptide de chaque pic HPLC est reconstruit à partir des fragments détectés (Schéma V.3).

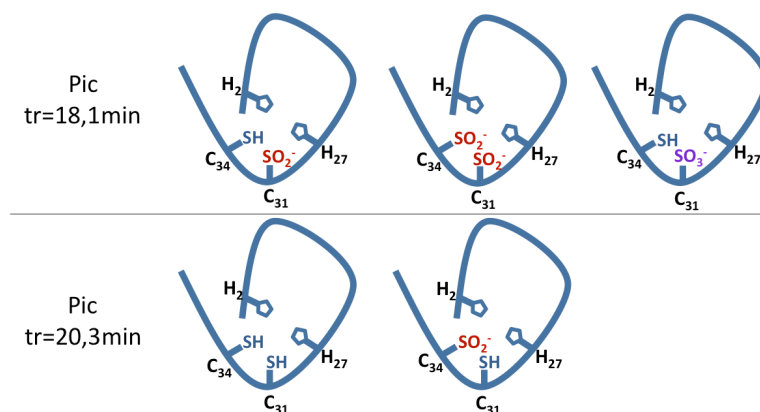


Schéma B.IV.3 : interprétation schématique des espèces présentes dans chaque pic HPLC, d'après les études en spectrométrie de masse.

Notons que parmi les espèces représentées Schéma B.IV.3, deux sont des suroxydations : le peptide portant un acide sulfonique, et celui portant deux acides sulfiniques. Elles correspondent respectivement aux adduits +3 O et +4 O détectés en spectrométrie de masse (voir plus haut) avant la digestion des peptides.

Ainsi, les produits primaires de l'oxydation de $ZnL_{ZAS}(HHCC)$ par l'oxygène singulet sont les deux espèces mono-sulfinate, l'une portant l'acide sulfinique sur la cystéine 31, l'autre, sur la cystéine 34. Reste à savoir à quelle vitesse ces produits apparaissent.

Comme pour les modèles ZnL_{TC} et $ZnCP1$ (voir Chapitres B.II et B.III), le k_R de $ZnL_{ZAS}(HHCC)$ est mesuré par compétition avec EGWKG (Figure B.IV.14). La disparition de $ZnL_{ZAS}(HHCC)$ et celle de EGWKG sont quantifiées en mesurant l'aire sous leur pic, sur les chromatogrammes correspondant aux différents temps d'irradiation.

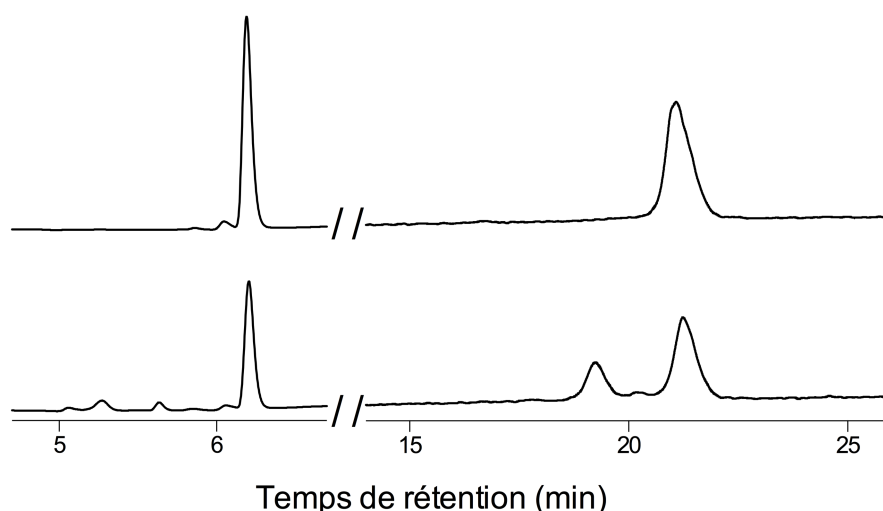


Figure B.IV.14: Photo-oxydation compétitive de ZnL_{ZAS}(HHCC) et EGWGK. Un mélange de 50μM ZnL_{ZAS}(HHCC), 50μM EGWGK et 1μM Bleu de Méthylène dans 20mM Pi pD 8,0 (D₂O) est analysé en HPLC avant (chromatogramme haut) et après (chromatogramme bas) 20 secondes d'irradiation. (Remarque : les temps de rétention sont légèrement décalés par rapport à ceux de la Figure B.IV.15. car la méthode de séparation diffère légèrement)

Cependant, puisqu'ici un des produits d'oxydation de ZnL_{ZAS}(HHCC) co-élue avec celui-ci, la quantification par HPLC sous-estime la disparition de ZnL_{ZAS}(HHCC), ce qui aura pour effet de sous-estimer son k_R . Autrement dit, ce que nous avons obtenu est une valeur limite inférieure : $k_R \text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC}) \geq 3,9.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

En ce qui concerne l'étude de la réactivité de ZnL_{ZAS}(CHCC) par ¹O₂, les produits d'oxydation n'ont pas été caractérisés. Néanmoins, le chromatogramme du complexe oxydé présente un profil proche de celui de ZnL_{ZAS}(HHCC) : on ne voit qu'un pic apparaître, avant celui du peptide initial. Des oxydations compétitives entre ZnL_{ZAS}(CHCC) et EGWGK ont été réalisées dans les conditions précédemment mises au point avec ZnL_{ZAS}(HHCC) (Figure B.IV.15).

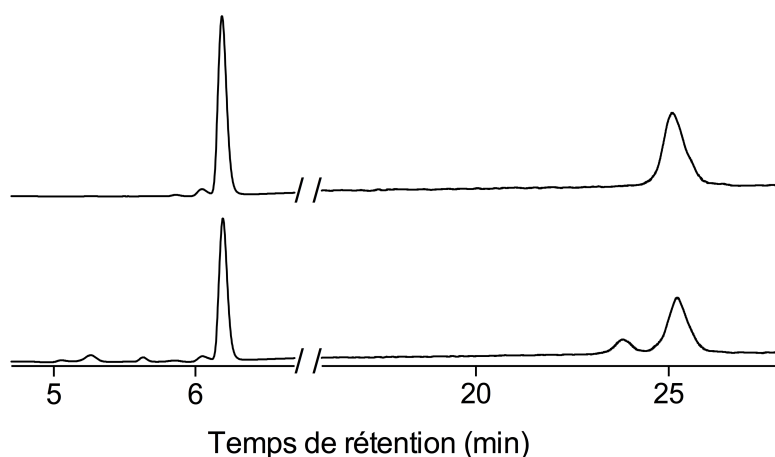


Figure B.IV.15: Photo-oxydation compétitive de ZnL_{ZAS}(CHCC) et EGWGK. Un mélange de 50μM ZnL_{ZAS}(HHCC), 50μM EGWGK et 1μM Bleu de Méthylène dans 20mM Pi pD 8,0 (D₂O) est analysé en HPLC avant (chromatogramme haut) et après (chromatogramme bas) 20 secondes d'irradiation.

De la même manière que pour ZnL_{ZAS}(CHCC), le k_R déduit de ces expériences est une limite inférieure de la vitesse d'oxydation de ZnL_{ZAS}(CHCC) par ¹O₂. Ainsi, $k_R \text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC}) \geq 5,9.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

3. Discussion

3.1. Conception du modèle et structure

Les modèles ZnL_{ZAS} reproduisent bien la structure des sites doigt de zinc des ZAS : la structure de ZnL_{ZAS}(CHCC) se superpose de manière satisfaisante à la structure cristallographique du site de ChrR.

Cependant, ces modèles linéaires sont beaucoup plus longs (environ deux fois plus) que les autres modèles utilisés (CP1, L_{TC} et L_{Hsp}). Au regard des aspects pratiques, ceci les place entre les protéines et les modèles peptidiques courts (~20 acides aminés), et l'on perd certains avantages qu'offrent les modèles peptidiques :

- les peptides L_{ZAS} sont moins stables en solution que les peptides courts (tendance à l'agrégation). Ceci nous a notamment empêché de mesurer leur constante de complexation de Zn²⁺.

- la séparation par HPLC devient plus difficile : les L_{ZAS} sont plus retenus sur la colonne, ce qui augmente le temps d'analyse, et, comme nous l'avons vu, les produits d'oxydation sont aussi très mal séparés.
- la résolution de la structure RMN des complexes a été faite par Olivier Sénèque car les spectres sont plus complexes à interpréter que pour les peptides courts.

Ces peptides possèdent un cœur hydrophobe important, permettant de bien maintenir la cohésion des hélices α . Ce cœur hydrophobe est aussi une force motrice du repliement du peptide : lorsque seuls trois ligands proches H-C-C sont présents ($\text{L}_{\text{ZAS}}(\text{AHCC})$), l'hélice la plus proche du N-ter, ne possédant aucun acide aminé coordonnant le zinc, se structure lors de la chélation du zinc par le peptide. Cependant, l'affinité du peptide pour le zinc, ainsi que la stabilité de conformation du complexe, sont diminués par rapport aux peptides $\text{L}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ et $\text{L}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$.

Cela se reflète dans la protéine entière. En effet, si ce quatrième ligand, loin du motif conservé, est muté chez RsrA et ChrR, ces protéines ne sont plus capables de séquestrer leur facteur σ cible *in vivo*^[1,23].

3.2. Réactivité vis-à-vis de H_2O_2 , comparaison avec les autres modèles

Nous avons mesuré les vitesses d'oxydation de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ et $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ par H_2O_2 . A 25°C, elles sont, respectivement, de $0,13 \pm 0,01$ et $0,03 \pm 0,003 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ces vitesses sont très proches de celles déjà été décrites pour des modèles à deux et trois cystéines (Figure B.IV.16).

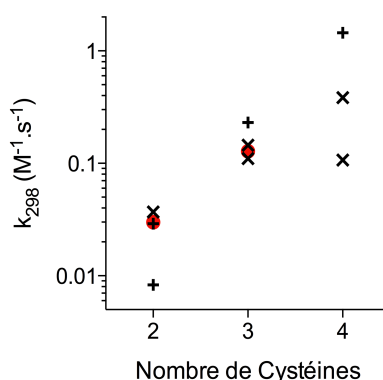


Figure B.IV.16 : Vitesses d'oxydation à 298 K de modèles doigts de zinc ZnL par H_2O_2 (Isaac et al) en fonction du nombre de cystéines coordonnées. Les peptides de la famille CP1 sont indiqués par des +, ceux de la famille L_{Hsp} sont indiqués par des x, ceux de la famille L_{ZAS} sont représentés par des ronds rouges.

Ces études ont montré que plus un peptide est flexible, plus il réagit vite avec H_2O_2 . Par exemple, les complexes $\text{ZnCP1-}\Delta 8(\text{CCHH})$ et $\text{ZnL}_{\text{Hsp}}(\text{CCHH})$ présentent un spectre RMN ^1H avec des pics très mal définis. Ceci a été interprété comme étant dû à un équilibre entre plusieurs conformations^[9,24]. Avec H_2O_2 , ces deux peptides, réagissent 3 à 4 fois plus vite que le complexe $\text{ZnCP1}(\text{CCHH})$ qui, lui, possède une conformation stable (signaux RMN bien définis). Il est troublant de voir que $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ a une vitesse similaires à celles de $\text{ZnCP1-}\Delta 8(\text{CCHH})$ et $\text{ZnL}_{\text{Hsp}}(\text{CCHH})$, alors qu'il présente des signaux bien définis en RMN, comme $\text{ZnCP1}(\text{CCHH})$.

Si l'on s'intéresse aux paramètres d'activation de la réaction, on voit qu'en passant d'un site $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$ à une site $\text{Zn}(\text{Cys})_3(\text{His})_1$, on observe :

- une baisse de l'enthalpie d'activation (passant de 63 à 52,5 kJ.mol^{-1} en moyenne)
- une augmentation de l'entropie d'activation (passant de -65 à -84 $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ en moyenne).

Or, lorsque l'on regarde l'évolution de ces paramètres en passant de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ à $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$, on observe (Diagramme B.IV.1) :

- une augmentation de l'enthalpie d'activation (de 51,4 à 56,9 kJ.mol^{-1})
- une baisse de l'entropie d'activation (de -101 à -71 $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)

Ainsi, au sein de la famille L_{ZAS} , les paramètres d'activation varient dans le sens opposé à ce qui a été observé pour les familles CP1 et L_{Hsp} .

De plus, nous pouvons remarquer que les paramètres d'activation de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ sont assez inhabituels : une enthalpie d'activation plus favorable encore que pour un modèle à trois cystéines, mais, une pénalité entropique très forte (-101 $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$). Nous n'avons pas d'explication à cela.

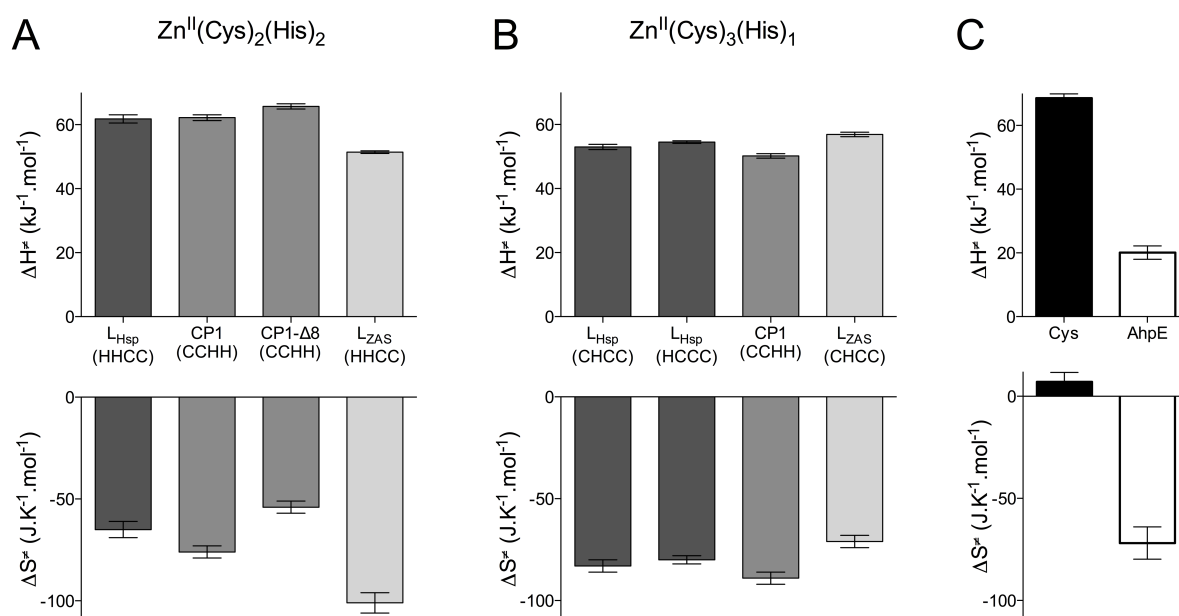


Diagramme B.IV.1 : Paramètres d'activation de l'oxydation par H₂O₂ de modèles peptidiques de type Zn(Cys)₂(His)₂ (A) et Zn(Cys)₃(His) (B).^[24] Ceux d'un cystéinate libre et d'une peroxyredoxine (*MtAhpE*) (C) à 25°C sont montrés à titre de comparaison^[25].

Finalement, lorsque l'on compare ces paramètres d'activation à ceux d'un cystéinate libre et ceux d'une peroxyrédoxine (Diagramme B.IV.1 C), il apparaît pourquoi les doigts de zinc réagissent plus lentement que ces deux espèces avec H₂O₂. La pénalité entropique mesurée pour la peroxyrédoxine (-71,9 J.K⁻¹.mol⁻¹) est de l'ordre de celle trouvée pour les sites Zn(Cys)₂(His)₂. Elle reflète la contrainte exercée sur l'état de transition. Cependant, dans le cas de la peroxyrédoxine, l'enthalpie d'activation est abaissée fortement par rapport à la réaction avec le cystéinate libre : passant de 68,6 kJ.mol⁻¹ à seulement 20,1 kJ.mol⁻¹. Ce n'est pas le cas des doigts de zinc, où l'état de transition n'est pas optimisé pour favoriser la réaction : l'enthalpie d'activation ne descend pas en dessous de 50 kJ.mol⁻¹ et il y a une forte pénalité entropique.

Ainsi, les doigts de zinc cumulent un état de transition contraint et une réaction non-facilitée.

3.3. Réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet

L'oxydation de ZnL_{ZAS}(HHCC) par ¹O₂ produit très majoritairement des acides sulfiniques, ce qui est en accord avec ce qui a été obtenu avec les modèles ZnL_{TC} et ZnCP1.

Néanmoins, des études plus détaillées sont nécessaires pour trancher sur la formation possible de produits d'oxydation des histidines. De plus, notons ici que nous n'avons pas observé de produits d'oxydation de la tyrosine, alors que ce modèle en possède deux, dont une est bien exposée au solvant.

L'identification des produits d'oxydation de $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$ devra être réalisée. Néanmoins, d'après les chapitres B.II, B.III et B.IV, l'oxydation des doigts de zinc produit très majoritairement des acides sulfiniques. Aussi, il serait surprenant que le fait de passer de deux à trois cystéines dans le modèle ZnL_{ZAS} change fondamentalement la nature des produits d'oxydation.

Nous n'avons pas pu faire de mesures d'affinité de ces peptides L_{ZAS} oxydés (mono-sulfinate) pour le zinc : d'abord parce que ne sommes pas parvenus à isoler ces produits (mélanges), et puis parce que nous nous serions certainement heurtés aux problèmes d'agrégation rencontrés avec les peptides initiaux, lors des compétition avec EDTA et TPEN. Mais en se basant sur les résultats obtenus avec ZnL_{TC} et ZnCP1 , on peut supposer que l'affinité des L_{ZAS} mono-sulfinate est comprise entre celle du peptide libre et celle d'un mutant alanine. De plus, nous avons vu avec CP1 que l'affinité d'un mono-sulfinate est proche de celle du mutant alanine, et puisque ce dernier n'est pas actif *in vivo*, il est possible qu'un ZAS perde son activité suite à l'oxydation par $^1\text{O}_2$.

Finalement, la quantification précise des différents produits, ainsi que leur identification définitive, est rendue impossible par la mauvaise séparation des différentes espèces en HPLC. Malgré cela, la limite inférieure de la vitesse d'oxydation par $^1\text{O}_2$ a été déterminée, pour $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{HHCC})$ et $\text{ZnL}_{\text{ZAS}}(\text{CHCC})$. Ces valeurs sont comparées à celles précédemment déterminées pour les modèles ZnL_{TC} et ZnCP1 (Figure B.IV.17). Les cinétiques d'oxydation par H_2O_2 sont indiquées à titre de comparaison.

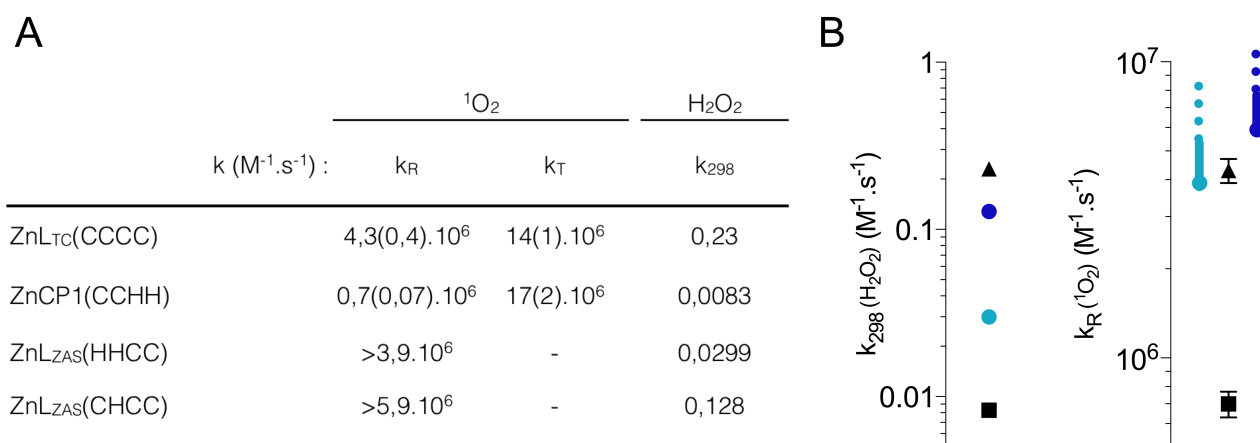


Figure B.IV.17: Comparaison de vitesse d'oxydation par ¹O₂ et par H₂O₂. (A) Tableau récapitulatif des vitesses d'oxydation des complexes modèles par l'oxygène singulet. La cinétique d'oxydation par H₂O₂ pour chaque peptide est indiquée, à titre de comparaison. (B) Représentation graphique des valeurs du tableau sur des échelles logarithmiques : ZnCP1 (■), ZnL_{TC} (▲), ZnL_{ZAS}(HHCC) (●) et ZnL_{ZAS}(CHCC) (●).

Il est flagrant sur la représentation graphique que même si la tendance générale est respectée, les rapports de vitesse d'oxydation déterminés avec H₂O₂ ne sont pas directement transposables à l'oxydation par ¹O₂. Par exemple, le modèle ZnL_{ZAS}(HHCC) réagit au moins aussi vite avec ¹O₂ que ZnL_{TC}, alors qu'il réagit plus lentement que ZnL_{TC} avec H₂O₂. Ainsi, ¹O₂ pourrait réagir avec un site à deux cystéines aussi vite qu'avec un site à quatre cystéines. Cependant, l'exemple de CP1 montre que la tendance générale est tout de même respectée : un modèle peu réactif avec H₂O₂ sera peu réactif vis-à-vis de ¹O₂. Il semble donc que ce « non respect de l'ordre » vienne plutôt de la nature du modèle. Cela pourrait en effet venir, non pas de la première, mais de la deuxième sphère de coordination. Cette dernière peut moduler grandement la réactivité (liaisons hydrogène, accessibilité, écrantage par la charge locale) et elle varie beaucoup d'un modèle à l'autre. Sur la structure RMN du modèle, nous avons vu que la chaîne principale de L_{ZAS}(CHCC) ne fait qu'une seule liaison hydrogène avec le soufre de la cystéine 31 (voir plus haut). Ceci contraste fortement avec le modèle ZnL_{TC} dans lequel on compte sept liaisons hydrogène impliquant les soufres liés au zinc (six venant de la chaîne principale, et une venant de la chaîne latérale d'une asparagine).

Un autre facteur modulant significativement la réactivité des sites doigt de zinc est l'exposition des soufres des cystéines. En effet, les sites doigt de zinc sont très souvent à la surface des protéines, et les cystéines liées au zinc voient leur soufre accessible au solvant, et donc, aux molécules oxydantes. Cependant, la chaîne principale de la protéine, repliée autour du site à zinc couvre une partie de ces soufres. Néanmoins, ce repliement diffère d'une famille de doigt de zinc à l'autre (les récentes classifications des doigts de zinc étant basées sur le

repliement de la chaîne principale autour du site à zinc). Ainsi, les différentes familles de doigt de zinc recouvrent différemment des soufres liés au zinc.

Au laboratoire, *A. Jacques* et collaborateurs^[26] ont calculé la surface accessible au solvant (SAS) des soufres pour 3 sites Zn(Cys)₄ de différentes familles. Parmi eux, nous n'avons étudié la réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet que de ZnL_{TC}, aussi, c'est celui qui nous servira de point de comparaison.

Cette surface accessible au solvant reflète la probabilité de rencontre entre l'oxydant et les soufres du site à zinc. Nous avons calculé la surface accessible au solvant sur les 10 structures RMN de plus basse énergie de ZnL_{ZAS}(CHCC). Le résultat correspond donc à celui du peptide « natif ». De plus, ces calculs ont été refaits après avoir muté tous les acides aminés non-coordinant en Alanine (avec l'outil « mutagenèse » de PyMOL). Les résultats sont présentés dans le Tableau B.IV.3. Il apparaît clairement que la surface accessible au solvant des soufres est bien plus grande dans le modèle ZnL_{ZAS}(CHCC) que dans ZnL_{TC} : 36 contre 11 Å² en moyenne. Le fort écart-type associé à cette valeur est dû à au mouvement des chaînes latérales proches du site à zinc dans les 10 structures de plus basse énergie. Les mutants poly-Alanine, qui permettent de révéler l'effet seul du repliement, confirment que le repliement du site ZAS est responsable de cette forte exposition des soufres : 54 Å² pour le mutant de ZnL_{ZAS} contre seulement 24 Å² pour le mutant de ZnL_{TC}. Finalement, il est à noter que dans ZnL_{ZAS}(CHCC), la surface de soufre exposé est plus grande que dans ZnL_{TC}, alors qu'il ne possède que 3 cystéines (contre 4 pour ZnL_{TC}).

	SAS des soufres (Å ²)	
	Natif	PolyAla
ZnL _{TC} (CCCC)	11,1±4,9	24,3±3,9
ZnL _{ZAS} (CHCC)	35,9±9,1	54,4±4,8

Tableau B.IV.3 : Exposition des soufres des cystéines au solvant dans les modèles ZnL_{TC} et ZnL_{ZAS}(CHCC). Ces surfaces accessibles au solvant (SAS) ont été calculées avec PyMOL en utilisant les 10 structures RMN de plus basse énergie des complexes natifs, et de leur mutant virtuel poly-alanine. Les résultats de ZnL_{TC} sont issus de *Jacques A., et al.*^[26].

La SAS des soufres n'explique pas les différences de réactivité entre les complexes peptidiques vis-à-vis de H₂O₂. Cependant, comme on l'a vu, cette réactivité est fortement

diminuée par l'entropie d'activation. Cette pénalité diffère d'un peptide à l'autre, et reflète la contrainte de l'état de transition, due notamment à l'établissement de liaisons hydrogène avec le peroxyde d'hydrogène. On peut supposer que la réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet est moins soumise à cette pénalité : l'attaque du thiolate sur $^1\text{O}_2$ ne provoque pas le départ d'un groupe partant, la liaison O-O ne doit pas être rompue. Or, dans le cas de H_2O_2 , c'est justement ce phénomène qui nécessite l'assistance des liaisons hydrogène.

Ainsi, il semble que la forte réactivité des modèles ZnL_{ZAS} vis-à-vis de $^1\text{O}_2$ soit due à une forte exposition des soufres du site, couplée à l'absence de liaisons hydrogène impliquant les-dits soufres.

4. Conclusion

Nous avons développé un nouveau modèle de doigt de zinc, reproduisant la structure des sites à zinc des ZAS, en termes de structure et de réactivité. Nous avons synthétisé et caractérisé par diverses spectroscopies deux mutants de ce modèle, l'un de type $\text{Zn}(\text{Cys})_2(\text{His})_2$, l'autre de type $\text{Zn}(\text{Cys})_3(\text{His})$. En plus des caractérisations structurales, leur réactivité vis-à-vis de H_2O_2 et de $^1\text{O}_2$ a été étudiée.

L'oxydation de ces modèles par $^1\text{O}_2$ produit très majoritairement des acides sulfiniques. Cette étude a révélé une réactivité des sites ZAS un peu plus élevée que celle des autres sites doigts de zinc vis-à-vis de l'oxygène singulet, même si nous ne sommes pas parvenus à déterminer les vitesses avec précision. Cette réactivité est intrinsèque à ces sites ZAS : elle peut être due à une grande exposition des soufres liés au zinc, et au faible nombre de liaisons hydrogène établies par la chaîne principale avec ces soufres. L'implication de tels sites dans la détection de l'oxygène singulet est donc plausible.

Références

- [1] E. A. Campbell, R. Greenwell, J. R. Anthony, S. Wang, L. Lim, K. Das, H. J. Sofia, T. J. Donohue, S. A. Darst, *Mol. Cell* **2007**, *27*, 793–805.
- [2] J. R. Anthony, K. L. Warczak, T. J. Donohue, *PNAS* **2005**, *102*, 6502–6507.
- [3] M. Ilbert, P. C. F. Graf, U. Jakob, *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *8*, 835–846.
- [4] M. S. B. Paget, J. B. Bae, M. . Hahn, W. Li, C. Kleanthous, J. H. Roe, M. J. Buttner, *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 1036–1047.
- [5] J. G. Kang, M. S. B. Paget, . J. Seok, M. . Hahn, J. B. Bae, J. S. Hahn, C. Kleanthous, M. J. Buttner, J. H. Roe, *Embo J.* **1999**, *18*, 4292–4298.
- [6] R. Greenwell, T.-W. Nam, T. J. Donohue, *J. Mol. Biol.* **2011**, *407*, 477–491.
- [7] A. M. Nuss, F. Adnan, L. Weber, B. A. Berghoff, J. Glaeser, G. Klug, *PLoS One* **2013**, *8*, e79520.
- [8] T.-W. Nam, E. C. Ziegelhoffer, R. A. S. Lemke, T. J. Donohue, *mBio* **2013**, *4*, e00541.
- [9] O. Sènèque, J.-M. Latour, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17760–17774.
- [10] W. Li, J. Zhang, J. Wang, W. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 892–900.
- [11] J. Venkatraman, S. C. Shankaramma, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131–3152.
- [12] D. I. Pattison, A. S. Rahmanto, M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 38–53.
- [13] I. Bertini, C. Luchinat, *Adv. Inorg. Biochem.* **1984**, *6*, 77–111.
- [14] B. Krizek, D. Merkle, J. Berg, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 937–940.
- [15] A. R. Reddi, T. R. Guzman, R. M. Breece, D. L. Tiemey, B. R. Gibney, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12815–12827.
- [16] . Shi, R. Beger, J. Berg, *Biophys. J.* **1993**, *64*, 749–753.
- [17] D. A. . Deranleau, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4044–4049.
- [18] D. A. Deranleau, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4050–4054.
- [19] E. Bourlès, M. Isaac, C. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 13762–13772.
- [20] M. Isaac, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3409–3420.
- [21] M. Tanaka, Funahash.s, K. Shirai, *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 573–578.
- [22] J.-W. Lee, J. D. Helmann, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23567–23578.
- [23] K. Zdanowski, P. Doughty, P. Jakimowicz, L. O'Hara, M. J. Buttner, M. S. B. Paget, C. Kleanthous, *Biochemistry* **2006**, *45*, 8294–8300.
- [24] M. Isaac, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3409–3420.
- [25] A. Zeida, A. M. Reyes, M. C. G. Lebrero, R. Radi, M. Trujillo, D. A. Estrin, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10070–10073.
- [26] A. Jacques, J.-M. Latour, O. Sènèque, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 3922–3930.

Discussion sur l'oxydation des doigts de zinc par
 $^1\text{O}_2$

Chapitre B.V : Discussion générale sur l'oxydation des doigts de zinc par $^1\text{O}_2$

1. *La liaison au zinc influence la réactivité des thiols vis-à-vis de $^1\text{O}_2$* 189
2. *Le zinc inhibe-t-il la réactivité des histidines vis-à-vis de $^1\text{O}_2$?* 192
3. *L'acidité du métal influence la nature des produits d'oxydation* 193
4. *L'intermédiaire persulfénate a une durée de vie très courte* 194

Comme nous l'avons vu précédemment, l'oxydation des doigts de zinc par $^1\text{O}_2$ conduit à la formation de sulfinates, comme produits majoritaires, et de disulfures (ou d'autres composés contenant des liaisons S-S). Avant de discuter cette réactivité, rappelons le mécanisme de l'oxydation des thiolates. La première étape est l'attaque du thiolate sur l'oxygène singulet qui forme un persulfénate (RSO_2^-). Celui-ci peut évoluer de deux façons (Schéma B.V.1). Il peut se protoner pour donner un acide persulfénique (RSOOH) qui peut réagir avec d'autres thiols pour donner des produits disulfures ou s'effondrer pour donner un sulfinates.

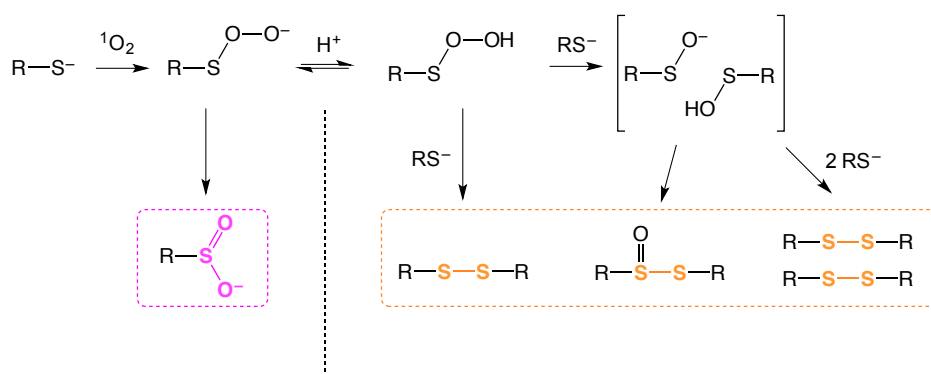


Schéma B.V.1 : Mécanisme proposé pour l'oxydation d'un thiolate par $^1\text{O}_2$.

1. La liaison au zinc influence la réactivité des thiols vis-à-vis de $^1\text{O}_2$

La Figure B.V.1 (A) montre les chromatogrammes obtenus après photo-oxydation de ZnL_{TC} lorsque le pH varie de 6 à 9,5. On peut noter que les produits et leurs proportions restent identiques, quel que soit le pH. Ceci contraste fortement avec les chromatogrammes obtenus par photo-oxydation du peptide L_{TC} libre, i.e. sans Zn^{2+} lié aux cystéines (Figure B.V.1 (B)). Tout d'abord, nous observons davantage de produits pour l'oxydation de L_{TC} libre. D'autre part, les proportions des différents produits varie en fonction du pH. La Figure B.V.1 C montre les chromatogrammes obtenu pour L_{TC} après photo-oxydation puis réduction au TCEP. Ainsi, les espèces sulfinates apparaissent clairement, les disulfures étant réduits. Ceci nous a permis de d'identifier et de quantifier les disulfure et les sulfinates. On y reconnaît notamment les peptides oxydés $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$, $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ et $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ décrits dans le Chapitre B.II.

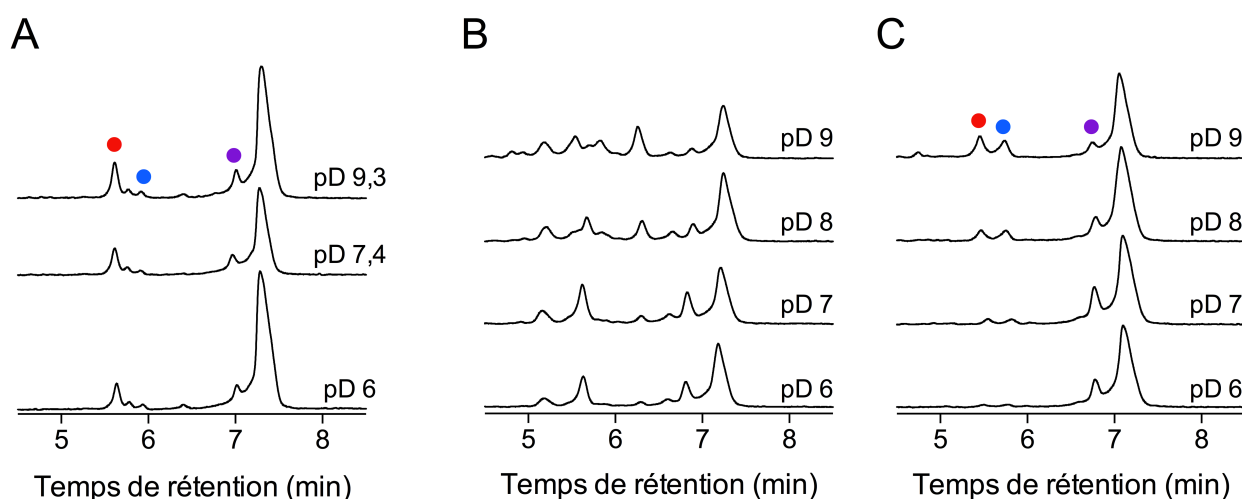


Figure B.V.1 : Effet du pD sur les produits de photo-oxydation de ZnLTC (A) et LTC (B et C). Les chromatogrammes des produits d'oxydation de LTC par l'oxygène singulet sont présentés avant (B) et après réduction à la TCEP (C). Les espèces mono-sulfinate sont indiquées par les points colorés : LTC A (●), LTC B (●), LTC D (●).

Pour la photo-oxydation de LTC libre, le produit mono-disulfure ($\text{tr}=6,3\text{min}$) est formé en plus grande quantité à mesure que le pD monte. Cependant, contrairement à ce que l'on a décrit pour ZnLTC , dans le cas de LTC , on ne peut pas savoir avec certitude si ce mono-disulfure provient de l'oxydation par $^1\text{O}_2$ ou par PS^* . Aussi, nous avons quantifié les produits d'oxydation en ignorant et en prenant en compte ces produits mono-disulfure (Figure B.V.2). Si on les prend en compte, la proportion de disulfure (mono- et bis-) dans les produits d'oxydation de LTC par $^1\text{O}_2$ varie peu avec le pD. Sa valeur moyenne est de $65\pm 5\%$. En revanche, si on considère que ces produits mono-disulfure ne font pas partie des produits issus de $^1\text{O}_2$, alors, il apparaît que la proportion de bis-disulfure diminue au profit des sulfinates à mesure que le pD augmente.

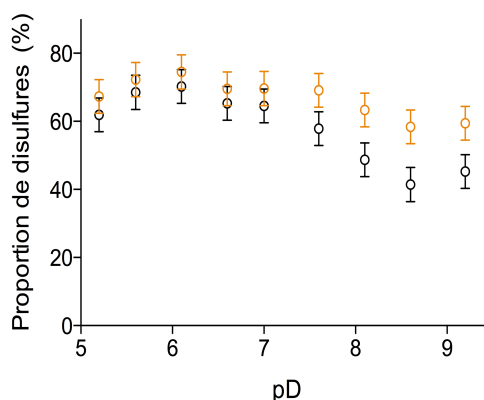


Figure B.V.2 : Proportion des produits disulfures dans les produits d'oxydation de LTC par $^1\text{O}_2$. Cette quantification a été faite sur les chromatogrammes présentés Figure B.V.1, en sommant les mono-disulfures et les bis-disulfures (orange) ou en ignorant les mono-disulfures dans les produits (noir).

Mis à part la nature des produits (disulfure vs sulfinate), la Figure B.V.1 révèle une autre différence de réactivité entre ZnL_{TC} et L_{TC} . Désormais, nous allons nous intéresser aux produits mono-sulfinate : les trois pics observés après réduction à la TCEP correspondent aux peptides $\text{L}_{\text{TC}}\text{A-C}$. Parmi les produits de type mono-sulfinate issus de l'oxydation de ZnL_{TC} par $^1\text{O}_2$, $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ représente 30%, $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ représente 10%, et $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ représente 60% (Figure B.V.3 (A)), et ce, quel que soit le pH/pD. En revanche, la répartition de ces trois espèces dans l'ensemble des sulfinites est très différente lorsque l'on regarde les produits issus de l'oxydation de L_{TC} libre par $^1\text{O}_2$ (Figure B.V.3 (B)). En effet, la proportion que représente chaque sulfinate varie fortement avec le pD. On peut observer que le profil de la Figure B.V.3 (B) reflète des événements de protonation pour des pD vers 6, 8 et 9.

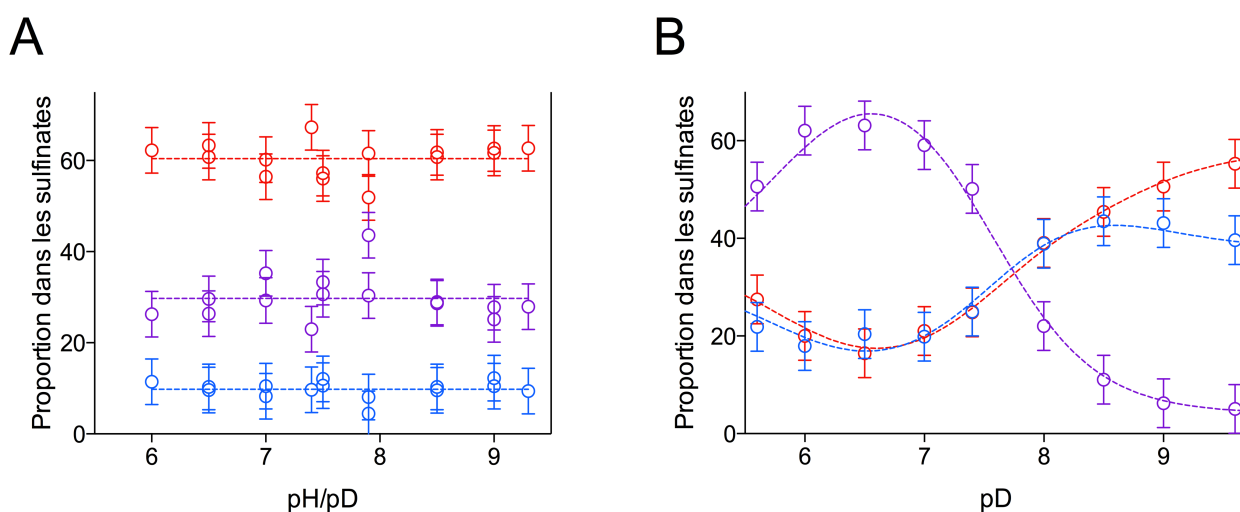


Figure B.V.3 : Proportion de $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$ (●), $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ (●) et $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$ (●) dans les sulfinites. Cette quantification a été faite sur les chromatogrammes de l'oxydation ZnL_{TC} (A) et L_{TC} (B) après réduction par TCEP.

Dans chacun des peptides $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$, $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$ et $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$, une cystéine a été oxydée en acide sulfinique. Cette cystéine est celle dont le soufre a été attaqué par la molécule de $^1\text{O}_2$. Pour $\text{L}_{\text{TC}}\text{A}$, c'est la cystéine 5, la cystéine 16 pour $\text{L}_{\text{TC}}\text{B}$, et pour $\text{L}_{\text{TC}}\text{D}$, c'est la cystéine 13. Ensuite, d'après le mécanisme réactionnel, le pH/pD peut influencer à plusieurs étapes. D'abord, au niveau de l'attaque nucléophile de la cystéine sur $^1\text{O}_2$: la forme déprotonnée thiolate ne réagit pas à la même vitesse qu'un thiol. Puis, au niveau des intermédiaires réactionnels, notamment le premier : l'intermédiaire persulfénate. Pour rappel, s'il reste déprotoné, il s'effondre pour donner un sulfénate, mais s'il se protone en acide persulfénique, alors, il évolue vers les disulfures. Les pK_a des quatre cystéines de L_{TC} (6.5, 7.9, 9 et 9.8) ont été mesurés il y a quelques années au laboratoire. On remarque que ces pK_a corrélient bien avec les variations observées et donc, que celles-ci sont liées à l'état de protonation des cystéines.

Nous avons démontré dans le Chapitre B.II que le zinc influe sur la proportion disulfure/sulfinate. Nous reviendrons sur ce point un peu plus loin. Il apparaît également que le zinc influe sur les proportions des produits sulfinates en maintenant les cystéines dans leur forme déprotonée, quel que soit le pH. Ce qui dicte la proportion des différents sulfinates n'est pas encore clair. La surface accessible au solvant de chacun pourrait être un élément de réponse.

2. *Le zinc inhibe-t-il la réactivité des histidines vis-à-vis de $^1\text{O}_2$?*

L'ion Zn^{2+} a un effet notable sur l'oxydation des cystéines de nos modèles par $^1\text{O}_2$. Qu'en est-il des histidines ? La photo-oxydation de ZnCP1 conduit à la formation de deux composés avec un sulfinate sur chacune des deux cystéines et un composé disulfure. Nous n'avons pas observé d'oxydation des histidines, alors que cet acide aminé est décrit comme très réactif vis-à-vis de l'oxygène singulet.^[1,2] Lorsque l'on photo-oxyde CP1 libre, on observe quatre nouveaux pics sur le chromatogramme (Figure B.V.4). D'après les temps de rétention, deux de ces quatre pics correspondent aux produits mono-sulfinates observés avec ZnCP1. Cependant, notons que ces produits sont minoritaires. Le pic majoritaire (*) n'a pas pu être caractérisé en détail. Tout ce que nous avons pu voir est que sa masse ($m/z=986,8(3+)$) correspond à un gain de 14Da par rapport au peptide initial ($m/z=982,3(3+)$). De plus, l'ajout de TCEP ne change rien : ni sur le chromatogramme, ni sur le spectre de masse. Il est donc probable que ce produit corresponde à l'adduit His-His (+1 O, -2 H), comme nous l'avons proposé dans le Chapitre B.III. Cette hypothèse nécessite d'être confirmée par digestion enzymatique et caractérisation en spectrométrie de masse.

Ainsi, dans les cas de CP1, la coordination au zinc changerait la cible de l'oxygène singulet : uniquement les cystéines pour ZnCP1, et majoritairement les histidines pour CP1 libre. Dans le cas de CP1 libre, il serait intéressant de voir quelle est la variation des produits en fonction du pH.

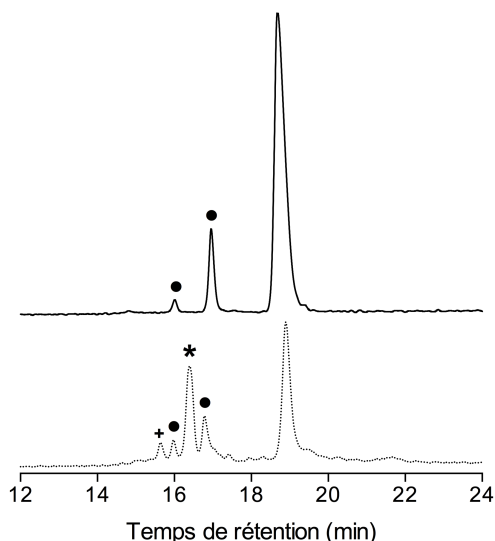


Figure B.V.4 : Oxydation de ZnCP1 (haut) et CP1 (bas) par $^1\text{O}_2$. Les produits mono-sulfinate sont indiqués par (•) tandis que les produits indiqués par (*) et (+) n'ont pas été identifiés en détail.

3. L'acidité du métal influence la nature des produits d'oxydation

Comme mentionné dans le Chapitre B.II, les produits d'oxydation de ZnL_{TC} et L_{TC} par $^1\text{O}_2$ diffèrent aussi. Nous avons vu que les produits mono-sulfinate représentent 90% des produits d'oxydation de ZnL_{TC} , contre seulement 35% pour L_{TC} (à pD 7,4).

Nous expliquons cet effet par l'acidité du zinc. En effet, le bis-disulfure découle de la forme protonée de l'intermédiaire (acide persulfénique RSOOH), tandis que les produits sulfinate découlent de la forme déprotonée (persulfénate RSOO^-). Or, le zinc est un acide de Lewis. Ainsi, le persulfénate, généré sur une cystéine liée au zinc, peut se coordonner au zinc, ce qui le maintient dans la forme déprotonée, pour conduire ensuite au sulfinate.

Pour confirmer cela, nous avons étudié la réactivité du complexe CdL_{TC} où l'ion Cd^{2+} a été substitué à Zn^{2+} . Il a été montré au laboratoire que le complexe CdL_{TC} adopte la même structure que le complexe ZnL_{TC} . La Figure B.V.5 montre une plus grande proportion de bis-disulfure dans le cas du complexe de cadmium. L'ion Cd^{2+} est moins acide que Zn^{2+} , ce qui permet au persulfénate de se protoner un plus facilement et donc engendre davantage de bis-disulfure dans les produits d'oxydation de CdL_{TC} que dans ceux de ZnL_{TC} .

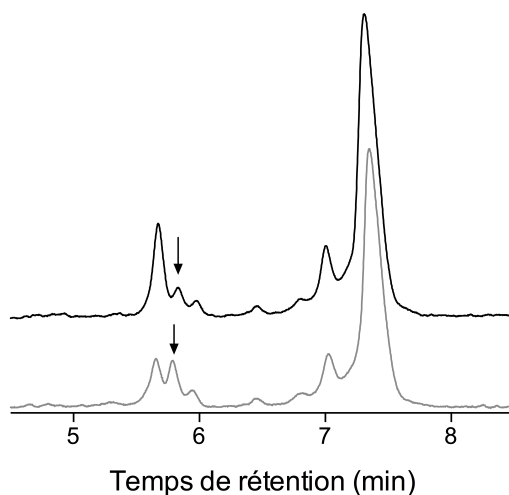


Figure B.V.5 : Oxydation de ZnL_{TC} et CdL_{TC} par $^1\text{O}_2$. Une solution de ZnL_{TC} ($65\mu\text{M}$) (trait noir) ou de CdL_{TC} ($65\mu\text{M}$) (trait gris) a été préparée dans du tampon phosphate 50mM pD 6 (D_2O), avec du rose bengal ($2,7\mu\text{M}$), et a été irradiée 5 secondes.

4. L'intermédiaire persulfénate a une durée de vie très courte

Comme nous venons de le voir, dans les produits issus de la photo-oxydation des doigts de zinc, nous observons un mélange de disulfures et de sulfinates. Cette proportion varie avec les modèles. Dans le cas de ZnL_{TC} , il se forme 90% de sulfinates contre 25% dans le cas de ZnCP1 et davantage encore avec ZnL_{Hsp} , semble-t-il, suite à des tests préliminaires. Le fait d'observer à la fois des disulfures et des sulfinates signifie qu'au niveau de l'intermédiaire persulfénate, les formes protonées et déprotonées coexistent. Autrement dit, les conditions de pH de nos oxydations devraient être proches de la valeur du pK_a d'au moins un des intermédiaires persulfénate. Ainsi, si l'équilibre entre ces deux formes a le temps de s'établir, nous devrions observer une forte dépendance des produits d'oxydation vis-à-vis du pH : à bas pH, l'intermédiaire serait entièrement protoné, ce qui donnerait uniquement des disulfures, alors qu'à haut pH, le persulfénate resterait entièrement déprotoné, et conduirait uniquement aux sulfinates. Or, comme nous venons de le décrire, pour ZnL_{TC} , entre les pH 5,5 et 9,5, nous n'observons pas de changement dans le rapport sulfinates/disulfure. Notons que ce rapport varie également peu pour L_{TC} libre.

L'hypothèse que nous avançons est que la formation des produits est sous contrôle cinétique. La vitesse d'effondrement du persulfénate est proche de celle de sa protonation et il a une compétition entre l'effondrement du persulfénate et sa protonation. Ainsi, l'équilibre entre le persulfénate et l'acide persulfénique n'a pas le temps de s'établir, et, quel que soit le pH, la répartition disulfures/sulfinates est la même.

Les cas où le transfert de proton est une étape cinétiquement limitante peuvent être mis en évidence par un phénomène de catalyse acide générale : la réaction est accélérée par une forte concentration d'un donneur de proton dans le milieu^[3].

Nous avons donc comparé les proportions des produits de photo-oxydation de ZnL_{TC} en présence d'une quantité croissante d'un donneur de protons, NH_4^+ . La Figure B.V.6 présente les chromatogrammes obtenus avec 50 mM, 900 mM et 4500 mM de chlorure d'ammonium (pH 7). Même si nous n'avons pas quantifié précisément des différentes espèces, il est bien visible qu'à forte concentration d'ammonium, il y a plus de bis-disulfure (pics repérés par des carrés) dans les produits qu'à faible concentration. Plus d'informations devraient être obtenues en utilisant des ammoniums avec d'autres pK_a , et à d'autres pH. Cela permettrait, entre autre, d'avoir une idée plus précise de la cinétique de la transformation du persulfénate en sulfinates et d'évaluer la valeur du pK_a d'un persulfénate, qui reste inconnu à ce jour.

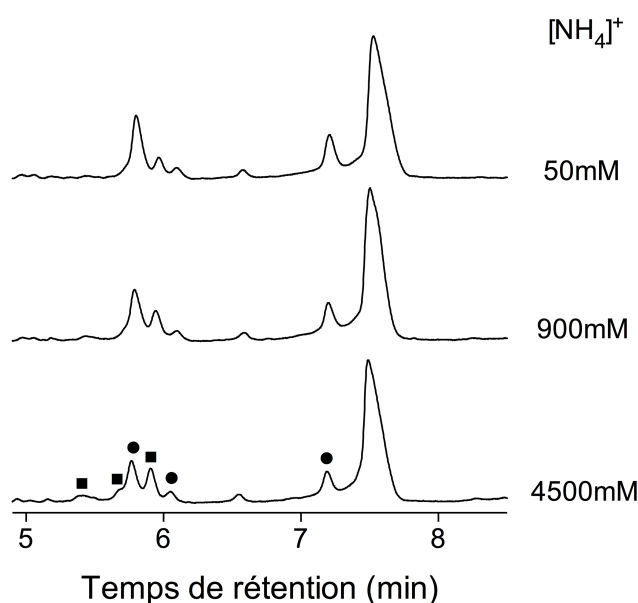


Figure B.V.6 : Effet de la catalyse acide de l'ammonium sur les produits d'oxydation de ZnL_{TC} par $^1\text{O}_2$. À un même mélange de ZnL_{TC} (90 μM) et de rose bengal (2 μM), des quantités croissantes d'acétate d'ammonium pH 7,0 (50mM : pointillés, 900mM : tirets, et 4,5M : trait plein) ont été ajoutées avant irradiation. Les produits bis-disulfure sont indiqués par des (■), et les sulfinates par des (●).

Ceci confirme que la formation des produits est sous contrôle cinétique et que le processus d'effondrement du persulfénate pour donner le sulfinates est très rapide, de l'ordre de la vitesse de transfert des protons dans l'eau.

Nous voyons une conséquence importante à ceci : la proportion de disulfure dans les produits d'oxydation pourrait être contrôlée par l'environnement autour des cystéines : s'il y a ou non des donneurs de protons à proximité du site à zinc. Il serait donc très intéressant de synthétiser des mutants des ZnL_{TC} comportant par exemple des résidus donneurs de protons (ammonium) ou d'autres accepteurs de protons pour moduler la proportions des produits.

Notre approche utilisant des modèles de doigts de zinc ouvre des portes intéressantes concernant l'étude mécanistique des réactions avec l'oxygène singulet et la caractérisation d'espèces instables.

Références

- [1] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, 24, 663–677.
- [2] I. B. C. Matheson, J. Lee, *Photochem. Photobiol.* **1979**, 29, 879–881.
- [3] E. E. Kwan, *J. Chem. Educ.* **2005**, 82, 1026.

Conclusions générales

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des études d'Olivier Sénèque et Jean-Marc Latour sur la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis des ERO impliquées dans le stress oxydant. Ces études visent à apporter des données expérimentales permettant de discuter les hypothèses selon lesquelles (i) les doigts de zinc peuvent être des cibles physiologiques de ces oxydants et (ii) ils peuvent intervenir dans la détection du stress oxydant. Des études précédentes ont montré que l'oxydation des doigts de zinc par H_2O_2 est très lente : l'ion Zn^{2+} protège les cystéines de l'oxydation. Les constantes de vitesses mesurées pour différents doigts de zinc montrent que ceux-ci ne sont pas des cibles de H_2O_2 , même en cas de stress important.

Cette thèse avait pour but d'étudier la réactivité des doigts de zinc avec des oxydants plus puissants que H_2O_2 , à savoir HOCl et l'oxygène singulet. Une des motivations de ce travail était l'implication de protéines à doigt de zinc comme Hsp33 et ChrR dans la réponse cellulaire à ces oxydants.

Réactivité vis-à-vis de HOCl

Dans une première partie, nous avons étudié l'oxydation du modèle du site à zinc de Hsp33 par HOCl. Nous avons observé que l'oxydation de ZnL_{Hsp} ne mène pas aux mêmes produits, selon qu'elle est faite par H_2O_2 ou HOCl. Ces produits étant différents isomères de bis-disulfure, nous avons montré que ces différences proviennent d'un réarrangement de disulfures au niveau de l'intermédiaire mono-disulfure. Ainsi, au niveau du mono-disulfure s'instaure une compétition cinétique entre les réarrangements et l'oxydation des cystéines restantes. Ceci est confirmé par les vitesses d'oxydation mesurées : l'oxydation par H_2O_2 est beaucoup plus lente que les réarrangements, tandis que l'oxydation par HOCl est beaucoup plus rapide. Les données que nous avons obtenu avec le modèle ZnL_{Hsp} permettent de proposer un mécanisme moléculaire pour l'activation de Hsp33 par HOCl et d'avancer une explication au fait que Hsp33 est activée par HOCl mais pas par H_2O_2 à basse température. De plus, nous avons montré que la vitesse d'oxydation de ZnL_{Hsp} par HOCl est de l'ordre de celle de la méthionine (environ $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,4). Or, l'oxydation de cet acide aminé est à la base de la détection de HOCl par des senseurs comme NemR ou RclR. Ceci va bien dans le sens d'une activation physiologique de Hsp33 par HOCl.

Ce travail illustre parfaitement l'intérêt des modèles peptidiques utilisés au laboratoire. Le modèle ZnL_{HSP} est suffisamment gros pour reproduire parfaitement la structure du doigt de zinc de Hsp33 et suffisamment petit et robuste pour permettre des études fines au niveau moléculaire qui n'étaient pas possible avec la protéine Hsp33. Ainsi, cette étude vient compléter les travaux des biochimistes travaillant sur Hsp33 et nous permet aujourd'hui de proposer un mécanisme moléculaire pour expliquer l'activation de Hsp33.

Dans le but de généraliser ces études aux différents doigts de zinc présents en biologie, il serait intéressant d'étendre ces études à d'autres modèles. En ce sens, nous avons fait des expériences préliminaires avec ZnL_{TC} . Ces données montrent que (i) le modèle s'oxyde à la même vitesse que la protéine et (ii) que ZnL_{TC} est oxydé à une vitesse proche de celle de ZnL_{Hsp} , ce qui suggère que des sites à zinc qui n'ont pas pour fonction de détecter HOCl peuvent être endommagés par HOCl.

Réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'oxydation des doigts de zinc par l'oxygène singulet. Nous avons d'abord étudié la réactivité de modèles que nous maîtrisions au laboratoire, puis, nous avons développé et étudié un modèle (ZnL_{ZAS}) du doigt de zinc de ChrR, une protéine qui a été proposée comme senseur de $^1\text{O}_2$. Ce nouveau modèle reproduit le site à zinc de certains facteurs anti- σ de type IV (dont ChrR et RsrA). Plusieurs points sont à retenir de cette étude :

- L'oxydation de doigts de zinc par $^1\text{O}_2$ produit un mélange de disulfures et de sulfinates. La formation de sulfinates est favorisée par rapport à celle des disulfures, contrairement à ce qui a été observé avec les thiols libres.
- L'oxydation d'une cystéine en sulfinates fait chuter l'affinité d'un doigt de zinc de ~ 5 - 6 ordres de grandeurs. Cette affinité ($K \sim 10^{-10}$) est suffisamment faible pour que, dans un milieu cellulaire, le zinc quitte le site et donc, que la protéine se déstructure.
- La vitesse d'oxydation par $^1\text{O}_2$ de certains doigts de zinc est élevée et est du même ordre que celle des thiols libres à pH 7,4 ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ceci montre que le zinc ne protège pas les cystéines de l'oxydation, contrairement à ce qui a été vu avec H_2O_2 et que les doigts de zinc sont des cibles possibles de $^1\text{O}_2$ dans la cellule. Dans un

stress causé par $^1\text{O}_2$, seules les molécules à proximité du site de production de $^1\text{O}_2$ (à environ un millier d'Ångström) risquent d'être oxydées. Ainsi, la localisation du senseur à proximité de la source de $^1\text{O}_2$ est aussi importante que sa vitesse d'oxydation. Dans ces conditions, il est possible d'envisager qu'un doigt de zinc puisse jouer le rôle de senseur de $^1\text{O}_2$.

Pour la suite, l'une des perspectives les plus intéressantes porte sur l'étude du premier intermédiaire réactionnel formé par l'attaque d'un thiolate sur l'oxygène singulet. Puisque les produits d'oxydation de ZnL_{TC} reflètent la protonation de cette espèce, ce système pourrait permettre d'obtenir des informations sur l'acide persulfénique, très rares dans la littérature.

En conclusion, nous pouvons proposer que les sites doigts de zinc puissent être des cibles de stress oxydant fort, de type HOCl ou $^1\text{O}_2$, et dans certains cas particuliers, servir de senseurs pour ces oxydants.

Partie Expérimentale

Table of Contents

1. Matériel et méthodes	205
<i>Spectrophotomètres</i>	205
<i>HPLC analytique</i>	205
<i>HPLC préparative</i>	206
2. Synthèse des peptides	206
3. Caractérisation des complexes peptidiques	210
<i>Préparation des solutions de peptide</i>	210
<i>Titrages UV/CD/Fluorescence</i>	211
<i>Détermination de la constante de complexation du zinc pour un peptide</i>	211
<i>RMN ^1H (500 MHz)</i>	212
4. Réactivité des complexes vis-à-vis de l'acide hypochloreux	212
<i>Préparation de la solution de complexe</i>	212
<i>Solution de NaOCl</i>	212
<i>Oxydation d'un peptide, libre ou complexé, par NaOCl, en vue d'analyse en HPLC</i>	212
<i>Digestion enzymatique des isomères bis-disulfures</i>	213
<i>Suivis spectroscopiques de l'oxydation d'un complexe peptidique par NaOCl (fluo/UV)</i>	214
<i>Compétition ZnL/Methionine-HOCl</i>	214
<i>Mesure cinétique directe de l'oxydation d'un modèle ZnL par NaOCl (Stopped flow)</i>	214
5. Réactivité des complexes vis-à-vis de l'oxygène singulet	216
<i>Préparation des tampons D_2O</i>	216
<i>Préparation des solutions de complexe et de peptide libre</i>	216
<i>Préparation des solutions de photo-sensibilisateur et de piège à $^1\text{O}_2$</i>	217
<i>Photo-oxydation de produits non-sensible à $^3\text{O}_2$ (anthracènes, EGWGK et ZnL)</i>	217
<i>Photo-oxydation des peptides libres</i>	218
<i>Quantification de l'espèce disulfure de CP1 produite lors de l'oxydation de ZnCP1</i>	219
<i>Digestion enzymatique des produits d'oxydation :</i>	219
<i>Mesure de désactivation de l'oxygène singulet (collaboration)</i>	220

1. Matériel et méthodes

Pour la synthèse peptidique, les acides aminés protégés, le PyBOP, l'HOBt, et les résines sont achetées chez NovaBiochem.

Les autres produits sont achetés chez SigmaAldrich : DEDTC, TIS, Phenylsilane, Pd(PPh₃)₄, DIEA, TEA, Zn(ClO₄)₂, ZnCl₂, Co(SO₄)(H₂O)₆, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, TCEP, Bleu de Méthylène (voir JLR), Rose bengal, AMM, AP, et les solvants, MeCN, MeOH, DMF, DCM, MNP.

Les autres produits utilisés sont D₂O (99.9% EurisoTop), résine CHELEX 100 (Biorad),

Enfin, l'équipe de Nathan McClenaghan, Bordeaux I a synthétisé les molécules suivantes : AVS, PdTTPS et PNS.

Spectrophotomètres

Les spectres UV-Vis ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Lambda 35 (Perkin Elmer) et un Cary 50 (Varian). La spectrophotométrie d'émission a été réalisée sur un Cary Eclipse (Varian). Le spectrophotomètre à dichroïsme circulaire utilisé est un Chirascan (Applied Photophysics). Certains peptides ont été synthétisés par un robot de synthèse, un Liberty 1 (CEM). Finalement, les études en stopped flow ont été faites sur un MOS 450 (BioLogic) (à lampe Xenon) avec un photomultiplicateur relié à un PMS 250.

HPLC analytique

Les analyses HPLC sont conduites sur une HPLC Infinity 1260 (Agilent) avec une colonne Chromolith® RP-18e 10-4,6mm thermostatée à 25°C. À l'exception des analyses portant sur les peptides L_{ZAS}, la phase mobile est un mélange de deux solvants A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans un mélange MeCN/H₂O 9:1). La composition du mélange est indiquée en pourcentage de solvant B. Les méthodes d'analyse sont : 5-12% 1min20 12-30% 10min30 3mL/min pour les solutions de L_{TC}, 2-5% 5min 5-10% 3min 10-25% 20min 25-75% 10min 2mL/min pour les solutions d'anthracènes et d'EGWGK, et d'autres encore selon les peptides. À la fin de la méthode, la colonne est rincée avec 100% de B avant d'être ré-équilibrée avec le mélange de départ (5% de B).

Pour les peptides L_{ZAS}, la phase mobile est un mélange de solvant A et de solvant C (0,1% TFA dans un mélange MeOH/H₂O 9:1). La méthode utilisée est 5-50% 5min 50-60% 20min 2mL/min.

Les chromatogrammes suivent l'absorbance de la solution éluée à 214, 254, 280 et 380nm.

HPLC préparative

Les peptides synthétisés sont purifiés sur une HPLC LaPrep (VWR) avec une colonne XBridge™ Prep C18 5μM 19x150mm. Les solvants utilisés sont ceux décrits dans la partie « HPLC analytique ».

Tous les tampons utilisés sont préparés par dissolution des sels dans de l'eau déionisée (18,2 MΩ) ou de l'eau deutérée, passés sur résine CHELEX pour enlever les traces de métaux, puis, leur pH est ajusté avec des solutions de NaO(H/D) et (H/D)Cl.

2. Synthèse des peptides

Avant de réaliser la synthèse peptidique à proprement parler, il faut d'abord silaniser le réacteur, afin que les billes de résine n'adhèrent pas à la paroi. Cette étape consiste à couvrir les fonctions hydroxyle de la silice de l'intérieur du réacteur avec une couche de diméthylsilane. Voici le protocole utilisé dans l'équipe : le réacteur est rempli aux 2/3 avec dichlorodiméthylsilane (DCDMSi), et laissé incubé 2h sous la hotte. Le liquide est alors expulsé du ballon, récupéré et conservé à 4°C en vue d'être réutilisé. Afin d'enlever l'excédant de DCDMSi et de neutraliser le réacteur, il est rincé 3 fois en remplissant avec du dichlorométhane (DCM), à un niveau plus haut que celui du DCDMSi. Puis, 3 lavages similaires sont réalisés en ajoutant à chaque fois 3ml de triéthylamine (TEA) (le liquide est laissé 1 minute). De nouveau, le réacteur est rincé 3 fois au DCM, puis, 3 fois avec une solution basique : le réacteur est rempli à mi-hauteur de DCM avec 1ml de TEA (le mélange est laissé 1 minute, sous agitation). Finalement, après 3 derniers rinçages au DCM, le réacteur est prêt à l'emploi.

Les différents peptides ont été synthétisés à la main ou au robot (CEM Liberty 1) suivant le protocole suivant (Schéma e.1) :

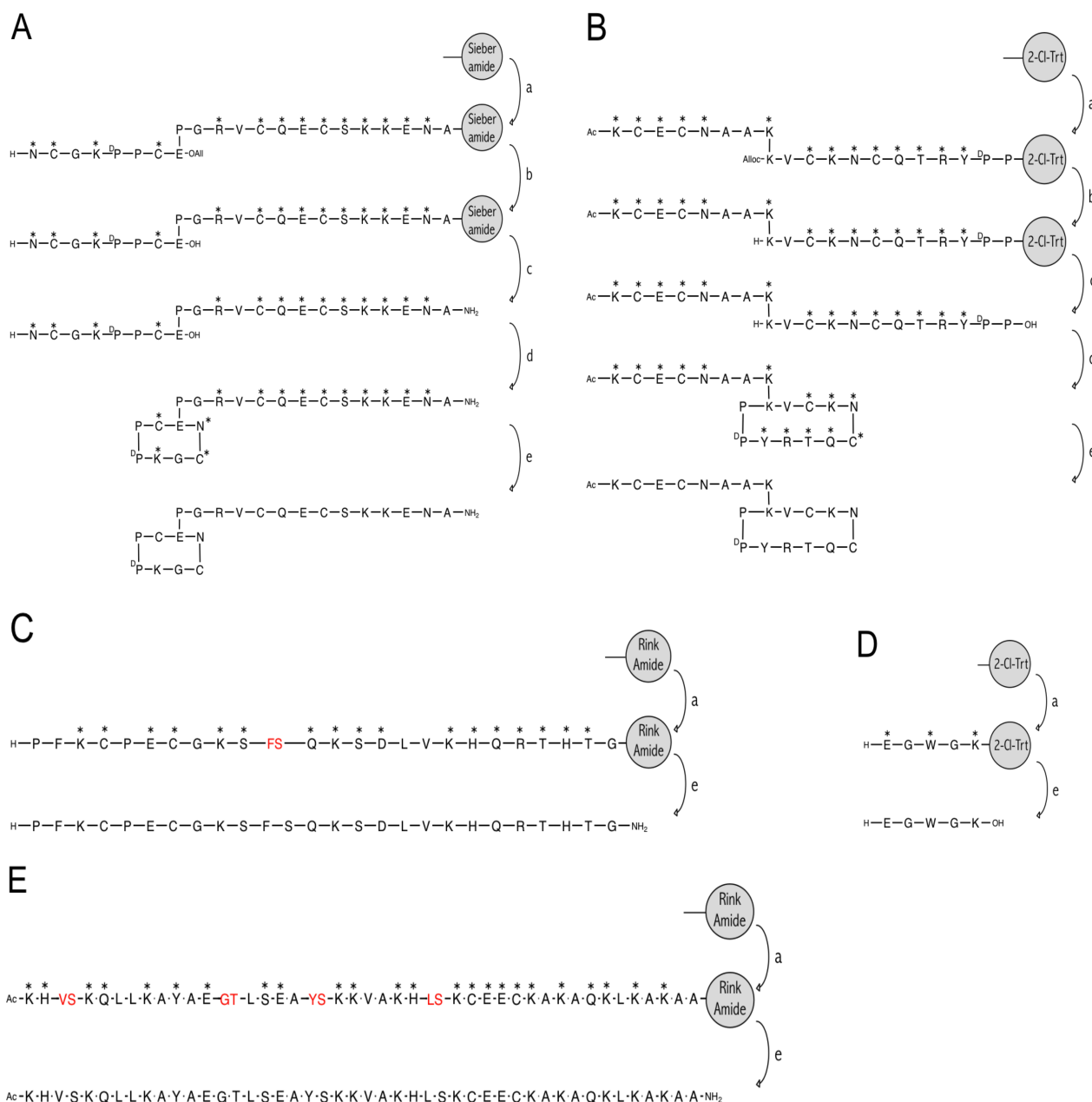


Schéma e.1 : Synthèse des peptides L_{TC} (A), L_{Hsp} (B), CP1-Y2F (C), EGWGK (D) et L_{ZAS} (E). Les résines utilisées sont la Sieber Amide, la 2-Chlorotrityl et la NOVA-PEG Rink Amide. Les astérisques représentent les groupements protecteurs classiques (trityl, tert-butyl, tert-butoxycarbonyl, etc), les acides aminés en rouge sont couplés sous forme de dipeptides. Ces dipeptides empêchent la formation de structures secondaires dans le peptide en croissance, ce qui évite les chutes de rendement. Pour synthétiser les peptides cycliques (A) et (B), il faut : a) greffer les acides aminés protégés en répétant le cycle déprotection/couplage/blocage, b) déprotéger sélectivement le groupement Alloc ou Allyl, c) décrocher le peptide de la résine en conditions douces, d) cycliser le peptide en solution et e) déprotéger entièrement le peptide. La synthèse des peptides linéaires (C),(D) et (E) est plus simple : elle ne passe que par les étapes a) et e).

a) Synthèse du peptide par greffage des acides aminés protégés.

La synthèse est réalisée en utilisant la stratégie Fmoc/tBu, selon un protocole déjà bien optimisé par l'équipe. L'élongation de la chaîne se fait en répétant le cycle des trois étapes déprotection/couplage/blocage. Notons que la résine est lavée entre chacune de ces étapes : 1 lavage = 4 rinçages avec 8 mL DMF, 1 rinçage 8 mL DCM, 1 rinçage 8mL DMF.

Déprotection du groupement Fmoc : la résine est suspendue 3 fois 3 minutes avec un mélange piperidine /DCM 1:4. Le mélange est récupéré à chaque fois, dont la mesure d'absorbance à 300nm donne la concentration en Fmoc ($\epsilon^{300nm}=7800M^{-1}.cm^{-1}$), ce qui permet de remonter à la quantité de peptide en croissance sur la résine.

Lavage.

Couplage de l'acide aminé Fmoc-AA-OH : cette étape est répétée deux fois de suite (avec une étape rinçage entre les deux). La résine est suspendue 30 minutes dans 8 mL de DMF, avec 2 équivalents (par rapport à la charge de la résine) de Fmoc-AA-OH, 2 équivalents de PyBOP et 6 équivalents DIEA. (sauf dans le cas particulier de la cystéine : 4 mL DMF, 4 mL DCM, 2 éq Fmoc-Cys(trt)-OH, 2 éq PyBOP, 2 éq HOBt, 10 éq Collidine ; 1h).

Lavage.

Blocage : la résine est suspendue 1 minute dans 10 mL DMF/Ac₂O/Pyridine 7:1:2

Lavage.

b) Déprotection sélective des groupements Allyl ou Alloc

Après 4 rinçages de la résine au DCM, puis 3 au DCM sec, la résine est suspendue, sous argon, dans 25 mL de DCM sec, avec 25 équivalents (par rapport à la quantité de groupement Alloc ou Allyl) de phénylsilane et 0,4 équivalent Pd(PPh₃)₄ pendant 1h. Cette opération est répétée une seconde fois puis la résine est rincée avec les solutions suivantes : DMF 2x, DMF/H₂O (99:1), DMF 2x, DMF/DIEA (99 :1), DMF, DMF/diéthylthiocarbamate de sodium (95:5).

c) Décrochage de la résine en conditions douces

Les résines 2-Chlorotrityl et Sieber Amide sont très sensibles à l'acide, ce qui permet de cliver le peptide de la résine sans déprotéger les chaînes latérales des acides aminés. La résine est lavée avec un mélange DCM/TFA 99:1 (5-6 lavages successifs avec 20mL de mélange, 2 minutes de suspension). Les fractions sont collectées dans un ballon contenant 25 mL d'un mélange MeOH/pyridine 4:1. La solution est ensuite évaporée jusqu'à l'obtention

d'une huile jaune. Cette huile est précipitée dans l'éther de pétrole : l'excès de pyridine se retrouve dans le surnageant. Après avoir retiré ce surnageant, le précipité est dissout dans du DCM. La phase organique est lavée à l'eau afin d'en extraire les sels de pyridinium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis, le DCM est évaporé, laissant place à un résidu jaune : le peptide protégé.

d) Cyclisation du peptide

Le peptide est dissout dans un grand volume de DCM (afin d'atteindre une concentration de peptide d'environ 10^{-4} mol.L⁻¹). 2 équivalents de PyBOP (1éq = quantité d'Allyl/Alloc déprotégé) sont ajoutés, ainsi que 600µl de DIEA (afin que le pH du mélange soit d'environ 8). La réaction de couplage est laissée sous agitation sur la nuit.

e) Déprotection des chaînes latérales

Le clivage du groupement protecteur des autres chaînes latérales est réalisé en conditions acides fortes : après évaporation à sec du mélange de la cyclisation, on ajoute directement un mélange H₂O (600µL), TIS (600µL), DTT (660mg) et 18mL de TFA.

Pour les peptides n'ayant pas besoin d'être cyclisés (ici synthétisés sur NOVA-PEG Rink Amide), ce mélange est versé directement sur la résine, dans le réacteur de synthèse.

Dans les deux cas, la réaction est laissée 2 heures. La solution est ensuite évaporée jusqu'à obtention d'une huile jaune. Cette dernière est précipitée avec de l'éther glacial : le peptide déprotégé forme des flocons, tandis que les groupements protecteurs sont dissouts dans l'éther. Après décantation, le surnageant est retiré. De l'éther glacial est ajouté, et l'opération est répétée. La poudre est ainsi lavée 3 fois. Finalement, l'éther restant emprisonné dans la poudre est évaporé en faisant passer un filet d'air sur la poudre. Une fois sèche, un échantillon est analysé en spectrométrie de masse (ESI-MS) pour vérifier que l'identité du peptide (Tableau e.1).

Le reste de la poudre est alors dissout dans l'eau, avec de la TCEP, et purifié en HPLC préparative (C-18 phase inverse). Les fractions pures du peptide sont réunies et lyophilisées. La poudre blanche obtenue est transférée dans un pilulier scellé avec un septum, rempli d'argon et conservé au réfrigérateur dans un récipient avec du gel de silice.

Peptide	Formule brute	Masse exacte		
		Espèce	théorique	expérimentale
L _{Hsp}	C96H158N30O28S4	neutre	2307,07	
		[M+2H] ²⁺	1154,55	1154,6
		[M+3H] ³⁺	770,03	770,1
		[M+4H] ⁴⁺	577,78	577,8
L _{TC}	C94H156N32O31S4	neutre	2357,05	
		[M+2H] ²⁺	1179,53	1179,4
		[M+3H] ³⁺	786,69	786,6
		[M+4H] ⁴⁺	590,27	590,2
CP1	C127H202N40O39S2	neutre	2943,46	
		[M+2H] ²⁺	1472,74	1472,7
		[M+3H] ³⁺	982,16	982,1
		[M+4H] ⁴⁺	736,87	736,8
L _{ZAS} (HHCC)	C225H383N65O64S2	neutre	5083,81	
		[M+5H] ⁵⁺	1017,77	1017,8
		[M+6H] ⁶⁺	848,31	848,3
		[M+7H] ⁷⁺	727,27	727,2
		[M+8H] ⁸⁺	636,48	636,5
L _{ZAS} (CHCC)	C222H381N63O64S3	neutre	5049,77	
		[M+3H] ³⁺	1684,26	1684,2
		[M+4H] ⁴⁺	1263,45	1263,4
		[M+5H] ⁵⁺	1010,96	1010,9
		[M+6H] ⁶⁺	842,63	842,6

Tableau e.1 : vérification des modèles synthétisés par spectroscopie de masse (ESI-MS).

3. Caractérisation des complexes peptidiques

Préparation des solutions de peptide

De la poudre de peptide est dégazée dans un pilulier munie d'un bouchon à septum, puis, est dissoute dans de l'eau dégazée. La concentration est d'abord déterminée par un dosage DTNB, méthode développée par Ellman^[1,2]. La quantité de thiols correspond à la quantité de TNB ($\epsilon^{412\text{nm}}=14\ 500\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) dans la solution (Schéma e.2). L'incertitude sur la valeur de la concentration de peptide ainsi déterminée est d'environ 20%. Si la concentration de peptide doit être connue avec une grande précision, un titrage par ZnCl_2 (UV-Vis) est réalisé (voir plus bas).

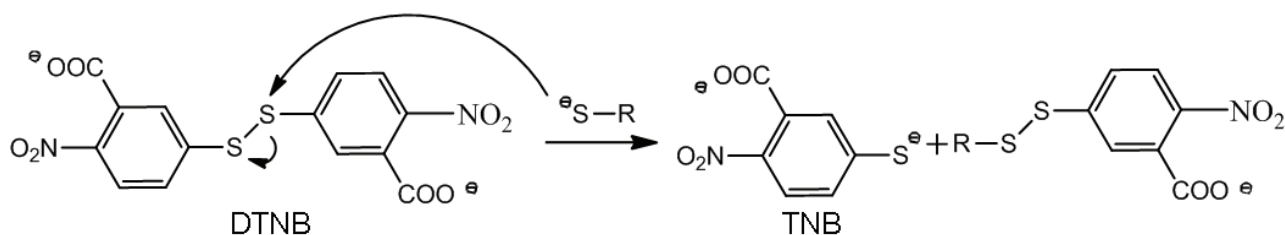


Schéma e.2 : mécanisme réactionnel du « test d'Ellman ». Le pont disulfure du DTNB subit l'attaque nucléophile d'un thiolate libre, libérant ainsi un TNB absorbant fortement à 412nm.

La solution de peptide peut être conservée ainsi (solution acide, sous argon) et utilisée dans la semaine, ou peut être complexée (voir plus bas).

Titrages UV/CD/Fluorescence

Un même titrage, d'un peptide par un métal, peut être suivi en parallèle en spectrophotométries UV, CD, et de fluorescence.

Dans une cuve en quartz fermée par un septum, une solution de tampon phosphate 20-100 mM pH 7,0 dégazée est préparée avec 250-500µM de TCEP (pour réduire le peptide qui pourrait s'oxyder lors du titrage). Un volume de solution de peptide, précédemment dosé au DTNB, est ajouté de manière à ce que sa concentration finale soit de l'ordre de 10-25µM. La solution de sel métallique est alors ajoutée par 0,1-0,2 équivalents M/L.

Lorsque les spectres des titrages sont retraités, les décalages de la ligne de base sont supprimés, puis, l'effet de la dilution (dû aux différents ajouts) est corrigé pour chaque spectre, en ramenant la concentration de peptide à sa valeur en début de titrage.

L'abscisse de la rupture de pente permet de corriger la concentration précédemment estimée au DTNB. C'est cette concentration qui sera ensuite utilisée pour les expériences suivantes.

Détermination de la constante de complexation du zinc pour un peptide

Le peptide libre est mis en présence d'un chélateur du zinc (NTA, EGTA, HEDTA, EDTA ou TPEN) dans un tampon Pi 100mM pH 7,0 dégazé, en présence de 250µM de TCEP, dans une cuve à septum. Un titrage par une solution de ZnCl₂ est réalisé en suivant la complexation du peptide par spectrophotométrie UV et dichroïsme circulaire. Dans le cas où les affinités pour Zn²⁺ du peptide et du compétiteur sont proches, les données sont simulées en utilisant le logiciel SPECFIT. Le paramètre ajusté est la constante apparente de complexe Zn²⁺/peptide.

Dans le cas des compétitions, étant donné l'affinité du compétiteur pour le zinc, et puisque le zinc est toujours en sous-stœchiométrie par rapport aux chélateurs

(peptide+compétiteur), nous pouvons négliger la quantité de zinc complexé par le tampon Phosphate.

Dans le cas où la complexation du zinc par le phosphate n'est pas négligeable, il faut l'introduire dans le modèle de simulation. L'espèce HPO_4^{2-} forme un complexe 1:1 avec l'ion Zn^{2+} , avec une affinité $K=10^{2,4}$.^[3] Néanmoins, tout le phosphate n'est pas sous cette forme à pH 7,0 : en effet, dans une solution à 0,1 M NaNO_3 à 25°C $\text{pKa} (\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}) = 6,73$.^[3] En prenant ces valeurs, une constante de complexation apparente de notre tampon de $K=10^{2,2}$ est obtenue.

RMN ^1H (500 MHz)

Une solution de peptide ~2,5 mM (dosage DTNB) est préparée dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9 :1. On y ajoute 1,1 équivalent de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ (solution à 0,1M), puis, le pH est ajusté à 6,3. La solution est transférée dans un tube RMN, dégazée ($\text{Ar}_{(\text{g})}$), et le tube est fermé hermétiquement.

L'acquisition des spectres ainsi que le calcul des structures est réalisé par Olivier Sénèque, selon le protocole décrit précédemment^[4,5]. Puisque ce n'est pas moi qui l'ai fait, ce travail ne sera pas décrit ici.

4. Réactivité des complexes vis-à-vis de l'acide hypochloreux

Préparation de la solution de complexe

Une solution de peptide libre est préparée comme décrit plus haut. Dans le pilulier, 1,1 équivalent de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ 0,1M est ajouté, et le pH de la solution est élevé jusqu'à pH~7-8 afin de déprotoner les cystéines pour permettre la formation du complexe. La solution de complexe est ainsi conservée sous argon et peut être utilisée dans la semaine.

Solution de NaOCl

Une solution diluée de NaOCl est préparée à partir d'une solution stock (env. 2%). La concentration exacte de cette solution diluée est déterminée en mesurant l'absorbance à 292nm ($\epsilon^{292\text{nm}} = 350 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)^[6]. La solution est conservée au frais, et son absorbance est mesurée régulièrement, avant utilisation.

Oxydation d'un peptide, libre ou complexé, par NaOCl, en vue d'analyse en HPLC

HOCl étant une espèce très réactive, il faut pouvoir homogénéiser rapidement la solution contenant le peptide et celle contenant l'oxydant, afin d'éviter les effets de fortes

concentrations locales. Pour ce faire, une solution de complexe est diluée dans le tampon, dans le fond d'un eppendorf. Dans le capuchon de l'eppendorf, on forme une goutte composée de la solution de NaOCl et de tampon. A $t=0$, l'eppendorf est fermé et agité rapidement de haut en bas. Au bout de 5-30 secondes (ce temps varie en fonction de la concentration de NaOCl), une solution de méthionine est ajoutée pour réagir avec l'excédent de HOCl, afin de stopper l'oxydation. Si ça n'est pas fait, puisqu'il n'y a que le peptide et HOCl dans le milieu, il peut y avoir des réactions parasites. De plus, il n'y a plus de HOCl lorsque l'échantillon est injecté en HPLC : les éluants sont acides (0,1%TFA) et, dans ces conditions, HOCl peut former du Cl_2 qui peut détériorer la colonne HPLC.

Digestion enzymatique des isomères bis-disulfures

Les trois bis-disulfures ont été isolés par HPLC et lyophilisés. Les poudres sont dissoutes en tampon phosphate (20mM pH 7,7), les enzymes (Trypsine et Glutamate Carboxy peptidase) sont ajoutées et la solution est incubée une nuit à 37°C. Le mélange de digestion est analysé en spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation. Les pics de masse détectés sont rassemblés dans le Tableau e.3 : on y voit, en plus des masses décrites dans le Chapitre I, des masses correspondants à des peptides partiellement digérés.

Fragments	Formule brute	Masse exacte (g/mol)	Pic tr=12,6min	Pic tr=14min	Pic tr=15,9min
YPPK	C25H37N5O6	503,27	504,24		504,24
$\text{C}_2\text{EC}_4\text{NAAK}$	C27H45N9O11S2	735,27			736,23(+) 368,56(2+)
$\text{VC}_{11}\text{K} \quad \text{NC}_{14}\text{QTR}$	C36H66N14O13S2	966,44			967,45(+) 484,17 (2+)
$\text{AcKC}_2\text{E} \quad \text{NC}_{14}\text{QTR}$	C38H66N14O16S2	1038,42		1039,43(+) 520,1(2+)	
$\text{C}_2\text{E} \quad \text{NC}_{14}\text{QTR}$	C30H52N12O14S2	868,31		869,3(+) 435,1(2+)	
$\text{C}_4\text{NAAK} \quad \text{VC}_{11}\text{K}$	C33H61N11O11S2	851,4		852,4(+) 426,62(2+)	
$\text{AcKC}_2\text{E} \quad \text{VC}_{11}\text{K}$	C30H54N8O11S2	766,33	767,3(+) 384,07(2+)		
$\text{C}_2\text{E} \quad \text{VC}_{11}\text{K}$	C22H40N6O9S2	596,23	597,18(+) 299,1(2+)		
$\text{C}_4\text{NAAK} \quad \text{NC}_{14}\text{QTR}$	C41H73N17O16S2	1123,48	562,71(2+)		
$\text{AcKC}_2\text{EC}_4\text{NAAK} \quad (2\text{S-S})$ $\text{VC}_{11}\text{K} \quad \text{NC}_{14}\text{QTR}$	C71H125N25O26S4	1871,81	937,42(2+) 625,1(3+)	936,94(2+) 625,1(3+)	
$\text{C}_2\text{EC}_4\text{NAAK} \quad (2\text{S-S})$ $\text{VC}_{11}\text{K} \quad \text{NC}_{14}\text{QTR}$	C63H111N23O24S4	1701,7	851,9(2+) 568,47(3+)	851,88(2+) 568,43(3+)	
$\text{AcKC}_2\text{EC}_4\text{NAAK} \quad (2\text{S-S})$ $\text{VC}_{11}\text{KNC}_{14}\text{QTR}$	C71H123N25O25S4	1853,8		927,9(2+) 619,22(3+)	
$\text{C}_2\text{EC}_4\text{NAAK} \quad (2\text{S-S})$ $\text{VC}_{11}\text{KNC}_{14}\text{QTR}$	C63H109N23O23S4	1701,7		842,8(2+) 562,47(3+)	

Tableau e.3 : tableau complet des masses détectées après digestion des pics bis-disulfures de L_{Hsp} isolés (voir Chapitre I). Les quatre espèces en bas du tableau correspondent à des peptides partiellement digérés contenant deux ponts disulfures : ils confirment que les deux espèces à $\text{tr}=12,6\text{min}$ et $\text{tr}=14\text{min}$ sont des isomères inter-motifs.

Suivis spectroscopiques de l'oxydation d'un complexe peptidique par NaOCl (fluo/UV)

Dans une cuve en quartz, une solution de complexe (15-20mM) est préparée dans du tampon Pi (20-100mM) pH 7 ou 7,4. Le NaOCl est ajouté par petites quantités (0,1-0,4 équivalent) à la seringue (préalablement rincée plusieurs fois avec la solution de NaOCl). Après chaque ajout, la seringue est vidée. La solution diluée de NaOCl est conservée dans la glace. La seringue n'est remplie que juste avant l'ajout suivant. Les spectres d'absorption UV-Vis ou d'émission (fluorescence) sont enregistrés à chaque ajout.

Compétition ZnL/Methionine-HOCl

Des titrages ont été réalisés de manière similaire au protocole décrit ci-dessus, à la différence qu'en plus du complexe peptidique, de la méthionine est ajoutée en début de titrage. Le NaOCl ajouté est consommé par le complexe et par la méthionine. Les spectres d'absorption UV-Vis ou d'émission (fluorescence) sont enregistrés à chaque ajout de NaOCl. La disparition du complexe initial est ensuite simulée avec SPECFIT, en entrant comme paramètres les concentrations de méthionine et de complexe, ainsi que le rapport de leur vitesse vis-à-vis de HOCl. Le modèle cinétique et les valeurs des paramètres sont décrits dans le Chapitre 1.

Mesure cinétique directe de l'oxydation d'un modèle ZnL par NaOCl (Stopped flow)

L'appareil se compose d'une partie optique (lampe, détecteur, et cuve) et d'une partie « solutions » (seringues et mélangeurs), voir Schéma e.3. La partie « solution » ainsi que la cellule optique sont thermostatées (25°C).

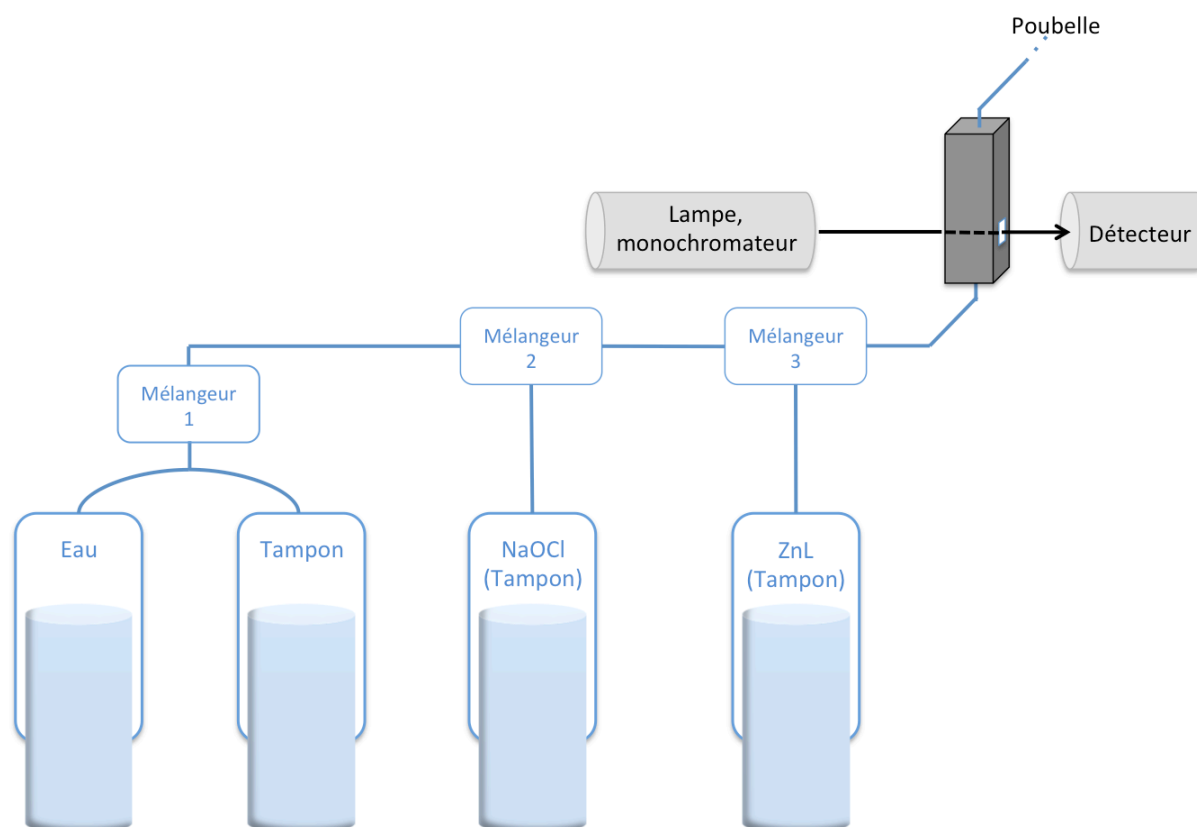


Schéma e.3 : Montage de cinétique rapide à flux arrêté (« stopped flow »). La partie optique est colorée en gris, tandis que la partie « solutions » est colorée en bleu.

Non schématisé ici, le « hard-stop » est une électro-vanne à haute vitesse qui se trouve à la sortie de la cuve. Elle est ouverte lors de la poussée des seringues et se ferme au moment où cette phase de poussée s'arrête. Cela permet d'avoir un mélange homogène dans la cuve, dont on suit l'évolution de l'absorbance après que le flux a été arrêté.

Le temps mort correspond au temps nécessaire à la solution pour parcourir la ligne depuis le mélangeur (où les deux réactifs sont mélangés) jusqu'à la cuve UV. Il dépend donc de la vitesse du débit et de la longueur de la ligne. Ainsi, pour le limiter, dans nos expériences nous mettons toujours les solutions de NaOCl et de complexe dans les seringues les plus près du mélangeur 3, et le débit choisi est le plus fort autorisé.

Les deux seringues les plus éloignées de la cuve sont remplies avec de l'eau et avec du tampon. La seringue d'eau permet de bien rincer les lignes avant et entre les expériences. Celle de tampon permet de diluer les solutions des réactifs afin de mesurer la vitesse de la réaction pour des concentrations différentes.

Les solutions tampons sont préparées à partir de solution de NaH_2PO_4 0,1M et de NaClO_4 0,8M, de manière à ce que $[\text{Pi}]_f = 20\text{mM}$ et que leur force ionique soit $I = 0,62 \pm 0,02$. Le pH est alors ajusté avec NaOH concentré. (Remarque : les espèces prises en compte pour le calcul de I sont : Na^+ , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , ClO_4^- et HO^-). Pour chaque expérience, les solutions de

NaOCl (50-800 μM) et de complexes (2-10 μM) sont préparées en diluant nos solutions mères (NaOCl et ZnL) avec le même tampon (fioles jaugées).

Une fois les seringues remplies et thermostatées, nous commençons par remplir le circuit et la cuve avec du tampon, sur lequel le blanc est enregistré. Ensuite, nous définissons des mélanges réactionnels en indiquant le volume total injecté dans le système, puis, le nombre de « portions » de ce volume que chaque seringue va injecter dans le circuit. Pour chaque « jeu » de portions, plusieurs « tirs » sont réalisés. Le signal suivi est l'absorbance à 230nm : nous observons la disparition de la bande de transfert de charge $\text{S}^- \rightarrow \text{Zn}^{2+}$ lors de l'oxydation des cystéines. Le choix de cette longueur d'onde est un compromis : elle correspond au recouvrement entre la bande de transfert de charge et le spectre d'émission de la lampe de l'appareil. En effet, pour avoir un bon rapport signal/bruit, il faut qu'à la longueur d'onde suivie, l'émission de la lampe soit intense, et que le coefficient d'extinction molaire de notre complexe soit grand.

Après acquisition, les données sont traitées comme suit. D'abord, les différents tirs réalisés dans les mêmes conditions sont superposés. Les traces aberrantes sont supprimées, et celles qui concordent sont moyennées afin d'en améliorer le rapport signal/bruit. Ces traces moyennes sont alors simulées en leur ajustant une courbe de décroissance exponentielle. La suite de la procédure est décrite dans le Chapitre A.

5. Réactivité des complexes vis-à-vis de l'oxygène singulet

Préparation des tampons D_2O

Nos tampons sont préparés en dissolvant les sels de tampons (Na_2HPO_3 , MES, MOPS) dans du D_2O . Ils sont ensuite passés sur une résine CHELEX préalablement lavée au D_2O . Leur pH est enfin ajusté avec DCl et NaOD : avec un pH-mètre étalonné de manière standard, on utilise la formule $\text{pD} = \text{pH}_{\text{lu}} + 0,44$ ^[7,8].

Préparation des solutions de complexe et de peptide libre

Elles sont préparées comme décrit plus haut, sauf qu'ici, le peptide est dissout dans D_2O et complexé avec 1,1 équivalent $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ 0,1M (D_2O).

Préparation des solutions de photo-sensibilisateur et de piège à 1O_2

De même, les photo-sensibilisateurs (rose bengal, bleu de méthylène, phénalène sulfonate) ainsi que les anthracènes (AVS, AMM, AP) sont préparés dans D_2O . Leur concentration est déterminée par absorbance (Tableau e.3).

	AVS ^a	AMM ^b	AP ^b	EGWGK ^c	Bleu de Méthylène ^d	Rose bengal ^e
λ (nm)	398	380	380	280	664	554
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	11 600	9 000	9 800	5 690	78 000	68 000

Tableau e.3 : Propriétés optiques utilisées dans cette étude pour déterminer la concentration des solutions de pièges à oxygène singulet et de photo-sensibilisateurs. a) Déterminé par pesée du sel disodique de l'AVS. b) ref. ^[9]. c) Coefficient d'extinction molaire du tryptophane de N-Acetyl-L-Tryptophanamide^[10]. d) ref. ^[11]. e) ref. ^[12].

Nous ne disposons pas de coefficient d'extinction molaire de la Phénalène-1-one-5-sulfonate (PNS). Nous ne déterminons pas sa concentration en solution, seulement l'absorbance du mélange à 355nm : l'absorption à cette longueur d'onde correspond à la transition qui conduit aux états excités de la molécule capables de générer de l'oxygène singulet^[13]. Pour les solutions préparées en vue d'être irradiées, $A^{355nm}=0,1-0,2$.

Photo-oxydation de produits non-sensibles à 3O_2 (anthracènes, EGWGK et ZnL)

Dans un tampon deutéré, on mélange un photo-sensibilisateur ($\sim 0,5-2\mu M$) et un ou plusieurs accepteurs d'oxygène singulet ($50-200\mu M$). La solution est mise à thermostat dans le montage représenté Schéma e.4. L'éppendorf étant ouvert, les gaz dissouts, notamment le dioxygène, ont le temps de s'équilibrer (entre l'air et la solution). La solution est ensuite irradiée avec la lampe halogène 400W, de quelques secondes à quelques minutes. La lumière de la lampe halogène traverse le bain en verre, ce qui filtre une partie des radiations UV.

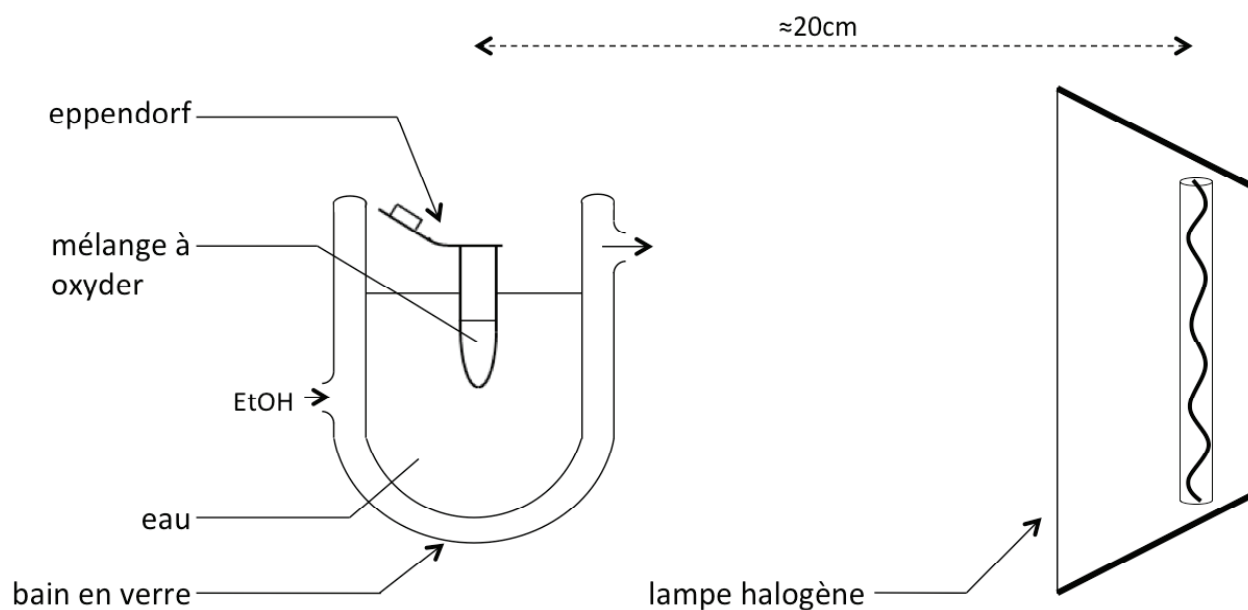


Schéma e.4 : Montage utilisé pour réaliser les photo-oxydations. L'eau du bain est maintenue à 4,5°C par circulation d'éthanol froid dans les parois du bain.

Après oxydation, les échantillons sont soit injectés immédiatement en HPLC, soit congelés. Avant analyse HPLC, des réactifs sont ajoutés à certains échantillons : de la TCEP (pour réduire les disulfures et les thiosulfonates) ou un agent alkylant (FB BB, NEM, etc.). Ceci permet d'identifier les temps de rétention correspondant aux espèces sulfonates et bis-disulfure, respectivement.

Photo-oxydation des peptides libres

Contrairement à leur complexe de zinc, les peptides libres s'oxydent à l'air dans nos tampons (pH>6). Aussi, la procédure pour les photo-oxyder diffère légèrement de celle décrite ci-dessus, afin de n'observer que l'oxydation due à l'oxygène singulet, et pas celle causée par le dioxygène à l'état fondamental ($^3\text{O}_2$).

La solution de tampon (D_2O) contenant le photo-sensibilisateur ($\sim 1\text{-}2\mu\text{M}$) est préparée et diluée de manière à ce qu'il n'y ait plus qu'à ajouter la solution de peptide libre (pour obtenir une concentration finale d'environ $50\text{-}100\mu\text{M}$). Cette solution est alors mise à thermostat à l'air libre. Au dernier moment, la solution de peptide libre (acide) est ajoutée, la solution est rapidement homogénéisée, irradiée, puis, on y ajoute quelques μL de solution TFA 0,5% pour que la solution soit à pH 2-3. On évite ainsi l'oxydation des peptides par l'air, entre l'irradiation et l'analyse de l'échantillon. Pour les échantillons dans lesquels de la TCEP est rajoutée, le pH est élevé au dessus de 6 avec une solution de NaOH, afin que la réduction des disulfures soit efficace.

Plus haut est le pH du tampon, plus court est le temps séparant l'ajout de peptide libre et l'ajout de TFA (10sec pour pD 9,6, à 90sec pour pD 5,6). De plus, plus le pH est haut, plus le temps d'irradiation est court (2sec pour pD 9,6, à 21sec pour pD 5,6). Afin de vérifier que dans ces conditions le peptide n'est pas oxydé par $^3\text{O}_2$, l'expérience est reconduite dans les mêmes conditions, à l'exception qu'on n'ajoute pas le photosensibilisateur. Un autre contrôle a été fait en ajoutant le photosensibilisateur, mais en n'allumant pas la lampe halogène, ce qui permet de vérifier l'absence de réaction entre le peptide et le photosensibilisateur, en l'absence de lumière.

Quantification de l'espèce disulfure de CP1 produite lors de l'oxydation de ZnCP1

Un mélange de ZnCP1 (~150 μM) et de bleu de méthylène (~1,5 μM), dans un tampon Pi pD 8, est irradié puis injecté en HPLC. Le mélange (CP1 réduit)+(CP1 disulfure) ($t_r=24,3\text{min}$), est récolté en sortie d'HPLC, puis lyophilisé. La poudre obtenue est dégazée et entrée en boîte à gants, il y est dissout dans 60 μL d'eau. En boîte à gants, une cuve UV est préparée avec 900 μL de tampon Pi 100mM pH 7,0. Le blanc est enregistré, 50 μL de CoSO_4 3,43 mM sont ajoutés et le spectre UV-Vis est enregistré. 50 μL de cette solution sont ajoutés dans la cuve et le spectre est enregistré afin de quantifier le peptide réduit en mesurant l'apparition des bandes de transitions d-d du cobalt. (Remarque : $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ne présente pas de bande de transition d-d dans la fenêtre 600-700nm, là où se trouve le maximum d'absorbance du Co^{II} complexé par CP1. Ainsi, dans cette fenêtre, l'intensité des bandes d-d est directement proportionnelle à la concentration de CoCP1.) Finalement, 10 μL de TCEP 100mM sont ajoutés afin de réduire les disulfures. L'enregistrement du spectre permet de quantifier la totalité de peptide CP1 (réduit+oxydé) dans la cuve. Nous obtenons alors le rapport $[\text{peptide oxydé}]/[\text{peptide réduit}]$ pour le pic $t_r=24,3\text{min}$.

De plus, le chromatogramme du mélange obtenu après oxydation permet de quantifier les sulfinates : on retrouve ainsi les quantités de chaque produit.

Digestion enzymatique des produits d'oxydation :

Les différents produits d'oxydation ont été isolés par HPLC et lyophilisés. Les poudres obtenues (0,1-0,2mg) sont dissoutes dans 200 μL H_2O . A un échantillon de 50 μL de cette solution, 140 μL d'acétate d'ammonium (25mM) pH 7,0 sont ajoutés, ainsi que 10 μL de peptidase (Trypsine 40ng. μL^{-1} ou Glumatate carboxypeptidase 200ng. μL^{-1}). Les solutions sont incubées à 37°C sur la nuit, puis analysées par spectrométrie de masse (ESI-MS ou LC-MS), avec ou sans TCEP.

Mesure de désactivation de l'oxygène singulet (collaboration)

Les mesures de phosphorescence de l'oxygène singulet ont été réalisées par Arnaud Tron et Luca Scarpantonio dans l'équipe de Nathan McClenaghan à l'ISM (Bordeaux I).

Rapidement, le temps de vie de l'oxygène singulet a été mesuré en solution en suivant la décroissance de l'émission à 1270nm. L'oxygène singulet est généré par un laser pulsé (532nm pour les solutions de rose bengal, ou 355nm pour les solutions de PNS). Après ce « pulse », une diode au germanium détecte l'émission de photons à 1270nm par la solution due à la désexcitation radiative du $^1\text{O}_2$ en son état fondamental, $^3\text{O}_2$.

Une solution de photosensibilisateur (quelques μM) est préparée dans 20mM tampon Pi pD 7 (D_2O). Cette solution est utilisée pour dissoudre la poudre de complexe ZnL (préparée, dosée, lyophilisée). Différentes cuves sont préparées en mélangeant du tampon et de la solution de complexe. Ainsi, quelles que soient les proportions du mélange, la concentration en photosensibilisateur et la proportion $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ restent les mêmes. Seule la concentration de complexe varie, et est responsable de la variation du temps de vie de $^1\text{O}_2$ dans ces cuves. De ces mesures sont ainsi déduits les vitesses de désactivation totales (k_T) de l'oxygène singulet de nos complexes.

Références

- [1] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Meth. Enzymol.* **1983**, 91, 49–60.
- [2] P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, *Anal. Biochem.* **2003**, 312, 224–227.
- [3] D. Banerjea, T. A. Kaden, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 2586–2590.
- [4] O. Sénèque, E. Bourlès, V. Lebrun, E. Bonnet, P. Dumy, J.-M. Latour, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 6888–6891.
- [5] O. Sénèque, E. Bonnet, F. L. Joumas, J.-M. Latour, *Chem.-Eur. J.* **2009**, 15, 4798–4810.
- [6] J. C. Morris, *J. Phys. Chem.* **1966**, 70, 3798–3805.
- [7] A. Krezel, W. Bal, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 161–166.
- [8] P. K. Glasoe, F. A. Long, *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 188–190.
- [9] N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, O. A. Yuzhakova, V. M. Negrimovskii, O. L. Kaliya, E. A. Luk'yanets, *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, 71, 36–41.
- [10] S. Gill, P. Vonhippel, *Anal. Biochem.* **1989**, 182, 319–326.
- [11] N. Houba-Herlin, C. M. Calberg-Bacq, J. Piette, A. Van de Vorst, *Photochemistry and Photobiology* **1982**, 36, 297–306.
- [12] O. Valdes-Aguilera, D. C. Neckers, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1989**, 47, 213–222.
- [13] M. Segado, M. Reguero, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 4138–4148.

Zinc fingers and oxidative stress : reactivity towards singlet oxygen and hypochlorous acid

Widely spread in the living world, zinc finger proteins constitute a large superfamily, with a zinc site of general formula $[Zn^{II}(Cys)_{4-x}(His)_x]$ ($x=0, 1$ or 2) as a common feature. Whereas the majority of such sites plays a purely structural role, a few of them exhibit a reactive function (e.g. oxidative stress detection). Indeed, zinc finger sites of Hsp33 and RsrA have been shown to act as redox switches^[1,2]: transmitting the information “oxidative stress” as a structural signal, by means of oxidation/reduction of its Zn^{II} -coordinating cysteines. However, the precise mechanism of the oxidation step remains poorly understood.

Given the occurrence of zinc finger proteins and their key roles, it is of high biological interest to identify factors controlling their reactivity and to understand why some ROS are able to oxidize them *in vivo*, on the contrary to H_2O_2 . In this project, we decided to focus on two major ROS: hypochlorous acid (HOCl), a key player of the immune response, and singlet oxygen (1O_2), produced in significant amount by photosynthetic organisms. By use of peptide model complexes, reproducing perfectly the structure of some archetypal zinc fingers, we investigated the reactivity of zinc fingers toward those ROS.

Doigts de zinc et stress oxydant : réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet et de l'acide hypochloreux

Très répandues dans le monde vivant, les protéines à doigt de zinc constituent une super-famille dont les membres possèdent un site à zinc de formule générale $[Zn^{II}(Cys)_{4-x}(His)_x]$ ($x=0, 1$ or 2). Tandis que la majorité de ces sites joue un rôle purement structural, certains présentent une fonction réactive, comme la détection de stress oxydant par exemple. En effet, les sites doigt de zinc de Hsp33 et de RsrA ont été décrits comme des interrupteurs rédox^[1,2] : transmettant l'information « stress oxydant » sous forme d'un signal structural, via l'oxydation/réduction des cystéines coordonnées au zinc, détruisant/reformant le domaine doigt de zinc. Cependant, certains aspects de l'étape d'oxydation restent mal compris.

Étant donné le grand nombre des protéines à doigt de zinc et leurs rôles clés, il est de tout intérêt d'identifier les facteurs contrôlant leur réactivité afin de comprendre pourquoi certaines espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont capable d'oxyder des doigts de zinc *in vivo*, contrairement à H_2O_2 . Durant ce projet, nous avons décidé de nous focaliser sur deux ERO très puissantes et jouant un rôle important en biologie : l'acide hypochloreux (HOCl) et l'oxygène singulet (1O_2). Nous étudierons la réactivité des doigts de zinc vis-à-vis de ces deux oxydant en utilisant des modèles peptidiques, reproduisant parfaitement la structure de doigts de zinc courants.

1. Kröncke, K.-D.; Klotz, L.-O.; *Antioxidants & redox signaling* **2009**, *11*, 1015-1027.

2. Ilbert, M.; Graf, P.C.F.; Jakob, U.; *Antioxidants & redox signaling* **2006**, *8*, 835-846.