



HAL
open science

Modulation de l'activité SOD par contrôle de la sphère de coordination du Ni(II) dans des complexes bioinspirés

Jérémy Domergue

► To cite this version:

Jérémy Domergue. Modulation de l'activité SOD par contrôle de la sphère de coordination du Ni(II) dans des complexes bioinspirés. Chimie inorganique. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV023 . tel-02955508

HAL Id: tel-02955508

<https://theses.hal.science/tel-02955508>

Submitted on 2 Oct 2020

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 LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Chimie Inorganique et Bioinorganique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Jérémy DOMERGUE

Thèse dirigée par **Pascale DELANGLE** et **Carole DUBOC**

préparée au sein des laboratoires **Département de Chimie Moléculaire
de Grenoble** et **Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour
l'Energie et la Santé du CEA Grenoble**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**.

Modulation de l'activité SOD par contrôle de la sphère de coordination du Ni^{II} dans des complexes bioinspirés

Thèse soutenue publiquement le **30 septembre 2019**,
devant le jury composé de :

Dr. Stéphane MENAGE

Directeur de recherche au CNRS Grenoble, Président du jury

Pr. Peter FALLER

Professeur à l'Université de Strasbourg, Rapporteur

Pr. Clotilde POLICAR

Professeur à l'École Normale Supérieure de Paris, Rapporteur

Pr. Frédéric BANSE

Professeur à l'Université Paris-Sud, Examineur

Dr. Christine CAVAZZA

Ingénieur-chercheur au CEA Grenoble, Examineur

Dr. Pascale DELANGLE

Ingénieur-chercheur au CEA Grenoble, Directrice de thèse, Membre invité

Dr. Carole DUBOC

Directrice de recherche au CNRS Grenoble, Directrice de thèse, Membre invité



*« La chimie est à la biologie
ce que le solfège est à la musique »*

Pierre Potier

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury : Peter Faller, Clotilde Policar, Frédéric Banse, Christine Cavazza et Stéphane Ménage, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie Frédéric Chandezon et Serge Cosnier pour m'avoir accueilli au sein des laboratoires Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé du CEA Grenoble, et Département de Chimie Moléculaire de l'Université Grenoble Alpes.

Je tiens à remercier particulièrement Pascale Delangle et Carole Duboc, mes directrices de thèse, sans qui ces trois ans n'auraient pu aussi bien se passer, d'un côté scientifique, mais aussi d'un côté humain. Pascale, merci pour les discussions que nous avons eues et qui m'ont beaucoup apporté, pour ton exigence et ta précision qui m'ont fait progresser et qui m'ont permis de réaliser ces travaux. Carole, merci pour ta bonne humeur sans faille et pour ton optimisme qui sont très motivants et qui m'ont poussé à aller chercher de nouveaux résultats. Merci pour votre encadrement et pour tous vos enseignements qui me suivront pendant longtemps.

Je remercie Christelle Gateau pour son aide en synthèse organique, ainsi que pour ses remarques toujours pertinentes et intéressantes. Je remercie Marcello Gennari pour son aide au laboratoire et pour avoir patiemment répondu à mes innombrables questions. Merci à Colette Lebrun pour m'avoir formé à la synthèse peptidique, sur les HPLC, et pour les analyses par spectrométrie de masse. Merci à Jacques Pécaut pour son aide avec les analyses des spectres EXAFS, ainsi que pour les analyses en spectrométrie de masse. Merci à Pascale Maldivi pour avoir réalisé les nombreux calculs DFT. Je remercie également Alan Le Goff pour son aide en électrochimie, et Pierre-Alain Bayle pour l'utilisation des spectromètres RMN. Je remercie Olivier Proux pour son aide pendant les acquisitions à l'ESRF, mais aussi pendant l'analyse des résultats et pour avoir pris le temps de répondre à toutes nos questions. Merci également à toute l'équipe de la ligne FAME. Merci à Fabrice Thomas et Olivier Sénèque pour leur aide avec le stopped-flow. Merci à Florian Molton pour les analyses RPE et pour m'avoir formé sur le spectromètre.

Merci à Christine Cavazza et Pascale Maldivi pour avoir fait partie de mon Comité de Suivi Individuel, pour vos conseils et vos remarques pertinentes.

Je remercie également Magali Douillard et Pawel Guinard, stagiaires qui m'ont beaucoup apporté dans ce projet.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres des équipes CIBEST et CIRE. Ces trois années de thèse m'ont permis de rencontrer des personnes formidables que je n'oublierai jamais.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	10
ACIDES AMINES ET PEPTIDES	11
1. LISTE DES ACIDES AMINES	11
2. NOMENCLATURE	11
INTRODUCTION	15
CHAPITRE I. LA NICKEL SUPEROXYDE DISMUTASE ET SES COMPLEXES MODELES	19
1. PROPRIETES DU NICKEL	19
2. LE NICKEL EN BIOLOGIE	20
2.1. ENZYMES SANS ACTIVITE REDOX	20
2.2. ENZYMES REDOX ACTIVES	21
2.3. DE NOUVELLES ENZYMES AVEC UN ION NICKEL COMME COFACTEUR	24
3. LES SUPEROXYDES DISMUTASES	24
3.1. LE STRESS OXYDANT ET LE RADICAL ANION SUPEROXYDE	24
3.2. LES SUPEROXYDES DISMUTASES (SODs)	26
3.3. LA Ni-SOD	28
4. LES MODELES DE LA Ni-SOD	31
4.1. MODELES PEPTIDIQUES	31
4.2. MODELES SYNTHETIQUES	35
5. OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE	38
6. RÉFÉRENCES	39
CHAPITRE II. LIGANDS TRIPODES FONCTIONNALISES PAR DES ACIDES AMINES	49
1. CONTEXTE ET OBJECTIFS	49
2. SYNTHESE DES LIGANDS	50
2.1. SYNTHESE DE L^{2S}	50
2.2. SYNTHESE DE L^{3S}	53
3. PREPARATION DES SOLUTIONS DE LIGAND	53
4. LIGAND DISSYMETRIQUE	54
4.1. STECHEIOMETRIE DES COMPLEXES	54
4.2. EFFET DU PH	56

4.3.	STRUCTURE DE $NiL^{2S}(OH_2)$	57
4.3.1	Spectroscopie d'absorption des rayons X.....	57
4.3.2	Etude par DFT	59
4.4.	PROPRIETES REDOX	60
4.5.	ACTIVITE CATALYTIQUE	61
4.5.1	Description du test à la Xanthine Oxydase	61
4.5.2	Détermination de l'IC ₅₀	63
5.	LIGAND SYMETRIQUE	64
5.1.	STÆCHIOMETRIE DES COMPLEXES.....	64
5.2.	EFFET DU PH.....	66
5.3.	STRUCTURE DES COMPLEXES.....	67
5.3.1	Analyse par RMN ¹ H.....	68
5.3.2	Spectroscopie d'absorption des rayons X.....	69
5.3.3	Etude par DFT	71
5.4.	PROPRIETES REDOX.....	73
5.5.	DETERMINATION DE L'IC ₅₀	74
5.6.	STOPPED-FLOW	75
5.6.1	Principe de fonctionnement	75
5.6.2	Application pour évaluer une activité SOD.....	77
5.6.3	Lois de vitesse	77
5.6.4	Détermination de l'activité catalytique	78
6.	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	80
7.	REFERENCES	81
 CHAPITRE III. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE MODÈLES PEPTIDIQUES		87
1.	CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	87
1.1.	COMPLEXES PEPTIDIQUES DE Ni^{II} DECRITS DANS LA LITTÉRATURE	87
1.2.	CHOIX DES SEQUENCES PEPTIDIQUES.....	89
2.	SYNTHÈSE DES LIGANDS PEPTIDIQUES	93
2.1.	PEPTIDES LINEAIRES	94
2.2.	PEPTIDE NON LINEAIRE CE(H)C	95
3.	FORMATION DES COMPLEXES DE $Ni(II)$.....	97
3.1.	CINETIQUE DE FORMATION DES COMPLEXES	97
3.2.	STÆCHIOMETRIE DES COMPLEXES.....	98
3.3.	EFFET DU PH.....	102
3.3.1	Evolutions spectroscopiques	102
3.3.2	Modélisations	103
4.	STRUCTURE DES COMPLEXES	107
4.1.	ETUDE PAR RMN ¹ H.....	107
4.2.	ETUDE PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X (XAS).....	110
4.2.1	XANES.....	110
4.2.2	EXAFS	111
4.3.	ETUDE PAR DFT	115
5.	PROPRIETES REDOX	118

5.1.	VOLTAMPEROMETRIE CYCLIQUE	118
5.2.	STABILITE DES COMPLEXES A L'AIR	120
6.	ACTIVITE CATALYTIQUE.....	121
6.1.	DETERMINATION DE L'IC ₅₀	121
6.2.	STOPPED-FLOW	122
7.	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	126
8.	REFERENCES	129
CHAPITRE IV.	ETUDE MECANISTIQUE EN MILIEU ORGANIQUE	133
<hr/>		
1.	CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	133
2.	CARACTERISATION DES COMPLEXES EN PHASE ORGANIQUE	135
2.1.	SYNTHESE DES COMPLEXES	135
2.2.	CARACTERISATION PAR SPECTROSCOPIE.....	135
2.2.1	Spectroscopie UV-Visible	135
2.2.2	Spectroscopie d'absorption des rayons X.....	136
3.	INTERACTION AVEC LE SUPEROXYDE	138
3.1.	SPECTROMETRIE DE MASSE.....	138
3.2.	RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE.....	139
4.	SPECTRO-ELECTROCHIMIE UV-VIS.....	140
5.	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	143
6.	REFERENCES	144
CONCLUSION		149
<hr/>		
EXPERIMENTAL PART		155
<hr/>		
1.	SYNTHESIS.....	155
1.1.	GENERAL PROCEDURE	155
1.1.1	Electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS).....	155
1.1.2	Nuclear magnetic resonance (NMR).....	155
1.1.3	High performance liquid chromatography (HPLC).....	155
1.2.	LIGAND L ²⁵	156
1.2.1	Synthetic pathway in solution	156
1.3.	LIGAND L ³⁵	160
1.4.	SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS (SPPS)	160
1.4.1	Linear peptides (AcCAC, FAC, HAC, CAC, CHC)	160
1.4.2	Nonlinear peptide CE(H)C.....	162
2.	METAL BINDING STUDIES	163
2.1.	SOLUTION PREPARATION.....	163
2.2.	UV AND CD SPECTROSCOPY	163
2.3.	MASS SPECTROMETRY	164
2.4.	¹ H NMR SPECTROSCOPY	165
2.5.	ELECTROCHEMISTRY.....	165

2.6.	X-RAY ABSORPTION SPECTROSCOPY	165
2.7.	XANTHINE/XANTHINE OXIDASE ASSAY	166
2.8.	KO ₂ SOLUTION IN DMSO	167
2.9.	STOPPED-FLOW	167
2.10.	COMPUTATIONAL DETAILS.....	167
3.	MECHANISTIC STUDY	168
3.1.	ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE	168
3.2.	SPECTROELECTROCHEMISTRY	168
4.	REFERENCES	168
ANNEXES CHAPITRE II.		173
3.	LIGAND DISSYMETRIQUE	173
3.1.	CARACTERISATIONS.....	173
3.2.	EFFET DU PH.....	174
3.3.	STRUCTURE DE Ni(N ₂ S ₂)	175
4.	LIGAND SYMETRIQUE	175
4.1.	RMN ¹ H.....	175
4.2.	CV DE L ³⁵	177
ANNEXES CHAPITRE III.		178
3.	CARACTERISATION DES PEPTIDES.....	178
3.1.	AccCAC.....	178
3.2.	FAC	179
3.3.	HAC	180
3.4.	CAC.....	181
3.5.	CHC.....	182
3.6.	CE(H)C	183
4.	DOSAGES DES PEPTIDES	184
4.1.	SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE.....	184
4.2.	DICHOÏSME CIRCULAIRE	185
5.	SPECTROMETRIE DE MASSE.....	187
6.	EFFET DU PH.....	189
6.1.	SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE.....	189
6.2.	DICHOÏSME CIRCULAIRE	190
7.	RMN ¹H	193
8.	SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X	198
9.	DFT.....	199
10.	ELECTROCHIMIE	200
11.	XANTHINE OXYDASE	200
12.	STOPPED-FLOW.....	201
ANNEXES CHAPITRE IV.		203

TABLE DES MATIERES

3.	SPECTROSCOPIE UV-VIS	203
4.	SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X	203
5.	SPECTROMETRIE DE MASSE	204
RESUME		206

Liste des abréviations

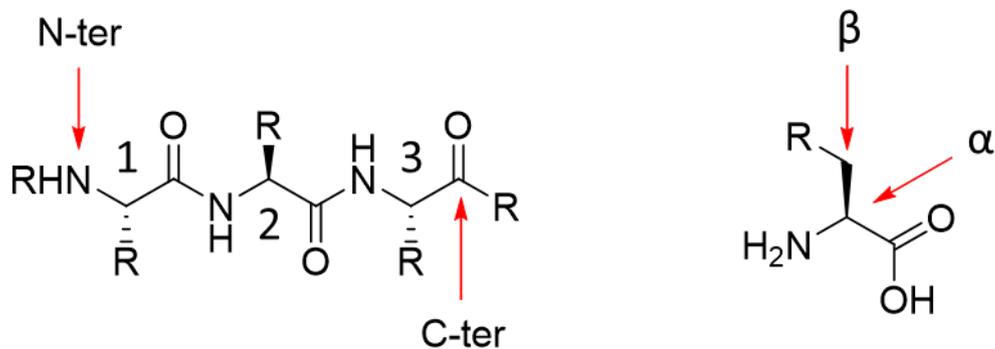
ACN	Acétonitrile
ACS	Acétyl-CoA Synthase
ATCUN	Amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding
BDFE	Bond Dissociation Free Energy / Energie de dissociation de liaison
CD	Circular Dichroism / Dichroïsme circulaire
CODH	CO déshydrogénase
CV	Cyclic Voltametry / Voltampérométrie Cyclique
DFT	Density Functional Theory / Théorie de la Fonctionnelle de la Densité
DMF	Diméthylformamide
DIEA	Diisopropyléthylamine
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
ESI	Electrospray ionisation
Fmoc	9-fluorénylmethoxycarbonyl
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Chromatographie Liquide Haute Performance
IR	Infra-Rouge
KIE	Kinetic Isotope Effect / Effet Isotopique Cinétique
MCR	Méthyl-coenzyme M Réductase
MS	Mass Spectrometry / Spectrométrie de masse
MW	Molecular Weight / Masse Molaire
NOE	Nuclear Overhauser Effect / Effet Overhauser Nucléaire
NTA	Acide nitrilotriacétique
PCET	Proton Coupled Electron Transfer / Transfert d'électron couplé à un proton
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species / Espèces Réactives de l'Oxygène
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis / Synthèse peptidique sur support solide
SOD	SuperOxyde Dismutase
TEMPO	(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl
TFA	Acide trifluoroacétique
TIPS	Triisopropylsilane
TNBS	Acide 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonique
Trt	Trityle
UV	Ultra-Violet
XAS	X-Ray Absorption Spectroscopy / Spectroscopie d'Absorption des rayons X

Acides aminés et peptides

1. Liste des acides aminés

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

2. Nomenclature



Introduction

Introduction

Dans de nombreux domaines, comme l'aéronautique, l'architecture ou l'énergie, l'Homme s'inspire de la Nature et de ses 3,8 milliards d'années d'évolution dans le but d'inventer ou de développer de nouvelles technologies : c'est le biomimétisme. Ce principe est aussi utilisé en chimie, et notamment pour des applications en catalyse. En effet, de nombreux procédés industriels nécessitent de hautes températures, de fortes pressions, et donc beaucoup d'énergie pour obtenir les produits désirés (ammoniaque, hydrogène...). Et souvent, des enzymes, comme les nitrogénases ou les hydrogénases, sont chargées de réaliser les mêmes réactions dans différents organismes. Ces réactions sont alors effectuées à température ambiante, à pression atmosphérique, et en utilisant des ressources environnantes.

Aujourd'hui, la chimie bio-inspirée est en pleine expansion pour tenter de mimer les propriétés extraordinaires des molécules du vivant. Les métallo-enzymes utilisent généralement les métaux de transition de la première ligne du tableau périodique (Cu, Mn, Fe, Ni...) contrairement à de nombreux procédés industriels qui nécessitent du platine, un métal beaucoup plus rare et donc plus cher. D'un point de vue économique, l'utilisation des métaux présents dans les sites actifs des enzymes permettrait donc de diminuer les coûts de production. Par ailleurs, les procédés actuels sont souvent énergivores comme évoqué précédemment, et polluants avec une forte consommation d'énergie fossile et la production de gaz à effet de serre, deux points cruciaux d'un point de vue environnemental. Néanmoins, l'utilisation directe des enzymes dans les procédés industriels reste difficile à cause de leur production et manipulation complexes. Les chimistes se sont donc intéressés à la synthèse de complexes bio-inspirés, de structures beaucoup plus simples, accessibles par synthèse chimique et qui imitent le site actif d'une enzyme afin d'en reproduire les propriétés.

Pour concevoir des composés efficaces basés sur un design rationnel, il est important de connaître la structure de l'enzyme ciblée, ainsi que le mécanisme réactionnel mis en jeu. Ainsi, un moyen pour y parvenir est l'étude de complexes modèles. Ces complexes, plus faciles à synthétiser et à étudier qu'une enzyme, peuvent apporter de nombreuses informations sur le fonctionnement du site actif, sur les facteurs nécessaires à la catalyse et leur rôle. C'est la stratégie que nous avons utilisée dans cette thèse pour la Nickel Superoxyde Dismutase (Schéma 1).

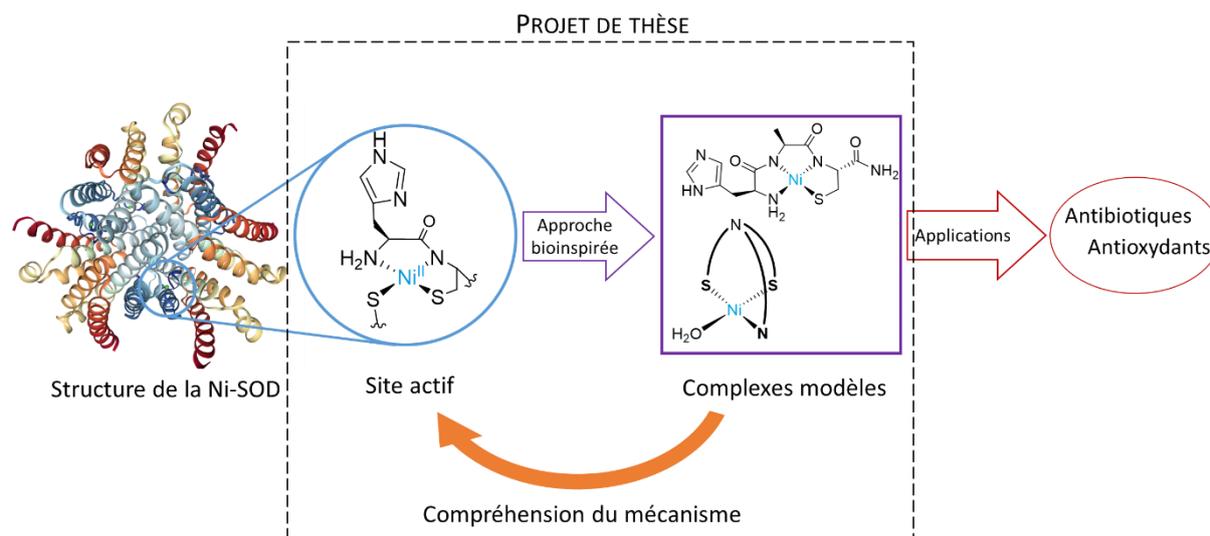


Schéma 1. Développement de complexes modèles par une approche bio-inspirée.

La Nickel Superoxyde Dismutase (Ni-SOD) est une enzyme dont le rôle est de catalyser la dismutation du superoxyde, une espèce réactive de l'oxygène. Sa structure ainsi que la sphère de coordination du nickel sont connues, néanmoins, le mécanisme réactionnel suscite encore de nombreuses questions. Comme nous le verrons dans la suite, et outre le développement de complexes biomimétiques, la compréhension de son fonctionnement pourrait conduire à de nouvelles applications thérapeutiques. Mes travaux de thèse ont donc porté sur la synthèse, la caractérisation et l'étude de réactivité d'une série de complexes bio-inspirés du site actif de la Ni-SOD dans le but d'apporter des réponses à ces questions et d'obtenir des informations sur le fonctionnement de l'enzyme, sur les ligands essentiels à la catalyse, ainsi que sur les intermédiaires réactionnels mis en jeu.

Chapitre I.

La Nickel Superoxyde Dismutase et ses complexes modèles

Chapitre I. La Nickel Superoxyde Dismutase et ses complexes modèles

1. Propriétés du nickel

Le nickel est l'élément chimique de numéro atomique 28. Il se situe dans la première ligne des métaux de transitions, entre le cobalt et le cuivre, et il appartient au groupe 10 qui contient aussi le palladium et le platine. Il possède cinq isotopes stables (^{58}Ni , ^{60}Ni , ^{61}Ni , ^{62}Ni et ^{64}Ni), ^{58}Ni étant l'isotope majoritaire avec une abondance naturelle de 68%.¹

Le nickel a été caractérisé avec des degrés d'oxydation allant de $-II$ à $+IV$, le Ni^{II} étant de loin le plus courant avec une configuration électronique $[\text{Ar}]3d^8$.^{2,3} La littérature sur les complexes de Ni^{II} est vaste, et pour résumer, tous les types de ligands étudiés en chimie de coordination des métaux l'ont aussi été avec le Ni^{II} .³ Ces complexes de Ni^{II} adoptent le plus souvent une géométrie octaédrique ($S = 1$), ou plan carré ($S = 0$), l'orbitale $d_{x^2-y^2}$, haute en énergie, étant alors inoccupée (Schéma 2). Le Ni^{II} plan carré est diamagnétique, et il est donc invisible en résonance paramagnétique électronique (RPE). Son identification dans les milieux biologiques n'est ainsi pas évidente.

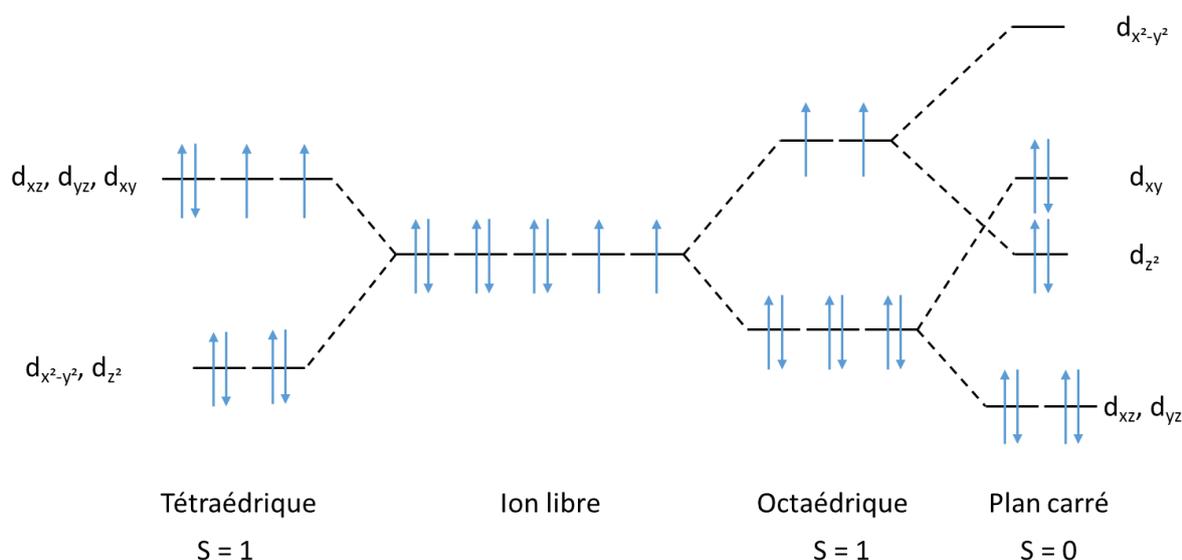


Schéma 2. Répartition des électrons dans les orbitales d du Ni^{II} pour différentes géométries.

Le Ni^{II} libre en solution aqueuse se présente sous la forme d'un complexe octaédrique $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Sa particularité est que son potentiel d'oxydation est supérieur à celui de l'eau, à plus de 2 V vs NHE. Il ne peut donc pas être oxydé sans ligand spécifique.⁴

2. Le nickel en biologie

De nos jours, le nickel est abondamment utilisé par l'Homme avec une production mondiale de plus de 2 millions de tonnes par an. Celui-ci est principalement utilisé dans des alliages, par exemple pour la fabrication d'aciers inoxydables (alliage Fe/Ni) ou des pièces d'un et deux euros (alliage Cu/Ni). Le nickel est aussi largement utilisé dans l'industrie chimique notamment comme catalyseur hétérogène avec le nickel de Raney développé en 1920 pour l'hydrogénation de nombreux composés insaturés. Néanmoins, il fallut attendre 1975, et la caractérisation de l'uréase, pour découvrir que la Nature l'utilisait aussi comme catalyseur dans des métalloenzymes.⁵ En effet, le nickel n'est pas rare à la surface de la terre : c'est le 24^{ème} élément en termes d'abondance dans la croûte terrestre où sa concentration est d'environ 80 µg/g. Il est aussi présent dans les océans à hauteur de 0,5 µg/L principalement sous la forme Ni²⁺.^{6,7} La majorité des organismes vivants y est donc exposée, mais seules certaines bactéries, archées et plantes en contiennent dans des protéines.^{8,9} Dix enzymes contenant du nickel et essentielles au métabolisme de ces organismes ont été découvertes, ainsi que plusieurs protéines chargées de sa régulation et de son transport, c'est donc un élément vital pour de nombreuses espèces.^{8,10}

2.1. Enzymes sans activité redox

Quatre enzymes sans activité redox ont été découvertes avec un ion nickel comme cofacteur : l'uréase, la glyoxalase I, l'aciréductone dioxygénase et la lactate racémase. Dans leurs sites actifs, le Ni^{II} est coordonné principalement par des imidazoles provenant d'histidines, des carboxylates ou carbamates, et des molécules d'eau. Ces ligands ont peu d'influence sur les potentiels redox des couples du Ni^{II}, et ne permettent pas d'accéder au Ni^I ou au Ni^{III} dans l'eau à pH physiologique (Figure 1).¹¹

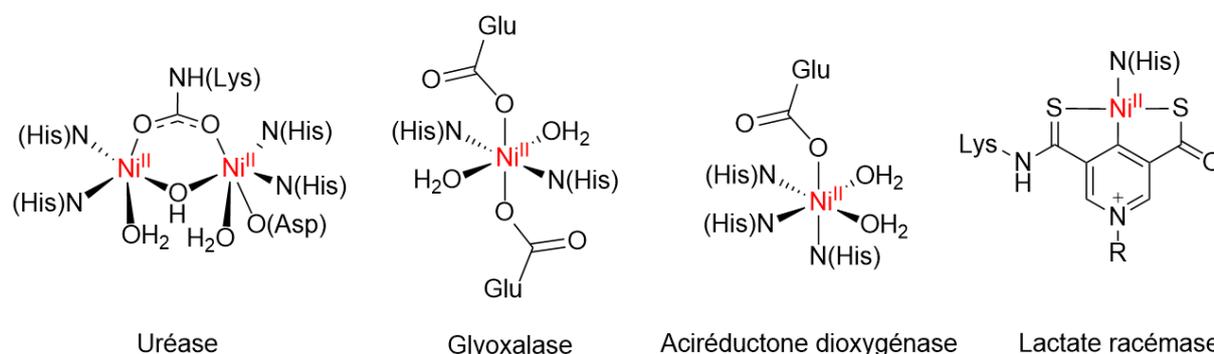
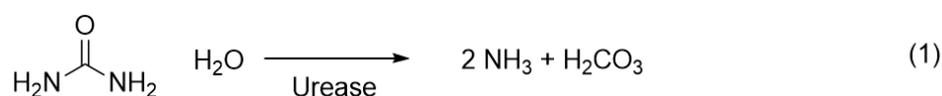


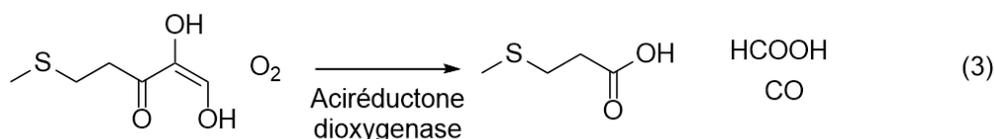
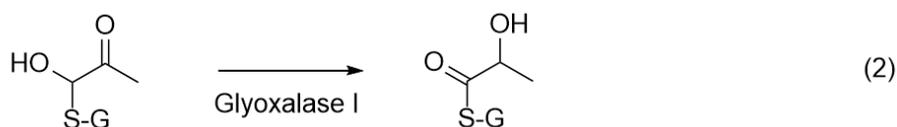
Figure 1. Sites actifs des enzymes de nickel sans activité redox.

L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone (Equation 1). Elle comporte un centre dinucléaire Ni^{II}-Ni^{II} essentiel à son activité qui permet de coordonner et d'activer

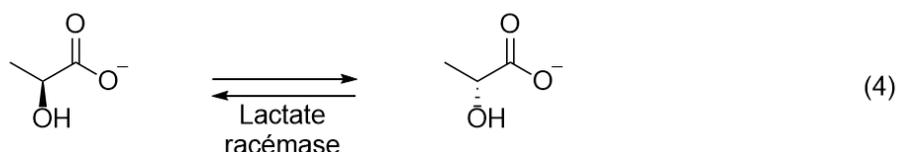
l'urée. De plus, l'acidité de Lewis du nickel permet de générer un hydroxo à pH physiologique qui va pouvoir servir de nucléophile.¹²



Le système glyoxalase convertit le méthylglyoxal qui est une espèce toxique en acide lactique. Pour la première étape, la glyoxalase I catalyse la réaction décrite en Equation 2.¹⁰ Le départ d'un glutamate et d'une molécule d'eau permet la coordination du substrat au nickel et son activation. L'aciréductone dioxygénase contient aussi un Ni^{II} en coordination octaédrique et catalyse la conversion de l'aciréductone en méthylthiopropionate (Equation 3).^{13,14}



Finalement, la lactate racémase, qui a été découverte plus récemment, catalyse la conversion de la L-lactate en D-lactate et inversement (Equation 4).¹⁵ Si le mécanisme n'est pas encore déterminé, les premières études suggèrent un centre Ni^{II} pendant la catalyse.¹⁶



2.2. Enzymes redox actives

Les réactions d'oxydoréduction sont des processus très importants en biologie et de nombreuses enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction ont été découvertes. Ce sont principalement des métalloenzymes, les métaux de transition pouvant exister sous plusieurs degrés d'oxydation tout en gardant une certaine stabilité. De nombreux ions métalliques sont donc utilisés par la Nature pour remplir ce rôle, comme le fer, le cuivre, le cobalt, le molybdène, le manganèse, mais aussi le nickel. La coordination de ce dernier dans les enzymes redox actives est très différente de celles décrites précédemment. Ici, les ligands vont permettre d'ajuster les potentiels des couples redox

du nickel mis en jeu, principalement avec la coordination de cystéines (Figure 2). Seuls les degrés d'oxydation du nickel de +I à +III ont été observés en biologie, mais certains mécanismes proposent la formation de Ni⁰ au cours de cycles catalytiques.

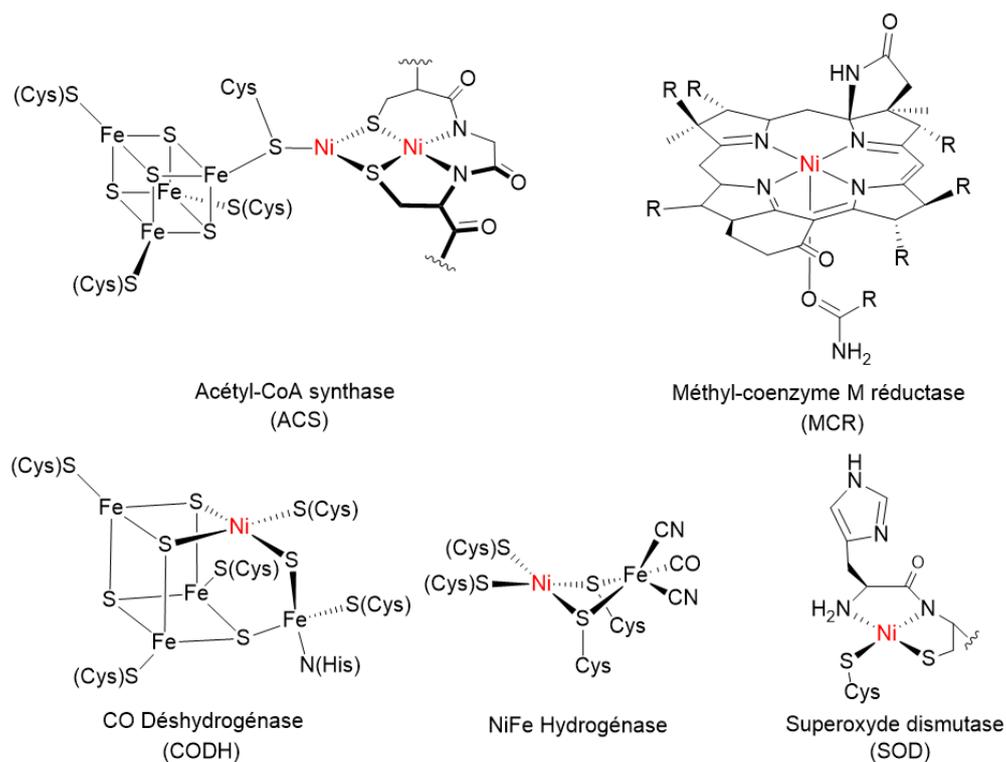


Figure 2. Sites actifs des enzymes redox actives.

Alors que la production d'hydrogène est l'objet de nombreuses études pour remplacer les énergies fossiles,¹⁷ les hydrogénases se révèlent particulièrement intéressantes grâce à leur capacité à réduire les protons en hydrogène ou à utiliser H₂ comme source d'énergie dans la réaction inverse (Equation 5).¹⁸ Trois types d'hydrogénases ont été découverts : les [Fe]-, [FeFe]-, et [NiFe]-hydrogénases, cette dernière est la plus répandue avec la coordination du nickel par quatre thiolates (Figure 2). Le mécanisme actuellement accepté met en évidence des degrés d'oxydation du nickel de +I à +III pendant la catalyse, avec un potentiel d'oxydoréduction d'environ -0,26 V (vs NHE) pour le couple Ni^{III}/Ni^{II}.^{19,20}



La CO Déshydrogénase (CODH) et l'Acétyl-CoA Synthase (ACS, Figure 2) sont souvent associées dans les organismes, la première produisant du monoxyde de carbone en réduisant sélectivement le CO₂, et la seconde utilisant ce CO pour acétyler la coenzyme A (CoA) (Equations 6 et 7).²¹ Dans la CODH, un cluster [3Fe-4S] est lié à un complexe dinucléaire [NiFe] qui permet d'activer le monoxyde ou le

dioxyde de carbone. Le nickel est alors coordonné par trois sulfures S^{2-} et un thiolate, et son degré d'oxydation pour chaque étape du mécanisme est toujours indéterminé. Le site actif de l'ACS comporte un cluster $[4Fe-4S]$ relié à un complexe dinucléaire de nickel coordonné par des thiolates et des amidos. Seul le nickel coordonné par les trois thiolates est directement impliqué dans la catalyse, et là encore, le mécanisme reste incertain.²¹



Chez les archées, la Méthyl-Coenzyme M Réductase (MCR) catalyse la dernière étape de la biosynthèse du méthane (Equation 8). Dans son site actif, le nickel est coordonné dans le cofacteur F_{430} , similaire à une porphyrine mais pour lequel les pyrroles ne sont pas tous conjugués entre eux par des liaisons π .²² Pour cette enzyme aussi, plusieurs mécanismes possibles sont proposés avec différents degrés d'oxydation du nickel.^{19,23}



Finalement, la nickel superoxyde dismutase (Ni-SOD), catalysant la dismutation du superoxyde (Equation 9), sera détaillée en partie 3.3.



Mis à part la MCR, toutes ces enzymes comportent des liaisons Ni-S essentielles à l'activité redox. En effet, il permet d'ajuster les potentiels redox du nickel.¹¹ La coordination de sulfures n'est pas limitée au nickel, mais se retrouve aussi dans de nombreuses métalloprotéines, principalement de cuivre (comme les « blue copper ») ou de fer (P450, clusters fer-soufre), et leur confère des propriétés électroniques particulières.

Les thiolates possèdent trois orbitales de valence 3p. La première est impliquée dans la liaison σ S-C et n'aura donc que peu d'influence sur la liaison S-M. Les deux autres orbitales sont perpendiculaires à la liaison S-C et permettent d'avoir une interaction forte avec les orbitales du métal (Figure 3). L'orbitale hors du plan C-S-M est impliquée dans des liaisons π avec le métal, tandis que celle dans le plan l'est dans des liaisons σ (le « pseudo » venant du fait que l'orbitale est décalée de l'axe S-M pour des angles C-S-M supérieurs à 90°).²⁴ Ces orbitales conduisent à des liaisons M-S

hautement covalentes caractérisées par d'intenses bandes à transfert de charges du ligand vers le métal (LMCT) en spectroscopie UV-Vis.

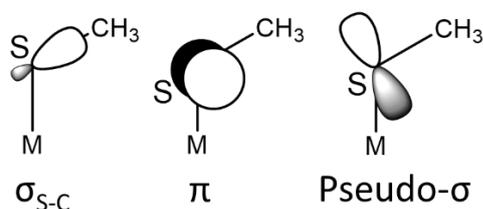


Figure 3. Orbitales de valence des thiolates (adapté de 24).

2.3. De nouvelles enzymes avec un ion nickel comme cofacteur

De nombreuses enzymes démontrent une activité catalytique avec différents métaux.²⁵ Il est alors compliqué de dire quel est le métal physiologique. C'est le cas d'une quercétinase, qui catalyse la coupure oxydante de la quercétine.²⁶ Suivant les organismes, la forme la plus active est obtenue avec un ion cuivre, manganèse ou nickel,²⁷ et elle est parfois définie comme la dixième enzyme comportant un cofacteur de nickel (Schéma 3).²⁸ Le mécanisme est encore inconnu, mais certaines études proposent la formation d'un complexe Ni^{II}-superoxo après départ d'une molécule d'eau et activation de l'oxygène.^{28,29}

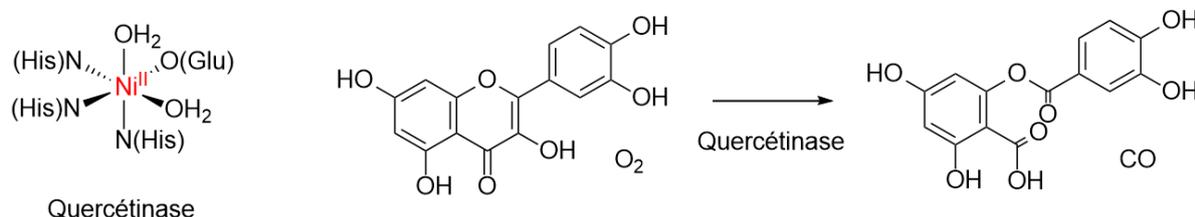


Schéma 3. Site actif et réaction catalysée par la quercétinase.

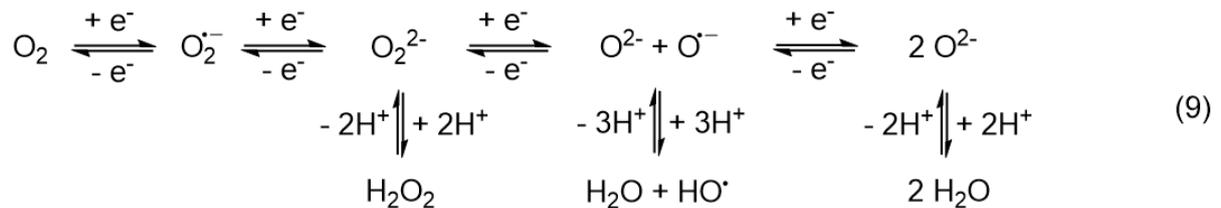
Il est donc fortement probable que le nickel soit utilisé dans beaucoup d'autres protéines et métabolismes qui n'ont pas encore été découverts ou caractérisés.

3. Les superoxydes dismutases

3.1. Le stress oxydant et le radical anion superoxyde

Lors de l'apparition de la vie sur Terre, l'environnement avait un caractère très réducteur, jusqu'à l'apparition de l'oxygène. Ce dernier était alors un déchet toxique issu principalement de la photosynthèse des cyanobactéries afin de produire de l'énergie à partir du CO₂. L'augmentation brutale de la concentration d'oxygène dans l'atmosphère pendant la Grande Oxydation fut

probablement une catastrophe écologique avec l'extinction de plusieurs espèces qui n'ont pas pu s'adapter à ce changement.³⁰ En effet, les cellules ont besoin de garder un environnement réducteur pour vivre, ce qui est toujours le cas aujourd'hui.³¹ Or, en plus de son caractère oxydant, l'oxygène peut facilement être réduit en différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS), principalement le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) qui sont toutes des molécules oxydantes par rapport à l'eau (Equation 9).



Les espèces survivantes sont donc parvenues à développer un système de défense contre ces oxydants et ont même réussi à en tirer profit. Si bien qu'aujourd'hui, les cellules ont besoin d'une certaine concentration de ROS pour fonctionner correctement : par exemple, une concentration trop faible empêche les cellules souches de se renouveler ou de se différencier normalement.³² De nombreuses enzymes sont donc chargées de produire ces ROS à partir d'oxygène : la NADPH oxydase ou la xanthine oxydase génèrent du superoxyde, et plus d'une trentaine d'enzymes produisant H_2O_2 ont été découvertes.³² Grâce à leurs propriétés physicochimiques, les ROS servent de sondes redox et jouent un rôle dans les voies de signalisation cellulaire, par exemple en transportant des informations redox de l'endroit où elles sont créées jusqu'à des cibles biologiques spécifiques.³³ Néanmoins, une exposition trop importante aux ROS est aussi dangereuse et peut entraîner un dérèglement de cette signalisation, voire des dommages dans les cellules.³⁴ Le stress oxydant est ainsi défini comme « un déséquilibre entre oxydants et antioxydants en faveur des oxydants, conduisant à un dysfonctionnement de la signalisation et du contrôle redox, et/ou à des dommages moléculaires ».³⁵

Ce déséquilibre est dangereux pour les cellules et peut être impliqué dans des maladies neurodégénératives comme Parkinson et Alzheimer, ou des cancers, entre autres...³⁶⁻³⁸ De nombreux facteurs peuvent entraîner une surproduction de ROS, comme l'exposition à un oxydant (fumée de cigarette, pollution environnante, certains aliments) ou à des rayons UV ou infrarouge (lumière du Soleil).³⁴ Les cellules ont donc besoin de réguler la concentration de ROS, et ce, de manière continue. Pour cela, leurs outils sont des enzymes chargées de convertir les ROS en espèces moins réactives afin de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant. Dès 1968, McCord et Fridovich ont observé une activité enzymatique pour la catalyse de la dismutation du superoxyde.³⁹ Et effectivement, tous les organismes vivants en condition aérobie possèdent dans leurs cellules des enzymes appelées superoxydes dismutases (SODs).

3.2. Les superoxydes dismutases (SODs)

Comme leur nom l'indique, les superoxydes dismutases sont chargées de catalyser la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène – ce dernier pouvant aussi être dismuté en oxygène et eau par les catalases.⁴⁰ Trois types de SODs ont été découverts et tous possèdent un cofacteur métallique : la CuZn-SOD, la Fe- ou Mn-SOD et la Ni-SOD (Figure 4).

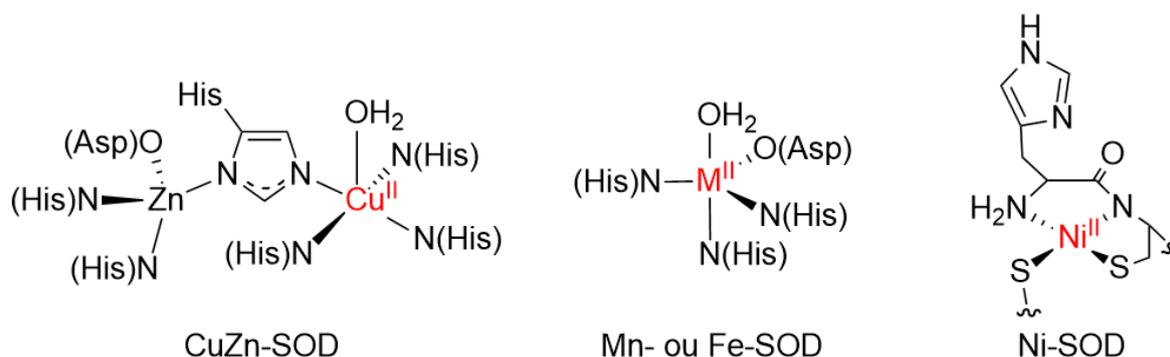


Figure 4. Sites actifs des différentes SODs

Ces enzymes sont redox actives et mettent en jeu un mécanisme de type ping-pong. Pour les deux étapes, un seul électron est mis en jeu entre l'enzyme et le superoxyde : l'enzyme dans son état réduit va s'oxyder en réduisant le superoxyde (Equation 10), et la forme oxydée de l'enzyme va se réduire en oxydant le superoxyde (Equation 11). Toutes ces SODs ont une activité similaire et font partie des enzymes les plus efficaces avec une catalyse limitée par la diffusion du superoxyde ($k_{cat} \approx 1.10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). A la différence des superoxyde réductases (SORs), les SODs n'ont pas besoin d'un apport extérieur d'électron (Equation 12).⁴¹



On notera que la dismutation du superoxyde est instantanée dans l'eau à pH physiologique, avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette constante n'est cependant pas assez élevée pour protéger efficacement les cellules du stress oxydant, $\text{O}_2^{\cdot-}$ étant produit en continu dans les cellules. Pour permettre la catalyse, il faut que le potentiel redox du couple $\text{M}^{n+1}/\text{M}^n$ mis en jeu soit compris entre les potentiels d'oxydation et de réduction du superoxyde (respectivement à -160 mV et 870 mV vs NHE, -400 mV et 630 mV vs SCE). Les SODs ont toutes des potentiels redox proches de la moyenne de ces valeurs : entre 250 et 400 mV vs NHE (Schéma 4).

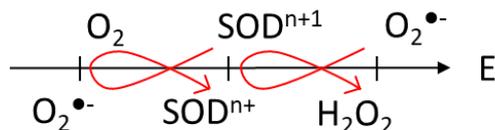


Schéma 4. Couples redox mis en jeu pour la catalyse de la dismutation du superoxyde.

La CuZn-SOD est la première SOD à avoir été découverte et isolée, en 1969.⁴² Cette enzyme est présente chez la grande majorité des eucaryotes, incluant les humains, mais aussi dans certaines bactéries. Des mutations sur le gène correspondant à cette enzyme peuvent être à l'origine de maladies graves, voire fatales pour l'Homme.⁴³ Son site actif est constitué d'un complexe hétérodinucléaire Cu/Zn, les ions métalliques étant pontés par l'imidazole d'une histidine (Figure 4).⁴⁴ Seul le cuivre participe directement à la catalyse en mettant en jeu le couple redox Cu^{II}/Cu^I .^{45,46} Lorsque le cuivre est réduit, le pont histidine est rompu et le Cu^I se retrouve dans une géométrie trigonale coordonnée par les trois autres histidines. L'histidine pontante joue le rôle de relais de protons, et le zinc permet de stabiliser l'enzyme pendant la catalyse et de rendre son activité indépendante du pH (pH 5 – 10).⁴⁷ L'oxydation du superoxyde s'effectuerait en sphère interne avec la coordination de $O_2^{\bullet-}$ sur le Cu^{II} , tandis que sa réduction s'effectuerait en sphère externe grâce à la stabilisation de $O_2^{\bullet-}$ par liaisons hydrogène.⁴⁸ On notera qu'une SOD avec uniquement un cofacteur de cuivre a aussi été découverte plus récemment chez des eucaryotes.⁴⁹

Les Mn-SOD et Fe-SOD ont été découvertes peu après la CuZn-SOD, respectivement en 1970 et 1973.^{50,51} Elles sont toutes deux présentes dans des cellules procaryotes et eucaryotes, mais chez l'Homme, seule la Mn-SOD est présente, et exclusivement dans les mitochondries qui génèrent du superoxyde en continu pendant la respiration cellulaire.⁴¹ Les structures cristallines de ces deux enzymes sont très proches, et les métaux sont coordonnés par les mêmes résidus (Figure 4).⁵² Certaines Mn-SOD et Fe-SOD sont même cambialistiques, c'est-à-dire qu'elles ont la même activité catalytique quel que soit le métal, Mn ou Fe, dans leurs sites actifs. Les ions métalliques, au degré d'oxydation +II ou +III, adoptent une géométrie bipyramidale trigonale avec la coordination des chaînes latérales de deux histidines et d'un aspartate en positions équatoriales, et d'une histidine ainsi qu'une molécule d'eau en positions axiales.⁵³ Les mécanismes proposés pour ces enzymes sont différents en fonction du métal. Pour la Fe-SOD, la réduction du superoxyde passerait par un mécanisme en sphère externe, et l'oxydation aurait lieu en sphère interne.⁴¹ Pour la Mn-SOD, l'inverse est proposé, avec la réduction en sphère interne et l'oxydation en sphère externe, mais le mécanisme reste incertain.^{41,54} Ce n'est que 23 ans plus tard qu'un troisième type de SOD contenant un ion nickel comme cofacteur a été découvert.

3.3. La Ni-SOD

La Ni-SOD a été découverte et isolée en 1996 par Youn *et al.*⁵⁵ Cette SOD est surprenante car l'ion métallique en solution aqueuse ($[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$) ne permet pas de catalyser la dismutation du superoxyde, le potentiel d'oxydation du Ni^{II} étant trop élevé. Alors pourquoi le nickel a-t-il été utilisé par la Nature ? Justement grâce à ce haut potentiel d'oxydation... Lors de la Grande Oxydation, le Fe^{II} , qui était jusqu'alors présent dans les océans, s'est oxydé en Fe^{III} pour donner des oxydes insolubles, ce qui a drastiquement diminué sa concentration dans l'eau. Certains organismes se sont donc adaptés pour utiliser le Ni^{II} qui était toujours disponible.⁵⁶

La sphère de coordination du nickel dans la NiSOD va donc moduler son activité catalytique en abaissant le potentiel d'oxydation du Ni^{II} . Effectivement, l'étude du gène correspondant n'a montré aucune similarité avec les autres types de SODs malgré l'obtention d'une activité catalytique similaire pour la dismutation du superoxyde. Depuis, la Ni-SOD a été trouvée chez plusieurs bactéries et cyanobactéries, toujours sous la forme d'homohexamère.^{57,58} Ces organismes comportent généralement les gènes de plusieurs SODs (Ni-SOD et Fe-SOD par exemple), mais la présence de nickel dans l'environnement inhibe la production de l'autre SOD afin de laisser le métal disponible pour d'autres protéines.^{59,60}

L'étude de la Ni-SOD peut donc se révéler intéressante pour plusieurs raisons : il a déjà été montré que des complexes modèles de la Mn-SOD peuvent être utilisés dans différents traitements, comme pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.⁶¹ L'utilisation de modèles de la Ni-SOD pourrait être une alternative intéressante pour le développement d'antioxydants. Par ailleurs, la Ni-SOD n'est pas présente chez l'Homme, mais l'est chez certaines bactéries pathogènes comme *Chlamydiae*.⁶² Comprendre le fonctionnement de la Ni-SOD et le mécanisme mis en jeu pour la catalyse permettrait le développement d'inhibiteurs spécifiques à cette enzyme, et donc la conception d'une nouvelle famille d'antibiotiques.

Les premières analyses, notamment par RPE, ont montré qu'après purification, l'enzyme est obtenue dans son état oxydé Ni^{III} et nécessite une réduction chimique pour pouvoir caractériser son état réduit, Ni^{II} . Ce premier résultat montre la capacité de l'apoenzyme à stabiliser un complexe de Ni^{III} . En 1999, la caractérisation des états oxydé et réduit de l'enzyme par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) a montré que le nickel était coordonné par plusieurs sulfures et que, comme pour la CuZn-SOD, un des ligands se décoordonne lors de la réduction. Des sites actifs mononucléaire ou dinucléaire de nickel ont alors été proposés.⁶³ Il fallut attendre 2004 et la résolution de sa structure cristalline pour connaître définitivement son site actif (Schéma 5).⁶⁴ Celui-ci est localisé dans les six premiers acides aminés de la protéine et est très différent de ceux des autres SODs. Le Ni^{II} est

coordonné par l'amine terminale de l'histidine His1, par un amido provenant d'une liaison peptidique (His1-Cys2), et par deux thiolates (Cys2 et Cys6) dans un environnement plan carré. Dans son état oxydé, le Ni^{III} est stabilisé par la coordination de l'imidazole de His1 pour donner une géométrie pyramidale à base carrée (Schéma 5). Il est surprenant de trouver des sulfures coordonnés au nickel pour ce type de catalyse mettant en jeu O₂^{•-}, H₂O₂ et O₂ car les thiolates sont connus pour s'oxyder facilement, même liés au nickel.^{65,66} Or, les deux cystéines Cys2 et Cys6 garantissent la bonne structure de l'enzyme et sont essentielles à l'activité catalytique : la mutation d'une des cystéines empêche la coordination du thiol restant et le mutant correspondant n'est pas actif en catalyse. De plus, les thiolates permettent d'ajuster le potentiel redox du couple Ni^{III}/Ni^{II} à une valeur adéquate (0,36 V vs NHE).⁶⁷

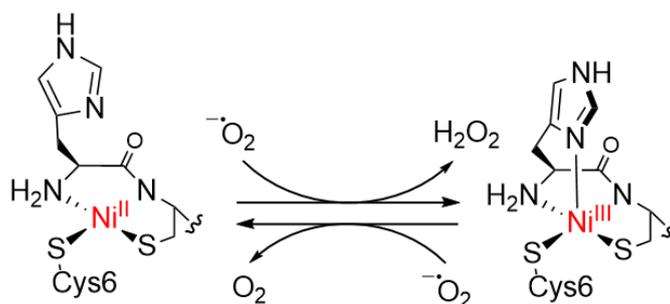


Schéma 5. Site actif de la Ni-SOD dans les états réduit et oxydé.

Si les deux formes oxydée et réduite de l'enzyme ont été caractérisées, le mécanisme de la réaction avec le superoxyde est toujours inconnu. Une des questions les plus importantes pour son élucidation est de savoir si les échanges d'électrons entre le nickel et le superoxyde ont lieu en sphère interne ou externe, c'est-à-dire s'il y a formation d'une liaison Ni-O₂^{•-} ou non, pour chaque réaction (Equations 10 et 11).

Certaines études, notamment par XAS et théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), proposent la protonation d'un des thiolates pendant la catalyse qui permettrait le transfert de proton couplé au transfert d'électron lors de la formation du peroxyde d'hydrogène (Equation 10) avec un mécanisme en sphère interne (Schéma 6). Le spectre XANES (X-Ray Absorption Near Edge Structure) au seuil K du soufre de l'enzyme oxydée présente deux pré-pics attribués aux transitions 1s(S) → 3d_{z²}(Ni^{III}) et 1s(S) → 3d_{x²-y²}(Ni^{III}). Après photoréduction, un seul pré-pic est observé, ce qui est en accord avec le fait que seule l'orbitale d_{x²-y²} soit vacante (Schéma 2). Lorsque H₂O₂ est utilisé comme réducteur sur le Ni^{III}, aucun pré-pic n'est visible. Ce résultat est expliqué par la protonation d'un thiolate qui provoquerait le déplacement de cette transition à plus haute énergie.⁶⁸ De plus, les études DFT ont montré que, contrairement à ce qui est attendu et à ce qui est observé avec d'autres métaux, la liaison Ni-SH serait légèrement plus courte que la liaison Ni-S⁻ car les répulsions électroniques entre les

orbitales du soufre et du nickel seraient moins importantes.⁶⁸⁻⁷¹ Le site actif de l'enzyme ne serait donc pas déstabilisé par la présence d'une fonction thiol. Néanmoins, la coordination d'un thiol au nickel en solution aqueuse n'a jamais été prouvée.

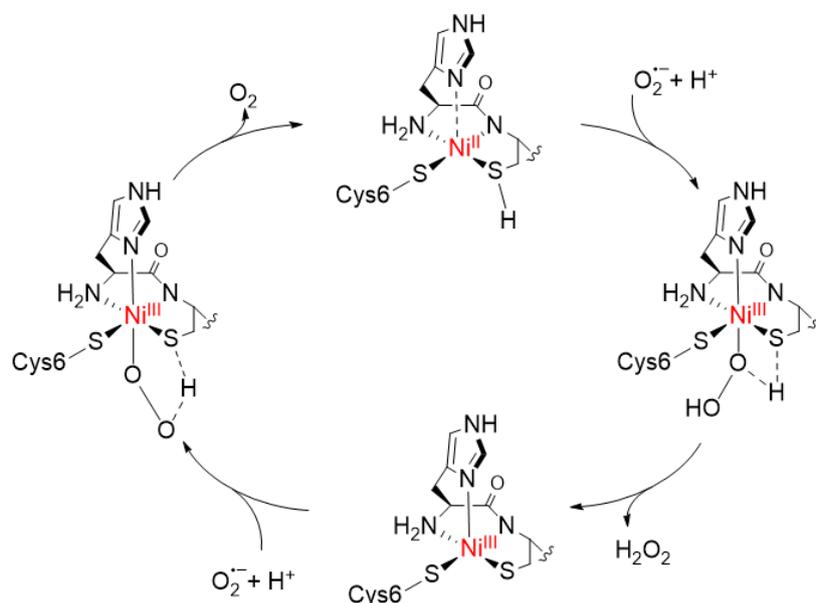


Schéma 6. Mécanisme proposé pour la dismutation du superoxyde catalysé par la Ni-SOD impliquant la protonation d'une cystéine.⁶⁸

D'un autre côté, les expériences réalisées en présence d'azoture (molécule modélisant le superoxyde) ont montré qu'il ne se coordonnait pas au nickel dans l'enzyme, et que donc le superoxyde réagirait en sphère externe.^{64,69} Cette hypothèse est confortée par l'obtention de structures cristallines en présence d'un ion chlorure ou bromure. Ces anions sont localisés dans une cavité proche du nickel sans coordination directe, ni avec le Ni^{II}, ni avec le Ni^{III}, la distance entre le chlore et le nickel étant de 3,5 Å. Les deux réactions seraient donc réalisées en sphère externe avec la fixation du superoxyde par des liaisons hydrogènes dans une poche à proximité du nickel.⁷² Dans ce cas, des molécules d'eau ou une tyrosine à proximité du superoxyde (Tyr9) serviraient de relais de protons. D'autres arguments ont été évoqués dans les deux camps pour répondre à cette question, comme la présence,⁶⁴ ou l'absence,⁷³ d'un tunnel guidant le superoxyde vers le nickel, suggérant donc respectivement un mécanisme en sphère interne ou externe.

Une autre particularité de l'enzyme est la longueur de la liaison nickel-imidazole dans la forme oxydée. Celle-ci est en effet particulièrement longue ($\approx 2,3$ Å).^{64,73} Ce résultat est expliqué par l'implication de liaisons hydrogène avec l'imidazole (His1-Glu17 et Glu17-Arg47). L'étude de mutants comportant ou non ces résidus a montré que ces liaisons hydrogène sont nécessaires à la bonne structure du site actif, à sa stabilité vis-à-vis du superoxyde, à l'ajustement du potentiel redox et donc à une activité catalytique optimale.^{74,75}

Le mécanisme de la réaction de dismutation du superoxyde par la Ni-SOD est donc sujet à débat, et il semble difficile de trancher entre un mécanisme en sphère interne ou externe sans avoir plus d'informations. Une des preuves les plus intéressantes serait la caractérisation d'un intermédiaire réactionnel, mais cela est difficilement réalisable avec une enzyme, surtout aussi efficace. Ce sont en effet de grosses molécules difficiles à manipuler car sensibles à la température, au pH, aux solvants, et qui sont de plus très réactives. Différents groupes se sont alors intéressés à la synthèse et caractérisation de complexes modèles de la Ni-SOD. Cette approche biomimétique est intéressante puisqu'elle permet l'étude de séries de complexes de nickel ayant plus ou moins de similarités avec l'enzyme, ce qui permet de comprendre le rôle de chaque constituant du site actif. Deux approches ont été utilisées pour le développement de complexes modèles : (i) une approche peptidique, et (ii) une approche synthétique.

4. Les modèles de la Ni-SOD

Le terme chimie biomimétique est apparu dans les années 70. Elle consiste à reproduire des réactions effectuées par la Nature afin de développer de nouvelles catalyses ou synthèses.⁷⁶ Cependant, elle permet aussi d'élucider les mécanismes d'action des enzymes en développant des complexes modèles du site actif centré sur le métal, et en étudiant sa réactivité. Dans le cas de la Ni-SOD, deux stratégies ont été mises en œuvre. La première utilise des modèles peptidiques avec une séquence d'acides aminés basée sur celle de l'enzyme, et la deuxième utilise des modèles synthétiques qui permettent de positionner différents groupes fonctionnels autour du nickel.

4.1. Modèles peptidiques

Dans le site actif de l'enzyme, toutes les fonctions coordonnant le nickel se trouvent dans les six premiers acides aminés (**H₂N-HCDLPC...**). L'idée a donc été de synthétiser des peptides d'au moins six acides aminés avec une séquence identique à celle de l'enzyme afin d'obtenir des complexes très similaires au site actif de la Ni-SOD. Cette stratégie a principalement été utilisée par l'équipe de Shearer, et plus particulièrement avec un peptide constitué des douze premiers acides aminés noté SOD^{M1}.^{77,78} Le complexe de nickel correspondant reproduit bien les caractéristiques spectroscopiques de l'enzyme, et la structure du complexe est donc proche de celle du site actif (Figure 5). Les premiers tests ont montré que NiSOD^{M1} possède une activité catalytique (non quantifiée dans un premier temps) vis-à-vis de la dismutation du superoxyde, fournissant la preuve de concept pour l'utilisation de tels modèles dans le but de reproduire une activité catalytique de type SOD.⁷⁷ Afin d'étudier l'importance de la coordination amido/amine dans l'enzyme, la version acétylée en position N-

terminale de SOD^{M1}, notée SOD^{M1}-Ac (Figure 5) a été synthétisée.⁷⁹ Le complexe acétylé NiSOD^{M1}-Ac se forme à pH légèrement plus haut que NiSOD^{M1}, en accord avec la coordination des deux amidos, ce qui a été confirmé par XAS. Par voltampérométrie cyclique (CV), NiSOD^{M1} et NiSOD^{M1}-Ac comportent des oxydations quasi-réversibles à respectivement $\approx 0,5$ V et 0,3 V vs NHE. Cette différence est aussi cohérente avec la coordination d'un amido qui augmente la densité électronique sur le Ni^{II}, facilitant ainsi son oxydation. Or, l'activité catalytique de NiSOD^{M1}-Ac est cent fois plus faible que celle de NiSOD^{M1} alors que son potentiel d'oxydoréduction est plus proche de la valeur idéale (0,29 V vs NHE). Une explication pour la baisse d'activité est une moins bonne stabilité du complexe par rapport à O₂^{•-} et H₂O₂.^{79,80}

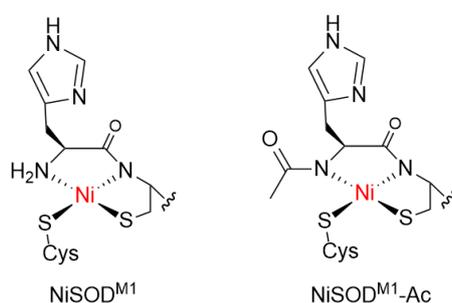


Figure 5. Structures de NiSOD^{M1} et de NiSOD^{M1}-Ac.

D'autres peptides avec sept acides aminés ont été synthétisés en faisant varier le premier résidu pour étudier l'influence de l'histidine. Celle-ci a été remplacée soit par une alanine, soit par un aspartate (Figure 6).⁸¹ Sans surprise, le complexe le plus efficace pour catalyser la dismutation du superoxyde est le dérivé histidine. Néanmoins, les deux autres complexes sont aussi actifs, le dérivé aspartate avec une activité cinq fois plus faible, et le dérivé alanine avec une activité diminuée d'un facteur 30. La présence d'un ligand en position axiale est donc importante pour la catalyse mais pas indispensable, ce qui est cohérent avec les résultats de Maroney obtenus sur l'enzyme après mutation du premier acide aminé.⁷⁴

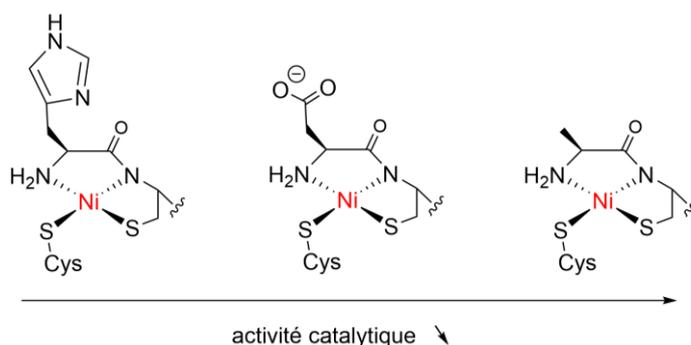


Figure 6. Complexes peptidiques dérivés du site actif de la Ni-SOD

Des études par CV du dérivé histidine ont montré une dépendance pour la réversibilité de l'oxydation du nickel en fonction de la vitesse de balayage.⁸¹ Ce résultat est expliqué par le fait que l'histidine reste coordonnée au nickel à haute vitesse même après réduction, tandis qu'elle se décoordonne à basse vitesse. L'imidazole de His1 reste donc coordonné au nickel pendant la catalyse, évitant ainsi un réarrangement structural du site actif au cours du cycle.

Pour mettre en évidence les effets de seconde sphère dus aux liaisons hydrogènes impliquant His1, plusieurs peptides avec des imidazoles substitués par différents groupements X ont été étudiés ($\text{Ni}(\text{SOD}^{\text{M}1}\text{H}(1)\text{H}^{\text{X}})$, Figure 7).⁸² Les groupements dinitrophényle (DNP) et tosyle (Tos) sont électroattracteurs et diminuent la densité électronique de l'imidazole et donc sa basicité de Lewis, tandis que le groupement méthyle est inductif donneur et conduit à l'effet inverse. Les deux premiers ont une activité environ 10 fois supérieure à celle obtenue lorsque l'imidazole n'est pas substitué, alors que lorsque l'imidazole est substitué par le méthyle, le complexe est 10 fois moins actif. Dans le cas du méthyle, le Ni^{III} est davantage stabilisé par l'imidazole en renforçant la liaison Ni-Im et sera donc moins réactif avec le superoxyde. En revanche, avec les groupements attracteurs, le Ni^{III} est moins stabilisé et donc plus réactif. Les liaisons hydrogène au sein de l'enzyme sont donc très importantes pour optimiser la basicité de Lewis de l'imidazole et, par conséquent, l'activité catalytique.⁸²

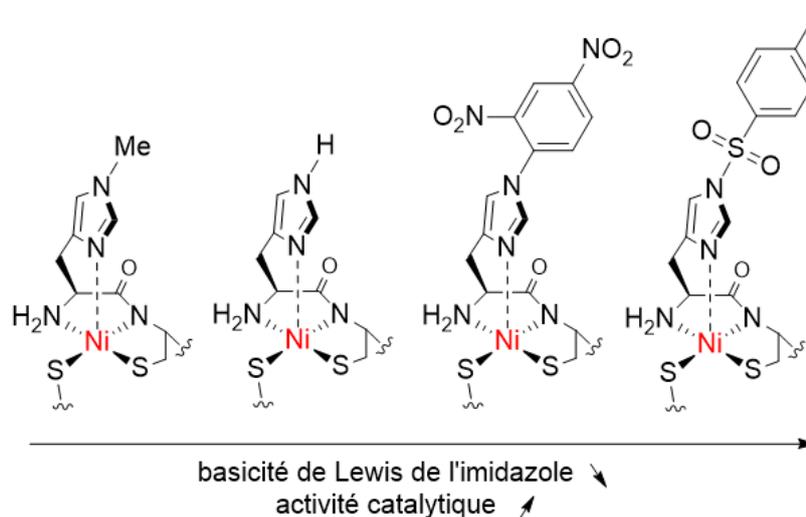


Figure 7. Effet de la substitution de l'imidazole sur l'activité catalytique

Le complexe $\text{Ni}(\text{SOD}^{\text{M}1}\text{H}(1)\text{H}^{\text{Me}})$ est moins actif que les autres composés de la série et sa réactivité est ainsi plus facile à étudier. Des expériences complémentaires sur ce dernier ont permis d'obtenir davantage d'informations sur le mécanisme, et notamment sur le transfert de proton lors de la réduction de O_2^{\bullet} en H_2O_2 . La catalyse dans l'eau légère et dans l'eau deutérée a montré un effet isotopique cinétique (KIE) de 20, ce qui signifie que la réaction est 20 fois plus rapide dans l'eau légère (un KIE de 1,2 est obtenu pour la réaction non catalysée). Ce résultat suggère un transfert d'électron

couplé à un proton (PCET), et donc la présence d'un site donneur d'atome d'hydrogène avec une liaison X-H relativement faible.⁸³ En effet, le complexe $\text{Ni}^{\text{III}}(\text{SOD}^{\text{M1}}\text{H}(1)\text{H}^{\text{Me}})$ peut être réduit par différents donneurs d'atome d'hydrogène avec différentes énergies de dissociation de liaisons (BDFE), comme le 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPO-H, BDFE = 71 kcal/mol), ou l'ascorbate (BDFE = 74 kcal/mol), mais pas par la 1,4-dihydroquinone (BDFE = 82 kcal/mol) ou l'hydrazine (BDFE = 83 kcal/mol). Le complexe modèle sous forme réduite possède donc un site donneur d'atome d'hydrogène avec une BDFE entre 70 et 80 kcal/mol. Cette valeur est inférieure à celle de HO_2^- (BDFE = 82 kcal/mol), et le PCET est donc thermodynamiquement autorisé.⁸³ Shearer *et al.* proposent aussi la protonation d'une cystéine pour le transfert de protons, ce qui est compatible avec les résultats précédents.

En ce qui concerne la coordination ou non du superoxyde sur le nickel au cours du cycle catalytique, les mêmes problématiques qu'avec l'enzyme sont obtenues. Shearer *et al.* ont montré que l'ajout d'azoture ou de cyanure sur leur modèle ne conduit pas aux adduits correspondants, suggérant un mécanisme en sphère externe (Figure 8).⁸¹ Néanmoins, le mécanisme proposé pour le complexe modèle NiSOD^{M1} est probablement différent de celui dans l'enzyme, notamment pour des raisons structurales. En effet, dans l'enzyme, le superoxyde n'aurait pas la place pour se positionner à proximité du thiolate (Cys6) et de l'amine terminale (His1).⁸⁴ A contrario, Buntkowsky *et al.* ont montré la coordination d'un cyanure sur le nickel avec un complexe construit à partir des neuf premiers acides aminés de l'enzyme.⁸⁵ Le même résultat est obtenu avec un dérivé imposant une configuration *cis* pour la liaison peptidique Leu4-Pro5, alors qu'une configuration *trans* est obtenue avec les modèles issus de la séquence de l'enzyme.⁸⁶ Ces résultats sont en accord avec un mécanisme en sphère interne (Figure 8). D'autres études par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et DFT suggèrent un mécanisme en sphère interne avec la participation de molécules d'eau proches du nickel pour le transfert de protons, et non d'une cystéine.^{87,88}

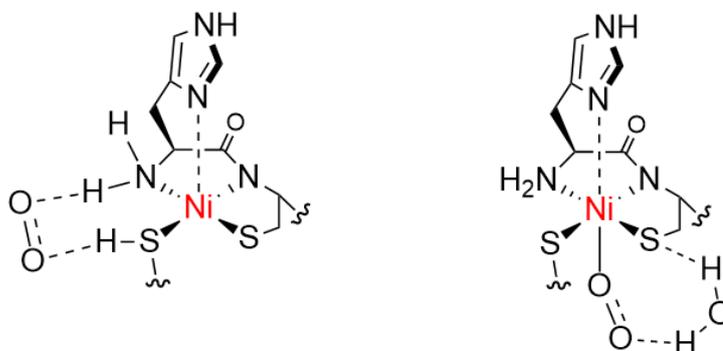


Figure 8. Intermédiaires proposés avec un mécanisme en sphère externe (gauche), ou sphère interne (droite).^{81,88}

Toutes ces recherches ont été effectuées avec des peptides de séquences proches qui conduisent à des structures similaires pour les différents complexes. Il est donc peu probable que les mécanismes soient si différents entre ces modèles, notamment avec la protonation ou non d'une cystéine pour la forme Ni^{II}. Le mystère reste donc entier quant au type de mécanisme mis en jeu et à la nature du relais de protons.

Un autre modèle peptidique a été étudié, mais avec une structure plus simple, à trois acides aminés (Asp-Cys-Cys).⁸⁹ La coordination proposée est la même que dans l'enzyme, mais l'activité est réduite. Pendant la catalyse, une inversion de chiralité des premier et troisième acides aminés est observée pour atteindre une structure plus stable.⁹⁰

L'avantage des modèles peptidiques est qu'ils permettent d'obtenir une activité catalytique dans l'eau. Cependant, comme c'est un solvant protique, il est difficile d'isoler des intermédiaires réactionnels. Des modèles synthétiques solubles en milieu organique ont alors été étudiés.

4.2. Modèles synthétiques

Une large variété de complexes de nickel a été synthétisée pour imiter le site actif de la Ni-SOD (Figure 9). Les recherches ont principalement porté sur les propriétés d'oxydoréduction de ces complexes, y compris la stabilité de la liaison Ni-S en présence d'oxygène et de ROS.

Afin d'obtenir des informations sur le rôle de la coordination amido/amine, une série de complexes a été synthétisée avec la coordination d'un amido et une amine (**1**), deux amines (**2**), ou deux amidos (**3**) en plus de deux thiolates.^{91,92} La première observation est que les complexes **1** et **2** sont stables à l'air, contrairement au complexe **3** qui se décompose rapidement. Par CV, les complexes **1** et **3** possèdent des oxydations quasi-réversibles (0,28 V et -0,18 V vs NHE),⁹¹⁻⁹³ tandis que l'oxydation du complexe **2** est irréversible (0,57 V vs NHE).⁹⁴ En plus d'apporter une stabilité au complexe, la coordination amido/amine permet d'ajuster le potentiel redox à une valeur appropriée pour la catalyse. Des résultats similaires sont obtenus avec **4** et **5** pour la stabilité à l'air, le premier étant stable plusieurs jours et le second s'oxydant rapidement.⁹⁵ Cependant, l'oxydation du complexe **4** est irréversible malgré la coordination d'un amido et d'une amine. La réactivité du complexe **6**, dérivé du complexe **1**, a alors été étudiée avec le superoxyde : la formation d'un complexe Ni^{II}-superoxo est proposée, suivi de l'oxydation du Ni^{II} en Ni^{III} après ajout de protons et de méthylimidazole.⁹⁶ Le complexe oxydé en présence de méthylimidazole peut être réduit par le superoxyde, mais ne réagit pas avec de l'azote. Ces résultats sont donc cohérents avec une réduction de O₂^{•-} en sphère interne, et son oxydation en sphère externe.⁹⁶ On notera que pour ce complexe, des oxydations irréversibles sont observées dans l'eau et l'acétonitrile, alors qu'elles sont réversibles dans le DMF.

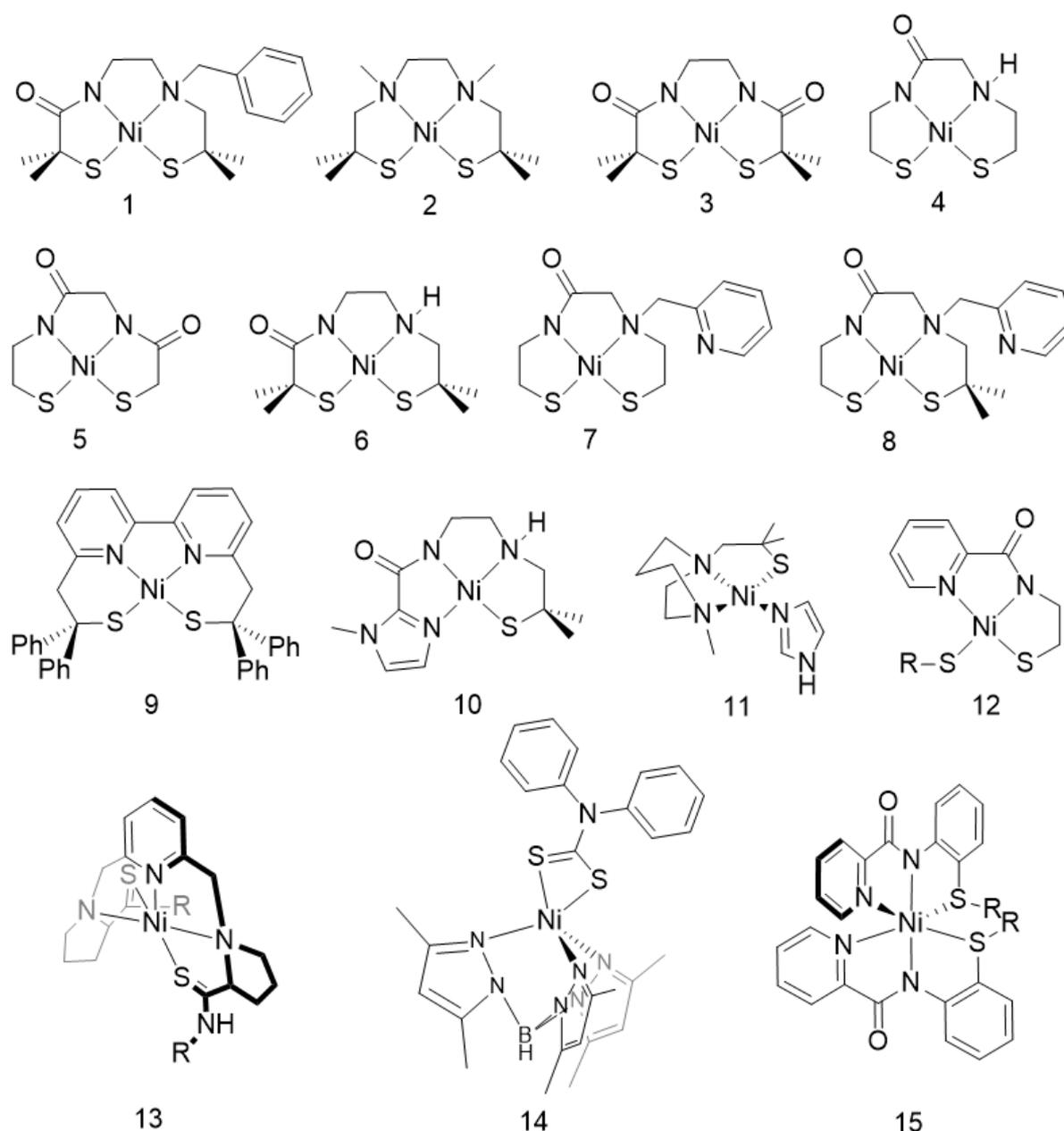


Figure 9. Structures de complexes de Ni^{II} comme modèles synthétiques de la Ni-SOD

Afin d'éviter l'ajout d'imidazole, les complexes **7** et **8**, intégrant directement un cinquième ligand, ont été synthétisés.^{97,98} Sous la forme Ni^{II} , les pyridines ne sont pas coordonnées. Or, les oxydations entraînent la formation de ponts disulfures et ne permettent pas d'isoler les formes Ni^{III} . La présence d'un ligand potentiel en position apicale n'est donc pas suffisante pour assurer la stabilité d'un complexe de Ni^{III} .

D'autres complexes de nickel avec des sphères de coordinations plus éloignées de celle de l'enzyme ont aussi été étudiés. Malgré l'absence d'amide, une oxydation réversible du nickel est obtenue par CV pour le complexe **9** en présence d'imidazole, et la forme Ni^{III} a pu être caractérisée par

RPE.⁹⁹ Le complexe **10** contient directement un dérivé imidazole dans son plan carré, mais les présences d'un seul thiolate et amido ne permettent pas d'abaisser suffisamment le potentiel d'oxydation du Ni^{II} et une oxydation irréversible est obtenue à 0,86 V vs NHE. Ce complexe est néanmoins stable à l'air, mais s'oxyde facilement en présence de peroxyde d'hydrogène.¹⁰⁰ De même, le complexe **11** qui contient également un imidazole dans le plan carré conduit aussi à une oxydation irréversible.¹⁰¹

De nombreux complexes dérivés de la structure **12** ont été étudiés en faisant varier le thiolate exogène.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Cela permet d'obtenir différentes propriétés électroniques tout en gardant une structure similaire, et donc de comprendre le rôle de la coordination des thiolates dans l'enzyme. L'étude par CV des complexes montre des oxydations irréversibles avec des différences de potentiel d'oxydation pouvant aller jusqu'à 0,2 V en fonction du groupement utilisé.^{102,103} Les structures de certains complexes déterminées par diffraction des rayons X (DRX) montrent la présence de liaisons hydrogène impliquant les thiolates qui leur confèrent une certaine stabilité vis-à-vis de l'oxydation.¹⁰³ Néanmoins, ces complexes ne réagissent pas avec le superoxyde.

Des complexes de Ni^{II} penta- ou hexa-coordonnés ont aussi été proposés comme modèles de la Ni-SOD. Le complexe **13** est dans une géométrie pyramidale à base carrée avec la coordination de thiocarbonyles, d'amines, ainsi que d'une pyridine en position axiale. Par CV, ce complexe montre des oxydations quasi-réversibles à un potentiel supérieur à celui de la réduction du superoxyde. La coordination d'un ligand axial même sur le Ni^{II} ne permet donc pas d'abaisser suffisamment le potentiel d'oxydation, ce qui montre encore une fois l'importance des thiolates.^{106,107} Le Ni^{II} du complexe **14** est aussi penta-coordonné avec un ligand scorpionate et un dithiocarbamate. De même, son oxydation est quasi-réversible à un potentiel élevé.¹⁰⁸ Enfin, le complexe **15** a aussi un potentiel d'oxydation très élevé, à plus de 1 V vs NHE.¹⁰⁹

La coordination de thiolates au nickel est donc essentielle pour abaisser le potentiel redox du couple Ni^{III}/Ni^{II}. Or, les thiolates sont sujet à s'oxyder en présence d'oxygène ou de ROS. La coordination originale du nickel dans l'enzyme permet de stabiliser ces liaisons Ni-S, notamment grâce à la coordination d'une amine et d'un amido. Néanmoins, ce facteur seul ne permet pas d'expliquer la stabilité des thiolates en présence de ROS dans l'enzyme et d'autres paramètres sont à prendre en compte, comme la présence d'un ligand en position axiale coordonnant le Ni^{III}, ou l'implication des thiolates dans des liaisons hydrogène, pour favoriser uniquement l'oxydation du métal. Pour illustrer cette difficulté, un seul complexe de Ni^{III} avec un thiolate coordonné a été cristallisé.¹¹⁰ Par conséquent, un seul intermédiaire réactionnel avec le superoxyde a pu être caractérisé avec un des complexes

précédents ($\text{Ni}^{\text{II}}\text{-O}_2^{\bullet}$),⁹⁶ et aucun n'est actif en catalyse. Finalement, cette approche n'a pas encore permis d'apporter des informations concluantes sur le mécanisme.

5. Objectifs et plan de la thèse

L'objectif de cette thèse est la synthèse et la caractérisation de nouveaux complexes de nickel bio-inspirés de la Ni-SOD avec deux buts principaux : (i) obtenir des complexes actifs en catalyse et qui permettraient de mettre en évidence les facteurs nécessaires à la catalyse de la dismutation du superoxyde, et (ii) obtenir des informations sur le mécanisme réactionnel grâce à la caractérisation d'intermédiaires réactionnels avec des complexes actifs.

Le Chapitre II présente l'étude dans l'eau de complexes obtenus à partir d'un ligand tripode déjà étudié au laboratoire pour la chélation de métaux mous comme le cuivre et le mercure, ainsi que d'un ligand dérivé qui contient les mêmes acides aminés que le site actif de la Ni-SOD. Les complexes obtenus présentent des structures originales avec une sphère de coordination relativement éloignée de celle du nickel dans l'enzyme. L'évaluation de leur activité catalytique de type SOD a montré qu'un des complexes était actif à pH physiologique.

Dans le Chapitre III, une série de complexes peptidiques a été développée et les complexes de Ni^{II} correspondants étudiés dans l'eau, dans le but d'établir une relation structure/activité, mettant en évidence certains paramètres essentiels à l'activité de type SOD. L'influence de la coordination de deux ou d'un seul thiolate, de deux amidos et d'un imidazole provenant d'une histidine a plus particulièrement été évaluée.

Enfin, le Chapitre IV porte sur l'étude d'un complexe peptidique en milieu organique et sur sa réactivité avec le superoxyde afin d'identifier des intermédiaires réactionnels et d'apporter des informations sur le mécanisme.

Dans les différents chapitres, les calculs DFT ont été réalisés en collaboration avec Pascale Maldivi, et les analyses des spectres EXAFS avec l'aide de Jacques Pécaut. Dans les Chapitre III et IV, une partie des caractérisations de NiCAC et NiAcCAC, et l'étude de NiFAC dans la cellule spectroélectrochimique ont été réalisées de manière respective par Magali Douillard (Stagiaire M2) et Pawel Guinard (Stagiaire M1), que j'ai formés et encadrés.

6. Références

1. L.J.R. de, J.K. Böhlke, B.P. De, et al. Atomic weights of the elements. Review 2000 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75 (6), 683–800.
2. Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. In *Nickel and its surprising impact in nature*; Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O., Eds.; Metal ions in life sciences; Wiley, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, **2007**; Vol. 2, pp 31–62.
3. S.R. Collinson, M. Schröder. Nickel: Inorganic & Coordination Chemistry. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; American Cancer Society, **2011**.
4. M. Uudsemaa, T. Tamm. Density-Functional Theory Calculations of Aqueous Redox Potentials of Fourth-Period Transition Metals. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107 (46), 9997–10003.
5. N.E. Dixon, C. Gazzola, R.L. Blakeley, B. Zerner. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97 (14), 4131–4133.
6. D.C. Adriano. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals, 2nd ed.; Springer-Verlag, New York, **2001**.
7. T.M. Nieminen, L. Ukonmaanaho, N. Rausch, W. Shotyk. Biogeochemistry of Nickel and Its Release into the Environment. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*; John Wiley & Sons, Ltd, **2007**; pp 1–29.
8. S.B. Mulrooney, R.P. Hausinger. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, 27 (2–3), 239–261.
9. E. Denkhaus, K. Salnikow. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, 42 (1), 35–56.
10. S.W. Ragsdale. Nickel Enzymes & Cofactors. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; Scott, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2011**.
11. M.J. Maroney. Structure/function relationships in nickel metallobiochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3 (2), 188–199.
12. S. Benini, W. Rypniewski, K. Wilson, S. Ciurli, S. Mangani. Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6 (8), 778–790.
13. S.C. Chai, T. Ju, M. Dang, et al. Characterization of Metal Binding in the Active Sites of Acireductone Dioxygenase Isoforms from *Klebsiella* ATCC 8724. *Biochemistry (Mosc.)* **2008**, 47 (8), 2428–2438.
14. J.W. Wray, R.H. Abeles. The Methionine Salvage Pathway in *Klebsiella pneumoniae* and Rat Liver, identification and characterization of two novel dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (7), 3147–3153.
15. B. Desguin, P. Goffin, E. Viaene, et al. Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system. *Nat. Commun.* **2014**, 5, 3615.
16. J.A. Rankin, R.C. Mauban, M. Fellner, et al. Lactate Racemase Nickel-Pincer Cofactor Operates by a Proton-Coupled Hydride Transfer Mechanism. *Biochemistry (Mosc.)* **2018**, 57 (23), 3244–3251.
17. I. Dincer, C. Acar. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *Int. J. Hydrog. Energy* **2015**, 40 (34), 11094–11111.
18. J.A. Cracknell, K.A. Vincent, F.A. Armstrong. Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (7), 2439–2461.

19. W. Kaim, B. Schwederski, A. Klein. Nickel-containing enzymes: the remarkable career of a long-overlooked biometal. In *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 163–181.
20. D.J. Evans, C.J. Pickett. Chemistry and the hydrogenases. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32 (5), 268–275.
21. M. Can, F.A. Armstrong, S.W. Ragsdale. Structure, Function, and Mechanism of the Nickel Metalloenzymes, CO Dehydrogenase, and Acetyl-CoA Synthase. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (8), 4149–4174.
22. U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R.K. Thauer. Crystal Structure of Methyl-Coenzyme M Reductase: The Key Enzyme of Biological Methane Formation. *Science* **1997**, 278 (5342), 1457–1462.
23. J.L. Craft, Y.-C. Horng, S.W. Ragsdale, T.C. Brunold. Nickel Oxidation States of F430 Cofactor in Methyl-Coenzyme M Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (13), 4068–4069.
24. E.I. Solomon, S.I. Gorelsky, A. Dey. Metal–thiolate bonds in bioinorganic chemistry. *J. Comput. Chem.* **2006**, 27 (12), 1415–1428.
25. J.E. Coleman, B.L. Vallee. Metallo-carboxypeptidases. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235 (2), 390–395.
26. J.-H. Jeoung, D. Nianios, S. Fetzner, H. Dobbek. Quercetin 2,4-Dioxygenase Activates Dioxygen in a Side-On O₂–Ni Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (10), 3281–3284.
27. J.L. Boer, S.B. Mulrooney, R.P. Hausinger. Nickel-dependent metalloenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 544, 142–152.
28. W.-J. Wang, W.-J. Wei, R.-Z. Liao. Deciphering the chemoselectivity of nickel-dependent quercetin 2,4-dioxygenase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20 (23), 15784–15794.
29. H. Noh, J. Cho. Synthesis, characterization and reactivity of non-heme 1st row transition metal-superoxo intermediates. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 382, 126–144.
30. W. Kaim, B. Schwederski, A. Klein. The dioxygen molecule: O₂: uptake, transport and storage of an inorganic natural product. In *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 77–97.
31. F.Q. Schafer, G.R. Buettner. Redox State and Redox Environment in Biology. In *Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles*; Forman, H. J., Fukuto, J., Torres, M., Eds.; Springer Netherlands, Dordrecht, **2003**; pp 1–14.
32. M. Schieber, N.S. Chandel. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* **2014**, 24 (10), R453–R462.
33. H. Sies. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **2017**, 11, 613–619.
34. H. Sies. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, 7, 122–126.
35. H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, 86 (1), 715–748.
36. V.P. Patel, C.T. Chu. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2011**, 4 (3), 215–229.
37. B. Halliwell. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* **2007**, 401 (1), 1–11.
38. J.M. McCord. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin. Biochem.* **1993**, 26 (5), 351–357.

39. J.M. McCord, I. Fridovich. The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* **1968**, 243 (21), 5753–5760.
40. I. Fridovich. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **1975**, 44 (1), 147–159.
41. Y. Sheng, I.A. Abreu, D.E. Cabelli, et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (7), 3854–3918.
42. J.M. McCord, I. Fridovich. Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, 244 (22), 6049–6055.
43. D.R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **1993**, 362 (6415), 59.
44. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson. Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* **1982**, 160 (2), 181–217.
45. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **1983**, 306 (5940), 284.
46. P.J. Hart, M.M. Balbirnie, N.L. Ogihara, et al. A Structure-Based Mechanism for Copper–Zinc Superoxide Dismutase. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, 38 (7), 2167–2178.
47. L.M. Ellerby, D.E. Cabelli, J.A. Graden, J.S. Valentine. Copper–Zinc Superoxide Dismutase: Why Not pH-Dependent? *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (28), 6556–6561.
48. V.V. Smirnov, J.P. Roth. Mechanisms of Electron Transfer in Catalysis by Copper Zinc Superoxide Dismutase. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (51), 16424–16425.
49. N.G. Robinett, R.L. Peterson, V.C. Culotta. Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *J. Biol. Chem.* **2018**, 293 (13), 4636–4643.
50. B.B. Keele, J.M. McCord, I. Fridovich. Superoxide Dismutase from *Escherichia coli* B, a new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.* **1970**, 245 (22), 6176–6181.
51. F.J. Yost, I. Fridovich. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248 (14), 4905–4908.
52. W.C. Stallings, K.A. Pattridge, R.K. Strong, M.L. Ludwig. Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259 (17), 10695–10699.
53. M.S. Lah, M.M. Dixon, K.A. Pattridge, et al. Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: Comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, 34 (5), 1646–1660.
54. Y. Sheng, E.B. Gralla, M. Schumacher, et al. Six-coordinate manganese(3+) in catalysis by yeast manganese superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109 (36), 14314–14319.
55. H.-D. Youn, E.-J. Kim, J.-H. Roe, Y.C. Hah, S.-O. Kang. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* **1996**, 318 (3), 889–896.
56. J.B. Glass, C.L. Dupont. Oceanic Nickel Biogeochemistry and the Evolution of Nickel Use. In *The Biological Chemistry of Nickel*; **2017**; pp 12–26.
57. B. Palenik, B. Brahamsha, F.W. Larimer, et al. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **2003**, 424 (6952), 1037.
58. C.L. Dupont, K. Neupane, J. Shearer, B. Palenik. Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. *Environ. Microbiol.* **2008**, 10 (7), 1831–1843.

59. E.-J. Kim, H.-P. Kim, Y.C. Hah, J.-H. Roe. Differential Expression of Superoxide Dismutases Containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces Coelicolor*. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 241 (1), 178–185.
60. H.M. Kim, J.-H. Shin, Y.-B. Cho, J.-H. Roe. Inverse regulation of Fe- and Ni-containing SOD genes by a Fur family regulator Nur through small RNA processed from 3'UTR of the *sodF* mRNA. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (3), 2003–2014.
61. E. Mathieu, A.-S. Bernard, N. Delsuc, et al. A Cell-Penetrant Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Mimic Is Able To Complement MnSOD and Exerts an Antiinflammatory Effect on Cellular and Animal Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Inorg. Chem.* **2017**, 56 (5), 2545–2555.
62. A. Schmidt, M. Gube, A. Schmidt, E. Kothe. In silico analysis of nickel containing superoxide dismutase evolution and regulation. *J. Basic Microbiol.* **2009**, 49 (1), 109–118.
63. S.B. Choudhury, J.-W. Lee, G. Davidson, et al. Examination of the Nickel Site Structure and Reaction Mechanism in *Streptomyces seoulensis* Superoxide Dismutase. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, 38 (12), 3744–3752.
64. D.P. Barondeau, C.J. Kassmann, C.K. Bruns, J.A. Tainer, E.D. Getzoff. Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, 43 (25), 8038–8047.
65. C.A. Grapperhaus, M.Y. Darensbourg. Oxygen Capture by Sulfur in Nickel Thiolates. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31 (8), 451–459.
66. V.E. Kaasjager, E. Bouwman, S. Gorter, et al. Unique Reactivity of a Tetradentate N2S2 Complex of Nickel: Intermediates in the Production of Sulfur Oxygenates. *Inorg. Chem.* **2002**, 41 (7), 1837–1844.
67. K.C. Ryan, O.E. Johnson, D.E. Cabelli, T.C. Brunold, M.J. Maroney. Nickel superoxide dismutase: structural and functional roles of Cys2 and Cys6. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, 15 (5), 795–807.
68. R.K. Szilagyi, P.A. Bryngelson, M.J. Maroney, et al. S K-Edge X-ray Absorption Spectroscopic Investigation of the Ni-Containing Superoxide Dismutase Active Site: New Structural Insight into the Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (10), 3018–3019.
69. A.T. Fiedler, P.A. Bryngelson, M.J. Maroney, T.C. Brunold. Spectroscopic and Computational Studies of Ni Superoxide Dismutase: Electronic Structure Contributions to Enzymatic Function. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (15), 5449–5462.
70. R. Prabhakar, K. Morokuma, D.G. Musaev. A DFT study of the mechanism of Ni superoxide dismutase (NiSOD): Role of the active site cysteine-6 residue in the oxidative half-reaction. *J. Comput. Chem.* **2006**, 27 (12), 1438–1445.
71. P.A. Bryngelson, M.J. Maroney. Nickel Superoxide Dismutase. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*; John Wiley & Sons, Ltd, **2007**; pp 417–443.
72. R.W. Herbst, A. Guce, P.A. Bryngelson, et al. Role of Conserved Tyrosine Residues in NiSOD Catalysis: A Case of Convergent Evolution. *Biochemistry (Mosc.)* **2009**, 48 (15), 3354–3369.
73. J. Wuerges, J.-W. Lee, Y.-I. Yim, et al. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101 (23), 8569–8574.
74. P.A. Bryngelson, S.E. Arobo, J.L. Pinkham, D.E. Cabelli, M.J. Maroney. Expression, Reconstitution, and Mutation of Recombinant *Streptomyces coelicolor* NiSOD. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (2), 460–461.

75. K.C. Ryan, A.I. Guce, O.E. Johnson, et al. Nickel Superoxide Dismutase: Structural and Functional Roles of His1 and Its H-Bonding Network. *Biochemistry (Mosc.)* **2015**, 54 (4), 1016–1027.
76. R. Breslow. Centenary Lecture. Biomimetic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1972**, 1 (4), 553–580.
77. J. Shearer, L.M. Long. A Nickel Superoxide Dismutase Maquette That Reproduces the Spectroscopic and Functional Properties of the Metalloenzyme. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (6), 2358–2360.
78. J. Shearer. Insight into the Structure and Mechanism of Nickel-Containing Superoxide Dismutase Derived from Peptide-Based Mimics. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (8), 2332–2341.
79. K.P. Neupane, J. Shearer. The Influence of Amine/Amide versus Bisamide Coordination in Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (26), 10552–10566.
80. J. Shearer. Dioxygen and superoxide stability of metallopeptide based mimics of nickel containing superoxide dismutase: The influence of amine/amido vs. bis-amido ligation. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 129, 145–149.
81. K.P. Neupane, K. Gearty, A. Francis, J. Shearer. Probing Variable Axial Ligation in Nickel Superoxide Dismutase Utilizing Metallopeptide-Based Models: Insight into the Superoxide Disproportionation Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (47), 14605–14618.
82. J. Shearer, K.P. Neupane, P.E. Callan. Metallopeptide Based Mimics with Substituted Histidines Approximate a Key Hydrogen Bonding Network in the Metalloenzyme Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (22), 10560–10571.
83. J. Shearer. Use of a Metallopeptide-Based Mimic Provides Evidence for a Proton-Coupled Electron-Transfer Mechanism for Superoxide Reduction by Nickel-Containing Superoxide Dismutase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (9), 2569–2572.
84. J. Shearer, K.L. Peck, J.C. Schmitt, K.P. Neupane. Cysteinate Protonation and Water Hydrogen Bonding at the Active-Site of a Nickel Superoxide Dismutase Metallopeptide-Based Mimic: Implications for the Mechanism of Superoxide Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (45), 16009–16022.
85. D. Tietze, H. Breitzke, D. Imhof, et al. New Insight into the Mode of Action of Nickel Superoxide Dismutase by Investigating Metallopeptide Substrate Models. *Chem. – Eur. J.* **2009**, 15 (2), 517–523.
86. D. Tietze, M. Tischler, S. Voigt, et al. Development of a Functional cis-Prolyl Bond Biomimetic and Mechanistic Implications for Nickel Superoxide Dismutase. *Chem. - Eur. J.* **2010**, 16 (25), 7572–7578.
87. D. Tietze, S. Voigt, D. Mollenhauer, et al. Revealing the Position of the Substrate in Nickel Superoxide Dismutase: A Model Study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (13), 2946–2950.
88. D. Tietze, B. Koley Seth, M. Brauser, A.A. Tietze, G. Buntkowsky. Ni(II) Complex Formation and Protonation States at the Active Site of a Nickel Superoxide Dismutase-Derived Metallopeptide: Implications for the Mechanism of Superoxide Degradation. *Chem. - Eur. J.* **2018**, 24 (59), 15879–15888.
89. M.E. Krause, A.M. Glass, T.A. Jackson, J.S. Laurence. Novel Tripeptide Model of Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2010**, 49 (2), 362–364.

90. M.E. Krause, A.M. Glass, T.A. Jackson, J.S. Laurence. MAPping the Chiral Inversion and Structural Transformation of a Metal-Tripeptide Complex Having Ni-Superoxide Dismutase Activity. *Inorg. Chem.* **2011**, 50 (6), 2479–2487.
91. J. Shearer, N. Zhao. [Me₄N](NiII(BEAAM)): A Synthetic Model for Nickel Superoxide Dismutase That Contains Ni in a Mixed Amine/Amide Coordination Environment. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (24), 9637–9639.
92. J. Shearer, A. Dehestani, F. Abanda. Probing Variable Amine/Amide Ligation in NiIIIN₂S₂ Complexes Using Sulfur K-Edge and Nickel L-Edge X-ray Absorption Spectroscopies: Implications for the Active Site of Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2008**, 47 (7), 2649–2660.
93. H. Kruger, G. Peng, R. Holm. Low-potential nickel(III,II) complexes: new systems based on tetradentate amido-thiolate ligands and the influence of ligand structure on potentials in relation to the nickel site in [NiFe]-hydrogenases. *Inorg. Chem.* **1991**, 30 (4), 734–742.
94. C.A. Grapperhaus, C.S. Mullins, P.M. Kozlowski, M.S. Mashuta. Synthesis and Oxygenation of a Nickel(II) and Zinc(II) Dithiolate: An Experimental and Theoretical Comparison. *Inorg. Chem.* **2004**, 43 (9), 2859–2866.
95. V. Mathrubootham, J. Thomas, R. Staples, et al. Bisamido and Mixed Amine/Amido NiN₂S₂ Complexes as Models for Nickel-Containing Acetyl Coenzyme A Synthase and Superoxide Dismutase: An Experimental and Computational Study. *Inorg. Chem.* **2010**, 49 (12), 5393–5406.
96. D. Nakane, Y. Wasada-Tsutsui, Y. Funahashi, et al. A Novel Square-Planar Ni(II) Complex with an Amino—Carboxamido—Dithiolato-Type Ligand as an Active-Site Model of NiSOD. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (13), 6512–6523.
97. E.M. Gale, A.C. Simmonett, J. Telsler, H.F. Schaefer, T.C. Harrop. Toward Functional Ni-SOD Biomimetics: Achieving a Structural/Electronic Correlation with Redox Dynamics. *Inorg. Chem.* **2011**, 50 (19), 9216–9218.
98. P.T. Truong, E.M. Gale, S.P. Dzul, T.L. Stemmler, T.C. Harrop. Steric Enforcement about One Thiolate Donor Leads to New Oxidation Chemistry in a NiSOD Model Complex. *Inorg. Chem.* **2017**, 56 (14), 7761–7780.
99. M. Gennari, M. Orio, J. Pécaut, et al. Reversible Apical Coordination of Imidazole between the Ni(III) and Ni(II) Oxidation States of a Dithiolate Complex: A Process Related to the Ni Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2010**, 49 (14), 6399–6401.
100. C.S. Mullins, C.A. Grapperhaus, B.C. Frye, et al. Synthesis and Sulfur Oxygenation of a (N₃S)Ni Complex Related to Nickel-Containing Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (21), 9974–9976.
101. R.M. Jenkins, M.L. Singleton, E. Almaraz, J.H. Reibenspies, M.Y. Darensbourg. Imidazole-Containing (N₃S)-NiII Complexes Relating to Nickel Containing Biomolecules. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (15), 7280–7293.
102. E.M. Gale, A.K. Patra, T.C. Harrop. Versatile Methodology Toward NiN₂S₂ Complexes as Nickel Superoxide Dismutase Models: Structure and Proton Affinity. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (13), 5620–5622.
103. E.M. Gale, B.S. Narendrapurapu, A.C. Simmonett, H.F. Schaefer, T.C. Harrop. Exploring the Effects of H-Bonding in Synthetic Analogues of Nickel Superoxide Dismutase (Ni-SOD): Experimental and Theoretical Implications for Protection of the Ni–SCys Bond. *Inorg. Chem.* **2010**, 49 (15), 7080–7096.

104. E.P. Broering, S. Dillon, E.M. Gale, et al. Accessing Ni(III)-Thiolate Versus Ni(II)-Thiyl Bonding in a Family of Ni–N₂S₂ Synthetic Models of NiSOD. *Inorg. Chem.* **2015**, 54 (8), 3815–3828.
105. P.T. Truong, E.P. Broering, S.P. Dzul, et al. Simultaneous nitrosylation and N-nitrosation of a Ni-thiolate model complex of Ni-containing SOD. *Chem. Sci.* **2018**, 9 (45), 8567–8574.
106. C.-W. Chiang, Y.-L. Chu, H.-L. Chen, T.-S. Kuo, W.-Z. Lee. Synthesis and Characterization of Ni(III)N₃S₂ Complexes as Active Site Models for the Oxidized Form of Nickel Superoxide Dismutase. *Chem. – Eur. J.* **2014**, 20 (21), 6283–6286.
107. W.-Z. Lee, C.-W. Chiang, T.-H. Lin, T.-S. Kuo. A Discrete Five-Coordinate Ni(III) Complex Resembling the Active Site of the Oxidized Form of Nickel Superoxide Dismutase. *Chem. – Eur. J.* **2012**, 18 (1), 50–53.
108. H. Ma, G. Wang, G.T. Yee, J.L. Petersen, M.P. Jensen. Scorpionate-supported models of nickel-dependent superoxide dismutase. *Inorganica Chim. Acta* **2009**, 362 (12), 4563–4569.
109. S.K. Chatterjee, R.C. Maji, S.K. Barman, M.M. Olmstead, A.K. Patra. Hexacoordinate Nickel(II)/(III) Complexes that Mimic the Catalytic Cycle of Nickel Superoxide Dismutase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53 (38), 10184–10189.
110. J. Hanss, H.-J. Krüger. First Isolation and Structural Characterization of a Nickel(III) Complex Containing Aliphatic Thiolate Donors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37 (3), 360–363.

Chapitre II.

Ligands tripodes fonctionnalisés par des acides aminés

Chapitre II. Ligands tripodes fonctionnalisés par des acides aminés

1. Contexte et objectifs

Tous les complexes de nickel décrits dans la littérature qui ont une activité de type SOD en conditions catalytiques impliquent un ligand peptidique dérivé de la séquence de l'enzyme. Ils comportent donc systématiquement deux thiolates, une amine et un amido coordonnés au nickel. Peu d'études ont été effectuées dans le but de déterminer la coordination nécessaire à l'activité catalytique, et notamment celle des atomes d'azote. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à des complexes présentant une structure éloignée de celle du site actif de l'enzyme, mais qui peuvent apporter une réponse à cette question.

Les ligands utilisés dans ce chapitre sont dérivés de l'acide nitrilotriacétique (NTA) dont les trois fonctions acides sont couplées à différents acides aminés (Figure 10). Ces structures et les complexes correspondant sont très solubles dans l'eau et peuvent donc être étudiés dans des conditions similaires à un environnement biologique.

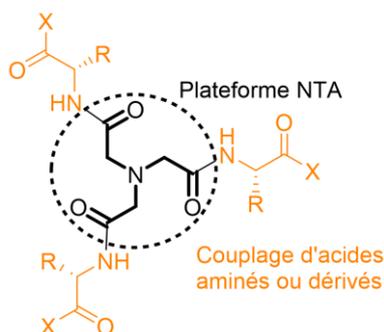


Figure 10. Structure de pseudo-peptides dérivés du NTA.

Lorsque trois dérivés soufrés sont couplés sur le NTA, comme des cystéines, des méthionines ou des D-pénicillamines, les ligands obtenus ont une bonne affinité pour les métaux mous, comme le Cu^{I} ou le Hg^{II} , avec la coordination des trois soufres.¹⁻⁶ Notamment, la chélation du Cu^{I} par L^{35} (Figure 11) est similaire à celle intervenant dans les métallothionéines, qui sont des protéines chargées de la détoxification des cellules par chélation des ions métalliques.⁷ En conditions stœchiométriques, des complexes mononucléaires trigonaux sont obtenus dans l'eau à pH physiologique. Si le cuivre est en excès, le ligand conduit à des clusters Cu_6S_9 . Ce ligand a aussi pu être vectorisé pour permettre la chélation intracellulaire du cuivre.⁸ Lorsque le NTA est couplé à trois histidines, le ligand peut aussi coordonner le Cu^{I} et également le Cu^{II} et des géométries sensiblement différentes sont obtenues : le

Cu^I conduit à une coordination tétraédrique, tandis que le Cu^{II} est coordonné dans une géométrie plan carré distordue.⁹

Ces pseudo-peptides sont donc très polyvalents en termes de sphère de coordination et de géométrie. La coordination du Ni^{II} peut se révéler intéressante, notamment par sa propension à former des complexes plan carré. Afin de conserver une coordination du nickel relativement proche de celle observée dans la NiSOD, et principalement pour ajuster le potentiel redox du métal dans une gamme qui permettrait la catalyse, des cystéines et histidines ont été couplées sur le NTA. Le ligand L^{35} , déjà décrit dans la littérature mais dont la coordination du nickel n'a pas été étudiée, le ligand L^{25} , ainsi que les complexes correspondants sont présentés dans ce chapitre. Afin d'empêcher la coordination des fonctions acides carboxyliques des acides aminés, ceux-ci sont protégés par des fonctions amides primaires, qui sont stables en milieu aqueux dans toute la gamme de pH.

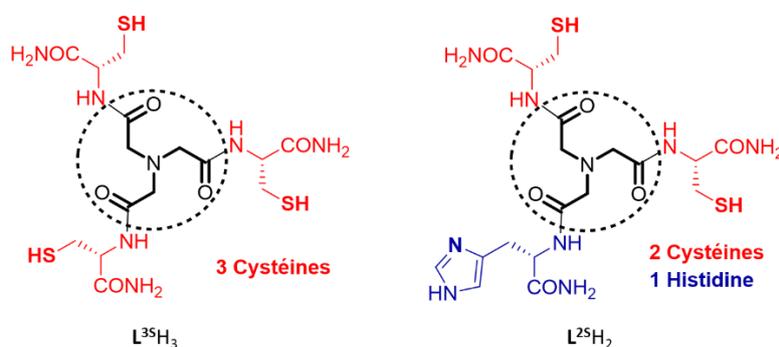


Figure 11. Structure des ligands L^{35} et L^{25} .

L^{25} possède les mêmes acides aminés que ceux impliqués dans la coordination du nickel dans l'enzyme : deux cystéines et une histidine, mais sans amine terminale. L^{35} est riche en soufre et doit permettre la coordination des trois thiolates sur le nickel. Ces ligands pourront permettre d'évaluer l'importance de la coordination amido/amine dans la NiSOD ainsi que la possibilité d'obtenir une activité catalytique avec une structure relativement éloignée de celle dans l'enzyme.

2. Synthèse des ligands

2.1. Synthèse de L^{25}

Le ligand L^{25} a la particularité d'être dissymétrique, avec deux cystéines et une histidine greffées sur le NTA. La synthèse n'est donc pas triviale car elle nécessite des activations/protections spécifiques pour garantir le bon ratio cystéine/histidine. Deux voies de synthèses ont été explorées.

La première méthode consiste à greffer successivement les acides aminés sur le NTA (Schéma 7). La première étape est la synthèse de l'histidine protégée en C-Ter **3**. Une fonction acide du NTA est ensuite activée avec la formation d'un anhydride (**4**). Celui-ci va ensuite pouvoir réagir avec l'amine de l'histidine protégée pour conduire au composé **5**. Les cystéines protégées sont ensuite couplées aux fonctions acides restantes du NTA avec un agent de couplage (**6**). Malheureusement, ce couplage ne permet pas d'obtenir le ligand avec un bon rendement (15% sur cette étape). La dernière étape correspond à la déprotection des chaînes latérales des acides aminés, puis le ligand est purifié par HPLC préparative en phase inverse (colonne C18) et lyophilisé. Un rendement global de 6% est obtenu et les spectres de masse et RMN sont présentés dans l'Annexe II.1.1.

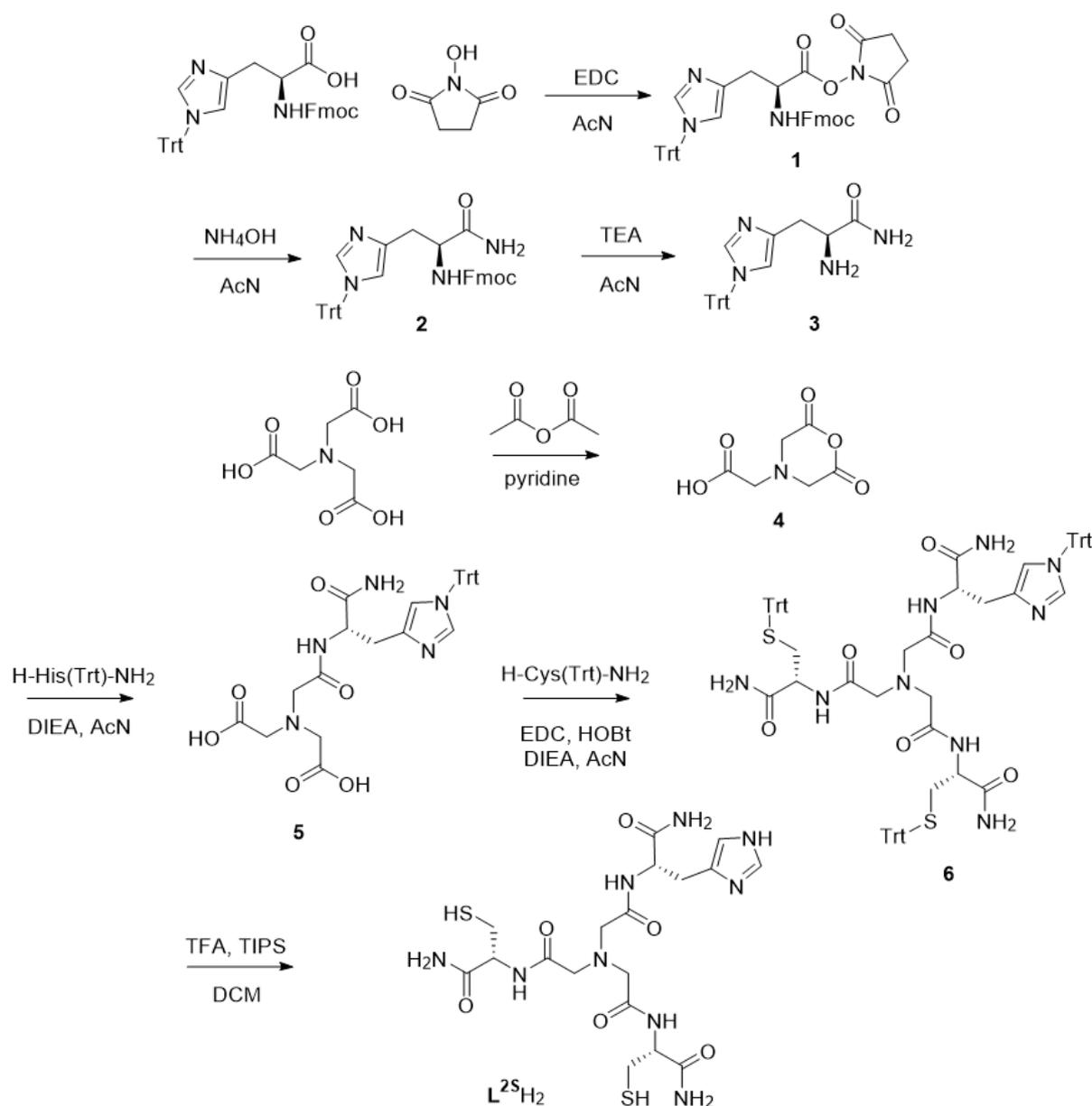


Schéma 7. Voie de synthèse du ligand L²⁵.

Dans le but d'améliorer ce rendement, une deuxième méthode s'inspirant de la synthèse peptidique sur support solide (SPPS, détaillée dans le Chapitre III) a été utilisée (Schéma 8). L'histidine protégée en N-Ter est d'abord greffée sur le support (résine), puis l'amine est déprotégée et couplée au NTA. Finalement, les cystéines sont couplées aux deux fonctions acides restantes du NTA, puis le ligand est déprotégé et clivé.

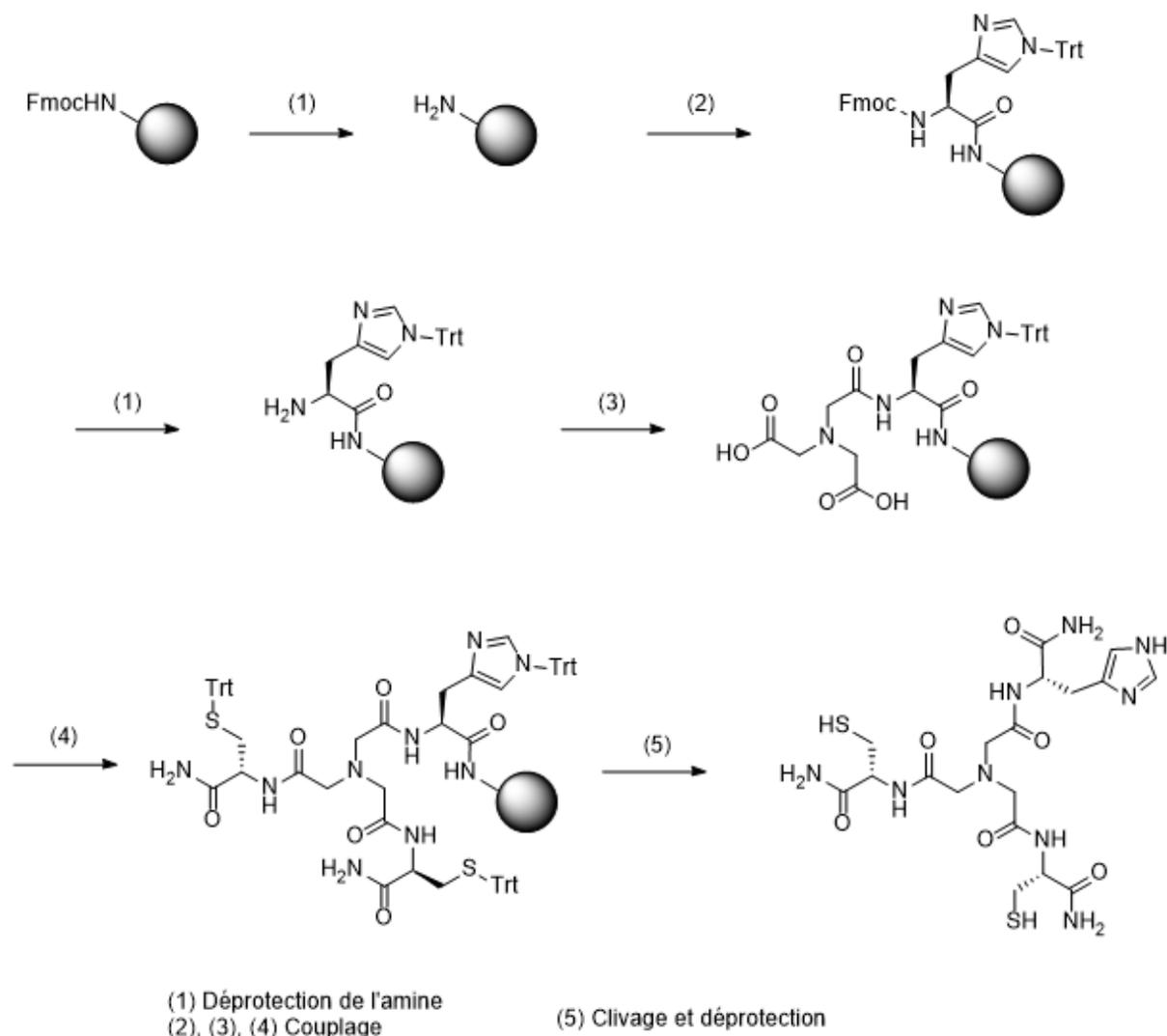


Schéma 8. Synthèse alternative du ligand L^{25} .

Cependant, de nombreux sous-produits sont obtenus. En effet, les histidines greffées sur la résine sont relativement proches entre elles, et lors du couplage avec le NTA, ce dernier réagit avec deux, voire trois histidines (Schéma 9). Le rendement global est donc faible, et cette stratégie n'a pas permis d'isoler le produit final.

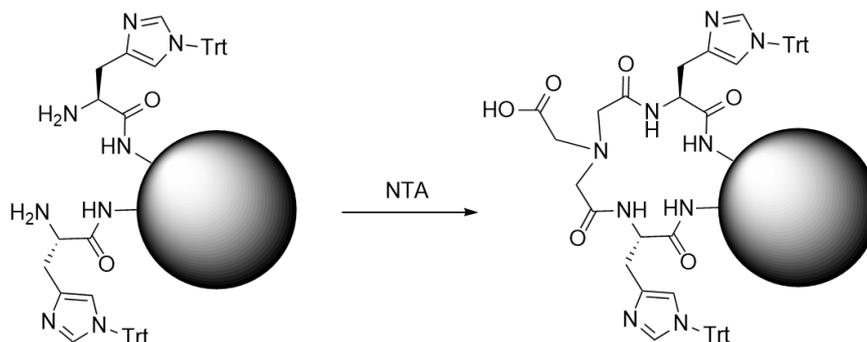


Schéma 9. Réaction secondaire observée pendant le couplage sur la résine.

2.2. Synthèse de L³⁵

La synthèse de L³⁵ a été mise au point précédemment au laboratoire et est aussi basée sur le couplage peptidique entre le NTA et trois cystéines.² Comme pour L²⁵, le ligand est purifié par HPLC préparative en phase inverse (C18).

3. Préparation des solutions de ligand

L'ensemble des études de ce chapitre nécessite des concentrations de complexes de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-5} M, et donc de faibles quantités de matière. Les différents ligands étant obtenus après purification en milieu acide et lyophilisation, leurs états de protonation et la quantité d'eau résiduelle dépendent de la lyophilisation, et par conséquent leurs masses molaires exactes sont inconnues. La pesée des différents ligands serait ainsi une technique trop imprécise et une autre méthode a été utilisée : le test d'Ellman, permettant de doser les thiols.¹⁰

Pour ce test, une partie d'une solution de ligand est prélevée et est dosée par un indicateur coloré, le 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Lors de la réaction avec un thiol, (Schéma 10) l'anion 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB²⁻) est généré et peut être quantifié par spectroscopie UV-Visible ($\epsilon_{412} = 14\ 150\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹¹

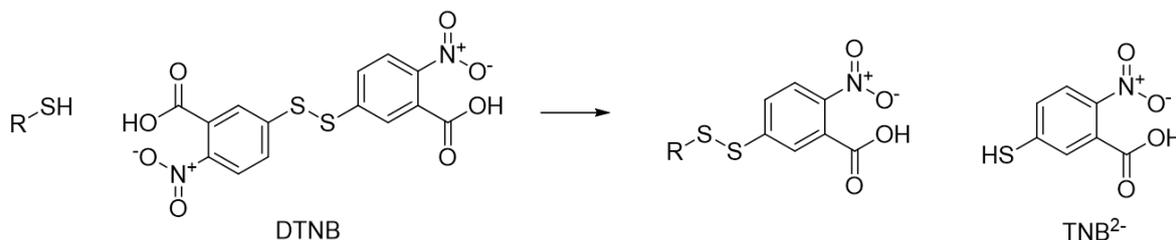


Schéma 10. Réaction mise en jeu dans le test d'Ellman.

Pour les différentes expériences, les solutions de ligand et complexe sont donc préparées *in situ*. Après détermination de la concentration de ligand en solution, la quantité de Ni^{II} adéquate est ajoutée.

4. Ligand dissymétrique

4.1. Stœchiométrie des complexes

Dans le but de déterminer si L²⁵ peut bien coordonner le Ni^{II} et avec quelle stœchiométrie, des dosages du ligand par NiSO₄ ont été effectués par suivis spectroscopiques UV-Visible et CD, ainsi que par spectrométrie de masse (MS). Comme des études préliminaires ont montré que le complexe n'était pas complètement formé à pH physiologique (Voir partie 4.2), les dosages ont été effectués à pH 8,5.

Le dosage suivi par spectroscopie UV-Visible en milieu tamponné (HEPES 20 mM, pH 8,5, [NaCl]=100 mM) conduit à l'apparition de bandes de transfert de charge du ligand vers le métal (LMCT) qui attestent de la formation de complexes de nickel (Figure 12). Deux évolutions distinctes des spectres UV-Visible sont observées au cours du dosage : une première entre 0 et 1 équivalent de Ni^{II} ajouté, et une seconde entre 1 et 2 équivalents (Figure 12, encadré). Le spectre à un équivalent montre deux bandes LMCT à 260 nm (épaulement, $\epsilon \approx 10\ 100\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et à $\approx 285\ \text{nm}$ (épaulement, $\epsilon \approx 7\ 600\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ainsi qu'une bande d-d à 450 nm ($\epsilon \approx 450\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Les bandes LMCT intenses indiquent la coordination des thiolates au nickel, tandis que la transition d-d est significative d'une géométrie plan carré.¹²⁻¹⁵

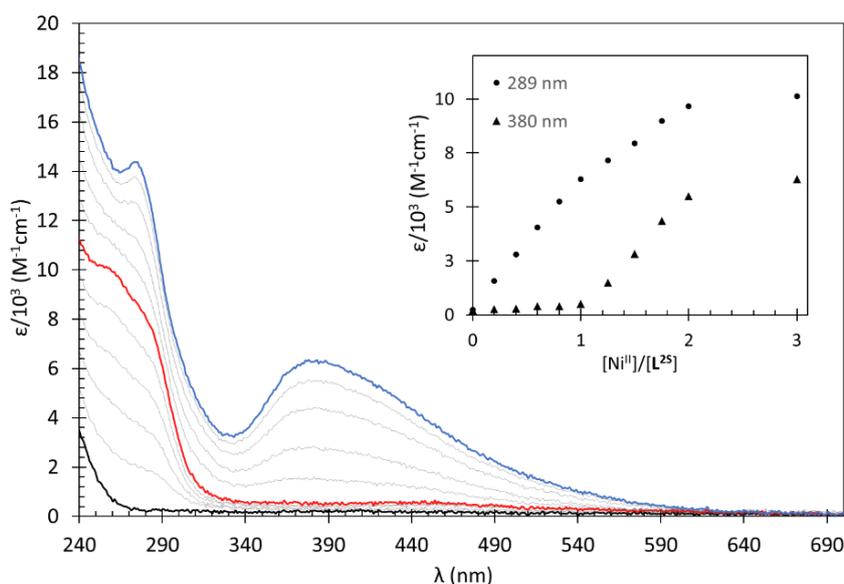


Figure 12. Dosage de L²⁵ (43 μM) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 8,5, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu.

A deux équivalents de Ni^{II} , le spectre est très différent : une nouvelle bande LMCT à 275 nm apparaît ($\epsilon = 14\,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ainsi qu'une autre à 380 nm ($\epsilon = 6\,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) qui peut provenir de sulfures pontant entre deux nickels.¹⁴

Les acides aminés étant chiraux, les complexes formés peuvent être analysés par dichroïsme circulaire (CD). Le suivi par CD du dosage montre les mêmes phénomènes qu'en spectroscopie UV-Visible, avec une première évolution des spectres jusqu'à un équivalent de nickel ajouté, puis une seconde au-delà avec un changement considérable du spectre, et donc une réorganisation de la structure (Figure 13). De plus, la présence de points isodichroïques entre 0 et 1 équivalent (258 nm, 308 nm, 385 nm, 510 nm), puis entre 1 et 2 équivalents (253 nm, 312 nm, 406 nm), montrent la formation d'une unique espèce en défaut de nickel ou condition stœchiométrique (283 nm (-), 325 nm (+), 455 nm (-)), qui évolue vers une seconde en excès de métal (273 nm (+), 347 nm (-), 435 nm (+)). Les bandes observées sont cohérentes avec la coordination des sulfures dans une géométrie plan carré.¹⁶ Ces résultats suggèrent la formation unique d'un complexe avec un ratio $\text{Ni}:\text{L}^{25}$ de 1:1 jusqu'à un équivalent de nickel, puis d'une espèce polymétallique 2:1 en excès de Ni^{II} .

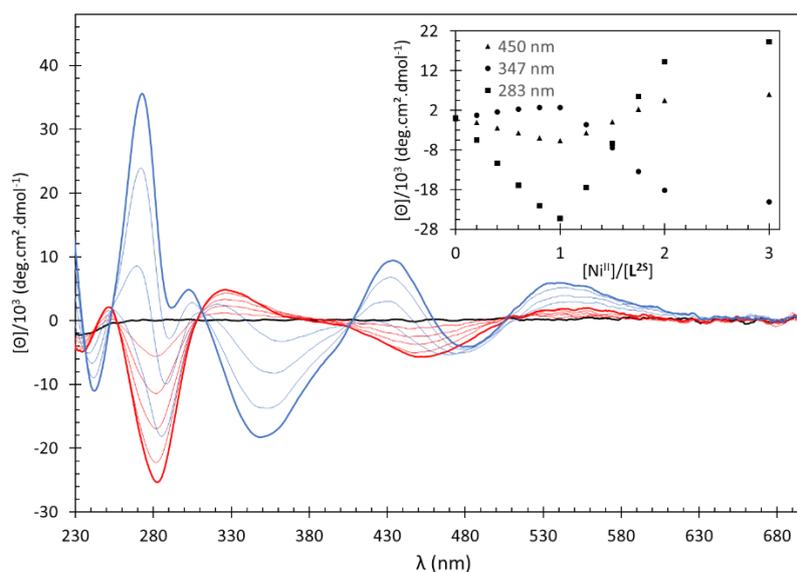


Figure 13. Dosage CD de L^{25} ($43 \mu\text{M}$) par NiSO_4 , tampon HEPES (20 mM , $\text{pH } 8,5$, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont respectivement représentés en noir, rouge et bleu.

Les analyses des complexes par spectrométrie de masse ont été effectuées dans une solution d'acétate d'ammonium (20 mM) à $\text{pH } 8,5$ (Figure 14). En condition stœchiométrique entre Ni et L^{25} , seul le pic correspondant à l'espèce $[\text{NiL}^{25}\text{-H}]^-$ est présent ($m/z = 586,0$). Lorsqu'un excès de Ni^{II} est ajouté au ligand, on observe uniquement l'apparition de l'espèce 2:1 $[\text{Ni}_2\text{L}^{25}\text{-3H}]^-$ ($m/z = 643,8$). Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus précédemment par spectroscopie UV-Visible et CD.

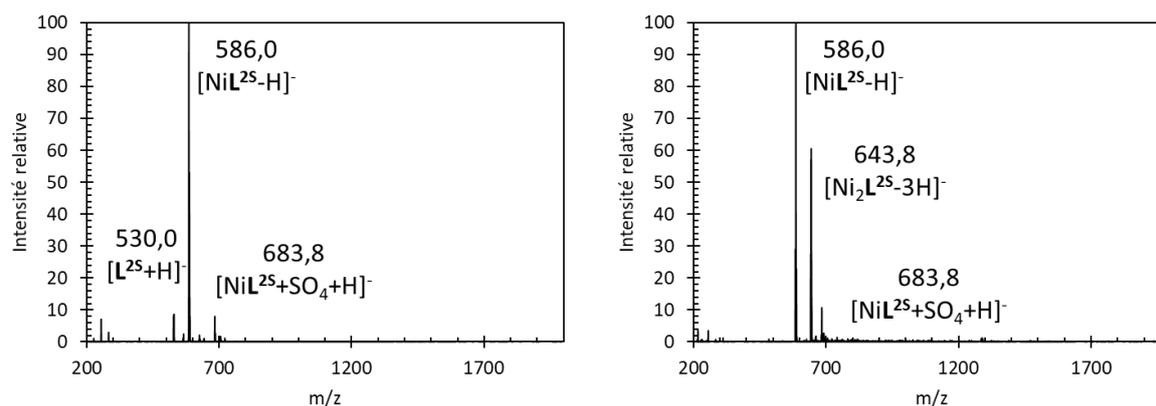


Figure 14. Spectres de masse (ESI-MS(-)) de L^{25} ($187 \mu\text{M}$) avec 1 équivalent (gauche) et 2 équivalents (droite) de NiSO_4 , dans de l'acétate d'ammonium (20 mM , $\text{pH } 8,5$)

En conclusion de ces études de dosage, les résultats obtenus à $\text{pH } 8,5$ montrent que jusqu'à un équivalent de nickel, seul le complexe mononucléaire NiL^{25} est formé en solution. Les bandes observées par spectroscopie suggèrent la coordination des deux thiolates dans un plan carré. La sphère de coordination du Ni^{II} peut donc être complétée par l'imidazole de l'histidine et une molécule du solvant (H_2O) pour donner le complexe $\text{NiL}^{25}(\text{OH}_2)$. Afin d'éviter la formation de l'espèce 2:1, le complexe mononucléaire a été étudié en conditions sous-stœchiométriques ($\text{Ni:L}^{25} 0,9:1$).

4.2. Effet du pH

La formation du complexe en fonction du pH a été étudiée par spectroscopie UV-Visible et CD entre $\text{pH } 5$ et 12 . Pour cela, de l'hydroxyde de potassium (KOH) est ajouté progressivement à une solution de L^{25} avec $0,9$ équivalent de Ni^{II} dans l'eau (Figure 15).

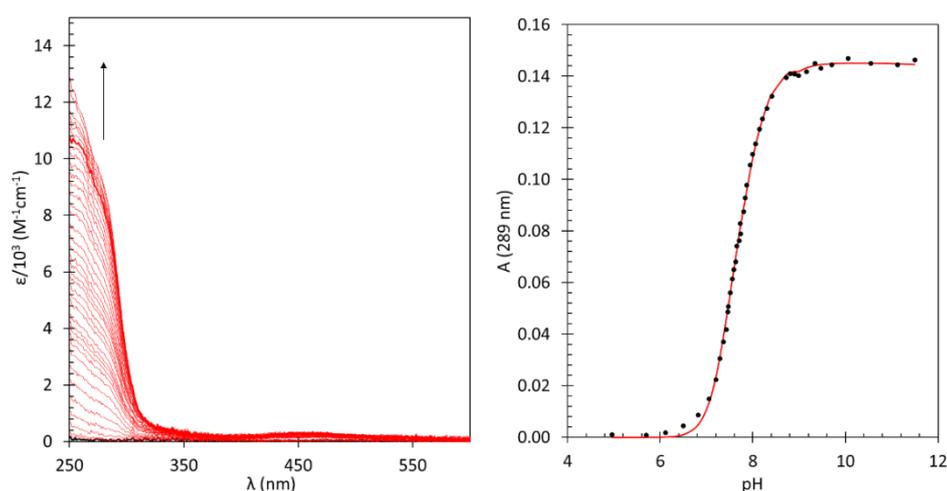
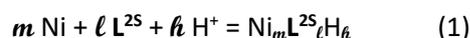


Figure 15. Gauche : Spectres UV-Visible pour L^{25} ($23 \mu\text{M}$) avec $0,9$ équivalent de Ni^{II} dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH.

L'augmentation du pH conduit à l'apparition des bandes UV-Visible décrites précédemment à 260, 285 et 450 nm à partir de pH 6 et jusqu'à pH 9 (Figure 15). A pH plus élevé, une nouvelle bande apparait à plus haute énergie. Le complexe n'est donc pas complètement formé à pH physiologique et devra être étudié dans des conditions basiques (pH > 8).

Les analyses par CD conduisent à la même évolution avec la formation du complexe jusqu'à pH 9 et l'apparition des bandes obtenues précédemment pour le complexe $\text{NiL}^{25}(\text{OH}_2)$ (Voir Annexe II.1.2). Là aussi, les points isodichroïques confirment la formation d'une unique espèce jusqu'à un équivalent de Ni^{II} (258 nm, 308 nm, 385 nm, 510 nm).

Dans le but de déterminer la constante d'affinité du complexe formé (β_{mth} , Equation 1) et le nombre de protons mis en jeu, l'évolution de l'absorbance sur l'ensemble de la gamme spectrale a été modélisée avec le logiciel SPECFIT.¹⁷⁻¹⁹ L'amine tertiaire du NTA possède généralement un pK_A très bas pour ce type de ligand ($\approx 2,8$) et son pK_A n'est donc pas considéré pour les modélisations.^{2,20} Le pK_A de l'histidine est généralement compris entre 6 et 7.^{21,22} Celui-ci a donc été fixé à 6,5 pour L^{25}H_3 . Par ailleurs, les pK_A des thiols du ligand L^{35}H_3 ont été précédemment déterminés par potentiométrie, et les valeurs des deux premiers thiols sont utilisées pour ceux de L^{25}H_3 , soit 8,5 et 9,2.



L'évolution de l'absorbance est modélisée par la perte de trois protons correspondant à l'imidazolium et aux deux thiolates, avec une constante d'affinité $\log\beta_{110} = 7,3$ (Figure 15, Droite).

4.3. Structure de $\text{NiL}^{25}(\text{OH}_2)$

4.3.1 Spectroscopie d'absorption des rayons X

Dans le but de confirmer la coordination du Ni^{II} dans le complexe, celui-ci a été analysé par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) au seuil K du nickel. Le spectre XANES (X-Ray Absorption Near Edge Structure) permet d'obtenir des informations sur la géométrie ainsi que sur l'état de spin et le degré d'oxydation de l'ion métallique, tandis que l'analyse des spectres EXAFS donne des informations sur la nature des atomes dans la sphère de coordination ainsi que sur les distances métal-ligand.

Pour limiter la dégradation du complexe pendant l'acquisition des spectres, les analyses sont effectuées à 10 K. Afin d'éviter la formation de cristaux de glace pouvant diffracter les rayons X, le complexe a été préparé dans l'eau avec 20% de glycérol et le pH a été ajusté à 8,4 par ajout de KOH. Le spectre XANES obtenu est présenté Figure 16 et comparé avec un complexe de référence : $\text{Ni}(\text{N2S2})$, qui contient un ion Ni^{II} coordonné par deux thiolates et deux pyridines dans un plan carré (la structure du complexe est représentée dans l'Annexe II.1.3). Les deux complexes présentent les mêmes

transitions, à 8333 eV ($1s \rightarrow 3d$) et 8339 eV (épaulement, $1s \rightarrow 4p_z$) pour NiL^{25} . La présence de ces deux transitions est en accord avec une géométrie plan carré autour du Ni^{II} .²³

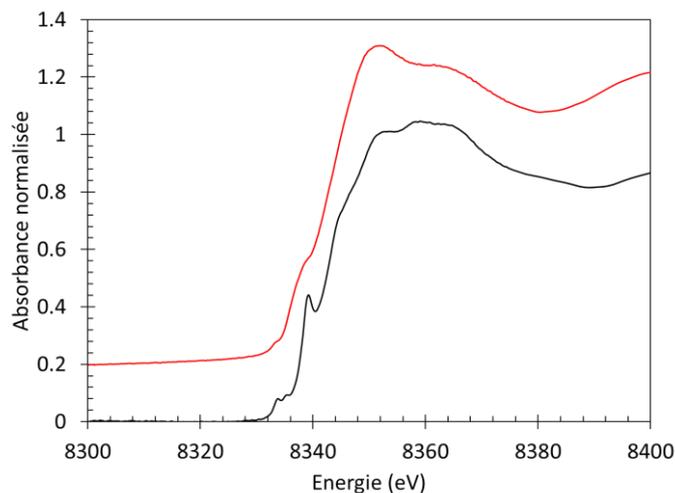


Figure 16. Spectres XANES de $NiL^{25}(OH_2)$ à 1,0 mM dans eau/glycérol (80:20) à pH 8,4 (offset de 0,2, rouge), et de $Ni(N_2S_2)$ solide dans une matrice de nitrure de bore (noir).

Pour le spectre EXAFS, les analyses ont été effectuées en considérant une couche de soufre, et une d'azote ou d'oxygène autour du nickel. En effet, l'azote et l'oxygène ayant des masses très proches, ils ne peuvent pas être différenciés par XAS. Les analyses EXAFS étant imprécises sur le nombre d'atomes par couche, ils ont soit été fixés, soit imposés avec une somme égale à 4. Les résultats sont présentés dans la Figure 17 et dans le Tableau 1.

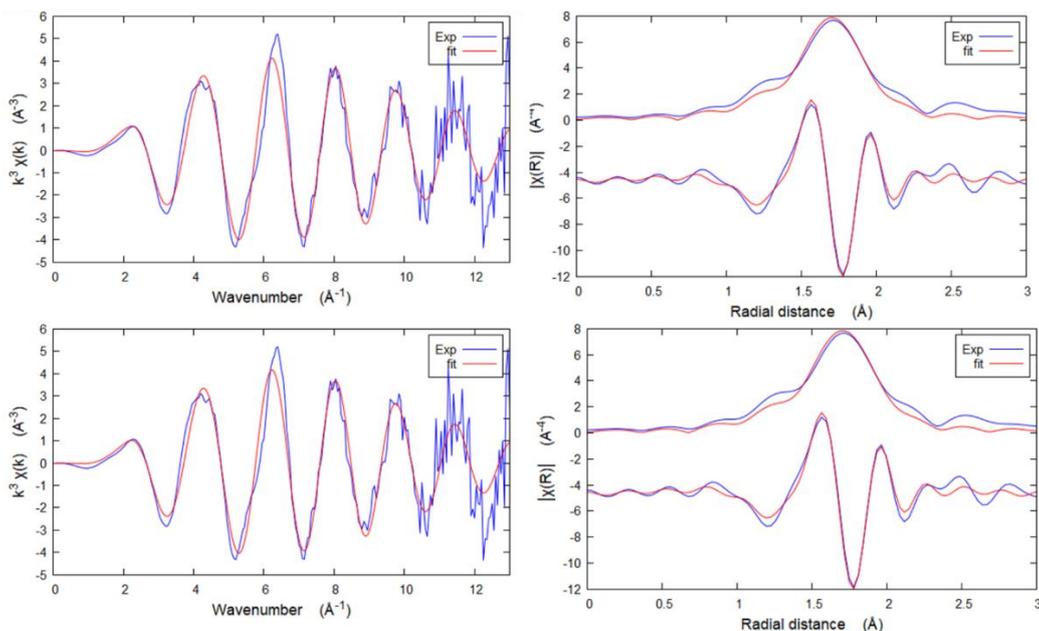


Figure 17. Analyses EXAFS pour $NiL^{25}(OH_2)$. Gauche : spectres EXAFS pondérés par k^3 . Droite : Transformées de Fourier. Analyses réalisées en fixant les nombres de coordination (bas), ou en imposant une somme égale à 4 (haut). Intervalles considérés : $2 < k < 12$ et $1 < R < 2,5$.

Tableau 1. Paramètres structuraux pour $NiL^{25}(OH_2)$ obtenus à partir des analyses EXAFS.

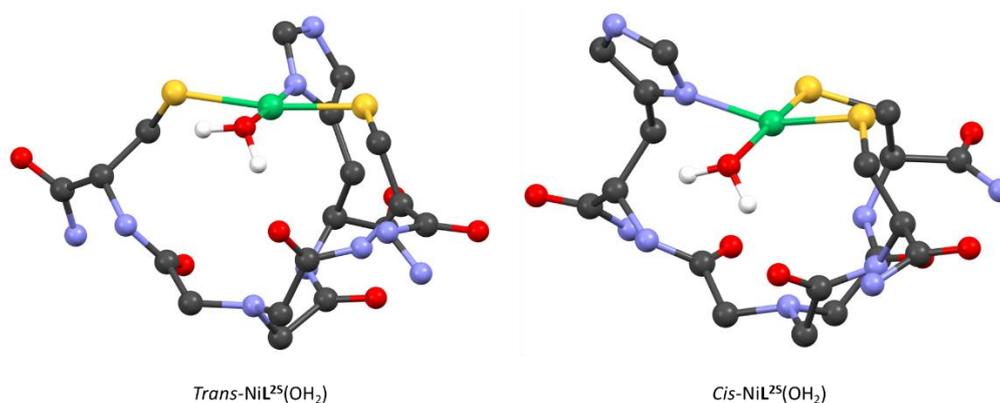
	Ni-S			Ni-O/N			ΔE_0 (eV)	Res (%)
	R (Å)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (Å ²)	R (Å)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (Å ²)		
$NiL^{25}(OH_2)^a$	2,22(3)	1.8(13)	4(2) ^c	2,05(4)	2.2(13)	4(2) ^c	1(6)	1,4
$NiL^{25}(OH_2)^b$	2,21(1)	2	5(1) ^c	2,04(3)	2	5(1) ^c	2(2)	1,4

Les erreurs sont indiquées entre parenthèses. ^a La somme des CNs a été fixée à 4. ^b Les valeurs de CN ont été fixées. ^c Les valeurs des σ^2 ont été imposées égales. Res = $[\sum(\chi_{exp} - \chi_{fit})^2 / \sum(\chi_{exp})^2] \times 100$.

Les analyses sont cohérentes avec la coordination des deux thiolates à 2,21 Å, de l'imidazole et d'une molécule d'eau à 2,04 Å. Néanmoins, les analyses XAS ne permettent pas de dire si la molécule d'eau et l'imidazole sont en *cis* ou en *trans* dans le complexe, ou si les deux coordinations sont présentes.

4.3.2 Etude par DFT

Des calculs DFT ont été effectués sur les deux complexes de Ni^{II} ($S = 0$) possibles, présentant une coordination *cis* ou *trans* (Figure 18). Les deux structures optimisées conduisent à des complexes de géométrie plan carré. La différence d'énergie entre les deux formes est très faible (< 2 kcal/mol) et n'est pas significative. Les deux formes peuvent donc être à priori présentes en solution.

Figure 18. Structures optimisées pour $NiL^{25}(OH_2)$.

Les distances métal-ligand entre les deux formes sont relativement différentes (Tableau 2). Les distances estimées par analyse EXAFS sont très proches de celles prédites par DFT pour la coordination *cis* qui doit donc être la forme majoritaire ou exclusive en solution.

Tableau 2. Distances obtenues après optimisation (Å).

	<i>Trans</i> -NiL ^{2S} (OH ₂)	<i>Cis</i> -NiL ^{2S} (OH ₂)
Ni-OH₂	1,95	2,04
Ni-N_{Im}	1,92	2,06
Ni-S	2,24	2,20
Ni-S	2,29	2,20

4.4. Propriétés redox

Les propriétés redox du complexe NiL^{2S}(OH₂) ont été analysées par voltampérométrie cyclique (CV) dans l'eau à pH 9,3 (Figure 19). La CV montre une oxydation irréversible à E_{pa} = 0,57 V vs SCE attribuée à l'oxydation du Ni^{II} en Ni^{III}. L'irréversibilité montre que le complexe de Ni^{III} est instable sur le temps de la CV et conduit probablement à l'oxydation des sulfures et à la dégradation du complexe. Néanmoins, le potentiel d'oxydation obtenu est tout juste inférieur au potentiel du couple O₂^{•-}/H₂O₂ (0,63 V vs SCE), et devrait donc permettre une catalyse de type SOD. La coordination des deux thiolates et de l'imidazole permet bien d'abaisser le potentiel d'oxydation du Ni^{II} sous le potentiel de réduction de superoxyde, mais ne permet pas d'atteindre le potentiel idéal, à environ 0,1 V vs SCE.

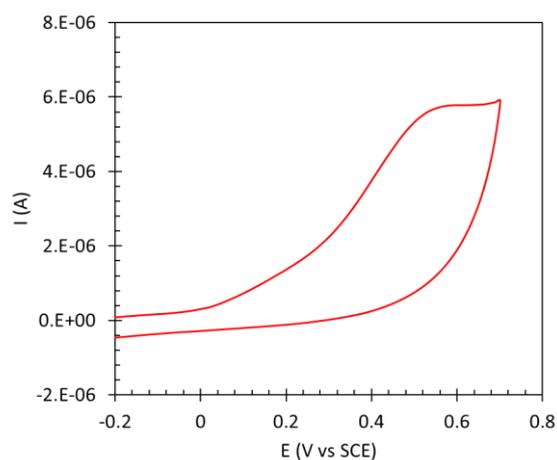


Figure 19. CV de NiL^{2S}(OH₂) (400 µM) à 100 mV/s dans l'eau (pH 9,3 ajusté par ajout de KOH, [NaCl] = 100 mM). Electrode de travail : carbone vitreux, électrode de référence : SCE.

4.5. Activité catalytique

Les superoxydes dismutases ont pour rôle d'accélérer la dismutation du superoxyde, réaction qui est déjà rapide à pH physiologique sans catalyseur. Mettre en évidence une activité catalytique de type SOD n'est donc pas trivial. Différentes méthodes ont été développées avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Ainsi, les activités sont parfois difficilement comparables entre les complexes modèles présentés dans le Chapitre I.²⁴ Elles peuvent être classées en deux catégories : les méthodes directes et les indirectes.

Les méthodes directes permettent la détermination précise de l'activité d'une SOD ou d'un modèle en travaillant en conditions catalytiques, c'est-à-dire en excès de superoxyde. Les plus courantes sont la radiolyse pulsée et le Stopped-Flow. En radiolyse pulsée, l'oxygène dissous en solution aqueuse est irradié pour générer $O_2^{\bullet-}$ *in situ* en présence de formate.^{25,26} Pour le Stopped-Flow, le principe consiste en un mélange rapide d'une solution contenant le superoxyde avec une autre contenant une SOD ou un modèle. Cette méthode sera détaillée en partie 5.6. Dans les deux cas, la dismutation du superoxyde peut être directement suivie par spectroscopie UV-Visible, le radical absorbant à 245 nm.

Les méthodes indirectes mettent en œuvre une compétition entre une SOD et un indicateur redox actif sensible au superoxyde. La réaction du superoxyde avec l'indicateur peut être suivie par spectroscopie UV-visible. La présence d'une SOD abaisse la concentration de superoxyde dans le milieu, ce qui aura un impact sur l'évolution de l'absorbance. Ces méthodes permettent de déterminer l'IC₅₀ des SODs, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la réaction entre l'indicateur et le superoxyde. Le test le plus couramment utilisé a été développé par McCord et Fridovich.

4.5.1 Description du test à la Xanthine Oxydase

Dans le test développé par McCord et Fridovich, le superoxyde est généré par une enzyme : la xanthine oxydase (XO).^{27,28} Celle-ci oxyde la xanthine en acide urique tout en réduisant l'oxygène en superoxyde (Schéma 11). $O_2^{\bullet-}$ peut alors réagir avec le Nitro Blue Tetrazolium (NBT) pour générer le formazan correspondant dont la concentration peut être suivie par spectroscopie UV-Visible ($\lambda_{max} = 560$ nm, $\epsilon_{560} \approx 35\,000$ M⁻¹cm⁻¹). L'ajout d'une SOD au milieu diminue alors la concentration de superoxyde en solution et donc la quantité de formazan formé.

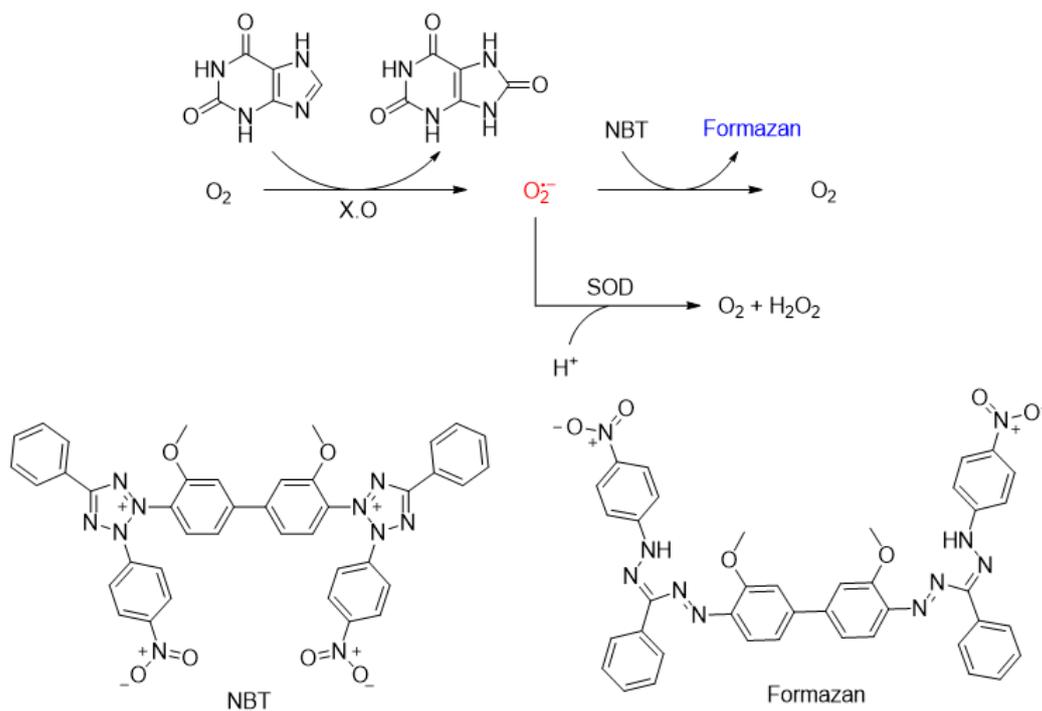


Schéma 11. Principe du test développé par McCord et Fridovich.

Expérimentalement, une solution aqueuse oxygénée contenant la xanthine et le NBT est préparée et l'absorbance est suivie à 560 nm, il n'y a alors pas d'évolution (Schéma 12, ①). La XO est ensuite ajoutée, entraînant la production de superoxyde qui réagit avec le NBT pour former du formazan. L'absorbance à 560 nm augmente alors linéairement (Schéma 12, ②). Finalement, l'ajout d'une SOD entraîne la consommation du superoxyde et inhibe donc la formation de formazan, ce qui ralentit l'augmentation de l'absorbance (Schéma 12, ③).

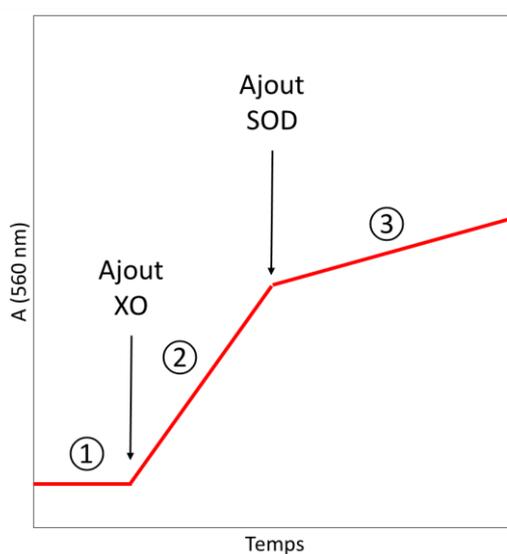


Schéma 12. Représentation de l'absorbance en fonction du temps lors du test à la Xanthine Oxydase.

Le principal avantage de cette méthode est la production continue du superoxyde en solution, modélisant ainsi correctement les milieux biologiques. L'inconvénient est que ce test ne permet pas de travailler en conditions catalytiques. En effet, dans des conditions classiques d'expérience, l'évolution de l'absorbance est fixée à $\Delta A_{560} = 0,024 \text{ min}^{-1}$.²⁹ L'expérience étant menée pendant environ 30 secondes après ajout de complexe, la quantité de superoxyde générée est de $\approx 2 \text{ nmol}$. A l'IC₅₀, seul 50% de O₂^{•-} réagit avec la SOD, soit $\approx 1 \text{ nmol}$. Les IC₅₀ de l'ordre du micromolaire ou supérieures n'auront donc pas été déterminées dans des conditions catalytiques, le volume de la solution étant de 2 mL. Néanmoins, ce test est un bon moyen pour déterminer si un complexe ou une SOD peut avoir une réactivité vis-à-vis du superoxyde. Pour information, l'IC₅₀ des SODs est de l'ordre de 10⁻⁸ M, tandis que pour les modèles peptidiques développés par Shearer (cf. Chapitre I), elle est de l'ordre de 10⁻⁶ M.³⁰

4.5.2 Détermination de l'IC₅₀

L'activité du complexe NiL^{2S}(OH₂) avec le superoxyde a été étudiée avec ce test à pH 8,4. Différentes concentrations ont été utilisées (jusqu'à 370 μM, Figure 20) mais aucune ne permet d'inhiber 50% de la formation de formazan. Le complexe étant alors en fort excès, il n'a pas d'activité de type SOD. Ce résultat est surprenant car même si le Ni^{III} est instable (irréversibilité de l'oxydation en CV), la première demi-équation entre le Ni^{II} et le superoxyde pourrait avoir lieu. L'obtention d'un complexe de Ni^{II} qui possède un potentiel d'oxydation proche mais inférieur au potentiel de réduction du superoxyde n'est donc pas suffisant pour conduire à une activité de type SOD. Une solution serait de centrer davantage le potentiel du complexe entre les potentiels d'oxydation et de réduction de O₂^{•-}. Pour cela, il est possible d'augmenter le nombre de thiolates coordonnés au Ni^{II} en utilisant le ligand L^{3S}.³¹

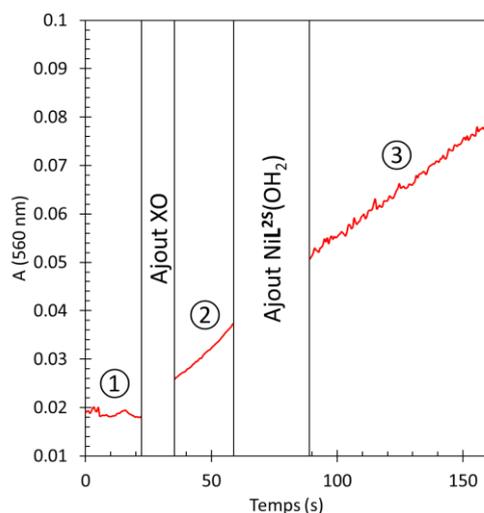


Figure 20. Suivi de l'absorbance à 560 nm. [Xanthine] = 50 μM, [NBT] = 100 μM, [NiL^{2S}(OH₂)] = 370 μM, [NaCl] = 100 mM, HEPES 20 mM, pH = 8,4.

5. Ligand symétrique

5.1. Stœchiométrie des complexes

Pour le ligand L^{35} , le dosage par $NiSO_4$ a été effectué à pH physiologique (HEPES 20 mM, pH 7,4). Les résultats obtenus par spectroscopie UV-Visible et CD sont présentés dans la Figure 21. Lors de l'ajout de Ni^{II} , les spectres UV-Visible montrent l'apparition de bandes de transfert de charge (LMCT) intenses à 289 nm ($\epsilon = 10\,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et 345 nm ($\epsilon = 6\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) qui sont attribuées à des transitions $S^- \rightarrow Ni^{II}$.^{13,32} L'ajout du métal conduit aussi à l'apparition d'une bande plus large et moins intense à 462 nm ($\epsilon = 1\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) qui peut être attribuée à une transition d-d.¹² L'encadré (Figure 21, gauche) représente l'évolution du coefficient d'absorption molaire (ϵ) en fonction du nombre d'équivalents de Ni^{II} ajouté. L'augmentation linéaire de ce coefficient jusqu'à 1 équivalent puis entre 1 et 2 équivalents suggère la formation d'un premier complexe qui évolue ensuite vers une deuxième espèce en présence d'un excès de nickel. Au-delà de 2 équivalents, l'absorbance n'évolue plus.

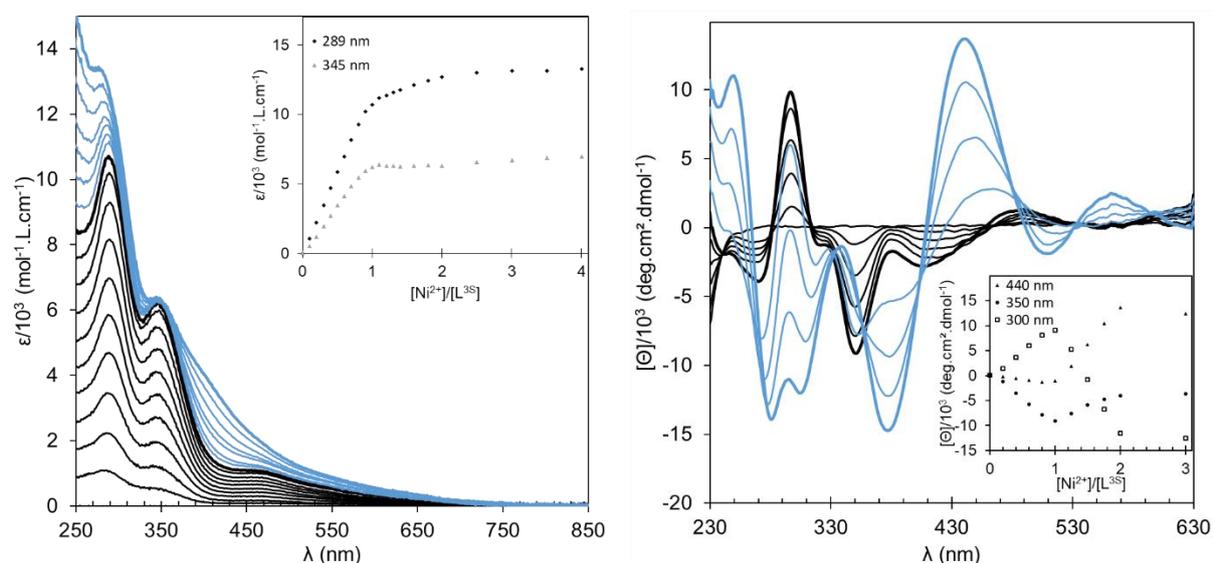


Figure 21. Dosages UV-Visible (gauche) et CD (droite) de L^{35} ($\approx 60\ \mu\text{M}$) à pH 7,4 (HEPES 20 mM, $[\text{NaCl}] = 100\text{ mM}$). Les spectres en noir sont obtenus entre 0 et 1 équivalent de Ni^{II} , et ceux en bleu entre 1 et 2 équivalents.

Le dosage suivi par CD est représenté à droite dans la Figure 21. Celui-ci confirme la formation successive de deux complexes de nickel avec des spectres CD très différents. En défaut de nickel, la présence de points isodichroïques (286 nm, 314 nm, 462 nm) atteste qu'un seul complexe est formé. Le spectre correspondant présente deux bandes intenses à 298 nm (+) et 351 nm (-) qui sont attribuées à des LMCT $S^- \rightarrow Ni^{II}$, et une plus faible à 405 nm (-) correspondant à une transition d-d et indiquant une géométrie plan carré.¹⁶ D'importants changements sont observés sur les spectres entre 1 et 2 équivalents avec l'apparition de nouvelles bandes à 248 nm (+), 282 nm (-), 307 nm (-), 378 nm (-), 440

nm (+) et 562 nm (+). Des points isodichroïques sont aussi observés à 333 nm, 357 nm, 404 nm et 533 nm, ce qui est en accord avec un équilibre entre deux complexes distincts uniquement. Ces expériences suggèrent la formation d'un seul complexe, avec un ratio Ni:L³⁵ 1:1, jusqu'à un équivalent de Ni^{II}. En présence d'un excès de nickel, ce complexe se transforme en une nouvelle espèce avec un ratio Ni:L³⁵ 2:1.

Les analyses par spectrométrie de masse (ESI-MS) des complexes en solution dans l'acétate d'ammonium (20 mM, pH 6,9) sont en accord avec les dosages précédents (Figure 22). En défaut de Ni^{II} ou en conditions stœchiométriques, l'ion principal correspond à l'espèce [NiL³⁵]⁻ (m/z = 552,0), avec des signaux faibles à m/z = 496,0 et 532,1 attribués au ligand libre : [L³⁵+2H]⁻ et [L³⁵+3H+Cl]⁻ (Figure 22, Gauche). Le complexe Ni₂L³⁵ n'est détecté qu'en excès de Ni^{II} avec l'apparition d'un signal à m/z = 607,9 correspondant à l'ion [Ni₂L³⁵ - 2H]⁻ (Figure 22, Droite).

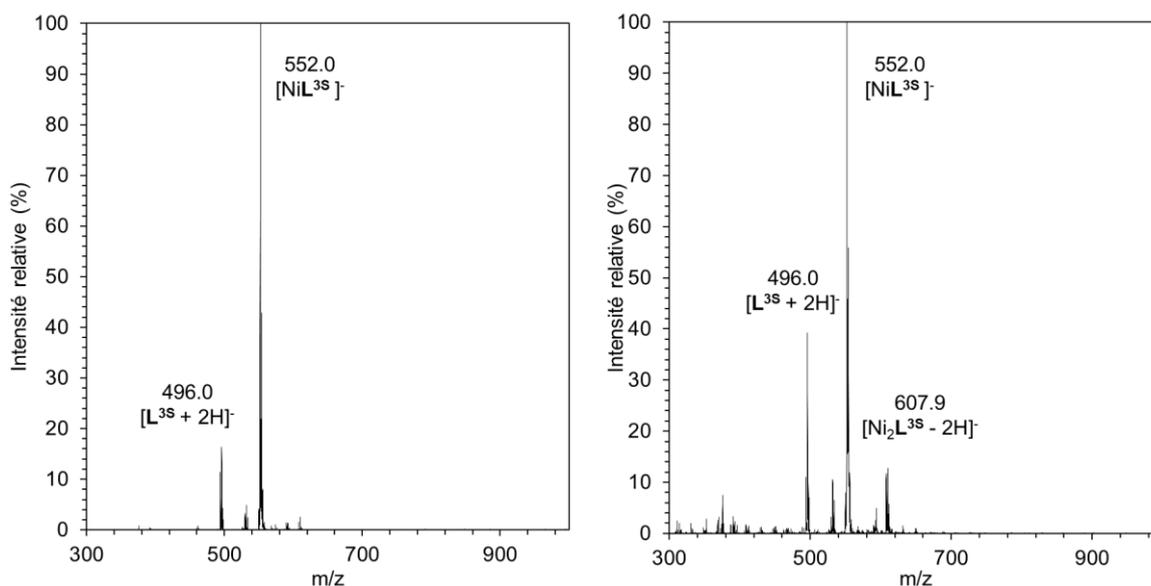


Figure 22. Spectres ESI-MS(-) de L³⁵ (190 μM) avec 1 (gauche) et 2 équivalents (droite) de Ni^{II} dans l'acétate d'ammonium (20 mM, pH 6,9).

L'ensemble de ces données confirme que, à pH 7,4 et jusqu'à un équivalent de Ni^{II}, une seule espèce est formée, correspondant au complexe mononucléaire de stœchiométrie 1:1. L'intensité des bandes observées par spectroscopie UV-Visible et CD suggère la coordination des trois thiolates au Ni^{II} dans une géométrie plan carré qui serait complétée par une molécule d'eau pour donner le complexe [NiL³⁵(OH₂)]⁻, ce qui pourra être confirmé par les expériences décrites ci-après. Comme pour le ligand L²⁵, les expériences sur le complexe seront conduites en défaut de Ni^{II} (Ni:L³⁵ 0,9:1) afin d'éviter la formation du complexe de stœchiométrie 2:1.

5.2. Effet du pH

L'effet du pH sur le complexe a été étudié par spectroscopie UV-Visible et CD entre pH 4 et pH 11 (Figure 23). Pour cela, de l'hydroxyde de potassium (KOH) est ajouté progressivement à une solution de Ni:L³⁵ 0,9:1 dans l'eau. Les transitions décrites précédemment pour NiL³⁵(OH₂) à pH 7,4 (289 nm, 345 nm et 462 nm) sont observées à partir de pH 5,3 avec un maximum à pH 6,9. Au-dessus de pH 7,5, le complexe initial évolue vers une deuxième espèce avec la présence de points isobestiques à 290 nm, 312 nm et 337 nm. Les deux bandes LMCT sont décalées vers de plus hautes énergies, à 270 nm ($\epsilon = 15\,800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et 325 nm ($\epsilon = 8\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), et la bande d-d à 483 nm ($\epsilon = 270\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La formation de ces deux complexes en fonction du pH est confirmée par CD (Figure 23, Droite). Entre pH 7 et pH 11, l'évolution du spectre donne lieu à cinq points isodichroïques avec des changements notables entre les spectres à pH 7,1 et à pH 10,6. Afin d'obtenir davantage d'informations sur cette seconde espèce, celle-ci a été analysée par spectrométrie de masse à pH 9,5 dans l'acétate d'ammonium (20 mM). Le spectre montre le même signal qu'à pH 6,9, correspondant au complexe mononucléaire Ni:L³⁵ 1:1.

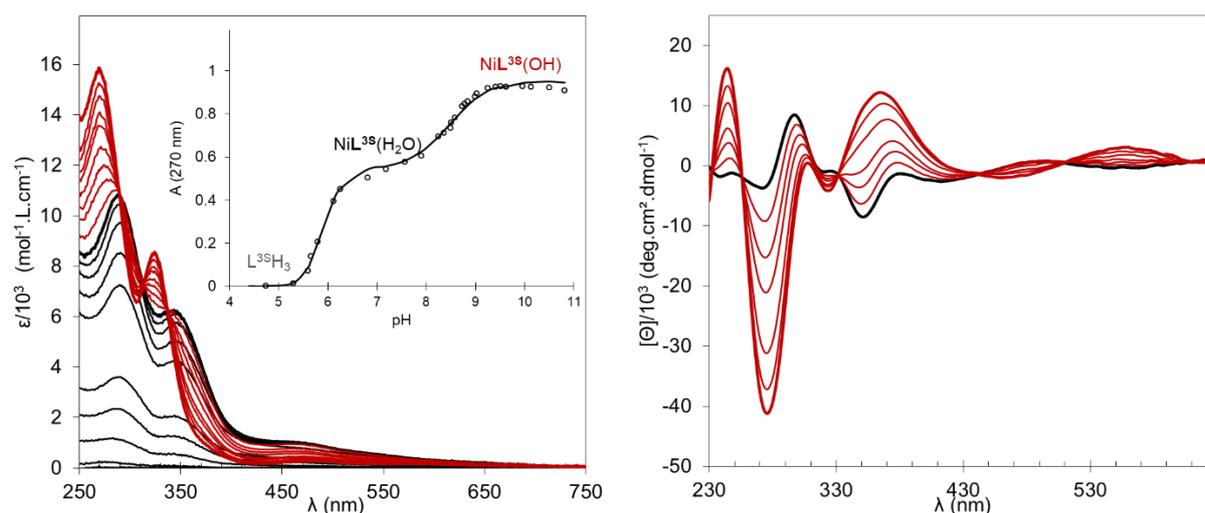


Figure 23. Spectres UV (gauche) et CD (droite) de L³⁵ (72 μM) et 0,9 équivalent de Ni^{II} dans l'eau à différents pH. UV-Visible : les spectres acquis entre pH 4 et 7,5 sont représentés en noir, et ceux entre pH 8 et 11 en rouge. Encadré : évolutions expérimentale (points) et simulée (trait) de l'absorbance à 270 nm avec le logiciel SPECFIT. CD : spectre obtenu à pH 7,1 (noir) et jusqu'à pH 10,5 (rouge).

Comme pour L²⁵, l'évolution de l'absorbance en fonction du pH a été modélisée avec le logiciel SPECFIT. Les pK_A du ligand L³⁵H₃ ont été déterminés dans des études précédentes et utilisés pour les analyses : pK_{A1} = 10,2, pK_{A2} = 9,2 et pK_{A3} = 8,5.² Deux phénomènes de déprotonation sont observés autour de pH 6,0 et pH 8,5, et ont été modélisés avec les pertes respectives de trois puis d'un proton (Figure 23, encadré). Ce résultat pour le premier phénomène est cohérent avec la formation du complexe NiL³⁵(OH₂) qui nécessite la déprotonation des trois thiols des cystéines. La constante

d'équilibre correspondante est $\log\beta_{110} = 14,6$. Cette valeur élevée démontre une grande stabilité pour ce complexe. Pour comparaison, le motif –Cys-Cys- dans des peptides a une affinité plus faible d'un à trois ordres de grandeurs pour le Ni^{II} .¹⁵

A pH plus élevé, le deuxième phénomène de déprotonation est attribué à la perte d'un proton de la molécule d'eau coordonnée au Ni^{II} , et donc à la formation d'un ligand hydroxo, pour conduire au complexe $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH})$. Un pK_A de 8,6 est ainsi déterminé pour cette molécule d'eau coordonnée dans un complexe de nickel de géométrie plan carré. Cette valeur est difficilement comparable avec les données de la littérature puisque aucune constante d'acidité pour une molécule d'eau dans ce type de coordination n'a été publiée. Néanmoins, cette valeur est relativement proche de celle déterminée pour le complexe $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ($\text{pK}_A = 9,9$).³³ Le diagramme de distribution des deux complexes est représenté dans la Figure 24. A pH physiologique, $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH}_2)$ est majoritaire (> 97% à pH 7, et > 94% à pH 7,4), tandis que $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH})$ devient majoritaire à pH > 9.

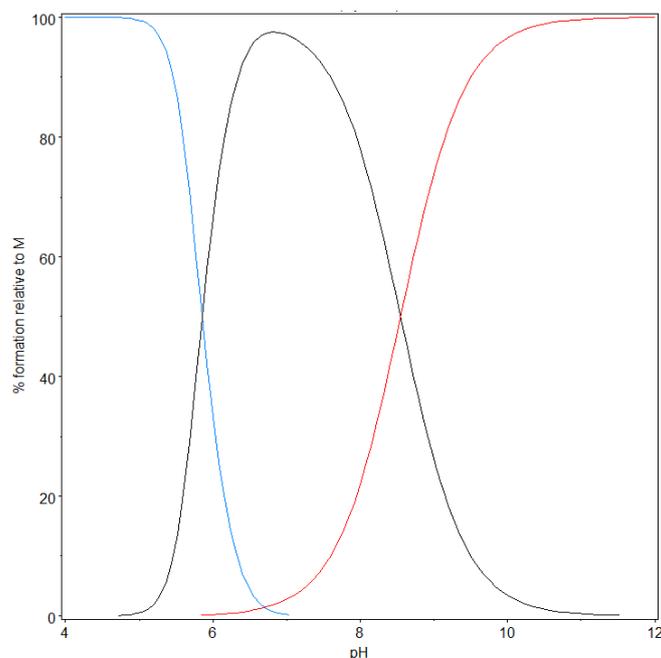


Figure 24. Diagramme de distribution pour les complexes de Ni^{II} avec L^{35} . $[\text{Ni}^{\text{II}}]/[\text{L}^{\text{35}}] = 0,9$, $[\text{Ni}^{\text{II}}] = 100 \mu\text{M}$. Bleu : $\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{aqua}}$, noir : $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH}_2)$, rouge : $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH})$.

5.3. Structure des complexes

A la différence du ligand L^{25} , L^{35} permet d'obtenir deux complexes de Ni^{II} en conditions stœchiométriques en fonction du pH. Afin de confirmer les structures proposées pour $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH}_2)$ et $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH})$, les complexes ont été analysés par RMN et XAS et modélisés par des calculs DFT.

5.3.1 Analyse par RMN ^1H

Les structures des deux complexes ont été étudiées par RMN ^1H . Des spectres caractéristiques de structures dissymétriques sont attendus. En effet, les trois résidus cystéines ont des environnements différents du fait de leur chiralité et de la géométrie plan carré des complexes. Afin de pouvoir observer les protons échangeables, les analyses ont été effectuées dans l'eau légère ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10).

Les deux spectres obtenus sont caractéristiques d'espèces diamagnétiques, avec des signaux entre 1 et 12 ppm, ce qui est en accord avec une géométrie plan carré autour d'un ion Ni^{II} bas spin ($S = 0$). De manière surprenante, les spectres RMN ^1H des deux complexes sont radicalement différents : celui de $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ présente des signaux bien résolus, tandis que celui de $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ ne comporte que des pics larges. Ce résultat suggère une différence de dynamique intramoléculaire importante dans les sphères de coordination des deux complexes.

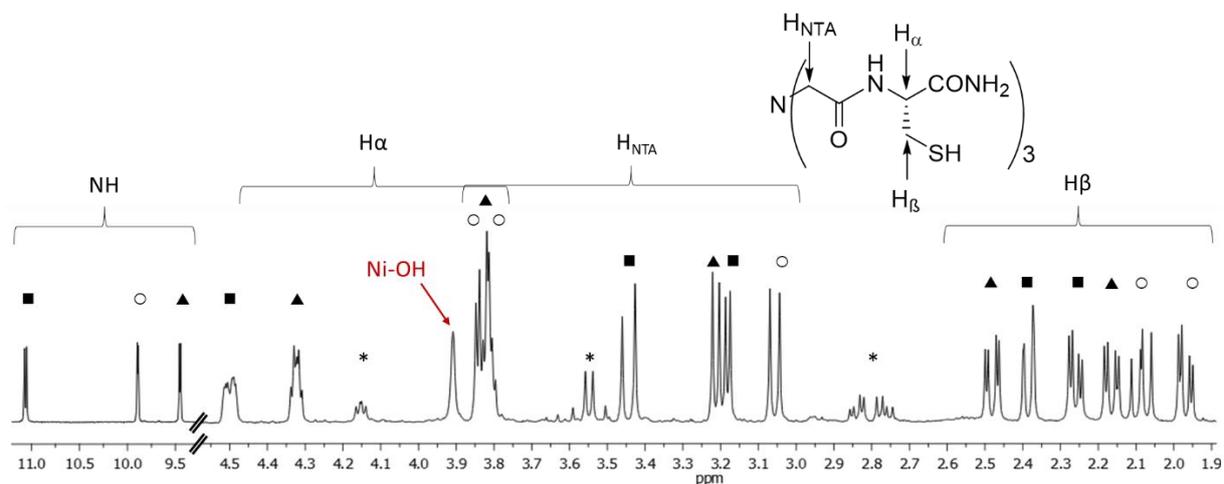


Figure 25. Spectre RMN ^1H (500 MHz) de $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ à 1,04 mM dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) à pH 10,1, 278 K. Chaque symbole correspond à un bras du tripode. (*) Excès de ligand (10%).

Pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$, le spectre a été acquis à 278 K. Un spectre similaire est obtenu à 298 K, mais un H_α est alors caché par le signal de l'eau. Tous les signaux ont été attribués grâce aux analyses des spectres 1D et 2D (Voir Annexe II.2.1), ce qui permet d'obtenir différentes informations structurales. Alors que les protons des amides primaires (NH_2) ne sont pas observés dans l'eau légère, ce qui est attendu à ces valeurs de pH, les trois protons des amides secondaires (NH) sont visibles sous la forme de doublets. En effet, ces protons ont de faibles coefficients de température (entre -1 et -3 ppb/K), caractéristiques d'une implication dans des liaisons hydrogène intramoléculaires.^{34,35} Ces observations confirment aussi que les amides ne sont pas déprotonées à pH 10,1, et donc qu'elles ne sont pas coordonnées au Ni^{II} .

Le pic large à 3,9 ppm, intégrant pour un proton, et qui disparaît avec l'ajout de D₂O est attribué au proton du ligand hydroxo coordonné au nickel. Une corrélation NOE intense dans le spectre NOESY du complexe indique que ce proton est proche d'un H_β d'une cystéine (le spectre NOESY est représenté dans l'Annexe II.2.1). De plus, son coefficient de température ($\Delta\delta/\Delta T = -3$ ppb/K) montre aussi son implication dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Toutes ces interactions conduisent à un environnement figé autour du centre Ni-OH, ce qui permet l'observation du proton de l'hydroxo par RMN ¹H. L'ensemble de ces données confirme qu'à pH 10,1, les trois thiolates de L³⁵ et un ligand hydroxo sont coordonnés au Ni^{II} dans une géométrie plan carré.

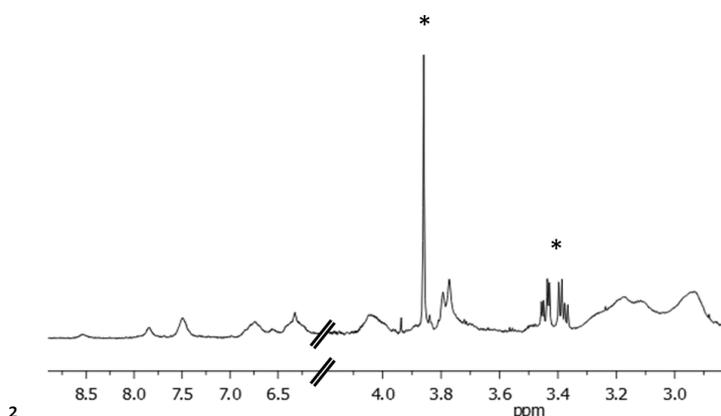


Figure 26. Spectre RMN ¹H (500 MHz) de NiL³⁵(OH₂) à 1,04 mM dans H₂O/D₂O (90:10) à pH 7,2, 298 K. (*) Excès de ligand (10%).

Contrairement à NiL³⁵(OH) qui possède une structure dissymétrique et rigide (signaux fins et bien résolus), le spectre RMN ¹H de NiL³⁵(OH₂) montre une dynamique intramoléculaire à l'échelle de temps de la RMN. Ce résultat est cohérent avec la présence d'une molécule d'eau labile à pH 7,2, au lieu d'un ligand hydroxo plus fortement coordonné à pH 10,1. L'échange de la molécule d'eau liée au nickel entre les quatre positions accessibles dans une géométrie plan carré, ainsi que la dissymétrie du complexe, conduisent à un spectre dont les signaux sont larges et non résolus entre 278 K et 353 K (les spectres obtenus aux différentes températures sont représentés dans l'Annexe II.2.1), et qui n'ont pas pu être attribués plus en détail.

5.3.2 Spectroscopie d'absorption des rayons X

Les complexes NiL³⁵(OH₂) et NiL³⁵(OH) ont été analysés par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) au seuil K du nickel dans le but de prouver leur environnement chimique, électronique et structural. Comme pour NiL²⁵(OH₂), les acquisitions ont été effectuées à 10 K dans un mélange eau/glycérol (80:20). Le pH a été ajusté à 7,5 ou 9,6 par ajout de KOH.

Les spectres XAS de $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ sont très similaires. Les spectres XANES (Figure 27) comportent un pré-pic de faible intensité à 8333 eV, attribué à une transition $1s(\text{Ni}) \rightarrow 3d(\text{Ni})$.²³ Un deuxième pré-pic est aussi observé à 8338 eV, correspondant à une transition $1s(\text{Ni}) \rightarrow 4p_z(\text{Ni})$. Cette transition n'est observée que dans des complexes planaires tétracoordonnés ou pyramidaux pentacoordonnés. La présence de ces deux transitions confirme donc la géométrie plan carré des complexes $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$.

La comparaison avec $\text{Ni}(\text{S}_2\text{N}_2)$ (Annexe II.1.3) permet d'affirmer que plus de deux sulfures sont coordonnés au Ni^{II} : les pentes du seuil pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ sont plus faibles que celle pour $\text{Ni}(\text{S}_2\text{N}_2)$, et les seuils sont décalés vers une énergie plus basse (Figure 27). En effet, des ligands polarisables tels que les thiolates diminuent la densité de charge positive sur l'ion métallique.

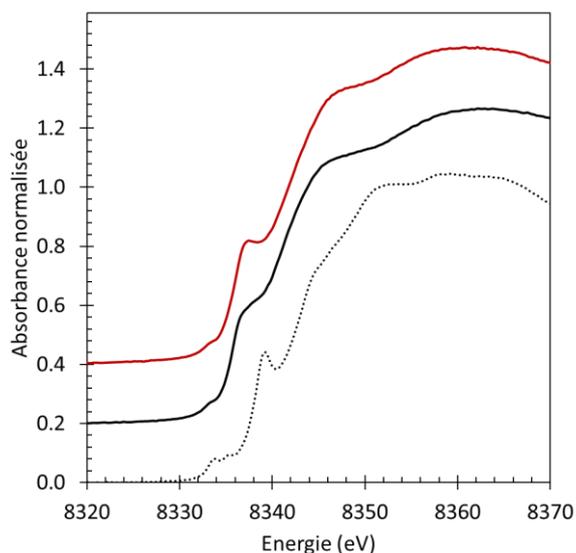


Figure 27. Spectres XANES de $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ (noir, offset de 0,2), $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ (rouge, offset de 0,4), et de $\text{Ni}(\text{N}_2\text{S}_2)$ (pointillés).

Pour les spectres EXAFS, les analyses ont été effectuées en considérant une couche d'atomes de soufre et une couche d'atomes d'oxygène autour du Ni^{II} . Les résultats sont présentés dans la Figure 28 et le Tableau 3. Les nombres de coordination (CN) n'ont pas été fixés dans un premier temps, mais avec leur somme imposée à 4. Ils ont ensuite été fixés au nombre entier le plus proche.

Pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$, l'analyse conduit à trois atomes de soufre et un atome d'oxygène coordonnés au Ni^{II} , à des distances respectives de 2,22 Å et 1,98 Å. Les résultats sont similaires pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$, avec trois sulfures à 2,21 Å et un oxygène à 1,94 Å. La distance Ni-O légèrement plus faible pour le complexe $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ est en accord avec la déprotonation de la molécule d'eau. En effet, les distances $\text{Ni-O}_{\text{aqua}}$ et $\text{Ni-O}_{\text{hydroxo}}$ sont respectivement d'environ 2,08 Å et 1,89 Å.^{36,37}

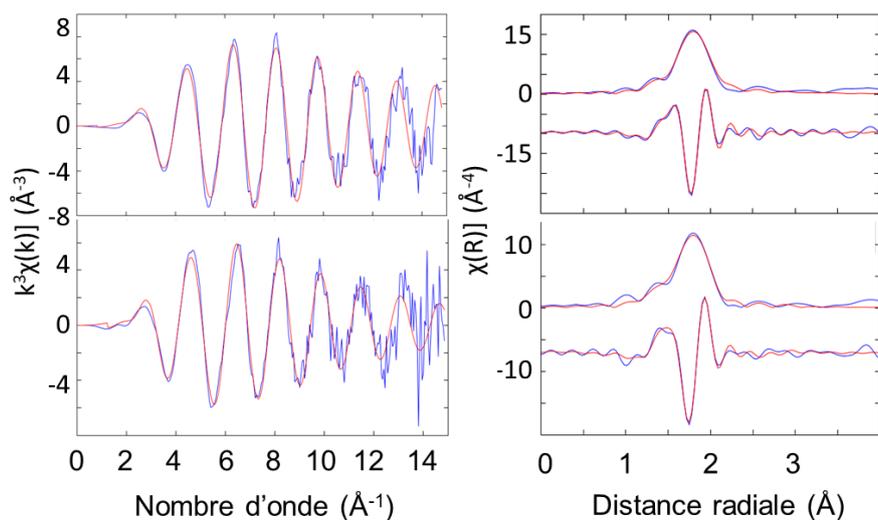


Figure 28. Analyses EXAFS pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ (haut) et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ (bas) à 1,0 mM dans l'eau/glycérol (80:20) à pH 7,5 et 9,6 respectivement. Gauche : données EXAFS pondérées par k^3 . Droite : parties réelle et imaginaire de la transformée de Fourier. Les données expérimentales sont en bleu, les analyses en rouge. Les paramètres utilisés sont décrits dans le Tableau 3 avec les CNs fixés.

Tableau 3. Paramètre structuraux obtenus à partir des analyses EXAFS.

	Ni-S			Ni-O			ΔE_0 (eV)	Res (%)
	R (\AA)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3 (\text{\AA}^2)$	R (\AA)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3 (\text{\AA}^2)$		
$\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$	2.22(1)	2.8(8) ^a	1(1) ^c	1.99(1)	1.2(8) ^a	1(1) ^c	3(3)	1.2
$\text{NiL}^{35}(\text{OH})$	2.21(1)	2.7(3) ^a	3(1)	1.95(2)	1.3(3) ^a	7(4)	7(2)	0.9
$\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$	2.22(1)	3 ^b	1(1) ^c	1.98(2)	1 ^b	1(1) ^c	2.6(7)	1.2
$\text{NiL}^{35}(\text{OH})$	2.21(1)	3 ^b	4(1)	1.94(2)	1 ^b	7(4)	5.9(9)	0.8

Les erreurs sont indiquées entre parenthèses. ^a La somme des CNs a été fixée à 4. ^b Les CNs ont été fixés. ^c Les σ^2 ont été imposés égaux. Res = $[\sum(\chi_{\text{exp}} - \chi_{\text{fit}})^2 / \sum(\chi_{\text{exp}})^2] \times 100$.

Les analyses des spectres XAS sont donc en accord avec les résultats obtenus précédemment avec la coordination de trois thiolates et d'une molécule d'eau ou d'un hydroxo au Ni^{II} dans une géométrie plan carré.

5.3.3 Etude par DFT

Dans le but de valider les structures proposées à partir des données spectroscopiques pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$, celles-ci ont été optimisées par calculs DFT. Les structures de plus basse énergie sont obtenues avec un état singulet et une géométrie plan carré autour du Ni^{II} . Celui-ci est

alors coordonné par les trois thiolates provenant des cystéines, et par un atome d'oxygène provenant soit d'une molécule d'eau, soit d'un hydroxo (Figure 29).

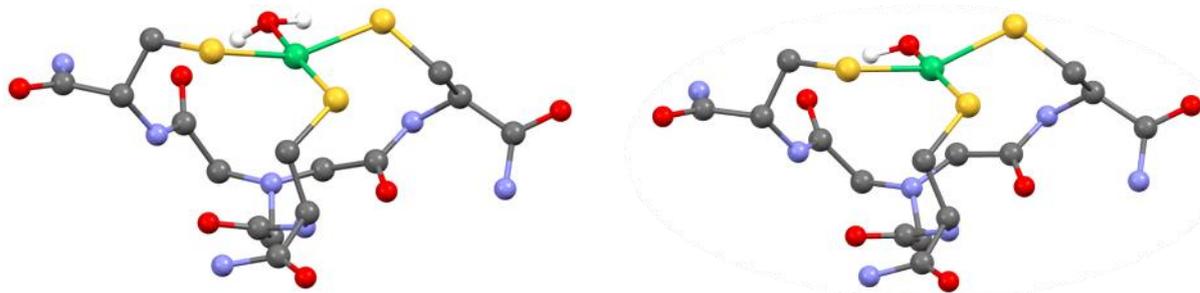


Figure 29. Structures optimisées par DFT de NiL³⁵(OH₂) (gauche) et NiL³⁵(OH) (droite). Seuls les protons de la molécule d'eau et de l'hydroxo sont représentés.

Les distances Ni-S sont proches de celles obtenues précédemment pour NiL²⁵(OH₂), entre 2,20 et 2,28 Å (Tableau 4). Le remplacement de la molécule d'eau par l'hydroxo entraîne bien une diminution de la distance Ni-O, de 2,01 Å à 1,88 Å. Le proton de l'hydroxo est alors impliqué dans une liaison hydrogène avec l'oxygène d'une fonction amide, et se trouve à 1,91 Å d'un proton H_β d'une cystéine, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par RMN ¹H.

Tableau 4. Distances Ni-ligand (Å) optimisées par DFT pour NiL³⁵(OH₂) et NiL³⁵(OH).

	Ni-S			Ni-O
NiL³⁵(OH₂)	2.20	2.23	2.28	2.01
NiL³⁵(OH)	2.25	2.25	2.26	1.88

Les spectres UV-Visible des deux complexes ont été prédits par TD-DFT (Figure 30). Ils sont cohérents avec ceux obtenus expérimentalement. Pour NiL³⁵(OH₂), les transitions observées par spectroscopie UV-Visible à 289 nm et 345 nm sont calculées à 295 nm et 343 nm. Pour NiL³⁵(OH), les décalages vers de plus hautes énergies sont bien reproduits, avec des transitions à 272 nm et 323 nm (270 nm et 325 nm expérimentalement). L'analyse de ces transitions confirme un transfert de charge, principalement des thiolates (orbitales p) vers le Ni^{II} (d_{x²-y²}).

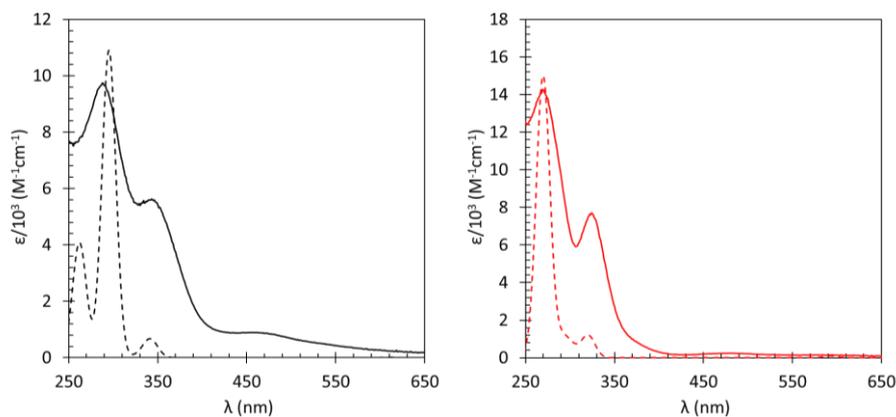


Figure 30. Spectres UV-Visible expérimentaux (trait) et prédits par TD-DFT (pointillés) de $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ (gauche) et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ (droite).

5.4. Propriétés redox

Les propriétés électrochimiques des complexes ont été étudiées par voltampérométrie cyclique (CV) à pH 7,4 et 9,5 (HEPES 20 mM, $[\text{NaCl}] = 100$ mM) (Figure 31).

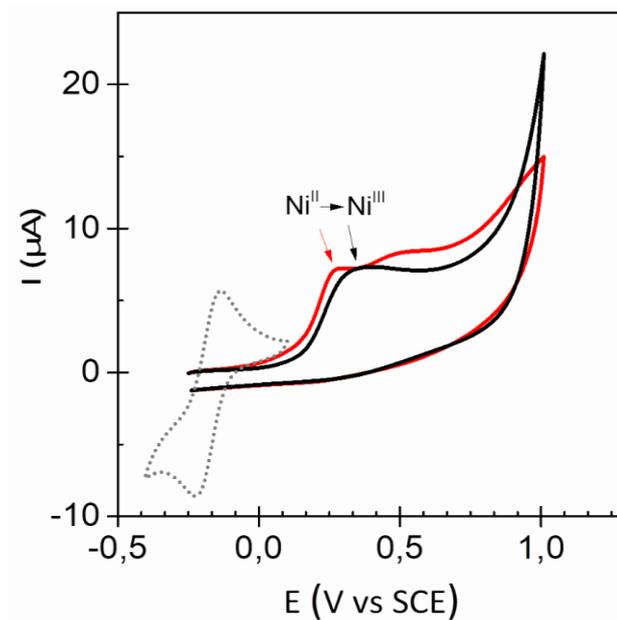


Figure 31. CV à 100 mV/s de $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ (noir) et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ (rouge) à 570 μM dans tampon HEPES (20 mM, respectivement à pH 7,4 et 9,5, $[\text{NaCl}] = 100$ mM. CV à 100 mV/s du complexe $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ utilisé comme référence (pointillés).

Comme pour $\text{NiL}^{25}(\text{OH}_2)$, la CV de $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ présente une oxydation irréversible qui peut être attribuée à l'oxydation du Ni^{II} en Ni^{III} . Le potentiel d'oxydation est notablement plus bas que pour le complexe $\text{NiL}^{25}(\text{OH}_2)$ ($E_{\text{pa}} = 0,48$ V vs SCE, contre 0,57 V). Ce résultat est cohérent avec la coordination d'un thiolate à la place d'un imidazole qui augmente la densité électronique sur l'ion métallique, et

donc avec une oxydation centrée sur le métal. La CV de $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ comporte deux oxydations irréversibles à $E_{\text{pa}} = 0,31 \text{ V}$ et $E_{\text{pa}} = 0,59 \text{ V}$ vs SCE. Comme le remplacement d'une molécule d'eau par un hydroxo est supposé diminuer le potentiel redox du complexe, le premier système redox est attribué au couple $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{II}}$. Le second système est en accord avec l'oxydation du ligand (la CV de L^{35} est représentée dans l'Annexe II.2.2). Par ailleurs, l'intensité des vagues d'oxydation a été comparée avec celle de l'oxydation réversible du complexe $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ dans les mêmes conditions. Des intensités très similaires sont observées, ce qui confirme des oxydations monoélectroniques pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ et $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$.

Pour les deux complexes, la première oxydation est irréversible à toutes les vitesses de balayage entre 10 mV/s et 1 V/s. Le complexe de Ni^{III} est donc instable et il est possible que sa dégradation relâche le ligand en solution. On notera que les deux potentiels anodiques pour l'oxydation des complexes sont dans la bonne gamme pour permettre une activité de type SOD. Néanmoins, même avec trois thiolates coordonnés au Ni^{II} , les potentiels d'oxydation des complexes sont supérieurs à celui de la Ni-SOD (0,1 V vs SCE). La coordination amine/amido dans l'enzyme doit donc aussi avoir un rôle important pour ajuster le potentiel redox du couple $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{II}}$ vers une valeur idéale.

5.5. Détermination de l' IC_{50}

L'activité de type SOD des complexes a d'abord été évaluée par le test à la xanthine oxydase (XO). Il a permis de montrer qu'uniquement un des deux complexes possède une activité de type SOD. Une IC_{50} d'environ 1 μM est obtenue pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ à pH 7,4 (Figure 32). Le complexe représente alors 93% des espèces de Ni^{II} dans ces conditions. Cette activité est proche de celles décrites pour les modèles peptidiques développés par Shearer *et al.* et qui présentent la même coordination du nickel que dans l'enzyme,³⁰ mais plus faible que celle des SODs ($\text{IC}_{50} = 4 \cdot 10^{-8}$ pour Cu/Zn-SOD). Cependant, à pH 9,6, lorsque $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ est l'espèce majoritaire (92%), l' IC_{50} est supérieure à 125 μM . Le complexe n'est, de ce fait, pas actif. Ainsi, les deux complexes, qui ne diffèrent que par la coordination d'une molécule d'eau ou d'un hydroxo, ont des activités de type SOD très différentes.

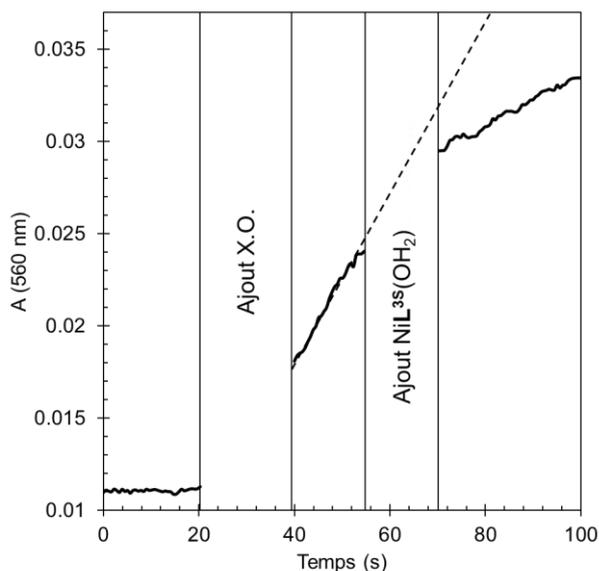


Figure 32. Evolution de l'absorbance à 560 nm. $[Xanthine] = 50 \mu M$, $[NBT] = 100 \mu M$, $[NiL^{35}(OH_2)] = 4 \mu M$, $[NaCl] = 100 mM$, tampon HEPES 20 mM, pH 7,4.

5.6. Stopped-Flow

Comme décrit précédemment, le test à la xanthine oxydase ne permet pas de déterminer si un complexe est actif en conditions catalytiques ou s'il s'agit d'une réaction stœchiométrique avec le superoxyde. Afin de pallier cet inconvénient, des mesures complémentaires ont été effectuées avec un Stopped-Flow (SF).

5.6.1 Principe de fonctionnement

Le SF est un appareil qui permet de mélanger rapidement plusieurs solutions dans le but de suivre une réaction chimique. Il est basé sur un système de seringues motorisées et contrôlées par ordinateur. Celles-ci sont reliées entre elles par différents mélangeurs comme représenté sur le Schéma 13. Afin de suivre une réaction par spectroscopie UV-Vis, il est possible de placer en sortie du deuxième mélangeur une cellule UV adaptée (Schéma 13, Droite).

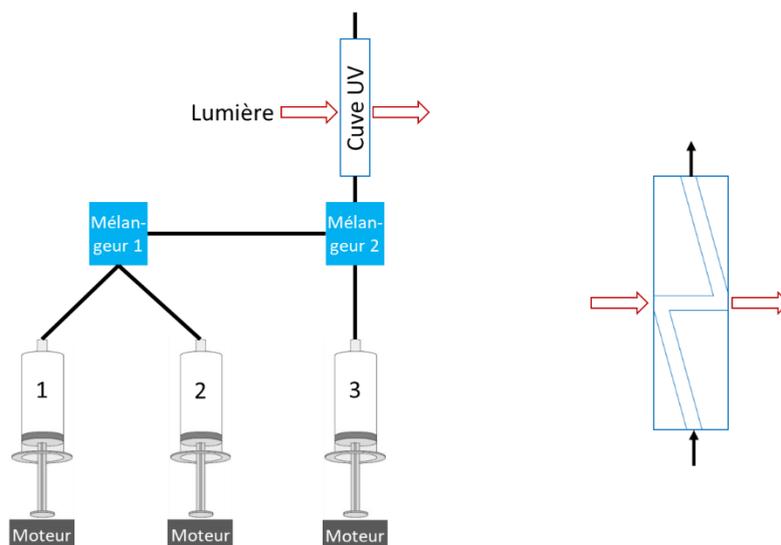


Schéma 13. Stopped-Flow (gauche), et cellule UV utilisée (droite).

Une expérience se déroule en deux étapes (Schéma 14). Dans un premier temps, le flux est initié par les pistons : ils forcent le passage des solutions au travers des mélangeurs et jusqu'à la cellule UV ①. Le mélange qui en résulte remplit la cellule ②, et évolue au fur et à mesure de son passage. Pendant l'écoulement, un état stationnaire est atteint pour lequel l'âge de la solution est proportionnel à la distance du dernier mélangeur. L'absorbance en chaque point de la cellule UV est alors constante en fonction du temps ③. La seconde étape débute lorsque le flux est stoppé : les pistons s'arrêtent et la sortie de la cellule est bloquée. La solution continue alors d'évoluer et les changements spectroscopiques peuvent être suivis au point d'observation ④. Sur le Schéma 14, le mélange d'un réactif avec une autre espèce, puis sa consommation, sont enregistrés. Dans les résultats expérimentaux, seule la partie ④ est représentée.

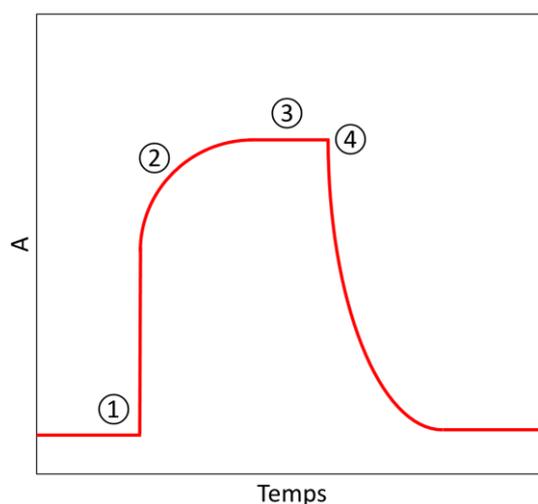


Schéma 14. Représentation de l'absorbance en fonction du temps lors d'une expérience de Stopped-Flow.

5.6.2 Application pour évaluer une activité SOD

Dans notre cas, il est possible de suivre directement la consommation du superoxyde par spectroscopie UV-Vis,³⁸ car il présente un spectre d'absorption avec un maximum à $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 2250$) dans l'eau.³⁹ La source de $\text{O}_2^{\bullet-}$ est alors du superoxyde de potassium (KO_2) dissous dans le DMSO et placé dans la seringue n°3.^{40,41} La seringue n°1 contient la SOD en milieu aqueux dans le tampon voulu, et la seringue n°2 contient uniquement du tampon. La SOD et le superoxyde sont donc mélangés dans le mélangeur 2, et la dismutation du superoxyde peut être suivie dans la cellule UV. L'utilisation de plusieurs seringues permet de limiter la proportion de DMSO après mélange tout en restant en conditions catalytiques, et permet d'obtenir des injections répétables.

Des conditions similaires à celles décrites dans la littérature ont été utilisées.^{38,42,43} Après mélange des solutions, un ratio tampon/DMSO 5:1 est obtenu, ce qui permet de limiter les perturbations optiques dues à la différence de viscosité des solvants.

5.6.3 Lois de vitesse

Lorsque la réaction n'est pas catalysée, l'autodismutation du superoxyde suit une loi de vitesse d'ordre 2 :

$$-d[\text{O}_2^{\bullet-}]/dt = k_{\text{auto}} [\text{O}_2^{\bullet-}]^2$$

Après intégration, la concentration de superoxyde en fonction du temps peut être exprimée comme suit :

$$[\text{O}_2^{\bullet-}](t) = \frac{[\text{O}_2^{\bullet-}]_0}{1 + [\text{O}_2^{\bullet-}]_0 k_{\text{auto}} t} = \frac{[\text{O}_2^{\bullet-}]_0}{1 + d t}$$

Le traitement des suivis cinétiques permet de déterminer le coefficient d. Connaissant la concentration initiale de superoxyde, il est possible de calculer la constante de vitesse k_{auto} .

Lorsque la réaction est catalysée par une SOD, la vitesse de réaction est décrite par la relation :

$$-d[\text{O}_2^{\bullet-}]/dt = k_{\text{auto}} [\text{O}_2^{\bullet-}]^2 + k_{\text{obs}} [\text{O}_2^{\bullet-}]$$

Dans laquelle :

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} [\text{SOD}]$$

Si $k_{\text{obs}} \gg k_{\text{auto}}$, il est possible de négliger l'autodismutation du superoxyde. Il y a alors un changement d'ordre pour la réaction qui devient d'ordre 1. Après intégration, on obtient alors :

$$[\text{O}_2^{\bullet-}](t) = [\text{O}_2^{\bullet-}]_0 e^{-k_{\text{obs}} t}$$

L'analyse des données permet de déterminer k_{obs} . Des expériences réalisées à différentes concentrations en catalyseurs permettent donc de calculer k_{cat} .

Remarque : évaluation des erreurs sur les constantes de vitesse.

Pour la dismutation non catalysée du superoxyde, l'écart-type sur k_{auto} est déterminé à partir de plusieurs mesures indépendantes. Pour les complexes, les essais à différentes concentrations sont aussi indépendants entre eux. L'erreur-type est donc déterminée sur la régression linéaire permettant de déterminer k_{cat} , et est de l'ordre de 1-10%.

5.6.4 Détermination de l'activité catalytique

Afin de déterminer l'activité catalytique de complexes modèles, il est préférable de travailler à pH légèrement basique (environ pH 8) pour ralentir l'autodismutation du superoxyde et ainsi négliger k_{auto} . A pH 8,1 (HEPES 60 mM, [NaCl] = 100 mM), la constante a été déterminée expérimentalement à $k_{auto} = 3(1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cette valeur est proche de celle décrite dans la littérature pour ces valeurs de pH ($k_{auto} \approx 4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).³⁹

A pH 8,1, l'addition du complexe de Ni^{II} n'a que peu d'effet sur la vitesse de dismutation du superoxyde (Figure 33). L'ordre de la réaction reste inchangé et l'autodismutation du superoxyde ne peut pas être négligée pour déterminer k_{obs} .

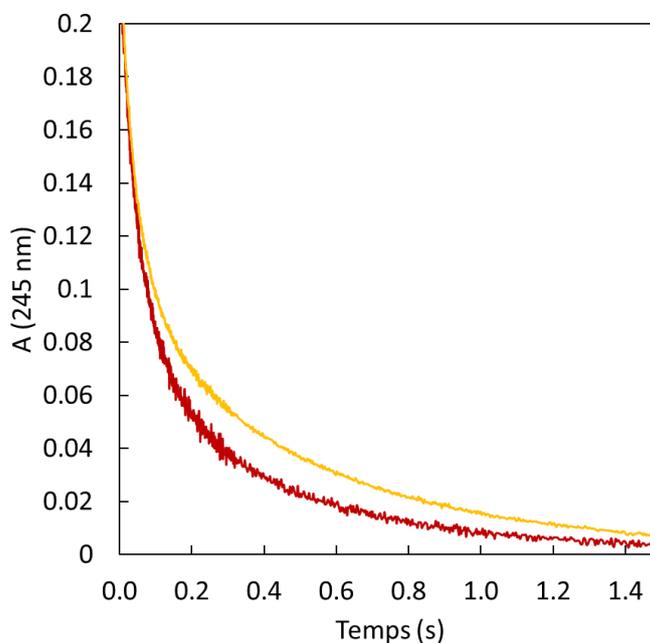


Figure 33. Dismutation du superoxyde (550 μM), autodismutation (jaune), et avec NiL^{35} (53 μM), tampon HEPES (60 mM, pH 8,1, [NaCl] = 100 mM) et DMSO (ratio 5:1). Encadré : k_{obs} en fonction de la concentration de complexe.

Comme le test à la xanthine oxydase montre une meilleure activité à pH physiologique, de nouvelles expériences de Stopped-Flow ont été réalisées à des pH plus faibles. Il apparaît qu'un pH de 7,8 est un bon compromis pour pouvoir négliger l'autodismutation, tout en ayant des résultats reproductibles. Le ratio $[\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)]/[\text{NiL}^{35}(\text{OH})]$ est alors de 86:14. Les analyses montrent une réaction nettement plus rapide en présence du complexe avec une loi de vitesse d'ordre 1 (Figure 34). Les essais à différentes concentrations de complexes, et toujours en excès de superoxyde, ont permis de déterminer la constante de vitesse $k_{\text{cat}} = 1,8(1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. De plus, le spectre du complexe est similaire avant et après la catalyse, ce qui prouve sa stabilité au cours de la catalyse dans ces conditions.

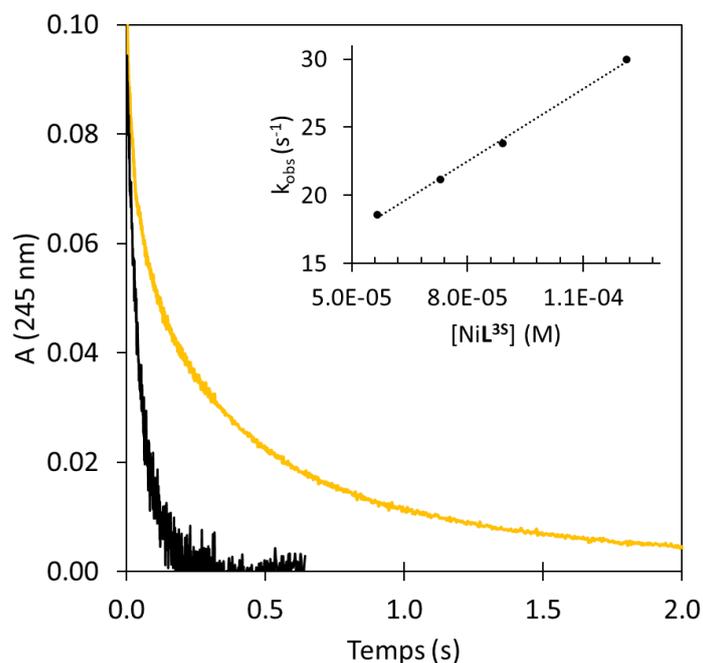


Figure 34. Dismutation du superoxyde (767 μM), autodismutation (jaune), et avec NiL^{35} (57 μM), tampon HEPES (60 mM, pH 7,8, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$) et DMSO (ratio 5:1). Encadré : k_{obs} en fonction de la concentration de complexe.

Bien que la réaction soit beaucoup plus rapide avec la Ni-SOD ($k_{\text{cat}} \approx 1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$),^{44,45} $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ est le premier complexe de nickel démontrant une activité catalytique avec une sphère de coordination très différente de celle de l'enzyme (S3O contre S2N2).

6. Discussion et conclusion

Actuellement, uniquement les complexes de nickel peptidiques inspirés de la Ni-SOD possèdent une activité de type SOD en conditions catalytiques (cf. Chapitre I), tandis que les modèles synthétiques, malgré des sphères de coordinations similaires à celle du nickel dans l'enzyme, ne catalysent pas la dismutation de $O_2^{\bullet-}$. Cela explique le fait que peu d'études aient été réalisées avec des modèles structuraux pour permettre de proposer une relation structure activité. Dans ce chapitre, nous avons développé une approche originale basée sur l'utilisation de pseudo-peptides (L^{25} et L^{35}) conduisant à des complexes de nickel de géométrie plan carré avec la coordination des chaînes latérales des acides aminés (cystéines et histidines), ainsi que d'une molécule d'eau ou d'un ligand hydroxo.

Le ligand L^{35} conduit à deux complexes en fonction du pH : $NiL^{35}(OH_2)$ et $NiL^{35}(OH)$ avec un pK_A de 8,6 pour la molécule d'eau coordonnée au nickel. Le ligand L^{25} conduit quant à lui à un seul complexe mononucléaire $NiL^{25}(OH_2)$, dont la molécule d'eau ne peut pas être déprotonée en solution aqueuse. Pour tous les complexes, les résultats sont en accord avec la coordination des thiolates sur le Ni^{II} . Ainsi, dans le complexe actif en catalyse $NiL^{35}(OH_2)$, les cystéines ne sont pas protonées à pH physiologique. Cette conclusion est en contradiction avec des études menées sur des métallopeptides pour lesquels il est proposé qu'une cystéine est protonée pendant le cycle catalytique.⁴⁶ Cependant, elle est en accord avec une autre étude plus récente suggérant aussi la coordination de thiolates au nickel.⁴⁷

Les complexes obtenus avec le ligand L^{35} possèdent des potentiels d'oxydation inférieurs à celui de la réduction du superoxyde (0,63 V vs SCE). Pourtant, seul l'un d'entre eux est actif. Cette condition n'est donc pas suffisante pour obtenir une activité de type SOD. De plus, l'oxydation du Ni^{II} est irréversible. La réversibilité du système n'est de ce fait pas nécessaire pour observer une activité catalytique, et la réaction du complexe oxydé avec le superoxyde doit être plus rapide que sa dégradation. En effet, la catalyse est terminée en moins de 0,4 seconde, tandis que même à une vitesse de 1 V/s en CV, l'espèce oxydée devrait être stable pendant 1 seconde pour pouvoir être observée en réduction. Pour $NiL^{25}(OH_2)$, le potentiel d'oxydation est légèrement inférieur à 0,63 V. Cette faible différence peut expliquer son absence d'activité vis-à-vis de la dismutation du superoxyde.

L'activité du complexe $NiL^{35}(OH_2)$ ($IC_{50} \approx 1.10^6$ M) est inférieure à celle de la Ni-SOD ($IC_{50} \approx 4.10^{-8}$ M), et la réaction est plus lente qu'avec l'enzyme ($k_{cat} = 1,8.10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ contre $k_{cat} \approx 1.10^9$ $M^{-1}s^{-1}$) et les modèles peptidiques (10^6 - 10^8 $M^{-1}s^{-1}$). Néanmoins, l'activité de $NiL^{35}(OH_2)$ pourrait être améliorée à pH physiologique. En effet, à pH 7,8, le complexe inactif $NiL^{35}(OH)$ est encore présent à 14%. Dans nos conditions d'expérience, la vitesse de dismutation du superoxyde à pH 7,4 est malheureusement

trop rapide pour conduire à des résultats reproductibles, et l'activité du complexe $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ seul ne peut donc pas être mesurée.

Les propriétés spectroscopiques des complexes mettent en évidence la différence de labilité entre la molécule d'eau et l'hydroxo. Pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$, le spectre RMN ^1H et l'élargissement des signaux montrent une dynamique intramoléculaire et donc la labilité de la molécule d'eau. En revanche, pour $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$, la structure est figée, comme l'atteste l'obtention de signaux fins par RMN dont celui correspondant au proton de l'hydroxo. Celui-ci n'est donc pas labile. Cette différence de labilité entre les ligands aqua et hydroxo peut être corrélée à l'activité catalytique de ces complexes. Comme les potentiels redox du couple $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{II}}$ des deux complexes sont dans une gamme appropriée pour permettre une activité de type SOD, cette différence de réactivité permet d'obtenir des informations sur le mécanisme. Particulièrement, ces résultats suggèrent qu'un ligand labile (la molécule d'eau dans notre cas) est nécessaire pour permettre une activité de type SOD. En conséquence, au moins une partie du mécanisme s'effectuerait en sphère interne, avec la coordination du superoxyde sur le nickel (Schéma 15, gauche).

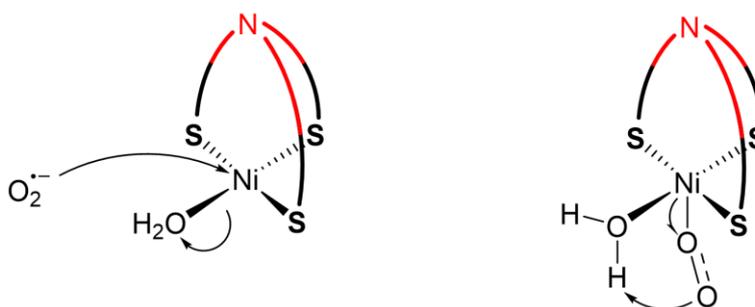


Schéma 15. Propositions de mécanisme pour la dismutation du superoxyde catalysée par $[\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)]^-$

Une autre explication pour l'activité du complexe $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ est la présence d'un potentiel relais de protons. La réduction du superoxyde nécessite deux protons du solvant pour former le peroxyde d'hydrogène. Or, la molécule d'eau coordonnée au nickel possède un pK_A de 8,6, qui est inférieur de plus de cinq ordres de grandeur au pK_E et peut donc servir de relais de protons (Schéma 15, droite).

7. Références

1. A.M. Pujol, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle. A Cysteine-Based Tripodal Chelator with a High Affinity and Selectivity for Copper(I). *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (20), 6928–6929.
2. A.M. Pujol, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle. A Series of Tripodal Cysteine Derivatives as Water-Soluble Chelators that are Highly Selective for Copper(I). *Chem. – Eur. J.* **2011**, 17 (16), 4418–4428.

3. A.M. Pujol, C. Lebrun, C. Gateau, A. Manceau, P. Delangle. Mercury-Sequestering Pseudopeptides with a Tris(cysteine) Environment in Water. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2012 (24), 3835–3843.
4. A.-S. Jullien, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle. Mercury Complexes with Tripodal Pseudopeptides Derived from D-Penicillamine Favour a HgS₃ Coordination. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 2015 (22), 3674–3680.
5. A.-S. Jullien, C. Gateau, C. Lebrun, et al. d-Penicillamine Tripodal Derivatives as Efficient Copper(I) Chelators. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (10), 5229–5239.
6. A.-S. Jullien, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle. Pseudo-peptides Based on Methyl Cysteine or Methionine Inspired from Mets Motifs Found in the Copper Transporter Ctr1. *Inorg. Chem.* **2015**, 54 (5), 2339–2344.
7. A.-S. Jullien, C. Gateau, I. Kieffer, D. Testemale, P. Delangle. X-ray Absorption Spectroscopy Proves the Trigonal-Planar Sulfur-Only Coordination of Copper(I) with High-Affinity Tripodal Pseudopeptides. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (17), 9954–9961.
8. A.M. Pujol, M. Cuillel, A.-S. Jullien, et al. A Sulfur Tripod Glycoconjugate that Releases a High-Affinity Copper Chelator in Hepatocytes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51 (30), 7445–7448.
9. A. Conte-Daban, B. Boff, A. Candido Matias, et al. A Trishistidine Pseudopeptide with Ability to Remove Both C_{ul} and C_{ull} from the Amyloid- β Peptide and to Stop the Associated ROS Formation. *Chem. – Eur. J.* **2017**, 23 (67), 17078–17088.
10. G.L. Ellman. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82 (1), 70–77.
11. P.W. Riddles, R.L. Blakeley, B. Zerner. Reassessment of Ellman's reagent. In *Methods in Enzymology; Enzyme Structure Part I*; Academic Press, **1983**; Vol. 91, pp 49–60.
12. A. Cotton, G. Wilkinson, C. Murillo, M. Bochmann. *The Chemistry of the Transition Elements. Advanced Inorganic Chemistry*; Wiley, **1999**.
13. R.T. Stibrany, S. Fox, P.K. Bharadwaj, H.J. Schugar, J.A. Potenza. Structural and Spectroscopic Features of Mono- and Binuclear Nickel(II) Complexes with Tetradentate N(amine)2S(thiolate)2 Ligation. *Inorg. Chem.* **2005**, 44 (23), 8234–8242.
14. H. Kozłowski, B.D.-L. Révérend, D. Ficheux, C. Loucheux, I. Sovago. Nickel(II) complexes with sulfhydryl containing peptides. potentiometric and spectroscopic studies. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, 29 (3), 187–197.
15. M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, S. Bielinska, W. Kamysz, H. Kozłowski. The –Cys–Cys– motif in *Helicobacter pylori*'s Hpn and HspA proteins is an essential anchoring site for metal ions. *Dalton Trans.* **2011**, 40 (20), 5604–5610.
16. J.W. Chang, R.B. Martin. Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivatives. *J. Phys. Chem.* **1969**, 73 (12), 4277–4283.
17. H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—I: Mathematical considerations. *Talanta* **1985**, 32 (2), 95–101.
18. H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—II: Specfit: two user-friendly programs in basic and standard fortran 77. *Talanta* **1985**, 32 (4), 257–264.
19. H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—III: Model-free analysis of spectrophotometric and ESR titrations. *Talanta* **1985**, 32 (12), 1133–1139.
20. C.J. Siddons, R.D. Hancock. Possible insights into metal ion recognition in calcium-binding proteins provided by complexing properties of ligands containing amide oxygen donors. *Chem. Commun.* **2004**, No. 14, 1632–1633.
21. P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler, H. Vahrenkamp. Solution behaviour and zinc complexation of tripeptides with cysteine and/or histidine at both termini. *Inorganica Chim. Acta* **1998**, 272 (1), 115–124.

22. P. Gockel, H. Vahrenkamp. Zinc Complexes of Amino Acids and Peptides, 8[.]. Difunctional Dipeptides Containing Cysteine or Histidine: Solution Behavior and Zinc Complexion. *Chem. Ber.* **1996**, 129 (10), 1243–1249.
23. G.J. Colpas, M.J. Maroney, C. Bagyinka, et al. X-ray spectroscopic studies of nickel complexes, with application to the structure of nickel sites in hydrogenases. *Inorg. Chem.* **1991**, 30 (5), 920–928.
24. O. Iranzo. Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: A balance between different factors. *Bioorganic Chem.* **2011**, 39 (2), 73–87.
25. H.A. Schwarz. Free radicals generated by radiolysis of aqueous solutions. *J. Chem. Educ.* **1981**, 58 (2), 101.
26. S. Goldstein, C. Michel, W. Bors, M. Saran, G. Czapski. A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radic. Biol. Med.* **1988**, 4 (5), 295–303.
27. J.M. McCord, I. Fridovich. Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocytoblast). *J. Biol. Chem.* **1969**, 244 (22), 6049–6055.
28. C. Beauchamp, I. Fridovich. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1971**, 44 (1), 276–287.
29. G. Tabbi, W.L. Driessen, J. Reedijk, et al. High Superoxide Dismutase Activity of a Novel, Intramolecularly Imidazolato-Bridged Asymmetric Dicopper(II) Species. Design, Synthesis, Structure, and Magnetism of Copper(II) Complexes with a Mixed Pyrazole–Imidazole Donor Set. *Inorg. Chem.* **1997**, 36 (6), 1168–1175.
30. K.P. Neupane, K. Gearty, A. Francis, J. Shearer. Probing Variable Axial Ligation in Nickel Superoxide Dismutase Utilizing Metallopeptide-Based Models: Insight into the Superoxide Disproportionation Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (47), 14605–14618.
31. M.J. Maroney. Structure/function relationships in nickel metallobiochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3 (2), 188–199.
32. N. Baidya, M.M. Olmstead, P.K. Mascharak. Structure and properties of bis(D-penicillaminato-N,S)nickelate(II) tetrahydrate: a monomeric nickel complex of D-penicillamine, the antidote for nickel toxicity. *Inorg. Chem.* **1991**, 30 (20), 3967–3969.
33. R. Gilson, M.C. Durrant. Estimation of the pKa values of water ligands in transition metal complexes using density functional theory with polarized continuum model solvent corrections. *Dalton Trans.* **2009**, No. 46, 10223–10230.
34. T. Cierpicki, J. Otlewski. Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins. *J. Biomol. NMR* **2001**, 21 (3), 249–261.
35. N.J. Baxter, M.P. Williamson. Temperature dependence of ¹H chemical shifts in proteins. *J. Biomol. NMR* **1997**, 9 (4), 359–369.
36. X. Zhang, D. Huang, Y.-S. Chen, R.H. Holm. Synthesis of Binucleating Macrocycles and Their Nickel(II) Hydroxo- and Cyano-Bridged Complexes with Divalent Ions: Anatomical Variation of Ligand Features. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (20), 11017–11029.
37. N. Sheng. Aqua-[2-(2-pyridylmethyl-imino-methyl)phenolato]nickel(II) nitrate monohydrate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **2009**, 65 (11), m1348–m1348.
38. D.P. Riley, W.J. Rivers, R.H. Weiss. Stopped-flow kinetic analysis for monitoring superoxide decay in aqueous systems. *Anal. Biochem.* **1991**, 196 (2), 344–349.
39. B.H.J. Bielski. Reevaluation of the Spectral and Kinetic Properties of HO₂ and O₂⁻ Free Radicals. *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28 (4–5), 645–649.
40. K. Dürr, B.P. Macpherson, R. Warratz, et al. Iron(III) Complex of a Crown Ether–Porphyrin Conjugate and Reversible Binding of Superoxide to Its Iron(II) Form. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (14), 4217–4228.
41. S. Kim, R. DiCosimo, J. San Filippo. Spectrometric and chemical characterization of superoxide. *Anal. Chem.* **1979**, 51 (6), 679–681.

42. F.C. Friedel, D. Lieb, I. Ivanović-Burmazović. Comparative studies on manganese-based SOD mimetics, including the phosphate effect, by using global spectral analysis. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 109, 26–32.
43. J. Shearer, K.P. Neupane, P.E. Callan. Metallopeptide Based Mimics with Substituted Histidines Approximate a Key Hydrogen Bonding Network in the Metalloenzyme Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (22), 10560–10571.
44. Y. Sheng, I.A. Abreu, D.E. Cabelli, et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (7), 3854–3918.
45. S.B. Choudhury, J.-W. Lee, G. Davidson, et al. Examination of the Nickel Site Structure and Reaction Mechanism in *Streptomyces seoulensis* Superoxide Dismutase. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, 38 (12), 3744–3752.
46. J. Shearer, K.L. Peck, J.C. Schmitt, K.P. Neupane. Cysteinate Protonation and Water Hydrogen Bonding at the Active-Site of a Nickel Superoxide Dismutase Metallopeptide-Based Mimic: Implications for the Mechanism of Superoxide Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (45), 16009–16022.
47. D. Tietze, B. Koley Seth, M. Brauser, A.A. Tietze, G. Buntkowsky. Nill Complex Formation and Protonation States at the Active Site of a Nickel Superoxide Dismutase-Derived Metallopeptide: Implications for the Mechanism of Superoxide Degradation. *Chem. – Eur. J.* **2018**, 24 (59), 15879–15888.

Chapitre III.

Synthèse et caractérisation de modèles peptidiques

Chapitre III. Synthèse et caractérisation de modèles peptidiques

Les ligands tripodes décrits dans le Chapitre II permettent d'obtenir des complexes de Ni^{II} dont le potentiel redox se situe dans la bonne gamme pour permettre une activité de type SOD. Néanmoins, un seul complexe est actif (NiL³⁵(OH₂)) et son activité catalytique est relativement faible. Dans la littérature, les complexes peptidiques ayant la même sphère de coordination du nickel que dans l'enzyme ont des activités plus élevées. Dans ce chapitre, nous avons donc utilisé une approche peptidique dans le but d'obtenir des complexes dont les structures sont plus proches de celle du site actif de l'enzyme, mais toujours avec une coordination différente. L'objectif est alors d'obtenir davantage d'informations sur la coordination nécessaire à l'activité catalytique grâce à une étude structure/activité.

1. Contexte et objectifs

1.1. Complexes peptidiques de Ni^{II} décrits dans la littérature

La coordination du nickel dans les enzymes se fait principalement via les chaînes latérales d'histidines (imidazole) et de cystéines (thiolates) (cf. Chapitre I). Une séquence d'acides aminés courte présente dans certaines protéines est particulièrement intéressante. Il s'agit du motif ATCUN (Amino Terminal Cu^{II}- and Ni^{II}-binding, Schéma 16), qui permet de coordonner la fonction amine terminale et deux amidos au métal, ainsi que la chaîne latérale de l'acide aminé en position 3.¹ Il est constitué de trois acides aminés, le premier comportant une amine libre (N-terminale) et le troisième étant une histidine, et conduit à des complexes très stables.² En effet, quatre atomes d'azote sont coordonnés au cation métallique dans un même plan avec la formation de trois cycles chélates à 5 et 6 chaînons. Ce motif, spécifique pour le cuivre(II) et le nickel(II), est présent dans des albumines (dont l'albumine du sérum humain), des neuromédines, ou des protamines, par exemple.

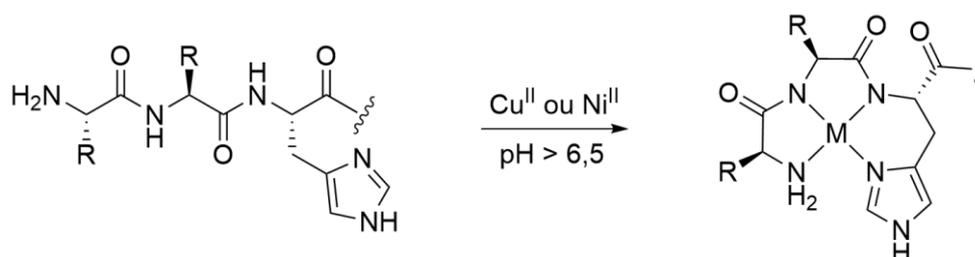


Schéma 16. Motif ATCUN et coordination autour du Cu^{II} ou du Ni^{II}.

De nombreuses séquences dérivées du motif ATCUN, plus ou moins longues, ont été synthétisées avec différents acides aminés naturels ou non en troisième position afin d'étudier l'influence sur la coordination des métaux de transition. L'introduction d'une cystéine en position 3 conduit à des complexes mono- ou dinucléaires de nickel(II) à pH physiologique, mais ceux-ci n'ont pas été étudiés en détail.^{3,4} Il a tout de même été montré par voltampérométrie cyclique que la présence de thiols dans le ligand entraîne une irréversibilité de l'oxydation des complexes, mais les potentiels redox Ni^{III}/Ni^{II} mesurés ne sont pas précisés.⁵ Aucun complexe de ce type n'a été étudié pour la catalyse de type SOD. Toutefois, la coordination de deux amidos et d'un thiolate au nickel pourrait suffire pour abaisser le potentiel redox du couple Ni^{III}/Ni^{II} dans la bonne gamme afin de permettre la catalyse. De même, la présence d'une amine terminale pourrait stabiliser la liaison Ni-S pendant la réaction.

D'autres dérivés du motif ATCUN, comportant une cystéine en première position et une histidine en troisième position, ont aussi été étudiés.⁶ Il y a alors deux coordinations possibles : les résultats montrent la coordination du thiolate en N-ter à pH physiologique, et celle de l'amine à pH > 8,5. Cependant, l'abaissement du pH ne permettrait pas de protoner l'amine terminale et ainsi de coordonner à nouveau le thiolate (Schéma 17). Ces deux structures sont intéressantes car elles permettent de positionner un groupe fonctionnel (thiol ou ammonium) proche du Ni^{II} qui pourrait jouer un rôle en seconde sphère de coordination. De même, lors d'une étude précédente avec une cystéine en troisième position, la coordination des deux thiolates et des deux amidos a été proposée mais reste à prouver.⁷

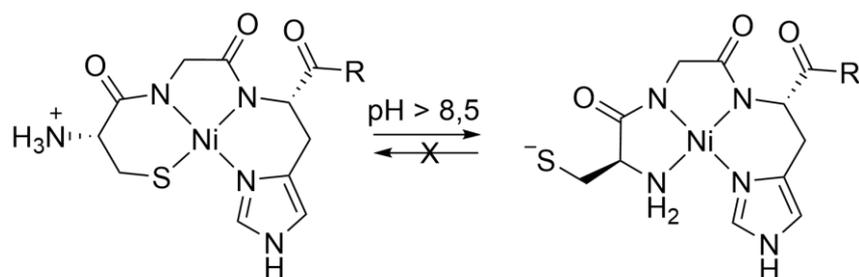
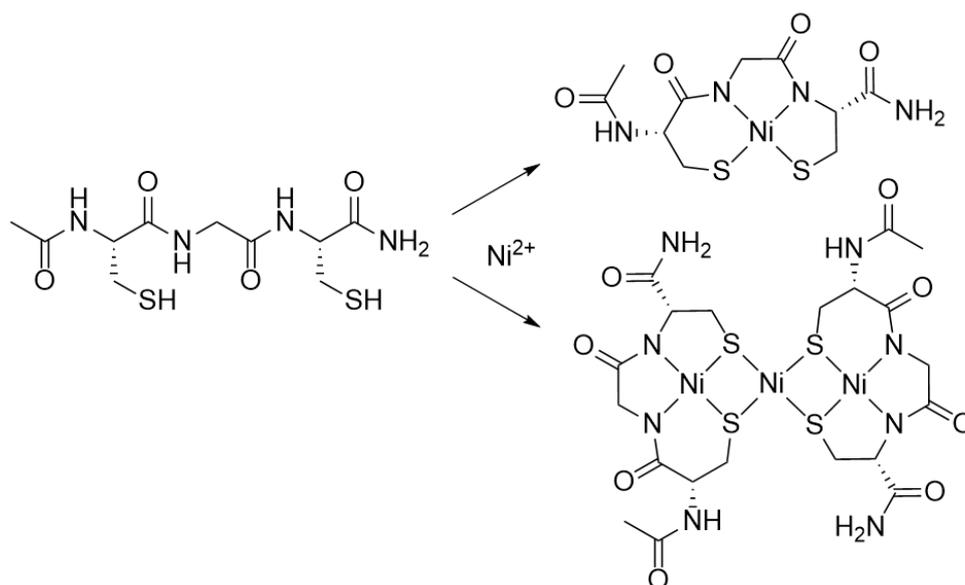
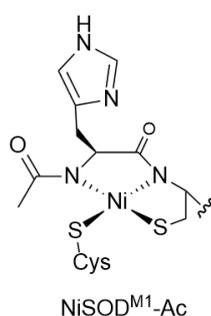


Schéma 17. Coordinations proposées avec un ligand dérivé du motif ATCUN.⁶

La coordination du soufre de la cystéine en N-ter peut également être contrainte en acétylant l'amine terminale. Lorsqu'une cystéine est insérée à la fois en première et troisième position, il est possible d'obtenir des complexes modèles d'une partie du site actif de l'Acétyl CoA Synthase (ACS), qui peuvent servir de briques élémentaires pour des complexes polynucléaires (Schéma 18).⁸

Schéma 18. Complexes modèles de l'ACS.⁸

Shearer *et al.* ont montré avec le test à la Xanthine Oxydase (XO) que le complexe NiSOD^{M1}-Ac (Figure 35), dans lequel le Ni^{II} est coordonné par deux amidos et deux thiolates (Cys2 et Cys6) d'un ligand peptidique, possédait une activité catalytique de type SOD.⁹ Par ailleurs, la présence d'une histidine en position axiale n'est pas indispensable à l'activité catalytique. Des structures dérivées du motif ATCUN peuvent donc être tout à fait pertinentes pour conduire à une activité de type SOD.

Figure 35. Structure du complexe NiSOD^{M1}-Ac.

1.2. Choix des séquences peptidiques

Nous nous sommes donc intéressés à plusieurs peptides, principalement à trois acides aminés, dérivés du motif ATCUN. Les complexes correspondants sont issus d'une plate-forme versatile représentée Figure 36. Cette plate-forme permet ainsi d'étudier la coordination du nickel nécessaire à l'activité catalytique, en évaluant les impacts de :

- la coordination d'un seul ou de deux thiolates
- la coordination de deux amidos,

- la coordination ou non d'une amine terminale,
- la présence ou l'absence d'un résidu histidine.

Le but de ce chapitre est d'obtenir des corrélations structure/activité. Par conséquent, les études des différents complexes ont toutes été réalisées dans l'eau afin que leurs structures et leurs activités soient déterminées dans le même milieu.

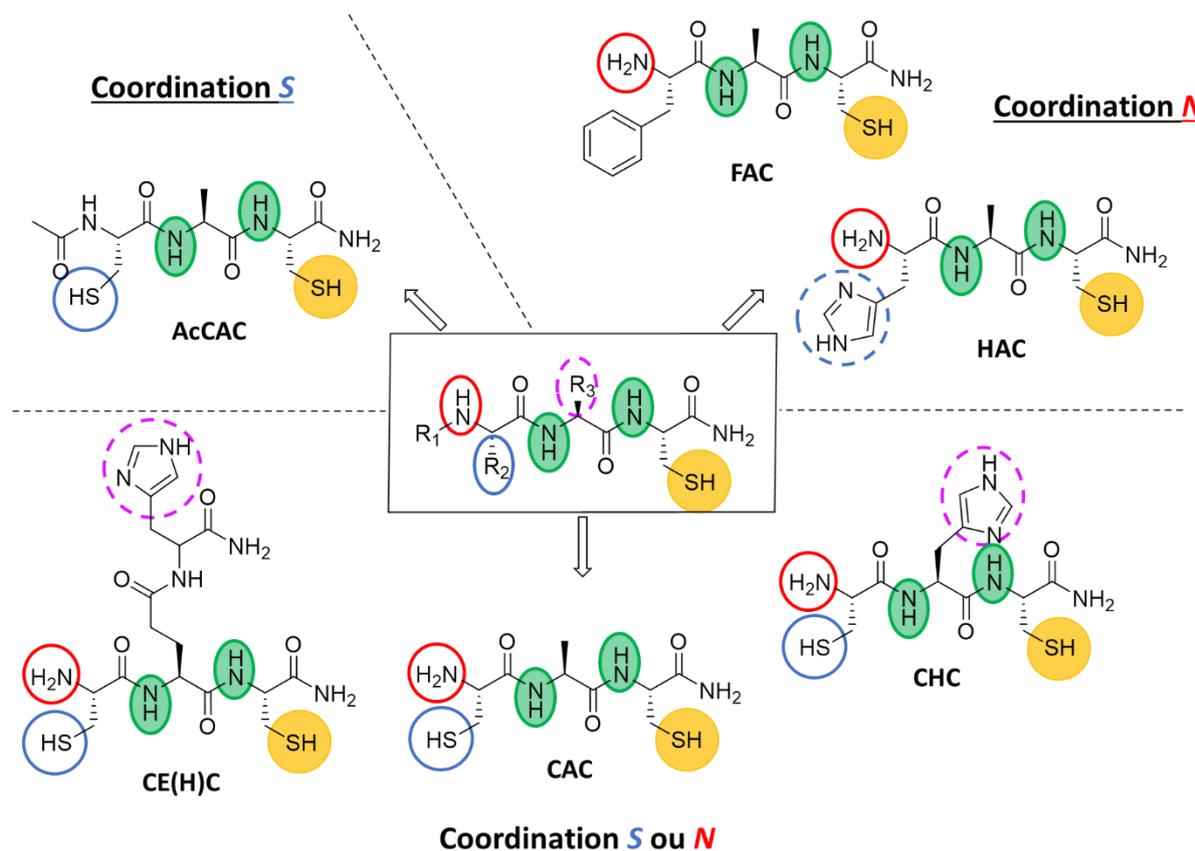


Figure 36. Plate-forme et ligands étudiés dans ce chapitre.

Par souci de simplification, les ligands neutres seront nommés par les lettres des acides aminés utilisés (XXX), et le complexe correspondant (NiXXX) sera considéré dans son état de protonation à pH physiologique.

Le ligand AcCAC (Ac-Cys-Ala-Cys-NH₂) comportant une séquence similaire à celle présente dans le site actif de l'ACS a été synthétisé (Schéma 19). Le complexe correspondant pourra donc servir de référence pour la coordination de type S, et de point de comparaison avec les complexes obtenus à partir de séquences plus longues, étudiés dans la littérature, notamment NiSOD^{M1}-Ac, formé de douze acides aminés.⁹

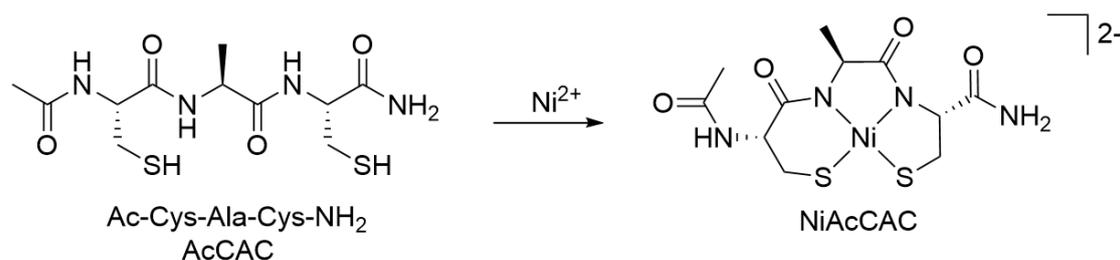


Schéma 19. Structure du ligand AcCAC et complexe attendu avec le Ni^{II} .

Dans le but d'étudier l'importance de la coordination de deux thiolates dans l'enzyme, le ligand FAC ($\text{H-Phe-Ala-Cys-NH}_2$), dérivé du motif ATCUN et conduisant à une coordination de type *N*, a été synthétisé (Schéma 20). L'étude électrochimique du complexe correspondant pourra se révéler particulièrement intéressante. En effet les modèles synthétiques non peptidiques de la Ni-SOD précédemment décrits, ne comportant qu'un seul thiolate et un seul amido, possèdent des potentiels d'oxydation trop élevés pour permettre une catalyse de type SOD (cf. complexes **10** et **11**, Chapitre I).^{10,11} Par ailleurs, le groupement phényle pourra aider à la solubilisation du complexe dans des solvants organiques pour des études complémentaires (cf. Chapitre IV).

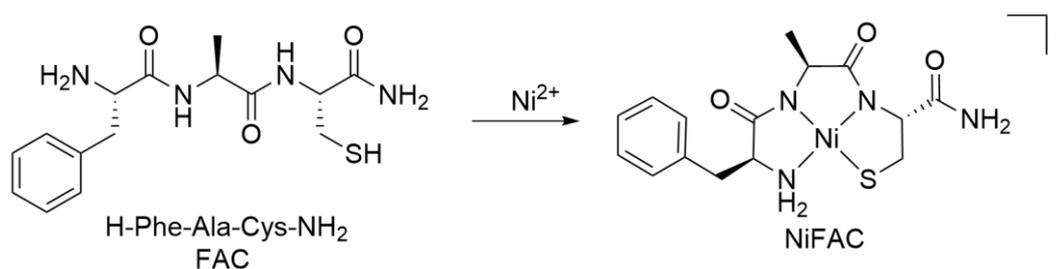


Schéma 20. Structure du ligand FAC et complexe attendu avec le Ni^{II} .

Les modèles peptidiques décrits dans la littérature, et issus de la séquence de l'enzyme, sont plus efficaces lorsqu'un résidu histidine est présent pour stabiliser l'état oxydé, Ni^{III} . Afin d'étudier l'influence de la présence d'un imidazole à proximité du nickel sur des peptides courts, une histidine a été introduite dans la séquence. Comme dans l'enzyme, le ligand HAC ($\text{H-His-Ala-Cys-NH}_2$) comporte une histidine en première position susceptible de coordonner et de stabiliser le Ni^{III} (Schéma 21). De plus, la présence de l'amine terminale et la formation d'un cycle chélate à cinq chaînons empêcherait la coordination de l'imidazole dans le plan carré sur le Ni^{II} . La comparaison de l'activité catalytique avec celle du complexe NiFAC sera alors intéressante, notamment parce que les deux possèdent un groupement aromatique en chaîne latérale, un seul étant coordonnant.

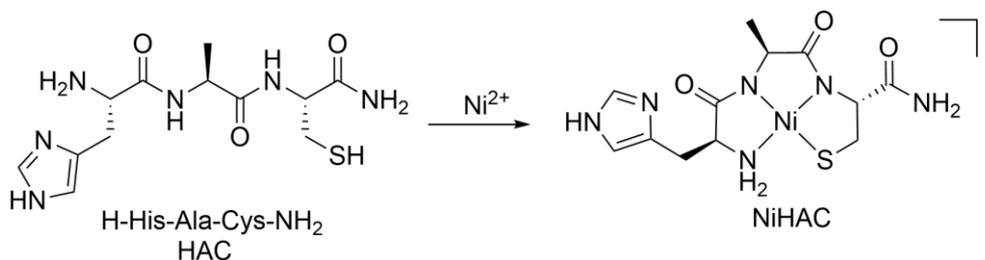


Schéma 21. Structure du ligand HAC et complexe attendu avec Ni^{II} .

Le ligand non acétylé CAC ($\text{H-Cys-Ala-Cys-NH}_2$) offre les deux possibilités de coordination (N ou S). Son étude pourra ainsi confirmer si l'une ou l'autre des coordinations est privilégiée, et son activité pourra être comparée à celle de NiAcCAC ou de NiFAC (Schéma 22).

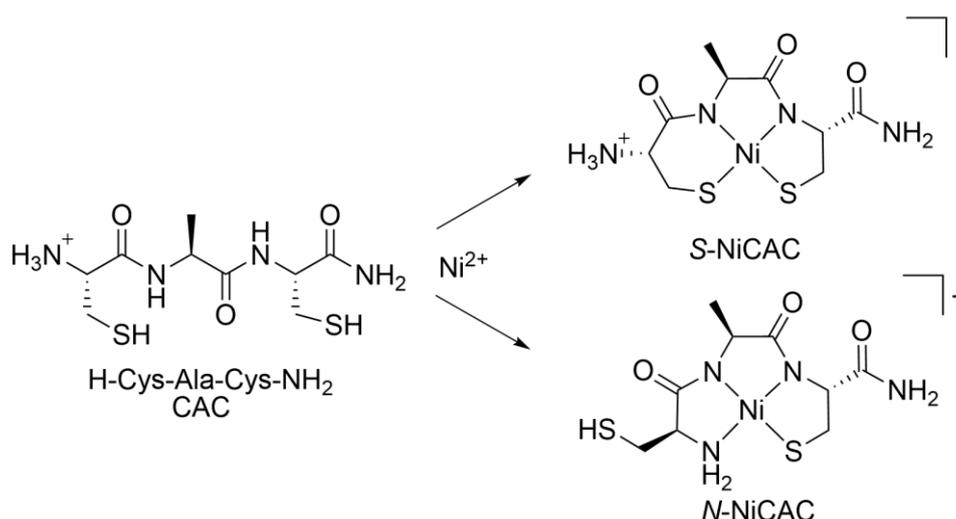


Schéma 22. Structure du ligand CAC et complexes attendus avec le Ni^{II} .

Le ligand $\text{H-Cys-Glu(His-NH}_2\text{)-Cys-NH}_2$ (CE(H)C, Schéma 23) s'inspire des pseudo-peptides décrits dans le Chapitre II en utilisant comme point d'ancrage du tripode un glutamate à la place de l'acide nitrilotriacétique (NTA). Il permet alors de libérer la fonction N-terminale d'un acide aminé. Ce ligand permet aussi les deux types de coordination N et S . L'activité du complexe correspondant pourra ainsi être comparée à celle obtenue avec le ligand CAC, afin de mettre en évidence un effet potentiel de l'histidine.

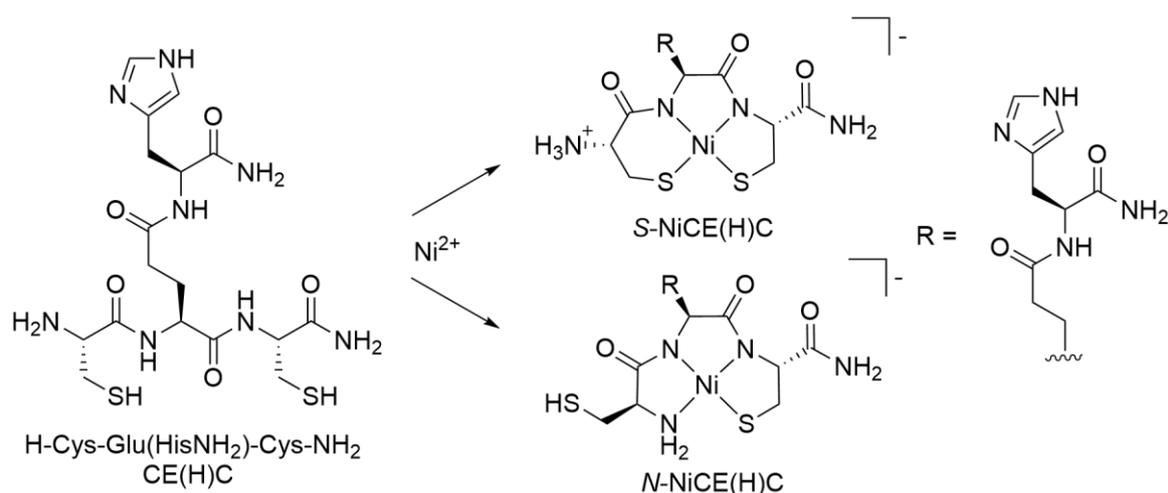


Schéma 23. Structure du ligand CE(H)C et complexes attendus avec Ni^{II} .

Finalement, le ligand H-Cys-His-Cys-NH₂ (CHC) a été synthétisé afin de rapprocher l'imidazole du nickel, tout en gardant les deux possibilités de coordination (Schéma 24).

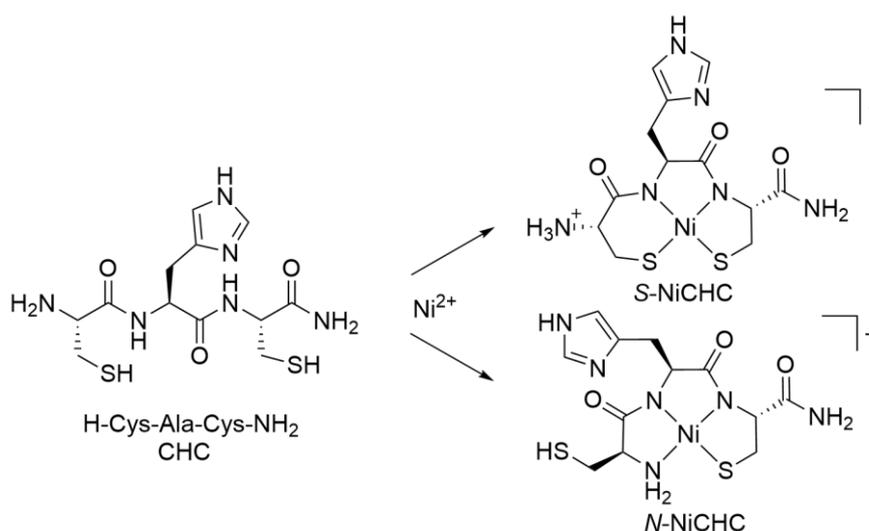


Schéma 24. Structure du ligand CHC et complexes attendus avec Ni^{II} .

2. Synthèse des ligands peptidiques

Tous les peptides présentés dans ce chapitre ont été synthétisés sur support solide (SPPS).¹² Cette technique a été développée en 1963 par Merrifield et utilise des petites billes de polymères, appelées résine, comme support. Différents types de résine existent et sont choisies suivant les fonctions désirées en bout de chaîne peptidique et suivant les conditions de synthèse. La SPPS consiste à greffer un premier acide aminé en C-ter de manière covalente sur la résine. Les résidus suivants sont

ajoutés successivement par couplage entre l'amine de l'acide aminé greffé et l'acide carboxylique de celui en solution, la réaction étant activée par un agent de couplage. Afin d'éviter des réactions intermoléculaires parasites, les fonctions amines des acides aminés en solution sont protégées, puis déprotégées après couplage pour permettre la réaction avec l'acide aminé suivant. Les chaînes latérales sont, elles aussi, protégées de manière orthogonale : les groupements protecteurs doivent être stables en conditions de synthèse, mais facilement clivables. Les principaux avantages de cette technique sont l'utilisation des réactifs en excès et la facilité de lavage du support par filtration après chaque couplage.

La stratégie Fmoc est utilisée dans ce chapitre : les amines sont protégées par le 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc), qui peut être clivé par une base, comme la pipéridine, et les chaînes latérales par des groupements trityles, déprotégés en milieu acide. La résine choisie (Rink Amide) permet d'obtenir des fonctions C-terminales protégées par des amides lors du clivage, qui a lieu en même temps que la déprotection des chaînes latérales. Pour les couplages, le diméthylformamide (DMF) est utilisé comme solvant avec l'ajout de diisopropyléthylamine (DIEA) pour être en conditions légèrement basiques, et d'hexafluorophosphate de (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium (PyBOP) comme agent de couplage. Afin de suivre l'évolution de la synthèse, le dibenzofulvène, qui est le produit de déprotection du Fmoc, peut être quantifié par spectroscopie UV-Visible. De même, un test qualitatif destructif avec l'acide 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonique (TNBS) permet de s'assurer que les fonctions amines du résidu greffé ont bien réagi. Néanmoins, après chaque couplage, les fonctions amines qui n'auraient pas réagi sont acétylées afin de limiter le nombre de sous-produits et de faciliter la purification. En fin de synthèse, la résine et les groupes trityles sont clivés dans un mélange acide trifluoroacétique (TFA), triisopropylsilane (TIPS) et eau (95/2,5/2,5). Finalement, les peptides sont purifiés par HPLC préparative et lyophilisés pour obtenir des solides blancs.

2.1. Peptides linéaires

La synthèse du ligand AcCAC est représentée dans le Schéma 25. Les autres peptides linéaires (CAC, FAC, HAC et CHC) ont été synthétisés suivant le même mode opératoire avec les acides aminés correspondant et sans l'étape d'acétylation finale afin de conserver l'amine libre en N-Ter (3). Les différents rendements obtenus sont présentés dans le Tableau 1. Les spectres de masse et les chromatogrammes des différents ligands sont représentés en Annexe III.1.

Tableau 5. Rendements obtenus pour les différents peptides après HPLC préparative.

Peptide	AcCAC	FAC	CAC	HAC	CHC
Rendement (%)	45	59	47	50	27

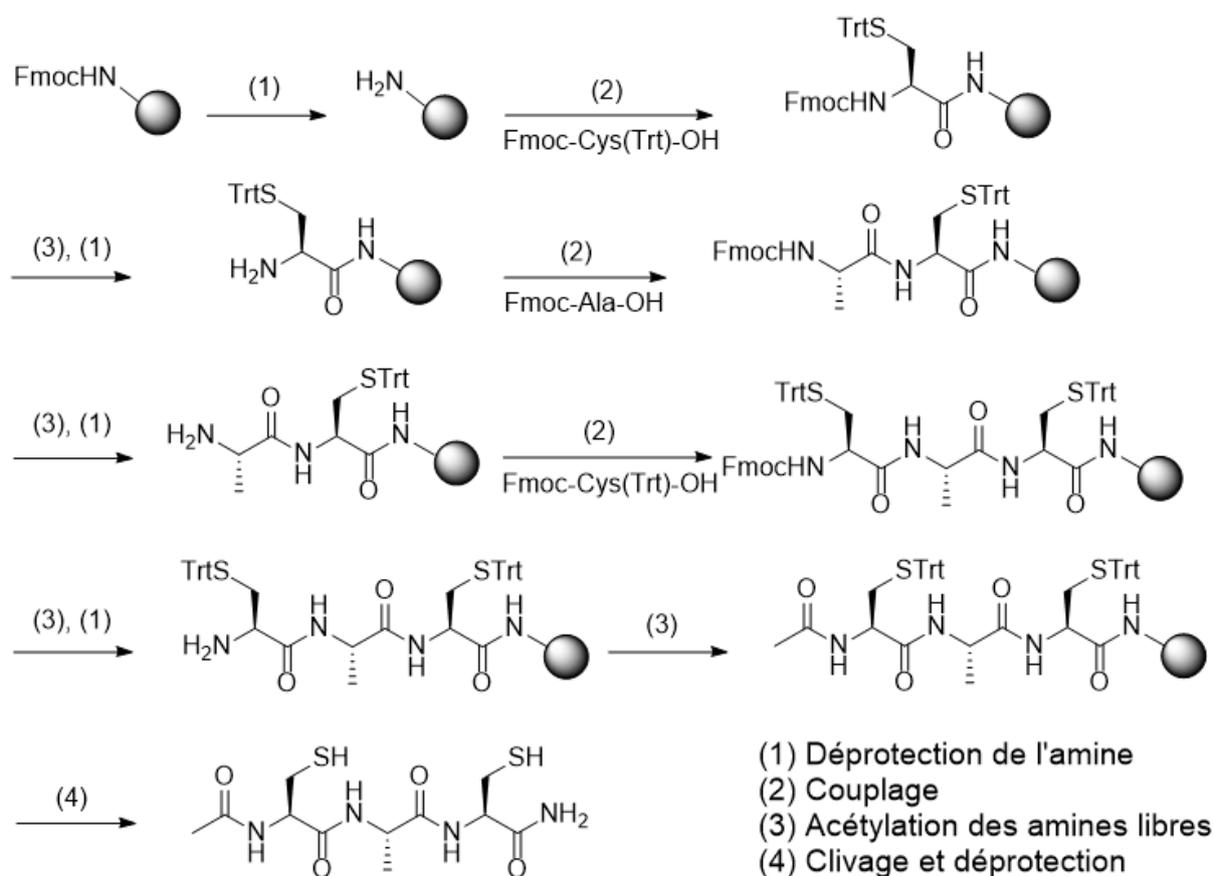


Schéma 25. Synthèse supportée du peptide AcCAC. (1) Pipéridine (20%), (2) AA (2 eq.), PyBOP (2 eq.), DIEA (6 eq.), (3) Pyridine (20%), anhydride acétique (10%), (4) TFA (95%), H₂O (2,5%), TIPS (2,5%).

2.2. Peptide non linéaire CE(H)C

Pour le ligand CE(H)C, une stratégie différente a été utilisée. L'histidine a d'abord été greffée, puis le glutamate avec ses fonctions acides et amines protégées de manière orthogonale respectivement par des groupements allyle et Fmoc. Après déprotection de l'allyle, la cystéinamide commerciale peut être couplée pour obtenir directement la fonction C-terminale protégée par un amide (Schéma 26). Après clivage, purification par HPLC préparative et lyophilisation, le ligand est obtenu avec un rendement de 71%.

3. Formation des complexes de Ni(II)

De façon similaire à ce qui est décrit dans la partie Chapitre II.3, les complexes sont préparés *in situ* : une solution de ligand est préparée dans le milieu voulu puis titrée avec le test d'Ellman.¹³ Une quantité de métal appropriée est ensuite ajoutée pour obtenir le complexe ciblé.

3.1. Cinétique de formation des complexes

Afin d'optimiser les conditions expérimentales pour la formation des complexes, la cinétique de complexation a tout d'abord été étudiée avec les différents ligands en milieu tamponné (HEPES, pH 7,4). Pour cela, 0,9 équivalent de NiSO₄ a été ajouté à chaque solution de ligand et la réaction a été suivie par spectroscopie UV-Visible (Figure 37). Il s'avère que la formation des complexes de Ni^{II} est relativement lente (entre 30 minutes et 7 heures), notamment par rapport au ligand NTA(CysNH₂)₃ présenté dans le chapitre II (quelques minutes).

Tous les ligands conduisent à l'apparition de bandes UV-Visible intenses correspondant à des transferts de charge LMCT S⁻→Ni et/ou N⁻→Ni,¹⁴ ce qui confirme la coordination du nickel et la formation des complexes. Cependant, deux comportements différents sont observés.

Les ligands AcCAC, CAC, CE(H)C et CHC, qui comportent deux thiols, conduisent à la formation rapide (< 5 minutes) d'une première espèce après ajout de nickel (transition entre 330 et 380 nm), qui évolue lentement vers une seconde avec une bande LMCT beaucoup plus intense à plus haute énergie (Figure 37, gauche). Cette observation laisse supposer que le nickel est seulement partiellement coordonné dans un premier temps. L'obtention des complexes met environ 7h avec les ligands AcCAC, CAC et CE(H)C mais seulement 30 min pour le ligand CHC.

Les ligands FAC et HAC (coordination N) conduisent quant à eux directement à des complexes qui n'évoluent plus (Figure 37, droite). La formation du complexe avec HAC, qui contient une histidine, est plus rapide que celle observée avec FAC (1h contre 5h).

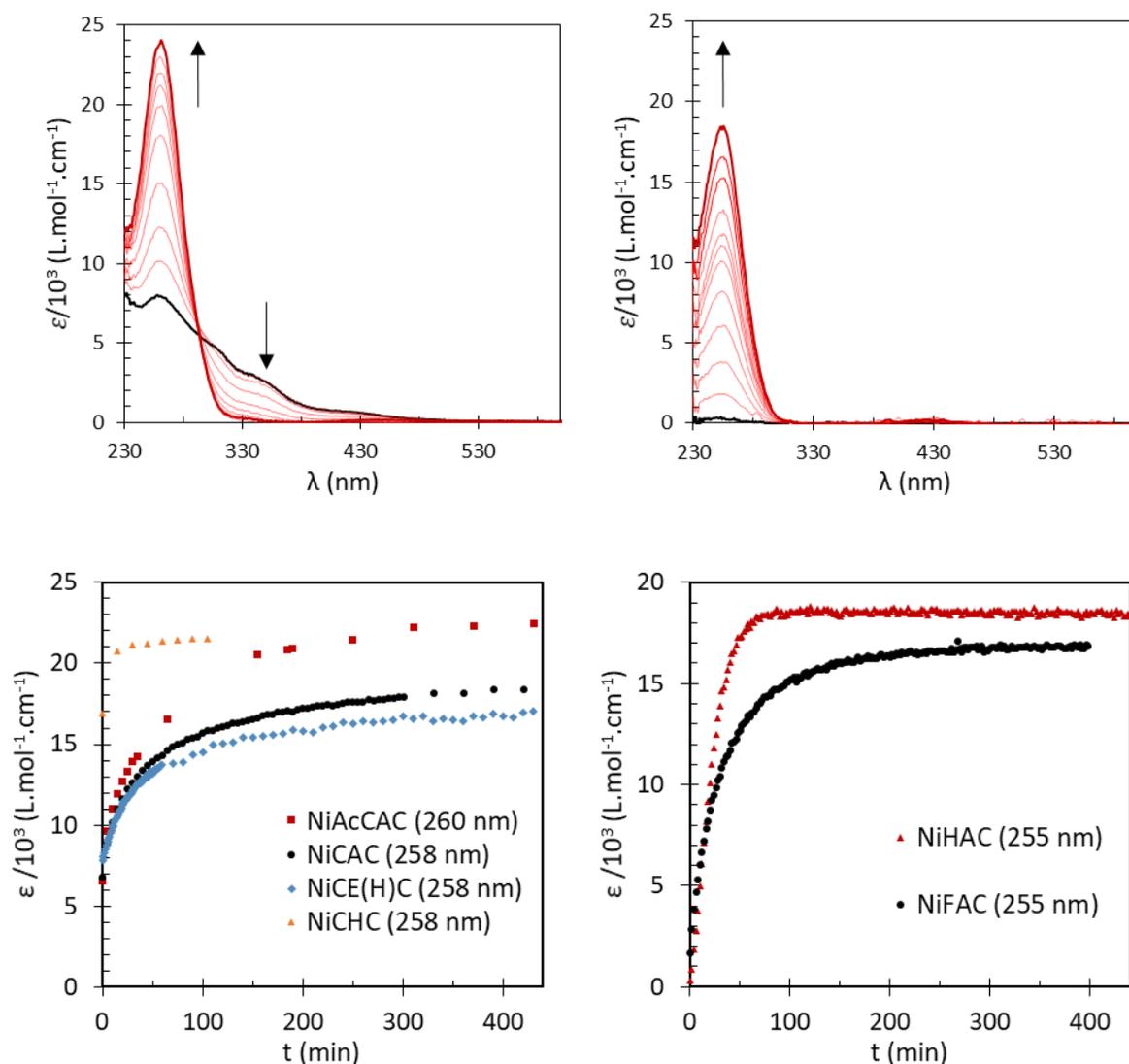


Figure 37. Haut : Evolution des spectres UV-Visible après ajout de 0,9 équivalents de Ni^{II} à AcCAC (37 μ M) (gauche), et FAC (26 μ M) (droite), tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM) sous agitation. Le spectre noir est obtenu directement après ajout du nickel, les spectres rouges après différents temps de stabilisation. Bas : Evolution de l'absorbance maximale des complexes en fonction du temps.

Ces temps de formation longs sont probablement dus à la déprotonation des amides suivie de la coordination des amidos. Dans la suite du chapitre, seuls les résultats obtenus avec des solutions de complexe à l'équilibre sont présentés.

3.2. Stœchiométrie des complexes

Des espèces polymétalliques étant souvent observées avec des peptides soufrés, la stœchiométrie des complexes formés a été étudiée par dosage des ligands avec le Ni^{II}. Comme le motif ATCUN est un chélateur du Ni^{II} à pH physiologique, les dosages ont été réalisés à pH 7,4.

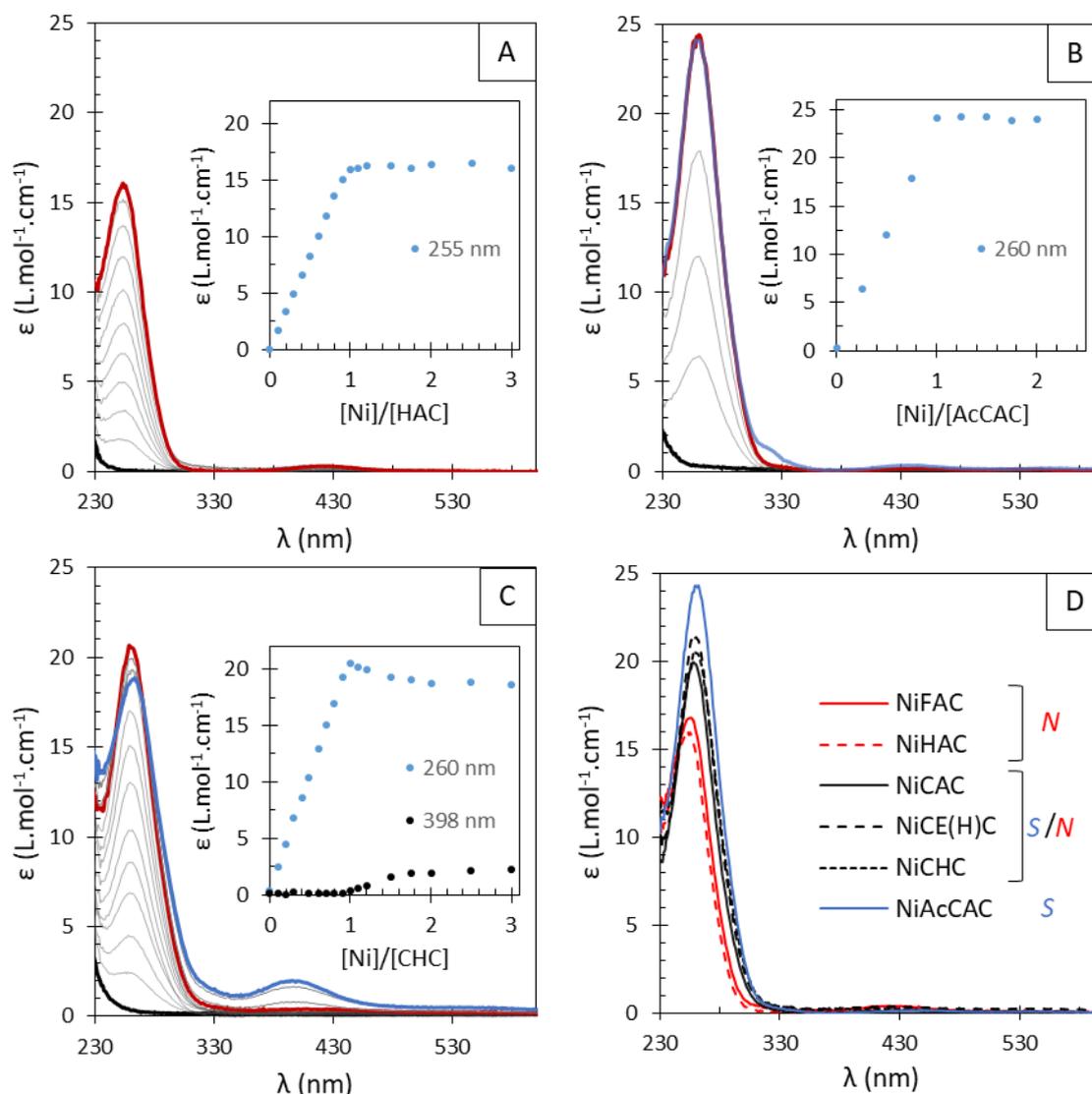


Figure 38. Dosage de CHC (38 μM) (A), HAC (42 μM) (B), AcCAC (45 μM) (C) par NiSO_4 , tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. (D) Spectres UV-Visible des différents complexes.

Tous les ligands conduisent à une augmentation linéaire de l'absorbance pour les bandes LMCT et d-d jusqu'à un équivalent de Ni^{II} , ce qui montre la formation de complexes stœchiométriques métal/ligand (Figure 38, les dosages pour FAC, CAC et CE(H)C sont représentés dans l'Annexe III.2.1). Les spectres pour les ligands FAC et HAC (coordination N) n'évoluent plus après l'ajout d'un équivalent de NiSO_4 (Figure 38, A). Pour AcCAC (coordination S), un épaulement à 320 nm qui apparaît au-delà d'un équivalent confirme la formation de complexes polymétalliques, en accord avec les résultats obtenus pour les modèles de l'ACS (Figure 38, B). Pour les ligands offrant deux possibilités de coordination (CAC, CE(H)C et CHC), un excès de nickel entraîne l'apparition d'une bande à 398 nm jusqu'à 1,5 équivalents, suggérant la formation d'espèces polymétalliques (3:2) (Figure 38, C). Ainsi,

tous les ligands qui contiennent deux thiols conduisent à des complexes polymétalliques en présence de plus d'un équivalent de nickel, contrairement à ceux qui n'en contiennent qu'un seul.

A un équivalent de Ni^{II}, les spectres UV-Visible obtenus avec FAC et HAC sont identiques, ce qui suggère la même sphère de coordination. La bande LMCT intense à 255 nm indique la coordination du thiolate et des amidos, tandis que la bande d-d à 425 nm est en accord avec une géométrie plan carré (Tableau 6). Le complexe obtenu avec AcCAC présente des bandes similaires à 260 et 435 nm (Figure 38, D). La valeur du ϵ_{260} , plus élevée que pour les autres complexes, est en accord avec la coordination des deux thiolates au nickel. Les spectres obtenus pour NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC sont aussi similaires avec une bande LMCT à 258 nm et une bande d-d à 430 nm. On notera que les spectres comportent des λ_{max} et des ϵ entre ceux obtenus avec les coordinations N et S (Tableau 6).

Tableau 6. λ_{max} (nm) pour les différents complexes, les coefficients d'extinction molaire ($M^{-1}cm^{-1}$) correspondant sont indiqués entre parenthèses.

	NiAcCAC	NiFAC	NiHAC	NiCAC	NiCE(H)C	NiCHC
	S	N	N	S/N	S/N	S/N
LMCT	260 (24 300)	255 (16 700)	255 (16 100)	258 (19 900)	258 (20 500)	258 (21 300)
d-d	435 (200)	425 (400)	425 (400)	430 (300)	430 (300)	430 (300)

Des dosages suivis par dichroïsme circulaire (CD) montrent des tendances similaires (Voir Annexe III.2.2). La présence de points isodichroïques entre 0 et 1 équivalent de Ni^{II} ajouté met en évidence la formation d'une unique espèce pour tous les composés. L'allure des spectres change profondément au-delà d'un équivalent de nickel pour les peptides permettant les coordinations N et S. De même, les points isodichroïques entre 1 et 2 équivalents pour ces ligands confirment que les espèces polymétalliques ne sont pas présentes en solution en deçà de 1 équivalent de Ni^{II}.

Les spectres CD obtenus avec un équivalent de nickel pour les différents ligands sont représentés Figure 39. Comme en spectroscopie UV-Visible, les spectres sont similaires, avec principalement une bande intense négative à 270 nm, et des bandes positives à 310 et 335 nm qui peuvent être attribuées aux transitions $S^- \rightarrow Ni$ et $N^- \rightarrow Ni$.^{4,15} Si on observe toujours une différence des signatures spectroscopiques entre la coordination N (FAC, HAC) et S (AcCAC), les spectres obtenus avec CAC, CE(H)C et CHC sont très proches de ceux correspondant à la coordination S.

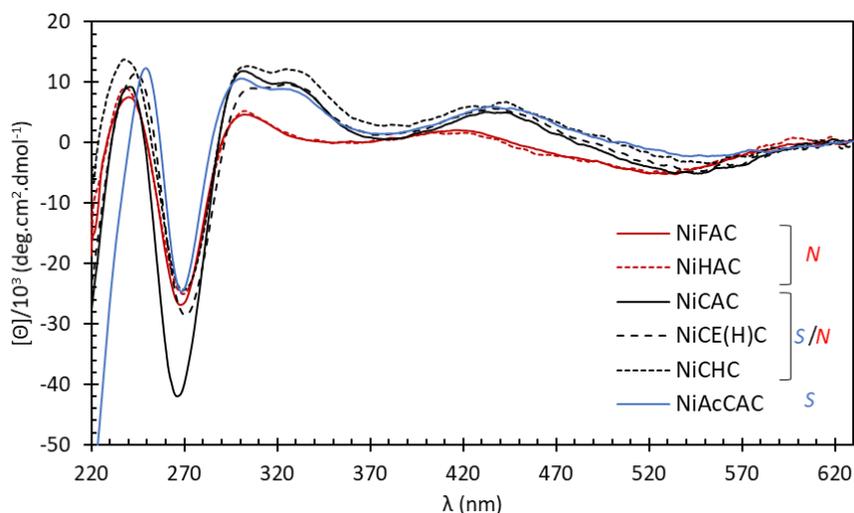


Figure 39. Spectres CD de NiFAC, NiHAC, NiCHC, NiCE(H)C, NiCAC, NiAcCAC, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM).

L'analyse par spectrométrie de masse des solutions de ligand dans l'acétate d'ammonium (20 mM, pH 6,9) en présence d'un équivalent de nickel confirme l'obtention de complexes mononucléaires (Tableau 7, les spectres de masse obtenus avec les ligands AcCAC, FAC, HAC, CAC et CE(H)C sont représentés dans l'Annexe III.2). Lorsque deux équivalents de nickel sont ajoutés, les ligands comportant deux cystéines (AcCAC, CAC, CHC et CE(H)C) conduisent à la formation des espèces polymétalliques [3:2] correspondantes, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par spectroscopie UV-Visible et CD (Figure 40, Annexe III.3)

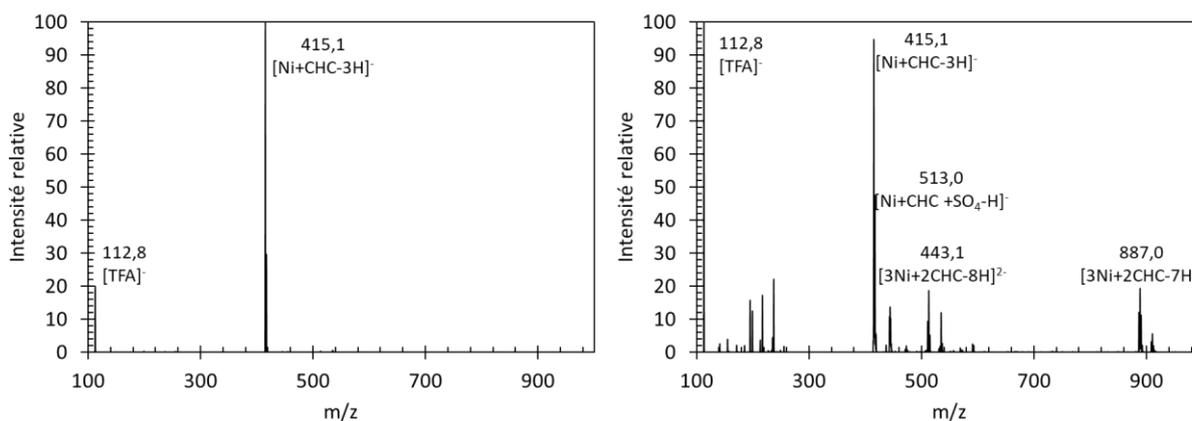


Figure 40. Spectres de masse (ESI-MS⁻) du ligand CHC (213 μM) avec 1 équivalent (gauche) et 1,5 équivalent (droite) de Ni^{II} dans NH₄OAc (20 mM, pH 6,9).

Tableau 7. Espèce majoritaire détectée par ESI-MS de solutions équimolaires de ligand et de Ni^{II}.

Ligand	AcCAC	FAC	HAC	CAC	CE(H)C	CHC
m/z	391.1	383.2	393.2	348.8	545.1	415.1
Espèce	[Ni+AcCAC-3H] ⁻	[Ni+FAC-3H] ⁻	[Ni+HAC-3H] ⁻	[Ni+CAC-3H] ⁻	[Ni+CE(H)C-H] ⁺	[Ni+CHC-3H] ⁻

La Ni-SOD ne comportant qu'un seul Ni^{II} dans son site actif, nous nous focaliserons sur les propriétés des complexes mononucléaires dans la suite du chapitre. Afin d'éviter la présence d'espèces polymétalliques, un excès de ligand sera utilisé dans les prochaines expériences avec un ratio métal/ligand de 0,9:1.

3.3. Effet du pH

3.3.1 Evolutions spectroscopiques

L'effet du pH sur la complexation du Ni^{II} par les différents ligands a été étudié par spectroscopies UV-Visible et CD. Le Ni^{II} (0,9 équivalent) a été ajouté à une solution de ligand dans l'eau ainsi que différentes quantités de KOH ou HCl. Après stabilisation (24-72h), le pH des solutions est mesuré et les spectres sont enregistrés.

Pour AcCAC, FAC et HAC, un seul phénomène de déprotonation est observé par UV-Visible et CD. Le complexe NiAcCAC est formé entre pH 6 et 7 avec l'apparition des bandes UV-Visible caractéristiques à 260 et 435 nm (Figure 41, haut). Pour FAC et HAC, la formation du complexe débute à pH plus acide (5,5) et est complète à pH 6,5 pour FAC, et 7 pour HAC (Figure 41, milieu). Cette différence peut être due à l'imidazolium de l'histidine qui est déprotoné dans cette gamme de pH ($pK_A \approx 6,5$). De même, les bandes UV-Visible décrites à pH 7,4 sont observées à 255 et 425 nm.

Pour CAC, CE(H)C et CHC, un premier phénomène de déprotonation, similaire à ceux décrits précédemment, est observé entre pH 5 et 6,5 (Figure 41, bas). La présence d'une histidine dans le ligand facilite la formation du complexe qui commence à pH plus acide. A pH > 8, un nouveau phénomène est observé avec une faible diminution de l'absorbance et un décalage de λ_{max} vers de plus hautes énergies. Les spectres obtenus avec les ligands FAC, CAC et CE(H)C sont représentés dans l'Annexe III.4.1

Des évolutions similaires sont observées par CD, avec l'obtention des spectres décrits Figure 39 à pH 7. Pour CE(H)C et CHC, un changement de l'intensité des bandes est aussi observé à pH basique. (Voir Annexe III.4.2). Ces résultats confirment la formation totale des complexes à pH physiologique.

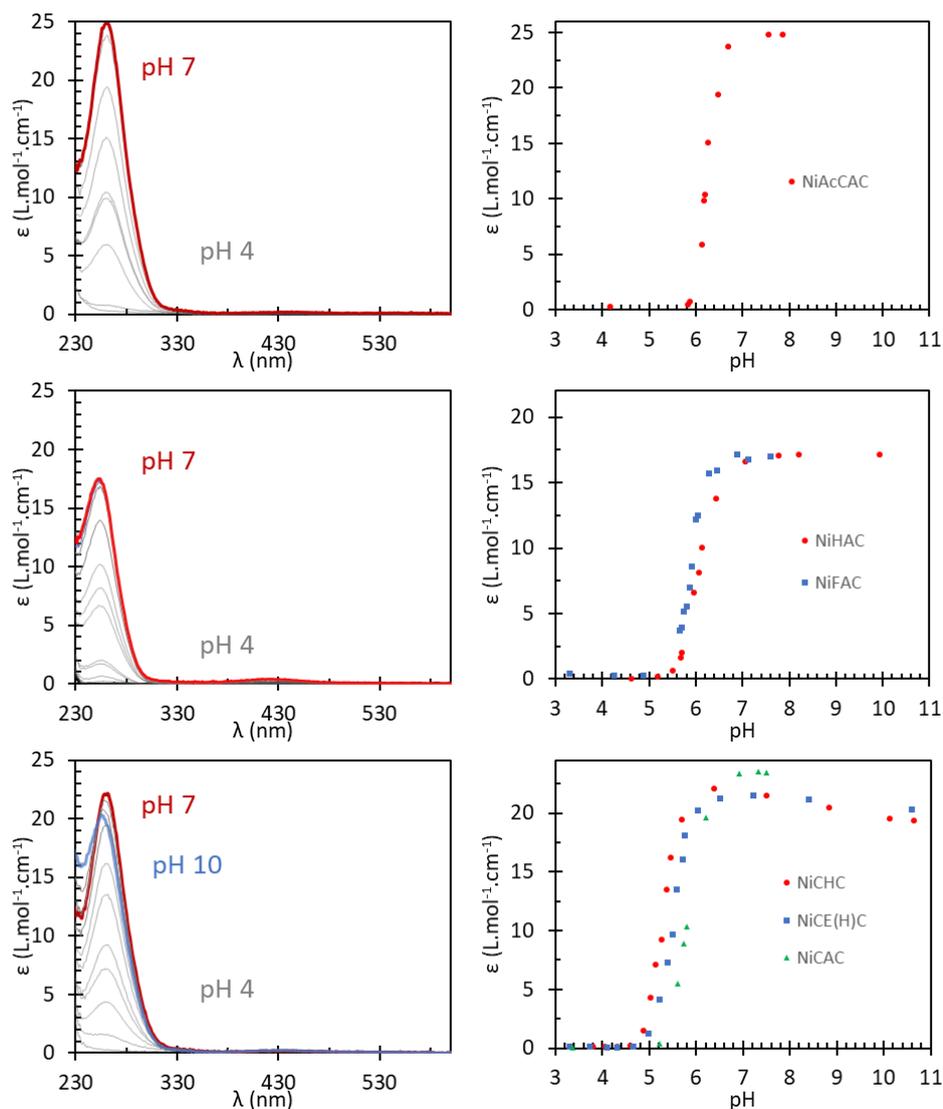
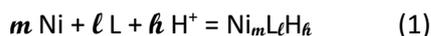


Figure 41. Gauche : Spectres UV-Visible pour AcCAC (30 μM) (haut), HAC (35 μM) (milieu), et CHC (28 μM) (bas) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH pour les différents complexes (FAC : 24 μM , CE(H)C : 30 μM , CAC : 34 μM).

3.3.2 Modélisations

Afin d'obtenir davantage d'informations sur les déprotonations, notamment sur le nombre de protons mis en jeu et les constantes d'affinité, des modélisations ont été effectuées avec le logiciel SPECFIT.¹⁶⁻¹⁸ Connaissant les pK_A des différentes fonctions du ligand, il est possible de modéliser l'évolution de l'absorbance sur l'ensemble de la gamme spectrale en supposant la formation de différents complexes.

Le ligand libre déprotoné dans l'eau est noté L, et la constante d'équilibre β_{mlh} est définie par l'Equation 1. Les pK_A des ligands ont été fixés à partir de valeurs déterminées expérimentalement dans la littérature (Tableau 8, Tableau 9).



Les pK_A des thiols du peptide Ac-Cys-Val-Cys-NH₂, précédemment décrits dans la littérature, sont de 9,5 et 8,3 (Tableau 8).¹⁹ Le remplacement de la valine par une alanine ne doit pas ou peu influencer ces pK_A , les mêmes valeurs ont donc été utilisées pour les thiols de AcCAC. De même, les pK_A de l'ammonium et des thiols publiés pour le peptide H-Cys-Gly-Cys-NH₂ ont été utilisés pour CAC, CE(H)C et CHC.²⁰ Le pK_A de l'ammonium en N-Ter est abaissé lorsque le peptide contient des cystéines ou histidines proches, une valeur de 7,8 a ainsi été utilisée pour FAC et HAC.²¹ Enfin, le pK_A de l'imidazolium d'une histidine étant généralement entre 6 et 7, il a été fixé à 6,5 pour HAC, CE(H)C ainsi que CHC.^{19,21} Son effet sur le pK_A du premier thiol a par conséquent été négligé pour CE(H)C et CHC. Les constantes obtenues avec ces deux ligands sont donc à considérer avec précaution.

Tableau 8. pK_A de peptides décrits dans la littérature

Peptide	$pK_A(\text{NH}_3^+)$	$pK_A(\text{SH})$	$pK_A(\text{SH})$	$pK_A(\text{HisH}^+)$	Référence
Ac-Cys-Val-Cys-NH ₂	-	9.49	8.25	-	19
H-Cys-Gly-Cys-NH ₂	9.55	8.48	6.41	-	20
H-Gly-Cys-OEt	7.95	8.96	-	-	21
H-Val-His-OEt	7.64	-	-	6.06	21
Ac-Cys-Val-His-NH ₂	-	10.24		6.84	19

Tableau 9. pK_A considérés pour les modélisations

Peptide	$pK_A(\text{NH}_3^+)$	$pK_A(\text{SH})$	$pK_A(\text{SH})$	$pK_A(\text{HisH}^+)$
Ac-CAC-NH ₂	-	9.5	8.3	-
H-CAC-NH ₂	9.6	8.6	6.4	-
H-CE(H)C-NH ₂	9.6	8.6	6.4	6.5
H-CHC-NH ₂	9.6	8.6	6.4	6.5
H-FAC-NH ₂	7.8	8.6	-	-
H-HAC-NH ₂	7.8	8.6	-	6.5

Les résultats des modélisations des spectres d'absorption en fonction du pH sont maintenant présentés. La réaction observée a lieu à partir de la forme protonée du ligand LH₂ ou LH₃ présente à pH inférieur à 4 pour obtenir le complexe NiLH₂ ou NiLH₁ en fonction du nombre de sites de protonation.

L'évolution de l'absorbance pour AcCAC a été modélisée avec la perte de 4 protons sur le ligand LH₂ pour former le complexe NiLH₂. Ce résultat est cohérent avec les déprotonations et coordinations des deux thiols et des deux amides (Schéma 27).

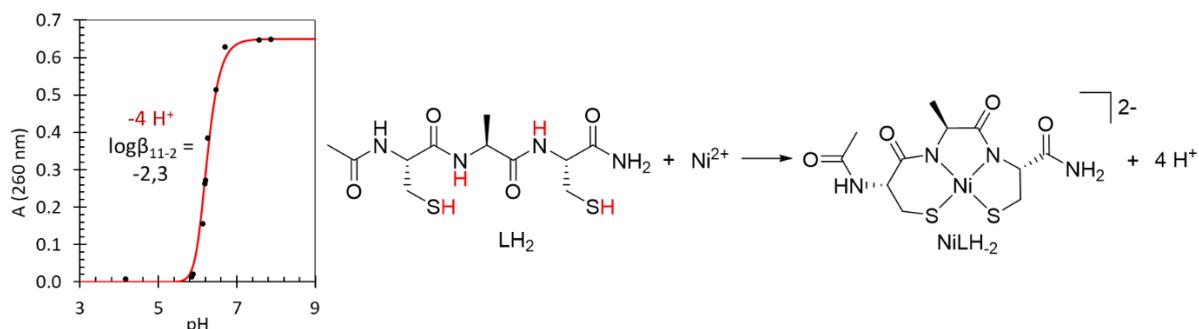


Schéma 27. (Gauche) Points expérimentaux et modélisation pour l'évolution de l'absorbance avec AcCAC à 255 nm dans les conditions décrites Figure 41. (Droite) Réaction de complexation considérée pour la modélisation.

Pour FAC, l'évolution de l'absorbance est aussi modélisée par 4 déprotonations, qui correspondent à l'ammonium, au thiol et aux deux amides (Schéma 28).

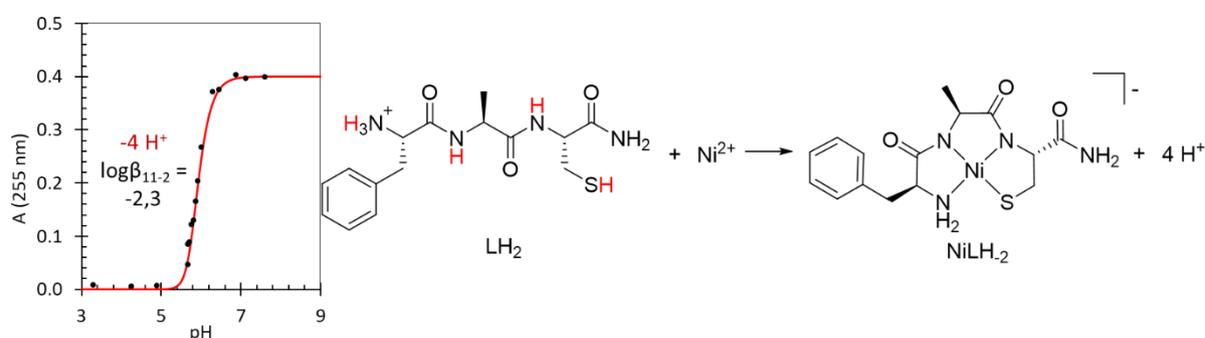


Schéma 28. (Gauche) Points expérimentaux et modélisation pour l'évolution de l'absorbance avec FAC à 255 nm dans les conditions décrites Figure 41. (Droite) Réaction de complexation considérée pour la modélisation.

Les résidus histidines étant déprotonnés à pH physiologique, 5 déprotonations ont été proposées pour la modélisation avec HAC (Schéma 29).

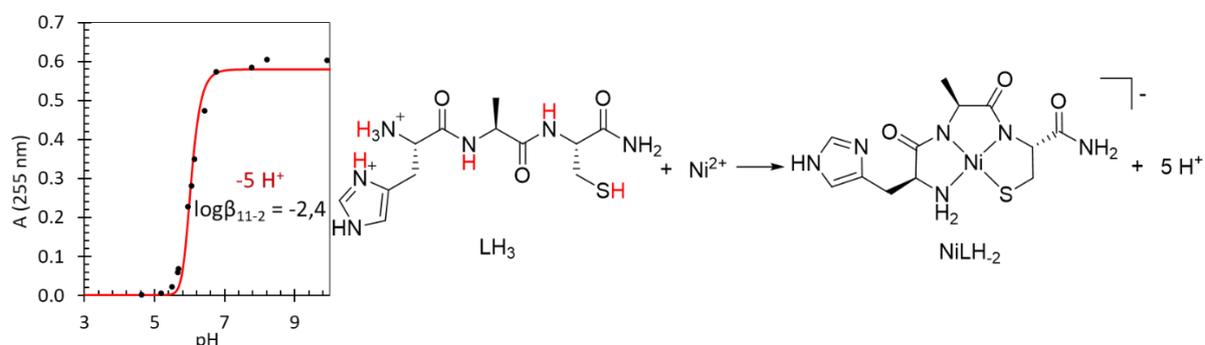


Schéma 29. (Gauche) Points expérimentaux et modélisation pour l'évolution de l'absorbance avec HAC à 255 nm dans les conditions décrites Figure 41. (Droite) Réaction de complexation considérée pour la modélisation.

Pour CAC, 4 déprotonations sont nécessaires pour obtenir le complexe $NiLH_{-1}$ que ce soit avec la coordination *N* ou *S*. En effet, les pK_A des thiols et ammoniums libres en solution sont supérieurs à 8, et ces fonctions sont donc protonées à pH physiologique si elles ne sont pas coordonnées (Schéma 30).

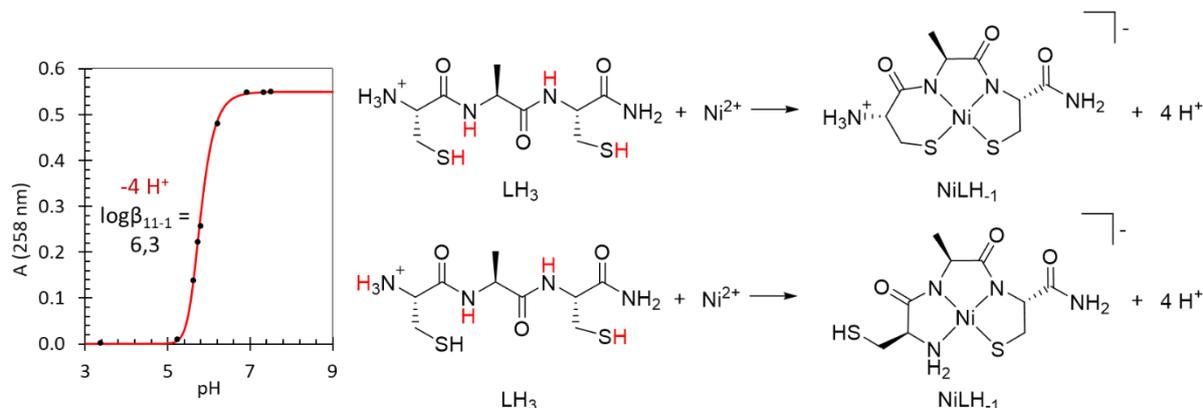


Schéma 30. (Gauche) Points expérimentaux et modélisation pour l'évolution de l'absorbance avec CAC à 258 nm dans les conditions décrites Figure 41. (Droite) Réactions de complexation considérées pour la modélisation.

Enfin, pour CHC et CE(H)C, les modélisations ont été réalisées en prenant en compte 5 déprotonations. Le deuxième phénomène de déprotonation observé par spectroscopie UV-Visible autour de pH 9-10 (Figure 41) n'a pas été considéré dans le modèle, celui-ci étant difficile à simuler. Il est toutefois possible de proposer qu'il provient de la déprotonation du thiol ou de l'ammonium non coordonné au nickel.

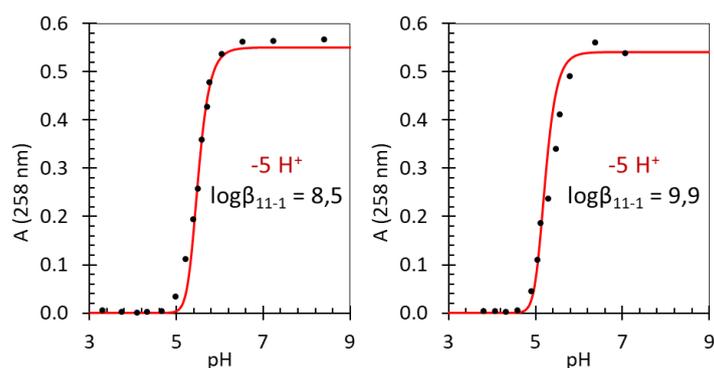


Schéma 31. Points expérimentaux et modélisations pour l'évolution de l'absorbance avec CE(H)C (gauche) et CHC (droite) à 258 nm dans les conditions décrites Figure 41.

Pour tous les ligands, la formation des complexes est bien modélisée en considérant les déprotonations des chaînes latérales, des amides et des ammoniums le cas échéant. Les différentes valeurs des $\log\beta$ sont reportées dans le Tableau 6.

Les modélisations conduisent à des $\log\beta_{11-2}$ très proches pour NiFAC, NiHAC et NiAcCAC et donc à des stabilités similaires pour les complexes avec la coordination *N* ou *S* (Tableau 10). Pour les ligands offrant une coordination *N* ou *S*, les $\log\beta_{11-1}$ sont plus élevés lorsqu'une histidine est présente. Cependant, ces différentes constantes sont difficilement comparables entre elles, les complexes n'ayant pas tous le même état de protonation. Le facteur pNi ($-\log[\text{Ni}_{\text{libre}}]$) a donc été introduit pour comparer l'affinité apparente des ligands pour le nickel à pH physiologique, *via* la quantité résiduelle de Ni^{II} libre en solution dans des conditions données. Ce facteur a été calculé à pH 7,4, avec le logiciel Hyss, en considérant les pK_A et $\log\beta$ reportés dans le Tableau 9 et le Tableau 10, la concentration de ligand à 10 μM et celle du nickel à 1 μM . Des résultats très similaires sont obtenus pour AcCAC, FAC, HAC et CAC avec des valeurs comprises entre 10,4 et 11,7 (Tableau 10). Néanmoins, des valeurs plus hautes sont obtenues avec CE(H)C et CHC, ce qui est cohérent avec la formation des complexes à pH plus acide expérimentalement (Figure 41). Toutefois, l'identification précise des fonctions coordonnantes des ligands dans ces différents complexes nécessite l'utilisation d'autres techniques d'analyse.

Tableau 10. Résultats des modélisations pour les différents ligands

	AcCAC	FAC	HAC	CAC	CE(H)C	CHC
		NiLH ₋₂			NiLH ₋₁	
logβ	-2,3	-2,3	-2,4	6,3	8,5	9,9
pNi	10,4	11,7	11,6	11,2	13,4	14,8

Ces études en pH permettent donc de confirmer la formation totale des complexes à pH physiologique, ainsi que leurs états de protonation. De plus, on notera la proximité entre les constantes de stabilité des coordinations *N* et *S*, ce qui peut indiquer un équilibre entre les deux formes.

4. Structure des complexes

4.1. Etude par RMN ¹H

Comme le motif ATCUN conduit à des complexes de Ni^{II} diamagnétiques de par leur géométrie plan carré,²² les différents complexes ont été caractérisés par RMN ¹H. Afin d'obtenir des informations sur les protons échangeables (NH, NH₂), les expériences ont été effectuées dans H₂O/D₂O (90:10). Les ligands ont été analysés à pH acide afin de ralentir les échanges des protons des amides avec l'eau. Les complexes sont obtenus en ajoutant 0,9 équivalent de nickel aux ligands et le pH est ajusté par ajout de KOH. Les spectres RMN ¹H des différents ligands sont représentés dans l'Annexe III.5.

Tous les complexes conduisent à des spectres bien résolus, avec des signaux entre 1 et 9 ppm, ce qui est en accord avec des espèces diamagnétiques, dans lesquelles le Ni^{II} est en coordination plan carré (Figure 42).

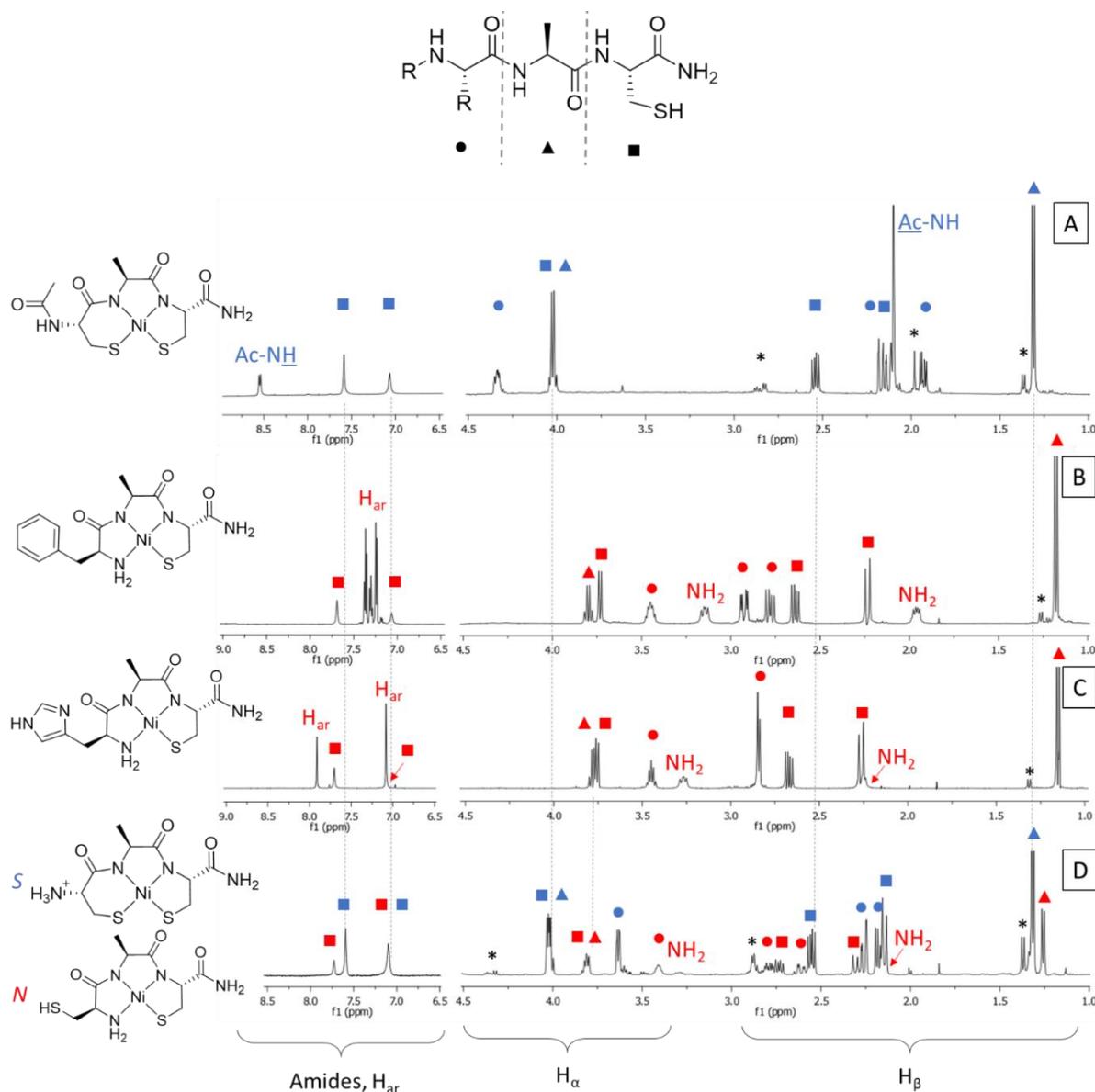


Figure 42. Spectres RMN ¹H à 500 MHz des ligands avec 0,9 équivalent de Ni^{II} dans H₂O/D₂O (90:10) à 298 K, pH ajusté par ajout de KOH. (A) NiAcCAC, 0,9 mM, pH 7,3. (B) NiFAC, 1,4 mM, pH 8. (C) NiHAC, 1,3 mM, pH 7,2. (D) NiCAC, 1,1 mM, pH 7,5. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

Les analyses mettent en évidence la perte de deux protons des amides sur les ligands lors de la formation de chaque complexe, ce qui confirme la coordination des amidos. Pour NiAcCAC, l'amide en N-ter reste protoné, ce qui est cohérent avec la structure proposée et la coordination des deux thiolates (Figure 42, A). Pour NiFAC et NiHAC, les spectres obtenus sont très similaires. Notamment, la coordination de l'amine terminale est démontrée dans les deux complexes par l'observation des

signaux des deux protons de l'amine à 1,9 et 3,2 ppm pour NiFAC, et 2,3 et 3,3 ppm pour NiHAC, (Figure 42, B et C). L'histidine de HAC n'est donc pas coordonnée dans le plan carré du Ni^{II} en solution. De plus, les spectres NOESY montrent que les protons de l'amine dans NiHAC sont en échange à l'échelle de temps de la RMN contrairement à ceux de NiFAC (les spectres NOESY de NiFAC et NiHAC sont représentés dans l'Annexe III.5). Ce résultat suggère une décoordination et coordination de l'amine terminale qui serait donc plus labile dans NiHAC.

Pour NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC, l'analyse des spectres RMN ¹H 1D et 2D montre la présence de deux espèces (Figure 42 D, les spectres obtenus pour NiCHC et NiCE(H)C sont représentés dans l'Annexe III.5). Les signaux de l'espèce identifiée en bleu sont proches de ceux de NiAcCAC, tandis que ceux de l'espèce identifiée en rouge correspondent à ceux de NiHAC ou NiFAC. Ces complexes sont donc présents sous deux formes en solution, correspondant aux coordinations N (≈25%) et S (≈75%). L'échange entre ces deux formes est visible sur le spectre 2D NOESY (Figure 43). Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus en spectroscopie UV-Visible qui montrent des spectres intermédiaires entre les coordinations N et S pour NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC (Figure 38).

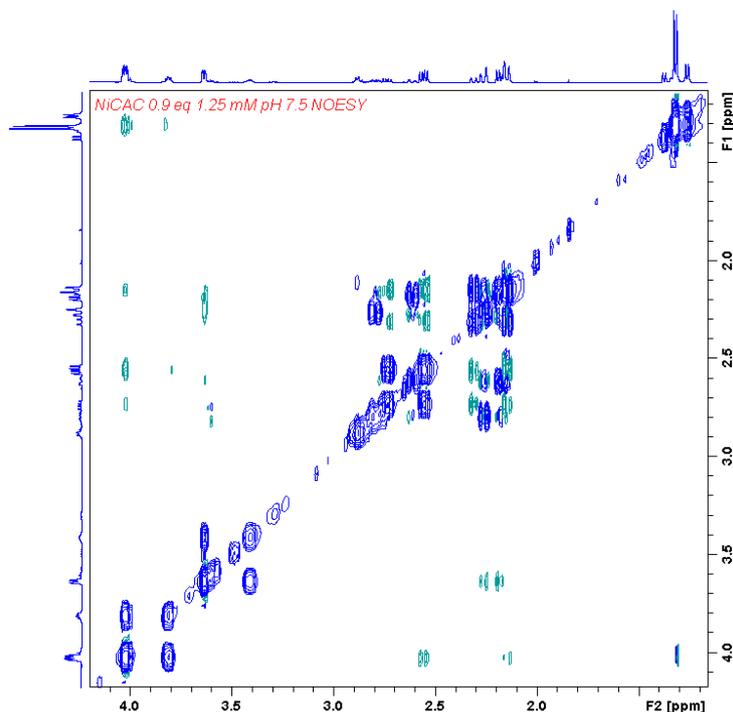


Figure 43. Spectre NOESY-Watergate 500 MHz de NiCAC (1,1 mM, pH 7,5) dans H₂O/D₂O (90:10) à 298 K. Temps de mélange 500 ms. Tâches vertes : effet NOE, tâches bleues hors diagonale : échange entre les coordinations S et N.

Les analyses à différents pH pour NiCAC et NiCHC (pH 6-11) démontrent que la proportion des coordinations N/S est indépendante du pH, bien qu'un élargissement des pics soit observé à pH > 10 (voir l'Annexe III.5). Ce résultat est en accord avec la déprotonation de l'ammonium ou du thiol non

coordonné, et ainsi à un échange plus rapide qu'à pH physiologique entre les deux coordinations. Les deux formes sont donc en équilibre lorsque le complexe est formé. Ce résultat est en contradiction avec ceux publiés pour des peptides similaires décrits en introduction, et qui proposent une seule coordination (coordination *S* à pH physiologique, et coordination *N* à pH > 8,5) à partir d'observations spectroscopiques.^{6,7}

4.2. Etude par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS)

Afin de confirmer l'environnement chimique et structural du nickel, les complexes ont été analysés par XAS. Ils ont été préparés à pH physiologique dans un mélange eau/glycérol (80:20) afin de limiter la formation de cristaux de glace lors du gel des échantillons (HEPES 100 mM, pH 7,4). Les analyses ont été effectuées à 10 K afin de limiter la dégradation des complexes pendant les acquisitions.

4.2.1 XANES

L'analyse des spectres XANES permet d'obtenir des informations sur le degré d'oxydation du centre métallique, ainsi que sur sa géométrie. Les spectres obtenus avec les différents complexes sont similaires : ils présentent tous deux pré-pics, un à 8332,8 eV correspondant à une transition $1s(\text{Ni}) \rightarrow 3d(\text{Ni})$ et un deuxième à 8339 eV (8338 eV pour NiAcCAC) attribué à la transition $1s(\text{Ni}) \rightarrow 4p_z(\text{Ni})$ (Figure 44). Les spectres obtenus pour NiCAC, NiCHC et NiCE(H)C présentent un épaulement à 8338 eV, cohérent avec un équilibre entre les deux coordinations *N* et *S*. La présence de ces deux transitions confirme un environnement plan carré autour du Ni^{II} dans les différents complexes.²³ De plus, la valeur du seuil pour la coordination *S* (NiAcCAC, 8336,5 eV) est plus basse en énergie que pour la coordination *N* (NiFAC et NiHAC, 8336,9 eV), en accord avec un nombre de soufre coordonné au nickel plus important. Enfin, la superposition des spectres de NiFAC et NiHAC permet d'affirmer que l'histidine n'est pas coordonnée axialement au Ni^{II} .

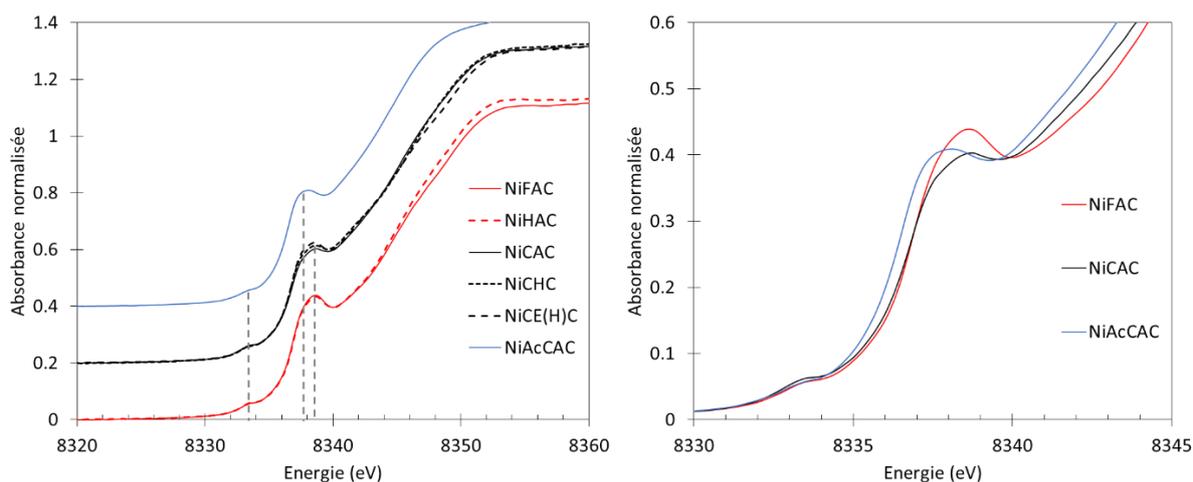


Figure 44. Gauche : Spectres XANES des complexes NiAcCAC (1,2 mM, offset de 0,4), NiCAC (1,1 mM, offset de 0,2), NiCE(H)C (1,1 mM, offset de 0,2), NiCHC (1,1 mM, offset de 0,2), NiFAC (1,1 mM) et NiHAC (1,0 mM) dans eau/glycérol (80:20) à pH 7,4 (HEPES 100 mM) à 10 K. Droite : Agrandissement pour les complexes NiFAC, NiCAC et NiAcCAC.

4.2.2 EXAFS

L'analyse des données EXAFS permet, quant à elle, de déterminer la nature des atomes coordonnant le nickel, ainsi que les distances métal-ligand. Les spectres obtenus pour les coordinations N et S sont relativement différents, notamment après calcul de la transformée de Fourier (Figure 45, le spectre de NiHAC étant très proche de celui de NiFAC, il n'est pas représenté ; de même pour ceux de NiCHC et NiCE(H)C, très proches de NiCAC). Dans le cas des spectres obtenus pour les complexes en équilibre entre les deux coordinations (NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC), ils sont plus proches de ceux caractéristiques de la coordination N alors que l'inverse était attendu d'après les résultats obtenus par RMN.

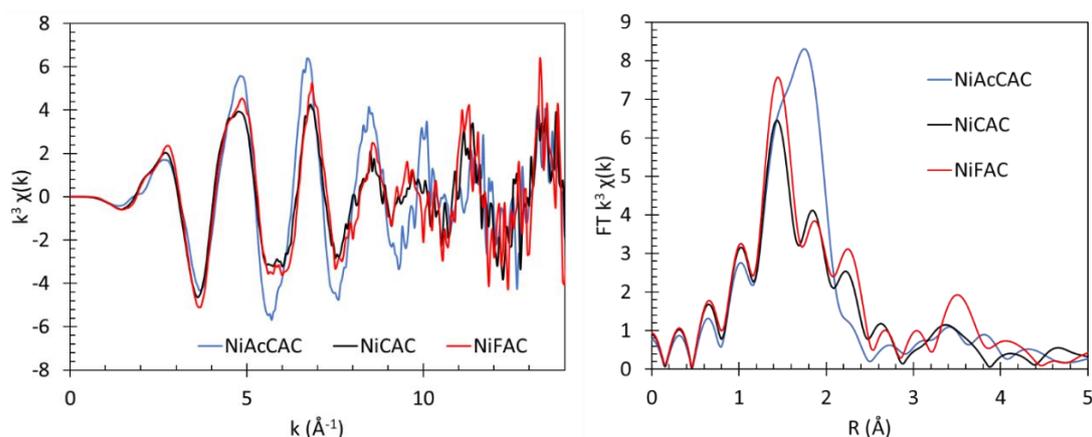


Figure 45. Spectres EXAFS pondérés par k^3 (gauche) et leurs transformées de Fourier (droite) pour les complexes NiAcCAC (1,2 mM), NiCAC (1,1 mM), et NiFAC (1,1 mM) dans eau/glycérol (80:20) à pH 7,4 (HEPES 100 mM) à 10 K.

Les analyses pour NiFAC et NiHAC ont été effectuées en considérant trois couches d'atomes autour du nickel : une pour l'amine, une pour le thiolate, et une pour les amidos. Les nombres de coordination ont été imposés, et les résultats sont présentés dans la Figure 46 et le Tableau 11.

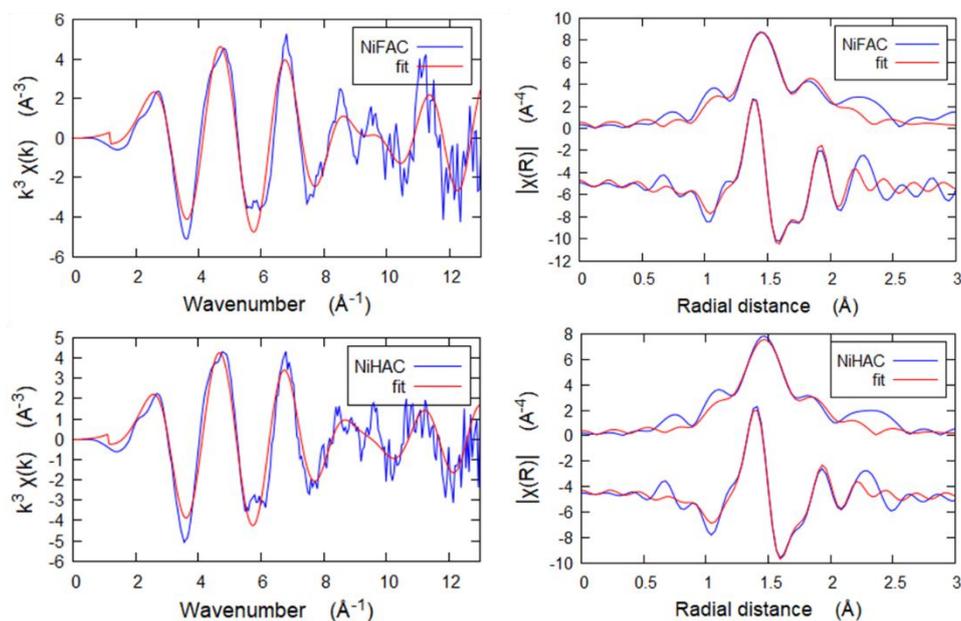


Figure 46. Analyses EXAFS pour NiFAC (haut) et NiHAC (bas). Gauche : spectres EXAFS pondérés par k^3 . Droite : transformées de Fourier. Intervalles considérés : $2 < k < 13,5$ et $1 < R < 2,2$.

Les analyses conduisent à des résultats similaires avec les mêmes distances pour les différentes couches. Les valeurs sont proches de celles obtenues par DRX sur des structures semblables comportant des amidos, amines et thiolates.^{24,25} Ces distances sont aussi proches de celles observées dans la Ni-SOD : 2,16 et 2,19 Å pour les liaisons Ni-S, 1,91 Å pour la liaison Ni-N et 1,87 Å pour Ni-NH₂, qui est étonnamment la plus courte dans la forme réduite de l'enzyme.²⁶

Tableau 11. Paramètres structuraux pour NiFAC et NiHAC obtenus à partir des analyses EXAFS.

	Ni-S			Ni-N			Ni-NH ₂			ΔE_0 (eV)	Res (%)	χ^2_v
	R (Å)	CN ^a	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (Å ²)	R (Å)	CN ^a	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (Å ²)	R (Å)	CN ^a	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (Å ²)			
NiFAC	2,18(1)	1	1(2) ^b	1,84(5)	2	1(2) ^b	1,92(3)	1	0,2(80)	5(3)	1,5	12
NiHAC	2,19(3)	1	3(3)	1,85(7)	2	3(3)	1,91(4)	1	0,1(70)	5(4)	4,9	36

Les erreurs sont indiquées entre parenthèses. ^a les nombres de coordination ont été fixés. ^b les valeurs ont été imposées comme égales pour l'analyse. Res = $[\sum(\chi_{\text{exp}} - \chi_{\text{fit}})^2 / \sum(\chi_{\text{exp}})^2] \times 100$.

Pour NiAcCAC, les analyses ont été réalisées avec une couche pour les thiolates et une couche pour les amidos (Figure 47, Tableau 12). Les résultats sont similaires en imposant les nombres de coordination ou en fixant seulement la somme à 4. Dans le second cas, l'analyse conduit à des valeurs

proches de celles attendues : 2,2 S et 1,8 N. De même, les distances obtenues sont proches de celles observées par DRX sur un complexe de nickel avec deux thiolates et deux amidos (2,18 Å pour Ni-S et 1,86 Å pour Ni-N).²⁴

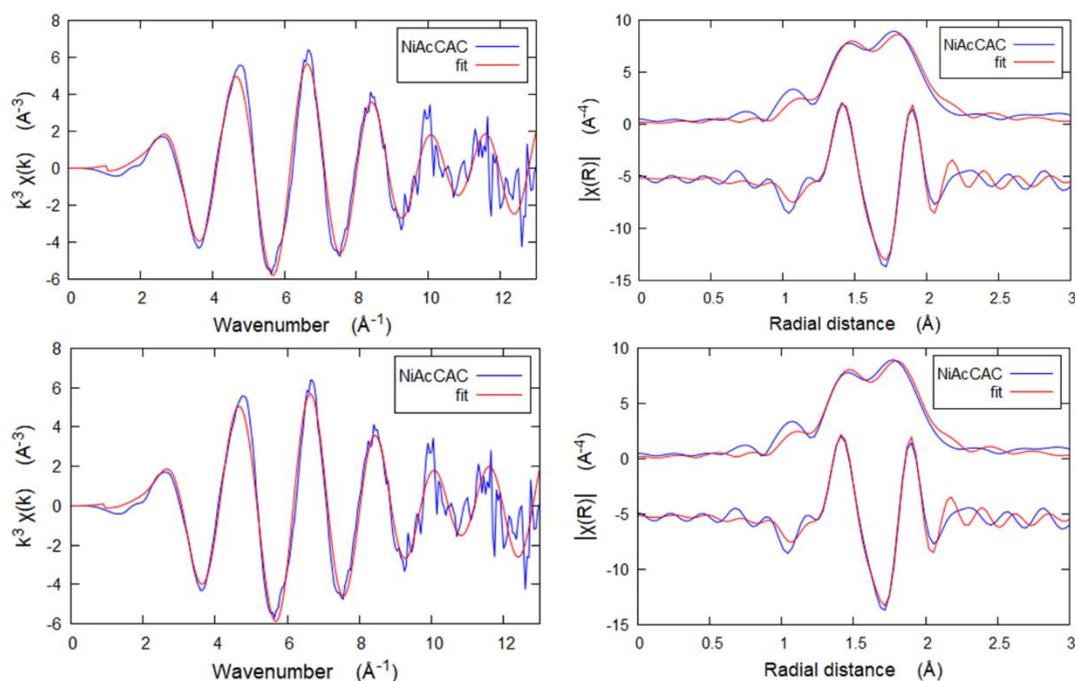


Figure 47. Analyses EXAFS pour NiAcCAC. Gauche : spectres EXAFS pondérés par k^3 . Droite : transformées de Fourier. Analyses réalisées en fixant les nombres de coordination (haut), ou en imposant une somme égale à 4 (bas). Intervalles considérés : $2 < k < 14$ et $1 < R < 2,2$.

Tableau 12. Paramètres structuraux pour NiAcCAC obtenus à partir des analyses EXAFS.

	Ni-S			Ni-N			ΔE_0 (eV)	Res (%)	χ^2_ν
	R (Å)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (Å ²)	R (Å)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (Å ²)			
NiAcCAC ^a	2,17(1)	2	2(1)	1,88(1)	2	1(1)	4(1)	1,1	164
NiAcCAC ^b	2,16(2)	2,2(7)	2(2)	1,88(3)	1,8(7)	1(2)	3(3)	1,0	214

Les erreurs sont indiquées entre parenthèses. ^a les nombres de coordinations ont été fixés. ^b les nombres de coordinations ont été imposés avec une somme égale à 4. Res = $[\sum(\chi_{\text{exp}} - \chi_{\text{fit}})^2 / \sum(\chi_{\text{exp}})^2] \times 100$.

Les analyses EXAFS des complexes NiAcCAC et NiFAC ou NiHAC confirment respectivement les coordinations S et N. La coordination S, qui présente un cycle chélate à 6 chaînons, augmente légèrement (0,04 Å) la distance Ni-N⁻, tandis que la distance Ni-S reste identique dans les deux cas.

Les complexes NiCAC, NiCE(H)C et NiHC étant en équilibre entre les coordinations N et S, les données ont été analysées par combinaison linéaire des spectres correspondant aux coordinations N

et S pures : les spectres EXAFS et XANES de NiFAC ont été utilisés pour la coordination N, et ceux de NiAcCAC pour la coordination S. Les résultats sont présentés Tableau 13 et Figure 48 pour NiCE(H)C (les analyses obtenues avec NiCAC et NiCHC sont représentées dans l'Annexe III.6).

Tableau 13. Résultats des combinaisons linéaires pour NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC sur les spectres EXAFS et XANES.

	EXAFS		XANES	
	2 < k < 12		8317 – 8357 eV	
	%S	%N	%S	%N
NiCAC	26(3)	74(3)	26(3)	74(3)
NiCE(H)C	23(4)	77(4)	21(3)	79(3)
NiCHC	30(4)	70(4)	23(2)	77(2)

Contrairement aux analyses RMN (75% de coordination S), la coordination N est majoritaire avec un ratio d'environ 75/25 pour ces différents complexes. Deux paramètres diffèrent entre les analyses RMN et XAS : le solvant (20% de glycérol) et la température (10 K). Des analyses RMN ¹H complémentaires réalisées avec NiCAC dans D₂O/glycérol-D8 ont montré que le glycérol n'a pas d'influence sur le ratio entre les deux coordinations (voir Annexe III.5). Les deux formes étant en équilibre thermodynamique, nous proposons alors que la différence de ratio obtenue entre ces deux techniques (EXAFS et RMN ¹H) provienne de la différence de température entre les analyses (10 K vs 298 K).

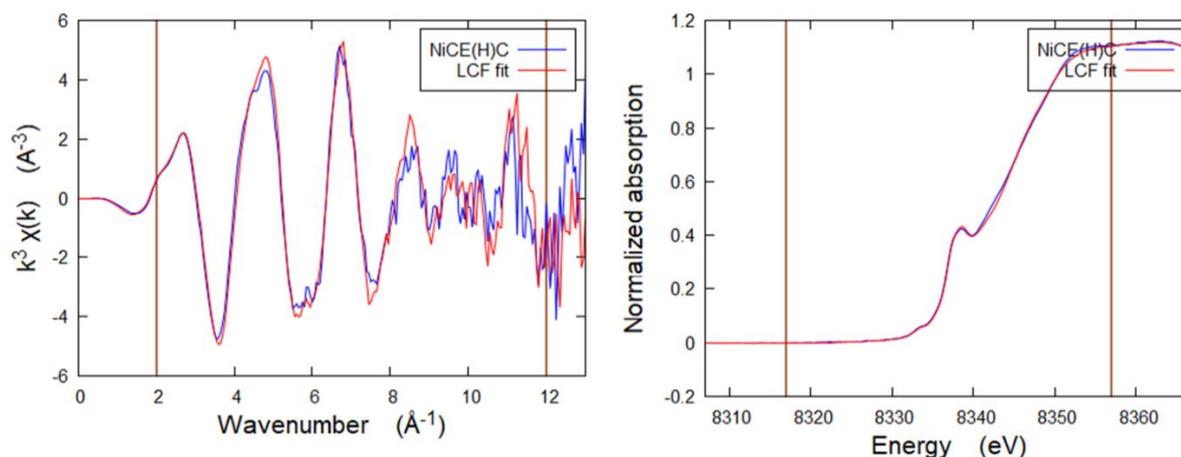


Figure 48. Spectres EXAFS pondérés par k^3 (gauche) et XANES (droite) de NiCE(H)C et spectres obtenus par combinaison linéaire des spectres de NiFAC et NiAcCAC. Intervalles considérés : $2 < k < 12$ et $8317 < eV < 8357$.

Les résultats obtenus par XAS sont donc en accord avec ceux obtenus par spectroscopie UV-Vis, CD et RMN : pour la coordination *N*, l'amine, les amidos et le thiolate sont coordonnés au nickel dans un environnement plan carré ; idem pour la coordination *S* avec les deux amidos et les deux thiolates. Pour NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC, l'analyse des spectres confirme l'équilibre observé en RMN ^1H entre les deux coordinations.

4.3. Etude par DFT

Afin de valider les structures proposées à partir des études spectroscopiques, des calculs DFT ont été effectués sur les différents complexes. Pour chaque complexe, les structures optimisées de plus basse énergie possèdent un état singulet, en accord avec une géométrie plan carré. Toutes ces optimisations conduisent à des structures plan carré légèrement distordues, avec la coordination de l'amine terminale, des deux amidos et du thiolate pour la coordination *N*, et celle des deux thiolates et des deux amidos pour la coordination *S*. NiCAC comportant le même nombre de protons dans les deux coordinations, il est possible de comparer leurs énergies après optimisation. *S*-NiCAC conduit à une structure plus stable de 4 kcal.mol $^{-1}$ par rapport à celle de *N*-NiCAC. Bien que cette différence d'énergie soit faible, elle reste significative, et est en accord avec l'équilibre proposé à partir des données RMN en faveur de la coordination *S*.

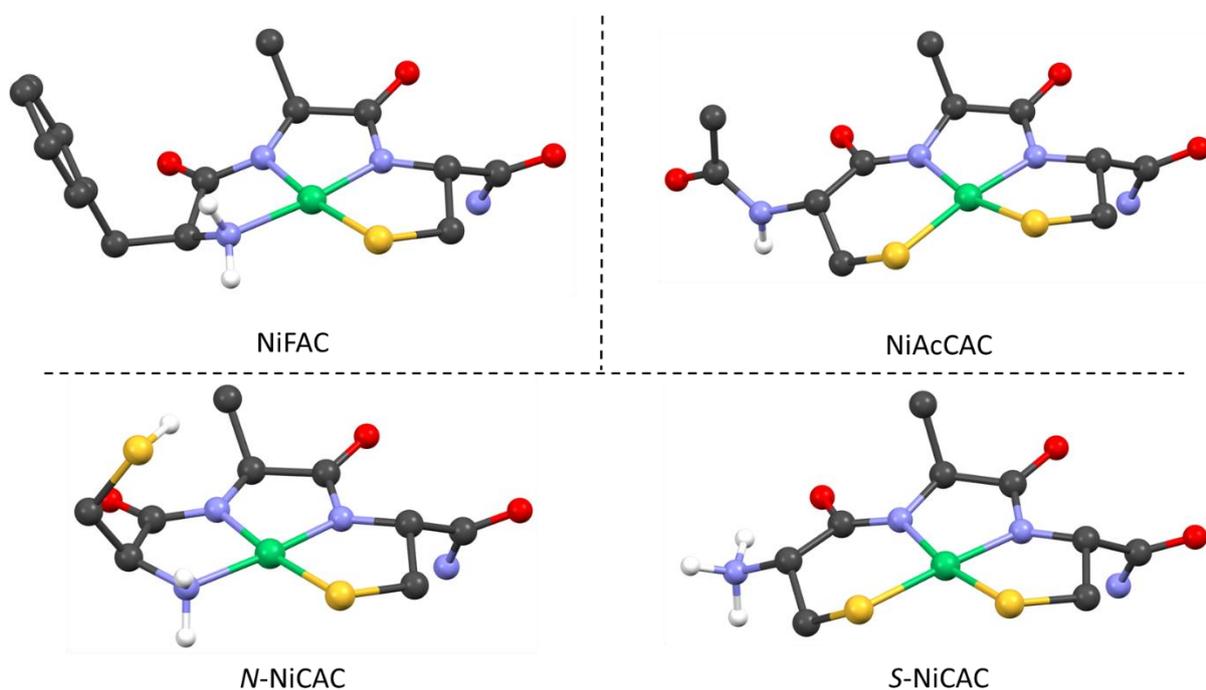


Figure 49. Structures optimisées pour NiFAC, NiAcCAC et NiCAC. Seuls les protons de l'amine terminale et du thiol sont représentés.

Les distances obtenues après optimisation sont présentées dans le Tableau 14. Celles-ci sont cohérentes avec les résultats obtenus par analyse EXAFS. On notera cependant des distances plus

élevées pour les amidos qui proviennent du cycle à 6 chaînons pour les complexes avec la coordination S.

Tableau 14. Distances obtenues après optimisation (Å). Méthode : fonctionnelle : CAM-B3LYP, base : def2-tzvp, solvant : eau.

	NiFAC	NiHAC	N-NiCAC	S-NiCAC	NiAcCAC
Ni-NH₂ / Ni-S	1,96	1,96	1,95	2,22	2,20
Ni-N⁻	1,86	1,86	1,86	1,98	1,97
Ni-N⁻	1,86	1,85	1,86	1,91	1,91
Ni-S	2,21	2,20	2,21	2,22	2,24

De même, les calculs TD-DFT sont en accord avec les spectres UV-Visible obtenus expérimentalement : les bandes LMCT et d-d pour S-NiCAC sont plus basses en énergie que celles obtenues pour N-NiCAC, avec des écarts entre les maxima ($\Delta\lambda$) proches de ceux observés expérimentalement (Tableau 15, Figure 50).

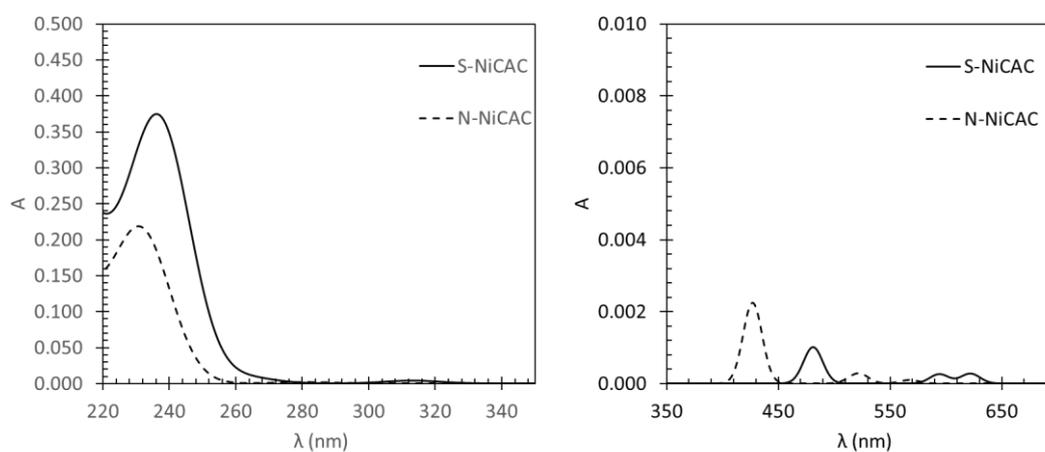


Figure 50. Spectres UV-Visible prédits par TD-DFT de S-NiCAC et N-NiCAC. Gauche : LMCT. Droite : transitions d-d. Méthode : fonctionnelle : CAM-B3LYP, base : def2-tzvp, solvant : eau. Gauche : LMCT. Droite : transitions d-d.

Tableau 15. Comparaison des spectres UV-Visible pour les coordinations S et N : prédits par TD-DFT pour le complexe NiCAC et mesurés expérimentalement pour NiAcCAC (S) et NiFAC (N).

	TD-DFT	UV-Vis
LMCT : $\Delta\lambda = \lambda_{\max}(S) - \lambda_{\max}(N)$	4 nm	5 nm
d-d : $\Delta\lambda = \lambda_{\max}(S) - \lambda_{\max}(N)$	10 nm	54 nm
LMCT : $\epsilon(S)/\epsilon(N)$	1,7	1,5

NiHAC a été optimisé à deux états d'oxydation : Ni^{II} (S = 0) et Ni^{III} (S = ½). Dans l'état réduit, l'imidazole de l'histidine est éloigné du Ni^{II} (distance supérieure à 5 Å) (Schéma 32). A l'état oxydé, l'imidazole se coordonne à l'ion Ni^{III}, conduisant à une géométrie pyramidale à base carrée distordue. La distance Ni-N_{im} est alors de 2,06 Å. Cette distance est très proche de celles obtenues dans la NiSOD ou dans des modèles peptidiques lorsque le réseau de liaisons hydrogènes impliquant l'imidazole de His1 est supprimé ($\approx 2,0$ Å).²⁷⁻²⁹ De plus, la densité de spin est principalement localisée sur le nickel (0,89), et très peu sur le soufre (-0,04) ou l'azote de l'imidazole (0,12).

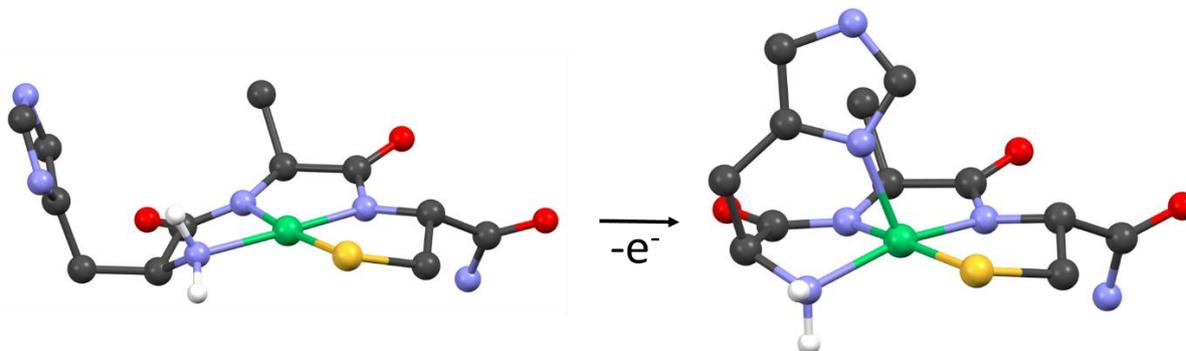


Schéma 32. Structures optimisées pour Ni^{II}HAC et Ni^{III}HAC.

Pour NiCHC, les optimisations des formes réduites (Ni^{II}, S = 0) conduisent à des résultats similaires à ceux obtenus pour Ni^{II}CAC. Les deux coordinations ont des énergies similaires ($\Delta H = 3$ kcal/mol en faveur de la coordination N). Pour les complexes oxydés (Ni^{III}, S = ½), les optimisations entraînent la coordination de l'imidazole sur le Ni^{III} dans les deux formes (Schéma 33, les structures optimisées avec la coordination N sont représentées dans l'Annexe III.7). Cependant, la différence d'énergie entre les deux coordinations devient plus importante et la coordination S conduit à une structure plus stable ($\Delta H > 5$ kcal/mol). Comme pour Ni^{III}HAC, la densité de spin est alors principalement localisée sur le nickel (0,97).

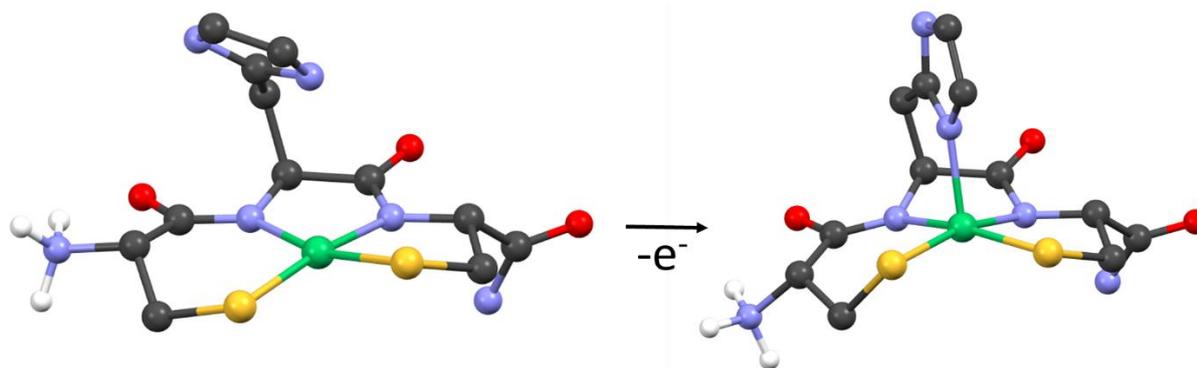


Schéma 33. Structures optimisées pour $Ni^{II}CHC$ et $Ni^{III}CHC$ en coordination *S*.

5. Propriétés redox

5.1. Voltampérométrie cyclique

Dans le but d'évaluer la capacité de ces différents complexes à avoir une activité catalytique de type SOD, leurs potentiels d'oxydation ont été mesurés par voltampérométrie cyclique (CV). Les mesures ont été effectuées en milieu tamponné à pH physiologique. Les potentiels sont décrits par rapport à l'électrode au calomel saturée (SCE).

Tous les complexes conduisent à des oxydations irréversibles, mais des différences notables sont observées (Figure 51, la CV du complexe $NiCE(H)C$ est présentée dans l'Annexe III.8). Le complexe $NiFAC$ possède le potentiel d'oxydation le plus élevé : $E_{pa} = 0,41$ V. La présence d'une histidine dans le complexe $NiHAC$ diminue le potentiel d'oxydation : $E_{pa} = 0,34$ V. L'histidine doit donc aider à stabiliser le complexe dans son état oxydé et faciliter son obtention. Ces résultats confirment une oxydation centrée sur le métal prédite par les calculs DFT et sont cohérents avec les structures optimisées. Les potentiels mesurés pour le couple redox Ni^{III}/Ni^{II} sont inférieurs à celui de la réduction du superoxyde ($E_{pc} = 0,63$ V). La coordination d'un thiolate et de deux amidos au nickel abaisse donc suffisamment le potentiel du couple Ni^{III}/Ni^{II} pour permettre une catalyse de type SOD, ce qui n'est pas le cas lorsqu'un seul amido est coordonné.^{10,11}

La coordination *S*, qui implique deux thiolates et deux amidos, conduit au potentiel d'oxydation le plus faible ($E_{pc} = 0,22$ V). Ce résultat est en accord avec la coordination d'un thiolate à la place d'une amine dans la coordination *N*, qui augmente la densité électronique sur le centre métallique, facilitant ainsi son oxydation. Toutefois, ce potentiel est relativement éloigné de celui obtenu pour le complexe modèle $NiSOD^{M1}-Ac$ décrit dans la littérature et possédant une coordination similaire avec deux thiolates et deux amidos pour le Ni^{II} ($E_{pc} = 0,06$ V).^{30,31} Cette différence peut s'expliquer par la présence

d'une histidine dans NiSOD^{M1}-Ac. En stabilisant l'état oxydé Ni^{III} avec la coordination de l'imidazole, le potentiel d'oxydation du Ni^{II} est alors abaissé, comme observé précédemment. Le rôle de l'histidine n'est donc pas négligeable pour ajuster le potentiel redox du couple Ni^{III}/Ni^{II}.

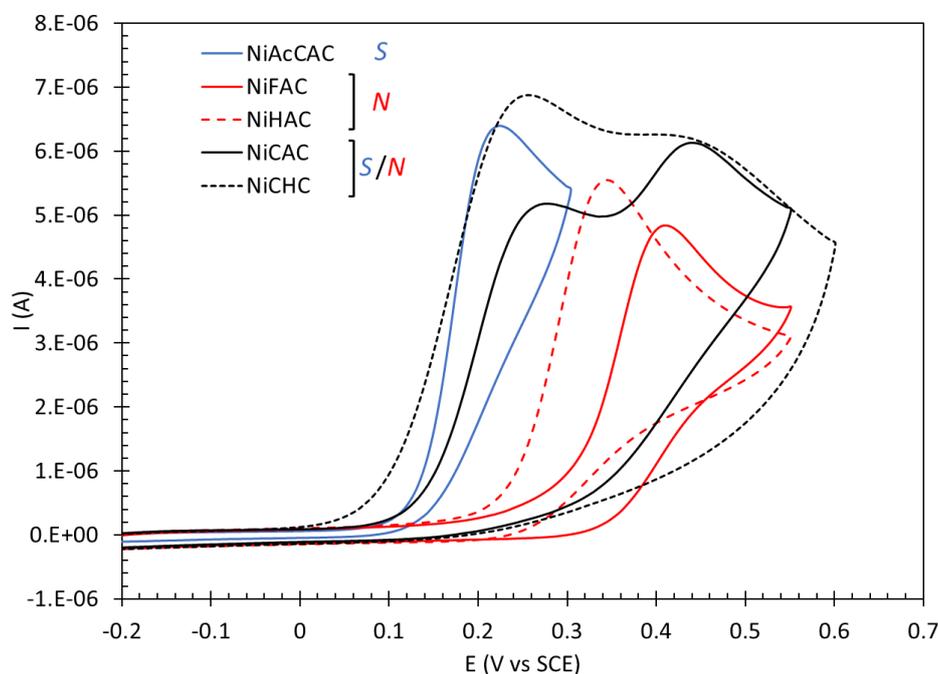


Figure 51. CVs des complexes NiAcCAC (438 μM), NiFAC (425 μM), NiHAC (510 μM), NiCAC (548 μM), NiCHC (698 μM), à 50 mV/s, dans tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Electrode de travail : carbone vitreux, électrode de référence : SCE.

Les CVs pour NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC, qui existent sous les deux coordinations *N* et *S*, présentent toutes deux oxydations irréversibles. Les potentiels sont très similaires entre eux et correspondent aux oxydations observées avec NiAcCAC (coordination *S*) et NiFAC (coordination *N*), en accord avec l'équilibre *S/N*. Cet équilibre entre les deux formes peut être directement observé en faisant varier la vitesse de balayage. Les résultats obtenus pour NiCHC sont présentés dans la Figure 52. On remarque que plus la vitesse de balayage est faible, plus l'intensité de la première vague est importante. En effet, au cours de la première oxydation, seul le complexe *S*-NiCHC réagit. Néanmoins, pendant cette première vague, le complexe *N*-NiCHC a le temps de changer de coordination en *S*-NiCHC (retour à l'équilibre de la solution) qui va pouvoir s'oxyder à son tour. Ainsi, la vague correspondant à la coordination *S* augmente, entraînant la diminution de la deuxième vague liée à l'oxydation du complexe avec la coordination *N* ; l'effet étant d'autant plus important que la vitesse de balayage est faible.

De manière surprenante, l'histidine n'a que peu, voire pas, d'influence sur les potentiels redox des deux coordinations (Tableau 16). Il est donc possible que l'histidine ait plus de difficultés à se coordonner sur ces complexes que sur NiHAC, ce qui n'est pas observé par calculs DFT.

Tableau 16. Potentiels redox pour les différents complexes.

	NiAcCAC	NiFAC	NiHAC	NiCAC	NiCE(H)C	NiCHC
E_{pa1} (V)	0,22	-	-	0,28	0,29	0,26
E_{pa2} (V)	-	0,41	0,34	0,45	0,48	0,43

On remarquera que tous les potentiels d'oxydation des complexes avec la coordination S sont inférieurs à celui du complexe $NiL^{35}(OH)$ décrit dans le Chapitre II et dans lequel trois thiolates et un hydroxyde sont coordonnés. Les amidos ont donc aussi un rôle important pour abaisser le potentiel redox du couple Ni^{III}/Ni^{II} .

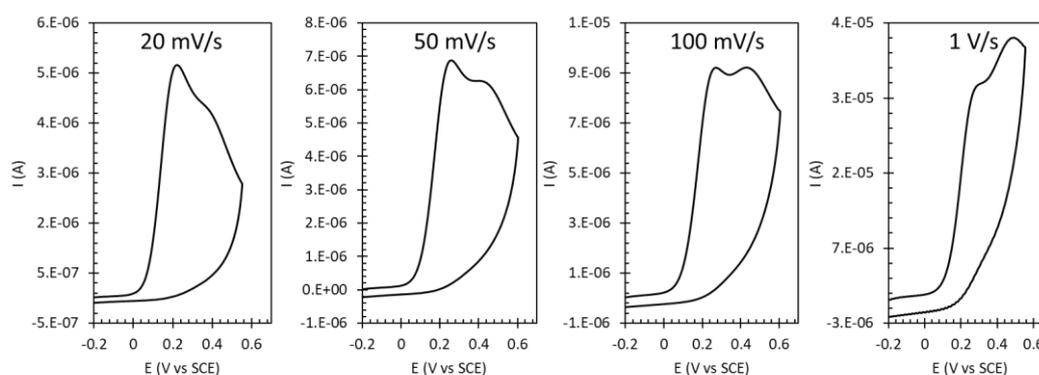


Figure 52. CV du complexe NiCHC (698 μM) à différentes vitesses de balayage dans tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, $[NaCl] = 100$ mM). Electrode de travail : carbone vitreux, électrode de référence : SCE.

5.2. Stabilité des complexes à l'air

Afin d'obtenir davantage d'informations sur les propriétés redox des complexes, la stabilité des complexes exposés à l'air à pH physiologique a été évaluée par spectroscopie UV-Vis. Tous les complexes présentent une diminution de l'intensité des bandes de transfert de charge en fonction du temps, certainement causée par l'oxydation des sulfures conduisant à la formation de ponts disulfures non coordonnants. Le complexe le plus stable est NiFAC, avec une absorbance constante pendant plus de 24h. Étonnamment, NiHAC est moins stable et l'absorbance diminue après 1,5 h. Le complexe NiAcCAC se dégrade, quant à lui, après 6h d'exposition. Les complexes NiCAC, NiCE(H)C et NiCHC sont stables pendant environ 1 h, NiCHC se dégradant plus rapidement que les deux autres.

Les solutions de complexes peuvent donc être exposées à l'air pendant un court instant sans risque de dégradation.

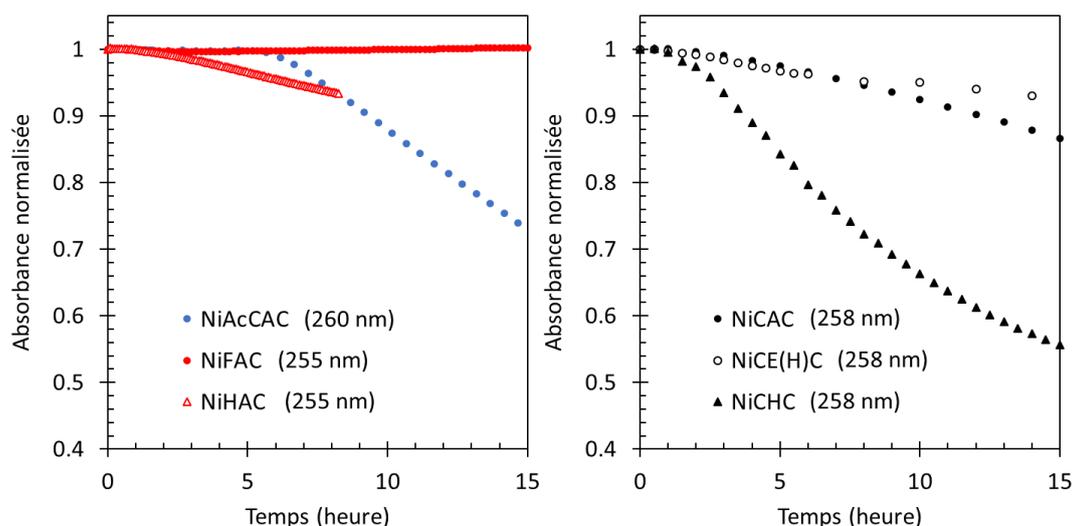


Figure 53. Evolution de l'absorbance des complexes (20-50 μM) dans une cuve UV exposée à l'air, sans agitation.

6. Activité catalytique

6.1. Détermination de l' IC_{50}

L'activité du complexe $\text{NiSOD}^{\text{M1}}\text{-Ac}$ a été déterminée par le test à la Xanthine Oxydase (XO) développé par McCord et Fridovich, décrit dans la partie 4.5.1 du Chapitre II.^{30,32} Pour $\text{NiSOD}^{\text{M1}}\text{-Ac}$ une IC_{50} d'environ 30 μM est obtenue.³⁰ Le complexe NiAcCAC ayant une coordination similaire, le même test a été utilisé pour comparer leurs activités avec le superoxyde.

Rappel : Dans ce test, le superoxyde est produit de manière continue par la XO et réagit avec le chlorure de *para*-nitrobleu tetrazolium (NBT) pour générer du formazan ($\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$ ($\epsilon \approx 35\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)). L' IC_{50} d'une SOD ou d'un modèle est alors définie comme la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la formation de formazan.

L'étude de l'activité de NiAcCAC a été effectuée à pH physiologique (pH 7,4). Les résultats montrent que le complexe NiAcCAC possède effectivement une activité de type SOD (Figure 54). Différentes concentrations de complexe ont été utilisées (1-6 μM), et par extrapolation, une IC_{50} de 1,6 μM est obtenue. Ce résultat confirme qu'une activité SOD peut être obtenue avec cette sphère de coordination comportant deux thiolates et deux amidos. Par ailleurs, l' IC_{50} est proche de celle obtenue avec $\text{NiL}^{\text{35}}(\text{OH}_2)$ présenté dans le Chapitre II pour lequel le nickel est coordonné par trois thiolates et une molécule d'eau.

NiAcCAC est donc 20 fois plus actif que NiSOD^{M1}-Ac tout en ayant la même coordination avec deux amidos et deux thiolates, et sans histidine pour stabiliser le Ni^{III}. Ce résultat est surprenant et peut venir d'une différence de stabilité entre ces deux complexes. En effet, NiAcCAC est stable plusieurs heures après exposition à l'oxygène, tandis que NiSOD^{M1}-Ac se décompose rapidement.³¹

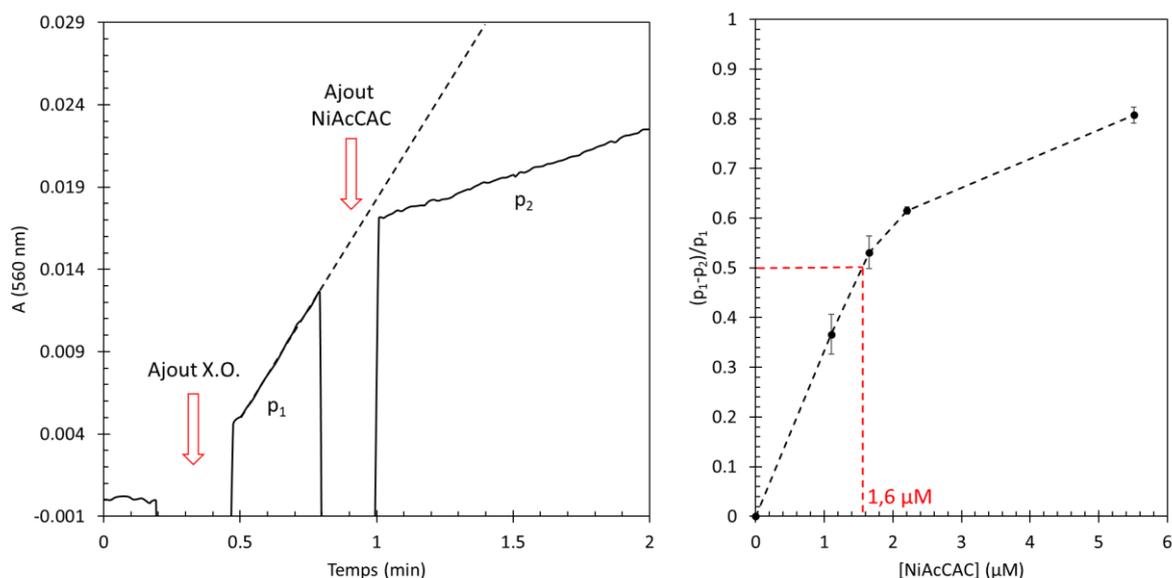


Figure 54. Gauche : Suivi de l'absorbance à 560 nm. [Xanthine] = 50 μM, [NBT] = 100 μM, [NiAcCAC] = 5,5 μM, [NaCl] = 100 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4. Droite : détermination de l'IC₅₀.

Les expériences ont aussi été réalisées avec NiCAC et NiCE(H)C. Pour ces deux complexes, une meilleure activité de type SOD est obtenue, les IC₅₀ étant de 0,8 μM (les déterminations des IC₅₀ sont représentées dans l'Annexe III.9). Ces complexes ont donc des activités identiques, mais environ deux fois plus importante que NiAcCAC.

6.2. Stopped-Flow

Dans le but de prouver l'activité de NiAcCAC en conditions catalytiques, de nouvelles mesures de Stopped-Flow ont été réalisées (le principe et l'appareil sont détaillés dans la partie 5.6.1 du Chapitre II).³³ Dans cette méthode, le superoxyde dissous dans le DMSO est mélangé à une solution de SOD ou de modèle dans l'eau, et la dismutation du superoxyde est suivie par spectroscopie UV-Vis. Afin de ralentir l'autodismutation du superoxyde dans l'eau, les mesures ont été réalisées à pH 8,1.³⁴

Comme décrit dans le Chapitre II, la dismutation non catalysée du superoxyde conduit à une réaction d'ordre 2 dont la constante de vitesse a été mesurée à $3(1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans les conditions d'expérience. Cette valeur est proche de celle décrite dans la littérature à ce pH ($\approx 4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).³⁵ L'ajout du complexe NiAcCAC en conditions catalytiques conduit à des réactions plus rapides avec un changement d'ordre de réaction (Figure 55). En effet, en présence d'un catalyseur, la vitesse de

réaction est de pseudo ordre 1. De plus, le spectre UV-Visible de NiAcCAC est similaire avant et après catalyse dans des conditions où le rapport $[O_2^{\bullet-}]/[NiAcCAC]$ est de 25, démontrant la stabilité du complexe au cours de la catalyse. Un TON supérieur à 25 est déterminé. Les mesures effectuées à différentes concentrations de complexe permettent de déterminer la constante de vitesse $k_{cat} = 5,1(3) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ce résultat est d'autant plus intéressant que NiSOD^{M1}-Ac ne montre pas d'activité de type SOD par Stopped-Flow.³¹ La constante obtenue est néanmoins plus faible que celle décrite pour NiSOD^{M1}, un peptide basé sur les douze premiers acides aminés de la NiSOD ($k_{cat} = 7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).³⁶

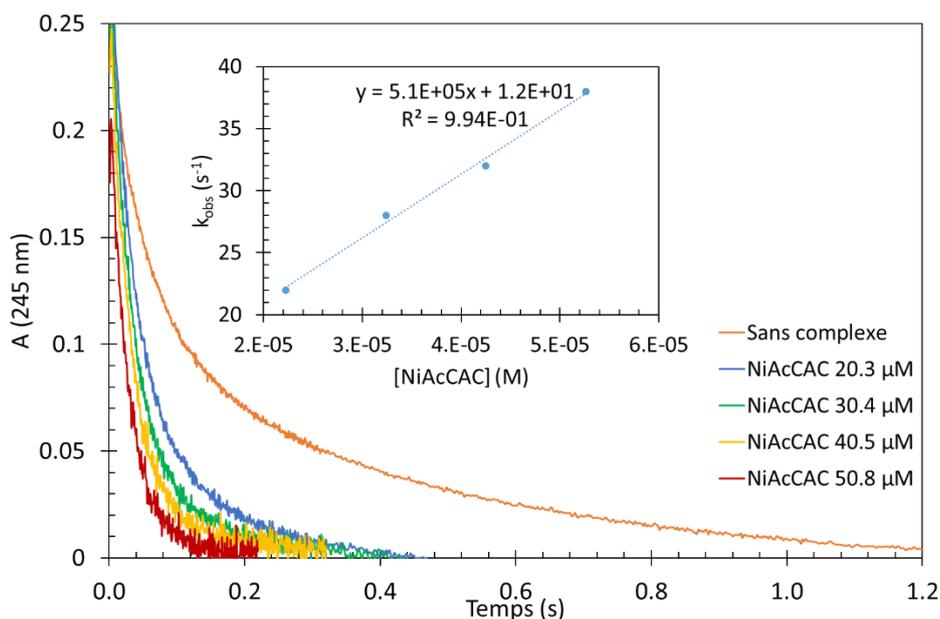


Figure 55. Suivi de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ (0,48 mM) par spectroscopie UV-Vis, sans et avec NiAcCAC à différentes concentrations. Encadré : détermination de k_{cat} .

Les analyses Stopped-Flow pour NiFAC dans les mêmes conditions conduisent aussi à une activité catalytique (Annexe III.10). Malgré la coordination d'un seul thiolate et une valeur de potentiel d'oxydation du Ni^{II} excentrée, la constante de vitesse est plus élevée : $k_{cat} = 8,4(2) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et un TON supérieur à 45 est obtenu. La stabilité des complexes étant identique sur cette durée d'expérience, la différence doit venir d'un autre facteur, comme la charge globale du complexe ou la seconde sphère de coordination. NiAcCAC possède une charge négative de -2, tandis que NiFAC a une charge de -1. Il y aura donc moins de répulsions électrostatiques avec l'anion superoxyde pour ce dernier complexe, ce qui peut expliquer une meilleure activité. Le superoxyde peut aussi interagir avec les différents groupements coordonnés au nickel (cf Chapitre I). Le remplacement d'un thiolate par une amine peut modifier ces interactions et donc l'activité du complexe.

Avec NiHAC, la constante de vitesse est légèrement plus élevée que pour NiFAC : $k_{cat} = 1,4(1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Annexe III.10). Ce résultat confirme les résultats obtenus dans la littérature et montre

l'importance de l'histidine pour optimiser l'activité catalytique, même avec une coordination différente de celle de l'enzyme.²⁸

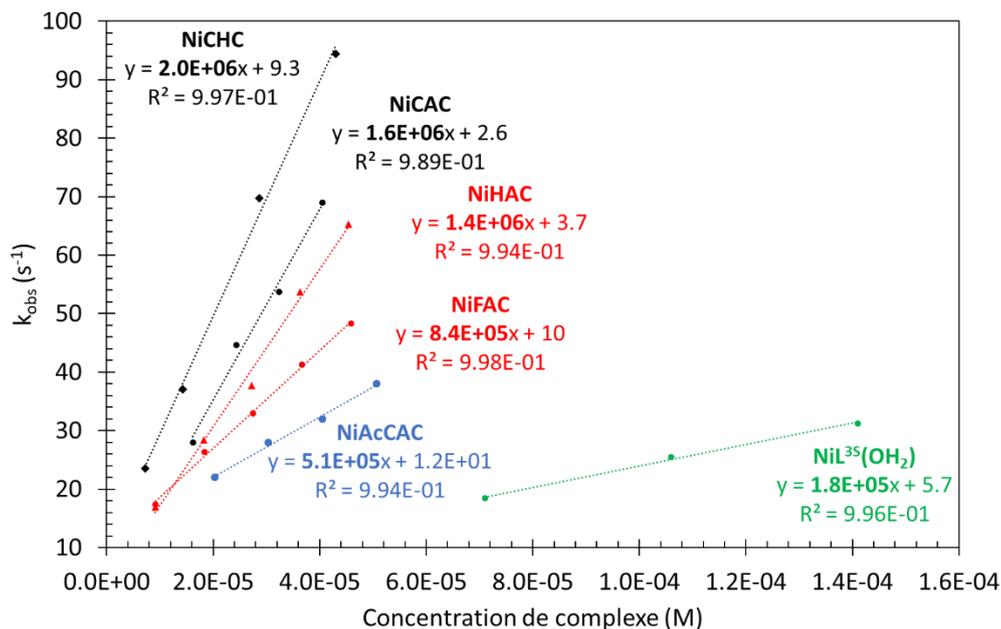


Figure 56. Comparaison de l'activité SOD catalytique des différents complexes.

Pour NiCAC, alors que nous aurions pu nous attendre à obtenir une activité intermédiaire entre celles obtenues avec les complexes de coordinations S et N, celui-ci est deux fois plus actif que NiFAC, et trois fois plus actif que NiAcCAC : $k_{cat} = 1,6(1).10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figure 56, Annexe III.10), ce qui est en accord avec les résultats du test à la Xanthine Oxydase. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Dans les conditions expérimentales utilisées, la coordination S est majoritaire, et la charge globale du complexe est de -1, il y aura donc moins de répulsion entre le superoxyde et NiCAC qu'avec NiAcCAC. Par ailleurs, dans l'une ou l'autre des coordinations, un groupement protique se trouve à proximité du centre métallique (ammonium ou thiol) et est susceptible d'intervenir dans des liaisons hydrogènes avec le substrat pour stabiliser les intermédiaires réactionnels.

Une constante de vitesse très proche est obtenue pour NiCE(H)C : $k_{cat} = 1,40(1) .10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ce résultat confirme l'observation faite avec le test précédent, et les activités similaires de NiCE(H)C et NiCAC (Annexe III.10). L'histidine n'a donc pas d'influence sur la catalyse dans ce complexe. Celle-ci doit donc être trop éloignée du nickel pour permettre de stabiliser l'état oxydé, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par électrochimie.

L'activité la plus élevée est obtenue avec NiCHC avec un TON supérieur à 80 ($k_{cat} = 2,0(1).10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Figure 56, Figure 57). Cependant, l'effet de l'histidine est plus faible qu'entre NiFAC et NiHAC puisque l'activité n'est que peu augmentée par rapport à NiCAC. Ce résultat est aussi en accord avec

l'étude des propriétés redox des complexes et l'incapacité de l'histidine à diminuer les potentiels redox du complexe NiCHC. La géométrie du complexe doit donc empêcher l'imidazole de coordonner ou de stabiliser efficacement le Ni^{III}.

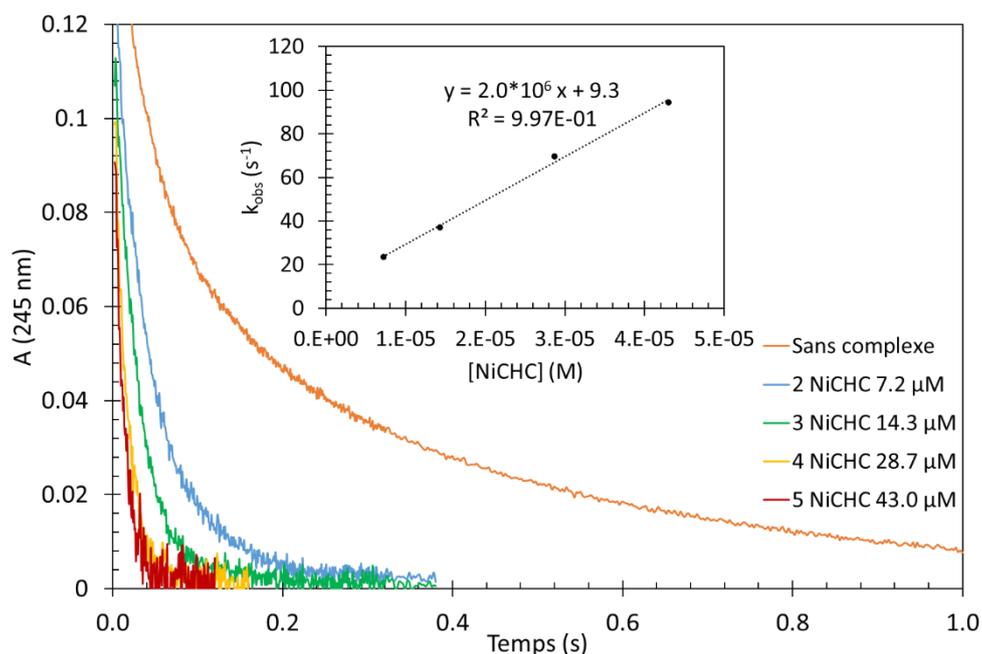


Figure 57. Suivi de la dismutation de O₂^{•-} (0,58 mM) par spectroscopie UV-Vis, sans et avec NiCHC à différentes concentrations. Encadré : détermination de k_{cat}.

Globalement, les différents complexes peuvent être classés en trois groupes en fonction de leur activité (Tableau 17) :

- NiAcCAC, coordination S, qui est le moins actif,
- NiFAC, coordination N,
- NiCAC, NiCE(H)C, NiCHC (coordination S et N), NiHAC (coordination N).

Tableau 17. Constantes de vitesse obtenues pour les différents complexes.

Complexe	NiAcCAC	NiFAC	NiHAC	NiCAC	NiCE(H)C	NiCHC
Coordination	S	N	N	S/N	S/N	S/N
k _{cat} (M ⁻¹ s ⁻¹)	5,1(3).10 ⁵	8,4(2).10 ⁵	1,4(1).10 ⁶	1,6(1).10 ⁶	1,40(1).10 ⁶	2,0(1).10 ⁶

7. Discussion et conclusion

Tous les ligands étudiés dans ce chapitre conduisent à des complexes mononucléaires de Ni^{II} dans des conditions stœchiométriques. La structure des complexes avec la coordination *N* (NiFAC et NiHAC) est similaire à celle obtenue avec le motif ATCUN, avec la coordination de l'amine terminale, de deux amidos et de la chaîne latérale du troisième acide aminé, un thiolate dans notre cas. La coordination *S*, obtenue en acétylant l'amine terminale (NiAcCAC), permet la coordination des deux amidos et des deux thiolates. Enfin, les peptides CAC, CE(H)C et CHC, dont le premier acide aminé est une cystéine avec l'amine terminale non protégée, entraînent un équilibre indépendant du pH entre les deux formes *S* ($\approx 75\%$) et *N* ($\approx 25\%$) à température ambiante. Cet équilibre montre des stabilités très proches pour ces deux coordinations.

La coordination de deux amidos et d'un thiolate au nickel est suffisante pour abaisser le potentiel d'oxydoréduction du couple Ni^{III}/Ni^{II} entre ceux de O₂^{•-}/H₂O₂ et O₂/O₂^{•-}, et donc pour permettre une activité de type SOD. La présence d'une histidine en première position (NiHAC), comme dans la NiSOD, est efficace pour abaisser le potentiel d'oxydation du Ni^{II} et donc pour faciliter l'accès au Ni^{III}. Cependant, elle n'a que peu ou pas d'effet lorsqu'elle est éloignée du centre métallique (NiCE(H)C) ou lorsqu'elle est en deuxième position (NiCHC), et les potentiels redox des complexes correspondants sont inchangés.

Tous les complexes obtenus conduisent à une activité catalytique pour la dismutation du superoxyde. Le complexe avec la coordination *S* est le moins actif malgré son potentiel redox qui est le plus proche de la valeur idéale. Avec la coordination *N*, les complexes ont une meilleure activité. Ce résultat peut provenir d'une charge du complexe moins négative. La présence de l'histidine en première position permet d'améliorer l'activité en facilitant l'accès à l'état oxydé Ni^{III} pendant le cycle catalytique, comme observé par électrochimie. Cet effet, qui a déjà été montré dans des complexes peptidiques avec une sphère de coordination du nickel identique à celle de l'enzyme, est donc préservé avec des sphères de coordination différentes.²⁸

Les complexes qui sont en équilibre entre les deux coordinations *N* et *S* conduisent aux constantes de vitesse les plus élevées. Ces activités supérieures peuvent provenir d'effets de seconde sphère, avec la possibilité d'avoir des relais de protons impliquant le thiol (coordination *N*, Schéma 34, gauche) ou l'ammonium (coordination *S*, Schéma 34, droite) qui ne sont alors pas coordonnés. L'introduction d'une histidine dans les ligands ne permet pas d'améliorer l'activité de manière significative, suggérant que l'histidine est mal positionnée pour stabiliser l'état oxydé des complexes. On notera aussi que toutes les constantes de vitesse obtenues sont relativement proches, avec seulement une différence d'un facteur 4 entre les complexes le plus et le moins actif.

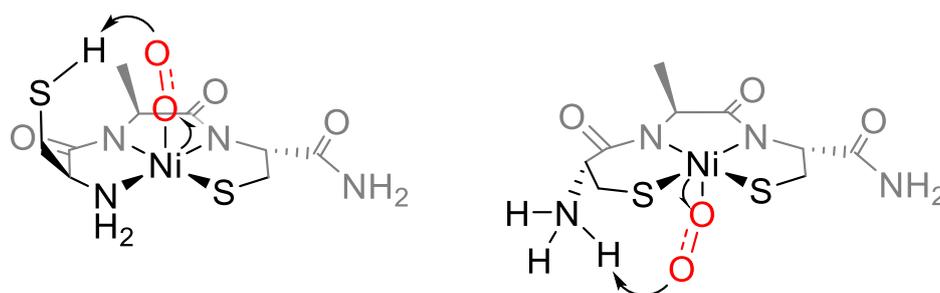


Schéma 34. Propositions de mécanisme pour la dismutation du superoxyde catalysée par NiCAC.

Comme dans le Chapitre II, ces résultats confirment que des complexes ayant une sphère de coordination différente de l'enzyme peuvent conduire à des activités catalytiques de type SOD et ouvrent la voie à l'étude de nouveaux complexes pour comprendre le fonctionnement de l'enzyme.

Afin de comprendre les différences d'activité observées, d'autres peptides peuvent être synthétisés pour obtenir des informations complémentaires. Un peptide dérivé de CAC avec un groupement protique différent du thiol, pouvant également jouer le rôle de relais de protons, pourrait être synthétisé, par exemple H-Ser-Ala-Cys-NH₂ (Schéma 35). De même, en alkylant l'amine terminale de CAC, il serait possible d'obtenir uniquement une coordination S avec une charge globale pour le complexe de -1. De plus, ce complexe ne posséderait pas de relais de protons, ce qui permettrait de mettre en évidence l'influence de ce dernier (Schéma 35).

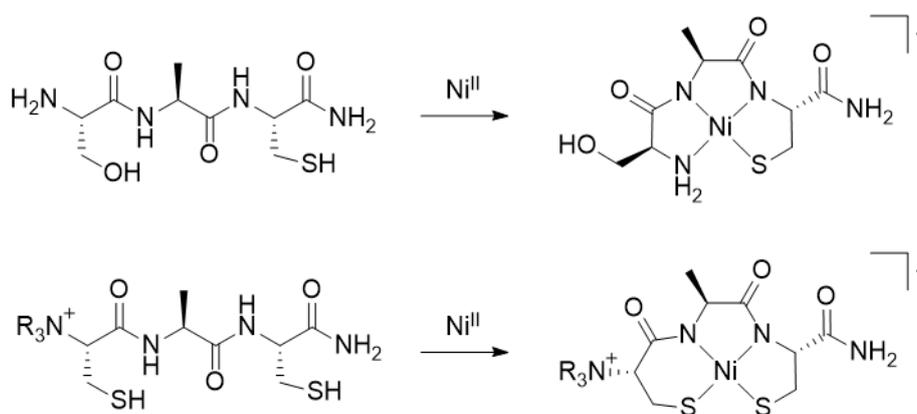


Schéma 35. Nouveaux ligands et complexes pouvant être synthétisés et étudiés.

Enfin, pour mieux comprendre le rôle de l'imidazole intramoléculaire, des études complémentaires en électrochimie et en catalyse pourraient être effectuées sur NiCAC et NiCHC en présence d'un excès d'imidazole. Si un abaissement du potentiel redox ou une meilleure activité catalytique est observée, cela voudra dire que la position de l'imidazole intramoléculaire n'est pas compatible avec sa coordination au Ni^{II}.

En effet, dans la coordination *N*, une interaction entre le thiolate et le superoxyde coordonné au nickel empêcherait l'imidazole de se coordonner au métal (Schéma 36, haut gauche), mais ce n'est pas le cas avec la coordination *S* qui est majoritaire en solution (Schéma 36, haut droit). L'étude du peptide équivalent avec une D-histidine pourrait apporter un premier élément de réponse : l'imidazole se trouverait alors de l'autre côté du plan et pourrait stabiliser l'intermédiaire dans la coordination *N* (Schéma 36, bas gauche) mais pas dans la coordination *S* (Schéma 36, bas droit). Un changement d'activité catalytique indiquerait donc une inversion de coordination entre l'état réduit et l'état oxydé pendant la catalyse.

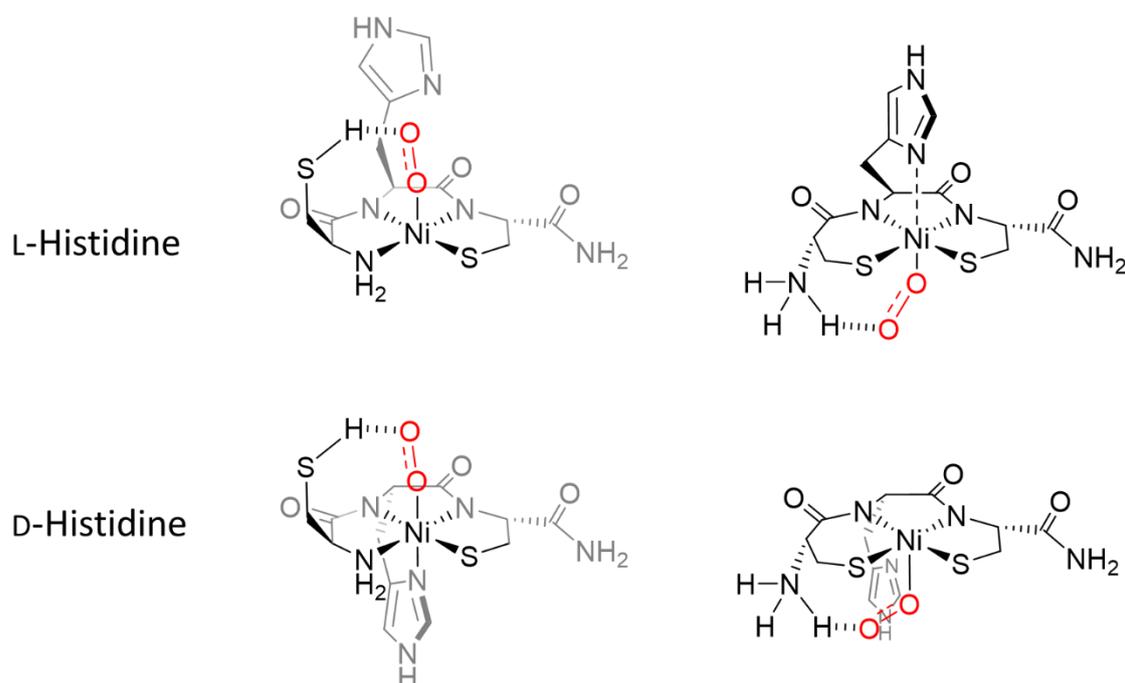


Schéma 36. Propositions d'intermédiaires réactionnels entre NiCHC (L-Histidine ou D-Histidine) en coordination *N* (gauche) ou *S* (droite) et le superoxyde.

L'étude du mécanisme et l'identification d'intermédiaires réactionnels sont essentielles pour répondre à ces questions, notamment en déterminant si le mécanisme a lieu en sphère interne avec la coordination du superoxyde au nickel, ou sphère externe grâce à des interactions avec des groupements protiques. Pour cela, un passage en milieu organique est nécessaire afin de réduire drastiquement le nombre de protons dans le solvant et ainsi de piéger des intermédiaires.

8. Références

1. C. Harford, B. Sarkar. Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30 (3), 123–130.
2. T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, E. Farkas, I. Sóvágó. Nickel Ion Complexes of Amino Acids and Peptides. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*; John Wiley & Sons, Ltd, **2007**; pp 63–107.
3. K. Cherifi, B.D.-L. Reverend, C. Loucheux, et al. Transition metal complexes of L-cysteine containing Di- and tripeptides. *J. Inorg. Biochem.* **1990**, 38 (1), 69–80.
4. H. Kozłowski, B.D.-L. Révérend, D. Fichoux, C. Loucheux, I. Sovago. Nickel(II) complexes with sulfhydryl containing peptides. potentiometric and spectroscopic studies. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, 29 (3), 187–197.
5. K.P. Neupane, A.R. Aldous, J.A. Kritzer. Metal-binding and redox properties of substituted linear and cyclic ATCUN motifs. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, 139, 65–76.
6. J.D. Van Horn, G. Bulaj, D.P. Goldenberg, C.J. Burrows. The Cys-Xaa-His metal-binding motif: {N} versus {S} coordination and nickel-mediated formation of cysteinyl sulfinic acid. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 8 (6), 601–610.
7. K. Kulon, D. Woźniak, K. Wegner, Z. Grzonka, H. Kozłowski. Specific interactions of metal ions with Cys-Xaa-Cys unit inserted into the peptide sequence. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, 101 (11), 1699–1706.
8. R. Krishnan, C.G. Riordan. Cys-Gly-Cys Tripeptide Complexes of Nickel: Binuclear Analogues for the Catalytic Site in Acetyl Coenzyme A Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (14), 4484–4485.
9. K.P. Neupane, J. Shearer. The Influence of Amine/Amide versus Bisamide Coordination in Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (26), 10552–10566.
10. C.S. Mullins, C.A. Grapperhaus, B.C. Frye, et al. Synthesis and Sulfur Oxygenation of a (N3S)Ni Complex Related to Nickel-Containing Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (21), 9974–9976.
11. R.M. Jenkins, M.L. Singleton, E. Almaraz, J.H. Reibenspies, M.Y. Darensbourg. Imidazole-Containing (N3S)-Ni(II) Complexes Relating to Nickel Containing Biomolecules. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (15), 7280–7293.
12. R.B. Merrifield. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.
13. P.W. Riddles, R.L. Blakeley, B. Zerner. Reassessment of Ellman's reagent. In *Methods in Enzymology*; Enzyme Structure Part I; Academic Press, **1983**; Vol. 91, pp 49–60.
14. A. Cotton, G. Wilkinson, C. Murillo, M. Bochmann. The Chemistry of the Transition Elements. *Advanced Inorganic Chemistry*; Wiley, **1999**.
15. M. Suzuki, Y. Nishida. A CD spectral study of square planar copper(II) and nickel(II) complexes containing optically Active N,N,N',N'-tetramethyl(R)-propylenediamine and various bidentate ligands. *Inorganica Chim. Acta* **1977**, 25, 185–190.
16. H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—I: Mathematical considerations. *Talanta* **1985**, 32 (2), 95–101.
17. H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—II: Specfit: two user-friendly programs in basic and standard fortran 77. *Talanta* **1985**, 32 (4), 257–264.
18. H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—III: Model-free analysis of spectrophotometric and ESR titrations. *Talanta* **1985**, 32 (12), 1133–1139.

19. P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler, H. Vahrenkamp. Solution behaviour and zinc complexation of tripeptides with cysteine and/or histidine at both termini. *Inorganica Chim. Acta* **1998**, 272 (1), 115–124.
20. M. Rowinska-Zyrek, D. Valensin, L. Szyrwił, Z. Grzonka, H. Kozłowski. Specific interactions of Bi(III) with the Cys-Xaa-Cys unit of a peptide sequence. *Dalton Trans.* **2009**, No. 42, 9131–9140.
21. P. Gockel, H. Vahrenkamp. Zinc Complexes of Amino Acids and Peptides, 8[.]. Difunctional Dipeptides Containing Cysteine or Histidine: Solution Behavior and Zinc Complexation. *Chem. Ber.* **1996**, 129 (10), 1243–1249.
22. C. Harford, B. Sarkar. Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30 (3), 123–130.
23. G.J. Colpas, M.J. Maroney, Csaba. Bagyinka, et al. X-ray spectroscopic studies of nickel complexes, with application to the structure of nickel sites in hydrogenases. *Inorg. Chem.* **1991**, 30 (5), 920–928.
24. J. Shearer, A. Dehestani, F. Abanda. Probing Variable Amine/Amide Ligation in Ni(II)N2S2 Complexes Using Sulfur K-Edge and Nickel L-Edge X-ray Absorption Spectroscopies: Implications for the Active Site of Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2008**, 47 (7), 2649–2660.
25. J. Shearer, N. Zhao. [Me4N](Ni(II)(BEAAM)): A Synthetic Model for Nickel Superoxide Dismutase That Contains Ni in a Mixed Amine/Amide Coordination Environment. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (24), 9637–9639.
26. D.P. Barondeau, C.J. Kassmann, C.K. Bruns, J.A. Tainer, E.D. Getzoff. Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry* **2004**, 43 (25), 8038–8047.
27. A.T. Fiedler, P.A. Bryngelson, M.J. Maroney, T.C. Brunold. Spectroscopic and Computational Studies of Ni Superoxide Dismutase: Electronic Structure Contributions to Enzymatic Function. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (15), 5449–5462.
28. K.P. Neupane, K. Gearty, A. Francis, J. Shearer. Probing Variable Axial Ligation in Nickel Superoxide Dismutase Utilizing Metallopeptide-Based Models: Insight into the Superoxide Disproportionation Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (47), 14605–14618.
29. J. Shearer, K.P. Neupane, P.E. Callan. Metallopeptide Based Mimics with Substituted Histidines Approximate a Key Hydrogen Bonding Network in the Metalloenzyme Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (22), 10560–10571.
30. K.P. Neupane, J. Shearer. The Influence of Amine/Amide versus Bisamide Coordination in Nickel Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (26), 10552–10566.
31. J. Shearer. Dioxygen and superoxide stability of metallopeptide based mimics of nickel containing superoxide dismutase: The influence of amine/amido vs. bis-amido ligation. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 129, 145–149.
32. C. Beauchamp, I. Fridovich. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1971**, 44 (1), 276–287.
33. D.P. Riley, W.J. Rivers, R.H. Weiss. Stopped-flow kinetic analysis for monitoring superoxide decay in aqueous systems. *Anal. Biochem.* **1991**, 196 (2), 344–349.
34. F.C. Friedel, D. Lieb, I. Ivanović-Burmazović. Comparative studies on manganese-based SOD mimetics, including the phosphate effect, by using global spectral analysis. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 109, 26–32.
35. B.H.J. Bielski. Reevaluation of the Spectral and Kinetic Properties of HO₂ and O₂⁻ Free Radicals. *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28 (4–5), 645–649.
36. J. Shearer. Insight into the Structure and Mechanism of Nickel-Containing Superoxide Dismutase Derived from Peptide-Based Mimics. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (8), 2332–2341.

Chapitre IV.
Etude mécanistique en
milieu organique

Chapitre IV. Etude mécanistique en milieu organique

Les études réalisées dans les Chapitres II et III ont permis d'obtenir de nouveaux complexes de nickel présentant une activité catalytique de type SOD. Les expériences ayant été réalisées en solutions aqueuses, il est impossible d'isoler et de caractériser des intermédiaires réactionnels qui pourraient apporter des informations sur le mécanisme catalytique mis en jeu. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des complexes en milieu organique aprotique, et à leur réactivité avec le superoxyde pour obtenir des informations mécanistiques en tentant de générer et caractériser des intermédiaires réactionnels.

1. Contexte et objectifs

Dans la littérature, seuls des complexes peptidiques possèdent une activité catalytique de type SOD. Certains d'entre eux comportant une sphère de coordination identique à celle de l'enzyme ont pu être caractérisés sous la forme oxydée (Ni^{III}), mais aucun intermédiaire réactionnel avec un dérivé de l'oxygène n'a pu être observé. En effet, du fait de leur activité, les intermédiaires sont instables et difficilement isolables. Pour les modèles synthétiques, exclusivement étudiés en milieu organique, aucun n'est actif en catalyse, ce qui compromet l'identification d'espèces intermédiaires. Par ailleurs, les thiolates sont sujets à l'oxydation, entraînant la dégradation des complexes. Un seul complexe Ni^{II} -superoxo possédant une coordination du nickel similaire à celle observée dans l'enzyme a pu être caractérisé par spectroscopie RPE, UV-Visible et Raman (Figure 58).¹

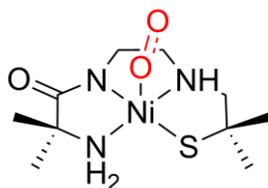
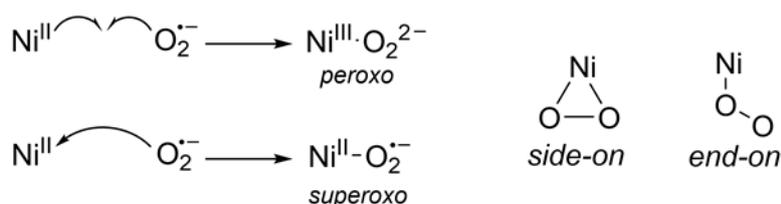
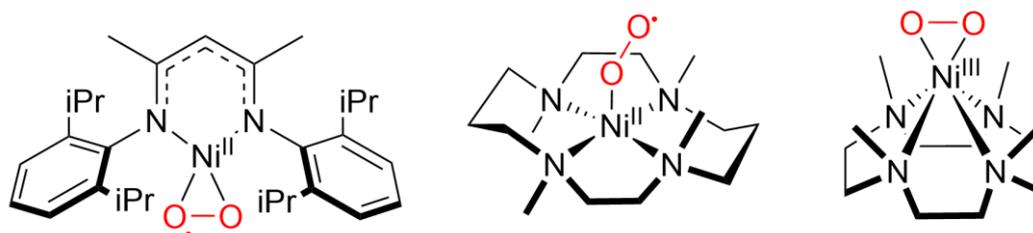


Figure 58. Complexe Ni^{II} -superoxo caractérisé par spectroscopie.¹

De manière plus générale, relativement peu de complexes nickel-superoxo et nickel-peroxo (Schéma 37) ont pu être caractérisés en comparaison avec le fer ou le manganèse, et aucun ne comporte de thiolate.²⁻⁶ Deux types de coordination peuvent être observés : *end-on* et *side-on*, en fonction du ligand utilisé.

Schéma 37. Activation du superoxyde par des complexes de Ni^{II}.

Le premier complexe Ni^{II}-superoxo dont la structure a été déterminée par diffraction des rayons X (DRX) est représenté dans la Figure 59 (gauche) et possède un ligand β-dicétimate, avec une coordination du superoxyde de type *side-on*.⁷ Différents complexes superoxo de type *end-on* ont aussi été caractérisés, mais aucun n'a pu être cristallisé.⁸ Le premier qui fut caractérisé par spectroscopie possède un ligand dérivé du cyclam (Figure 59, milieu). Lorsqu'un dérivé du cyclène est utilisé, le complexe obtenu est un Ni^{III}-peroxyde de type *side-on* (Figure 59, droite).^{2,9}

Figure 59. Complexes Ni^{II}-superoxo *side-on* (gauche),⁷ Ni^{II}-superoxo *end-on* (milieu),⁸ Ni^{III}-peroxyde *side-on* (droite).⁹

La formation de ce type de complexe de nickel est aussi proposée dans la Nature. La quercétinase, qui est une enzyme catalysant la coupure oxydante de la quercétine (cf. Chapitre I), est supposée activer l'oxygène en générant un complexe Ni^{II}-superoxo qui n'a cependant ni été isolé ni caractérisé.¹⁰

L'obtention de complexes de nickel dérivés de l'oxygène est donc un objectif stimulant, notamment dans le cadre de la modélisation de la Ni-SOD. Les modèles possèdent des liaisons nickel-thiolate qui sont connues pour être sensibles aux dérivés de l'oxygène,^{11,12} et le mécanisme réactionnel est toujours inconnu. Ces complexes pourraient notamment confirmer un mécanisme en sphère interne, comme proposé par Nakane *et al.*¹ Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la demi-réaction avec la réduction du superoxyde, et donc à l'interaction du radical avec nos complexes peptidiques de Ni^{II} (cf. Chapitre III). Ces complexes ont des sphères de coordination plus proches de celle de la Ni-SOD que celle du complexe NiL³⁵(OH₂), ainsi qu'une meilleure activité. Il est donc pertinent d'utiliser ces complexes dans le but d'obtenir des informations sur le mécanisme dans l'enzyme.

2. Caractérisation des complexes en phase organique

2.1. Synthèse des complexes

Afin d'empêcher la dismutation du superoxyde, avec ou sans catalyseur, et d'identifier des intermédiaires réactionnels, il est préférable que le milieu soit aprotique. Pour cela, l'acétonitrile a été choisi comme solvant, et la synthèse des complexes a donc dû être adaptée.

Pour contrôler au mieux la stœchiométrie des complexes, une méthode similaire à celle décrite dans les chapitres précédents a été utilisée : les solutions de ligand dans l'eau sont d'abord titrées par le test d'Ellman, puis 0,9 équivalent de Ni^{II} est ajouté.¹³ Les complexes étant anioniques, l'hydroxyde de tétraéthylammonium (NEt₄OH) dont le contre ion est soluble dans l'acétonitrile a été utilisé comme base pour déprotoner le ligand. Après agitation pendant plusieurs heures pour former les complexes (cf. Chapitre III), les solutions sont lyophilisées. Une fois secs, ils sont dissous dans l'acétonitrile. Ces solutions sont filtrées afin d'éliminer le ligand résiduel.

2.2. Caractérisation par spectroscopie

Dans le but de vérifier que les complexes ont bien la même structure en milieu organique qu'en milieu aqueux, ils ont été caractérisés par différentes techniques spectroscopiques.

2.2.1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV-Visible de NiFAC et NiHAC (coordination *N*) dans l'eau (tampon HEPES 20 mM, pH 7,4) et dans l'acétonitrile sont très similaires, avec la présence des bandes de transfert de charge LMCT, et des transitions d-d décrites précédemment pour les deux complexes (Figure 60, les spectres pour NiHAC sont représentés dans l'Annexe IV.1). Pour NiAcCAC (coordination *S*), les spectres sont aussi très proches avec un léger décalage vers une énergie plus basse pour la bande LMCT (266 nm contre 262 nm en milieu aqueux). Les complexes avec les deux coordinations ont donc des structures analogues dans l'eau et dans l'acétonitrile.

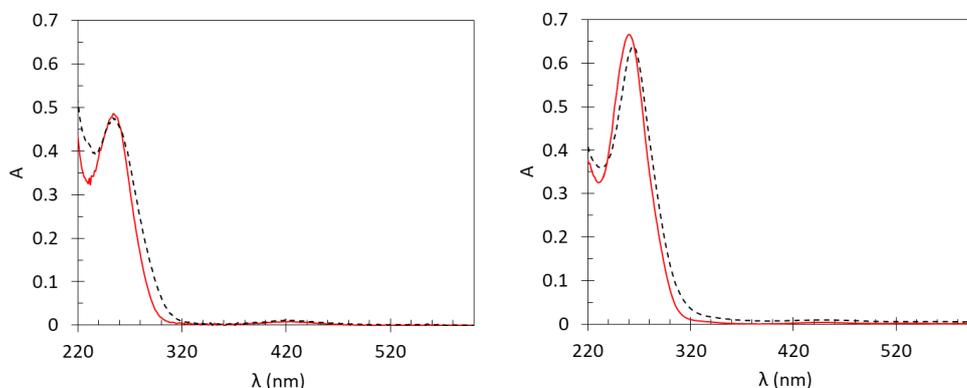


Figure 60. Spectres UV-Visible de NiFAC (30 µM, gauche) et NiAcCAC (25 µM, droite) dans tampon HEPES 20 mM, pH 7,4 (rouge), et dans l'acétonitrile (noir).

2.2.2 Spectroscopie d'absorption des rayons X

Comme précédemment, les complexes NiAcCAC (coordination *S*), NiHAC (coordination *N*) et NiCAC (coordination *N* et *S*) ont été analysés par XAS au seuil K du nickel afin de confirmer leurs sphères de coordination. Les expériences ont été réalisées sur des solutions gelées dans l'acétonitrile à 10 K.

- Spectres XANES :

Les spectres XANES des trois complexes présentent les mêmes transitions qu'en milieu aqueux : la transition $1s(\text{Ni}) \rightarrow 3d(\text{Ni})$ à 8333 eV et la transition $1s(\text{Ni}) \rightarrow 4p_z(\text{Ni})$ à 8337 eV pour NiAcCAC et 8338 eV pour NiHAC et NiCAC (Figure 61). Le Ni^{II} est donc bien dans un environnement plan carré dans les coordinations *N* et *S*.

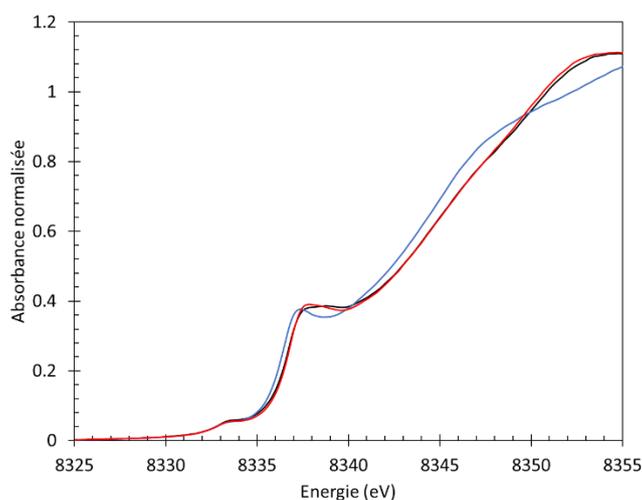


Figure 61. Spectres XANES des complexes NiAcCAC (2,8 mM, bleu), NiCAC (2,1 mM, noir), et NiHAC (2,2 mM, rouge) dans l'acétonitrile à 10 K.

- Spectres EXAFS :

Les analyses pour NiAcCAC ont été effectuées en considérant deux couches d'atomes autour du nickel : une couche de deux soufres pour les thiolates, et une couche de deux azotes pour les amidos. De même, les analyses pour NiHAC ont été réalisées avec trois couches : une pour l'amine, une pour les amidos et une pour le thiolate. Les résultats, présentés dans la Figure 62, le Tableau 18 et le Tableau 19, sont très proches de ceux obtenus avec les complexes en solution aqueuse. Ces analyses confirment une coordination identique pour les complexes dans les deux solvants.

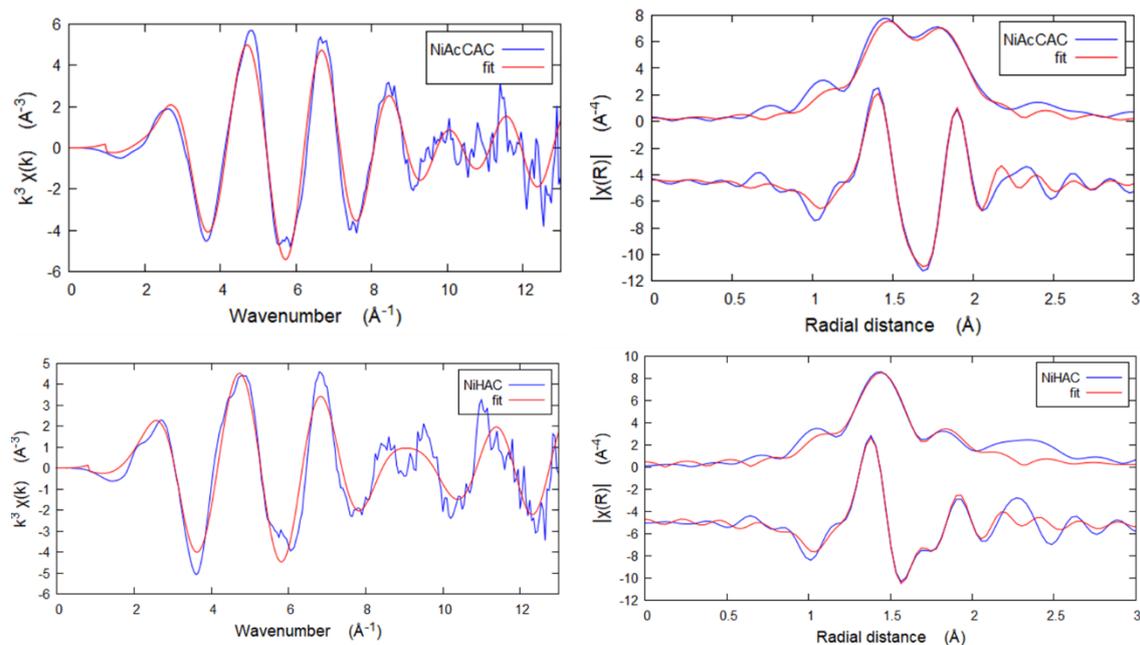


Figure 62. Analyses EXAFS pour NiAcCAC (haut) et NiHAC (bas). Gauche : spectres EXAFS pondérés par k^3 . Droite : transformées de Fourier. Intervalles considérés : $2 < k < 13,5$ et $1 < R < 2,2$.

Tableau 18. Paramètres structuraux pour NiAcCAC obtenus à partir des analyses EXAFS dans l'acétonitrile et dans l'eau/glycérol (80:20).

NiAcCAC	Ni-S		Ni-N		ΔE_0 (eV)	Res (%)		
	R (\AA)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (\AA^2)	R (\AA)			CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (\AA^2)
CH ₃ CN	2,16(1)	2	4(1)	1,87(1)	2	2(1)	3(2)	1.5
H ₂ O/Gly	2,17(1)	2	2(1)	1,88(1)	2	1(1)	4(1)	1.1

Tableau 19. Paramètres structuraux pour NiHAC obtenus à partir des analyses EXAFS dans l'acétonitrile et dans l'eau/glycérol (80:20).

NiHAC	Ni-S			Ni-N			Ni-NH ₂			ΔE_0 (eV)	Res (%)
	R (\AA)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (\AA^2)	R (\AA)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (\AA^2)	R (\AA)	CN	$\sigma^2 \cdot 10^3$ (\AA^2)		
CH ₃ CN	2,16(2)	1	3(2) ^b	1,84(8)	2	3(2) ^b	1,86(7)	1	0,3(40)	2(3)	1,2
H ₂ O/Gly	2,19(3)	1	3(3)	1,85(7)	2	3(3)	1,91(4)	1	0,1(70)	5(4)	4,9

Les spectres XANES et EXAFS de NiCAC ont été analysés par combinaison linéaire des spectres de NiHAC et NiAcCAC enregistrés dans l'acétonitrile. Les résultats montrent une contribution des deux coordinations ($N \approx 85\%$, $S \approx 15\%$), ce qui est en accord avec l'équilibre entre les deux coordinations N et S observé dans le Chapitre III avec un équilibre légèrement plus favorable à la coordination N (voir Annexe IV.2).

Ces analyses permettent d'affirmer que les complexes ont des sphères de coordination identiques dans l'eau et dans l'acétonitrile, et qu'il est donc intéressant d'étudier leurs interactions avec le superoxyde en solvant organique.

3. Interaction avec le superoxyde

Afin de simplifier les études et l'analyse des résultats, les expériences ont été réalisées avec un complexe qui ne présente qu'une seule coordination. Dans le Chapitre III, nous avons montré que le complexe NiFAC (Figure 63, coordination N) est stable à l'air pendant plusieurs heures contrairement à NiAcCAC et NiHAC, ce qui est aussi le cas dans l'acétonitrile. De plus, le groupement phényle dans NiFAC augmente la solubilité du complexe et permet d'obtenir des concentrations relativement élevées (≈ 10 mM), permettant une meilleure détection. Les études ont donc été exclusivement réalisées avec NiFAC.

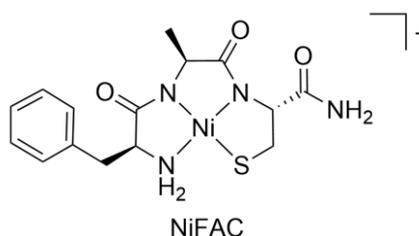


Figure 63. Structure du complexe NiFAC

Pour cette étude, du superoxyde est directement ajouté sur le complexe, et la réaction est suivie par différentes techniques. La source de O_2^\bullet est le superoxyde de potassium (KO_2). Ce sel est très peu soluble dans l'acétonitrile et un éther couronne (18-crown-6) présentant une forte affinité pour le potassium a donc été utilisé pour augmenter sa solubilité dans l'acétonitrile.

3.1. Spectrométrie de masse

Dans le but d'obtenir des informations sur les espèces formées après ajout de KO_2 sur le complexe, des analyses par spectrométrie de masse (ESI-MS) ont été effectuées. Le complexe dans l'acétonitrile est refroidi à $-40^\circ C$ puis un équivalent de superoxyde est ajouté. La solution est ensuite directement gelée dans l'azote liquide, puis dégelée avant injection dans le spectromètre. Le pic majoritaire observé correspond au complexe $[NiFAC]^-$ ($m/z = 393,2$), et on observe aussi un pic à $m/z = 425,1$, correspondant à une espèce $[NiFAC + O_2]$ (voir Annexe IV.3). Malheureusement, la fragmentation de ce second pic conduit à la perte d'un fragment SO_2 ($m/z = 361,1$), suggérant

l'oxydation du thiolate pendant l'injection, et non la formation d'un complexe Ni-peroxo ou superoxo. Ce type d'oxydation a déjà été observé avec des complexes modèles.¹⁴

3.2. Résonance paramagnétique électronique

Comme observé par MS, l'ajout de KO_2 au complexe NiFAC dans l'acétonitrile conduit à l'oxydation du ligand *in fine*. Néanmoins, ce résultat peut provenir de la dégradation d'un intermédiaire réactionnel dans le spectromètre. Afin de le vérifier, les solutions ont été analysées par résonance paramagnétique électronique (RPE). En effet, le complexe Ni^{II} FAC est diamagnétique et par conséquent silencieux en RPE. Par contre, les espèces Ni^{II} -superoxo et Ni^{III} -peroxo sont paramagnétiques ($S = \frac{1}{2}$) et doivent donc présenter une signature RPE.

Afin d'éviter des réactions avec plusieurs équivalents de superoxyde, celui-ci a été ajouté en défaut (0,2 équivalent) à une solution de NiFAC dans l'acétonitrile à $-40\text{ }^\circ\text{C}$ (1 mM) dans le tube RPE. La solution est ensuite immédiatement gelée dans l'azote liquide puis analysée par RPE. Les résultats sont présentés dans la Figure 64.

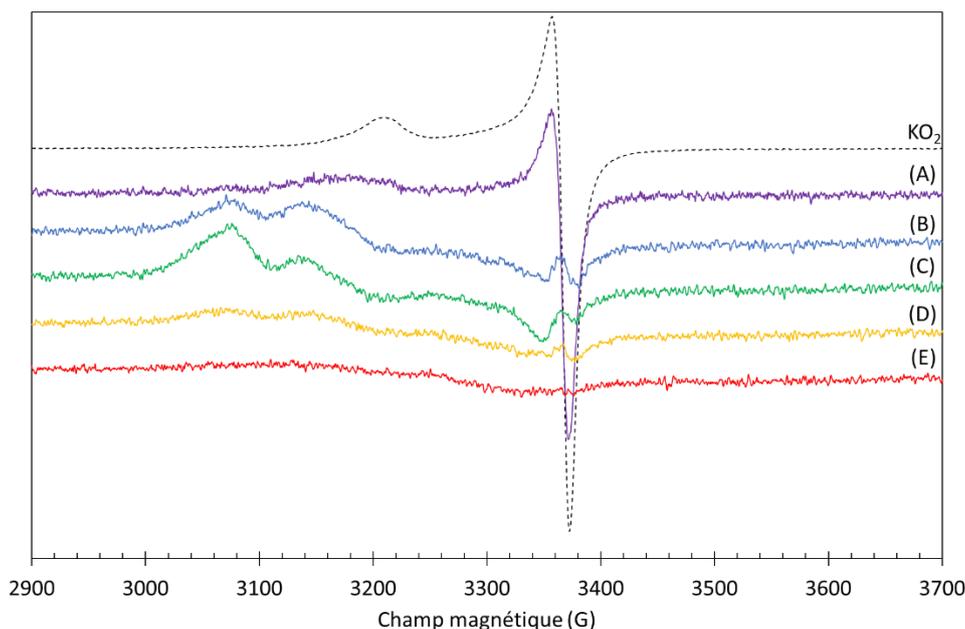


Figure 64. Spectres RPE en bande X à 100 K de KO_2 (0,2 mM), et de NiFAC (1 mM) avec 0,2 éq. de KO_2 à différents temps après mélange à $-40\text{ }^\circ\text{C}$ (A \rightarrow E, ≈ 5 secondes entre deux spectres) dans l'acétonitrile.

Les spectres (A) à (E) ont été enregistrés pour la même solution après différents temps d'évolution à $-40\text{ }^\circ\text{C}$ (≈ 5 secondes entre deux spectres). Le spectre axial de KO_2 en solution dans l'acétonitrile est représenté en pointillés ($g_{\parallel} = 2,10$; $g_{\perp} 2,01$). Le spectre (A) montre une diminution du signal du superoxyde et un décalage de la composante parallèle du tenseur g à 2,14. Ce spectre est très similaire à celui publié pour un complexe Ni^{II} -superoxo de type *end-on* qui a pu être caractérisé

par spectroscopie Raman (Figure 65, B et C).¹ Ce complexe évolue ensuite vers une autre espèce qui présente un spectre rhombique ($g_x = 2,20$; $g_y = 2,15$; $g_z = 2,02$; spectre (C)). Cette nouvelle espèce est également instable et évolue vers un composé silencieux en RPE (spectre (E)).

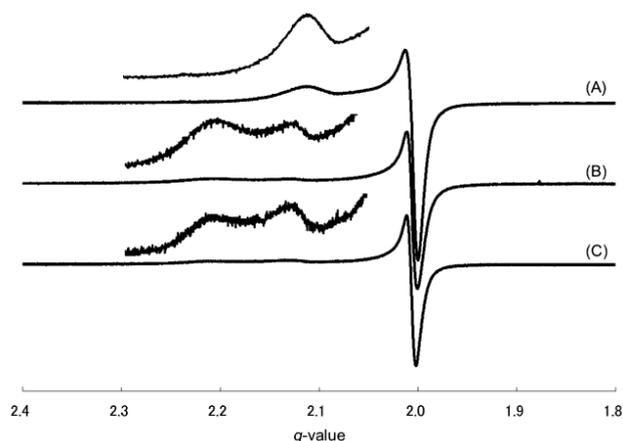


Figure 65. D'après la référence 1. Spectre RPE de (A) KO_2 (DMF), (B) et (C) complexe Ni^{II} -superoxo (acétone/DMF), à $-196^\circ C$.

L'ajout de KO_2 au complexe NiFAC entraîne bien la disparition du signal du superoxyde et la formation d'espèces paramagnétiques centrées sur le nickel, ce qui prouve une interaction du superoxyde avec le centre métallique. Les signaux peu intenses montrent l'instabilité de ces espèces qui conduit à l'oxydation du ligand observé par spectrométrie de masse. A partir de ces seules données, il est impossible de conclure quant à la nature de ces espèces, forme oxydée du nickel (Ni^{III}), ou intermédiaire oxygéné de type peroxy ou superoxy.

4. Spectro-électrochimie UV-Vis

Afin d'obtenir davantage d'informations sur l'intermédiaire formé entre le superoxyde et le complexe NiFAC, des expériences d'électrochimie suivies par spectroscopie UV-Visible ont été effectuées. Pour cela, la cellule présentée dans le Schéma 38 a été utilisée. Le principal avantage de ce type de cellule est qu'il permet d'électrolyser rapidement l'ensemble de la solution placée dans la cellule grâce à plusieurs paramètres :

- La faible épaisseur entre les fenêtres, de l'ordre du dixième de millimètre, qui limite la diffusion,
- La forme en grillage de l'électrode de travail et de la contre électrode afin de maximiser l'interface électrode/solution,
- L'utilisation de vitesses de balayage relativement faibles ($5-20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$),

- La concentration en électrolyte plus élevée (0,2 M).

Les évolutions spectroscopiques d'espèces électroactives pourront donc être suivies pendant les réactions.

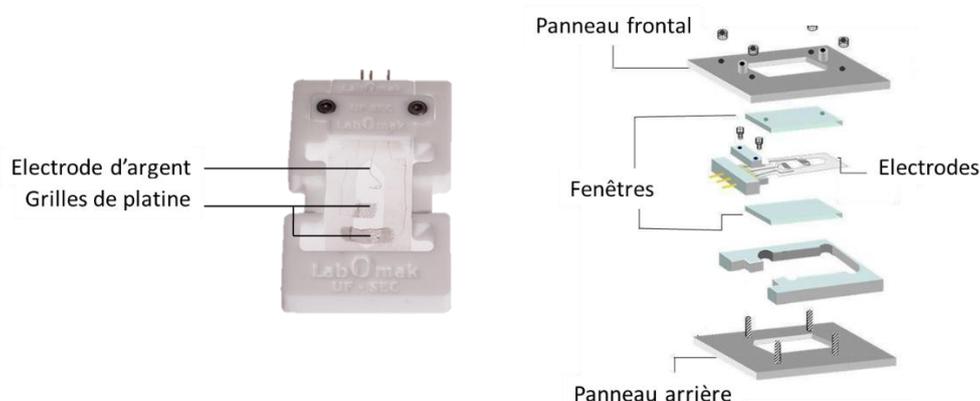


Schéma 38. Cellule spectroélectrochimique utilisée.¹⁵

Dans cette expérience de spectro-électrochimie, la source de superoxyde est l'oxygène qui est réduit électrochimiquement. Pour cela, les solutions d'électrolytes (NBu_4ClO_4 (TBAP) 0,2 M dans l'acétonitrile) sont saturées avec de l'air avant les expériences, conduisant à une concentration en oxygène d'environ 2,4 mM.¹⁶

L'analyse de la solution d'électrolyte oxygénée par voltampérométrie cyclique (CV) conduit à une réduction quasi-réversible de l'oxygène en superoxyde. La différence relativement importante entre E_{pc} et E_{pa} ($\approx 0,6$ V) peut provenir de la cellule ainsi que d'une interaction du superoxyde avec le tétrabutylammonium.^{17,18} De plus, l'intensité de la vague d'oxydation est inférieure à celle observée en réduction. Cela montre l'instabilité du superoxyde qui peut réagir avec de l'eau résiduelle en solution au cours de la CV.

Lorsque NiFAC est rajouté à la solution, l'intensité de la vague de réduction de l'oxygène reste constante, confirmant qu'il n'y a pas de réaction entre l'oxygène et le complexe (Figure 66). En revanche, l'intensité de la vague d'oxydation du superoxyde diminue. De plus, l'augmentation de la concentration de NiFAC est corrélée avec la diminution de la vague, démontrant que $\text{O}_2^{\bullet-}$ réagit avec le complexe.

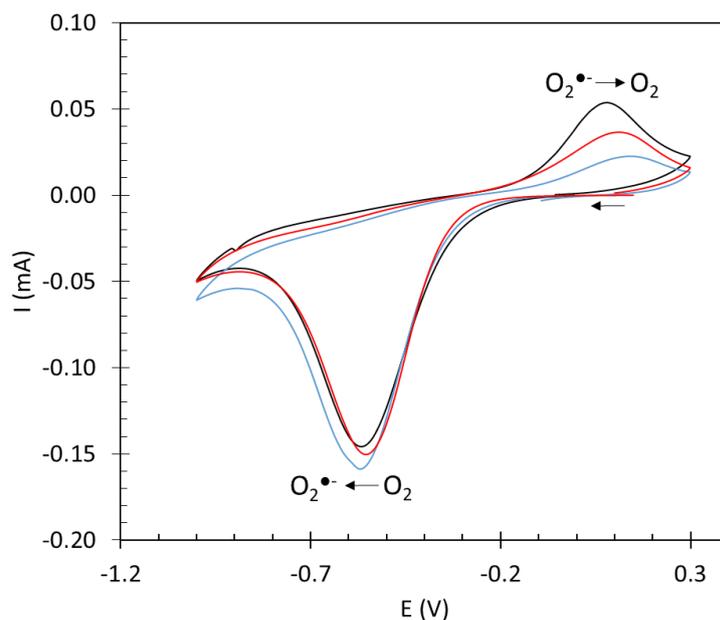


Figure 66. CV de l'oxygène (2,4 mM) dans l'acétonitrile (TBAP 0,2 M) à 15 mV/s avec NiFAC : 0 mM (noir), 0,5 mM (rouge) et 2,4 mM (bleu). Pseudo-référence : Ag.

Pour le suivi par spectroscopie UV-Vis, un profil du potentiel en fonction du temps différent a été utilisé : le potentiel est abaissé jusqu'à -0,9 mV puis maintenu à cette valeur (Figure 67). Avant la réduction de l'oxygène, la bande d-d caractéristique du complexe NiFAC est obtenue (①, $t = 0$ s, $\lambda_{\max} = 425$ nm, $\epsilon_{425} = 400$ M⁻¹cm⁻¹). Lors de la formation du superoxyde, l'intensité de la bande augmente jusqu'à atteindre un maximum avec $\epsilon = 800$ M⁻¹cm⁻¹ (②, $t \approx 40$ s). L'espèce correspondante est instable et se dégrade en quelques secondes (③, $t \approx 80$ s → ⑤, $t \approx 160$ s). Ces résultats sont donc en accord avec la formation d'un intermédiaire entre NiFAC et le superoxyde.

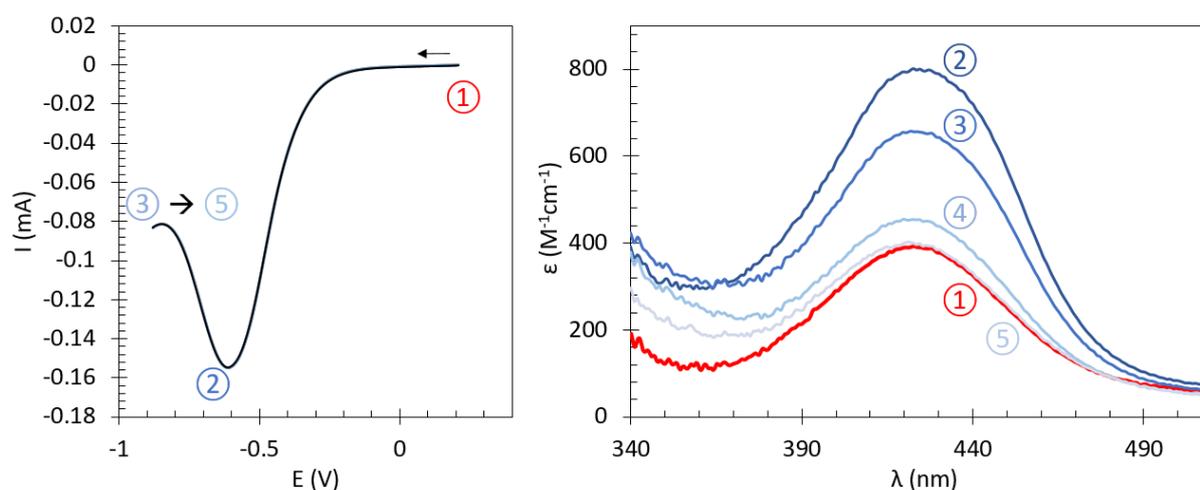


Figure 67. Gauche : CV de l'oxygène (2,4 mM) dans l'acétonitrile (TBAP 0,2 M) avec NiFAC (2,4 mM) à 15 mV/s, le potentiel est maintenu 80 secondes à -0,9 V. Droite : spectres UV-Visible obtenus pendant la CV.

L'évolution observée pour NiFAC pendant la réduction de l'oxygène est proche de celles décrites dans la littérature pour la formation de complexes Ni^{II}-superoxo (Figure 58, Figure 59) qui présentent des transitions d-d entre 400 et 450 nm avec des intensités similaires.^{1,7,8,19}

5. Discussion et conclusion

Ces premières analyses ont permis de montrer que les complexes en coordination *N* et *S* ont la même structure en milieu aqueux et en milieu organique, et qu'ils peuvent être étudiés dans l'acétonitrile afin d'obtenir des informations sur le mécanisme réactionnel mis en jeu lors de la catalyse de la dismutation du superoxyde. Les études de réactivité avec NiFAC, qui est un complexe stable à l'air et présentant uniquement la coordination *N*, ont permis de mettre en évidence une interaction avec le superoxyde, et vraisemblablement sa coordination sur le Ni^{II}. La comparaison des données obtenues par RPE et spectroscopie UV-Visible avec un complexe similaire (coordination N2S2) tend à montrer la formation d'un complexe Ni^{III}-superoxo *end-on* (Figure 68).

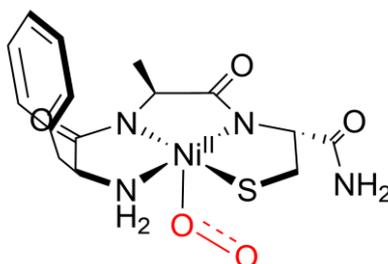


Figure 68. Structure possible pour l'intermédiaire formé entre NiFAC et KO₂.

Toutefois, l'instabilité de ce complexe limite l'utilisation de techniques de caractérisations essentielles pour confirmer cette structure, comme l'analyse par spectroscopie Raman. Par ailleurs, l'étude de l'interaction du complexe avec de l'azote pourrait permettre d'obtenir des complexes plus stables et facilement caractérisables qui pourraient apporter des informations sur sa coordination, supposée similaire à celle du superoxyde.^{20,21}

Une alternative serait d'utiliser un complexe différent avec un ligand permettant de stabiliser un intermédiaire réactionnel, comme HAC, contenant un imidazole, qui pourrait faciliter la caractérisation d'espèces de Ni^{III}.

Ces résultats suggèrent ainsi un mécanisme en sphère interne pour la réduction du superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La coordination de O₂^{•-} sur le Ni^{II} est en accord avec les résultats obtenus dans le Chapitre II et avec la nécessité d'avoir un ligand labile coordonné au nickel dans le complexe NiL³⁵(OH₂).

6. Références

1. D. Nakane, Y. Wasada-Tsutsui, Y. Funahashi, et al. A Novel Square-Planar Ni(II) Complex with an Amino—Carboxamido—Dithiolato-Type Ligand as an Active-Site Model of NiSOD. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (13), 6512–6523.
2. J. Cho, H.Y. Kang, L.V. Liu, et al. Mononuclear nickel(II)-superoxo and nickel(III)-peroxo complexes bearing a common macrocyclic TMC ligand. *Chem. Sci.* **2013**, 4 (4), 1502–1508.
3. C.A. Rettenmeier, H. Wadepohl, L.H. Gade. Structural Characterization of a Hydroperoxo Nickel Complex and Its Autoxidation: Mechanism of Interconversion between Peroxo, Superoxo, and Hydroperoxo Species. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54 (16), 4880–4884.
4. H. Noh, J. Cho. Synthesis, characterization and reactivity of non-heme 1st row transition metal-superoxo intermediates. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 382, 126–144.
5. K. Ray, F.F. Pfaff, B. Wang, W. Nam. Status of Reactive Non-Heme Metal–Oxygen Intermediates in Chemical and Enzymatic Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (40), 13942–13958.
6. S. Fukuzumi, Y.-M. Lee, W. Nam. Structure and reactivity of the first-row d-block metal-superoxo complexes. *Dalton Trans.* **2019**, 48 (26), 9469–9489.
7. S. Yao, E. Bill, C. Milsman, K. Wieghardt, M. Driess. A “Side-on” Superoxonickel Complex [LNi(O₂)] with a Square-Planar Tetracoordinate Nickel(II) Center and Its Conversion into [LNi(μ-OH)₂Ni]. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (37), 7110–7113.
8. M.T. Kieber-Emmons, J. Annaraj, M.S. Seo, et al. Identification of an “End-on” Nickel–Superoxo Adduct, [Ni(tmc)(O₂)]⁺. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (44), 14230–14231.
9. J. Cho, R. Sarangi, J. Annaraj, et al. Geometric and electronic structure and reactivity of a mononuclear ‘side-on’ nickel(II)-peroxo complex. *Nat. Chem.* **2009**, 1 (7), 568–572.
10. J.-H. Jeoung, D. Nianios, S. Fetzner, H. Dobbek. Quercetin 2,4-Dioxygenase Activates Dioxygen in a Side-On O₂–Ni Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (10), 3281–3284.
11. C.A. Grapperhaus, M.Y. Darensbourg. Oxygen Capture by Sulfur in Nickel Thiolates. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31 (8), 451–459.
12. V.E. Kaasjager, E. Bouwman, S. Gorter, et al. Unique Reactivity of a Tetradentate N₂S₂ Complex of Nickel: Intermediates in the Production of Sulfur Oxygenates. *Inorg. Chem.* **2002**, 41 (7), 1837–1844.
13. P.W. Riddles, R.L. Blakeley, B. Zerner. Reassessment of Ellman’s reagent. In *Methods in Enzymology; Enzyme Structure Part I*; Academic Press, **1983**; Vol. 91, pp 49–60.
14. J. Shearer. Dioxygen and superoxide stability of metalloprotein based mimics of nickel containing superoxide dismutase: The influence of amine/amido vs. bis-amido ligation. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 129, 145–149.
15. UF-SEC thin layer cell FULL KIT <http://www.labomak.it/uf-sec-thin-layer-cell-full-kit/> (accessed Jul 3, 2019).
16. C. Franco, J. Olmsted. Photochemical determination of the solubility of oxygen in various media. *Talanta* **1990**, 37 (9), 905–909.
17. M. Hayyan, M.A. Hashim, I.M. AlNashef. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (5), 3029–3085.
18. J.P. Vivek, N. Berry, G. Papageorgiou, R.J. Nichols, L.J. Hardwick. Mechanistic Insight into the Superoxide Induced Ring Opening in Propylene Carbonate Based Electrolytes using in Situ Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (11), 3745–3751.
19. M.T. Kieber-Emmons, C.G. Riordan. Dioxygen Activation at Monovalent Nickel. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40 (7), 618–625.
20. D.P. Barondeau, C.J. Kassmann, C.K. Bruns, J.A. Tainer, E.D. Getzoff. Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, 43 (25), 8038–8047.

21. A.T. Fiedler, P.A. Bryngelson, M.J. Maroney, T.C. Brunold. Spectroscopic and Computational Studies of Ni Superoxide Dismutase: Electronic Structure Contributions to Enzymatic Function. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (15), 5449–5462.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de cette thèse était d'obtenir de nouveaux complexes de nickel bio-inspirés de la Ni-SOD afin d'apporter des informations sur les différents facteurs nécessaires à la catalyse, ainsi que sur le mécanisme catalytique de l'enzyme. Ces informations permettraient également le développement de nouveaux agents thérapeutiques, comme des antibiotiques ou des antioxydants.

Pour y parvenir, deux approches ont été utilisées : la première avec l'utilisation de ligands tripodes pseudo-peptidiques, et la deuxième avec l'étude d'une série de peptides minimalistes (3 ou 4-mer) permettant de varier la coordination du nickel dans un motif de type ATCUN. Dans les deux cas, les acides aminés permettent d'obtenir relativement facilement une large variété de ligands offrant différentes possibilités de coordination, avec un environnement peptidique similaire à celui trouvé dans les protéines. De plus, de tels ligands permettent d'obtenir des complexes solubles en milieux aqueux et organiques, en fonction des acides aminés choisis, et leurs propriétés peuvent donc être étudiées dans des conditions proches des milieux biologiques, ou au contraire dans des milieux aprotiques pour obtenir des informations mécanistiques (Schéma 39).

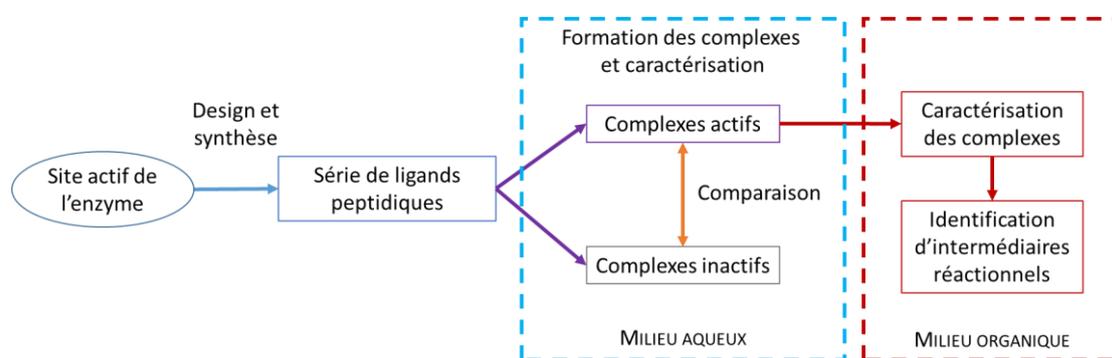


Schéma 39. Stratégie utilisée.

Les ligands pseudo-peptidiques ont permis d'obtenir des complexes de nickel originaux avec la coordination des chaînes latérales des acides aminés utilisés ainsi que d'une molécule de solvant (H_2O) qui peut être déprotonée pour former un ligand hydroxo avec le ligand L^{35} . Le nickel se retrouve alors dans une géométrie plan carré avec une coordination $[\text{S}2\text{NO}]$ pour L^{25} et $[\text{S}3\text{O}]$ pour L^{35} . Dans les deux cas, la sphère de coordination est différente de celle de l'enzyme ($\text{N}2\text{S}2$). En l'absence d'amido impliqué, la coordination des deux thiolates de L^{25} au Ni^{II} ne permet pas d'abaisser suffisamment le potentiel redox du complexe, celui-ci étant très proche de celui de la réduction du superoxyde. Le ligand L^{35} permet quant à lui la coordination de trois thiolates, conduisant à des potentiels redox plus faibles pour les complexes correspondants. Ce résultat peut expliquer la différence de réactivité entre

CONCLUSION

les complexes $[\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)]^-$ et $[\text{NiL}^{25}(\text{OH}_2)]$, le premier étant actif en catalyse contrairement au second. La valeur du potentiel d'oxydation du complexe est donc le premier facteur à prendre en compte pour obtenir des modèles de la Ni-SOD. Néanmoins, celui-ci n'est pas suffisant. En effet, le complexe $[\text{NiL}^{35}(\text{OH})]^{2-}$, qui possède aussi un potentiel redox dans la bonne gamme, n'est pas actif. Cela peut être expliqué par deux facteurs : la charge globale du complexe est -2, la répulsion électronique avec le radical anion superoxyde est donc plus forte qu'avec le complexe $[\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)]^-$. De plus, la molécule d'eau est un ligand labile et le complexe correspondant possède une dynamique intramoléculaire en solution, contrairement au complexe hydroxo qui possède une structure figée. La réactivité peut donc également être attribuée à la labilité de la molécule d'eau qui peut s'échanger avec le radical anion superoxyde, ou jouer le rôle d'un relais de protons. Cependant, le site actif de l'enzyme ne contient pas de molécule d'eau coordonnée au nickel. Les mécanismes réactionnels mis en jeu pendant la catalyse sont ainsi probablement différents entre ce complexe bio-inspiré et l'enzyme.

La nécessité d'avoir trois thiolates dans la sphère de coordination du nickel pour avoir une activité de type SOD, avec les pseudo-peptides précédents, limite les possibilités de structures. Dans le Chapitre III, une approche différente a donc été utilisée avec l'introduction d'amidos et d'une amine terminale dans la sphère de coordination avec des peptides dérivés du motif ATCUN qui offrent davantage de possibilités.

Les différents peptides synthétisés ont permis d'obtenir des complexes de nickel de géométrie plan carré avec des structures plus proches de celle du site actif de la Ni-SOD, et trois types de coordinations :

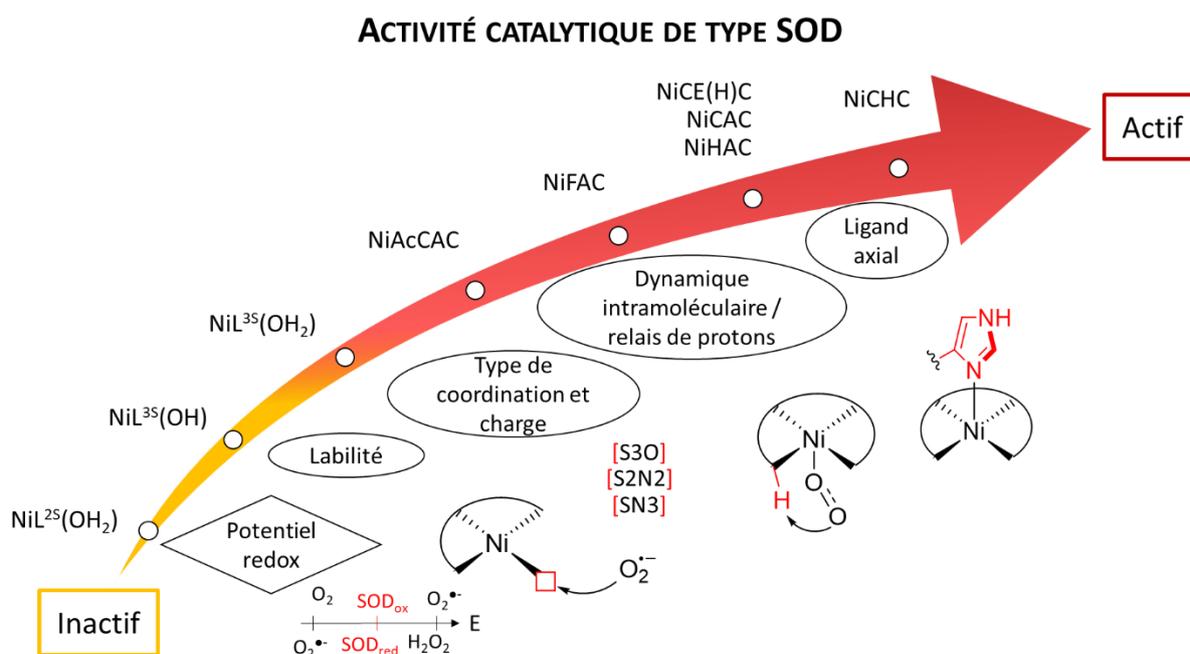
- La coordination *S* [S2N2] : deux amidos et deux thiolates,
- La coordination *N* [SN3] : une amine, deux amidos et un thiolate,
- Un échange entre les coordinations *S* et *N*.

Toutes ces coordinations permettent d'obtenir des potentiels redox pour les complexes dans une gamme permettant la catalyse de type SOD et, en effet, tous les complexes sont actifs en catalyse. La coordination *S* permet d'obtenir le potentiel redox le plus proche de la valeur idéale, or, son activité catalytique est la plus faible. Cela indique que la vitesse de réaction n'est pas limitée par la thermodynamique d'un processus redox. Les complexes avec la coordination *N* ont permis de confirmer que la présence d'un ligand axial susceptible de stabiliser la forme oxydée Ni^{III} , comme l'imidazole d'une histidine, permet d'améliorer l'activité catalytique, et ce, même avec des sphères de coordination différentes de l'enzyme. Néanmoins, ce ligand axial n'est pas indispensable à la catalyse.

La présence d'une cystéine non acétylée en N-ter entraîne un équilibre entre la coordination de l'amine terminale et celle du thiolate dans les complexes correspondants. Ceux-ci possèdent la

meilleure activité catalytique, environ trois fois supérieure à la coordination *S* et deux fois supérieure à la coordination *N*. Cet effet peut provenir d'interactions en seconde sphère de coordination *via* des liaisons hydrogènes entre le superoxyde et le thiol ou l'ammonium non coordonné, ces fonctions pouvant également jouer le rôle de relais de protons au cours de la catalyse. Il peut aussi s'expliquer par la présence du processus d'interconversion entre les deux types de coordination, qui libère de façon transitoire un site vacant dans la sphère de coordination du nickel pendant l'échange. Différentes études avec de nouveaux ligands pourraient permettre de répondre à ces questions. Dans l'ensemble, ces différents complexes peptidiques ont des activités relativement proches, et inférieures à celle de l'enzyme d'un facteur 10^3 . Cela suggère que ce type de coordination ne permet pas d'atteindre une catalyse aussi efficace que celle de l'enzyme ou que celles de complexes peptidiques utilisant la séquence du site actif de la Ni-SOD. D'un autre côté, cette activité moins importante facilite l'étude du mécanisme et l'identification d'intermédiaires réactionnels.

Cette thèse a permis de montrer que plusieurs facteurs peuvent moduler l'activité catalytique (Schéma 40) : le potentiel redox (qui doit obligatoirement être dans la bonne gamme), le type de coordination ainsi que la charge des complexes, la création d'un site vacant dans la sphère de coordination du nickel (présence d'un ligand labile), la présence d'un relais de protons, et enfin la coordination d'un ligand axial. Prendre en compte l'ensemble de ces facteurs permettra d'optimiser et de développer de nouveaux ligands qui pourront conduire à des complexes de seconde génération possédant une meilleure activité catalytique.



CONCLUSION

Afin d'obtenir des informations sur le mécanisme réactionnel, des premières études sur la réactivité de NiFAC (coordination *N*) avec le superoxyde ont été effectuées. Les résultats tendent à montrer la coordination de $O_2^{\bullet-}$ sur le Ni^{II} pour conduire à un complexe Ni-superoxo, ce qui suggère un mécanisme en sphère interne pour la réduction du superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La formation de cette espèce reste cependant à confirmer avec l'utilisation de techniques de caractérisations complémentaires sur des intermédiaires plus stables. Par ailleurs, des études de cinétique dans l'eau deutérée et la détermination de l'effet isotopique cinétique (KIE) pourrait apporter des informations sur le transfert de proton pendant la catalyse.

Finalement, cette approche a permis d'obtenir différents complexes peptidiques et pseudo-peptidiques actifs dans des conditions catalytiques, dans l'eau à pH physiologique. Une sphère de coordination du nickel identique à celle de la Ni-SOD n'est donc pas obligatoire pour obtenir une activité de type SOD, et d'ailleurs, ces complexes sont les premiers à démontrer une activité en conditions catalytiques dans l'eau avec ces différentes sphères de coordination. De plus, l'étude mécanistique en solvant organique sur un complexe actif permet de proposer un mécanisme en sphère interne pour la réduction du superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

Experimental part

Experimental part

1. Synthesis

1.1. General procedure

All the solvents and the starting materials were purchased from Fluka, Alfa Aesar, Sigma-Aldrich and VWR, and used without further purification. Amino acids were purchased from Novabiochem. Deuterated solvents were purchased from Euriso-top. All aqueous solutions were prepared from ultra-pure laboratory grade water that has been filtrated and purified by reverse osmosis using Millipore Milli-Q cartridge system (resistivity: 18M Ω .cm).

1.1.1 Electro spray ionisation mass spectrometry (ESI-MS)

Mass spectra were acquired on a LXQ-linear ion trap (THERMO Scientific) instrument equipped with an electro spray ion source. Electro spray full scan spectra in the range of $m/z = 50$ –2000 amu were obtained by infusion through a fused silica tubing at a flow rate of 2–10 mL/min. The solutions were analyzed in negative and positive ion modes. The LXQ calibration ($m/z = 50$ –2000) was achieved according to the standard calibration procedure from the manufacturer (mixture of caffeine, MRFA and Ultramark 1621). The temperature of the heated capillary for the LXQ was set in the range of 200–250 °C, the ion-spray voltage was in the range of 3–6 kV and the injection time was 5–200 ms.

1.1.2 Nuclear magnetic resonance (NMR)

The NMR experiments were recorded on a 500 MHz or a 400 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a BBI probe with triple axis gradient field. The chemical shifts (δ) are reported in ppm with the solvent as the internal reference. The coupling constants are reported in Hz.

1.1.3 High performance liquid chromatography (HPLC)

Reversed phase HPLC were performed on a LaChrom system equipped with a UV monitor. UV chromator wavelength was set at 214 nm. Ligand samples (ca 1 mg.mL⁻¹ for analytical HPLC and 10 mg.mL⁻¹ for preparative HPLC) were prepared in a solvent identical to the initial chromatography conditions. Samples were filtrated on a 0.45 μ m PTFE filter before injection. Solvents used for HPLC were: A: AcN/H₂O/TFA (90:10:0.1), and B: H₂O/TFA (100:0.1). Applied flow rate was 1 mL.min⁻¹ for analytical HPLC and 20 mL.min⁻¹ for preparative HPLC.

Gradient 1: 100% B for 5 min, 100 % B to 85% in 5 min, 15% A to 100% in 5 min.

Gradient 2: 100% B for 5 min, 100 % B to 75% in 25 min, 75% A to 100% in 5 min.

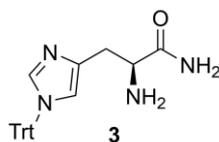
Gradient 3: 100% B to 80% in 10 min, 20% A to 100% in 5 min.

To a solution of **1** (4.0 g) in acetonitrile (70 mL), 14 mL of an ammonia solution (20% in water) were added. The reaction was stirred for 1 hour at room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in water (200 mL) and CH₂Cl₂ (200 mL). After separation, the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 100 mL), and the combined organic phases were washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 x 100 mL) and with brine (2 x 100 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product (3,0 g) was used without further purification.

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 2.85 (ABX, J_{AB} = 14.3 Hz, J_{AX} = 8.7 Hz, 1H, H_β), 2.92 (ABX, J_{AB} = 14.3 Hz, J_{BX} = 6.2 Hz, 1H, H_β), 4.22 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H_{Fmoc}), 4.35 (m, 2H, H_α, H_{Fmoc}), 5.74 (bs, 1H, NH₂), 6.40 (bs, 1H, NH₂), 6.54 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH), 6.70 (s, 1H, H_{ar}), 7.15 (m, 7H, H_{ar}), 7.36 (m, 13H, H_{ar}), 7.65 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H_{ar}), 7.85 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H_{ar}).

ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calculated 619.3, found 619.0.

Synthesis of compound 3:



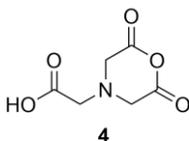
Chemical Formula: C₂₅H₂₄N₄O
MW: 396,49 g/mol

To a solution of **2** (2.8 g) in acetonitrile (30 mL), 25 mL of triethylamine were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in water (175 mL) and ethyl acetate (250 mL). After separation, the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 100 mL), and the combined organic phases were washed with brine (2 x 100 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The product was dissolved in CH₂Cl₂ and filtrated twice. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the product **3** is obtained (1.1 g, 60%, 0.2 equivalent of 9-methylenefluorene determined by ¹H NMR) and used without further purification.

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 2.82 (ABX, J_{AB} = 14.5 Hz, J_{AX} = 7.7 Hz, 1H, H_β), 3.03 (ABX, J_{AB} = 14.5 Hz, J_{BX} = 4.4 Hz, 1H, H_β), 3.65 (ABX, J_{AX} = 7.7 Hz, J_{BX} = 4.4 Hz, 1H, H_α), 5.40 (bs, 1H, NH₂), 6.67 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H_{ar}), 7.34 (m, 15H, H_{ar}), 7.38 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H_{ar}).

ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calculated 397.2, found 397.0.

Synthesis of compound 4:

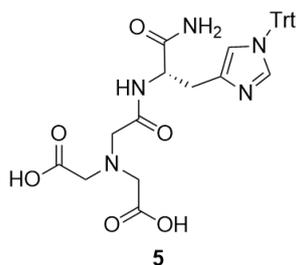


Chemical Formula: C₆H₇NO₅
MW: 173,12 g/mol

NTA (1 equiv., 228 mg) was suspended in pyridine (2.5 mL) and acetic anhydride (1.75 equiv., 216 mg) was added drop by drop. The solution was stirred for 16 h at 65 °C. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was used without further purification.

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 3.47 (s, 4H), 3.78 (s, 2H).

Synthesis of compound 5:



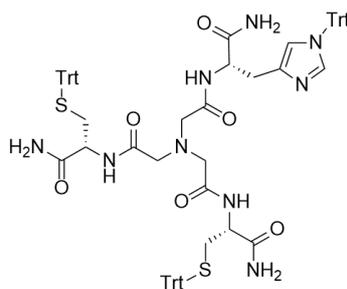
Chemical Formula: C₃₁H₃₁N₅O₆
MW: 569,62 g/mol

4 (1 equiv., 206 mg) was added to a solution of **3** (1 equiv., 512 mg) in acetonitrile (4 mL) and the solution was stirred at 30 °C for 70 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residual solid was washed with Et₂O. The product **5** was obtained as a beige solid (378 mg, 56%). The crude product was used without further purification.

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 3.03 (m, 2H, H_β), 3.37 (d, J = 17.7 Hz, 1H, CH₂CONH), 3.42 (d, J = 17.7 Hz, 1H, CH₂CONH), 3.48 (d, J = 17.1 Hz, 2H, CH₂COOH), 3.54 (d, J = 17.1 Hz, 2H, CH₂COOH), 4.68 (ABX, J_{AX} = 6.1 Hz, J_{BX} = 7.8 Hz, 1H, H_α), 5.48 (bs, 1H, NH₂), 6.71 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H_{ar}), 7.35 (m, 15H, H_{ar}), 7.41 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H_{ar}), 8.70 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH).

ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calculated 570.2, found 570.2.

Synthesis of compound 6:

**6**

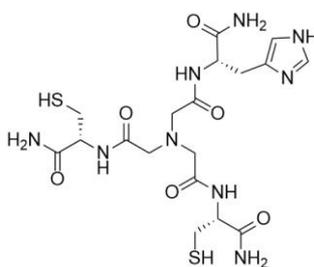
Chemical Formula: C₇₅H₇₁N₉O₆S₂
MW: 1258,57 g/mol

H-Cys(Trt)NH₂ (2.3 equiv., 87.3 mg) and DIEA (2.7 equiv., 37.1 mg) were added to a solution of **5** (1 equiv., 99 mg), EDC (2.2 equiv., 44 mg) and hydroxybenzotriazole (2.3 equiv., 37 mg) in acetonitrile (6 mL). The reaction mixture was stirred for 22 hours at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in water (15 mL) and CH₂Cl₂ (15 mL). After separation, the organic phase was washed with brine (2 x 15 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (gradient 100:0 to 50:50 CH₂Cl₂/EtOH) to afford compound **6** as a white solid (20 mg, 15%).

¹H NMR (MeOD, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 2.56 (m, 4H, H_{β,Cys}), 2.87 (ABX, J_{AB} = 14.7 Hz, J_{AX} = 9.1 Hz, 1H, H_{β,His}), 3.02 (ABX, J_{AB} = 14.7 Hz, J_{BX} = 4.7 Hz, 1H, H_{β,His}), 3.22 (d_{AB}, J_{AB} = 15.6 Hz, 2H, CH₂CONH), 3.24 (d_{AB}, J_{AB} = 15.9 Hz, 1H, CH₂CONH), 3.32 (m, 2H, CH₂CONH), 3.33 (m, 1H, CH₂CONH), 4.24 (dd, J_{AX} = 8.2 Hz, J_{BX} = 5.7 Hz, 2H, H_{α,Cys}), 4.60 (dd, J_{AX} = 9.1 Hz, J_{BX} = 4.7 Hz, 1H, H_{α,His}), 6.78 (s, 1H, H_{ar}), 7.25 (m, 15H, H_{ar}), 7.40 (s, 1H, H_{ar}).

ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calculated 1258.5, found 1258.3.

Synthesis of L²⁵:

**L²⁵H₂**

Chemical Formula: C₁₁₈H₂₉N₉O₆S₂
Molecular Weight: 531,61

A solution of TFA (10% v/v) in CH₂Cl₂, (1.5 mL) was added to **6** (1 equiv., 49 mg) dissolved in CH₂Cl₂ (1.5 mL). Triisopropylsilane (10 equiv., 80 μL), was added and the reaction mixture was stirred

for 2 hours at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and purified by HPLC. After freeze-drying, $L^{25}H_2$ was obtained as a white solid (14 mg, 68%).

HPLC gradient: 100% B to 80% in 15 min. $R_t = 8.3$ min, 99% purity. ESI-MS (positive mode): $[L^{25}+3H]^+$ m/z calculated 532.2, found 532.2.

1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 2.99 (ABX, $J_{AB} = 14.2$ Hz, $J_{AX} = 7.5$ Hz, 2H, $H_{\beta,Cys}$), 3.08 (ABX, $J_{AB} = 14.2$ Hz, $J_{BX} = 5.0$ Hz, 2H, $H_{\beta,Cys}$), 3.28 (ABX, $J_{AB} = 15.5$ Hz, $J_{AX} = 8.7$ Hz, 1H, $H_{\beta,His}$), 3.41 (ABX, $J_{AB} = 15.5$ Hz, $J_{BX} = 5.7$ Hz, 1H, $H_{\beta,His}$), 3.69 (m, 6H, CH_2CONH), 4.62 (dd, $J_{AX} = 7.5$ Hz, $J_{BX} = 5.0$ Hz, 2H, $H_{\alpha,Cys}$), 4.82 (dd, $J_{AX} = 8.7$ Hz, $J_{BX} = 5.7$ Hz, 1H, $H_{\alpha,His}$), 7.42 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.72 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H_{ar}).

$^{13}C\{^1H\}$ NMR (D_2O , 100 MHz, 298 K): δ ppm = 25.41 ($C_{\beta,Cys}$), 26.43 ($C_{\beta,His}$), 52.14 ($C_{\alpha,His}$), 55.21 ($C_{\alpha,Cys}$), 57.65 (C_{NTA}), 117.15 (C_{ar}), 128.52 (C_{ar}), 133.54 (C_{ar}), 171.93 (CH_2COHis), 172.06 (CH_2COCys), 174.03 ($HisCONH_2$), 174.19 ($CysCONH_2$).

1.3. Ligand L^{35}

The synthesis of L^{35} was performed previously as published.¹ It was purified by C. Lebrun by RP-HPLC before use.

1.4. Solid phase peptide synthesis (SPPS)

1.4.1 Linear peptides (AcCAC, FAC, HAC, CAC, CHC)

Linear peptides were prepared by manual SPPS using standard Fmoc protection strategy on a Rink Amide resin: amino acids that were used were $N\alpha$ -Fmoc-protected, side chains of cysteines and histidines were protected by a trityl group. Between each step, the resin was washed with DMF (3 x 10 mL), CH_2Cl_2 (10 mL) and DMF (10 mL).

The resin beads (≈ 500 mg) were swelled for 30 min in CH_2Cl_2 . An initial deprotection of the Fmoc group grafted on the amine of the resin, using a DMF/piperidine solution (4:1 v/v, 3 x 10 mL x 3 min), gave the loading of the resin (0.5-0.6 mmol/g). Coupling were performed with the amino acids (2 equiv.), PyBOP (2 equiv.) and DIEA (4 equiv.) in DMF (10 mL). After each coupling, the resin was treated with an acetic anhydride solution (DMF/pyridine/acetic anhydride, 7:2:1 v/v/v, 2 x 5 mL x 2 min) to acetylate unreacted amino groups. Fmoc deprotections were performed with a DMF/piperidine solution (4:1 v/v, 3 x 10 mL x 3 min). The yield of each amino acid coupling was determined by UV-Visible spectroscopy ($\epsilon_{300} = 7800 M^{-1}.cm^{-1}$ for the dibenzofulvene-piperidine adduct).

Peptides were deprotected and cleaved from the resin using a TFA/TIPS/H₂O solution (95:2.5:2.5 v/v/v, 30 mL, 2h). The solution was filtrated and the resin was washed with TFA (2 x 5 mL). The fractions were combined and evaporated under reduced pressure. Peptides were dissolved in water and filtrated prior analysis and purification by HPLC. Peptides were then obtained as white solids after freeze-drying.

AcCAC. Yield 45%

HPLC gradient 1: R_t 5.4 min, 97% purity. ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calcd 337.1, found 337.0.

¹H NMR: (H₂O/D₂O 90:10, 500 MHz, 298 K) δ ppm = 1.35 (d, J = 7.5 Hz, 3H, H_{β,Ala}), 1.99 (s, 3H, CH₃), 2.87 (m, 4H, H_{β,Cys}), 4.32 (m, 1H, H_{α,Ala}), 4.42 (m, 2H, H_{α,Cys}), 7.14 (bs, 1H, NH₂), 7.53 (bs, 1H, NH₂), 8.23 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH_{Cys}), 8.26 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH_{Cys}), 8.49 (d, J = 5.5 Hz, 1H, NH_{Ala}).

CAC. Yield: 47%.

HPLC gradient 2: R_t 3.2 min, 95% purity. ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calcd 295.1, found 295.0.

¹H NMR (H₂O/D₂O 90:10, 500 MHz, 298 K) δ ppm = 1.37 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H_{β,Ala}), 2.86 (ABX, J_{AB} = 14.2 Hz, J_{AX} = 7.0 Hz, 1H, H_{β,Cys3}), 2.90 (ABX, J_{AB} = 14.2 Hz, J_{BX} = 5.5 Hz, 1H, H_{β,Cys3}), 3.01 (ABX, J_{AB} = 14.9 Hz, J_{AX} = 5.4 Hz, 1H, H_{β,Cys1}), 3.06 (ABX, J_{AB} = 14.9 Hz, J_{BX} = 5.7 Hz, 1H, H_{β,Cys1}), 4.15 (m, 1H, H_{α,Cys1}), 4.37 (q, J = 7.0 Hz, 1H, H_{α,Ala}), 4.44 (m, 1H, H_{α,Cys3}), 7.14 (bs, 1H, NH₂), 7.58 (bs, 1H, NH₂), 8.39 (d, J = 6.9 Hz, 1H, NH)

FAC. Yield 59%.

HPLC gradient 1: R_t 6.5 min, 95% purity. ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calcd 339.1, found 339.3.

¹H NMR (H₂O/D₂O 90:10, 500 MHz, 298 K) δ ppm = 1.31 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H_{β,Ala}), 2.88 (m, 2H, H_{β,Cys}), 3.10 (ABX, J_{AB} = 14.2 Hz, J_{AX} = 7.5 Hz, 1H, H_{β,Phe}), 3.20 (ABX, J_{AB} = 14.2 Hz, J_{BX} = 6.8 Hz, 1H, H_{β,Phe}), 4.20 (m, 1H, H_{α,Phe}), 4.35 (m, 1H, H_{α,Cys}), 4.40 (m, 1H, H_{α,Ala}), 7.15 (bs, 1H, NH₂), 7.23 (m, 2H, H_{ar}), 7.32 (m, 3H, H_{ar}), 7.59 (bs, 1H, NH₂), 8.32 (d, J = 7.1 Hz, NH), 8.51 (d, J = 6.2 Hz, NH).

HAC. Yield 50%.

HPLC gradient 1: R_t 3.1 min, 97% purity. ESI-MS (positive mode): [M+H]⁺ m/z calcd 329.1, found 329.2.

¹H NMR (H₂O/D₂O 90:10, 500 MHz, 298 K) δ ppm = 1.35 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H_{β,Ala}), 2.87 (ABX, J_{AB} = 14.1 Hz, J_{AX} = 7.5 Hz, 1H, H_{β,Cys}), 2.92 (ABX, J_{AB} = 14.1 Hz, J_{BX} = 5.3 Hz, 1H, H_{β,Cys}), 3.32 (ABX, J_{AB} = 14.9 Hz, J_{AX} = 6.4 Hz, 1H, H_{β,His}), 3.35 (ABX, J_{AB} = 14.9 Hz, J_{BX} = 5.1 Hz, 1H, H_{β,His}), 4.24 (m, 1H, H_{α,His}), 4.39 (m, 1H, H_{α,Cys}), 4.43 (m, 1H, H_{α,Ala}), 7.16 (bs, 1H, NH₂), 7.36 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H_{ar}), 7.60 (bs, 1H, NH₂), 8.58 (d, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 8.60 (d, J = 1.2 Hz, H_{ar}), 8.77 (d, J = 3.8 Hz, 1H, NH).

CHC. Yield 27%.

HPLC gradient 1: R_t 3.5 min, 97% purity. ESI-MS (positive mode): $[M+H]^+$ m/z calcd 361.1, found 361.2.

1H NMR (H_2O/D_2O 90:10, 500 MHz, 298 K) δ ppm = 2.82 (ABX, $J_{AB} = 14.2$ Hz, $J_{AX} = 7.3$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys3}$), 2.87 (ABX, $J_{AB} = 14.2$ Hz, $J_{BX} = 5.4$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys3}$), 2.96 (ABX, $J_{AB} = 14.7$ Hz, $J_{AX} = 5.5$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys1}$), 3.00 (ABX, $J_{AB} = 14.7$ Hz, $J_{BX} = 5.7$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys1}$), 3.14 (ABX, $J_{AB} = 15.3$ Hz, $J_{AX} = 7.6$ Hz, 1H, $H_{\beta,His}$), 3.17 (ABX, $J_{AB} = 15.3$ Hz, $J_{BX} = 7.5$ Hz, 1H, $H_{\beta,His}$), 4.09 (m, 1H, $H_{\alpha,Cys1}$), 4.43 (m, 1H, $H_{\alpha,Cys3}$), 7.12 (bs, 1H, NH_2), 7.18 (s, 1H, H_{ar}), 7.59 (bs, 1H, H_{ar}), 8.31 (s, 1H, H_{ar}).

1.4.2 Nonlinear peptide CE(H)C

The ligand was prepared by manual SPPS on a Rink Amide resin. Unless specified, the resin was washed with DMF (3 x 10 mL), CH_2Cl_2 (10 mL) and DMF (10 mL) between each step. After each coupling, the resin was treated with an acetic anhydride solution (DMF/pyridine/acetic anhydride, 7:2:1 v/v/v, 2 x 5 mL x 2 min) to acetylate unreacted amino groups. Fmoc deprotections were performed with a DMF/piperidine solution (4:1 v/v, 3 x 10 mL x 3 min). The yield of each amino acid coupling was determined by UV-Visible spectroscopy ($\epsilon_{300} = 7800 M^{-1}.cm^{-1}$ for the dibenzofulvene-piperidine adduct).

The resin beads (502.3 mg) were swelled for 30 min in CH_2Cl_2 . An initial deprotection of the Fmoc group grafted on the amine of the resin, using a DMF/piperidine solution (4:1 v/v, 3 x 10 mL x 3 min), gave the loading of the resin (0.59 mmol/g). Fmoc-His(Trt)-OH (2 equiv., 372 mg) was first coupled to the resin, with PyBOP (2 equiv., 312 mg) and DIEA (6 equiv., 310 μ L) in DMF (10 mL) and stirred for 30 min. This operation was repeated twice. After deprotection, Fmoc-Glu(OH)-OAll (2 equiv., 249.1 mg) was coupled with PyBOP (2 equiv., 316 mg) and DIEA (6 equiv., 310 μ L) in DMF (10 mL) and stirred for 30 min. $Pd(PPh_3)_4$ (1.04 g) in a mixture of $CHCl_3$ /AcOH/NMM (37:2:1 v/v/v, 20 mL) was added to the resin, and the solution was stirred during 2h. After the reaction, the resin was washed with a DMF/DIEA solution (100:0.5 v/v, 4 x 10 mL) and with a diethyldithiocarbamate solution in DMF (30 mM, 4 x 10 mL). H-Cys(Trt)- NH_2 (2 equiv., 218.4 mg) was coupled with PyBOP (2 equiv., 314 mg) and DIEA (6 equiv., 310 μ L) in DMF (10 mL) and stirred for 30 min. After deprotection, Fmoc-Cys(Trt)-OH (2 equiv., 352.7 mg) was coupled with PyBOP (2 equiv., 315 mg) and DIEA (6 equiv., 310 μ L) in DMF (10 mL) and stirred for 30 min. This operation was repeated twice.

The peptide was deprotected and cleaved from the resin using a TFA/TIPS/ H_2O solution (95:2.5:2.5 v/v/v, 30 mL, 2h). The solution was filtrated and the resin was washed with TFA (2 x 5 mL). The fractions were combined and evaporated under reduced pressure. The peptide was dissolved in water and filtrated prior analysis and purification by HPLC. The peptide was then obtained as a white solid after freeze-drying (95 mg).

CE(H)C. Yield 71%.

HPLC gradient 3: $R_t = 5.2$ min, 99% purity. ESI-MS (positive mode): $[M+H]^+$ m/z calcd 489.2, found 489.2.

1H NMR (H_2O/D_2O 90:10, 500 MHz, 298 K) δ ppm = 1.96 (m, 2H, $H_{\beta,Glu}$), 2.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $H_{\gamma,Glu}$), 2.85 (ABX, $J_{AB} = 14.2$ Hz, $J_{AX} = 7.4$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys3}$), 2.91 (ABX, $J_{AB} = 14.2$ Hz, $J_{BX} = 5.2$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys3}$), 3.01 (ABX, $J_{AB} = 14.5$ Hz, $J_{AX} = 5.4$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys1}$), 3.05 (ABX, $J_{AB} = 14.5$ Hz, $J_{BX} = 7.0$ Hz, 1H, $H_{\beta,Cys1}$), 3.08 (ABX, $J_{AB} = 15.0$ Hz, $J_{AX} = 7.6$ Hz, 1H, $H_{\beta,His}$), 3.22 (ABX, $J_{AB} = 15.0$ Hz, $J_{AX} = 5.7$ Hz, 1H, $H_{\beta,His}$), 4.19 (m, 1H, $:H_{\alpha,Cys1}$), 4.28 (m, 1H, $H_{\alpha,Glu}$), 4.46 (m, 1H, $H_{\alpha,Cys3}$), 4.63 (m, 1H, $H_{\alpha,His}$), 7.14 (bs, 1H, NH_2), 7.16 (bs, 1H, $:NH_2$), 7.25 (s, 1H, H_{ar}), 7.68 (bs, 2H, NH_2), 8.45 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH), 8.52 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H_{ar}), 8.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, NH).

2. Metal binding studies

2.1. Solution preparation

For the preparation of all the aqueous solutions, ultrapure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore MilliQ reverse-osmosis cartridge system (resistivity 18M Ω cm) (Millipore) was used.

In order to prevent the oxidation of the cysteine residues, all the solutions were prepared under an argon atmosphere in a glovebox. Solutions of ligands or complexes were freshly prepared before each experiment in the appropriate deoxygenated buffer.

Ni^{II} solutions were prepared from the sulfate corresponding salt dissolved in water.

The ligand concentration for the different solutions was determined by the Ellman's procedure.⁷⁶ 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) is used as an indicator. Each free thiol group present in the ligand yields 1 equiv. of TNB^{2-} [$\lambda = 412$ nm, $\epsilon(TNB^{2-}) = 14150$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$].

For the complex solutions, 0.9 equiv. of Ni^{II} were added to the ligand in the proper buffer so that only the mononuclear complex is formed.

2.2. UV and CD spectroscopy

The UV spectra were recorded with a Varian Cary50 spectrophotometer equipped with optical fibers connected to an external cell holder in a glovebox. The circular dichroism spectra were acquired with an Applied Photophysics Chirascan spectrometer. Spectra were recorded in the 230–630 nm wavelength range with 1 nm bandwidth and 1 second dwell time per point. For each sample, 2 parallel spectra were recorded and the average of these spectra was smoothed by the Savitzky–Golay method with a “window size” 7. CD spectra are reported in molar ellipticity $[\theta]$ defined as $[\theta] = \theta_{obs}/(10/c)$

where θ_{obs} is the ellipticity in millidegrees, l the optical path length of the cell in centimeters and c the species concentration in moles per litre. Quartz cells with 1 cm pathlength were used.

For the titration of L^{25} and L^{35} with Ni^{II} , 2.5 mL of a ligand solution (50-75 μM) in HEPES buffer (20 mM, pH 7.4, $[NaCl] = 100$ mM) were titrated with aliquots of the Ni^{II} solution. The UV-Visible and CD spectra were recorded after 10 min stabilization.

Batch titration were performed for FAC, HAC, AcCAC, CAC, CHC and CE(H)C, because of the slow complex formation. 2.5 mL of a ligand solution (20-50 μM) in HEPES buffer (20 mM, pH 7.4, $[NaCl] = 100$ mM) were placed in different UV cells. Aliquots of the Ni^{II} solution were added to the different cells. The UV-Visible and CD spectra were recorded after at least 24 hours stabilization.

For the pH studies with L^{25} and L^{35} , 2.5 mL of a complex solution (50-75 μM) in water were titrated with aliquots of a 0.01 M KOH solution. The pH and the UV-Visible and CD spectra were recorded after 10 min stabilization. For FAC, HAC, AcCAC, CAC, CHC and CE(H)C, 2.5 mL of a complex solution (20-50 μM) in water were placed in different UV cells. Aliquots of the KOH solution were added to the different cells. The pH and the UV-Visible and CD spectra were recorded after at least 24 hours stabilization. The pH was measured using a Metrohm 702 SM Titrino equipped with a Mettler Toledo InLabs Micro-electrode.

For the complex formation, 2.5 mL of a ligand solution (20-50 μM) in HEPES buffer (20 mM, pH 7.4, $[NaCl] = 100$ mM) were placed in a UV cell, 0.9 equivalent of Ni^{II} were added. The solution was stirred and the reaction was monitored by UV-Visible spectroscopy up to 10 h.

To study the complex stability to oxidation, 2.5 mL of a complex solution (20-50 μM) in HEPES buffer (20 mM, pH 7.4, $[NaCl] = 100$ mM) were placed in a UV cell and then exposed to the air without stirring. The reaction was monitored by UV-Visible spectroscopy during up to 24 h.

2.3. Mass spectrometry

Mass spectra were acquired on a LXQ-linear ion trap (THERMO Scientific) instrument equipped with an electrospray ion source. Electrospray full scan spectra in the range of $m/z = 50-2000$ amu were obtained by infusion through a fused silica tubing at a flow rate of 2-10 mL/min. The solutions were analyzed in negative and positive ion modes. The LXQ calibration ($m/z = 50-2000$) was achieved according to the standard calibration procedure from the manufacturer (mixture of caffeine, MRFA and Ultramark 1621). The temperature of the heated capillary for the LXQ was set in the range of 200-250°C, the ion-spray voltage was in the range of 3-6 kV and the injection time was 5-200 ms. The ligand solution (≈ 150 mM) was prepared in ammonium acetate buffer (20 mM, pH 6.9) and aliquots of Ni^{2+} were then added. The solutions with FAC, HAC, AcCAC, CAC, CHC and CE(H)C, were prepared 24 hours before analysis.

2.4. ^1H NMR Spectroscopy

The NMR experiments were recorded on a 500 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a BBI probe with triple axis gradient field. Complex samples at ≈ 1 mM were prepared in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ($v/v=9/1$) and the pH was adjusted using a KOH solution. Spectra were acquired on a 15 ppm window and 32k data points in the time domain with a presaturation or a watergate pulse program to suppress the water signal. The temperature coefficients of the amide and the hydroxo protons for NiL^{35} were measured using watergate water suppression between 278 and 308 K.

2.5. Electrochemistry

Cyclic voltammograms were recorded with a Metrohm Autolab PGSTAT100 potentiostat. A glassy carbon electrode was used as the working electrode, a platinum wire as the auxiliary electrode and SCE as the reference. Solutions of complexes (400-700 μM) were prepared in Hepes buffer (20 mM, $[\text{NaCl}] = 100$ mM).

2.6. X-Ray Absorption Spectroscopy

Ni K-edge XANES (X-ray Absorption Near-Edge Structure) and EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) spectra were recorded at the BM30B (FAME) beamline at the European synchrotron radiation facility (ESRF, Grenoble, France) using a Si(220) double-crystal monochromator.

The tripod complexes were prepared at ca. 1 mM in water/glycerol (80:20) in order to prevent ice crystallization and the pH was then adjusted with KOH. Peptidic complexes were prepared in HEPES buffer (100 mM, pH 7.4, glycerol 20% v/v). The complex solutions were placed in a sample holder with Kapton tape windows and flash-frozen in liquid nitrogen, and the frozen glass was mounted in a continuous flow helium-vapor cryostat ($8 \text{ K} \leq T \leq 20 \text{ K}$) to minimize sample photo-damage. Spectra were measured in fluorescence-yield detection mode with a 30-element Ge Canberra detector. At least nine scans were averaged for each samples. Data were acquired in 5 eV steps in the pre-edge region (8100-8295 eV), 0.25 eV steps in the edge region (8295 – 8375 eV), 2 eV steps in the post-edge region (8375 – 9182 eV). The energy was calibrated with a Ni metallic foil, such that the maximum of the first derivative was set at 8333 eV.

The data analyses were performed using the Demeter package, including ATHENA for the data extraction and ARTEMIS for the shell fitting.² The k^3 -weighted EXAFS spectra were Fourier-transformed using a Hanning window. $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6$, $\text{Ni}(\text{cyclam})(\text{CH}_3\text{CN})_2$,³ $\text{Ni}(\text{Acac})_2$ and NiS_2N_2 ⁴ were used as reference complexes to determine the amplitude reduction factor S_0^2 which was averaged and set to 0.76. The aqua complex was prepared at 1 mM in water from NiSO_4 , the other ones were analyzed as powder in BN pellets.

List of samples and conditions:

Compound	Matrix/solvent/buffer	pH	[Ni] (mM)	[L] (mM)	[Ni]/[L]
NiSO ₄	Water/glycerol	-	3.12	-	-
Ni(N2S2)	BN matrix	-	-	-	-
Ni(acac) ₂	BN matrix	-	-	-	-
Ni(cyclam)(CH ₃ CN) ₂	BN matrix	-	-	-	-
Ni(cyclam)(Cl) ₂	BN matrix	-	-	-	-
NiL ³⁵	Water/glycerol	7.5	1.02	1.13	0.90
NiL ³⁵	Water/glycerol	9.6	1	1.11	0.90
NiL ²⁵	Water/glycerol	8.4	1.02	1.13	0.90
NiCE(H)C	Water/glycerol	7.2	0.99	1.1	0.90
Ni(NTA(HisNH ₂) ₃)	Water/glycerol	7.5	1.03	1.15	0.90
NiCE(H)C	Water/glycerol	5	0.96	1.07	0.90
Ni ₃ (CE(H)C) ₂	Water/glycerol	7	1.62	1.08	1.50
NiCE(H)C	Water/glycerol	10	0.92	1.02	0.90
NiL ²⁵	Water/glycerol	10.5	0.97	1.08	0.90
Ni ² L ³⁵	Water/glycerol	7.5	2.07	1.09	1.90
NiCE(H)C	HEPES	7	1.06	1.17	0.91
Ni ₃ (CE(H)C) ₂	HEPES	7	1.74	1.16	1.50
NiL ³⁵	Water/glycerol	7.4	1.02	1.13	0.90
NiL ³⁵	Water/glycerol	9.5	1	1.11	0.90
NiL ²⁵	Water/glycerol	8.4	1.02	1.13	0.90
NiCAC	HEPES	7.4	1.0854	1.206	0.90
NiAcCAC	HEPES	7.4	1.1655	1.295	0.90
NiFAC	HEPES	7.4	1.0611	1.179	0.90
NiHAC	HEPES	7.4	1.0188	1.132	0.90
NiCHC	HEPES	7.4	1.0602	1.178	0.90
NiCAC	ACN	-	2.0844	2.316	0.90
NiAcCAC	ACN	-	2.7864	3.096	0.90
NiHAC	ACN	-	2.2005	2.445	0.90
NiCE(H)C	HEPES	7.4	1.0665	1.185	0.90

2.7. Xanthine/Xanthine Oxidase assay

The superoxide was generated with the Xanthine/Xanthine Oxidase system developed by Fridovich and Beauchamp,⁵ and adapted by Tabbi *et al.*⁶ In this test, the IC₅₀ is defined as the SOD concentration needed to inhibit 50% of the NBT conversion to formazan.

In a typical experiment, xanthine oxidase is added to a solution (final volume of 2 mL) of 50 μM xanthine, 100 μM NBT in HEPES buffer (20 mM, pH 7.4 or 9.4, [NaCl] = 100 mM) in order to have an increase of the absorbance of $\Delta A_{560} = 0.024 \text{ min}^{-1}$ before the addition of the complex. The reaction was monitored during 150 seconds or less to ensure a stationary state for the superoxide production. The IC₅₀ is reached when the slope after the complex addition is $\Delta A_{560} = 0.012 \text{ min}^{-1}$.

To be sure that the complexes have no influence on the superoxide production, the formation of urate without NBT was also monitored at 290 nm in their absence and in their presence, no difference in the slope was observed.

Blanks performed with Ni^{II} (25 μ M) displayed no change of the slope after its addition.

2.8. KO₂ solution in DMSO

Preparation of KO₂ solutions was adapted from a reported procedure by Durr *et al.*⁷ Fresh KO₂ solutions were prepared before each experiment by stirring vigorously \approx 100 mg of solid KO₂ in 10 mL of dry DMSO. The solutions were filtered after 30 minutes (0.45 μ M, PTFE) to give slightly yellow solutions and the superoxide concentration was determined by UV spectroscopy (0.2 mm length path cell, $\epsilon_{250} = 2686 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and was typically \approx 5 mM. Solutions were found to be stable for approximately 2 h.

2.9. Stopped-Flow

Stopped-flow experiments were performed at 25.0 °C on a Biologic SFM-400 using the first three syringes and a high density mixer to minimize optical perturbations due to the mix of solvents. A J&M TIDAS diode array detector (integration time 0.8 ms) and a Hamamatsu L10290 light source were used. The first syringe was filled with Hepes buffer (60 mM, pH 7.8 or 8.1, [NaCl] = 100 mM), the second one with the complex in the same buffer, and the third one with KO₂ in DMSO. The ratio for the syringes was set to 5:5:2, respectively in order to have reproducible shots and an excess of superoxide (constant ratio of 5:1 buffer/DMSO). The dismutation of superoxide was monitored by measuring the absorbance at 245 nm during 2.2 s after the injection in the cell. At least 9 shots were averaged for each complex concentration (range 50-150 μ M). Shots of the Ni^{II} complex at different concentrations without superoxide evidence that the complexes remain stable in DMSO containing solutions for the duration of the entire experiment. They were averaged and used as baselines. Data were processed using the Biokine software. No catalytic activity was observed in the control experiment with NiSO₄ (500 μ M).

2.10. Computational details

Density Functional calculations in the Kohn-Sham approach have been carried out with Orca 3.0.3.⁸ Geometry optimizations have been performed with the hybrid functional B3LYP to which the Grimme dispersion correction with Becke-Johnson damping (D3BJ)^{9,10} has been added, and using the Alhrich def2-tzvp basis set^{11,12} for all atoms. The RIJCOSX approximation^{13,14} has been used for all calculations. Harmonic frequencies have been calculated at the same level to check the nature of the stationary points. Electronic transitions have been calculated through the TD-DFT module on 20 roots using the range-separated CAM-B3LYP.¹⁵ The latter functional was shown to be the most adapted

thanks to a benchmark on the UV spectrum of NiL³⁵(OH₂) (see SI for details) including normal hybrids and range-separated ones. TightSCF criteria have been used in all calculations. Geometry optimizations, frequencies and TDDFT spectra, were performed with a solvent continuum (COSMO)¹⁶ modeling the water solvent.

3. Mechanistic study

3.1. Electron paramagnetic resonance

X-band EPR spectra were recorded on a Bruker EMX, equipped with the ER-4192 ST Bruker cavity and an ER-4131 VT at 100 K.

To a solution of NiFAC (1.0 mM, final concentration) in acetonitrile at -40 °C, was added a solution of superoxyde (0.2 mM, 1 mM 18-crown-6 final concentration). The resulting solution was directly frozen in liquid nitrogen before analysis by EPR spectroscopy. After the acquisition, the solution was melted at -40 °C, held for 5 seconds and frozen again before analysis. The operation was repeated four times.

3.2. Spectroelectrochemistry

For spectroelectrochemical measurements, cyclic voltamograms were carried out in MeCN solution, 0.1 M Bu₄NClO₄, using a SP300 Bio-Logic potentiostat at 15 mV/s. Solutions of NiFAC were saturated with air before the analysis. Experiences were conducted with a UFS-SEC spectroelectrochemical cell. Platinum was used as the working and the auxiliary electrode, and silver as a pseudo-reference. The UV-Visible spectra were recorded by using a MCS 501 UV-NIR (Carl Zeiss) photodiode-array spectrophotometer ($\Delta t = 1$ s).

4. References

1. A.M. Pujol, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle. A Series of Tripodal Cysteine Derivatives as Water-Soluble Chelators that are Highly Selective for Copper(I). *Chem. – Eur. J.* **2011**, 17 (16), 4418–4428.
2. B. Ravel, M. Newville. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* **2005**, 12 (4), 537–541.
3. M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, F. Foti, M. Vázquez. Further insights on the high–low spin interconversion in nickel(II) tetramine complexes. Solvent and temperature effects. *Dalton Trans.* **2004**, No. 17, 2616–2620.
4. M. Gennari, M. Orio, J. Pécaut, et al. Reversible Apical Coordination of Imidazole between the Ni(III) and Ni(II) Oxidation States of a Dithiolate Complex: A Process Related to the Ni Superoxide Dismutase. *Inorg. Chem.* **2010**, 49 (14), 6399–6401.
5. C. Beauchamp, I. Fridovich. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1971**, 44 (1), 276–287.

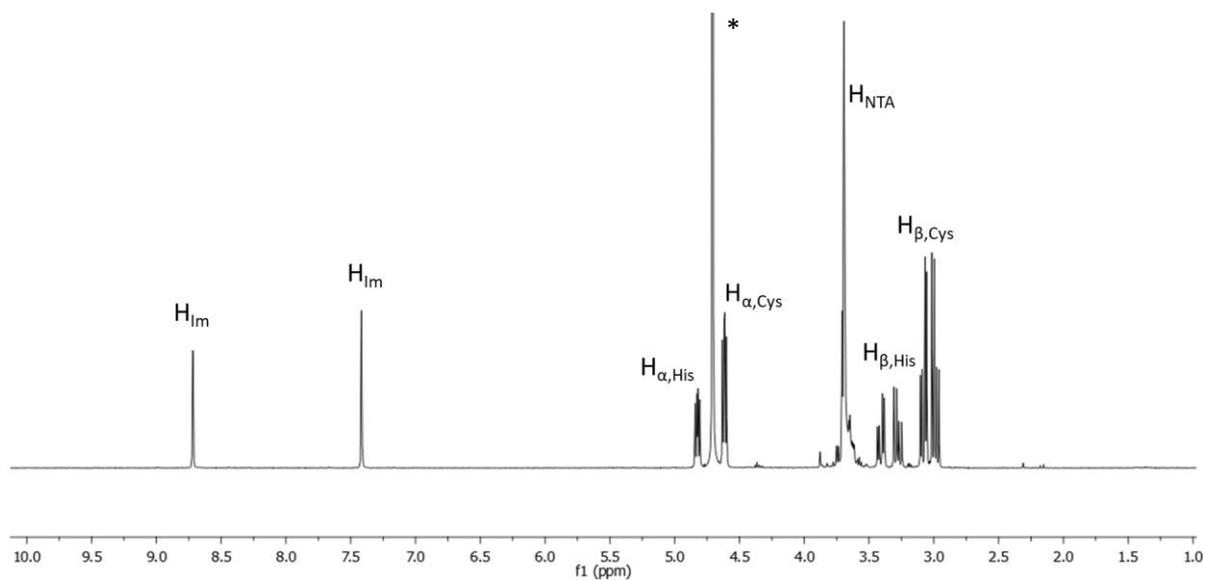
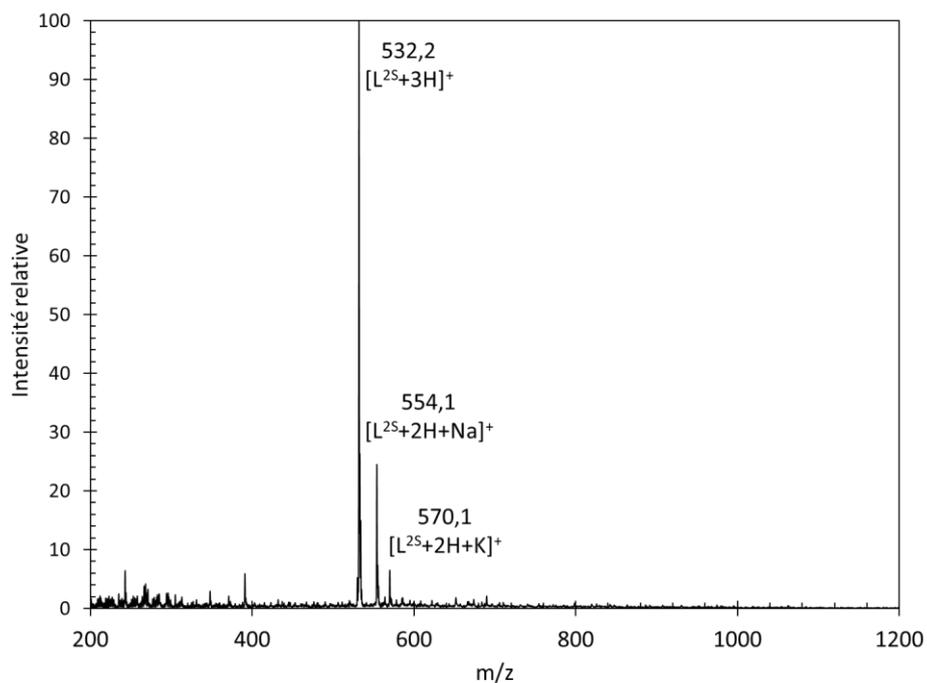
6. G. Tabbì, W.L. Driessen, J. Reedijk, et al. High Superoxide Dismutase Activity of a Novel, Intramolecularly Imidazolato-Bridged Asymmetric Dicopper(II) Species. Design, Synthesis, Structure, and Magnetism of Copper(II) Complexes with a Mixed Pyrazole–Imidazole Donor Set. *Inorg. Chem.* **1997**, 36 (6), 1168–1175.
7. K. Dürr, B.P. Macpherson, R. Warratz, et al. Iron(III) Complex of a Crown Ether–Porphyrin Conjugate and Reversible Binding of Superoxide to Its Iron(II) Form. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (14), 4217–4228.
8. F. Neese. The ORCA program system. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, 2 (1), 73–78.
9. S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H–Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, 132 (15), 154104.
10. S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, 32 (7), 1456–1465.
11. A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs. Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.* **1992**, 97 (4), 2571–2577.
12. F. Weigend, R. Ahlrichs. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7 (18), 3297–3305.
13. F. Neese. An improvement of the resolution of the identity approximation for the formation of the Coulomb matrix. *J. Comput. Chem.* **2003**, 24 (14), 1740–1747.
14. F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, U. Becker. Efficient, approximate and parallel Hartree-Fock and hybrid DFT calculations. A ‘chain-of-spheres’ algorithm for the Hartree-Fock exchange. *Chem. Phys.* **2009**, 356, 98–109.
15. T. Yanai, D.P. Tew, N.C. Handy. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 393 (1), 51–57.
16. S. Sinnecker, A. Rajendran, A. Klamt, M. Diedenhofen, F. Neese. Calculation of Solvent Shifts on Electronic g-Tensors with the Conductor-Like Screening Model (COSMO) and Its Self-Consistent Generalization to Real Solvents (Direct COSMO-RS). *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110 (6), 2235–2245.

Annexes

Annexes Chapitre II.

1. Ligand dissymétrique

1.1. Caractérisations

Figure 69. Spectre RMN ^1H (400 MHz) de L^{25} dans D_2O , 298 K.Figure 70. Spectre de masse (ESI-MS(+)) de L^{25} .

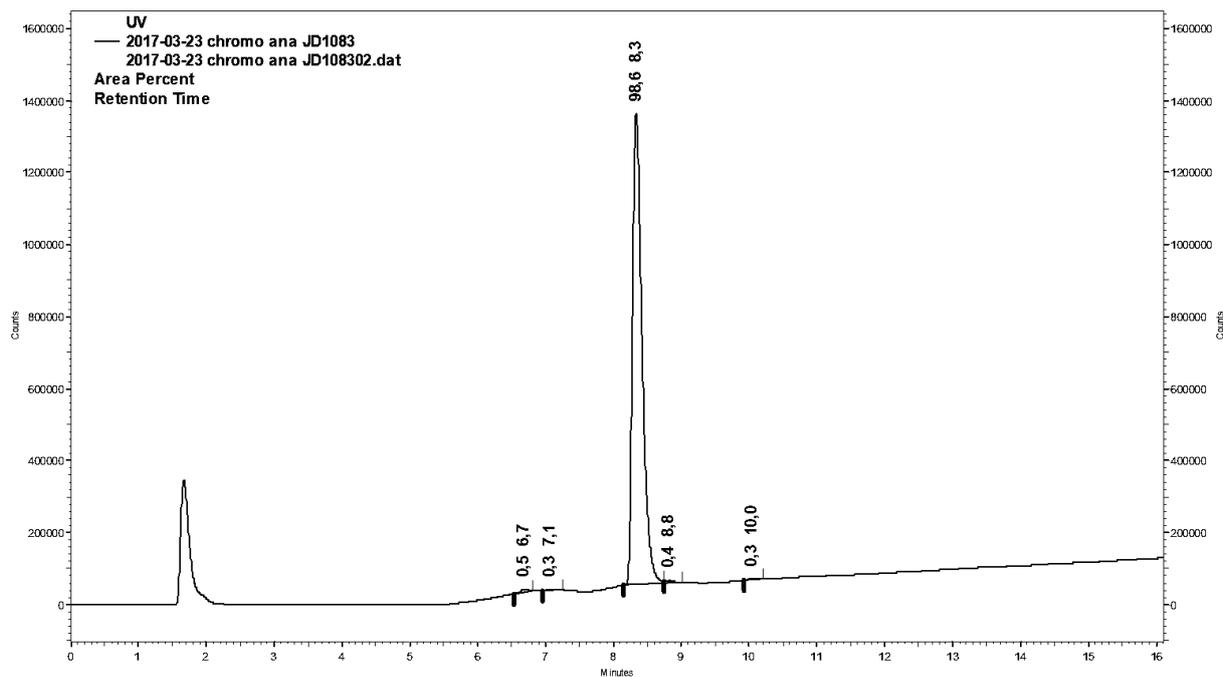


Figure 71. Chromatogramme de L^{25} . Gradient: 100% B to 80% in 15 min.

1.2. Effet du pH

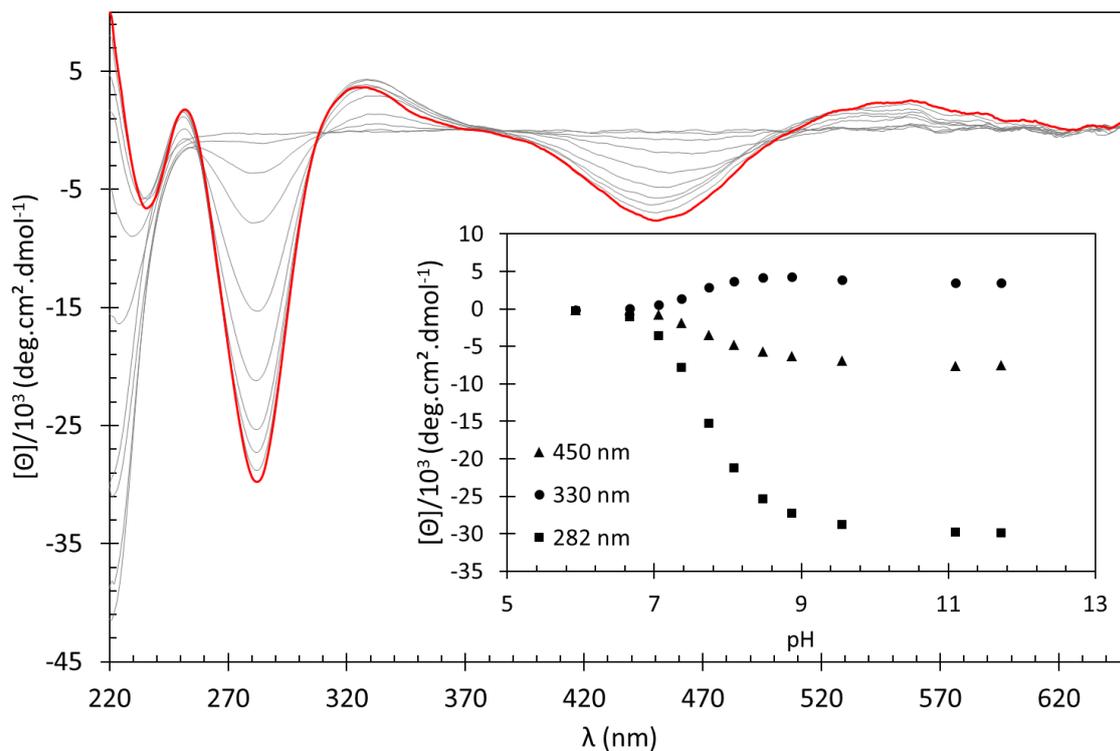


Figure 72. Spectres UV pour L^{25} ($47 \mu\text{M}$) avec 0,9 équivalent de Ni^{II} dans l'eau en fonction du pH. Le spectre rouge est acquis à pH 11,7. Encadré : évolution de l'absorbance en fonction du pH.

1.3. Structure de Ni(N2S2)

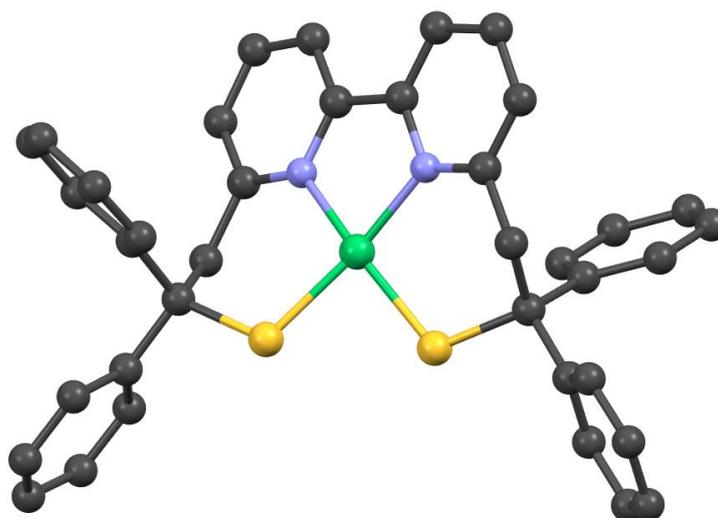


Figure 73. Structure du complexe Ni(S2N2) déterminée par DRX.

2. Ligand symétrique2.1. RMN ¹H

Tableau 20. Attribution des protons (δ , ppm) pour NiL³⁵(OH) 1,04 mM dans H₂O/D₂O (90:10) à pH 10,1, 278 K.

	NH	H _{α} (Cys)	H _{β} (Cys)	H _{N_{TA}}
Arm1 ■	11.06 (d, ³ J = 10.5 Hz)	4.50 (ddd, ³ J _{NH} = 10.5 Hz, ³ J _{AX} = 1.7 Hz, ³ J _{BX} = 4.5 Hz)	2.38 (ABX, ² J _{AB} = 12.7 Hz, ³ J _{BX} = 1.7 Hz) 2.26 (ABX, ² J _{AB} = 12.7, ³ J _{AX} = 4.5 Hz)	3.44 (d, ² J = 17.1 Hz) 3.20 (d, ² J = 17.1 Hz)
Arm2 ○	9.89 (d, ³ J = 5.1 Hz)	3.81 (m)	2.08 (ABX, ² J _{AB} = 14.4 Hz, ³ J _{BX} = 11.9 Hz) 1.97 , (ABX, ² J _{AB} = 14.4 Hz, ³ J _{AX} = 4.5 Hz)	3.06 (d, ² J = 12.7 Hz) 3.82 (d, ² J = 12.7 Hz)
Arm3 ▲	9.45 (d, ³ J = 6.4 Hz)	4.32 (ddd, ³ J _{NH} = 6.4 Hz, ³ J _{AX} = 3.9 Hz, ³ J _{BX} = 4.5 Hz)	2.48 (ABX, ² J _{AB} = 14.5 Hz, ³ J _{BX} = 3.9 Hz) 2.17 (ABX, ² J _{AB} = 14.5 Hz, ³ J _{AX} = 4.5 Hz)	3.19 (d, ² J = 14.4 Hz) 3.83 (d, ² J = 14.4 Hz)

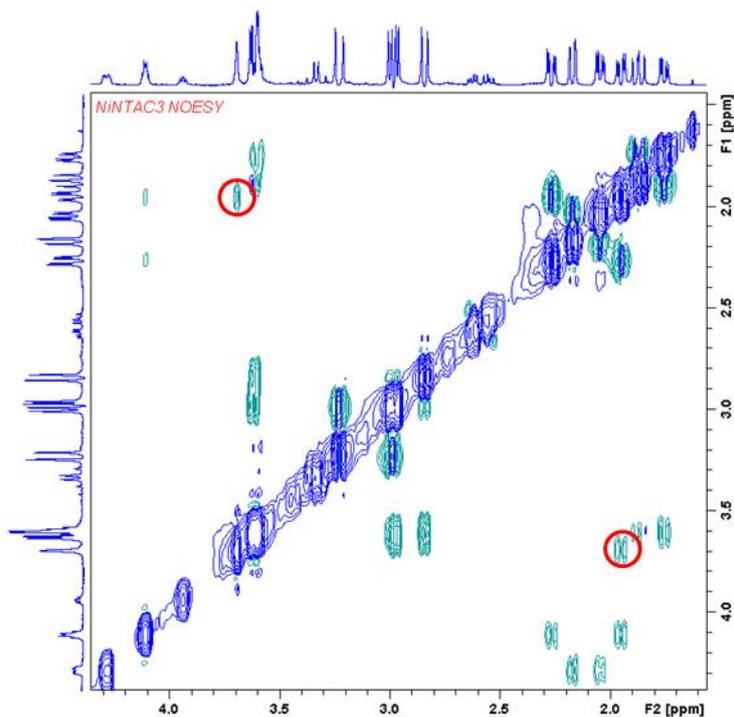


Figure 74. Spectre NOESY de $\text{NiL}^{35}(\text{OH})$ 1,04 mM dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) à pH 10,1, 278 K. Le cercle rouge met en évidence l'interaction entre le proton de l'hydroxo et un proton H_β d'une cystéine.

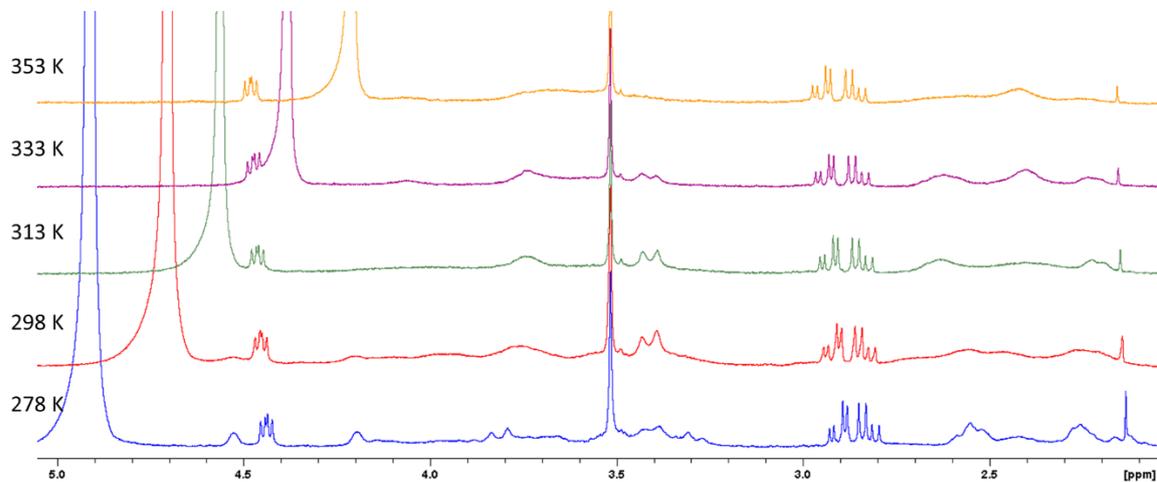


Figure 75. Spectres RMN ^1H (500 MHz) de $\text{NiL}^{35}(\text{OH}_2)$ (1.0 mM) dans D_2O à pD 7.4 à différentes températures avec un excès de ligand de 10%.

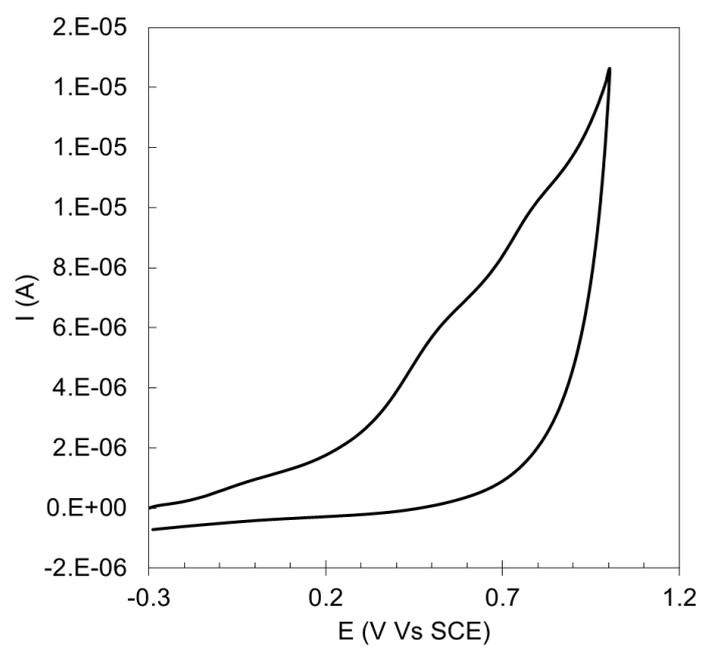
2.2. CV de L^{35} 

Figure 76. CV de L^{35} ($435 \mu M$) à 100 mV/s dans tampon HEPES (20 mM, pH 9,5, $[NaCl] = 100$ mM).

Annexes Chapitre III.

1. Caractérisation des peptides

1.1. AcCAC

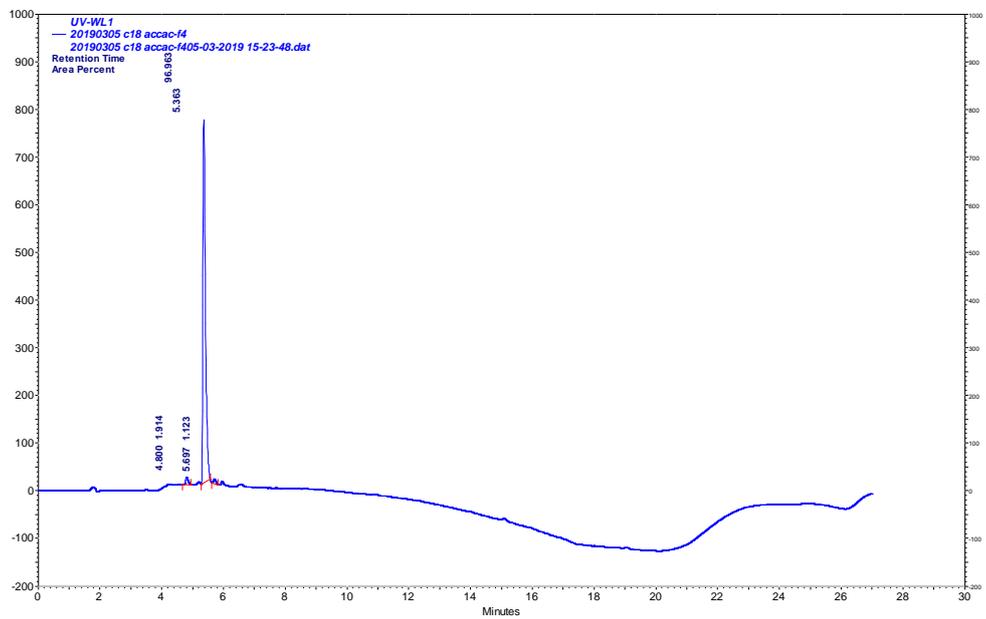


Figure 77. Chromatogramme de AcCAC, Gradient 1.

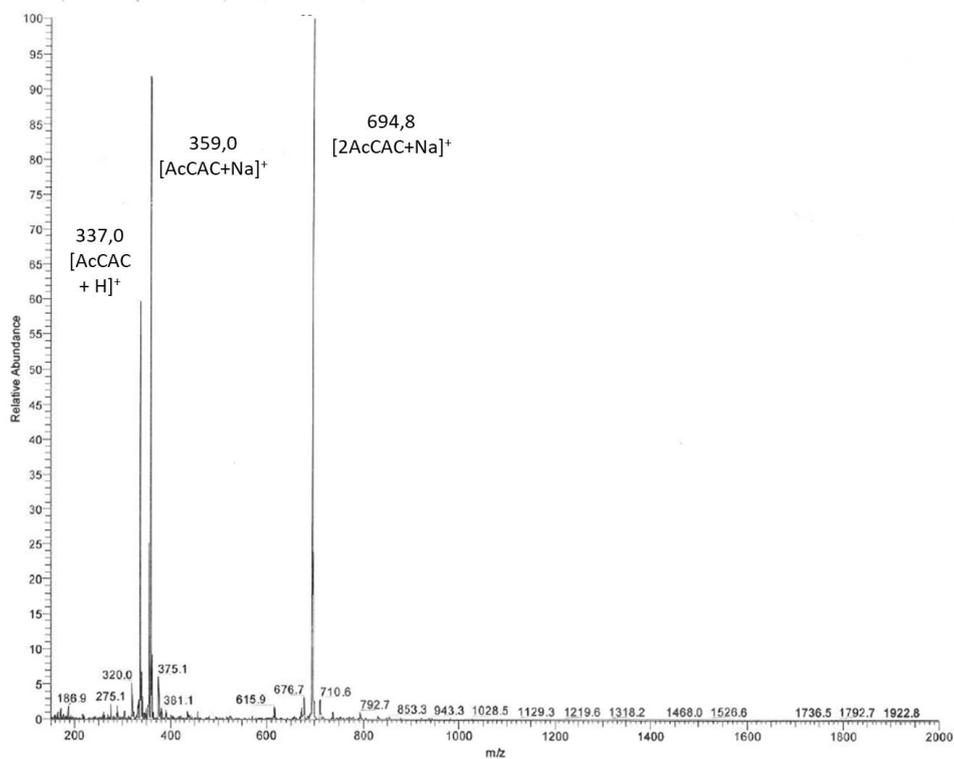


Figure 78. Spectre ESI-MS(+) de AcCAC.

1.2. FAC

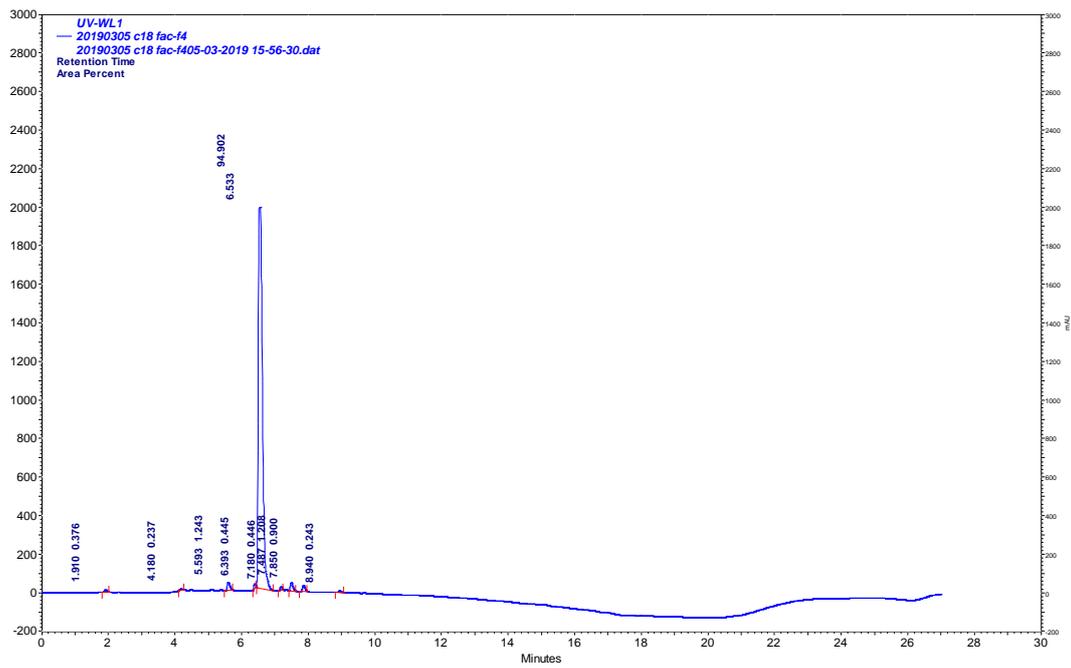


Figure 79. Chromatogramme de FAC, Gradient 1.

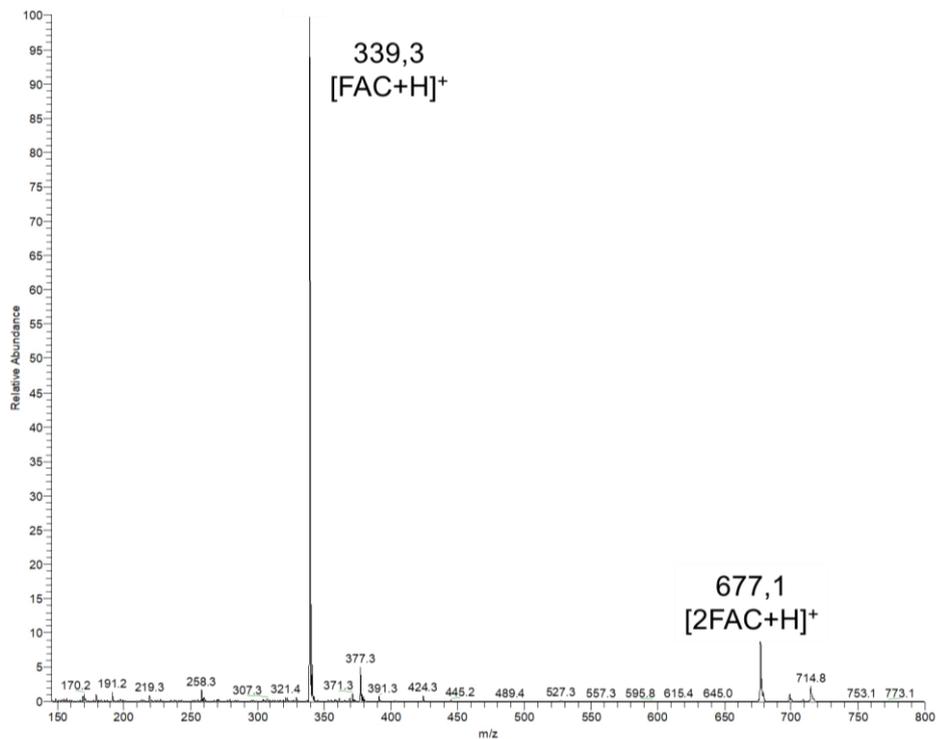


Figure 80. Spectre ESI-MS(+) de FAC.

1.3. HAC

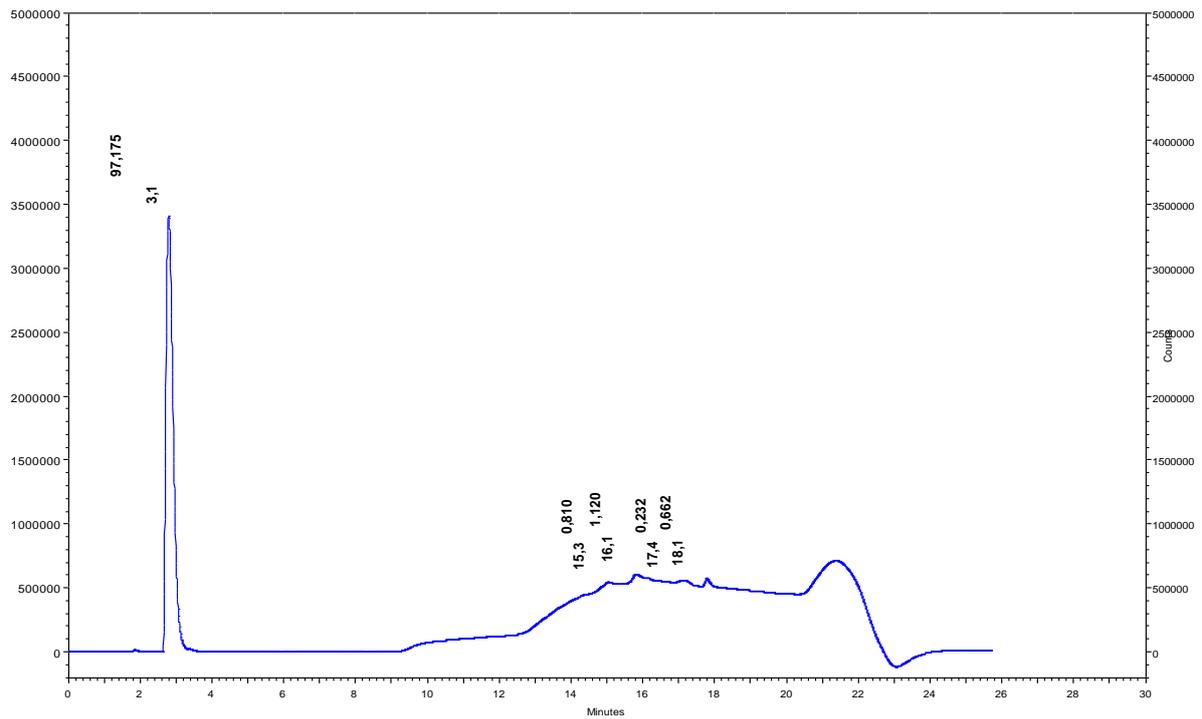


Figure 81. Chromatogramme de HAC, Gradient 1.

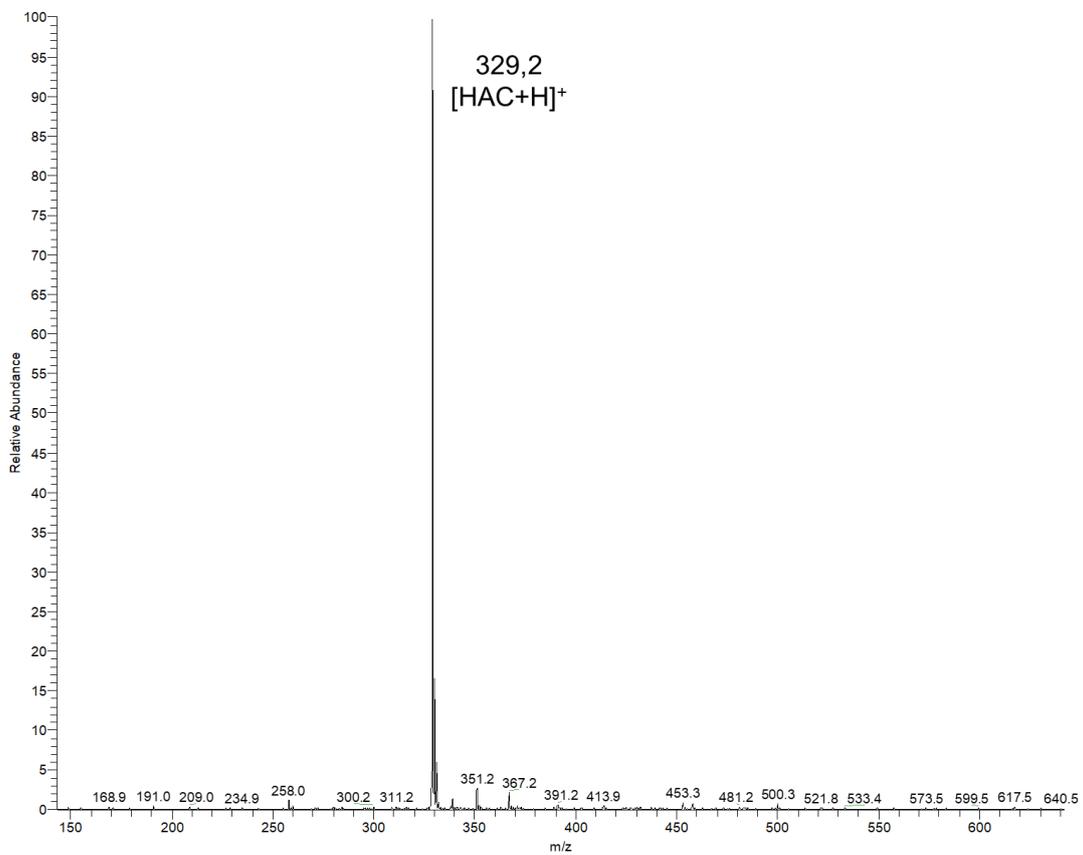


Figure 82. Spectre ESI-MS(+) de HAC.

1.4. CAC

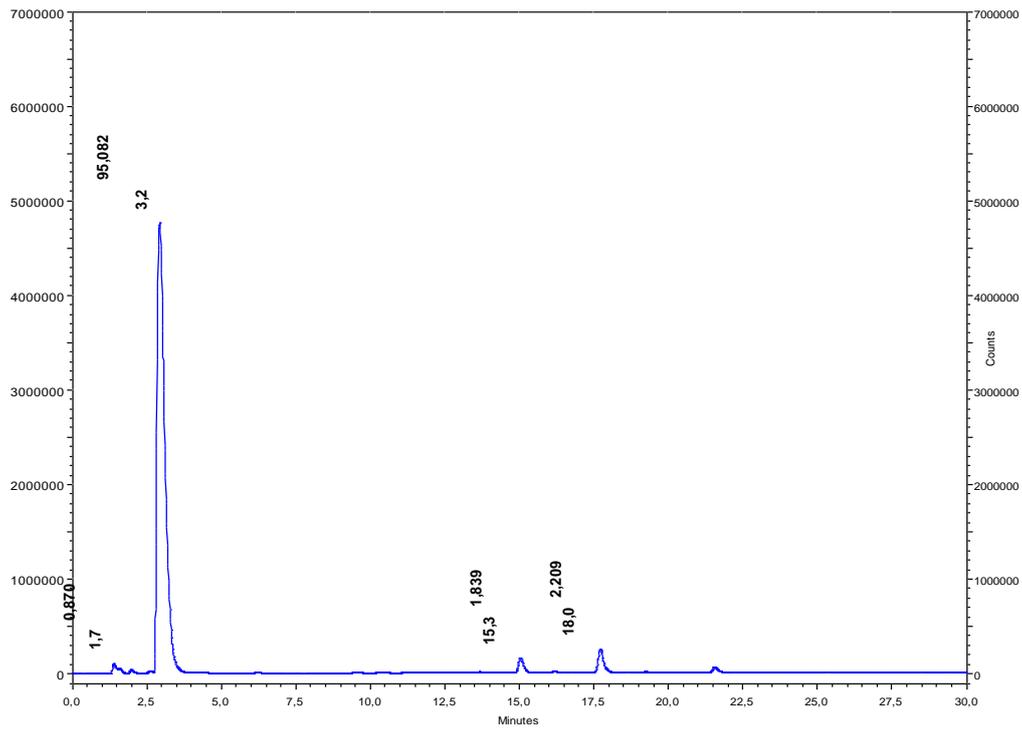


Figure 83. Chromatogramme de CAC, Gradient 2.

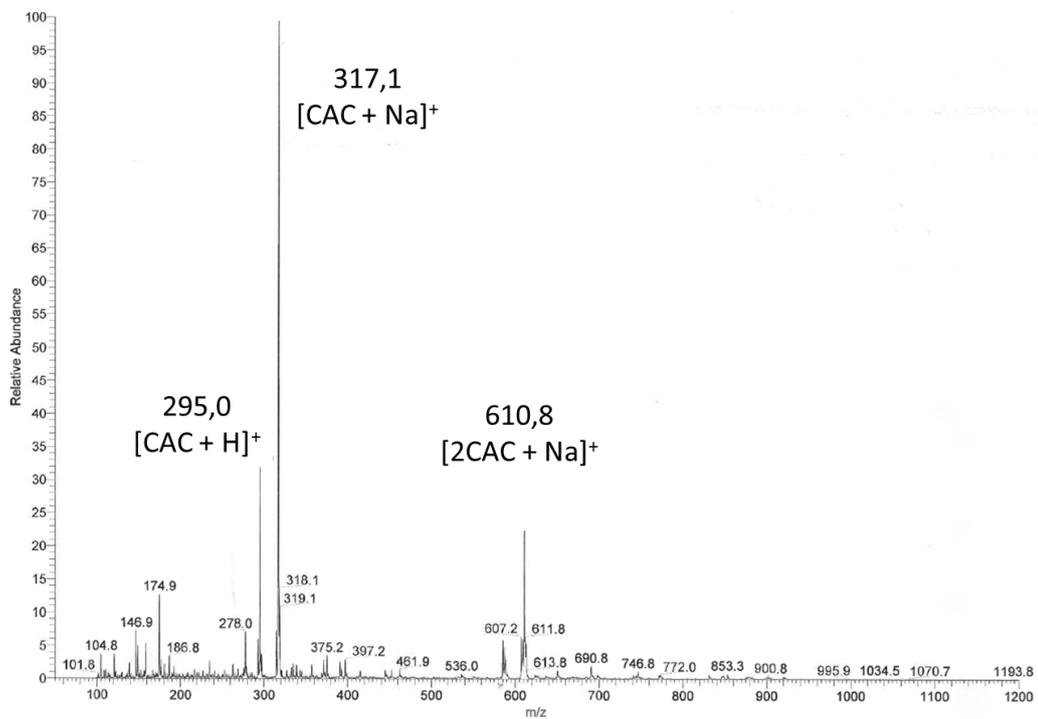


Figure 84. Spectre ESI-MS(+) de CAC.

1.5. CHC

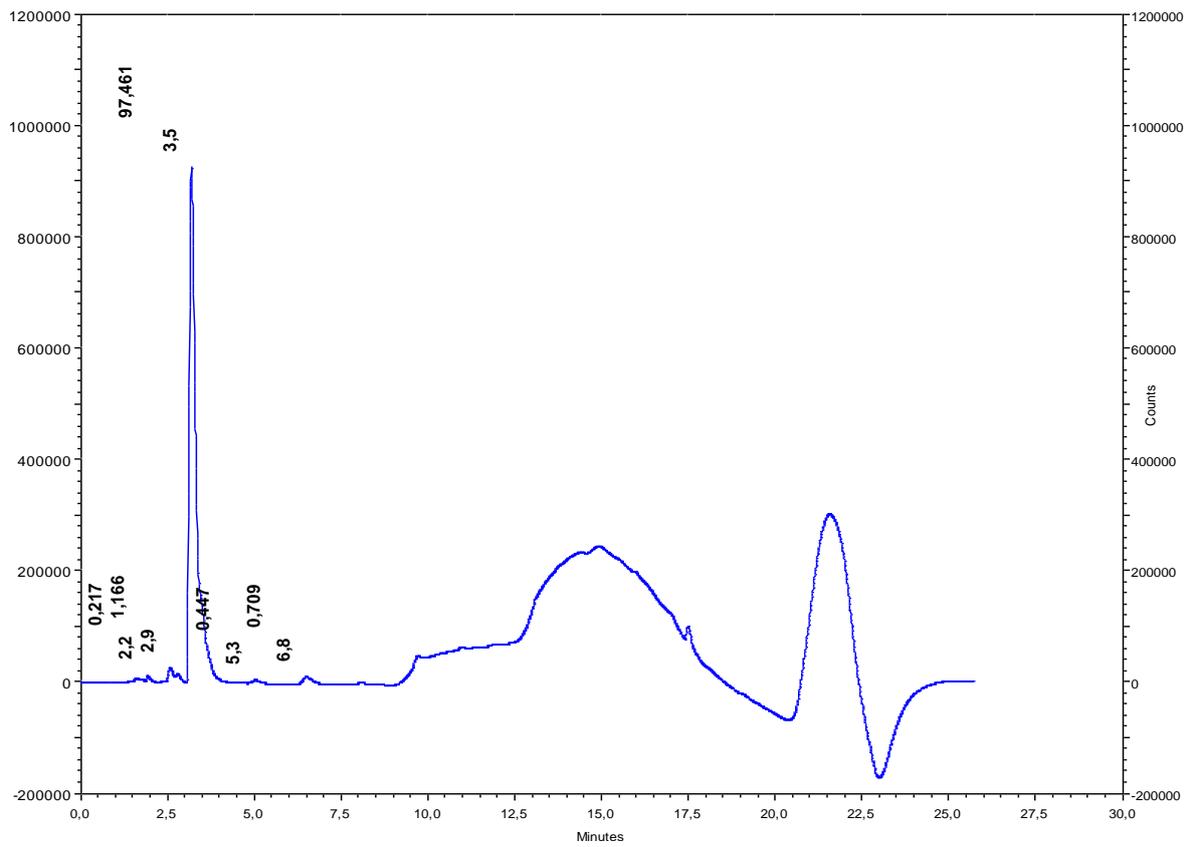


Figure 85. Chromatogramme de CHC, Gradient 1.

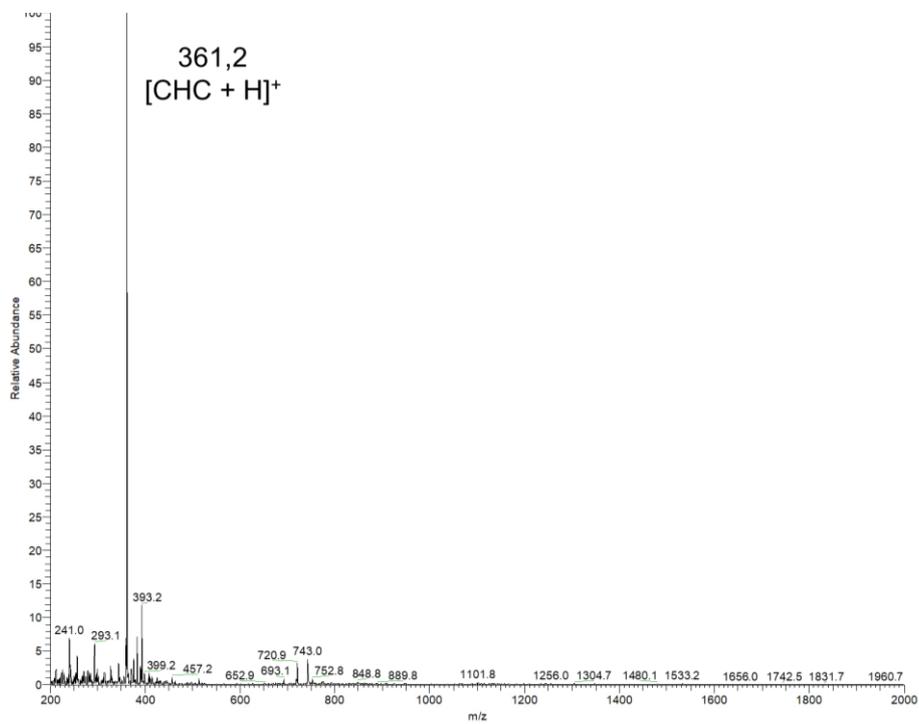


Figure 86. Spectre ESI-MS(+) de CHC.

1.6. CE(H)C

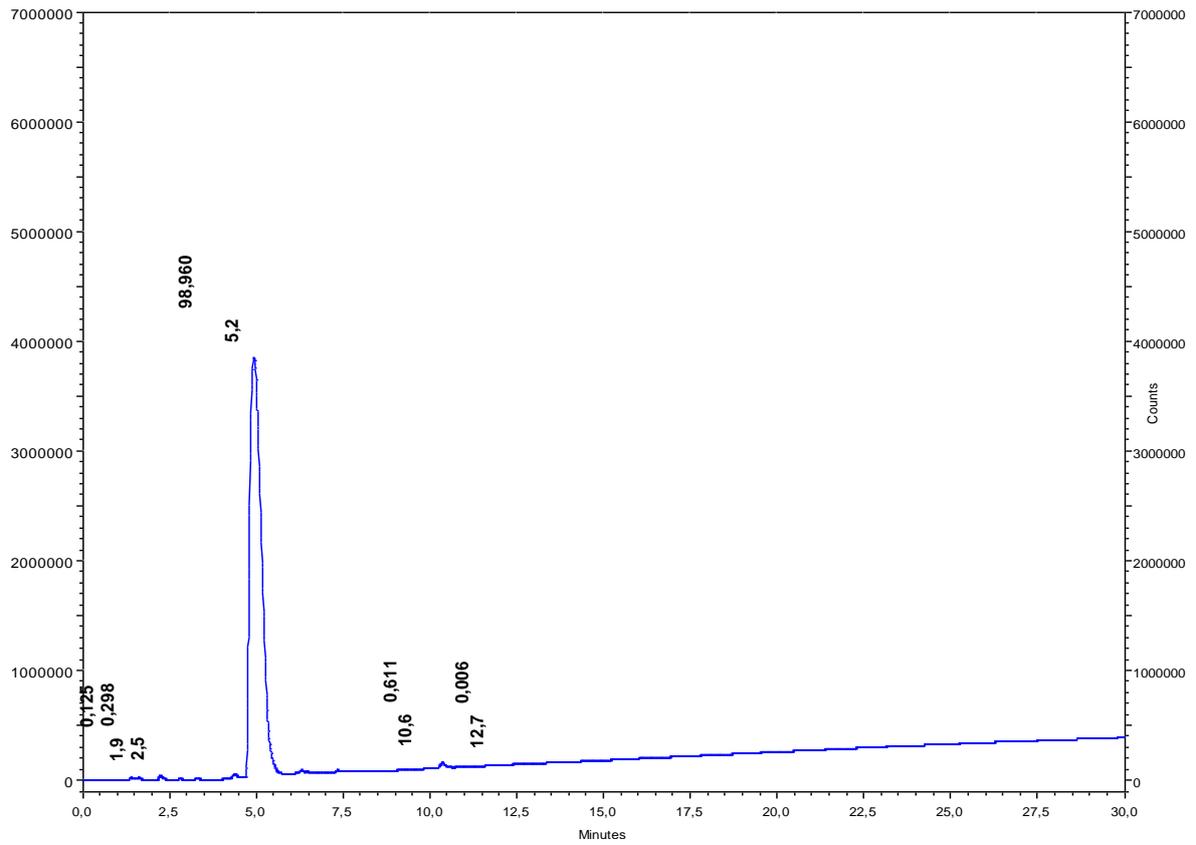


Figure 87. Chromatogramme de CE(H)C, Gradient 3.

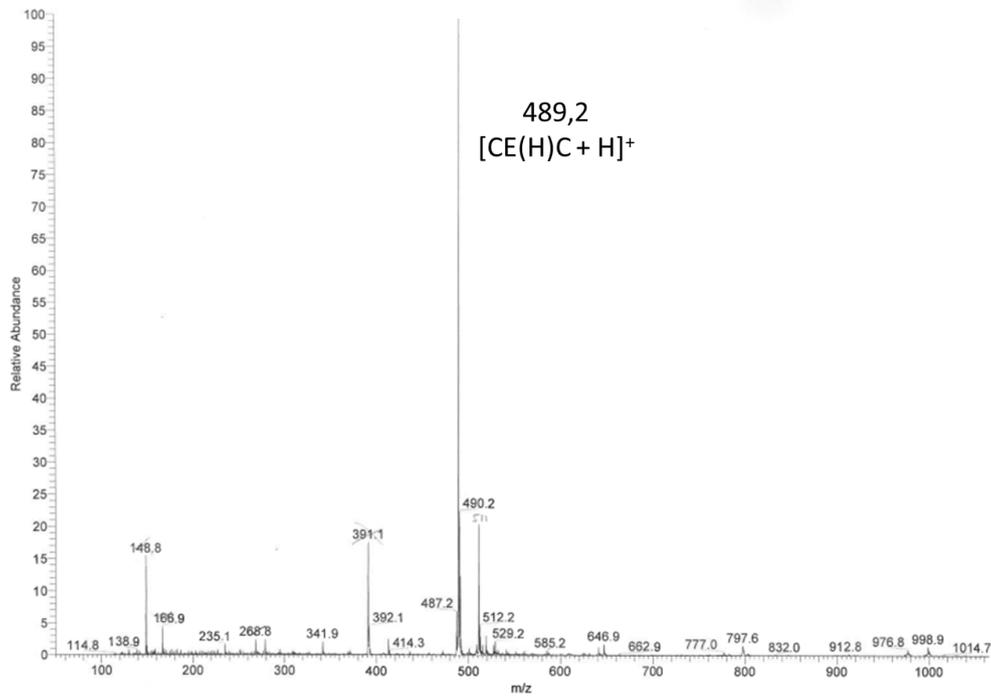


Figure 88. Spectre ESI-MS(+) de CE(H)C.

2. Dosages des peptides

2.1. Spectroscopie UV-Visible

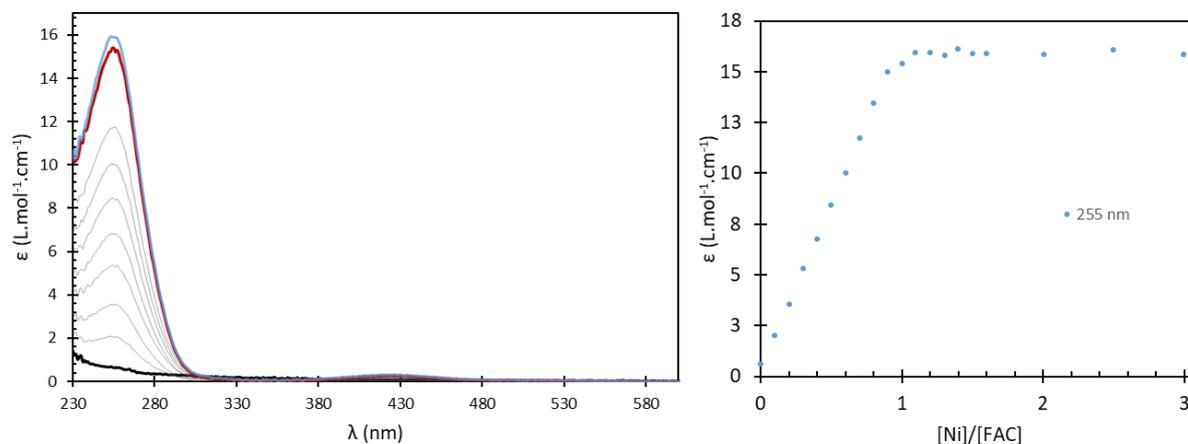


Figure 89. Gauche : Dosage de FAC (46 μ M) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution de l'absorbance à 255 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II}.

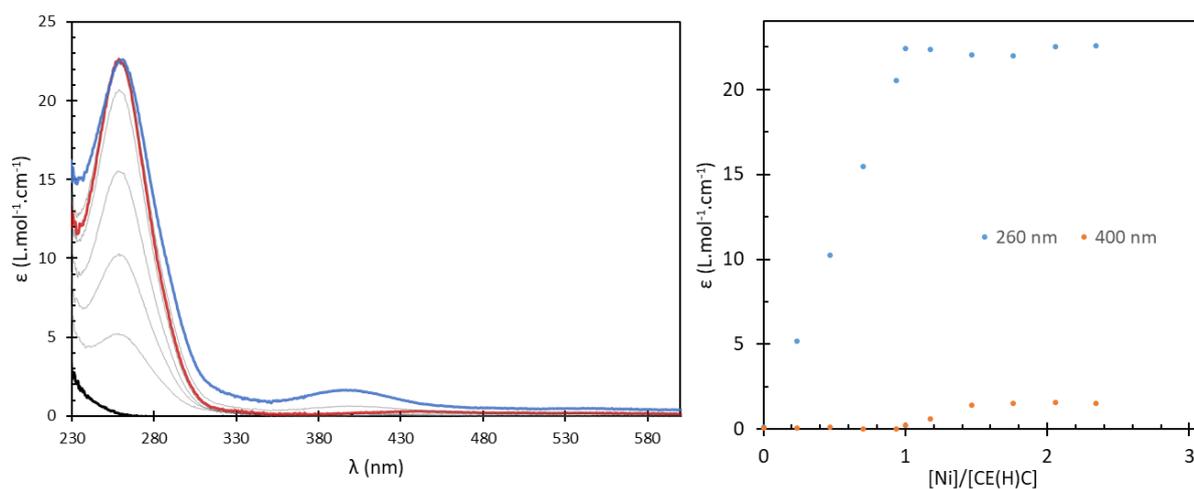


Figure 90. Gauche. Dosage de CE(H)C (25 μ M) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution de l'absorbance à 260 nm et 400 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II}.

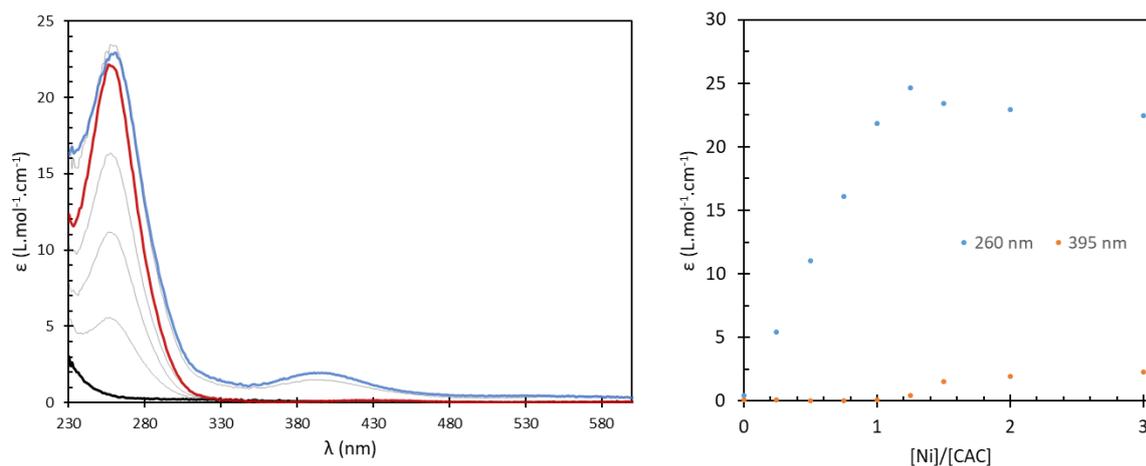


Figure 91. Gauche. Dosage de CAC (38 μ M) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution de l'absorbance à 260 nm et 395 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II}.

2.2. Dichroïsme circulaire

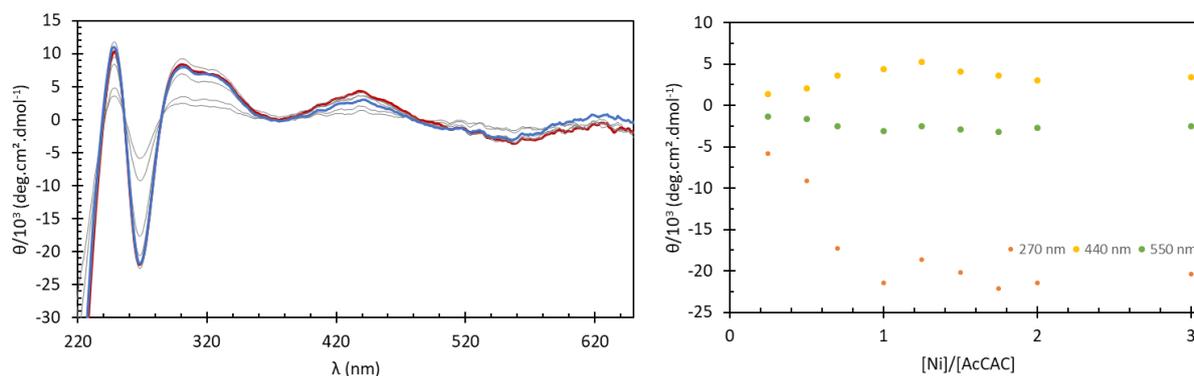


Figure 92. Gauche. Dosage de AcCAC (45 μ M) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution des bandes à 270 nm, 440 nm et 550 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II}.

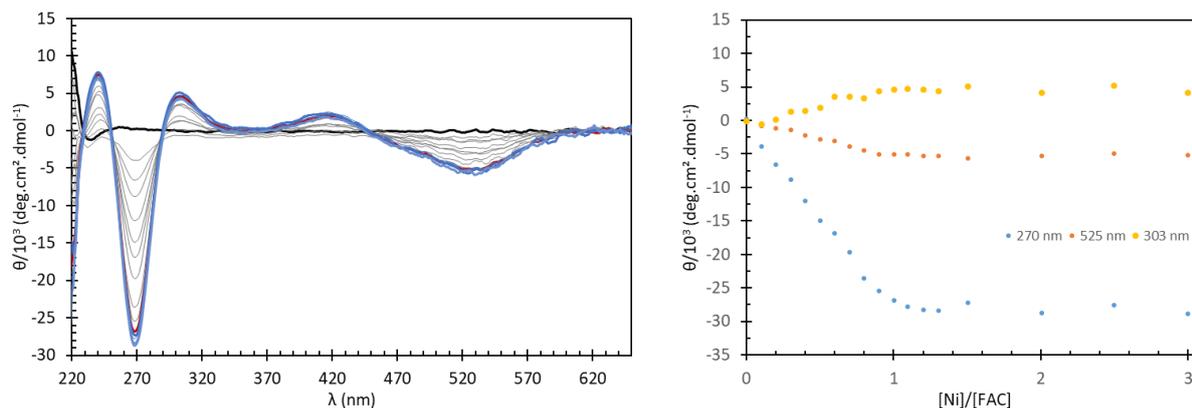


Figure 93. Gauche. Dosage de FAC (46 μM) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution des bandes à 270 nm, 303 nm et 525 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II}.

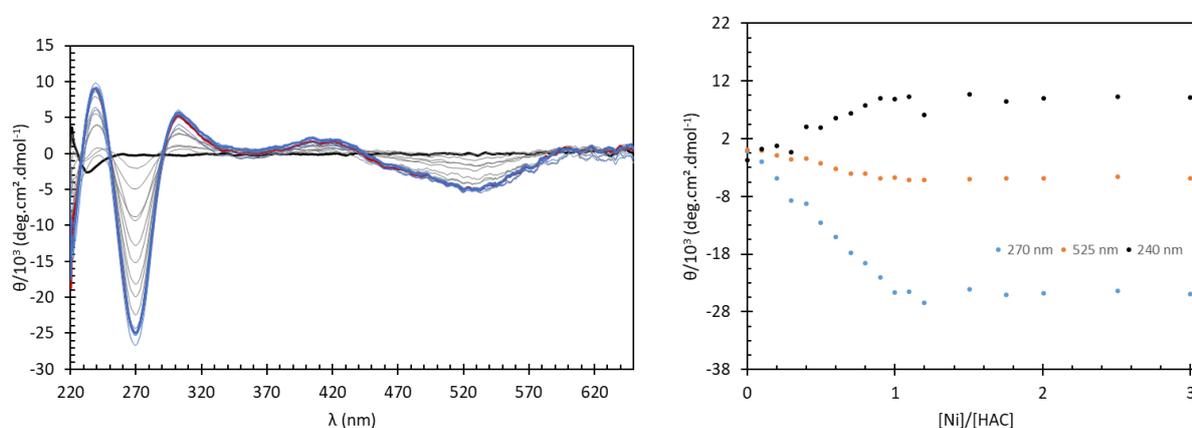


Figure 94. Gauche. Dosage de HAC (42 μM) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution des bandes à 270 nm, 240 nm et 525 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II}.

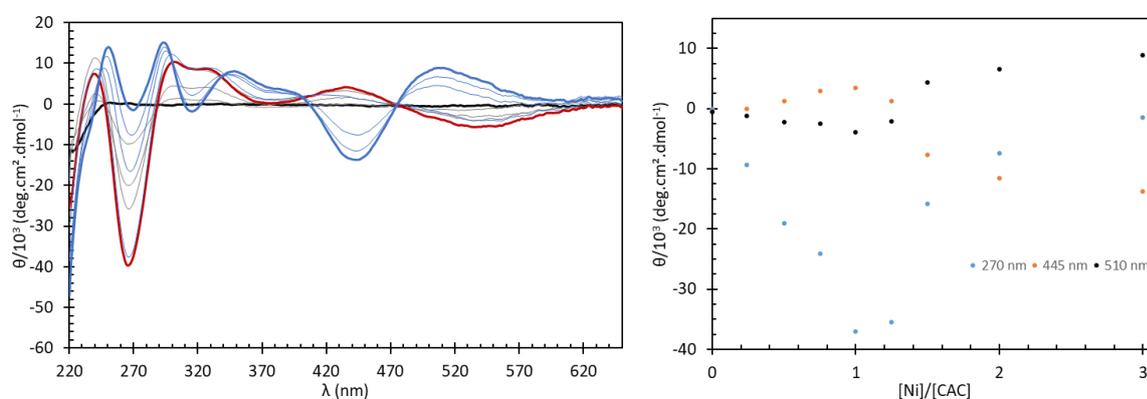


Figure 95. Gauche. Dosage de CAC (38 μM) par NiSO₄, tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, [NaCl] = 100 mM). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution des bandes à 270 nm, 445 nm et 510 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II}.

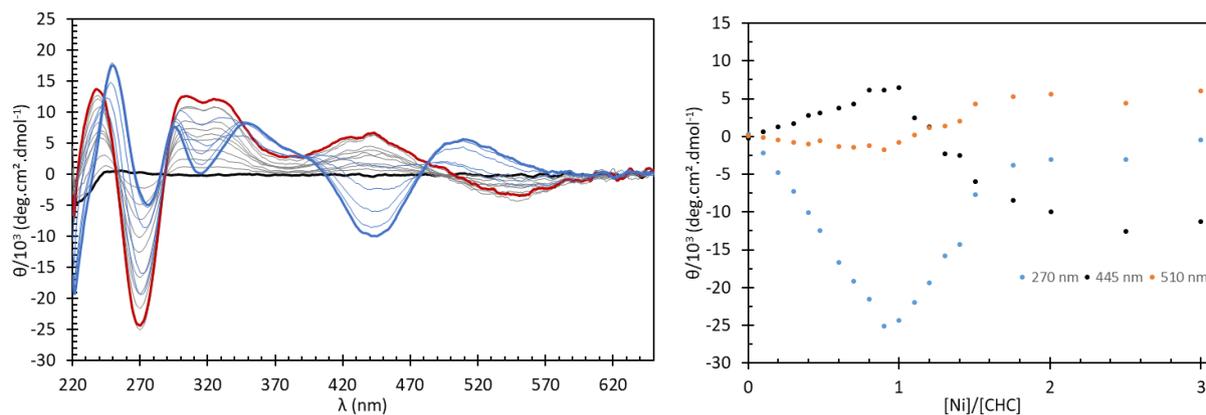


Figure 96. Gauche. Dosage de CHC ($38 \mu\text{M}$) par NiSO_4 , tampon HEPES (20 mM , $\text{pH } 7,4$, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$). Les spectres à 0, 1 et 2 équivalents de nickel sont représentés respectivement en noir, rouge et bleu. Droite : Evolution des bandes à 270 nm, 445 nm et 510 nm en fonction du nombre d'équivalent de Ni^{II} .

3. Spectrométrie de masse

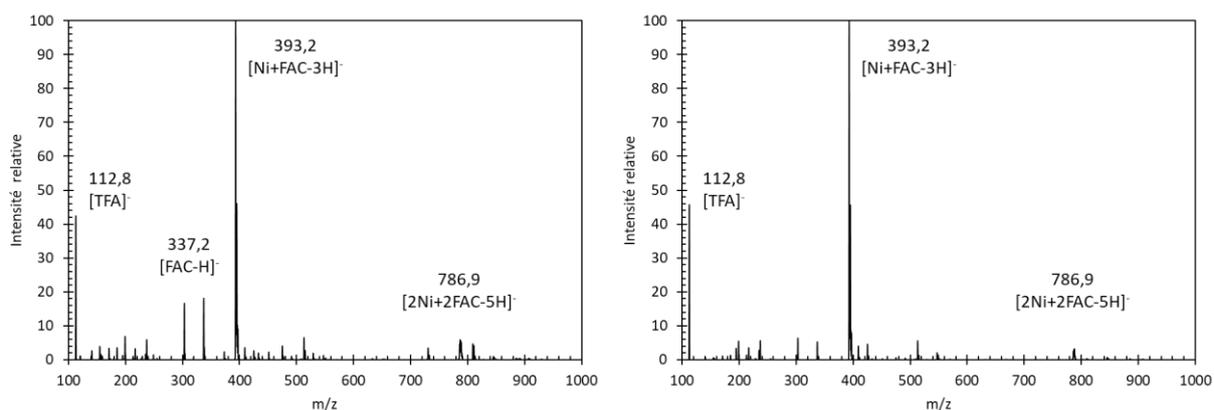


Figure 97. Spectres de masse (ESI-MS(-)) du ligand FAC ($239 \mu\text{M}$) avec 1 équivalent (gauche) et 1,5 équivalent (droite) de Ni^{II} dans NH_4OAc (20 mM , $\text{pH } 6,9$).

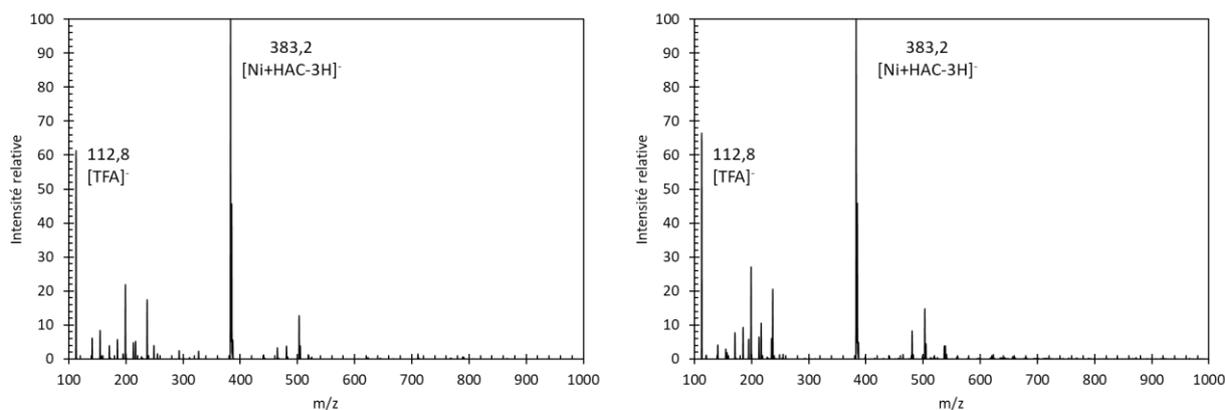


Figure 98. Spectres de masse (ESI-MS(-)) du ligand HAC ($180 \mu\text{M}$) avec 1 équivalent (gauche) et 1,5 équivalent (droite) de Ni^{II} dans NH_4OAc (20 mM , $\text{pH } 6,9$).

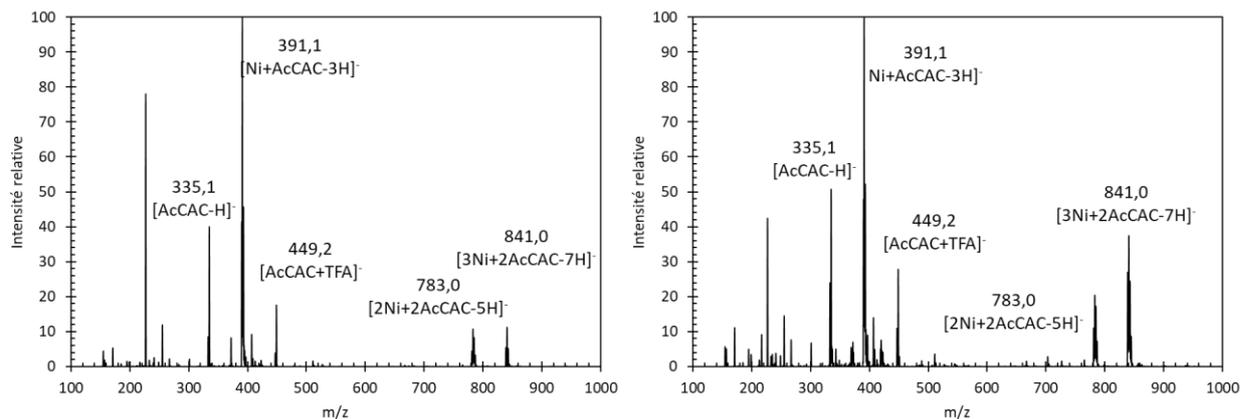


Figure 99. Spectres de masse (ESI-MS(-)) du ligand AcCAC (167 μM) avec 1 équivalent (gauche) et 1,5 équivalent (droite) de Ni^{II} dans NH_4OAc (20 mM, pH 6,9).

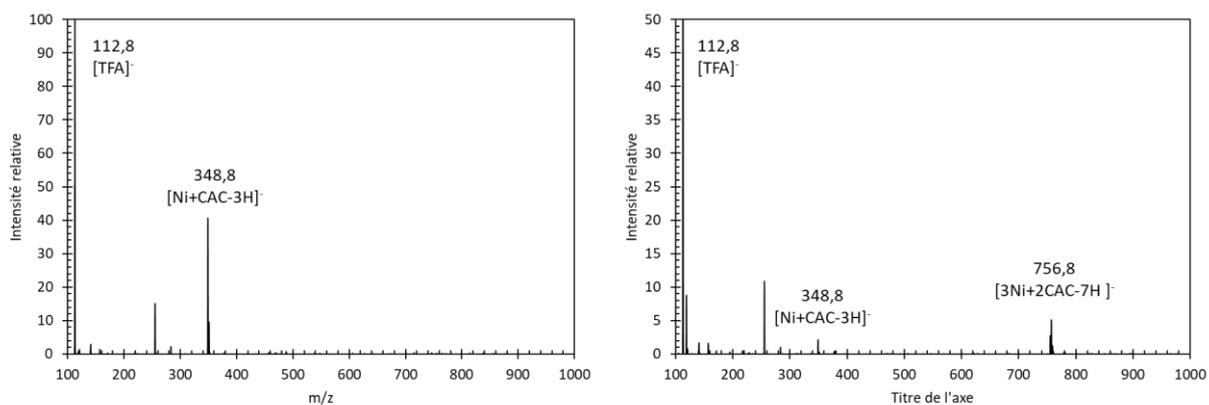


Figure 100. Spectres de masse (ESI-MS(-)) du ligand CAC (173 μM) avec 1 équivalent (gauche) et 1,5 équivalent (droite) de Ni^{II} dans NH_4OAc (20 mM, pH 6,9).

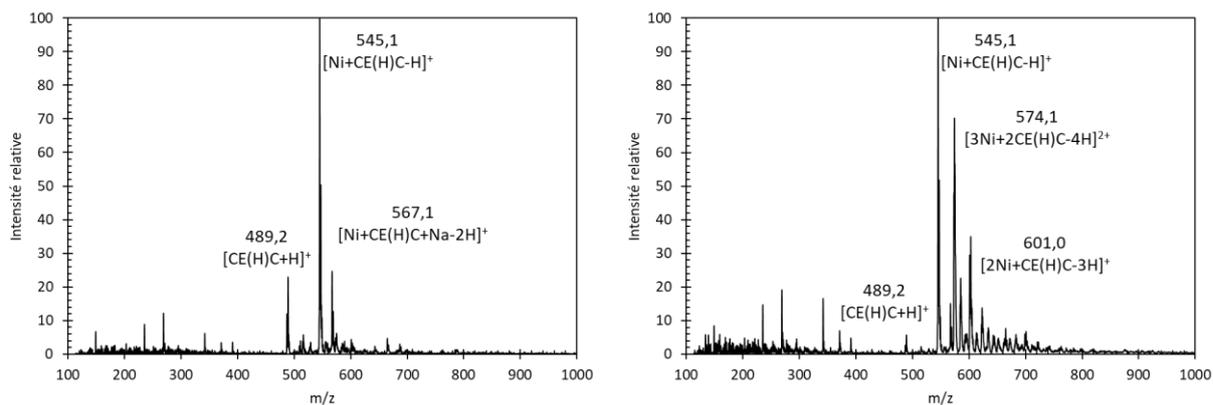


Figure 101. Spectres de masse (ESI-MS(+)) du ligand CE(H)C (140 μM) avec 1 équivalent (gauche) et 1,5 équivalent (droite) de Ni^{II} dans NH_4OAc (20 mM, pH 6,9).

4. Effet du pH

4.1. Spectroscopie UV-Visible

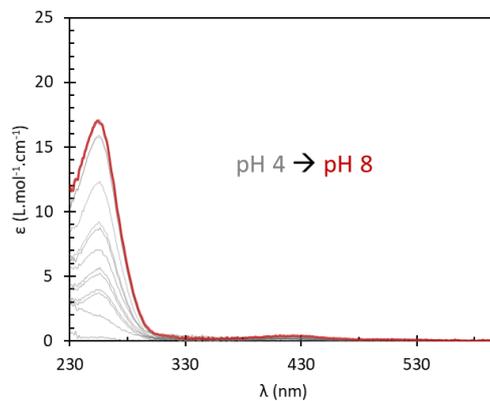


Figure 102. Spectres UV pour FAC (27 μM) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH.

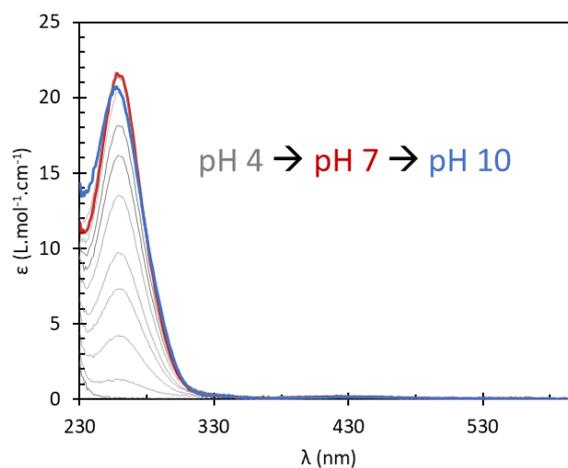


Figure 103. Spectres UV pour CE(H)C (30 μM) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH.

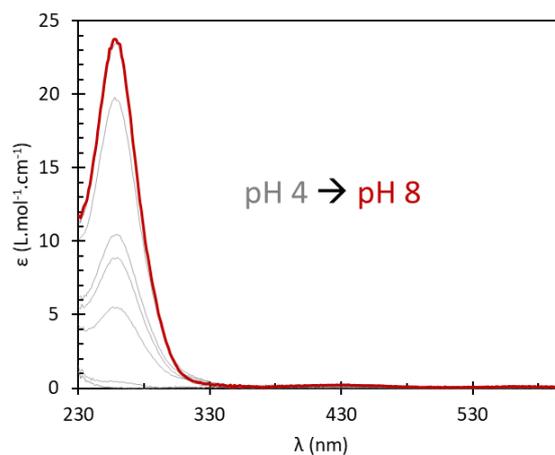


Figure 104. Spectres UV pour CAC (34 μM) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH.

4.2. Dichroïsme circulaire

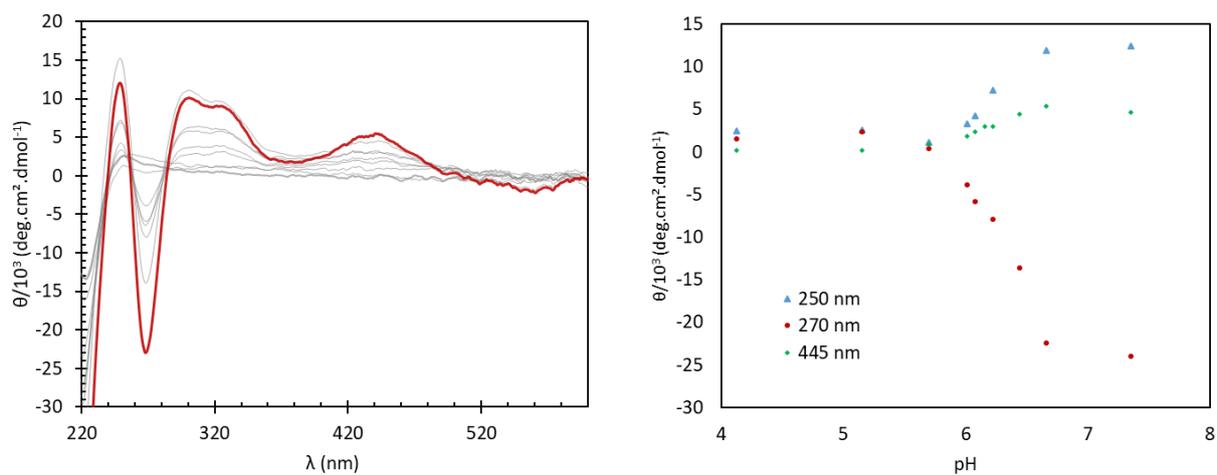


Figure 105. Gauche : Spectres CD pour AcCAC (30 μM) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH.

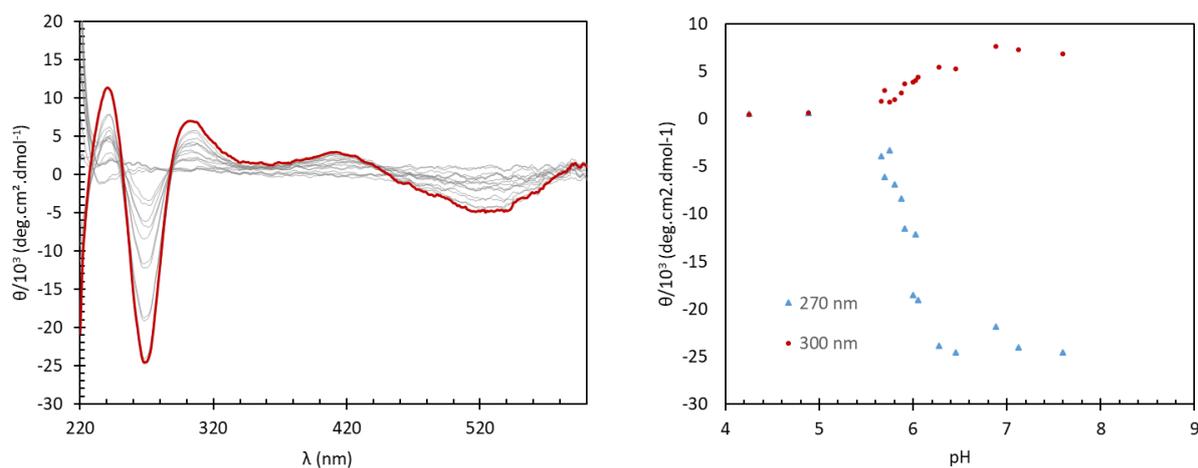


Figure 106. Gauche : Spectres CD pour FAC (27 μM) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH.

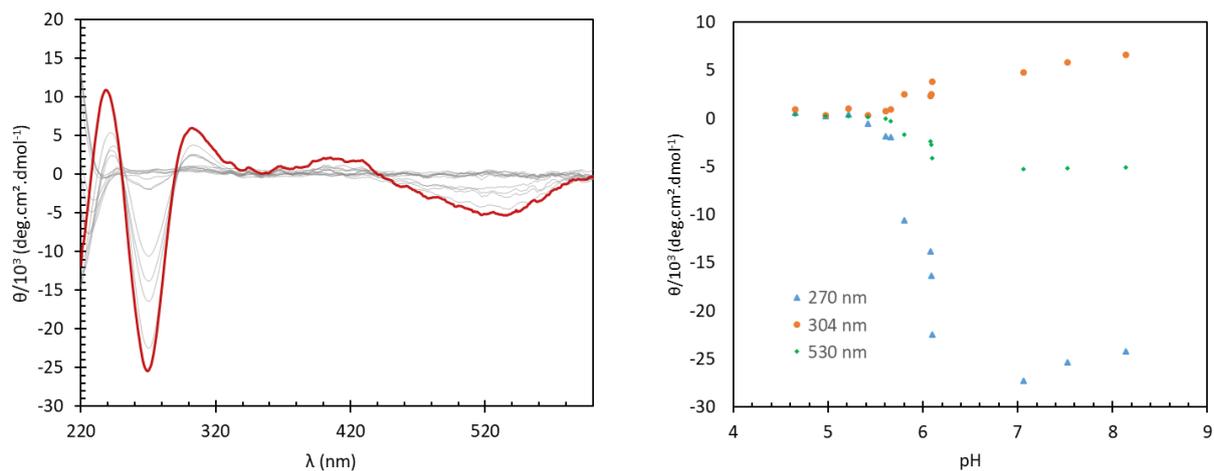


Figure 107. Gauche : Spectres CD pour FAC (27 μ M) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH.

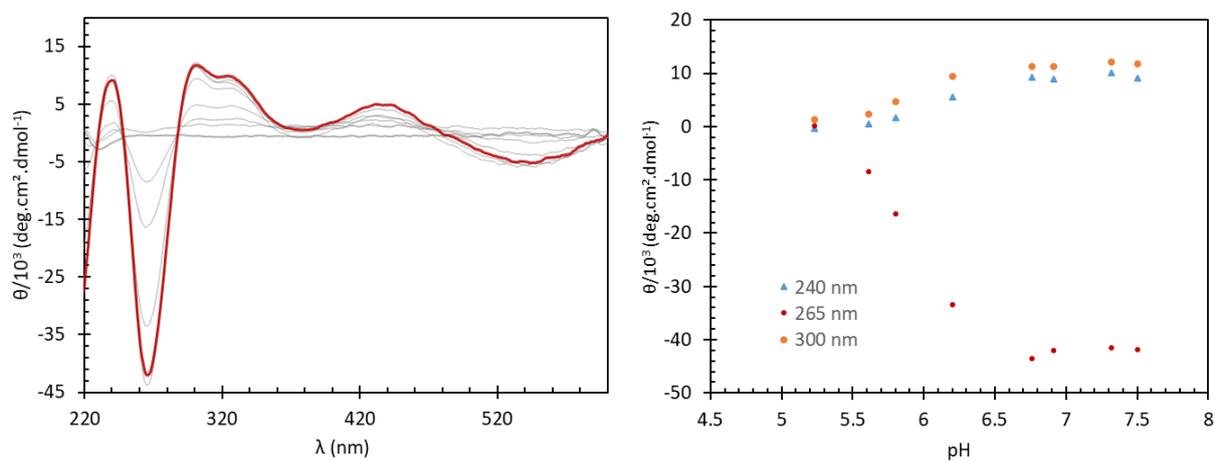


Figure 108. Gauche : Spectres CD pour CAC (34 μ M) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH.

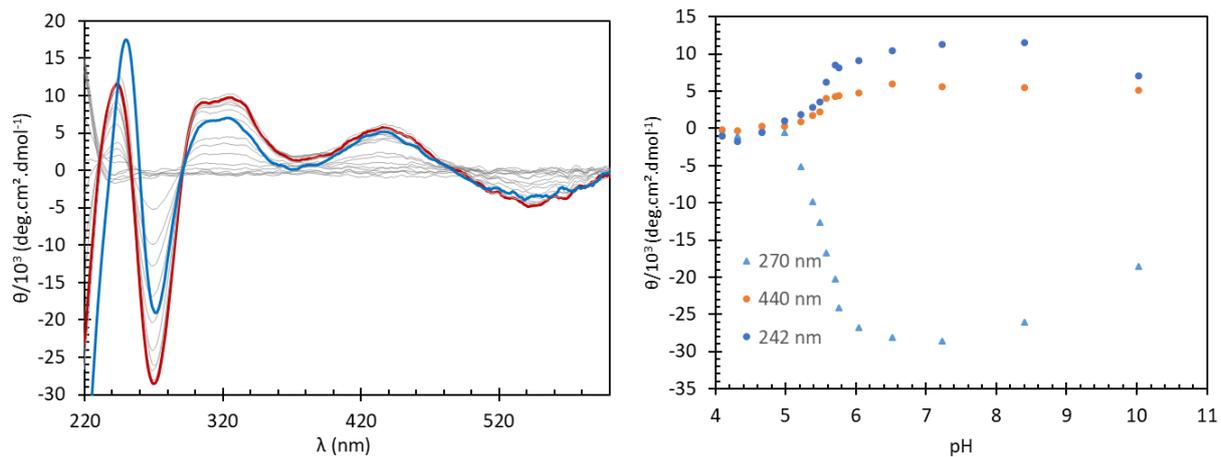


Figure 109. Gauche : Spectres CD pour CE(H)C (30 μ M) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH.

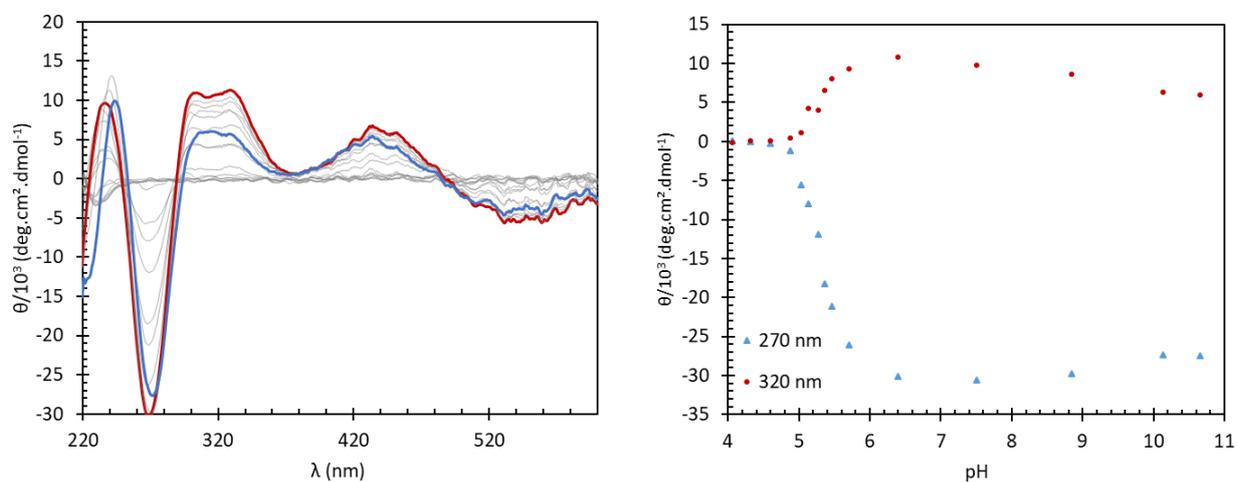


Figure 110. Gauche : Spectres CD pour CHC (29 μ M) avec 0,9 équivalent de nickel dans l'eau en fonction du pH. Droite : Evolution de l'absorbance en fonction du pH.

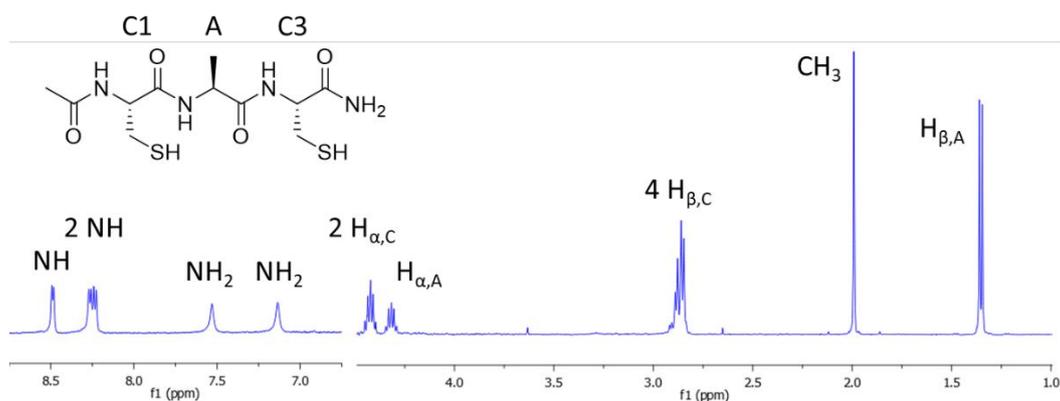
5. RMN ¹H

Figure 111. Spectre RMN ¹H à 500 MHz de AcCAC (1,0 mM) dans H₂O/D₂O (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

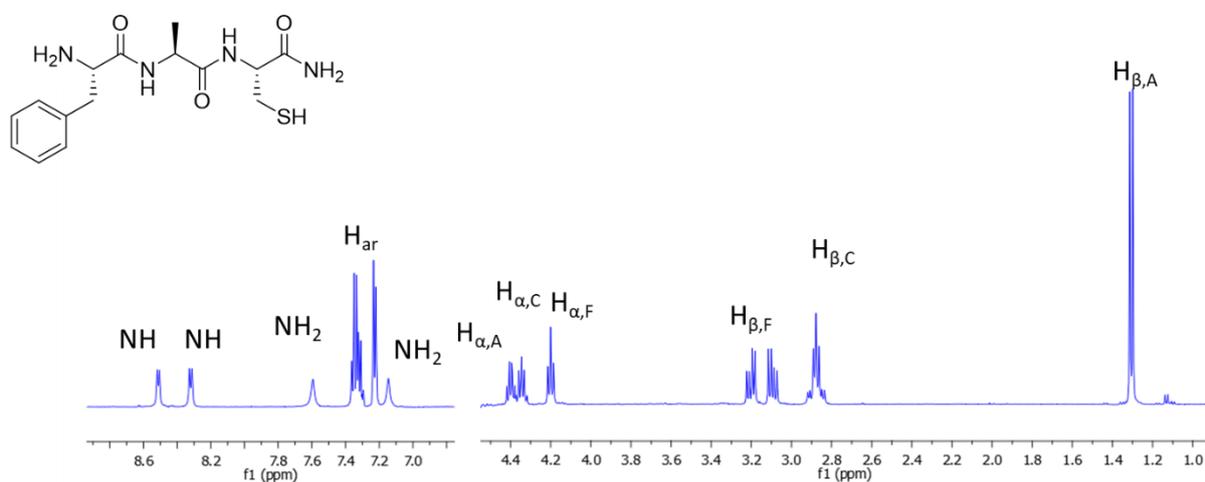


Figure 112. Spectre RMN ¹H à 500 MHz de FAC (1,4 mM, pH 3,0) dans H₂O/D₂O (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

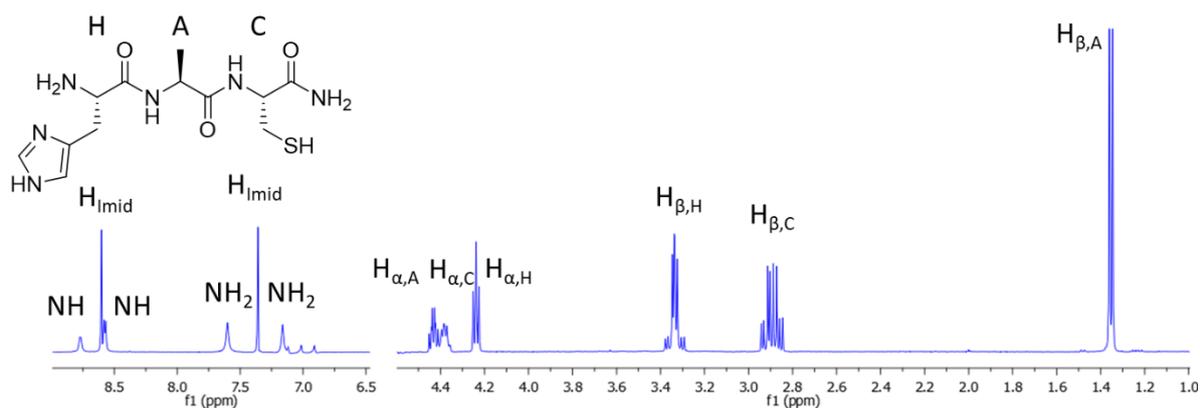


Figure 113. Spectre RMN ¹H à 500 MHz de HAC (1,4 mM, pH 3,9) dans H₂O/D₂O (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

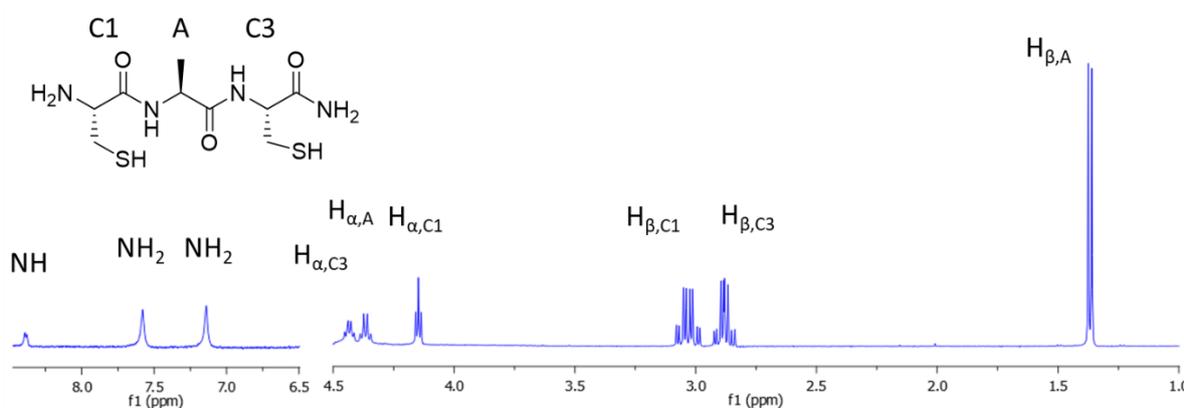


Figure 114. Spectre RMN ¹H à 500 MHz de CAC (1,2 mM, pH 5,2) dans H₂O/D₂O (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

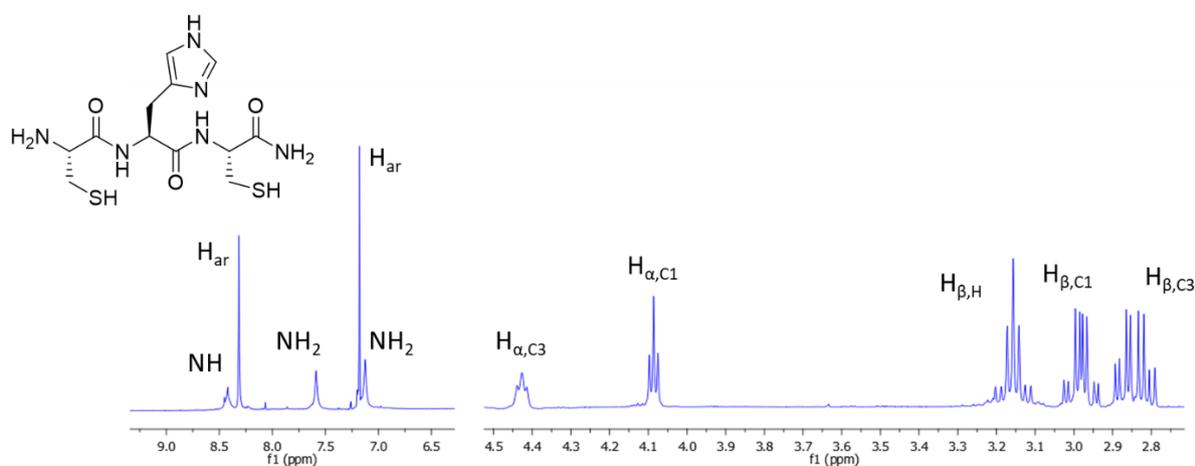


Figure 115. Spectre RMN ¹H à 500 MHz de CHC (1,3 mM, pH 5,4) dans H₂O/D₂O (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

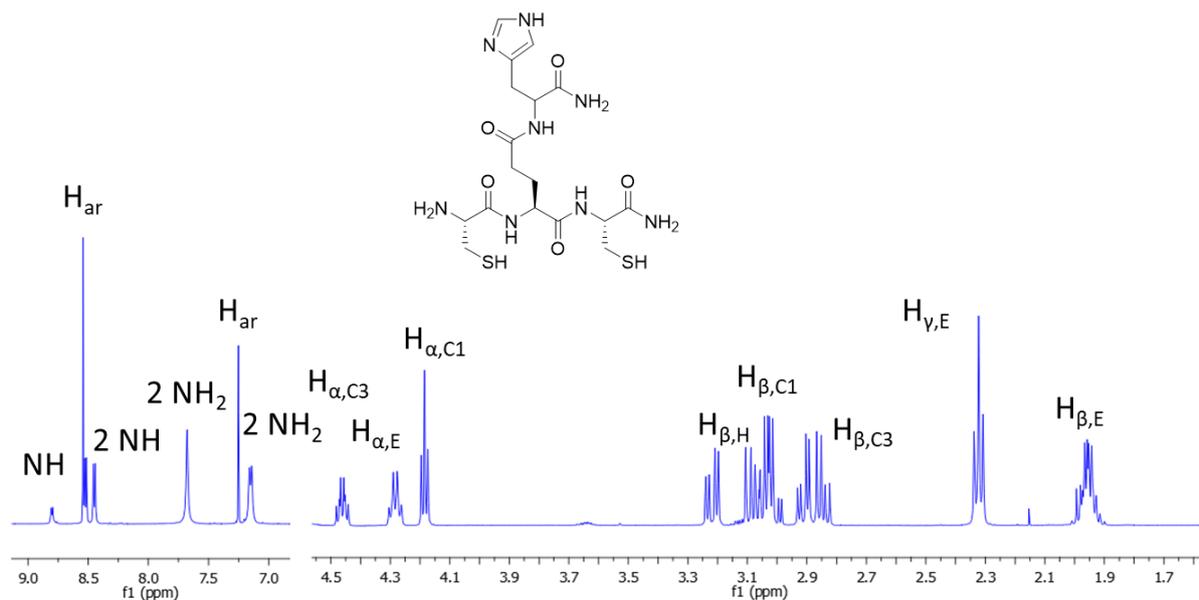


Figure 116. Spectre RMN ^1H à 500 MHz de CE(H)C (2,5 mM, pH 3,6) dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

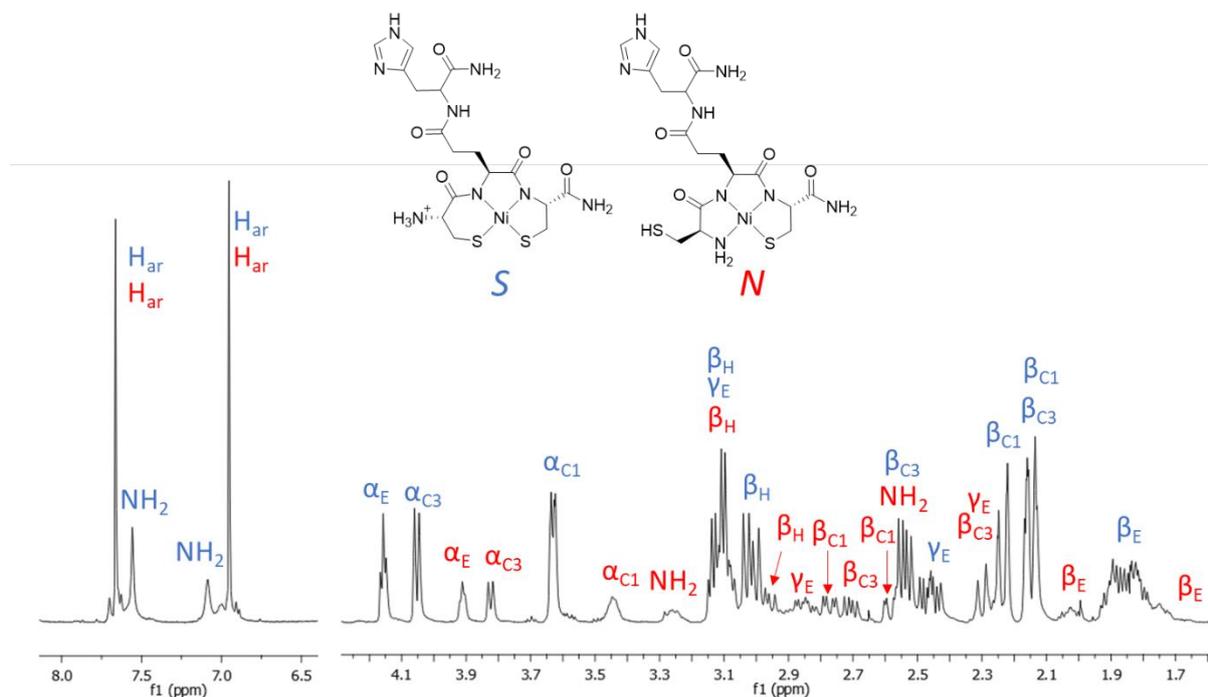


Figure 117. Spectres RMN ^1H à 500 MHz de CE(H)C (1,0 mM, pH 7,9) avec 0,9 équivalent de Ni^{II} dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

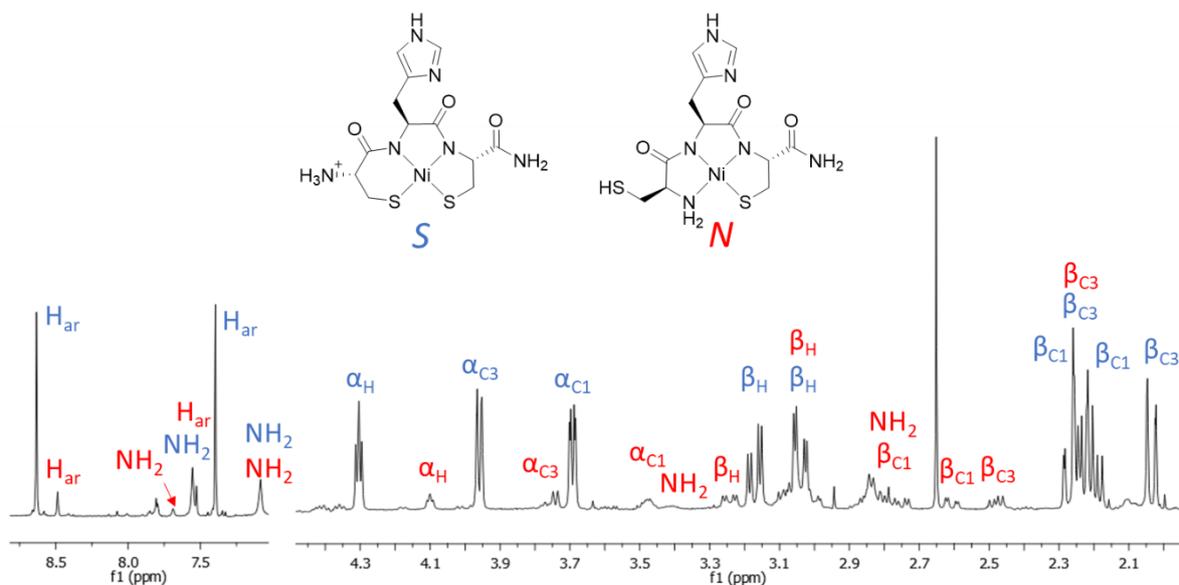


Figure 118. Spectres RMN ^1H à 500 MHz de CHC (1,1 mM, pH 7,1) avec 0,9 équivalent de Ni^{II} dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) à 298 K. Les spectres entre 6,5 et 9 ppm ont été acquis avec une séquence de pulse Watergate, et les spectres entre 1 et 4,5 ppm par présaturation.

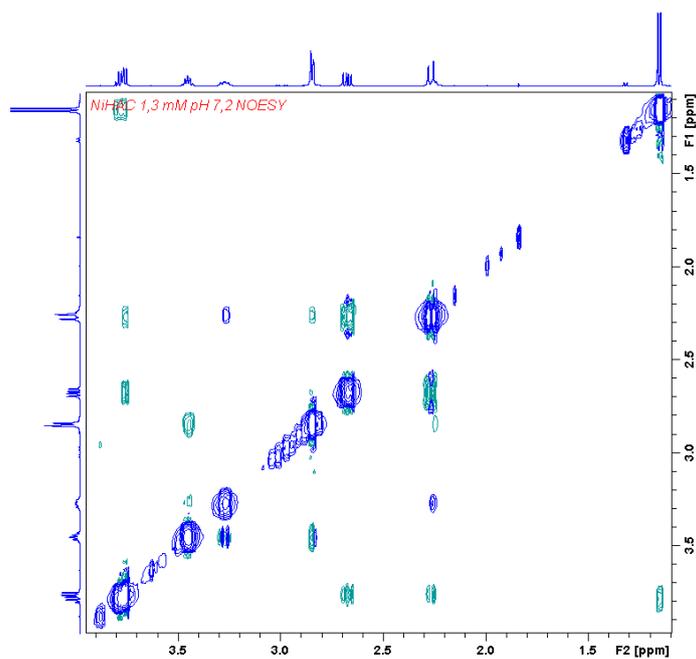


Figure 119. Spectre NOESY-Watergate 500 MHz de HAC avec 0,9 équivalent de Ni^{II} (1,3 mM, pH 7,2) dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) à 298 K. Temps de mélange 500 ms. Tâches vertes : effet NOE, tâches bleues hors diagonale : échange.

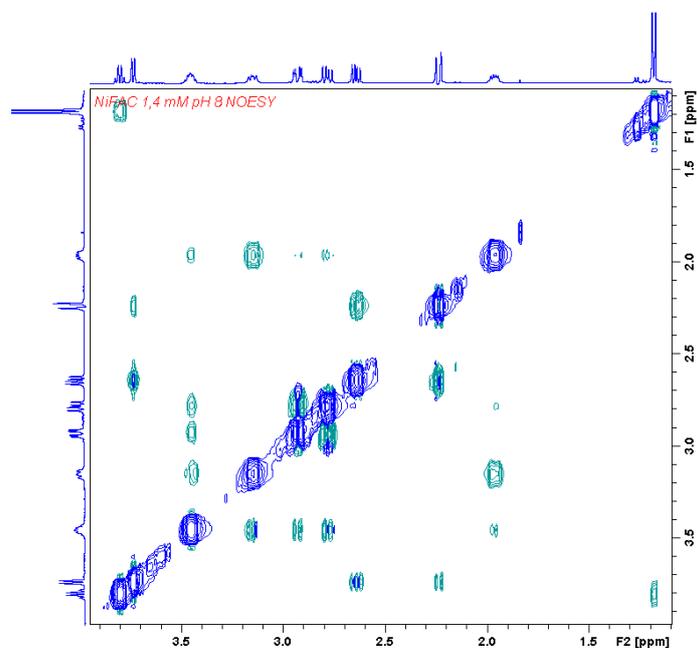


Figure 120. Spectre NOESY-Watergate 500 MHz de FAC avec 0,9 équivalent de Ni^{II} (1,4 mM, pH 8) dans H_2O/D_2O (90:10) à 298 K. Temps de mélange 500 ms. Tâches vertes : effet NOE, tâches bleues hors diagonale : échange.

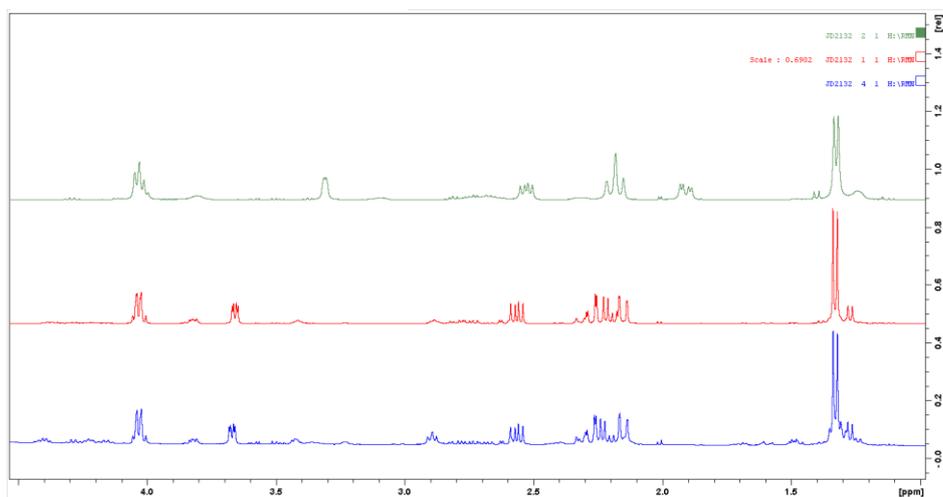


Figure 121. Spectres RMN 1H à 500 MHz de CAC (1,1 mM) avec 0,9 équivalent de Ni^{II} dans D_2O à 298 K à pD 6,5 (bleu), pH 7,9 (rouge) et pH 10,1 (vert).

6. Spectroscopie d'absorption des rayons X

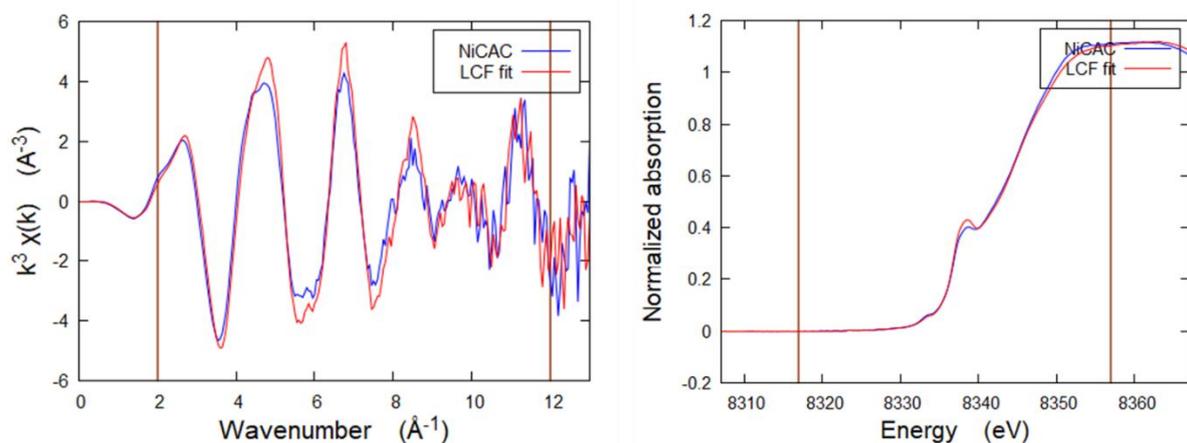


Figure 122. Spectres EXAFS pondéré par k^3 (gauche) et XANES (droite) de NiCAC et fits obtenus par combinaison linéaire des spectres de NiFAC et NiAcCAC. Intervalles considérés : $2 < k < 12$ et $8317 < eV < 8357$.

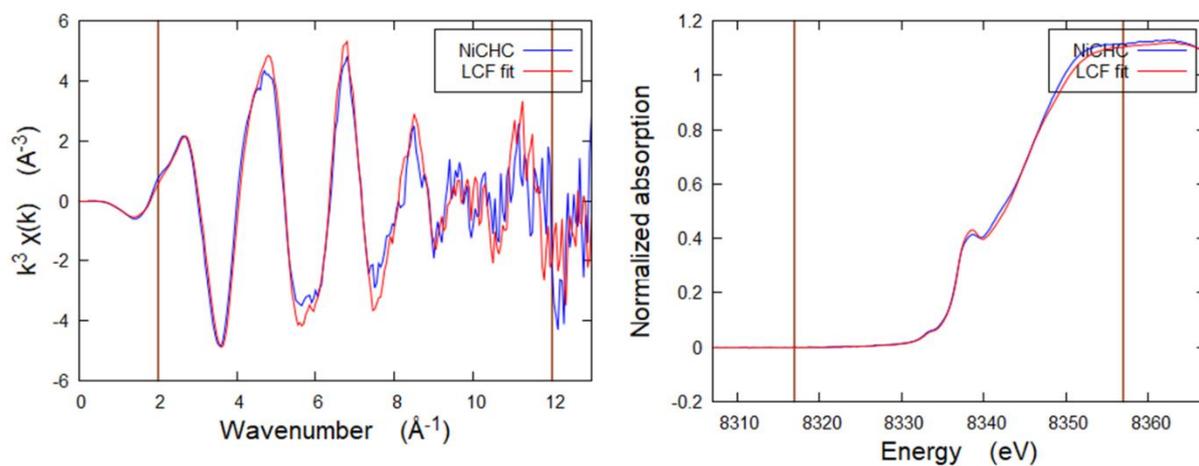


Figure 123. Spectres EXAFS pondéré par k^3 (gauche) et XANES (droite) de NiCHC et fits obtenus par combinaison linéaire des spectres de NiFAC et NiAcCAC. Intervalles considérés : $2 < k < 12$ et $8317 < eV < 8357$.

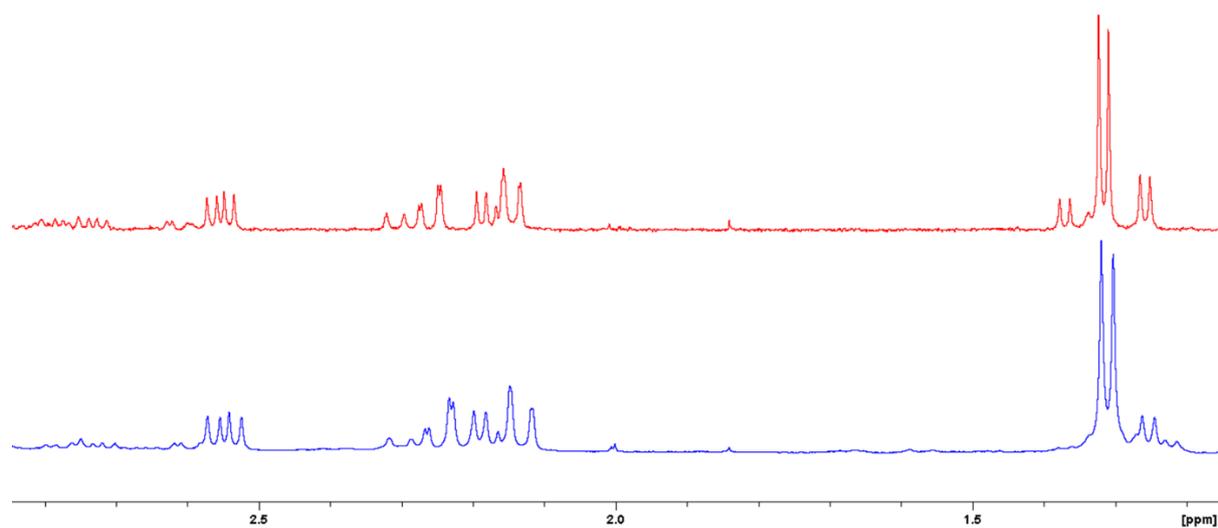


Figure 124. Spectres RMN ^1H à 500 MHz de CAC (1,1 mM) avec 0,9 équivalent de Ni^{II} dans D_2O (bleu) et $\text{D}_2\text{O}/\text{Glycérol-D8}$ (80/20) (rouge) à 298 K à pD 8,4.

7. DFT

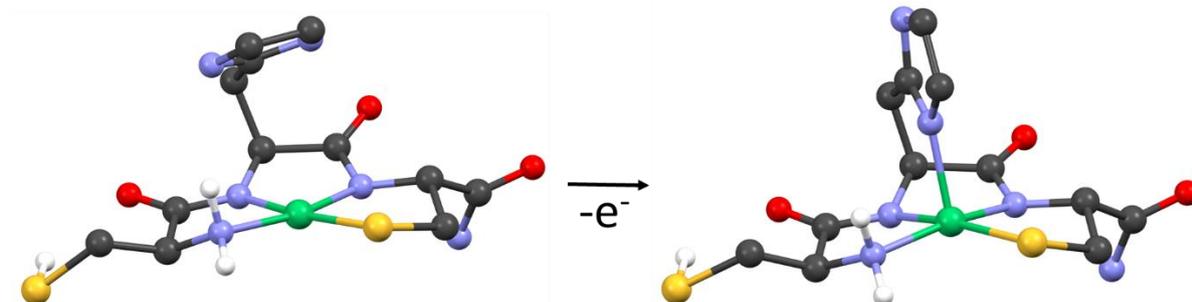


Schéma 41. Structures optimisées pour $\text{Ni}^{\text{II}}\text{CHC}$ et $\text{Ni}^{\text{III}}\text{CHC}$ en coordination N.

8. Electrochimie

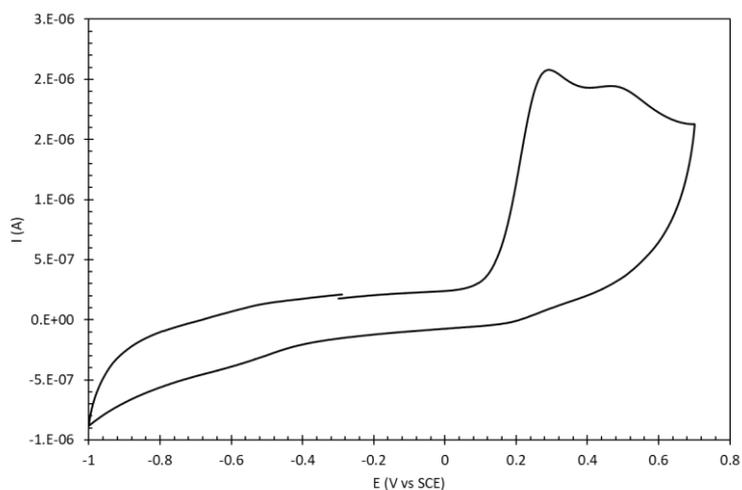


Figure 125. CV du complexe NiCE(H)C (520 μM), à 10 mV/s, dans tampon HEPES (20 mM, pH 7,4, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$). Electrode de travail : carbone vitreux, électrode de référence : SCE.

9. Xanthine Oxydase

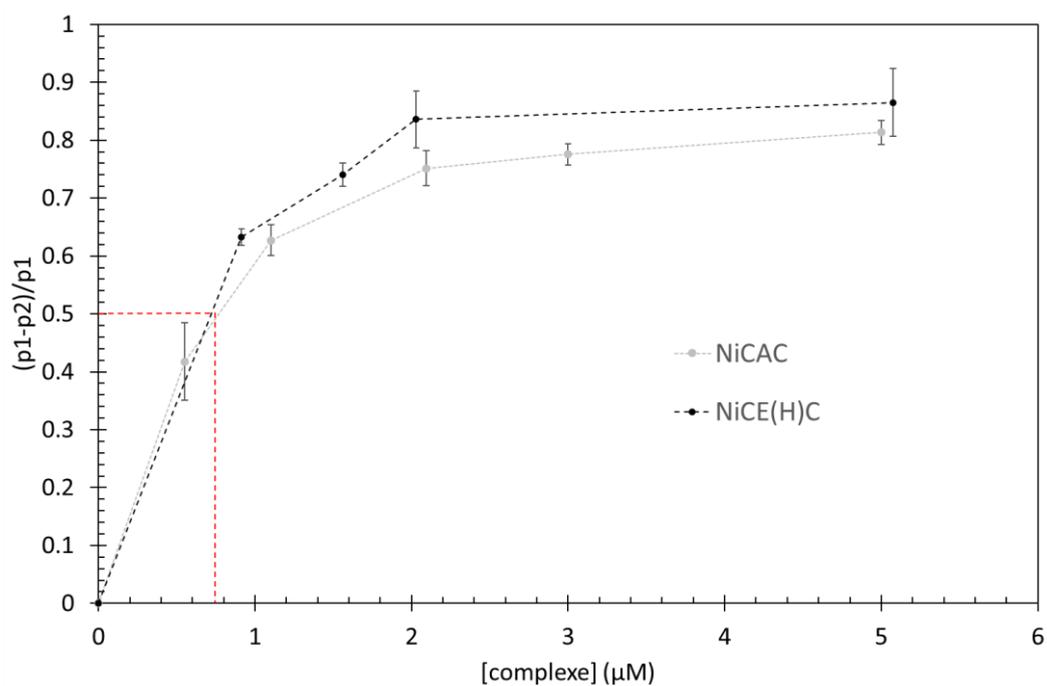


Figure 126. Détermination de l' IC_{50} pour NiCAC et NiCE(H)C

10. Stopped-Flow

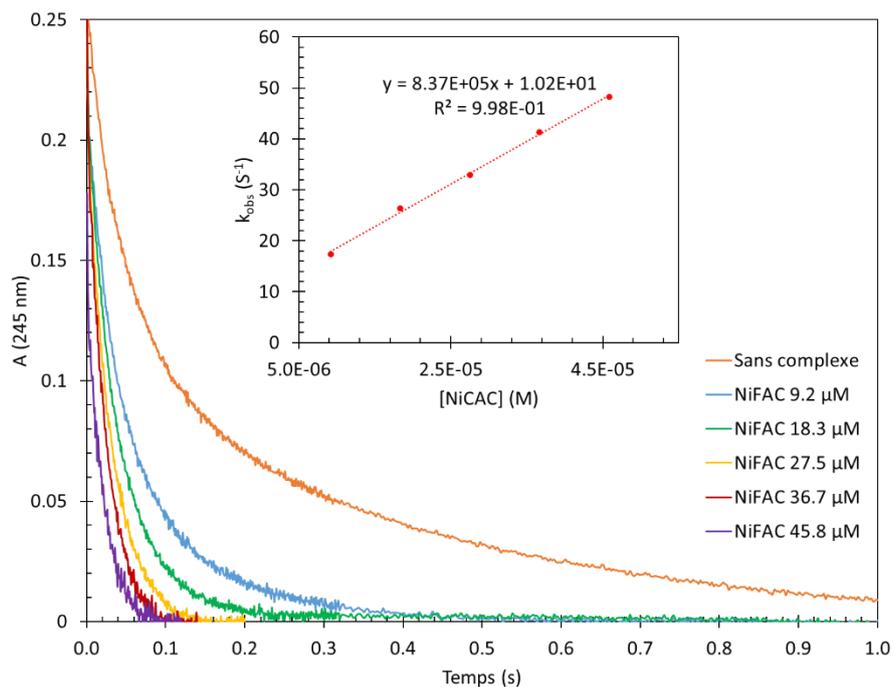


Figure 127. Suivi de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ (0,42 mM) par spectroscopie UV, sans et avec NiFAC à différentes concentrations. Encadré : détermination de k_{cat} .

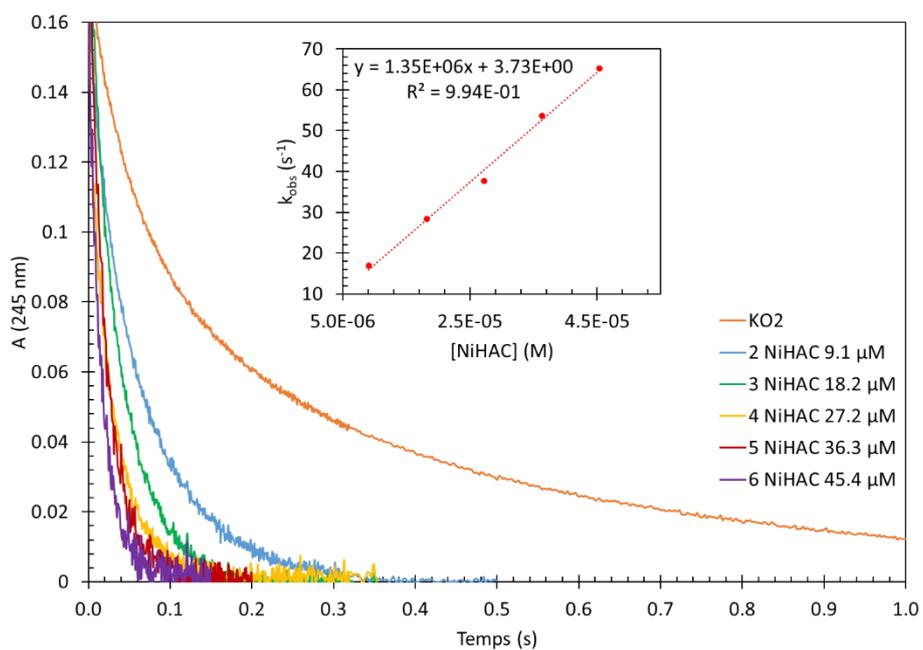


Figure 128. Suivi de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ (0,48 mM) par spectroscopie UV, sans et avec NiHAC à différentes concentrations. Encadré : détermination de k_{cat} .

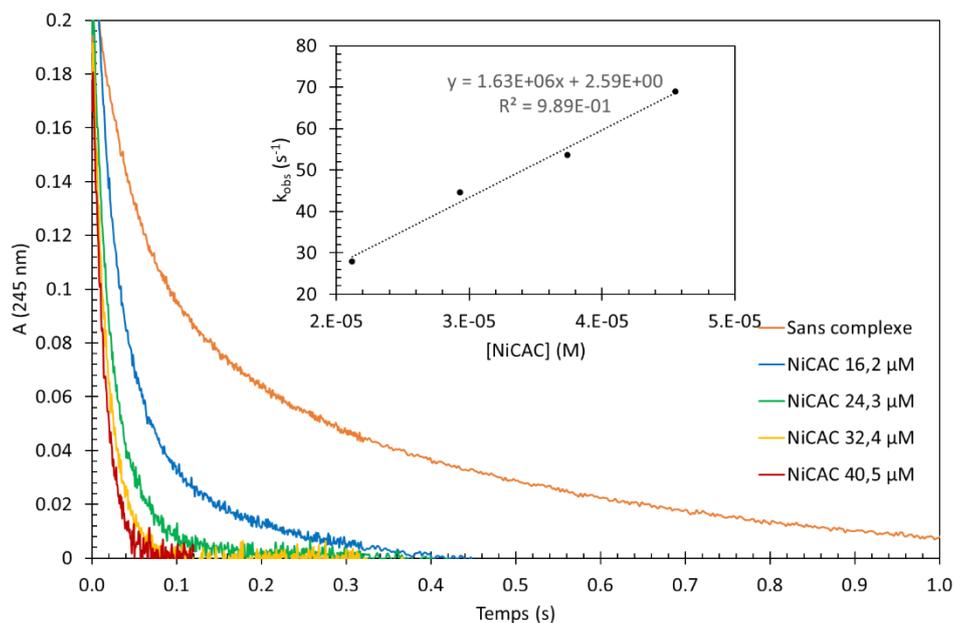


Figure 129. Suivi de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ (0,51 mM) par spectroscopie UV, sans et avec NiCAC à différentes concentrations. Encadré : détermination de k_{cat} .

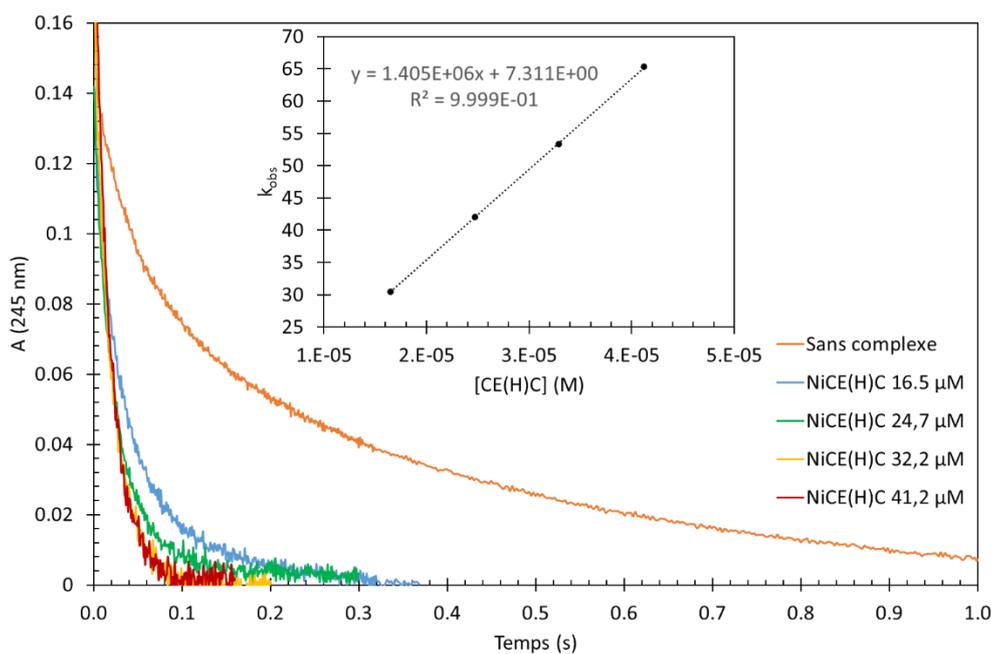


Figure 130. Suivi de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ (0,44 mM) par spectroscopie UV, sans et avec NiCE(H)C à différentes concentrations. Encadré : détermination de k_{cat} .

Annexes Chapitre IV.

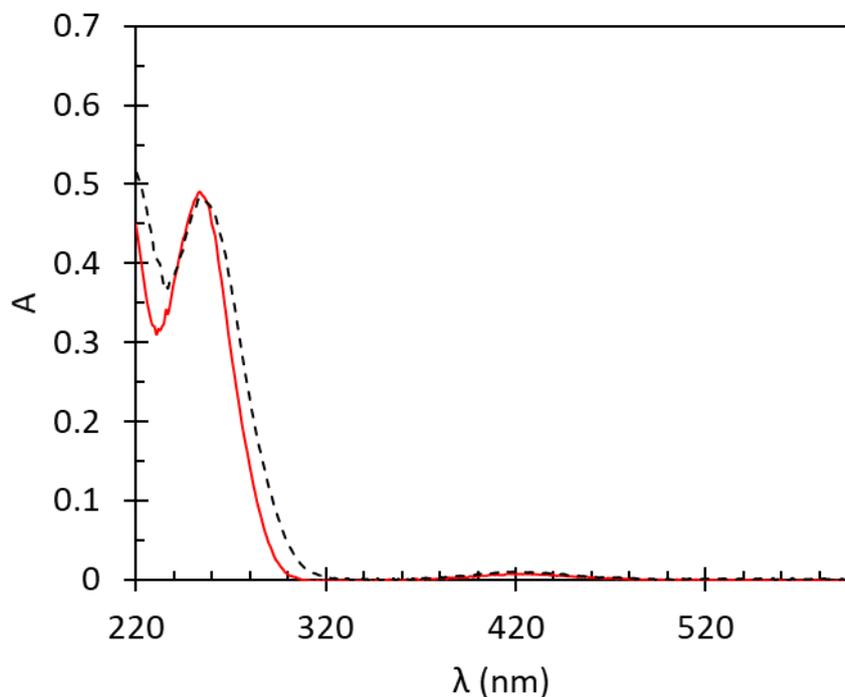
3. Spectroscopie UV-Vis

Figure 131. Spectres UV-Visible de NiHAC ($30 \mu\text{M}$) dans tampon HEPES 20 mM, pH 7,4 (rouge), et dans l'acétonitrile (noir).

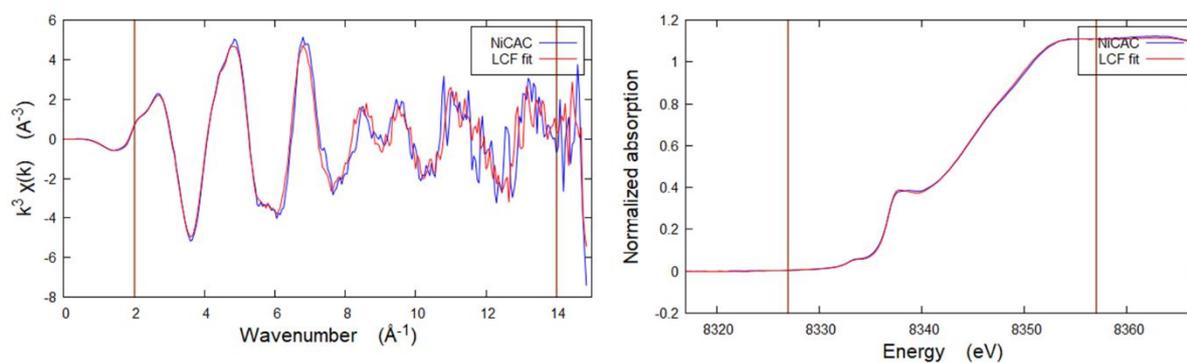
4. Spectroscopie d'absorption des rayons X

Figure 132. Spectres EXAFS pondéré par k^3 (gauche) et XANES (droite) de NiCAC et spectres obtenus par combinaison linéaire des spectres de NiFAC et NiAcCAC. Intervalles considérés : $2 < k < 14$ et $8327 < eV < 8357$.

5. Spectrométrie de masse

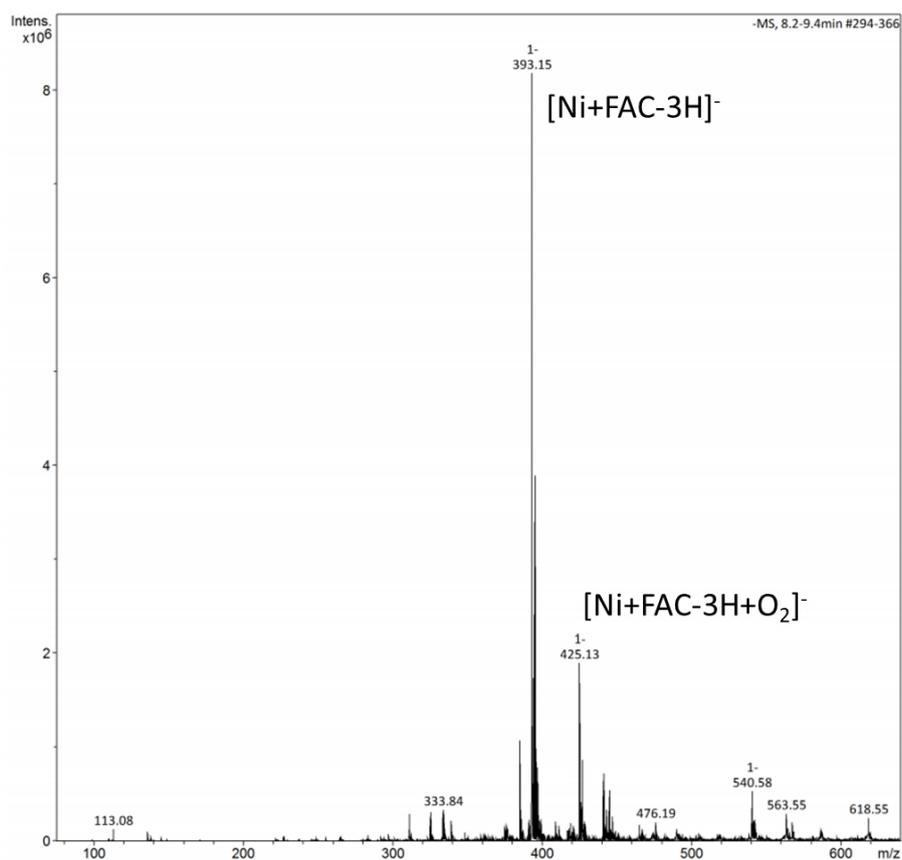


Figure 133. Spectre de masse (ESI-MS(-)) de NiFAC (0,2 mM) avec un équivalent de KO_2 dans l'acétonitrile.

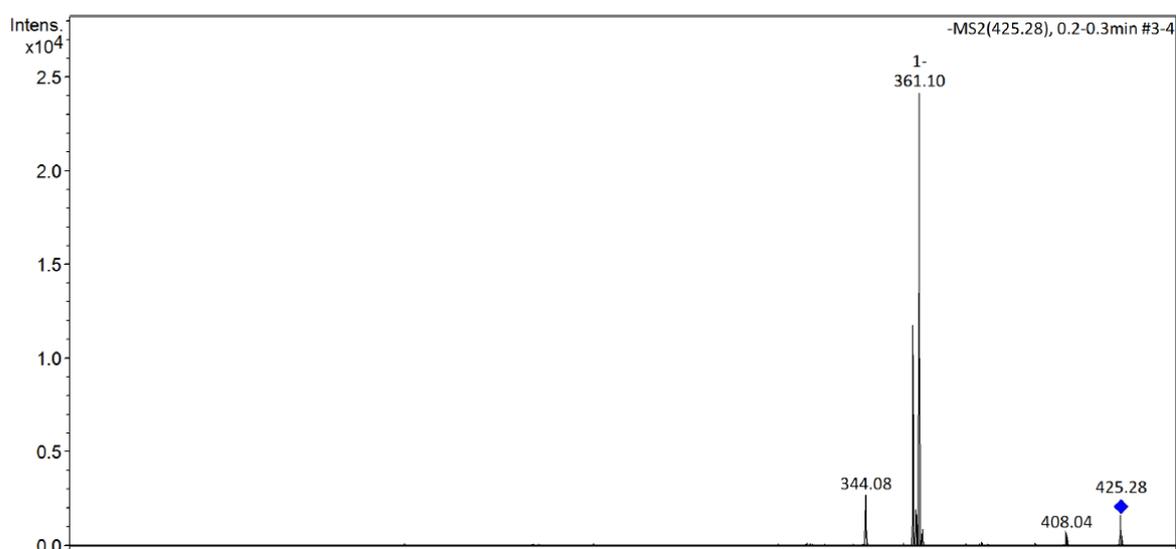


Figure 134. Spectre MS/MS du pic à m/z = 425,28.

Résumé

Le superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est une espèce réactive de l'oxygène produite par de nombreux métabolismes chez les espèces vivant en condition aérobie. Ses propriétés radicalaires font de $O_2^{\bullet-}$ une espèce très réactive capable d'endommager les macromolécules présentes dans les cellules, conduisant entre autre au stress oxydant et à de possibles troubles neurodégénératifs. Pour se protéger, la Nature utilise des enzymes, appelées superoxydes dismutases (SOD), qui sont chargées de catalyser la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. La dernière qui fut découverte est la NiSOD qui comporte un ion nickel dans son site actif. Contrairement aux autres types de SOD, celle-ci n'est pas présente chez l'homme et ne l'est que chez certaines bactéries comme *Chlamydiae*. Ainsi, cibler la NiSOD est une méthode prometteuse pour le développement de nouveaux antibiotiques. De même, le développement de nouveaux complexes biomimétiques des SOD peut conduire à de nouveaux agents thérapeutiques contre les maladies liées au stress oxydant. Notre projet consiste à développer de nouveaux modèles actifs de la NiSOD, avec comme stratégie l'utilisation de ligands peptidiques. Les deux principaux objectifs sont (1) de développer des catalyseurs de type SOD, actifs dans l'eau, mais aussi (2) d'acquérir des informations supplémentaires sur le mécanisme mis en jeu lors de la catalyse par la NiSOD, afin de mettre en évidence les intermédiaires clés et les différences majeures entre la NiSOD et les autres SODs présentes chez l'homme. Nos résultats montrent qu'une bonne activité catalytique peut être obtenue même avec une sphère de coordination différente de celle de l'enzyme, et mettent en évidence des facteurs clés pour l'activité. De plus, des études mécanistiques tendent à montrer un mécanisme en sphère interne pour la réduction du superoxyde.

The superoxide radical anion, $O_2^{\bullet-}$, is generated by many life processes. Its radical properties make it a highly reactive species able to damage all macromolecules contributing to the pathogenesis of many diseases including neurodegenerative disorders. In order to protect cells against $O_2^{\bullet-}$, Nature uses superoxide dismutases (SODs) which catalyze the dismutation of $O_2^{\bullet-}$ into hydrogen peroxide and oxygen. The last discovered SOD contains a nickel cofactor. Importantly the NiSOD is found in several pathogenic bacteria but not in humans. Therefore targeting the NiSOD is a promising approach to develop antibiotics. Secondly, the development of novel SOD mimics may have potential uses as therapeutic agents in oxidative stress-related diseases. Our project aims at developing innovative active NiSOD mimics, based on the use of peptide-based ligands with two main objectives: (i) to develop efficient SOD like catalysts, active in water, displaying antioxidant properties for potential therapeutic applications and (ii) to contribute to the full understanding of the catalytic mechanism of the NiSOD to highlight the specific key elements that differentiate NiSOD from the human MnSOD for the design of potential antibiotics. Our results show that, even with a coordination sphere different from the one in the enzyme, a good catalytic activity can be obtained. Key elements for the activity are also determined. Moreover, mechanistic studies indicates an inner sphere mechanism for superoxide reduction.