



Élaboration et étude de nouveaux complexes métalliques constitués d'un ligand peptidique et mimant la catalase, une metalloenzyme antioxydante

Koudedja Coulibaly

► To cite this version:

Koudedja Coulibaly. Élaboration et étude de nouveaux complexes métalliques constitués d'un ligand peptidique et mimant la catalase, une metalloenzyme antioxydante. Chimie inorganique. Université Paris sciences et lettres, 2020. Français. NNT : 2020UPSLE065 . tel-03635331

HAL Id: tel-03635331

<https://theses.hal.science/tel-03635331>

Submitted on 8 Apr 2022

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 DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à L'École Normale Supérieure

**ELABORATION ET ETUDE DE NOUVEAUX COMPLEXES
METALLIQUES CONSTITUES D'UN LIGAND PEPTIDIQUE ET
MIMANT LA CATALASE, UNE METALLOENZYME
ANTIOXYDANTE**

Soutenue par

Koudedja COULIBALY

Le 13 novembre 2020

Ecole doctorale n° 406

**Chimie moléculaire Paris
Centre**

Spécialité

Chimie bio-inorganique

Composition du jury :

Fabienne, BURLINA Directrice de recherche, PSL	<i>Présidente</i>
Jean-Pierre, MAHY Professeur, Université Paris-Saclay	<i>Rapporteur</i>
Pascale, DELANGLE Directrice de recherche, Université Grenoble Alpes - CEA	<i>Rapporteuse</i>
Marc, LECOUEY Professeur, Paris 13	<i>Examineur</i>
Nicolas, DELSUC Chargé de recherche, ENS-PSL	<i>Directeur de thèse</i>
Clotilde, POLICAR Professeure, ENS-PSL	<i>Directrice de thèse</i>

« La véritable science enseigne, par-dessus tout, à douter et à être ignorant. »

Miguel de Unamun

REMERCIEMENTS

Ces années de doctorat ont été rythmées par des rencontres et des échanges qui m'ont permis d'évoluer humainement et scientifiquement. Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné durant ces années.

Avant tout, j'adresse mes remerciements à Sandrine Sagan, directrice du Laboratoire des Biomolécules, et Anne Boutin, Directrice du département de chimie de l'ENS, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et du département de chimie.

Je remercie les membres de mon jury, Pascale Delangle et Jean-Pierre Mahy d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que Fabienne Burlina et Marc Lecouvey qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je souhaiterais adresser mes gratitudes à Nicolas Delsuc, mon Directeur de thèse, pour ses encouragements, ses conseils avisés qui m'ont été d'une aide et d'un soutien si précieux. Je lui suis reconnaissante de s'être engagé avec moi pour mener à bien ces travaux et de s'être impliqué dans mon projet. Je le remercie pour sa bonne humeur quotidienne et sa patience sans faille qui m'ont permis d'évoluer scientifiquement durant ces années dans un environnement saint, agréable et équilibré.

Je remercie le Pr. Clotilde Policar, qui a codirigé ces travaux, de m'avoir fait confiance, conseillée et soutenue tout au long de cette thèse. Son dynamisme, son esprit critique et son excellence scientifique ont été une source d'inspiration pour moi.

Je remercie très chaleureusement Géraldine Gazzah pour toute son aide et de s'être assurée constamment que l'on ne manquait de rien au sein du laboratoire. Je me rappellerai de ses délicieux gâteaux apportés lors des petits déjeuners d'équipe.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe administrative du LBM à L'ENS et à Sorbonne Université.

Je remercie le Pr Marc Fontecave et le Dr. Michel Salmain, membres de mon comité de suivi, pour leurs conseils et leur regard critique sur ce travail

J'adresse un immense remerciement à toutes les personnes qui ont collaborées à ce projet : Sophie Vriz et Marion Thauvin pour les expériences sur les cellules HeLa et le zebrafish, Martin Stillman et Adyn Melenbacher pour les expériences en masse ESI, Manon Guille-Collignon et Frédéric Lemaitre pour les modélisations en électrochimie, Rose Hoste pour les modélisations dynamiques moléculaires. Je tiens également à remercier Sandrine Sagan, Carole Aimé et Sonia Lajnef qui m'ont permis d'utiliser respectivement l'ITC, le dichroïsme circulaire et la RPE dans leur laboratoire.

Je souhaite remercier tous mes collègues post-docs, doctorants et stagiaires avec qui j'ai eu l'honneur de travailler pour leurs conseils et pour les nombreux moments de convivialité partagés. Un merci particulier à Manon, Rose, Martha et Gabrielle pour leur amitié, leur soutien moral et les moments de bonheur partagés. Je n'oublierai jamais mon anniversaire au congrès-jacuzzi. J'ai également eu la chance de pouvoir encadrer 4 supers stagiaires, Alimatou, Magdaléne, Eva et Clara que je remercie pour l'effort fourni et leur contribution à ce travail.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance auprès de mes amies, ma team P13, Yasmine, Leila, Sihame, Hanane, Saida, Ghaniat et Sébé pour leur soutien depuis de longues années, Je remercie les membres de l'association A-Sabil pour leur soutien et leur encouragement.

Je tiens à remercier ma famille (frères, sœurs, belles sœurs, neveux, nièces et belle-famille) pour leur soutien et leur encouragement. Je leur suis reconnaissante pour la force qu'ils m'ont apporté durant toutes mes études et de me rappeler au quotidien les choses importantes de la vie. Merci, particulièrement à ma mère Minta Diarisso-Coulibaly, qui m'accompagne, me soutient et me supporte depuis toujours. Je lui suis indéfiniment reconnaissante pour tous ses sacrifices qui m'ont permis de réaliser les études que je voulais. Ses prières et son amour ont été mon carburant.

Un grand merci à mon mari, Guillaume, pour son amour, sa patience et son soutien inconditionnel. Merci pour tes lectures et relectures du manuscrit. Je te suis reconnaissante pour ta bienveillance et pour tout le reste.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	acide aminé
ACTH	adrénocorticotrophine
ADP	adénosine diphosphate
Ala	alanine
AND	acide désoxyribonucléique
ANP	3-amino-3-(2-nitrophenyl)propanoic acid
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique (aspartate)
ATP	adénosine triphosphate
BOC	tert-butoxycarbonyl
CAT	catalase
CLTR	2-chlorotriyl chloride
cpYFP	protéine fluorescente jaune à permutation circulaire
CuZnSOD	copper-zinc superoxide dismutases
Cys	cystéine
DC	dichroïsme circulaire
DNBS	2,4 dinitrobenzenesulfonic acid
EDTA	éthylènediaminetétraacétique
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionisation par Electrospray
Fmoc	fluorénylméthoxycarbonyl
Glu	Glutamate (ou acide glutamique)
Gly	Glycine
GPCR	G protein-coupled receptor
HemeCAT	catalase à fer héménique
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His	histidine

HIV	human immunodeficiency virus
HPV	human Papillomavirus
HySS	<i>Hyperquad Simulation and Speciation</i>
Ile	isoleucine
iPP	interaction protéine-protéine
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K _{cat}	constante catalytique
Leu	leucine
LPC	<i>L. plantarum</i>
Lys	lysine
MALDI	matrix Assisted Laser Desorption Ionization
Met	méthionine
MICI	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MnCAT	catalase à manganèse
MnCAT-LPC	catalase à manganèse isolée de <i>L. plantarum</i>
MnCAT-TTC	catalase à manganèse isolée de <i>T. thermophilus</i>
MnSOD	manganese superoxide dismutases
MOPS	acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MPO	chlorure et de myéloperoxydase
MPOC	maladies pulmonaires obstructives chroniques
MRC	maladie rénale chronique
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBT	nitroblue tetrazolium
NOX	NADPH oxidases
OBOC	one bead - one compound
OxyR-RD	domaine de régulation d' <i>Escherichia coli</i> OxyR
Phe	phénylalanine
PP	protéine-protéine
Pro	proline
PTH	phénylthiodhyantoi
PTP	pores transitoires de perméabilité

Rink	4-(2',4'- dimethoxyphenyl- aminomethyl)- phenoxyethyl- polystyrene
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	reactive oxygen species
RPE	résonance paramagnétique électronique
Ser	sérine
SOD	superoxyde dismutase
SPPS	synthèse peptidique sur support solide
TCAC	taux de croissance annuel composé
TeNt	tétanospasmine (toxine tétanique)
TFA	trifluoroacetic acid
Thr	thréonine
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
TOF	temps de vol
TOF	turnover frequency
TON	turnover number
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
Trp	tryptophane
TTC	<i>T. thermophilus</i>
Tyr	tyrosine
UV-vis	ultraviolet-visible
Val	valine

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	11
I. LE STRESS OXYDANT	11
1) LES DIFFERENTES VOIES DE FORMATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	11
2) LE ROLE DES ROS DANS LES MECANISMES CELLULAIRES.	15
3) LES SYSTEMES DE REGULATION DES ROS.	19
4) STRESS OXYDANT ET PATHOLOGIES LIEES AU ROS	22
II. LA CATALASE	24
1) CATALYSE DE LA REACTION DISMUTATION DU PEROXYDE D'HYDROGENE PAR LA CATALASE	24
2) CATALASES, STRUCTURES ET MECANISMES REACTIONELS.	25
3) LES APPROCHES THERAPEUTIQUES	31
CHAPITRE 2 : DECOUVERTE PAR CHIMIE COMBINATOIRE D'UN COMPLEXE METALLOPEPTIDE	
MIMANT L'ACTIVITE DE CATALASE	39
I. INTRODUCTION	39
1) MIMÉ ENZYMATIQUE PEPTIDIQUE, QUEL EST L'AVANTAGE D'AVOIR UN LIGAND PEPTIDIQUE ?	39
2) DECOUVERTE DE METALLOPEPTIDES ACTIFS PAR CHIMIE COMBINATOIRE	47
II. IDENTIFICATION D'UN COMPLEXE ACTIF PAR CHIMIE COMBINATOIRE COUPLÉE À UN TEST D'ACTIVITÉ SUR GEL	56
1) METHODE DE SYNTHÈSE ET D'IDENTIFICATION DES HITS.	56
2) CONCEPTION ET PRÉPARATION DE LA BIBLIOTHEQUE JRF1	58
3) SÉLECTION DES COMPLEXES ACTIFS PAR UN TEST D'ACTIVITÉ CATALASE SUR GEL	67
4) ANALYSE DES PEPTIDES SÉLECTIONNÉS PAR SPECTROMÉTRIE MALDI-TOF ET IDENTIFICATION DE LEURS STRUCTURE PRIMAIRE À L'AIDE DU LOGICIEL BIBLIO.	72
5) SECONDE SÉLECTION : ANALYSE QUANTITATIVE DE L'ACTIVITÉ CATALASE PAR SPECTROMÉTRIE UV-VISIBLE DES COMPLEXES SÉLECTIONNÉS	77
III. CARACTÉRISATION DU COMPLEXE CuCATm1-Cu²⁺	78
1) SYNTHÈSE DU PEPTIDE CuCATm1 : PHYKHRLH	78
2) MISE EN ÉVIDENCE DE LA FORMATION DE COMPLEXES ET DÉTERMINATION DE LEUR STœCHIMÉTRIE	78
3) DÉTERMINATION DES CONSTANTES DE DISSOCIATION ET DONNÉES THERMODYNAMIQUES	87
4) ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ CATALASE ET DES CONSTANTES CINÉTIQUES DE DISMUTATION DE H ₂ O ₂	95
IV. ACTIVITÉ CATALASE DE CATm1 DANS LES CELLULES HELA HYPER	107
1) MODÈLE CELLULAIRE HELA-HYPER	107
2) ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DU COMPLEXE CuCATm1:Cu ²⁺ DANS LES CELLULES HELA-HYPER	110

CHAPITRE 3 : SECONDE GENERATION DE METALLOPETIDES : OPTIMISATION DU COMPLEXE

CUCATM1-CU²⁺ **115**

I. INTRODUCTION : INDUCTION D'UN REPLIEMENT DE TYPE COUDE- β AU SEIN D'UN PEPTIDE **115**

1) STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTEINES ET ACTIVITE. 115

2) LE MOTIF COUDE- B (B-TURN) 116

II. CONCEPTION, SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DU COMPLEXE PEPTIDIQUE CUCATM1-COUE : CU²⁺ **124**

1) CONCEPTION DU PEPTIDE CUCATM1-COUE (CUCATM1-C) 124

2) CARACTERISATION DU COMPLEXE CUCATM1-C : CU²⁺ 125

3) ANALYSE DE L'ACTIVITE CATALASE DU COMPLEXE CUCATM1-COUE : CU²⁺ 129

III. CONCEPTION, SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DES COMPLEXES PEPTIDIQUES DE SECONDE GENERATION

CUCATM1-(x) : CU²⁺ **132**

1) CONCEPTION DES PEPTIDES DE LA SECONDE GENERATION 133

2) CARACTERISATION ET ANALYSE DE L'ACTIVITE CATALASE DES COMPLEXES DE LA SECONDE GENERATION 139

3) CONCLUSION ET PERSPECTIVES 156

CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS **160**

I. CONCLUSION **160**

PARTIE EXPERIMENTALE **162**

I. CHEMICALS **162**

II. INSTRUMENTS **162**

III. PROCEDURES AND DATA ANALYSIS **163**

1) PEPTIDE LIBRARY SYNTHESIS ON SOLID SUPPORT 163

2) COMPLEXES FORMATION 165

3) COMBINATORIAL SCREENING AND SELECTION 165

4) PEPTIDE SEQUENCE DETERMINATION BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY 166

5) QUANTITATIVE ANALYSIS OF CATALASE ACTIVITY MEASURED BY UV-VIS SPECTROSCOPY. 166

6) PEPTIDE SYNTHESIS ON LARGE SCALE 167

7) PEPTIDE STOCK SOLUTION PREPARATION 168

8) ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY (EPR) 170

9) TITRATION BY CIRCULAR DICHROISM (CD) 171

10) CYCLIC VOLTAMMETRY EXPERIMENTS 171

11) COMPETITION ASSAY WITH BABA LIGAND 171

12) ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY (ITC) 171

13)	TITRATION BY MALDI IONIZATION MASS SPECTROMETRY	172
14)	TITRATION BY ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY	172
15)	CATALASE ACTIVITY ASSAY USING X-TRITON	172
16)	CATALASE ACTIVITY ASSAY USING HADWAN ET ABED METHOD BY UV-VIS SPECTROMETRY	173
17)	CATALASE ACTIVITY ASSAY USING A CLARK-TYPE ELECTRODE	173
18)	EXPERIMENTS ON HELA HYPER CELLS	174
19)	MODELING OF THE CONFORMATION OF THE CUCATm1-C PEPTIDE BY MOLECULAR DYNAMICS	175
20)	TITRATION BY FLUORESCENCE	175
21)	EXTINCTION COEFFICIENTS DETERMINATION	176
22)	FLUORESCENCE COEFFICIENTS DETERMINATION	176
ANNEXE		177
I. METHODES DE CARACTERISATION DES PEPTIDES		177
1)	LA SPECTROMETRIE DE MASSE	177
2)	L'ANALYSE PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE.	178
3)	L'ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE	179
4)	LE TITRAGE CALORIMETRIQUE ISOTHERME	181
5)	LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE	182
RÉFÉRENCES		184

Chapitre 1 : INTRODUCTION

I. Le stress oxydant

1) LES DIFFERENTES VOIES DE FORMATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

Les organismes aérobies génèrent leur énergie par la réduction du dioxygène (O_2) en molécule d'eau (H_2O). Au cours de ce processus, des sous-produits appelés espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS en anglais pour Reactive Oxygen Species) se forment. Le premier ROS généré est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Il est le résultat de la réduction à un électron du dioxygène. Ensuite, par réactions en cascade, l'anion superoxyde conduit à la formation d'autres ROS, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis le radical hydroxyle ($\bullet OH$). Chez l'homme, les ROS sont essentiellement produits dans les mitochondries et les peroxysomes.^{1,2}

1. Généralités sur la formation des ROS¹

L'oxygène (O_2) est une molécule qui possède deux électrons non appariés. L'acceptation par l' O_2 d'un électron dans son orbitale anti-liante π^*2p , induit sa transformation en radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$. A pH physiologique, $O_2^{\bullet-}$ est protoné ($pK_a = 4.8$) et est transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et O_2 par réaction de dismutation ou est réduit à nouveau pour donner un ion peroxyde puis après protonation former du peroxyde d'hydrogène (Schéma 1).

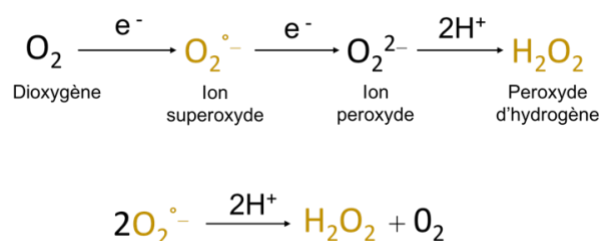


Schéma 1. Différentes voies de formation de H_2O_2 à partir du superoxyde.

Le peroxyde d'hydrogène est un précurseur d'un autre ROS, le radical hydroxyle ($\bullet OH$). En effet, une rupture homolytique de la liaison O-O d' H_2O_2 peut être provoquée par différents phénomènes tels qu'un rayonnement ionique, une source de chaleur ou une réaction d'oxydo-réduction avec ions métalliques. La réaction d' H_2O_2 avec l'ion Fe^{2+} ou l'ion Cu^+ a pour

conséquence la formation d'un radical hydroxyle et d'un ion hydroxyde et ce avec de très bonnes constantes de vitesse : cette réaction est appelée réaction de Fenton (Schéma 2).¹

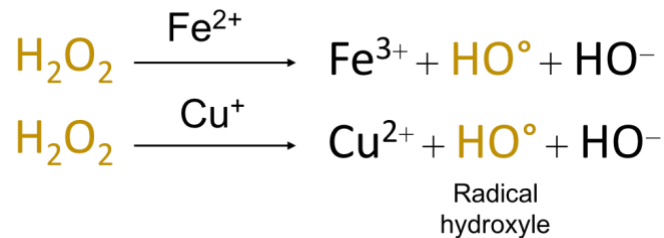


Schéma 2. Formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton

2. La formation des ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale

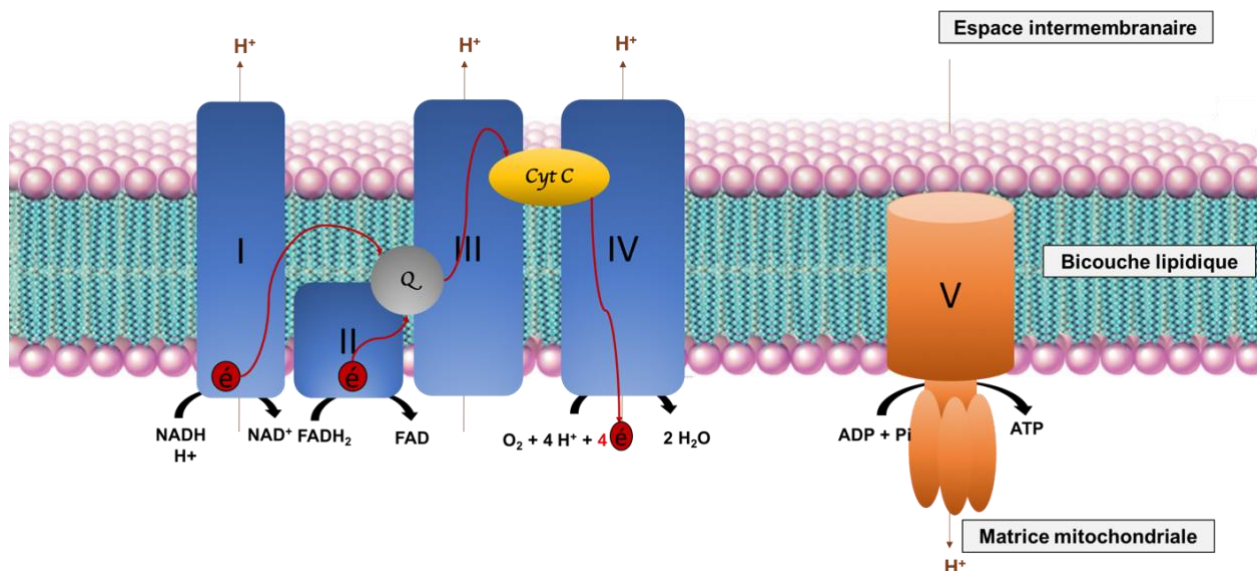


Figure 1. Transfert électronique à travers la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Schéma inspiré du site <https://www.cours-pharmacie.com/biochimie/chaine-respiratoire-et-phosphorylation-oxydative.html#post/0>

Les chaînes de transport d'électrons, notamment la chaîne respiratoire de la mitochondrie, est une source importante de ROS pour les cellules. La chaîne respiratoire mitochondriale qui a pour rôle de produire de l'ATP à partir d'ADP se compose principalement de cinq complexes protéiques nommés I, II, III, IV et V.

Le transfert électronique débute par le transfert simultané d'électrons provenant du complexe I (la NADH déshydrogénase) et du complexe II (la succinate déshydrogénase) vers le coenzyme Q₁₀H₂. Ces électrons proviennent de l'oxydation de la NADH en NAD⁺ et de

l'oxydation du succinate en fumarate. Le complexe I et le complexe II transfèrent donc des électrons provenant de la matrice mitochondriale vers le coenzyme $Q_{10}H_2$, qui diffuse dans la membrane mitochondriale interne. Le complexe III (la coenzyme Q-cytochrome c réductase) transfère des électrons provenant de $Q_{10}H_2$ vers l'espace inter-membranaire par la réduction du cytochrome c. Enfin, le complexe IV (la cytochrome c oxydase) transfère 4 des électrons provenant des cytochromes c réduits vers une molécule de dioxygène qui est réduite en deux molécules d'eau (Figure 1).

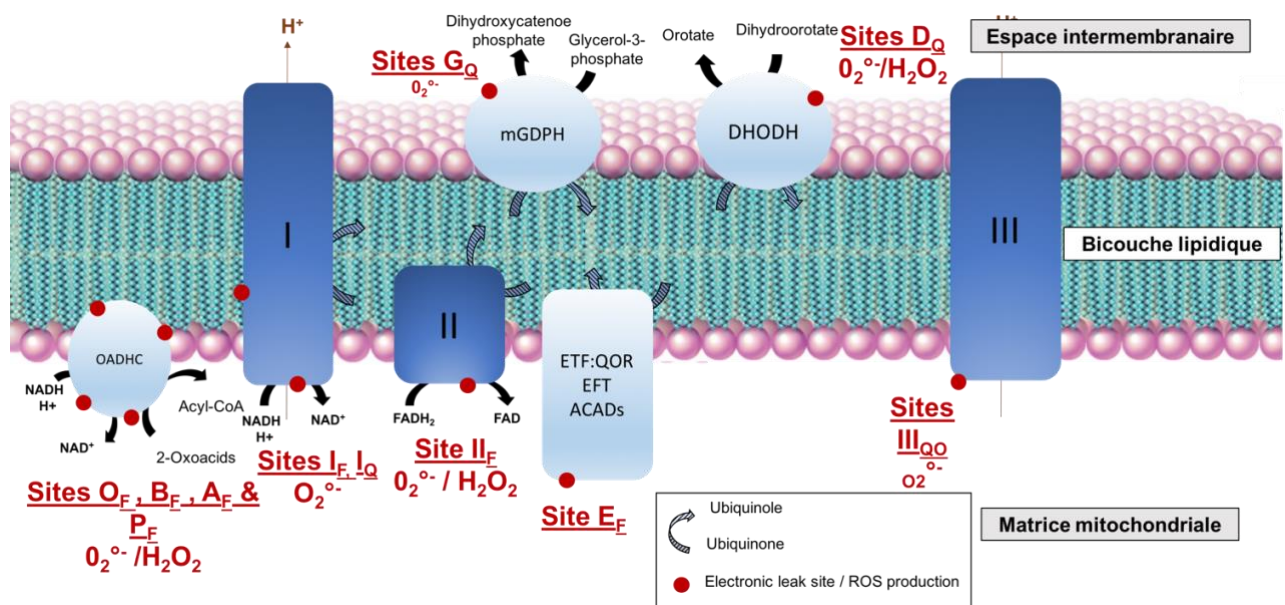


Figure 2. Sites des fuites électroniques dans la chaîne mitochondriale. Schéma inspiré de l'article²

Durant le processus de transfert électronique dans la chaîne mitochondriale, de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène peuvent être produits. Ces ROS sont formés par réduction du dioxygène (à un ou deux électrons) induite par les centres redox donneurs présents dans la mitochondrie et les enzymes métaboliques associées. Onze sites «de fuite électronique» libérant des électrons et produisant ainsi ces ROS ont été identifiés dans la chaîne mitochondriale : O_F , B_F , A_F , P_F , I_F , I_Q , II_F , III_{QO} , G_Q , E_F et D_Q qui se réfèrent aux sites de liaison de la flavine (indice F) ou de l'ubiquinone (indice Q) des complexes 2-oxoglutarate (O), 2-oxoacide à chaîne ramifiée (B), 2-oxoadipate (A) et pyruvate (P) déshydrogénase, du complexe I, du complexe II et du site externe de l'ubiquinone du complexe III (III_{QO}), et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (G), du système ETF/ETF: QOR (E) et de la dihydroorotate déshydrogénase (D)² (Figure 2).

3. La formation des ROS par les NADPH Oxydases³

La famille des NOX, aussi appelée NADPH oxydases, sont des oxydoréductases transmembranaires (enzyme de classe 1) chargées de transporter les électrons à travers les membranes biologiques. Les NOX catalysent la réaction d'oxydation par le dioxygène du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH). Cette réaction a pour produit la NADP⁺ et l'ion superoxyde (O₂^{•-}). Ainsi les NOX, ont été les premiers systèmes enzymatiques identifiés comme ayant pour rôle la production de ROS pour leurs fonctions biologiques et qui ne sont donc pas des produits secondaires.

A ce jour, sept NOXs ont été identifiées et caractérisées : NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2. Chaque NOX a des niveaux d'expression importants dans un ou deux tissus cellulaires seulement. Néanmoins, une expression moindre peut être détectée dans un nombre de tissus plus large (voir Tableau 1 ci-dessous). Dans chaque cellule exprimant une NOX, la présence de superoxyde est observée à concentration plus ou moins importante.³⁻⁶

Tableau 1. Régions d'expression des NOXs et leur implication dans différents mécanismes cellulaires.³

NOXs	Implication	Localisation	
		Haut niveau d'expression	Faible niveau d'expression
NOX 1	Synthèse de l'angiotensine II	Colon	Muscle lisse, endothélium, utérus, placenta, prostate, ostéoclastes, péricytes rétiens
NOX 2	Phénomène de phagocytose	Phagocyte	Lymphocytes B, neurones, cardiomyocytes, muscle squelettique, hépatocytes, endothélium, cellules souches hématopoïétiques, muscle lisse
NOX 3	Synthèse d'organes otolithiques	Appareil vestibulaire : oreille interne	Rein fœtal, rate fœtale, os du crâne, cerveau
NOX 4	Synthèse de l'angiotensine II	Rein, vaisseaux sanguins	Ostéoclastes, endothélium, muscle lisse, cellules souches hématopoïétiques, fibroblasts, kératinocytes, cellules de mélanome, neurones
NOX 5	L'angiogenèse / Apoptose	Tissu lymphoïde, testicule	Endothélium, muscle lisse, pancréas, placenta, ovaire, utérus, estomac, divers tissus fœtaux
DUOX 1	Synthèse hormone thyroïdiennes	Glande thyroïde	Épithélium des voies respiratoires, épithélium de la langue, cervelet, testicule
DUOX 2	Synthèse hormone thyroïdiennes	Glande thyroïde	Glandes salivaires et rectales, épithéliums gastro-intestinaux, épithélium des voies respiratoires, utérus, vésicule biliaire, îlots pancréatiques

4. La formation des ROS par d'autres systèmes enzymatiques

En plus de la chaîne respiratoire mitochondriale et des NADPH oxydases, d'autres systèmes enzymatiques ont été identifiés comme sources de ROS dans différents compartiments cellulaires : les flavoprotéines, la D-amino acide oxydase, la glycolate oxydase, l'acyl-CoA oxydase, et l'urate oxydase sont des enzymes présentes dans le peroxysome et sont génératrices d' H_2O_2 sans passer par l'intermédiaire du radical superoxyde. Le cytosol possède également des enzymes génératrices d' H_2O_2 telles que la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase.⁷

2) LE ROLE DES ROS DANS LES MECANISMES CELLULAIRES.

Les ROS sont donc des espèces naturellement présentes dans les cellules. De nombreuses fonctions physiologiques sont contrôlées par des voies de signalisation sensibles à l'état redox des cellules.⁸ Les ROS jouent ainsi un rôle clé dans différents mécanismes cellulaires. Quelques exemples de l'implication des ROS sont décrits ci-dessous, en se focalisant plus particulièrement sur H_2O_2

Les ROS permettent de réguler **la ventilation respiratoire** et la masse des globules rouges. Les corps carotides jouent le rôle de capteur pour mesurer la concentration en dioxygène du sang artériel. Ils détectent le niveau d'apport en dioxygène au niveau des tissus de l'organisme et relayent les informations sensorielles aux neurones du tronc cérébral qui régulent la respiration. Lors d'une hypoxie, le manque de dioxygène engendre la diminution de l'activité d'enzymes telles que la NADPH oxydase et la NADPH- cytochrome P450, qui produisent des ROS et notamment H_2O_2 . La diminution de la concentration de H_2O_2 impacte les canaux à potassium, ce qui induit une dépolarisation de la membrane, et la libération de neurotransmetteurs. L'activité sensorielle va être stimulée et une régulation du niveau d'oxygène effectuée.⁹ Ainsi les ROS permettent de maintenir strictement **l'homéostasie du dioxygène** (Figure 3).

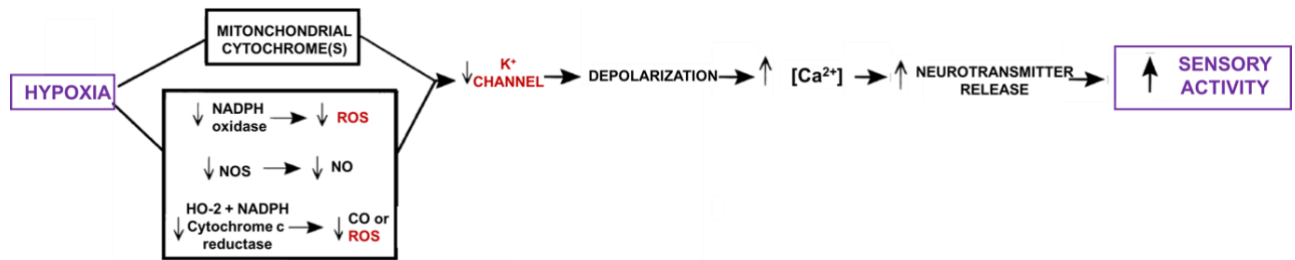


Figure 3. Présentation schématique d'un des modèles de transduction sensorielle au niveau du corps carotidien. Hypothèse selon laquelle une enzyme utilisant le dioxygène et conduisant à la formation de ROS contribue à la transduction du signal. ⁹

Par conséquent, l'**activité du canal à potassium** qui a un impact dans la l'homéostasie de dudioxygène est également contrôlée par le niveau de ROS. L'hypoxie est donc le niveau de ROS diminue la probabilité d'ouverture des canaux de 20 à 40%. Les ROS jouent donc un rôle de modulateur endogène des canaux^{10,11}.

L'adhésion cellulaire est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que l'embryogenèse, la croissance ou la différenciation cellulaire. Il existe 4 classes de récepteur d'adhésion qui participent au mécanisme d'adhésion cellulaire : les intégrines, la superfamille des immunoglobulines, les cadhérines et les sélectines (Figure 4A). Deux d'entre elles, les cadhérines et les intégrines, peuvent fortement être impactées par le niveau de ROS et voir leur niveau d'expression fortement diminuer dans un état de stress oxydant (Figure 4B). Le dysfonctionnement des récepteurs d'adhésion va avoir un rôle critique dans la prolifération des cellules cancéreuses, notamment sur le caractère invasif. Le niveau de ROS impacte le mécanisme de translocation de la E cadhérine de la membrane cellulaire externe vers les compartiments intracellulaires ce qui conduit à une modification de l'adhérence des cellules. Dans le cas de cellules tumorales, l'important niveau de ROS engendre la diminution des propriétés adhésives, ce qui mène à leur détachement de la matrice extracellulaire et augmente la migration cellulaire. ^{12,13}

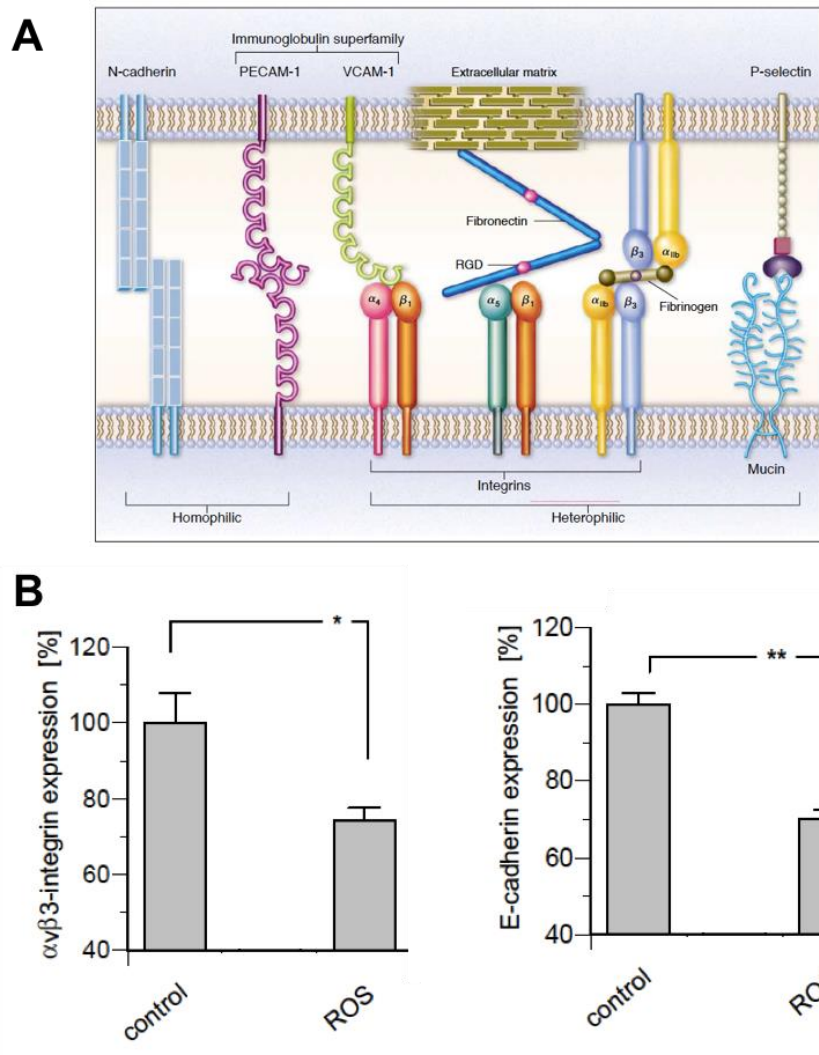


Figure 4. (A) Les quatre grandes classes de récepteurs d'adhésion, illustrées incorporées dans une membrane plasmique putative. (B-gauche) Expression relative de l' $\alpha_v\beta_3$ -intégrine-dimère dans les sarcomes DS 24 h après le traitement d'hyperthermie induisant des ROS (ROS). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM d'au moins 4 tumeurs. (*) $p < 0,05$. (B-droite) Expression relative de E-cadhérine 24 h après le traitement d'hyperthermie induisant des ROS (ROS). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM d'au moins 11 tumeurs. (**) $p < 0,01$. Figure modifiée des articles ^{12,13}

Les ROS jouent un rôle essentiel dans la **réponse immunitaire**. En présence d'un pathogène, les macrophages qui le reconnaissent, produisent et sécrètent une quantité importante de ROS pour l'éliminer (« oxidative burst ») : c'est la première ligne de défense, l'immunité innée. Cependant, si tous les pathogènes ne sont pas éliminés, la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T est enclenchée. Il a été montré que cette réponse est amplifiée par la présence de ROS dans le milieu, ce qui permet d'accélérer l'élimination du pathogène (Figure 5).

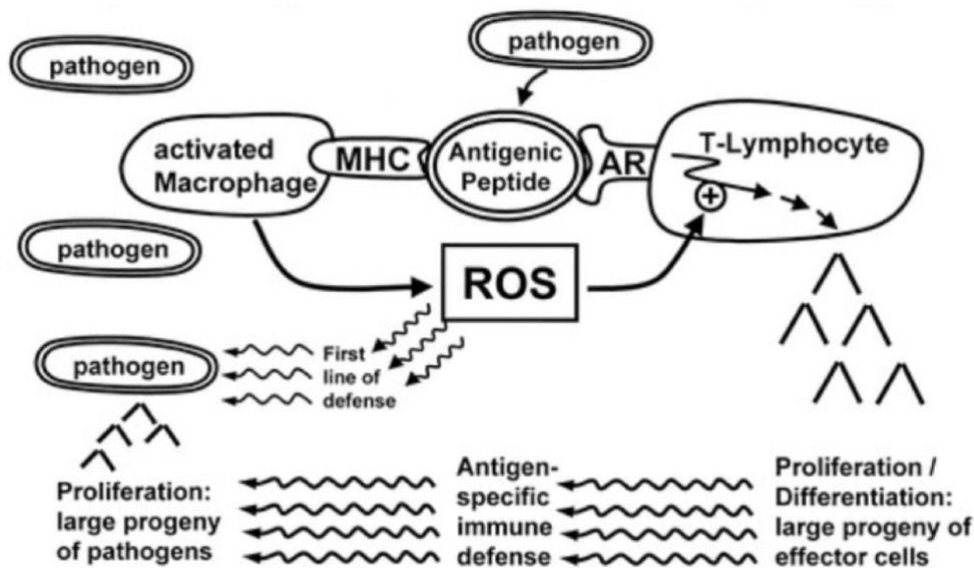


Figure 5. Fonctions de ROS dans la réponse immunitaire contre des agents pathogènes. Figure issue de l'article ⁸

L'apoptose,^{14,15,16} joue un rôle indispensable dans le développement cellulaire et l'homéostasie des organismes multicellulaires. Il a été démontré la contribution des ROS à ce phénomène de mort programmée dans de nombreux types cellulaires. En effet, une concentration accrue de H_2O_2 suffit à induire l'apoptose, qui est hautement contrôlée par une cascade de mécanisme moléculaire. En premier lieu la présence d' H_2O_2 à un niveau anormalement élevé va induire 3 événements : la génération de pores transitoires de perméabilité mitochondriale (PTP), la diminution rapide du potentiel transmembranaire mitochondrial et le relargage du cytochrome C et de ROS mitochondriales.

Ces événements vont impacter l'activité de la protéine kinase C et de la phosphatase ce qui va avoir pour conséquence la phosphorylation de la protéine I κ B et induire sa dégradation protéolytique par une protéase. La protéine I κ B a pour action de maintenir le facteur de transcription NF- κ B dans un état inactif au sein du cytoplasme. Par conséquent, la dégradation de la protéine I κ B conduit à la libération et la translocation de NF- κ B dans le noyau et donc l'expression du gène p53 qui active l'apoptose (Figure 6).¹⁵

Il est important de noter que la sensibilité des cellules aux concentrations de H_2O_2 est variable d'un type cellulaire à un autre. De plus, à ce jour, seuls H_2O_2 et $HO^\bullet$ ont été décrits comme étant capables d'activer ce phénomène en cascade menant finalement à l'apoptose. A l'inverse, des études sur cellules-T ont prouvé que $O_2^{\bullet -}$ libéré par la mitochondrie avait un rôle protecteur contre l'apoptose induite par H_2O_2 .¹⁷

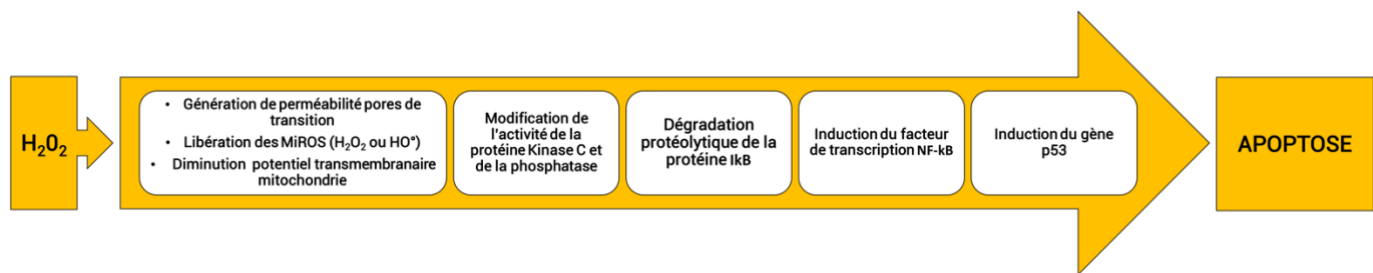


Figure 6. Cascade induite par H_2O_2 et conduisant à l'apoptose. D'après ¹⁵

Les ROS sont donc des espèces présentes naturellement dans les cellules et sont nécessaires à leur bon fonctionnement. Néanmoins, les ROS sont des molécules très réactives qui possèdent un fort pouvoir oxydant. Il est donc primordial que leur concentration intracellulaire soit régulée afin qu'elles ne dépassent pas leur seuil de cytotoxicité.

3) LES SYSTEMES DE REGULATION DES ROS.

Il existe de nombreux systèmes antioxydants intracellulaires destinés à la régulation des concentrations de ROS dans les cellules. Un système antioxydant est défini comme un composé ou un mécanisme permettant d'empêcher, de réduire, ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat oxydable même si celui-ci se trouve en excès.¹ Les systèmes antioxydants permettent ainsi la régulation du niveau de ROS en s'adaptant continuellement à l'état redox de la cellule, protégeant ainsi les différents compartiments cellulaires.

Les systèmes antioxydants peuvent être classés en fonction de leur niveau d'intervention.¹⁸¹⁹

- Les premières lignes de défense antioxydants sont les mécanismes ayant pour action de prévenir la formation en excès de ROS. On parle de **système de prévention**. Ils vont avoir essentiellement pour rôle de protéger les cellules de composés qui pourraient générer des ROS. Nous pouvons citer dans ce cas les protéines qui chélatent les ions fer ou cuivre, et évite la formation du radical hydroxyle par réaction de Fenton. Un autre exemple est la mélanine qui protège les cellules contre le rayonnement ultraviolet qui contribue aussi à la formation de ROS. La mélanine prévient essentiellement la formation de radicaux et évite ainsi la peroxydation lipidique ou la fragmentation d'ADN entre autres.

- Néanmoins, le système de prévention n'évite pas totalement la formation de ROS. Intervient alors **le système d'interception**. Les composés de ce système ont pour rôle d'intercepter les ROS formés, de les éliminer, de les isoler ou de les transformer en espèces moins dangereuses avant qu'ils ne puissent causer des dommages au sein de la cellule. Ces composés peuvent également agir en transférant les espèces oxydantes vers des compartiments cellulaires moins sensibles à l'oxydation que le compartiment sources, par exemple de la membrane vers le cytosol ou des lipoprotéines du plasma sanguin vers la phase aqueuse du plasma. Les molécules impliquées dans ce système sont classées en deux groupes : les composés enzymatiques et les composés non-enzymatiques.
- Enfin, le dernier système de protection est **le système de réparation**. Il consiste en la réparation rapide des dommages causés par un oxydant. C'est le cas de toute enzyme impliquée dans la réparation d'une détérioration de l'ADN ou de lipides due à une oxydation, permettant ainsi le maintien ou la restitution de leur activité à un niveau normal appartient à ce système.

Dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons au système d'interception. Comme formulé plus haut, il existe au sein de ce système deux groupes moléculaires : les molécules non enzymatiques réagissant avec les ROS de façon stœchiométrique et les enzymes qui ont une activité catalytique. Ces antioxydants sont principalement présents de façon endogène, néanmoins certains proviennent de l'alimentation. C'est notamment le cas des antioxydants non enzymatiques.¹⁹

hydroperoxydes organiques (de type ROOH) et du peroxyde d'hydrogène en alcool (ou en eau en présence de glutathion réduit (GSH)). Le glutathion oxydé (GSSG) est ensuite réduit par d'autres enzymes : la glutathion réductase, la glucose-6-phosphate déhydrogénase et l'oxydase d'ascorbate. Il s'agit d'antioxydants enzymatiques indirects.

Comme indiqué précédemment, les antioxydants peuvent être des petites molécules qui réagissent de façon stœchiométrique avec les ROS. Le glutathion, le tocopherol (ou vitamine E), l'acide ascorbique, l'acide α -lipoïque, CoQ10 ubiquinole, et les caroténoïdes permettent ainsi le contrôle du niveau de ROS par réactions stœchiométriques.^{18,36} La vitamine E, la vitamine C et certains polyphénols, font parties des antioxydants exogènes provenant de l'alimentation, notamment des fruits, légumes, céréales...^{37,38,36,39}

Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques agissent de manière synergique afin de maintenir efficacement l'homéostasie redox dans la cellule (Schéma 3).⁴⁰

4) STRESS OXYDANT ET PATHOLOGIES LIEES AU ROS

Dès lors que l'équilibre existant dans la cellule entre les quantités de ROS et l'activité antioxydante est rompu, la cellule se retrouve en situation de stress oxydant. La production en excès de ROS peut être causée par plusieurs processus endogènes (inflammation, immunodéficiency, infections, stress) mais aussi par des processus exogènes (pollution de l'air et de l'eau, tabac, alcool, mode de vie déséquilibré ou encore rayonnement UV...). Le stress oxydant correspond donc à un taux anormalement élevé de ROS dans la cellule. Le stress oxydant peut-être causé par une surproduction de ROS ou par un dysfonctionnement du système de protection antioxydant.

Le plus réactif et le plus dommageable des ROS est le radical hydroxyle. Néanmoins, même si H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ ne sont pas aussi réactifs, ils peuvent aussi devenir cytotoxiques si leur concentration intracellulaire dépasse un certain seuil. En effet, en situation de stress oxydant, l'oxydation anarchique de biomolécules telles que les lipides, les protéines ou l'ADN peuvent se produire induisant des dommages cellulaires et/ou l'apoptose.⁴¹

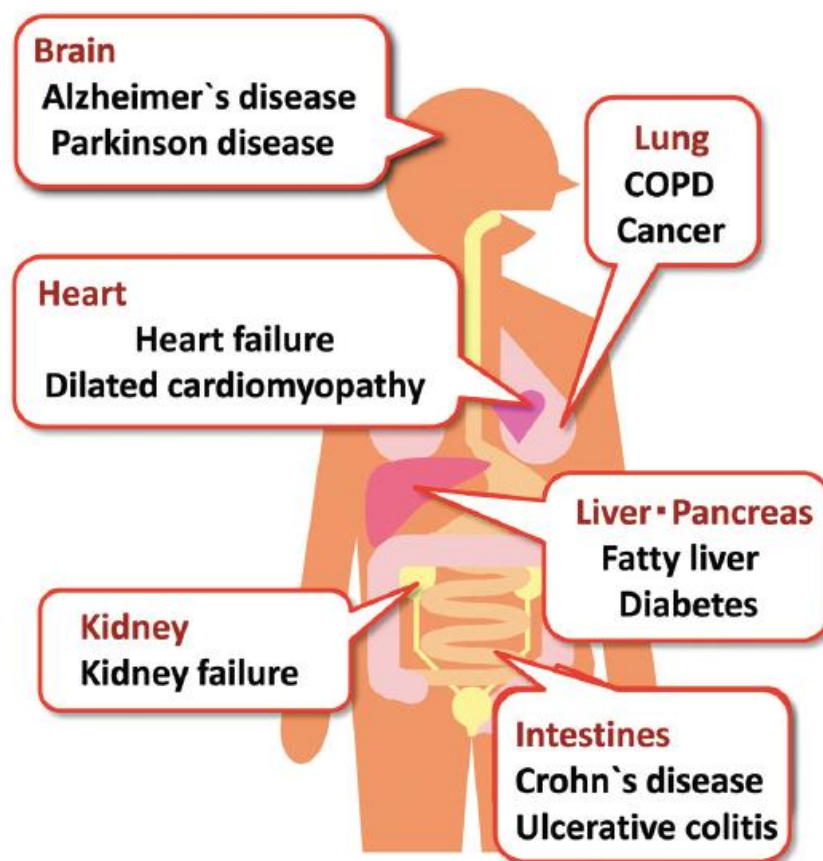


Figure 7. Exemple de maladies impliquant le stress oxydant⁴⁰

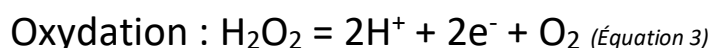
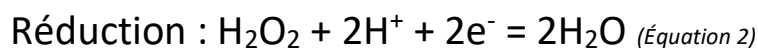
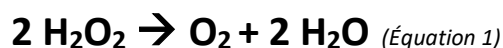
Le stress oxydant est donc impliqué dans de nombreuses situations physiopathologiques telles que les maladies neurodégénératives (maladies de Parkinson et Alzheimer),⁴² les maladies inflammatoires chroniques, les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC),^{43,44} la maladie rénale chronique (MRC),⁴⁵⁻⁴⁷ les maladies métaboliques (diabète)^{48,49} ou les cancers.^{50,51} Bien que la présence de radicaux libres ne soit pas toujours la seule cause de ces différentes pathologies, elle favorise néanmoins l'apparition de certaines d'entre elles (Figure 7). Même si des concentrations plus élevées de H_2O_2 par rapport aux autres ROS sont tolérées, mettant en évidence sa toxicité plus faible, la concentration intracellulaire de H_2O_2 doit être étroitement contrôlée en dessous du seuil de 50 μM chez les organismes eukaryotes.^{52,53} En effet, via la réaction de Fenton ou en présence de chlorure et de myéloperoxydase (MPO), H_2O_2 est capable de former respectivement des radicaux hydroxyles ou de l'acide hypochloreux, molécules beaucoup plus réactives et toxiques.⁵⁴

Dans la suite de ce chapitre nous allons nous focaliser sur la catalase puisque nous souhaitons plus particulièrement développer des mimes de cette enzyme.

II. La Catalase

1) CATALYSE DE LA REACTION DISMUTATION DU PEROXYDE D'HYDROGENE PAR LA CATALASE

La catalase (CAT) est l'une des enzymes qui régulent la concentration de H_2O_2 en accélérant sa dismutation. Au cours de cette réaction, il se produit le transfert de deux électrons et de deux protons d'une molécule de peroxyde d'hydrogène vers une autre. Ces transferts mènent à la réduction d'une molécule d' H_2O_2 en deux molécules d'eau tandis que l'autre molécule est oxydée en dioxygène. Cette oxydation conduit également à la formation d'une molécule d'eau (Équation 1). La dismutation de H_2O_2 implique ainsi deux processus bi-électroniques, nécessitant un catalyseur biélectronique.⁵⁵



La réaction de dismutation d' H_2O_2 est thermodynamiquement favorable avec une composante enthalpique largement favorable ($\Delta H = -47 \text{ kcal.mol}^{-1}$) et une composante entropique défavorable ($-\Delta S = +34 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), ce qui conduit à un ΔG de $-57 \text{ kcal mol}^{-1}$ à 294 K. La barrière d'activation estimée à 18 kcal mol^{-1} dans le cas d'une réaction non catalysée : cette réaction est très donc très lente. Ceci explique la nécessité qu'elle soit catalysée par la CAT.^{56,57}

2) CATALASES, STRUCTURES ET MECANISMES REACTIONELS.

1. La Catalase à fer Héminique

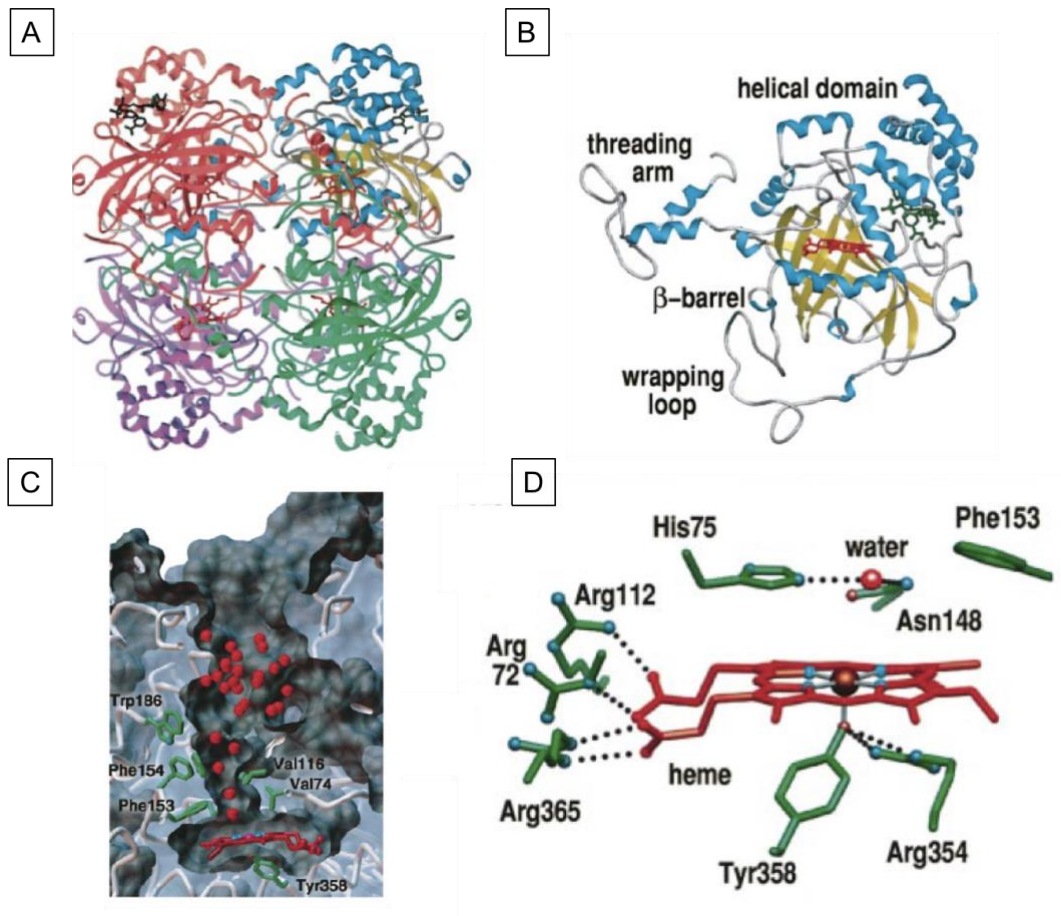


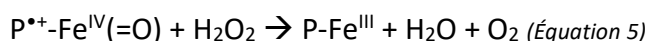
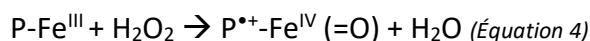
Figure 8. Structure tétramérique de la catalase (A), une sous-unité de l'HemeCAT (B), canal d'accès au site actif (C), site actif de l'HemeCAT (D).²⁸

La CAT est présente chez toutes les espèces aérobies : archées, bactéries, champignons, plantes et les animaux, y compris chez l'être humain.⁴² À ce jour, deux classes de catalase ont été identifiées : la classe des CAT à fer héminique monométallique (HemeCAT) et celle des CAT non héminiques possédant deux cations manganèse dans leur site actif (MnCAT).^{31,55,56,58}

La HemeCAT, présente dans la grande majorité des organismes aérobies procaryotes, eucaryotes et chez certains organismes anaérobies peut être localisée dans différents compartiments cellulaires : les mitochondries et les peroxysomes ainsi que dans le cytosol. La HemeCAT impliquant un hème est constituée d'un cation fer coordonné à une porphyrine. HemeCAT est une protéine tétramérique qui présente un long canal de 20 Å qui rend le site

actif accessible au substrat (Figure 8). Trois acides aminés de la matrice protéique jouent un rôle clé pour catalyser la dismutation de H_2O_2 . Une histidine et une asparagine sont deux résidus distaux qui jouent un rôle dans la stabilisation de H_2O_2 dans le site actif et fonctionnent comme des catalyseurs acide-base. Une tyrosine dite proximale est liée au fer hémique. Une mutation de l'un de ces acides aminés induit la perte totale de l'activité enzymatique.^{28,55,59}

La dismutation H_2O_2 catalysée par l'HemeCAT est réalisée selon un mécanisme de type ping-pong avec une constante catalytique élevée ($k_{\text{cat}} = 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Le fer et le ligand porphyrine participent tous les deux à l'échange biélectronique. L'enzyme passe ainsi d'un état fondamental (P)Fe^{III} à un état d'oxydation élevé (P•⁺)Fe^{IV}=O (également appelé composé I).⁶⁰



La réaction de dismutation de H_2O_2 par la HemeCAT est effectuée selon le mécanisme réactionnel suivant : la première étape consiste en la réduction de la première molécule de peroxyde d'hydrogène selon un mécanisme réactionnel qui fait consensus.²⁸ Dans un premier temps, la molécule de H_2O_2 accède au site actif et est stabilisée par liaisons hydrogènes avec l'His75, l'Asn148 et un réseau de liaisons hydrogène impliquant des molécules d'eau, elles-mêmes stabilisées par la Gln168 et l'Asp128. H_2O_2 est ensuite déprotoné par l'imidazole de l'His75. L'oxygène déprotoné se coordonne au cation métallique Fe^{III} et des liaisons hydrogène se forment entre l'oxygène protoné et les hydrogènes de l'His75 et de Ans148 (Figure 9a). S'ensuit une rupture hétérolytique de la liaison O—O et le transfert du proton de l'imidazole de l'His75 vers l'oxygène protoné. Une molécule d'eau est alors libérée par rupture hétérolytique de la liaison O—O et une oxydation à deux électrons du centre (P)Fe^{III} : il se forme simultanément le composé intermédiaire, le composé 1 par le transfert d'un électron vers le fer. Il s'agit d'un procédé « push – pull »⁶¹ (Figure 9b).

La seconde étape qui consiste à l'oxydation de la seconde molécule d' H_2O_2 et au retour à l'état Fe^{III} fait quant à elle débat.⁵⁵ Deux mécanismes réactionnels sont proposés : un mécanisme concerté et un mécanisme avec deux abstractions d'hydrogène successives, faisant ou non intervenir His75. C'est ce second mécanisme qui a été proposé comme énergétiquement favorable dans une étude théorique.

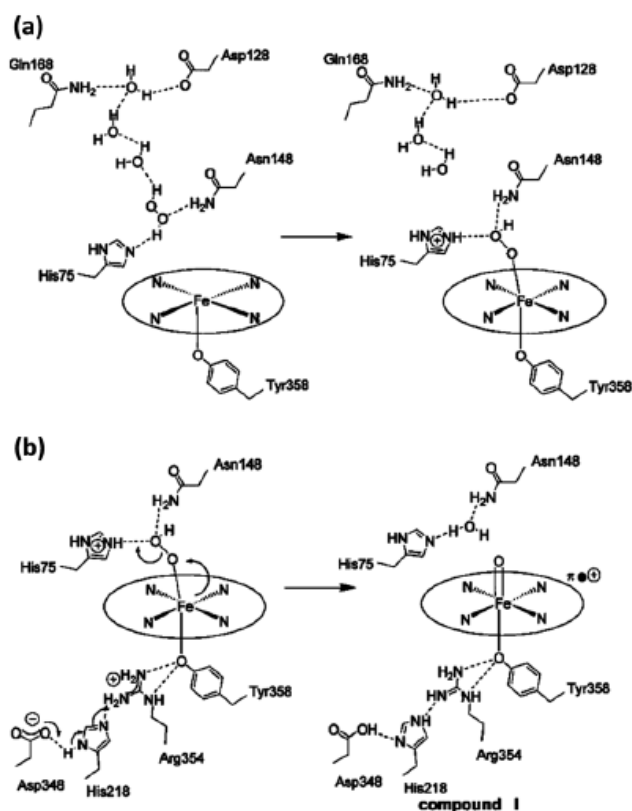


Figure 9. (a et b) Activation d' H_2O_2 par la catalase à hème pour former le composé I. ⁴⁰

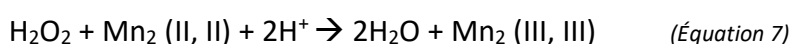
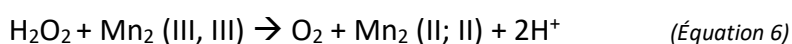
2. La Catalase à di-manganèse

La MnCAT a été découverte plus récemment dans des bactéries lactiques, des bactéries dépourvues d'hème et de cytochrome. L'enzyme a été isolée chez plusieurs espèces bactériennes : *L. plantarum*³¹ *T. thermophilus*,³³ *T. album*.⁶² La MnCAT présente chez le *L. plantarum* (LPC) et de *T. thermophilus* (TTC) est décrite dans une excellente revue publiée par James W. Whittaker.⁶⁸ La MnCAT possède un site actif impliquant un complexe binucléaire de manganèse. Ce complexe cycle entre l'état réduit $\text{Mn}^{\text{II}}\text{-Mn}^{\text{II}}$ et l'état oxydé $\text{Mn}^{\text{III}}\text{-Mn}^{\text{III}}$.^{31,56,58}

Dans le cas de la MnCAT isolée de LPC (MnCAT-LPC), l'étude par diffraction des rayons-X a permis de mettre en évidence que cette enzyme possède une structure homohexamérique. (Figure 10A).³¹ Les sous-unités proximales de MnCAT-LPC s'assemblent par la formation de feuillets β antiparallèles à leur extrémité N-terminale. La structure secondaire de chaque sous-unité est essentiellement composée de 4 hélices α formant un faisceau. Ce faisceau correspond à environ 50% de chaque sous-unité, le reste étant relativement peu structuré. Chaque sous-unité possède également au niveau de l'extrémité C-terminale plusieurs sites de fixation du Ca^{2+} participant à leur structuration. Le site actif est positionné au centre des 4

hélices α (Figure 10B, C). Les deux centres métalliques (Mn1 et Mn2) sont reliés l'un à l'autre par deux oxygènes pontants issus de molécules d'eau (un pont μ -oxo et un pont μ -hydroxo) et par un pont formé par le groupement carboxylate de l'acide glutamique (μ -acétate, E66). Le site de coordination de chaque métal est complété par une histidine en position « proximale » (His69 et His181), et par un glutamate en position distale, qui est soit monodente pour Mn1 (Glu35) soit bidente pour Mn2 (E148). Enfin, une molécule d'eau complète la sphère de coordination de Mn1. Ainsi chaque métal a une géométrie octaédrique avec six atomes coordonnants (Figure 10D). L'enzyme possède un canal d'accès jusqu'au site actif. Ce canal est constitué d'une chaîne de résidus hydrophiles, de résidus chargés négativement et positivement, favorisant ainsi le passage de petites molécules neutres telles que H_2O_2 , O_2 et H_2O .⁵⁶

La réaction de dismutation mettant en jeu deux électrons, fait intervenir les deux centres métalliques selon 2 étapes : le premier peroxyde d'hydrogène est oxydé en dioxygène grâce à la réduction des deux centres des métalliques (équation 6). S'ensuit la réduction de la seconde molécule de peroxyde d'hydrogène avec un clivage hétérolytique de la liaison O-O puis la formation de 2 molécules d'eau et une oxydation de Mn_2 (II, II) en Mn_2 (III, III) (équation 7).



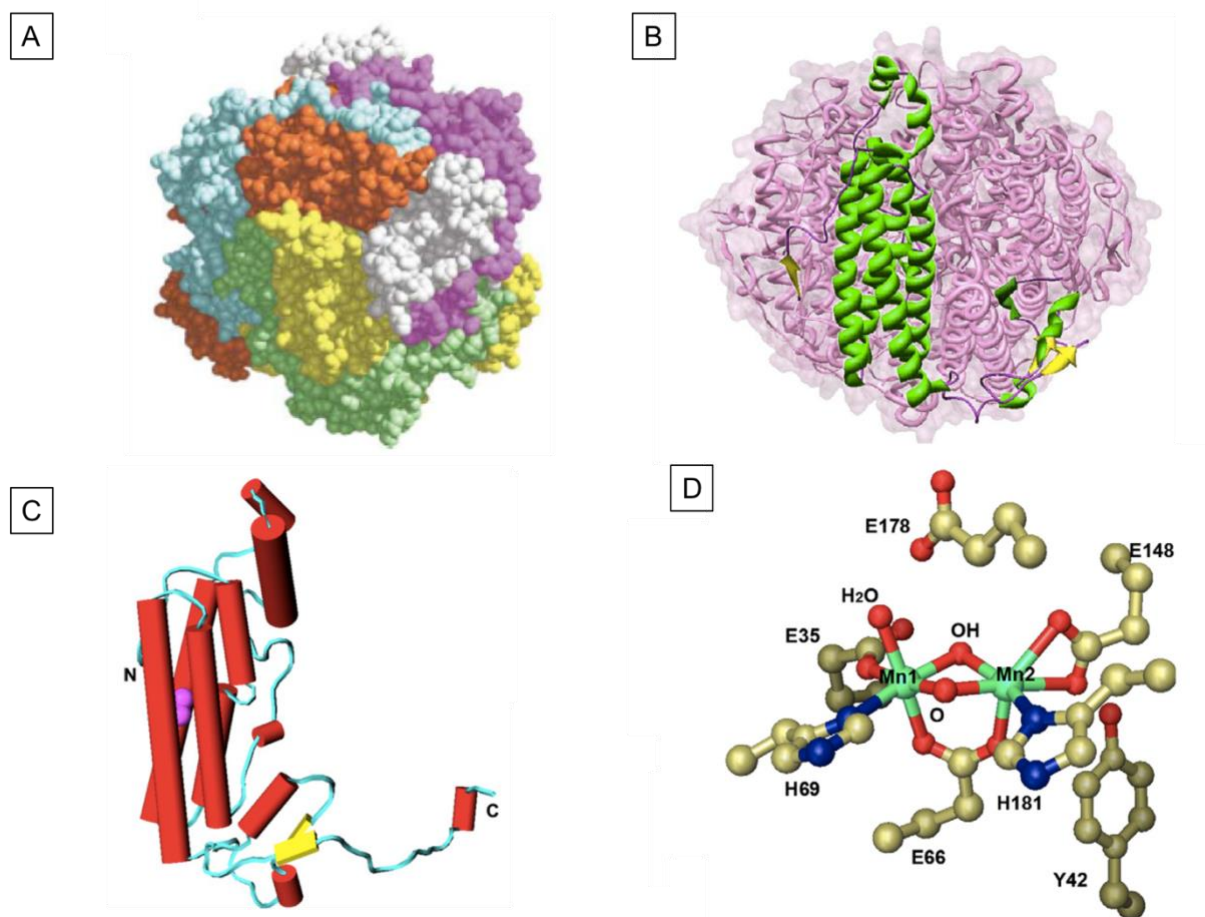


Figure 10. (A) Structure de la catalase à di-manganèse hexamérique de *Lactobacillus plantarum*. (B) Une seule sous-unité de LPC est représentée sous forme de rubans incorporés dans l'holoenzyme hexamérique globulaire . PDB ID: 1JKU. (C) Structure des sous-unités de la manganèse catalase. Eléments structuraux secondaires des polypeptides LPC. Figure produite à partir des articles ³¹et ⁵⁶

La Figure 11 présente une représentation du chemin réactionnel de la dismutation d'H₂O₂ par MnCAT.⁵⁶ Dans une première étape à partir du centre (Mn^{III})₂, la molécule d'H₂O₂ se coordonne au centre Mn1 à la place de la molécule d'eau (complexe 2). Puis les 2 protons d'H₂O₂ sont respectivement transférés vers les atomes d'oxygène impliqués dans le pont oxo Mn₂(O)(OH). Cette étape facilitée par l'acide glutamique 178 (non représenté) s'accompagne de l'oxydation d'H₂O₂ en dioxygène et la réduction des deux centres métalliques en (Mn^{II})₂ pour donner un complexe de type Mn₂(OH)(OH₂) (complexe 3), avec libération de la molécule de dioxygène (complexe 4). La seconde molécule d'H₂O₂ se coordonne alors au centre réduit à Mn1 (complexe 5a), ou s'insère dans le cluster formant ainsi un complexe μ -peroxo Mn₂(OH)(H₂O₂-OH₂) (complexe 5b). Une réduction à deux électrons avec une rupture de la liaison O—O affaiblie par la coordination au centre bimétallique conduit à la formation de deux

molécules d'H₂O (l'une coordonnée et l'autre relarguée avec retour à l'état oxydé, Mn₂ (III, III)).⁵⁶ Une constante catalytique (k_{cat}) de $2.6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ et un K_M de 80 mM à 65 °C ont été déterminés pour cette réaction.⁶³

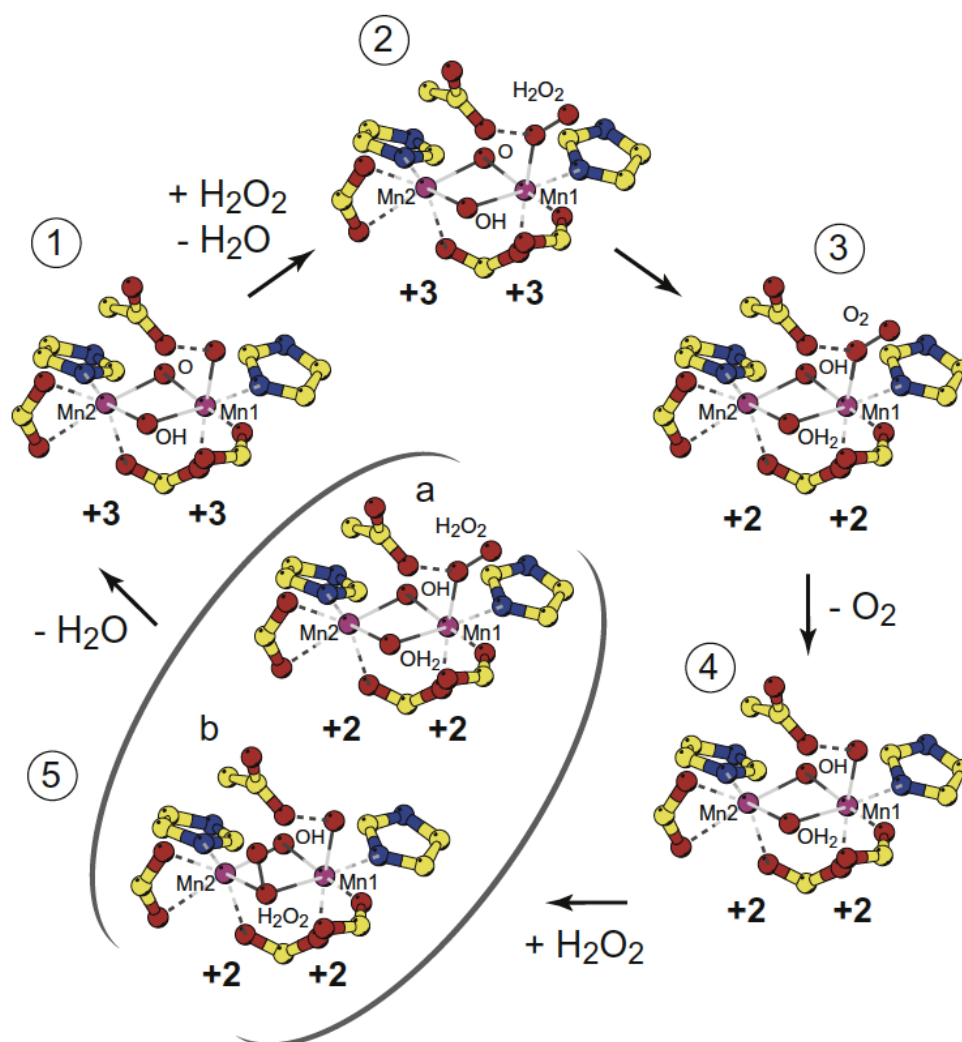


Figure 11. Catalyse de la réaction dismutation d'H₂O₂ par la MnCAT.⁵⁶

La catalase à *T. thermophile* (MnCAT-TTC) possède, à peu de choses près, les mêmes caractéristiques (repliement, site active et cycle catalytique) que celles de la MnCAT-PLC. Néanmoins, la MnCAT-TTC, se distingue par la nature du canal d'accès à son site actif. Ce dernier, électroniquement neutre, permet le passage d'une variété d'espèces ioniques. De plus il est observé des MnCAT de nature Mn₂(II, III) et Mn₂(III, IV) en plus des états Mn₂(II, II) et Mn₂(III, III). L'existence de ces différents niveaux redox et la possibilité d'accès au site active par de nombreux ligands exogènes, suggère que la MnCAT-TTC puisse avoir d'autres activités catalytiques en plus de l'activité CAT déjà décrite notamment une activité peroxydase.^{33,64,65}

3) Les approches thérapeutiques

Différentes approches thérapeutiques ont à ce jour été mises au point dans la perspective de réduire le stress oxydant dans des situations pathologiques.

1. Administration de Catalase recombinantes.

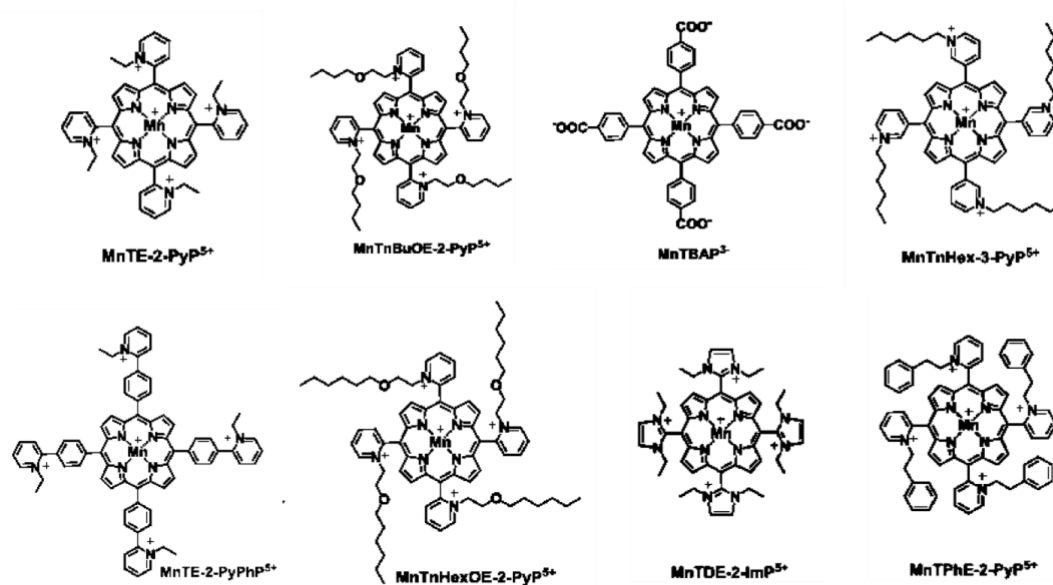
Dans la décennie 1990-2000, de nombreux espoirs étaient fondés sur l'utilisation des métalloenzymes antioxydantes recombinantes telles que la catalase, la SOD ou la peroxydase pour réduire les ROS et ainsi limiter les dommages du stress oxydant.⁶⁶ Des travaux ont été réalisés pour mettre en place des techniques permettant la manipulation des protéines et leur administration dans les organismes vivants. De telles études ont été en particulier réalisées avec la SOD recombinante. Quelques travaux ont présenté des résultats intéressants dans le cas de pathologies pulmonaire⁶⁷, neurologique⁶⁸, gastrointestinale⁶⁹ ou oculaire.⁷⁰⁻⁷³ Néanmoins, ces travaux ont en grande partie subis des critiques sur les protocoles utilisés et le manque de rigueur scientifique, mettant ainsi en cause les résultats obtenus.⁷⁴ De plus, cette approche possède de nombreux désavantages tels qu'un coût de production des protéines trop élevé, un temps de demi-vie dans le plasma limité et une forte immunogénicité. Ceci justifie qu'à ce jour, le nombre d'études impliquant l'administration de protéines recombinantes dans le cas de pathologies impliquant les ROS reste anecdotique.

2. Utilisation de complexes métalliques mimes de CAT

Une seconde approche utilise des complexes métalliques de faible poids moléculaire mimant les métalloenzymes antioxydantes et leur réactivité vis-à-vis des ROS. De nombreux mimes de CAT ont ainsi été développés.⁷⁵⁻⁸⁰ Ces mimes bioinspirés sont principalement dérivés de porphyrine monométallique (Mn ou Fe) (Figure 12) ou de complexes de manganèse dinucléaire par analogie avec le site actif de HemeCAT ou MnCAT respectivement.⁸¹

Il a été proposé que pour les mimes porphyriniques à Mn (MnP), la catalyse se produise via le couple redox $Mn^{III}(P) / Mn^{IV}(O)_2(P)$ ou le couple redox $Mn^{II}(P) / Mn^{IV}=O(P)$.

Mn porphyrins



Fe porphyrins

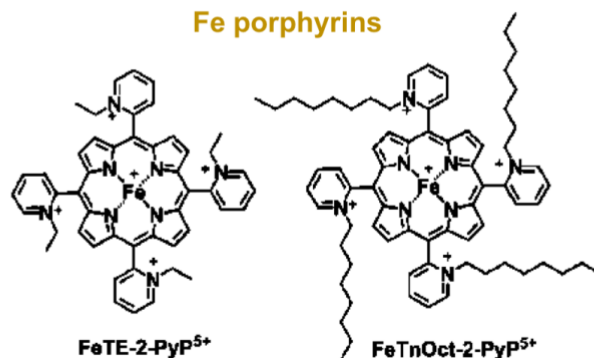


Figure 12. Quelques exemples de complexe dérivés de porphyrine mononucléaire à manganèse ou à fer ayant une activité de type-catalase.⁸¹

Les complexes dinucléaires de Mn bioinspirés de MnCAT sont principalement des complexes pontant alkoxo, phénoxo ou oxo / carboxylate⁸¹ (Figure 14). Il existe aussi un nombre de complexes mononucléaires non porphyriniques tels que des dérivés de salen, les corroles, des macrocycles et des polyamines décrits comme mimes de CAT (Figure 13). Néanmoins ces ligands ne sont pas capables de stabiliser l'ion métallique correspondant avec des états d'oxydation variant de M^{n+} à $M^{(n+2)+}$ pendant la catalyse. Des études mécanistiques ont été effectuées : une dimérisation rapide de ces composés est observée en solution. Cette organisation permet au composé de fournir les deux électrons requis sans atteindre un état d'oxydation élevé dans un seul complexe.⁸² Cependant, il été démontré que ces dimères

perdaient rapidement leur activité dans les conditions requises pour réaliser le test d'activité (quelques minutes).⁸³

Dans une excellente revue, Signorella Hureau ont comparé les informations concernant l'activité catalase et les propriétés redox de plusieurs complexes bi-manganèse de natures différentes. Les données ont permis de définir le rôle et l'effet des ligands pontants, des bases intramoléculaires et l'impact des sphères de coordination sur le potentiel redox et l'activité catalytique des complexes. Les résultats sont présentés selon de la nature du ligand pontant.⁸³

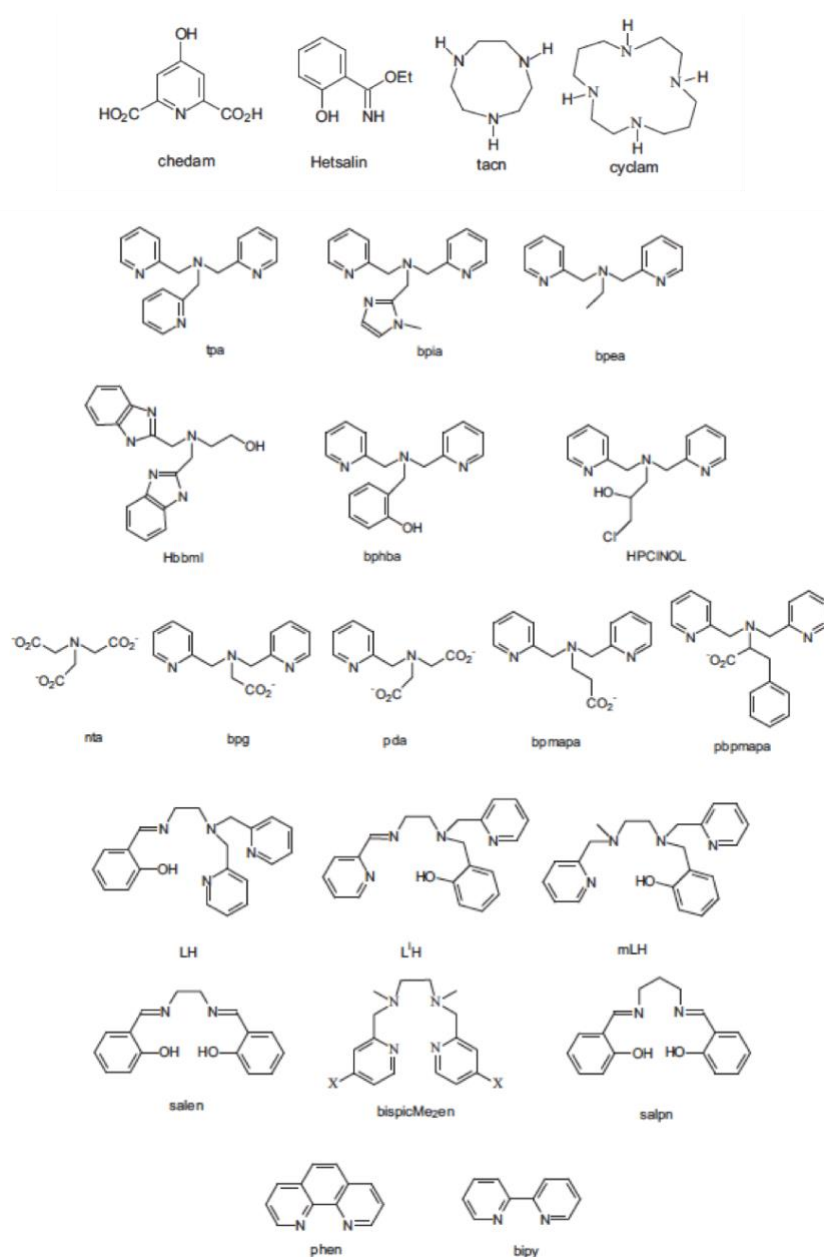


Figure 13. Exemples de ligands mono nucléant.

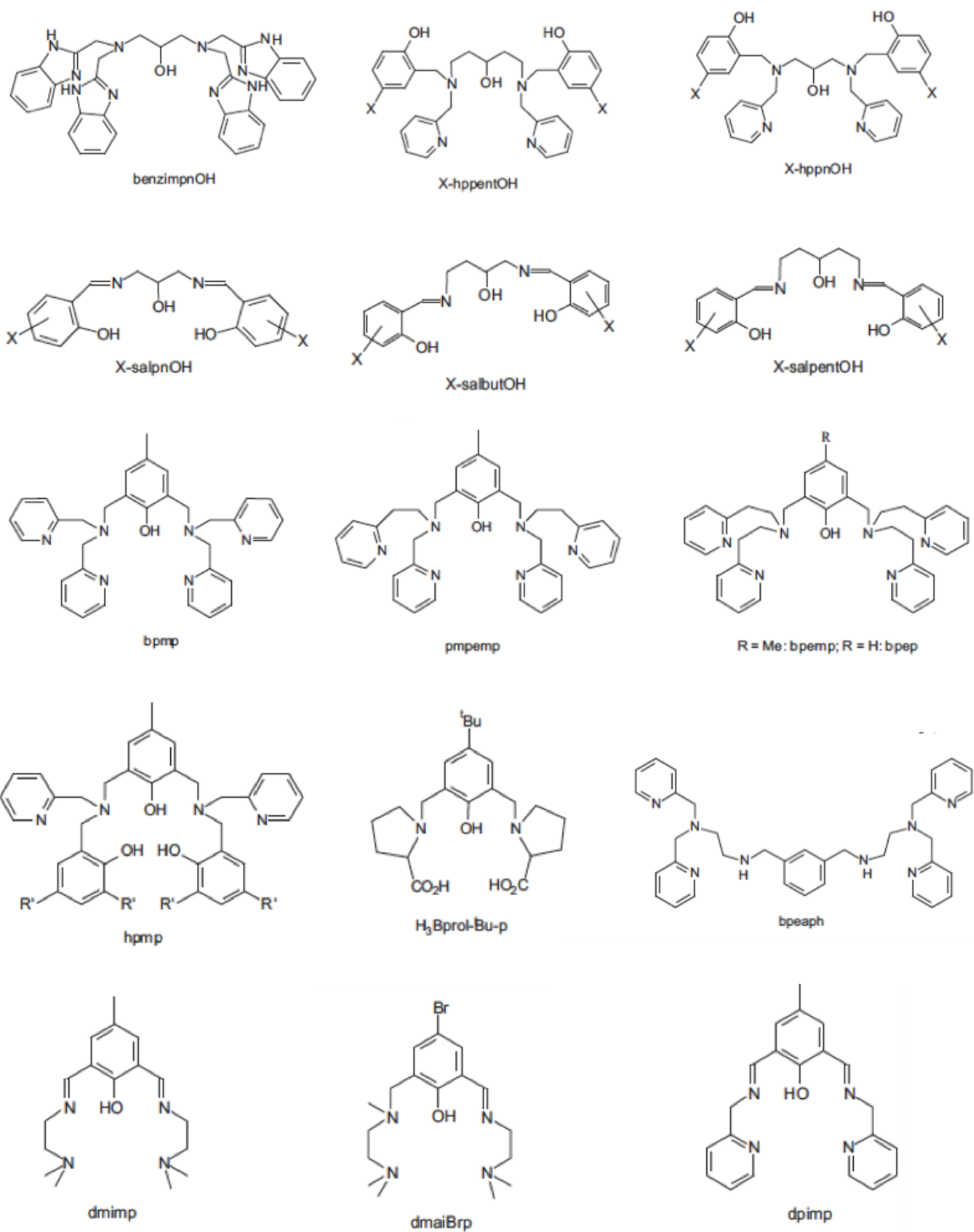


Figure 14. Quelques exemples de ligands utilisés pour donner des complexes bi nucléaires, mimes de MnCAT.

Concernant les catalyseurs bimanganèse diamine et diimine ayant les deux centres métalliques liés par **un pont alkoxo** (Figure 15), il s'avère que :

- L'étape cinétiquement déterminante du cycle catalytique correspond en général à l'étape de réduction du complexe et donc à celle d'oxydation du peroxyde d'hydrogène.
- La présence d'un site labile autour du Mn permet non seulement d'augmenter l'affinité du complexe pour le peroxyde d'hydrogène, mais également à ce dernier de se fixer au complexe de manière à favoriser le clivage O—O.
- Une distance intermétallique courte favorise également le bon mode de fixation du peroxyde d'hydrogène sous forme de ligand pontant
- Les complexes ayant des ligands porteurs de groupements électrodonneurs sont plus faciles à oxyder et agissent plus rapidement que ceux ayant des groupements électroattracteurs.

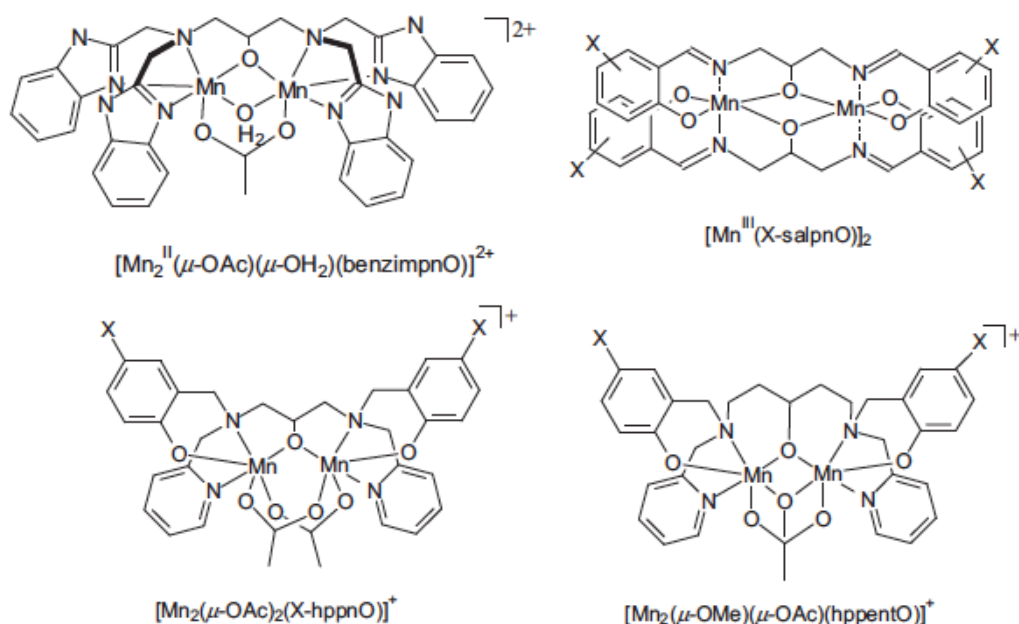


Figure 15. Complexe di manganèse possédant un pont Alkoxo qui utilise un cycle $Mn_2(II)/Mn_2(III)$ pour dismuter H_2O_2 .

La présence d'un cycle aromatique au sein du ligand pontant, permet de stabiliser le complexe bi-manganèse en rigidifiant l'espaceur. **Un pont phénoxo** procure un avantage entropique lors de réactions concertées, ce qui favorise la catalyse. De ce fait, de nombreux mimes de CAT possédant cette caractéristique ont été développés (Figure 16). De cette analyse systématique de C. Hureau et S. Signorella, il est possible de conclure que :

- Le Mn au sein de complexe est stabilisé dans les hauts degrés d'oxydation (Mn^{III}) respectivement dans le cas de ligands N-donneur (fragment imine/phénolate ou imine/pyridine) ou lorsque le ratio O/N est important.

- Le potentiel redox du composé augmente avec la taille du metallocycle. En effet un ligand qui conduit à la formation d'un petit métallocycle, peu flexible et qui limite des distorsions de la géométrie octaédrique déstabilise le Mn à l'état d'oxydation III.
- Le potentiel redox du complexe est également modulé par la nature des substituants sur le ligand phénolate. L'effet inductif donneur des substituants a pour effet de diminuer le potentiel redox.
- En milieu aqueux, la possibilité de former des espèces pontées par un pont μ -oxo (au lieu d'acétate par exemple) permet aux cations d'accéder à de hauts états d'oxydation à des potentiels plus bas, ce qui facilite la catalyse.

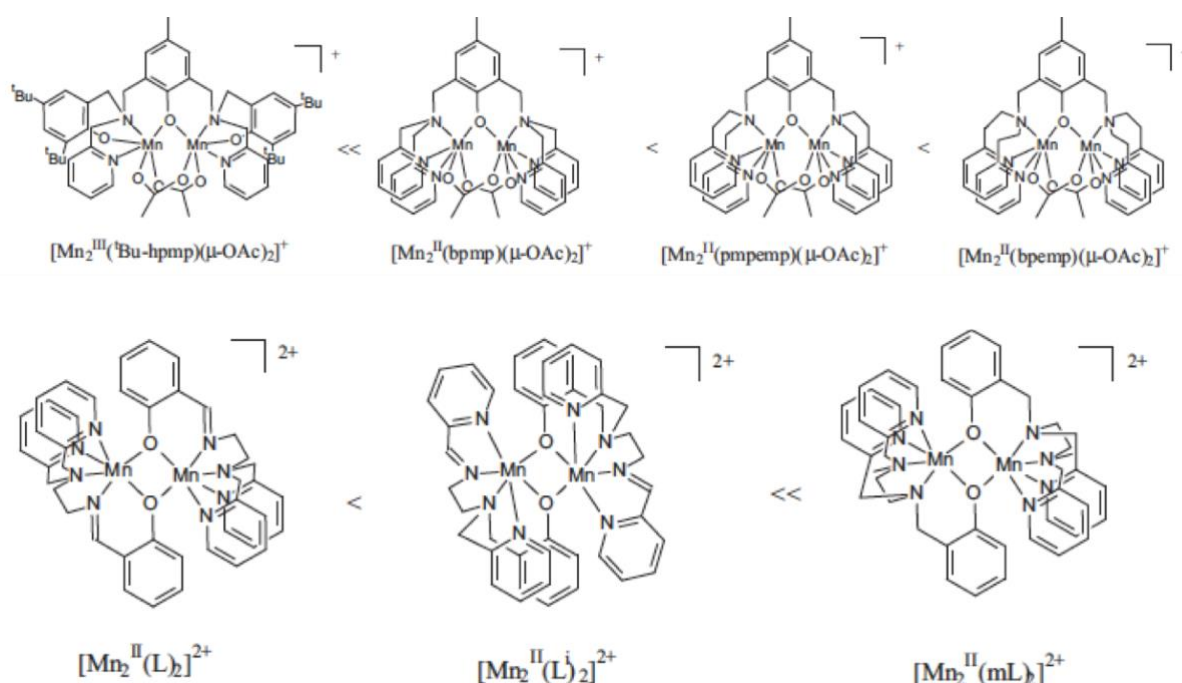


Figure 16. Potentiel redox relatif de complexe $\text{Mn}_2(\text{II})$ avec un pont phenoxo (haut) et imino/phénolate ou amino/phénolate (bas)

Les complexes bi-manganèse avec un **pont carboxylato** ont également été étudiés (Figure 17). Un des facteurs importants pour obtenir un catalyseur efficace est le mode de coordination du carboxylato. En effet, il a été démontré que la coordination d'un carboxylate bidentate conduisait à de meilleures activités que celle d'un carboxylate monodente⁸⁴. Compte tenu du fait que le ligand carboxylato joue un rôle de base intramoléculaire favorisant la déprotonation du peroxyde, les auteurs ont expliqué cette meilleure activité en montrant que

l'angle O-C-O et la distance O-Mn diminuaient lorsque le ligand était bidenté, ce qui conduisait à une basicité plus élevée. .

D'une manière générale, il a été démontré qu'en plus des potentiels redox des ions métalliques qui sont essentiels pour permettre la catalyse de la dismutation de H_2O_2 , l'efficacité des complexes est associée à la présence d'une base intramoléculaire pour aider à la déprotonation de H_2O_2 .

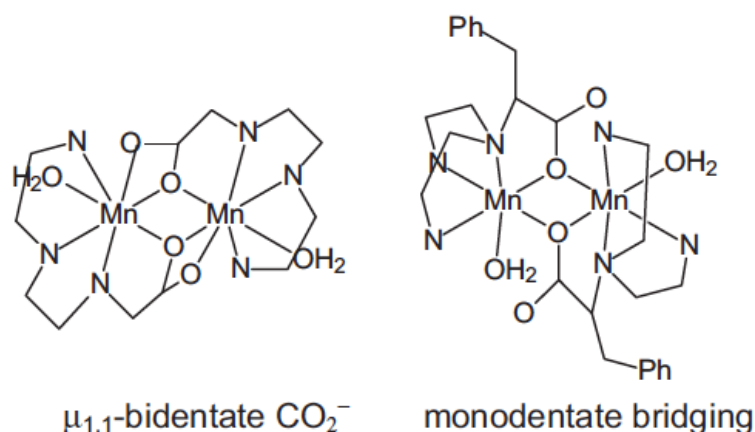


Figure 17. Mode de coordination bidentate et monodentate du carboxylato pontant les deux cations métalliques

Un certain nombre de mimes présentant des potentiels redox dans les mêmes gammes impliquent des degrés redox différents dans la catalyse de dismutation : ceci montre que les potentiels redox ne sont pas les seuls paramètres contrôlant le cycle catalytique mais que des facteurs structuraux (distance entre les 2 centres métalliques, flexibilité du ligand, présence de site vacant sur les cations Mn), importants pour la liaison de H_2O_2 jouent aussi un rôle.

Enfin, les catalyseurs peuvent être inactivés par la protonation des ligands pontants en milieux aqueux, ce qui est une limitation majeure à l'utilisation de ces complexes dans les milieux biologiques.

L'exigence d'un processus bi-électronique implique la conception de mimes avec deux centres redox (un métal et un ligand oxydable, comme les porphyrines, de deux centres métalliques ou d'un centre métallique avec des états d'oxydation variant de M^{n+} à $\text{M}^{(n+2)+}$) ce qui est différent de ce qui est requis pour les mimes de catalyseurs monoélectroniques, comme ceux mimant la superoxyde dismutase (SOD).

A ce jour, aucun mime de catalase n'a été développé à partir d'un ligand peptidique. Cela peut s'expliquer par la difficulté de concevoir rationnellement un peptide capable de se lier à deux cations métalliques avec une affinité élevée et possédant les potentiels redox appropriés.^{83,85–88} Néanmoins les peptides étant constitué de blocs moléculaires (acide aminé), il est assez aisé de synthétiser rapidement des bibliothèques peptidiques de ligands de cations métalliques. La possibilité de tester un grand nombre de complexes dans un approche utilisant une bibliothèque permettrait ainsi d'augmenter les chances d'identifier un mime de CAT. De plus, la possibilité d'incorporer des acides aminés non naturels permettrait d'augmenter la diversité au sein de la bibliothèque et de moduler les propriétés des complexes (potentiel redox, stabilité, solubilité, flexibilité...).

Dans le domaine émergent des médicaments catalytiques,^{89–91} ces travaux de thèse ont pour objectif de développer de nouveaux complexes métalliques à base de peptides mimant l'activité de la CAT dans le but de rétablir une situation normale dans les cellules soumises à un stress oxydant.

Chapitre 2 : DECOUVERTE PAR CHIMIE COMBINATOIRE D'UN COMPLEXE METALLOPEPTIDE MIMANT L'ACTIVITE DE CATALASE

I. INTRODUCTION

1) Mime enzymatique peptidique, quel est l'avantage d'avoir un ligand peptidique ?

1. *Etat de l'art : Les mimes peptidiques dans la littérature*

Peptides et métalloprotéines

Les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons amides. Elles sont présentes sous différentes formes chez l'essentiel des organismes multicellulaires et jouent un rôle clé dans de nombreux mécanismes physiologiques. Elles peuvent jouer le rôle d'hormones, de neurotransmetteurs ou de récepteurs et participent à la régulation de voies cellulaires essentielles.⁹²

Près de la moitié des protéines naturelles connues à ce jour possèdent un ou plusieurs sites de fixation de métaux.⁹³ Les cations métalliques peuvent jouer différents rôles : un rôle structural dans le maintien de la structure de la matrice protéique, un rôle de coordination (transport de petites molécules par exemple) ou un rôle dans l'acte catalytique d'une enzyme. Le rôle structural implique le plus souvent des cations métalliques ayant qu'un unique état d'oxydation tels que le zinc, le magnésium ou le calcium. Les cations métalliques ayant plusieurs états d'oxydation accessibles en conditions physiologiques peuvent être impliqués dans des processus impliquant des transferts électroniques : c'est le cas de complexes à base de fer (Fe^{II} , Fe^{III} mais aussi Fe^{IV} ou Fe^{V}), de manganèse (Mn^{II} à Mn^{VII}) ou de cuivre (Cu^{I} , Cu^{II} et éventuellement Cu^{III}). Nous parlons de métalloenzymes dès lors que ces métalloprotéines ont une activité catalytique. La catalase, fait partie de cette famille de molécules.

Médicaments peptidiques

Les peptides utilisés en médecine ont essentiellement pour but de se substituer à une protéine impliquée dans une voie d'un système naturel dans le cas de pathologie impliquant une

protéine endogène défaillante. Ainsi, ils ont pour rôle de mimer des peptides naturels endogènes ou d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques. Les médicaments peptidiques se divisent en trois groupes basés sur leur liens structuraux avec le peptide naturel : les peptides de synthèse dits *natifs* ont une séquence primaire identique à celle du peptide naturel. Les peptides de synthèse dits *analogues* sont des peptides dont la séquence est inspirée du peptide naturel mais avec des modifications. Enfin les peptides de synthèse dit *hétérologues*, sont des peptides conçus indépendamment de la structure du peptide naturel. Plus des deux tiers des médicaments peptidiques rentrant en phase d'essais cliniques sont des analogues de peptides ayant pour but l'amélioration de l'activité ou la stabilisation du peptide naturel.⁹⁴

Depuis l'isolement de l'insuline et son utilisation dans la thérapie contre le diabète dans la décennie 1920-30,⁹⁵ les médicaments peptidiques jouent un rôle essentiel dans la recherche thérapeutique et les pratiques médicales.⁹⁴ L'insuline, isolée et purifiée des ilots de Langerhans de bœuf et de porc a été le premier peptide utilisé sur patient et ayant prouvé une efficacité. Cette découverte a valu le prix Nobel en 1923 aux chercheurs Frederick Banting et John James Richard MacLeod.⁹⁶ Les peptides constituent de parfaits agents thérapeutiques du fait de leur propriétés intrinsèques, à savoir une bonne biocompatibilité, une synthèse aisée et versatile. En effet, les peptides sont des composés d'origine naturelle ou synthétisés chimiquement à partir d'acides aminés, entités naturellement présentes dans les cellules. Néanmoins, du fait de leur origine naturelle, les peptides possèdent plusieurs inconvénients majeurs. Ils peuvent être reconnus par les protéases et dégradés rapidement. De plus, la taille des peptides et leur nature polaire peuvent limiter leur pénétration cellulaire. Les peptides possèdent globalement un temps de demi-vie très court en conditions physiologiques, une faible perméabilité membranaire et une biodisponibilité orale négligeable (dégradation par la digestion).⁹⁷ Par conséquent, il a fallu une phase de recherche et développement importante afin de contourner ces limitations. Afin de limiter la dégradation protéolytique, l'acétylation de l'extrémité N-terminale et l'amidation de l'extrémité C-terminale s'est avérée être une solution convaincante. La présence de certains acides aminés dans la séquence peptidique augmenter les probabilités d'une dégradation protéolytique dans le plasma. En effet, les peptides riches en Pro, Glu, Ser et Thr sont plus sujets à la dégradation enzymatique. De plus, les peptides possédant à leur extrémité N-terminale un Met, Ser, Ala, Thr, Val ou Gly ont un temps de demi-vie plus long que ceux avec une Phe, Leu,

Asp, Lys ou Arg. Plusieurs logiciels permettent aujourd'hui de prédire les sites de clivages (PeptideCutter, PROSPER, CutDB).⁹⁸ Enfin, l'ajout d'acides aminés non naturels ou la conjugaison du peptide avec une entité moléculaire d'une autre nature permet également de réduire cette dégradation.^{99,100} Malgré une nette amélioration de la stabilité des peptides par ces différentes stratégies, l'administration des médicaments peptidiques par voie orale reste limitée. Des voies d'administration alternatives ont été développées telles que l'administration subcutanée, intramusculaire, par spray nasal ou par patchs transdermiques. Par ailleurs, cette faible stabilité protéolytique est désormais vue comme un avantage puisque les peptides sont plus facilement éliminés par clairance rénale évitant ainsi leur accumulation au niveau des reins mais également des autres organes notamment du foie, des poumons et de l'intestin.⁹²

Les nouvelles connaissances sur les propriétés physico-chimiques des peptides et les nouvelles stratégies développées, permettent aujourd'hui de pouvoir moduler les propriétés d'un peptide. La longueur, la solubilité, la charge nette et l'hydrophobicité peuvent être utilisées afin de moduler l'activité et la sélectivité d'un peptide. Des études indiquent que les médicaments peptidiques ont près de six fois plus de chances que les petites molécules chimiques de passer avec succès la phase 1 de développement clinique.⁹⁴

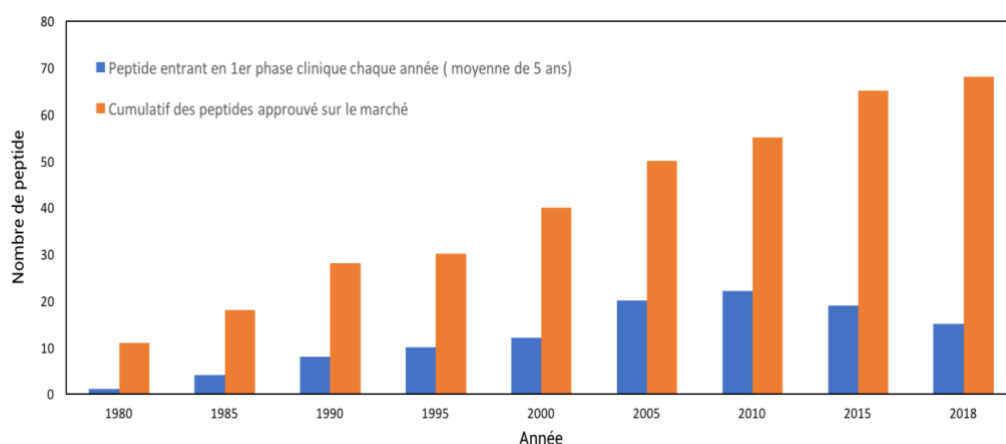


Figure 18. Nombre de peptides entrant chaque année en 1^{er} phase clinique ou étude pilote sur l'homme et nombre total de peptides approuvés sur la marché pour une application pharmaceutique.⁹⁴

En un siècle, le domaine de la thérapie peptidique a considérablement évolué et le potentiel de cette famille d'agents thérapeutiques n'est plus à prouver. En 2004, les médicaments à base de peptides ou de protéines représentaient plus de 10% du chiffre global de l'industrie pharmaceutique. Plus de 40 médicaments sur les 200 les plus vendus cette année-là étaient

de cette famille.¹⁰¹ Les antidiabétiques, Victoza® (ligraglutide) commercialisé par le laboratoire Novo Nordisk et Byetta® (peptide de type glucagon) commercialisé par Amylin, sont les médicaments peptidiques les plus vendus avec plus de deux milliards de dollars de ventes par an pour chacun d'entre eux. À ce jour, plus de 60 médicaments peptidiques sont sur le marché (Tableau 2) et plus de 300 sont en phase de développement ou d'essai clinique. Le taux de croissance annuel composé (TCAC) de l'industrie mondiale sur la thérapie peptidique a été évalué à près de 10% de 2016 à 2024. Cette croissance est notamment due à une augmentation des pathologies métaboliques, des maladies du système nerveux central et des cancers chez l'homme qui correspondent à 80% des parts de revenus du marché mondial de la thérapie peptidique.

Tableau 2. Liste de quelques peptides thérapeutiques avec une autorisation de mise sur le marché ou en phase d'essai clinique.¹⁰²

MÉDICAMENT	COMAPGNIE PHARMACEUTIQUE	SOURCE	PATHOLOGIE	PHASE
Plenaxise™®	Praecis Pharmaceuticals	GnRH	Cancer de la prostate	NDA déposé
FUZEON™	Trimeris	gp41	SIDA	Approuvé
Lupron depot®	Takeda Abbott Pharmaceuticals	GnRH, LH-RH	Cancer de la prostate	Approuvé
Lupron depot®	Takeda Abbott Pharmaceuticals	GnRH, LH-RH	Endométriose	Approuvé
Exubra®	Inhale/Pfizer	Insulin	Diabète type I et II	3
Symlin®	Amylin	amyline	Diabète type I et II	3
Plenaxise	Praecis Pharmaceuticals	GnRH	Endométriose	2/3
Isegran	IntraBiotics	protégrine	Pneumonie	2/3
Oralin™	Generex	insuline	Diabète type I et II	2/3
Exendin-4	Amylin	Glucagon peptide	Diabète type II	2
Oral calcitonin	Emisphere / Novartis	calcitonin	Ostéoporoses	2
Oral insulin	NOBEX	insuline	Diabète type I et II	2
T-1249	Trimeris	HIV2, SIV, gp41	SIDA	1/2
HER-2/neu vaccine	Corixa	HER-2/neu	Cancer du sein et de l'ovaire	1
Oratonine	NOBEX	calcitonin	L'ostéoporose	1
Apan™	Praecis Pharmaceuticals	b-amyloid	Alzheimer	1

2. Conception des médicaments peptidiques : administration d'enzymes recombinants.

Les peptides sont des composés obtenus soit par isolement à partir d'espèces vivantes soit par synthèse chimique ou biologique. Dès lors qu'une pathologie est caractérisée par l'absence ou la défaillance d'une protéine identifiée, il est théoriquement envisageable d'administrer chez le patient la même protéine isolée et purifiée chez une autre espèce. Ce fut le cas en 1920, lors de l'isolement de l'insuline à partir de pancréas de bœuf et de porc dans la thérapie contre le diabète, avec en 1950, l'isolement de adrénocorticotrophine (ACTH) à partir des glandes bovines et porcines dans le cas de pathologies menant à des troubles endocriniens

notamment le syndrome de Cushing. Néanmoins, cette approche thérapeutique rencontre de nombreux inconvénients mentionnés plus haut.

3. Conception des médicaments peptidiques : synthèse peptidique par voie chimique

La production de médicaments peptidiques par synthèse chimique devient possible dès 1950. En effet, Perh Edman met au point une méthode de dégradation peptidique qui permet la détermination de la séquence primaire d'une protéine.¹⁰³ Ainsi, dès lors qu'un peptide naturel endogène est identifié comme bioactif, celui peut-être isolé et séquencé par la méthode de dégradation d'Edman. Une fois la séquence connue, il est possible de synthétiser le peptide natif, ou de concevoir des peptides analogues avec des propriétés pharmacologiques optimisées.

La méthode de « dégradation d'Edman »,¹⁰³ amélioration de la méthode de dégradation de Bergmann,¹⁰⁴ est basée sur une réaction chimique entre l'extrémité N-terminale libre d'un peptide et l'isothiocyanate de phényle suivi d'une cyclisation de l'acide aminé en position N-terminale et son clivage. La nature de l'acide aminé isolé sous forme de phénylthiodihyantoïne (PTH) est ensuite déterminée à l'aide d'une analyse par chromatographie ou par électrophorèse. Cette réaction répétée plusieurs fois permet l'identification ordonnée de chaque acide aminé constituant le peptide (Schéma 4).

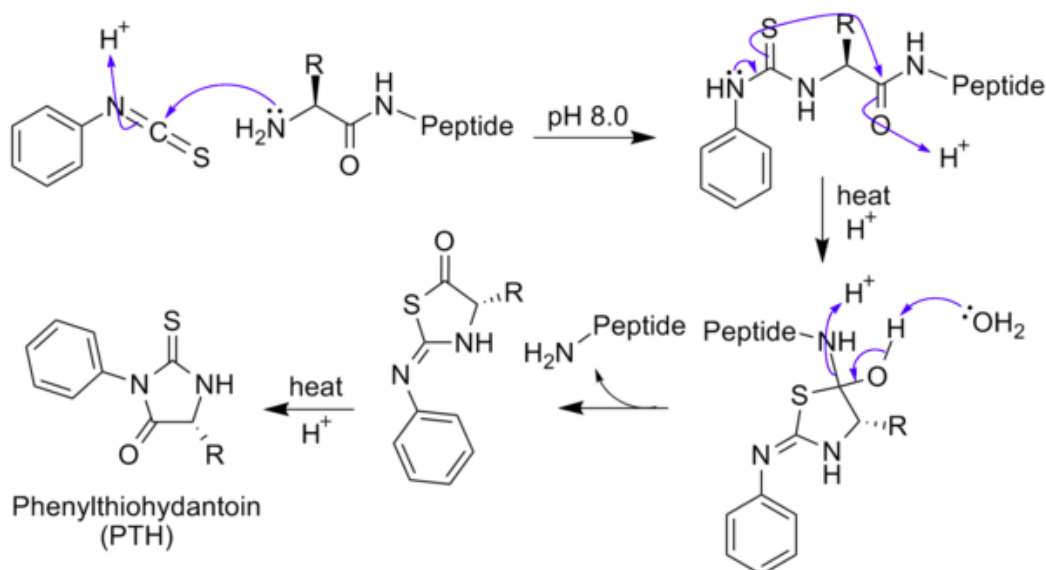


Schéma 4. Mécanisme de dégradation d'Edman.¹⁰⁵

Synthèse phase liquide / Synthèse support solide (choix des résines)

La synthèse peptidique consiste à produire un peptide par couplages successifs d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons amide. Un nombre de 500 acides aminés a été recensé chez les espèces vivantes, dont 22 acides aminés protéinogènes (Figure 19).¹⁰⁶ Les acides aminés protéinogènes sont ceux qui entrent comme brique élémentaire dans la synthèse ribosomale des protéines. Ils y sont incorporés par des ARN de transfert lors de la traduction des ARN messagers par les ribosomes. Ces acides aminés sont des molécules essentiellement chirales avec une configuration naturelle L. Ils peuvent être classés selon certaines propriétés : polarité, charge électronique et hydrophobicité.

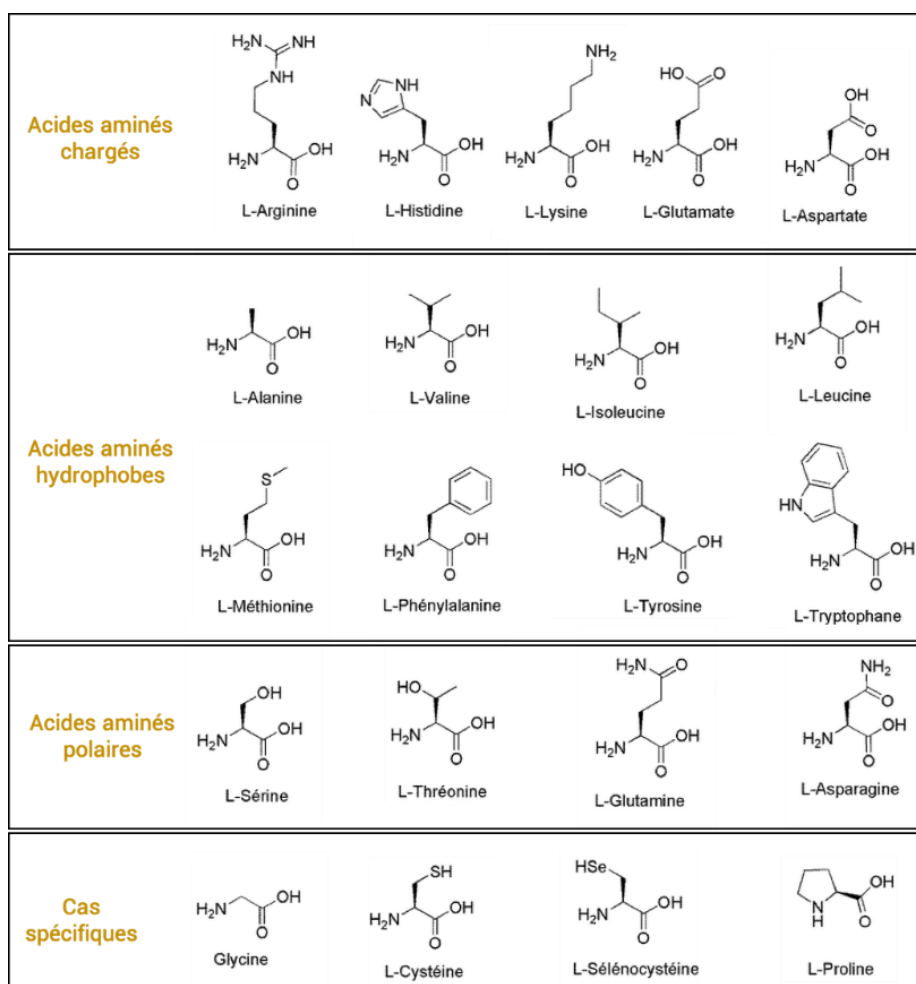


Figure 19. Liste des 21 acides aminés naturels protéinogènes. Figure adaptée de l'illustration de Dancojocari.¹⁰⁷ (la pyrrolysine, 22^e acide aminé protéinogène n'y figure pas car on ne la trouve que chez certaines archées méthanogènes)

La synthèse par voie chimique permet de concevoir des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels de configuration L ou D. Il existe aujourd'hui différentes techniques permettant la production aisée d'analogues ou d'hétérologues de peptides endogènes.

La synthèse peptidique sur support solide (SPPS) est à ce jour la méthode de synthèse la plus utilisée. Cette méthode, publiée en 1963 par Merrifield, se base sur une synthèse sur un support solide de type polymère.¹⁰⁸ L'élongation du peptide se fait de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale par l'ajout successif d'acide aminé sur support solide. Les acides aminés utilisés possèdent leurs chaînes latérales et leurs extrémités N-terminales protégées de manière orthogonale.

La synthèse peptidique sur support solide (SPPS) se déroule en 7 étapes : (1) La première étape correspond au greffage du premier acide aminé (AA_n avec la fonction amine protégée) par son extrémité acide carboxylique sur la résine fonctionnalisée souvent présentée sous forme de particules sphériques ou « billes ». (2) S'ensuit un lavage du milieu réactionnel par filtration afin d'éliminer l'excès de résidu AA_n non greffé sur la bille. (3) L'amine de AA_n est ensuite déprotégée. (4) L'acide aminé suivant, AA_{n+1} est rajouté au milieu réactionnel, ce qui permet la formation d'une liaison peptidique par réaction de couplage de l'amine de l'acide AA_n avec l'acide carboxylique de AA_{n+1} . (5) Le milieu réactionnel est à nouveau filtré afin d'éliminer l'excès de résidu AA_{n+1} non couplé. Les étapes 3,4 et 5 sont répétées pour les acides aminés suivants jusqu'à l'obtention de la séquence peptidique souhaitée. (6) Enfin, les chaînes latérales des acides aminés sont déprotégées. (7) Le clivage du peptide peut se réaliser conjointement à l'étape précédente ou séparément selon la fonction de la résine et les conditions de déprotection choisies. L'étape de filtration, qui permet un retrait facile des excès de réactif, permet une synthèse rapide, aisée d'une quantité de peptide importante. Chaque étape a un rendement élevé car des excès importants des réactifs et des agents de couplage sont utilisés. Ces derniers sont également essentiels pour l'obtention d'une bonne pureté énantiomérique : ils permettent souvent d'inhiber la racémisation.¹⁰⁹ La synthèse de peptide sur support solide peut être totalement automatisée.

La réalisation d'une synthèse sur support solide nécessite de choisir la stratégie de protection, la nature du support et son lien clivable (ou linker en anglais) associé.

La nature de la bille de résine et le lien associé :¹¹⁰ la résine utilisée doit être chimiquement inerte et stable dans les conditions de synthèse et de taille suffisamment grande pour être

facilement filtrable. Cette résine doit être facilement fonctionnalisée par un lien afin de pouvoir y coupler un acide aminé. Différents liens sont adaptés à la SPPS. Ils nécessitent des conditions de clivages particulières et permettent l'obtention d'un peptide avec l'extrémité C-terminale fonctionnalisée après clivage de la bille. Le choix du lien se fera donc selon le résultat final souhaité (clivage du peptide concomitant à la déprotection de chaînes latérales, nature de l'extrémité C-terminale souhaitée, conditions de clivage...) (Tableau 3).

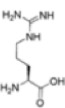
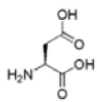
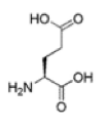
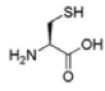
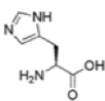
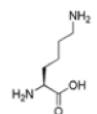
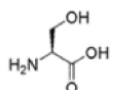
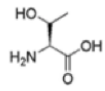
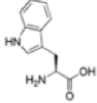
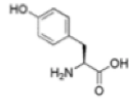
Tableau 3. Liste des liens les plus communément utilisés en SPPS par stratégie Fmoc/tBu ¹¹⁰

Lien	Condition de clivage	Fonctionnalisation terminal carboxyle
4-(2',4'- dimethoxyphenyl- aminomethyl)- phenoxymethyl-polystyrene (Rink)	TFA dilué, AcOH	Amide
2-chlorotrityl chloride (CLTR)	AcOH	Acide libre
3-amino-3-(2-nitrophenyl)propanoic acid (ANP)	hv= 253 nm	Acide libre

La stratégie de protection :¹¹¹ Il existe à ce jour plus de 250 groupements protecteurs adaptés à la synthèse peptidique sur support solide. La stratégie de protection choisie régit les conditions de déprotection. La déprotection de l'extrémité N-terminale du peptide qui est réalisée à chaque nouveau couplage est orthogonale à la déprotection des chaînes latérales des acides aminés qui doit être réalisée en fin de synthèse. La stratégie Fmoc/tBu et la stratégie t-BOC/Bzl sont les plus couramment utilisées.

Le développement des techniques d'isolement, de séquençage et de synthèse autorise la conception de médicaments peptidiques de plus en plus complexes. Durant ces trois dernières décennies, la longueur moyenne des peptides utilisés en thérapeutique a doublé passant de 9 acides aminés dans les années 80 à 20 acides aminés à ce jour.

Tableau 4. Groupements protecteurs d'acides aminés les plus communément utilisés lors de stratégies Fmoc ou t-Boc

Acide aminé	Groupe de la chaîne latérale	Groupe protecteur	
		Stratégie Fmoc	Stratégie t-Boc
Arginine - Arg - R		2,2,5,7,8 pentaethyl-croman-6-sulfonyl	tosyl
Acide aspartique - Asp - D		t-butyl	benzyl
Acide glutamique - Glu - E		t-butyl	benzyl
Cysteine - Cys - C		trityl	p-methylbenzyl
Histidine - His - H		trityl	tosyl 2,4-dinitrophenyl
Lysine - Lys - K		t-butyloxycarbonyl	2-Cl-bezyloxycarbonyl
Sérine - Ser - S		t-butyl	benzyl
Thréonine - Thr - T		t-butyl	benzyl
Tryptophan - Trp - W		t-butyloxycarbonyl	formyl
Tyrosine - Tyr - Y		t-butyl	2-Br-bezyloxycarbonyl

2) Découverte de métallopeptides actifs par chimie combinatoire

La conception rationnelle de métallopeptides inspirée de la séquence de la metalloenzyme endogène est très fastidieuse. Il est en effet très complexe d'obtenir un complexe peptidique stable et ayant simultanément, de façon significative, l'activité biologique souhaitée. La

chimie combinatoire s'avère être une méthode de choix afin d'amplifier les chances de découvrir un peptide d'intérêt ayant les propriétés souhaitées dans une visé thérapeutique ou non.

1. La chimie combinatoire peptidique

La chimie combinatoire a pour objectif la conception de nouvelles molécules révélant une activité biologique ou une propriété souhaitée. Elle se base sur la combinaison de plusieurs composés ou blocs moléculaires différents pouvant réagir l'un avec l'autre afin de créer une entité nouvelle possédant la propriété ciblée. Le concept de la chimie combinatoire est donc étroitement lié à celui de bibliothèque moléculaire.

La chimie combinatoire peptidique voit le jour en 1984 avec les travaux de H. Mario Geysen.¹¹² Ces travaux ont pour but de déterminer le rôle de chaque acide aminé présent dans l'épitope d'une protéine virale. Pour cela, 208 hexapeptides proches de la séquence protéique d'intérêt ont été synthétisés sur support solide et leurs interactions avec l'anticorps concerné ont été étudiées par test ELISA. Cette étude repose sur la technologie dite de « *multi-pin* ». Chaque peptide est synthétisé indépendamment dans des plaques de micros-puits étiquetées sur un support (pin). La sélection immunologique est par la suite effectuée simultanément pour tous les peptides dans chacun de ces mêmes puits. L'anticorps se lie aux peptides les plus affins et les complexes sont retenus par le support. Les peptides ayant une bonne affinité sont ainsi identifiés. L'analyse simultanée d'un grand nombre de peptides est un gain de temps considérable. Néanmoins, la synthèse indépendante de chaque peptide est un réel inconvénient et s'avère être le facteur limitant. Certaines techniques permettaient la synthèse simultanée de deux à quatre peptides, comme que la méthode de Gorman basée sur la mise au point d'un appareil permettant d'attacher sur un même mélangeur rotatif quatre cellules de réaction ou la méthode de Rietschoten basé sur l'utilisation de billes de résine de taille différente.¹¹³ Cependant, ces procédures ont eu une portée et un caractère pratique limités.

Richard Houghten¹¹⁴ propose en 1985, la technique du *tea-bag*, qui permet la synthèse rapide d'un grand nombre de peptides. Cette méthode est illustrée dans le cas de travaux ayant pour objectif l'analyse de l'interaction d'anticorps avec des antigènes de la protéine d'hémagglutinine. Houghten a synthétisé sur support solide une bibliothèque de 248 peptides d'une longueur de 13 acides aminés. Chaque peptide ne diffère de la séquence de l'épitope

de la protéine d'hémagglutinine que d'un résidu d'acide aminé. La synthèse de chaque peptide se fait dans un sachet étiqueté et perméable au solvant, le *tea-bag* (Figure 20). Lorsque l'acide aminé à coupler est identique à plusieurs peptides, les sachets correspondant à ces peptides sont incubés dans la même solution de solvant contenant l'acide aminé en question. Ces étapes de couplage se font donc simultanément pour tous les peptides concernés, ce qui simplifie grandement la réalisation de la synthèse. Ainsi, la bibliothèque de 248 peptides a été synthétisée en deux semaines seulement. Les peptides ont ensuite été déprotégés et clivés de la résine. Enfin, chaque contenant de sachet est ensuite adsorbé dans un unique puit qui est méticuleusement étiqueté afin de réaliser le test ELISA selon la méthode de Geysen. Cette technique de « tea-bag » permet ainsi de réduire de manière conséquente la durée de réalisation (ou de synthèse) d'une bibliothèque peptidique. De plus cette technique est compatible avec toutes les résines couramment utilisées en SPPS et permet la synthèse de peptides en quantité suffisante pour satisfaire la majorité des besoins.

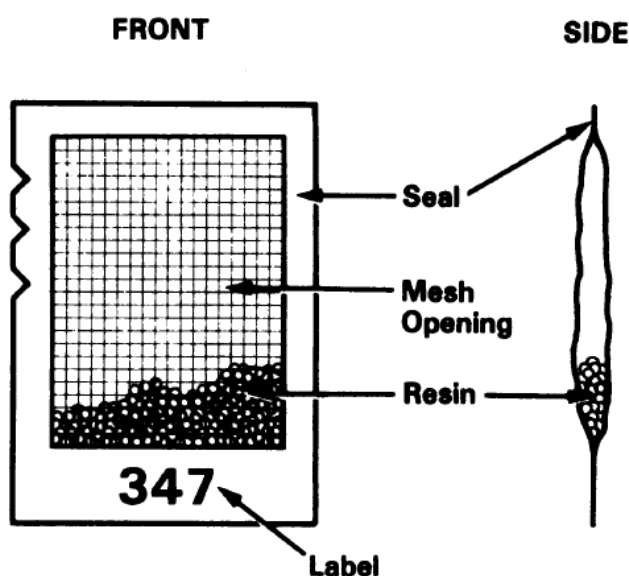


Figure 20. Représentation d'un « tea-bag » utilisé dans les travaux de Houghten.¹¹⁴

Kit S. Lam propose en 1991 le concept de la synthèse peptidique selon l'approche « one bead - one compound (OBOC) », dans le cas de travaux ayant pour objectifs l'identification rapide et le séquençage de ligands montrant une bonne affinité pour des molécules accepteurs d'intérêt (enzyme, récepteur, anticorps ...).¹¹⁵ Chaque bille de résine porte plusieurs exemplaires (selon sa capacité de charge (50-200 pmol)) d'une unique séquence peptidique.

Lam et son équipe sont parvenus à synthétiser une bibliothèque composée de plusieurs millions de peptides selon la stratégie « *split and pool* » mise au point par Furka.^{116,117} Cette stratégie est schématisée ci-dessous de manière simplifiée pour des tripeptides pour lesquels à chaque position 3 acides aminés ont été introduits : l'alanine (A), la glycine (G) ou la valine (V). La synthèse se fait sur des microbilles de résines, sphériques d'un diamètre de 100 à 200 μm : un lot de plusieurs billes de résines est dans un premier temps divisé en 3 lots différents afin de coupler pour chaque lot, l'un des 3 acides aminés cités. Après le couplage, les billes sont rassemblées et mélangées pour reformer un unique lot, puis de nouveau séparées en 3 lots pour le couplage suivant. Ainsi en seulement 3 étapes, 27 ($=3^3$) tripeptides sont synthétisés (Figure 21a).

Dans le cas des travaux de Lam, ce processus est utilisé pour produire une bibliothèque de pentapeptides incorporant à chaque position les 19 acides aminés naturels (excepté la cystéine). Ainsi en seulement 5 étapes, une bibliothèque constituée de 2 476 099 ($= 19^5$) peptides différents a été synthétisée. Une fois les peptides synthétisés, ceux-ci sont déprotégés mais non clivés. Les billes portant des peptides sont incubées dans une solution contenant la molécule accepteuse préalablement couplée à une fluorescéine. Ainsi, les billes portant un peptide capable de lier cette dernière se colorent et sont détectables parmi les billes non-réactives (Figure 21b). Contrairement à la méthode de Geysen ou d'Houghten, dans la méthode OBOC les billes sont toutes mélangées et non étiquetées. La séquence des peptides portés par les billes sélectionnées n'est pas connue. Il est donc nécessaire que les HITs soient séquencés à l'aide d'une dégradation d'Edman et d'une analyse par électrophorèse. La quantité de peptides synthétisés sur une unique bille ne permet généralement pas de faire des caractérisations plus poussées. Le peptide sélectionné est donc synthétisé à nouveau en quantité plus importante.

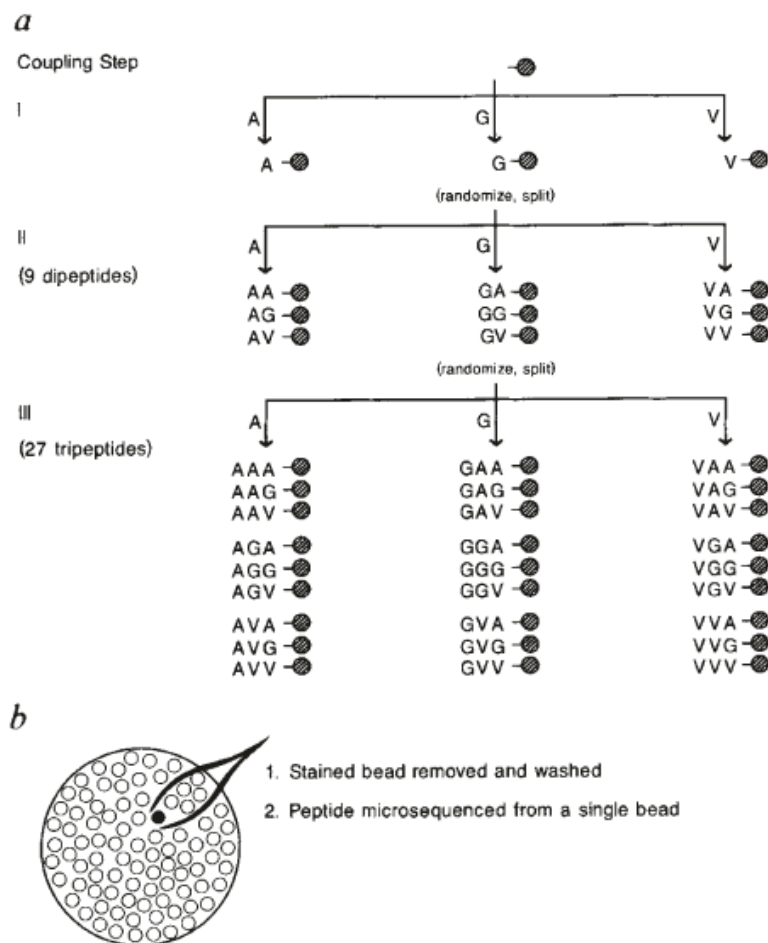


Figure 21. (a) Schéma représentant le principe de la méthode OBOC couplée à la stratégie split and pool pour la synthèse d'une bibliothèque de 27 tripeptides sur support solide. Schéma représentant une bille colorée dû à la liaison d'un peptide porté par un accepteur couplé à une fluorescéine. La bille est isolée et lavée puis le peptide est séquencé.¹¹⁵

Les travaux de Lam fournissent une preuve de concept de la stratégie OBOC et sont aujourd'hui validés par toute la communauté scientifique. La synthèse de bibliothèques peptidiques selon la méthode OBOC couplée à la stratégie « split and pool » a permis de faire une avancée considérable dans l'utilisation de la chimie combinatoire pour le développement de peptides médicaments. Cette méthode est depuis la référence en chimie combinatoire qui se comporte 3 étapes : premièrement, la conception et la préparation d'une bibliothèque de composés. Deuxièmement, le criblage de la bibliothèque pour une activité ciblée et la sélection des hits. Enfin, la détermination de la structure des hits.

Ces trois étapes ont rapidement été adaptées à la synthèse de composés non peptidiques. En effet, la diversité structurale des peptides étant limitée, l'application à des composés de nature moléculaire différente a permis une diversité chimique et structurale permettant des

caractéristiques pharmacologiques intéressantes. Ainsi, la chimie combinatoire s'est étendue à la conception de bibliothèques de diverses familles moléculaires (Figure 22).

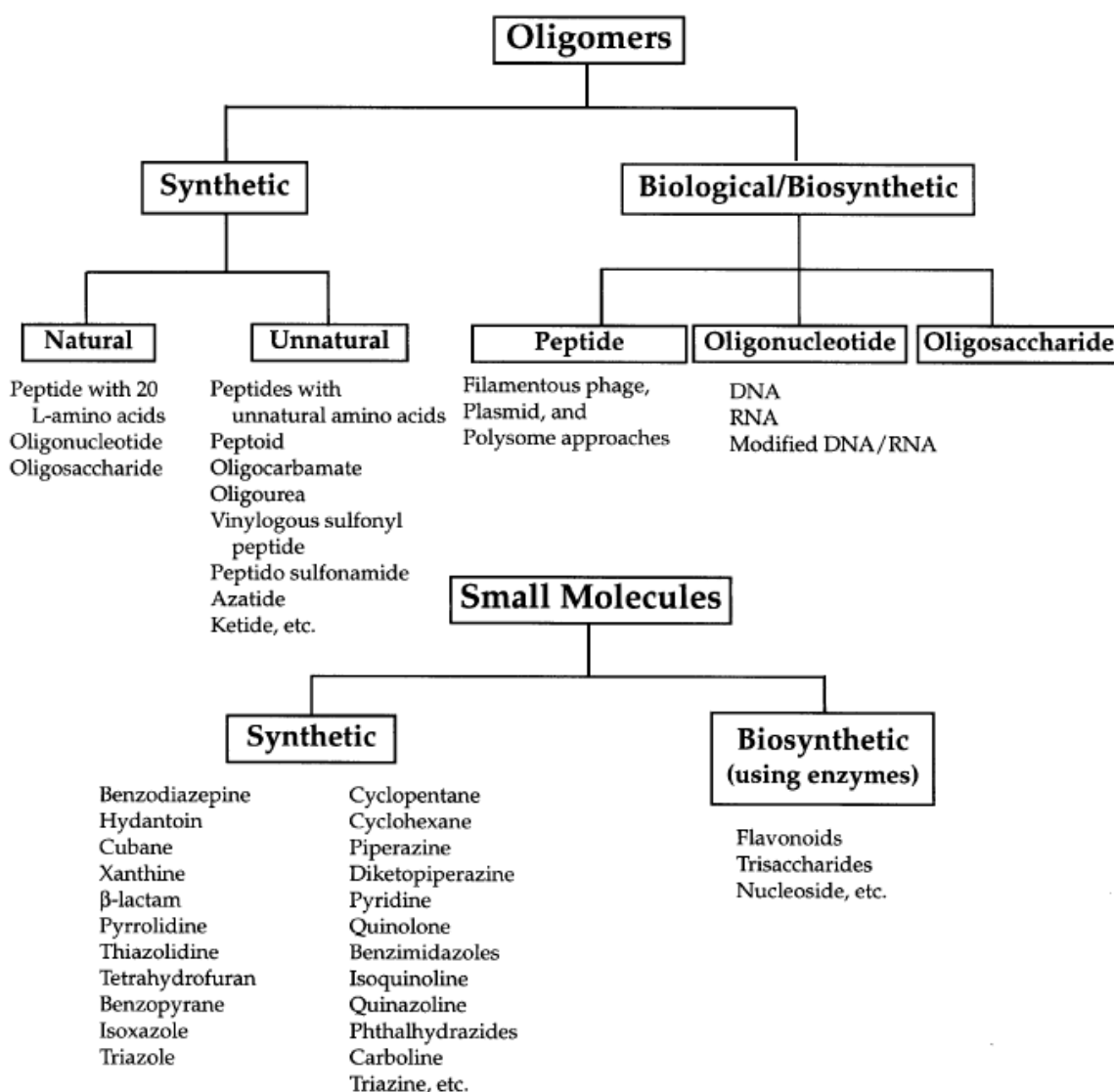


Figure 22. Diversité des bibliothèques produites par chimie combinatoire.¹¹⁸

2. Utilisation de la chimie combinatoire pour la découverte de peptides bioactifs

L'approche par bibliothèque combinatoire a ainsi été utilisée durant ces vingt dernières années pour différentes applications et a permis la découverte de plusieurs médicaments.^{119–}

¹²⁹ De nombreux travaux traitent de la conception de bibliothèque de complexes métalliques à base de peptides. Quelques-uns d'entre eux sont répertoriés dans le Figure 21 ci-dessous. Ces travaux sont pour la majorité basés sur des tests de criblages concernant l'affinité métal-

ligand avec pour l'objectif d'étudier la structure d'un site actif d'une métalloprotéine endogène.^{130,131,132} Néanmoins, quelques travaux se concentrent sur la conception de nouveaux composés ayant une activité catalytique ciblée,^{133,134} mais rares sont ceux qui portent sur la conception de mimes de metalloenzymes.¹³⁵

Tableau 5. Travaux basés sur la conception de metallopeptide par le biais de bibliothèques combinatoires.

Type de bibliothèque	Composition	Criblage	Objectif	Ref.
Ni-Peptide	18 Tripeptides (Xaa-Lys-His, Lys-Xaa-His, and Xaa-Xaa-His)	Test de liaison peptidique	Optimiser le domaine de clivage de l'ADN	136
Zn-Peptide	38 thiol-pseudotripeptides	Test d'activité inhibitrice de TeNt	Inhibiteurs de la Zn peptidase	137,138
Cu-protéine		Test de liaison / stabilité	Etude de la coordination du <i>Blue Copper CysHis₂Met</i>	131,132
Hemoprotéines - Fe	462 hémoprotéines modulaires	Criblage du potentiel redox	Interaction entre protéine et cofacteur hème	139
Cu-peptide	125 peptides	Test de stabilité / activité	Mimes de SOD	140
Protéine à Heme	Hémoprotéines	Test d'activité	Nouvelles peroxydases	141
Tb ³⁺ - peptide	15 000 peptides (Asp-X-Asn-X-Asp-X-X-Glu-X-X-Glu)	Test de luminescence	Développement de Tags luminescents	142
Complexes métallique	5760 complexes (192 ligand * 30 metals)	Test d'activité	Epoxydation asymétrique d'alcènes	133
Zirconium - Peptide	625 décapeptides	Test d'activité	Mimes de phosphatase	134
Metal-peptide	93500 complexes (8500 peptides * 11 metals)	Test de liaison peptidique	Chélation de complexe radioactif	143
Zn/Eu - ligand	1458 complexes	Test d'activité	Mime de phosphodistase	135

TeNt : Tétanospasmine (ou toxine tétanique)

Berkessel et Riedl¹³⁴ ont présenté en 1991 les premiers travaux qui consistent à concevoir une bibliothèque combinatoire peptidique dans le but de mimer une activité enzymatique. Ils proposent la synthèse d'une bibliothèque de 1 458 metallopeptides selon la stratégie « split and pool » afin de découvrir un nouveau mime de phosphodiesterase. Les peptides sont synthétisés sur support solide selon la méthode OBOC. Les ligands sont par la suite complexés à des ions Zn^{2+} ou Eu^{3+} . L'activité phosphodiesterase des complexes est criblée selon deux tests d'activités colorimétriques :

- Le premier test repose sur la formation de bleu de Prusse dans le cas de complexes actifs (Figure 23A) : dans un premier temps, les billes portant les complexes sont incubées avec le phosphoester **1**. Dans le cas de billes actives, la transestérification du phosphoester **1** mène à la formation de l'hydroxylamine **2** par liaison hydroxylamine-phosphate. Les billes sont ensuite traitées avec de l'hexacyanoferrate III de potassium ($K_3[Fe(CN)_6]$) et du chlorure de fer III ($FeCl_3$) qui par réaction avec l'hydroxylamine **2** mène à la formation du bleu de Prusse, un précipité bleu. Ainsi, les billes de résine portant un complexe ayant une activité phosphodiesterase sont identifiées par leur coloration bleue.
- Le second test, illustré par la Figure 23B, repose sur la réaction de transestérification du bis(para-nitrophenyl)phosphate **3** par les complexes actifs, ce qui mène au transfert du groupement phosphate sur la bille de résine. Les billes actives couplées au groupe phosphate chargé négativement sont visibles en fluorescence par liaison ionique avec un violet de crésyl qui lui est chargé positivement. La séquence primaire des HITs sélectionnés est déterminée par dégradation d'Edman.

Des expériences supplémentaires ont été effectuées avec les complexes de zinc sélectionnés afin d'obtenir des informations quantitatives sur leur activité phosphodiesterase. Le complexe de zinc sélectionné possède une activité phosphodiesterase 2,5 fois supérieure à l'activité observée pour le cation Zinc II seul.

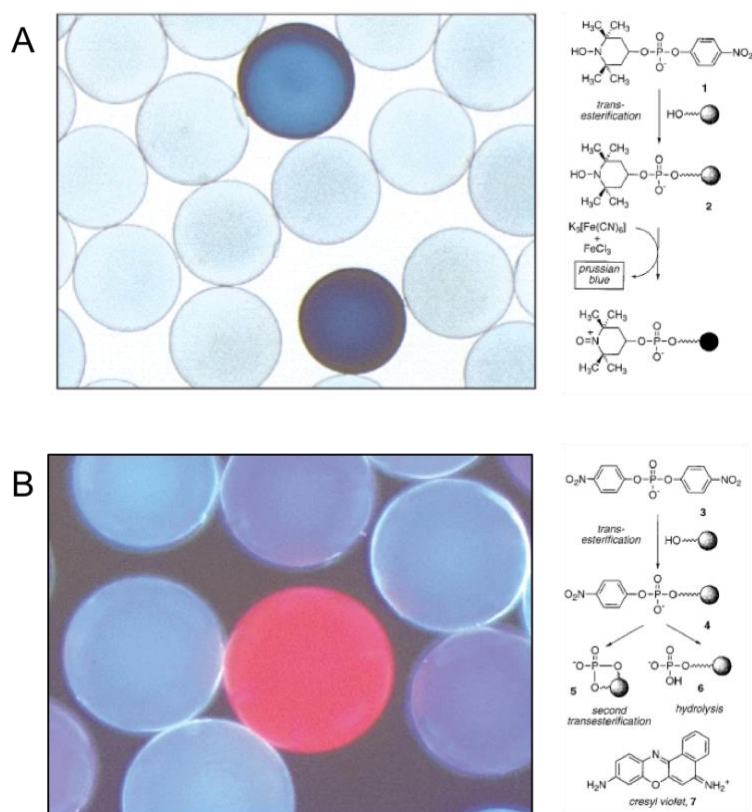


Figure 23. Criblage de la bibliothèque de Berkessel and Riedl pour l'activité phosphodiesterase: identification de billes portant un complexe actif (a) par une coloration bleu due à la présence de bleu de Prusse, (b) ou par fluorescence par la présence de violet de crésyle.¹³⁵

De récents travaux effectués au sein de notre équipe ont permis la conception de la première bibliothèque de métallopeptides à activité de type Superoxyde Dismutase (SOD).¹⁴⁰ Une bibliothèque de 125 peptides a été synthétisée selon la méthode OBOC et *split and pool* et les billes ont été incubées dans une solution de Cu(II) puis immobilisées dans un gel d'agarose. Le gel est incubé en présence de riboflavine et de Nitrobleu tetrazolium (NBT) puis irradié en UV. L'irradiation UV de la riboflavine mène à la formation de l'ion superoxyde qui réagit avec la NBT pour former du formazan, colorant le gel en violet. Ainsi dans le cas de billes portant des mimes de SOD actifs, la réaction de l'ion superoxyde et du NBT est inhibée (Figure 24A). Les billes actives sont ainsi détectables par leur couleur jaune, due au NBT n'ayant pas réagi (Figure 24B). Différents cations métalliques ont été utilisés sur cette librairie et un HIT à Cu^{II} a été sélectionné puis séquencé à l'aide d'une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le complexe a par la suite été synthétisé à grande échelle, étudié à l'aide de plusieurs méthodes de caractérisation et évalué par un test de Fridovich pour déterminer les constantes catalytiques apparentes. Le complexe sélectionné présente une activité de l'ordre de 1,3% de

l'activité enzymatique du CuZnSOD, ce qui coïncide à l'ordre de grandeur des meilleurs mimes de SOD présents dans littérature. Le complexe de cuivre identifié a de plus montré une activité antioxydante intéressante sur deux modèles cellulaires.¹⁴⁰

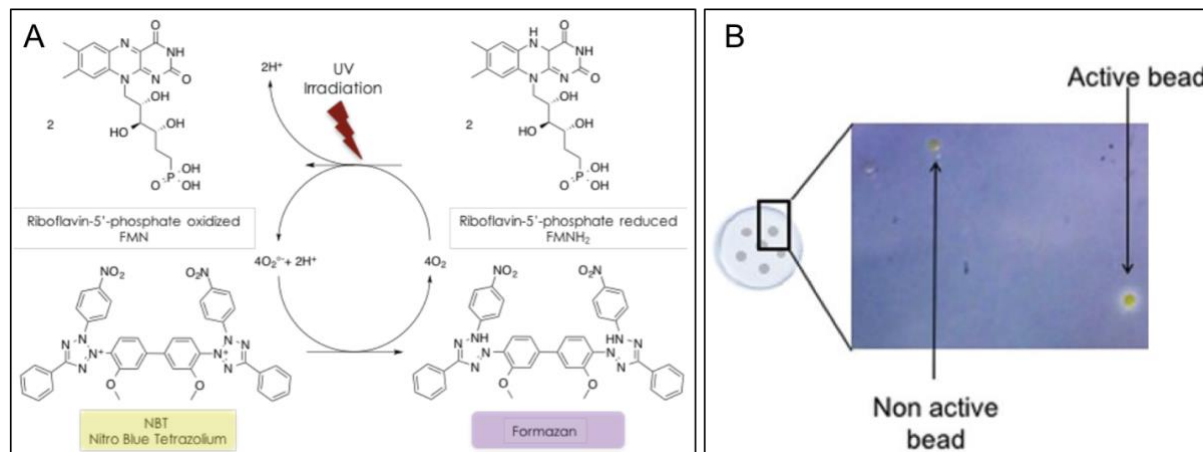


Figure 24. (A) Schéma représentant le mécanisme de production de l'ion superoxyde lors du test de sélection des mimes de SOD sur gel. (B) Identification des billes portant des complexes actifs par l'observation d'un halo jaune.¹⁴⁰

II. IDENTIFICATION D'UN COMPLEXE ACTIF PAR CHIMIE COMBINATOIRE COUPLÉE À UN TEST D'ACTIVITÉ SUR GEL

1) Méthode de synthèse et d'identification des Hits.

Pour identifier des complexes peptidiques ayant une activité de type Catalase, nous nous sommes inspirés d'une méthode mise au point par le groupe de B. Imperiali¹⁴² pour la découverte de complexes peptidiques luminescents de lanthanides. Elle permet l'identification facile et rapide de séquences peptidiques ayant une forte affinité pour un ion métallique, le Tb^{3+} , et des propriétés de luminescence par le biais d'un criblage par fluorescence d'une bibliothèque de complexes.

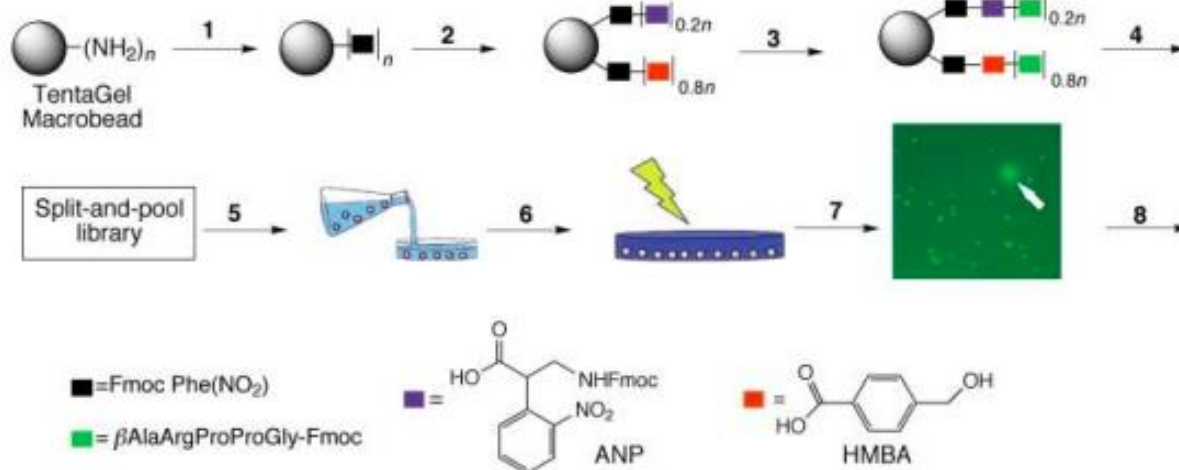


Figure 25. Synthèse de bibliothèque et méthode de criblage pour la découverte de nouveau marqueur de liaison au lanthanide développées par B.impariali¹⁴²

Cette méthode comporte trois étapes (Figure 25) :

- la synthèse d'une bibliothèque peptidique combinatoire sur support solide selon la méthode de « split and pool ».
- une sélection sur un gel des complexes luminescents
- une identification des hits par spectrométrie de masse

Dans un premier temps, la synthèse peptidique se fait sur support solide, sur des macro billes de Tentagel, billes de tailles importantes, visible à l'œil nu. La synthèse débute par un couplage de liens orthogonaux (20% d'un lien photoclivable et 80% d'un lien clivable en milieu basique). Il s'ensuit le couplage d'une séquence peptidique faisant office d'espaceur « G-P-P-R-βA ». Enfin, la bibliothèque peptidique est synthétisée par couplage successif d'acides aminés selon la stratégie Fmoc. De la diversité a été insérée au sein de leur bibliothèque à l'aide d'une procédure de synthèse « split and pool » croisée à une méthode de « coiffage » inspirée des travaux de Griesinger et al¹⁴⁴. Ces dernières étapes seront plus longuement expliquées dans la suite de ce manuscrit.

La seconde phase consiste à cribler la bibliothèque afin d'y identifier les peptides ayant l'activité souhaitée. Pour cela un test d'activité sur gel a été mis en place. Les billes comportant les peptides ont été incorporées dans un gel d'agarose comportant de l'ion Tb³⁺. Le gel a par

la suite été irradié par rayon UV afin de libérer localement autour de chaque bille, la proportion de peptide liée par le lien photoclivable. Enfin le gel a été éclairé par un transilluminateur, pour révéler les billes fluorescentes comportant donc des peptides ayant complexés l'ion Tb^{3+} .

Enfin, la dernière phase est le séquençage des peptides sélectionnés. L'identification des hits est réalisée par spectroscopie de masse.

2) Conception et Préparation de la bibliothèque JRF1

1. *Conception de la bibliothèque peptidique (choix de la séquence peptique)*

Dans le cadre de cette thèse, la bibliothèque a été conçue pour générer des peptides capables de complexer fortement l'ion Cu^{2+} ou/et l'ion Mn^{2+} . Pour obtenir des séquences peptidiques aptes à répondre à cette caractéristique, nous nous sommes basés sur les données de la littérature.

Peptides coordonnant le cuivre :

Plusieurs séquences peptidiques ont été décrites pour leur capacité à chélater fortement les ions Cu^+/Cu^{2+} . Les sites donneurs N-imidazole des histidines sont des ligands de cations métalliques observés au sein des sites de chélation des métalloprotéines, et la stabilité des complexes formés suivent la tendance de la série de Irving–Williams, avec une stabilité optimale pour l'ion Cu^{2+} .^{145,146} Le mode de complexation du métal avec les résidus d'histidines (le nombre, la position) a souvent été invoqué comme ayant un impact dans l'activité biologique intrinsèque de ces métalloprotéines. Afin de rationaliser la stabilité des complexes peptidiques de cuivre, de nombreuses courtes séquences peptidiques comportant plusieurs histidines ont été étudiées comme modèle par plusieurs équipes de recherche.^{145,147,148,149} Notamment, Csire et collaborateurs¹⁴⁹ ont regroupé les données thermodynamiques obtenues pour de courtes séquences peptidiques de 3 à 7 acides aminées contenant de 2 à 4 histidines (Figure 26). Cette étude a permis de mettre en évidence que :

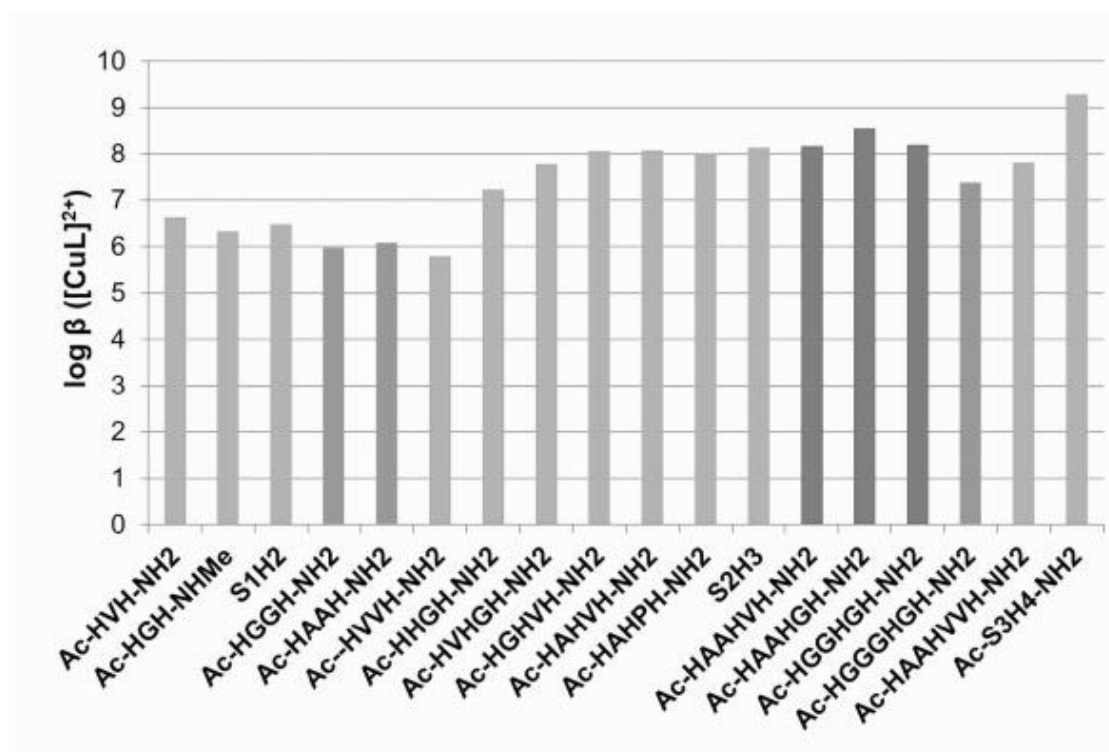


Figure 26. Constante de stabilité ($\log\beta$) de complexes Cu/ligand de plusieurs peptides contenant des histidines.¹⁴⁹

- La stabilité thermodynamique des complexes augmente considérablement avec le nombre d'histidine. La valeur moyenne des constantes de stabilité ($\log\beta$) mesurées sont de 5.5, 7.5 et 9.0 pour des ligands peptidiques ayant respectivement 2, 3 ou 4 N-imidazole impliqués dans la coordination du Cu.
- Dans le cas de séquences à deux histidines, les complexes les plus stables sont ceux obtenus à partir de séquences où les histidines sont séparées par un seul acide aminé non coordonnant Z : HZH. Plus la distance entre les histidines est importante plus la stabilité du complexe diminue.
- Dans le cas des ligands à trois histidines, les complexes les plus stables sont ceux sous la forme : HZZHZH.

Les motifs suivants $H(ZH)_n$, $H(ZZH)_n$ et $H(HZH)_n$ se révèlent donc permettre de bonnes constantes d'affinité, tout en rappelant certains modes de coordination dans les métalloprotéines. Nous avons donc conçu notre bibliothèque en nous basant sur ces 3 motifs.

Par ailleurs, S3v3g3 et al. indiquent que la pr3sence d'une amine terminale libre a une forte influence sur la nature de la sph3re de coordination ainsi que sur la stabilit3 du complexe de cuivre r3sultant.¹⁴⁵ La pr3sence d'une extr3mit3 N-terminale libre facilite en effet la d3protonation des liaisons amides des premiers r3sidus. Le site N-terminal d3prot3g3 devient alors le site de liaison principal du m3tal puis la coordination implique l'histidine. La complexation des amidates du squelette, se trouvant entre le N-terminal et l'histidine, au m3tal, est favoris3e. Ainsi, selon la position de la premi3re histidine (en position 1, 2 ou 3) dans un court peptide, diff3rents modes de coordination sont privil3gi3s (Figure 27): si l'histidine se trouve en position 1, un complexe cyclique 3 6 chainons de type Histamine (NH₂, N⁻) sera g3n3r3¹⁴⁷ et la pr3sence en exc3s de ligand peut engendrer la formation de complexe bis(ligand).¹⁵⁰ Dans le cas o3 l'His est en position 2, un complexe de type cycles 3 5-6 chainons fusionn3s (NH₂, N⁻, N_{im}) est form3. Enfin si l'His est en position 3, un motif de type ATCUN (NH₂, N⁻, N⁻, N_{im}) sera impliqu3. Ces modes de coordination impliquant une amine terminale sont ceux qui conduisent aux m3tallopeptides les plus stables thermodynamiquement.⁸⁻¹⁰ Cependant, ce type de coordination n'est pas celui impliqu3 dans les m3talloenzymes antioxydantes comme les SOD. L'extr3mit3 N-terminale des peptides au sein de notre biblioth3que est donc ac3tyl3e afin de permettre la formation d'une multitude de modes de coordination et d'3viter que l'3quilibre thermodynamique ne favorise que les 3 modes pr3c3demment cit3s.

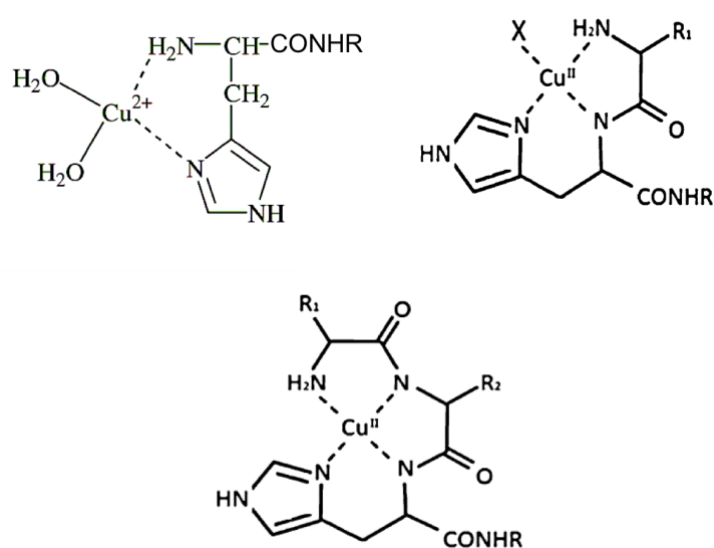


Figure 27. Repr3sentation des diff3rents modes de coordination de peptide au cuivre(II) selon la pr3sence de l'histidine en position 1 (haut- gauche), en position 2 (haut-droite) ou en position 3 (bas). Image adapt3e des articles ^{154,155}

Notre bibliothèque possède donc la séquence générique suivante : **Ac-His¹-His²-Z³-His⁴-His⁵-Z⁶-His⁸-NH₂**, Z représentant un acide aminé non coordonnant.

Peptides coordonnant le manganèse :

Nous souhaitons également qu'il y ait au sein de cette bibliothèque des peptides capables de complexer l'ion Mn^{2+} . Pour cela, nous nous sommes basés sur les travaux de Medici et al¹⁵⁶ qui décrivent le fragment 1165-1171 de la protéine YPK9, ayant comme rôle de protéger le système nerveux et les cellules d'une intoxication au manganèse et d'ainsi éviter le syndrome parkinsonien. Ce fragment est une courte séquence peptidique de 7 résidus Pro¹-Asp²-Glu³-Lys⁴-His⁵-Glu⁶-Leu⁷ identifiée comme celle chélatant le manganèse (Figure 28):

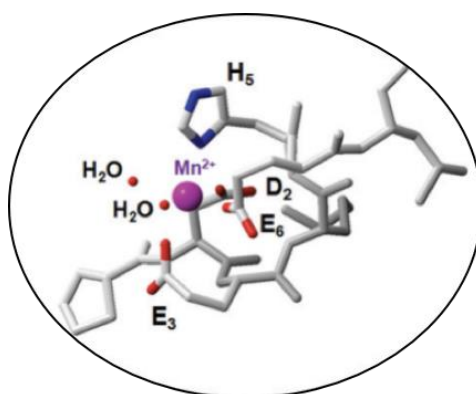


Figure 28. Ion $Mn(II)$ complexé avec le peptide $Ac-P^1D^2E^3K^4H^5E^6L^7-NH_2$.¹⁵⁶

D'après la caractérisation du fragment, notamment par RMN, il a été démontré que les groupements donneurs impliqués dans la coordination du manganèse sont les suivants : L'azote Nε de l'imidazole de l'histidine (5), et les γ-O des chaînes latérales de l'aspartate (2) et des deux glutamates (3 et 6). Inversement, les autres acides aminés, la proline (1), la lysine (4) et la leucine (7) ne semblent pas impliqués dans la coordination du métal. Il apparaît donc clairement que la chélation du Mn, se fait davantage *via* les carboxylates.

La séquence générique de la bibliothèque peptidique finale est donc une combinaison de la séquence polyhistidine précédemment citée et le fragment d'YPK9 : **Ac- Pro¹-X²-X³-Lys⁴-His⁵-X⁶-Leu⁷-His⁸-NH₂**. Ici X désigne les positions où de la variabilité a été introduite de telle sorte que les 2 séquences précédemment évoquées puissent être présentes (Tableau 6)

Tableau 6. Conceptions de la bibliothèque à partir du fragment YPK9 et de la séquence polyhistidine

Position d'acide aminé	1	2	3	4	5	6	7	8
Fragment d'YPK9 (Chélateur de Mn^{2+})	Pro	Asp	Glu	Lys	His	Glu	Leu	
Séquence polyhistidine (Chélateur de Cu^{2+})		His	His	Z ^a	His	His	Z	His
Séquence générique de la Bibliothèque	Pro	X	X	Lys	His	X	Leu	His

^a Z : acide aminé non coordonnant. ^b X : acide aminé : D ou E, H, Y, R, G.

Les acides aminés en positions 2, 3 et 6 sont importants pour la complexation du Cu^{2+} et du Mn^{2+} , mais sont différents pour le fragment d'YPK9 et le fragment polyhistidine. Les positions 2, 3 et 6 ont donc été choisies pour introduire de la diversité au sein de notre bibliothèque. Ainsi à chacune de ces trois positions, en plus de l'histidine, des acides aspartique ou glutamique présents dans les séquences d'intérêt, trois autres acides aminés ont été introduits dans le but d'accroître la variété des séquences accessibles (Figure 29), en ajoutant des amino-acides coordonnants, ou non coordonnants, ces derniers permettant une flexibilité dans la séquence pouvant favoriser son repliement autour du cation métallique, ou chargés.

- La tyrosine, acide aminé ayant la capacité de coordonner les métaux par le groupement phénol.
- La glycine, acide aminé neutre, peu encombré, non coordonnant et n'ayant pas de conformation particulière.
- L'arginine, acide aminé chargé positivement à pH physiologique favorise la solubilité du peptide.

Une bibliothèque potentiellement constituée de 125 peptides avec des propriétés de chélation différentes devrait être ainsi obtenue (Figure 29). En effet, chaque peptide ayant une séquence peptidique différente, devrait avoir une sphère de coordination unique, et donc former un complexe peptide-métal qui possède une géométrie, une stœchiométrie et un potentiel redox qui lui est propre.

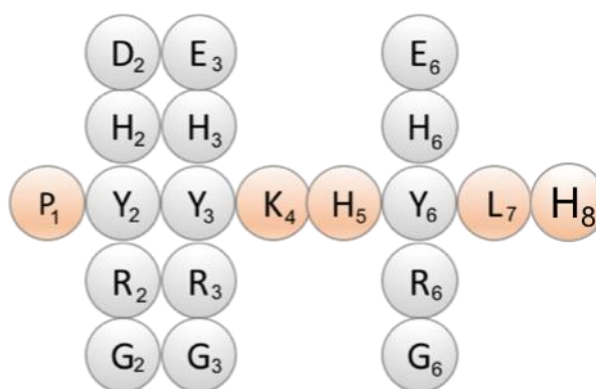
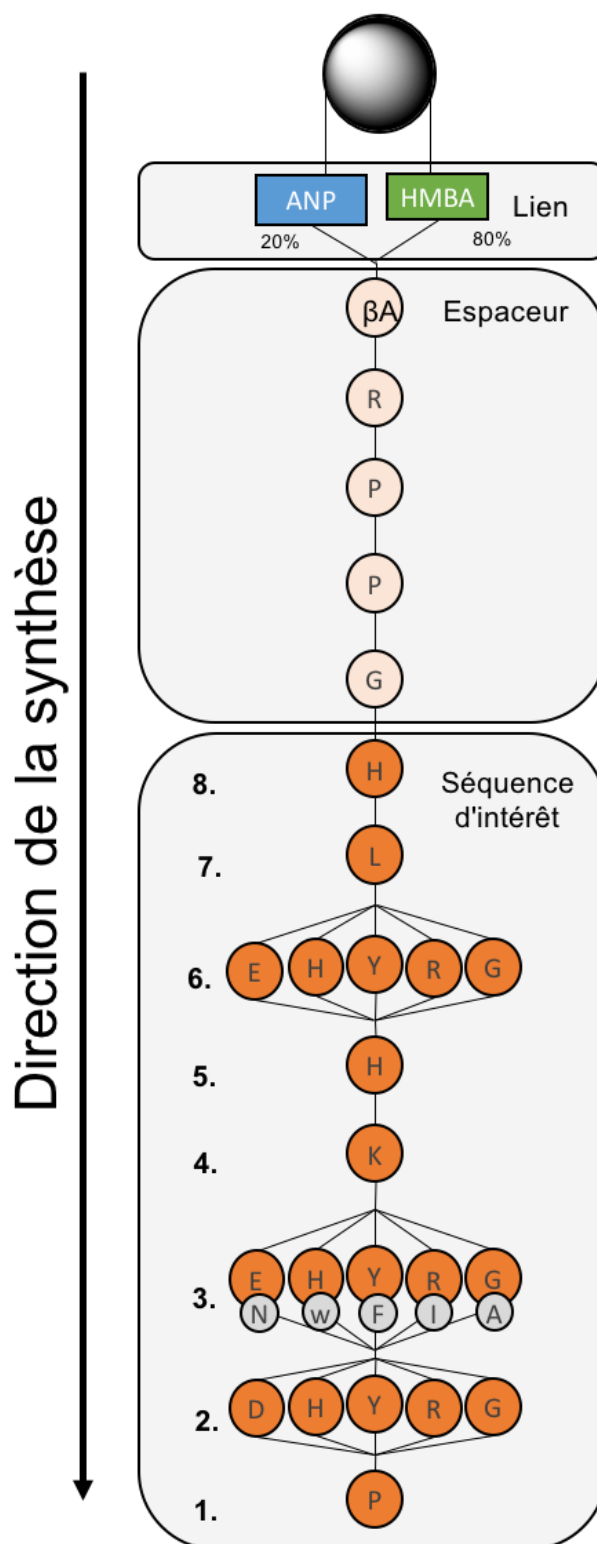


Figure 29. Bibliothèque peptidique sur bille.

2. Synthèse de la bibliothèque peptidique par la méthode « split and combine »

La bibliothèque peptidique a été synthétisée sur support solide par une méthode combinatoire « split and pool ».¹¹⁵ Cette méthode conduit à une bibliothèque « une bille-un peptide », chaque bille comportant plusieurs exemplaires d'une séquence unique (Figure 30).^{116,118}

La synthèse (Figure 30) a été réalisée suivant la stratégie de B Imperiali¹⁴² sur des macro billes de Tentagel (substitution de la résine : 0.24 mmol/g, diamètre : 280-300 μm), ([partie expérimentale voir «Peptide library synthesis on solid support » p.163](#)). Ces billes ont été choisies pour trois raisons : (i) leur haute capacité de charge (3 à 5 nmol/bille) permet la synthèse d'une quantité importante de peptides, (ii) leur faculté à gonfler dans les milieux aqueux ou organiques, permet d'effectuer la synthèse peptidique en milieu organique et la synthèse des complexes et le test de sélection en milieu aqueux et (iii) leur taille importante permet de les visualiser distinctement à l'œil nu et de les isoler aisément lors du test sur gel. La synthèse a été réalisée en stratégie Fmoc, le groupe protecteur de l'amine de la chaîne principale peut donc être clivé en présence de piperidine.



ANP : Acide 3-amino-3-(2-nitrophenyl) propionique
 HMBA : Acide 4-hydroxyméthylbenzoïque

Figure 30. Synthèse de la bibliothèque peptidique utilisant la stratégie « Split and combine » selon la stratégie Fmoc. La position 3 correspond à l'étape de coiffage, 10% d'acide aminé N-Boc (coiffe : rond gris) est introduit en même temps que l'acide aminé d'intérêt (rond orange).

Dans un premier temps, deux liens clivables orthogonaux ont été introduits par liaison covalente au support solide. L'acide 3-amino-3-(2-nitrophenyl) propionique (ANP), lien photoclivable et l'acide 4-hydroxymethylbenzoïque (HMBA), lien clivable en milieu basique aqueux sont respectivement incorporés dans un ratio 2:8 .

Cette étape est suivie par l'ajout séquence espaceur : β A-R-P-P-G.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Cette séquence permet d'éloigner la séquence d'intérêt du support solide afin de diminuer les effets stériques et de favoriser sa mobilité. De plus, elle permet d'augmenter la masse molaire du peptide final et des peptides tronqués afin que, lors de l'analyse par spectroscopie de masse MALDI TOF, les pics de masse soient hors de la zone des pics liés au composés de la matrice (>500 Da). Le choix de la séquence de l'espaceur est basé sur l'étude de Youngquist et al.¹⁵⁷ Ce pentapeptide a été décrit comme étant inerte biologiquement dans le cas de test en lien avec l'HIV. Il est constitué d'acide aminés ne possédant pas de chaîne latérale coordonnante et ce pentapeptide n'adopte pas une conformation spécifique. Ceci nous laisse penser que cette séquence n'aura aucune influence sur la chélation des métaux et sur l'activité testée.

Enfin, la synthèse de la séquence d'intérêt a été réalisée par la méthode de « Split and combine » décrite par Furka^{116,117} et Lam.¹¹⁸ Cette méthode permet la synthèse facile et rapide d'une bibliothèque contenant une grande variété de séquences peptidiques. Dans notre cas, après le couplage de la glycine, correspondant au dernier acide aminé de l'espaceur, nous avons couplé l'histidine puis la lysine. En position 6 correspondant à une des positions où de la variabilité a été introduite, les billes ont été divisées en 5 portions égales. Pour chaque lot un unique acide aminé des acides aminés suivants a été couplé : H, Y, R, G ou D. Puis les billes ont de nouveau été regroupées et mélangées. C'est ce processus qui est nommé « split and combine ». Nous avons par la suite couplé l'histidine puis une lysine suivie de deux nouvelles étapes de « split and combine » pour les positions 3 et 2. Finalement, nous obtenons une bibliothèque « une bille - un peptide », chaque bille ne comportant qu'une unique séquence répétée.

Lors de la synthèse des séquences isobares sont produites en position 3. Une étape de "coiffage" a donc été réalisée à ce stade suivant la méthode développée par l'équipe de C. Griesinger, ce qui permet l'identification formelle de chaque séquence peptidique lors de l'analyse par masse MALDI.¹⁴⁴ Le coiffage consiste à introduire en plus de l'acide aminé souhaité, une petite portion (environ 10%) d'une « coiffe » qui permet de générer une

séquence tronquée d'une masse molaire connue. Dans notre cas les « coiffes » sont des acides aminés protégés en position N-terminale par un groupement BOC qui n'est pas clivé lors de la synthèse en stratégie Fmoc et qui ressemble à l'acide aminé introduit afin qu'ils aient des réactivités similaires. Chaque bille de support solide porte donc 90% du peptide entier et de 10% du peptide écourté de masse connue et caractéristique de la coiffe introduite. Lors de l'enregistrement du spectre de masse, la combinaison du pic de masse du peptide entier et du pic de séquence écourtée permettra de déterminer sans ambiguïté la séquence du peptide.

La synthèse peptidique se termine par le couplage de la proline, une étape d'acétylation de l'amine N-terminale puis de la déprotection des chaînes latérales en milieu acide. Compte tenu de la nature des liens clivables choisis, l'étape de déprotection des chaînes latérales en milieu acide ne conduit pas au clivage des peptides, ce qui diffère de la synthèse peptidique classique. Chaque étape de couplage et de déprotection de l'amine terminale est contrôlée par un test colorimétrique (test de « Kaiser ») mettant en évidence la présence d'amines libres.

Une bibliothèque peptidique comportant 125 peptides différents a donc été synthétisée. Néanmoins, les acides aminés n'ayant pas tous la même réactivité et la répartition des billes lors des étapes « split » n'étant pas tout à fait égale, la bibliothèque peptidique n'est pas composée d'une même quantité de chaque peptide.

3. Formation des complexes peptidiques

Pour former les complexes, les peptides supportés provenant de la bibliothèque ont été incubés en présence d'une solution de cuivre(II), de manganèse (II) ou de fer (III) dans un tampon HEPES (50 mM, pH 7,5) pendant 2h à 60°C puis lavées ([Partie expérimentale voir «Complexes formation » p. 165](#)).

Même si les séquences des peptides de la bibliothèque ne sont pas conçues pour chélater spécifiquement le fer, nous avons décidé d'incuber également les peptides dans une solution d'un sel de Fe(III) car il s'agit d'un cation métallique impliqué dans le site de coordination de HemeCAT.

3) Sélection des complexes actifs par un test d'activité catalase sur gel

1. Principe du test d'activité CAT sur gel colorimétrique

La sélection des complexes actifs au sein de la bibliothèque a été réalisée sur gel selon la stratégie développée par Imperiali et al¹⁴² et que nous avons adaptée en un protocole pour un criblage fonctionnel des métallopeptides pour une activité de type CAT¹⁶⁰ (Figure 31) (Partie expérimentale voir «Combinatorial screening and selection» p. 165).

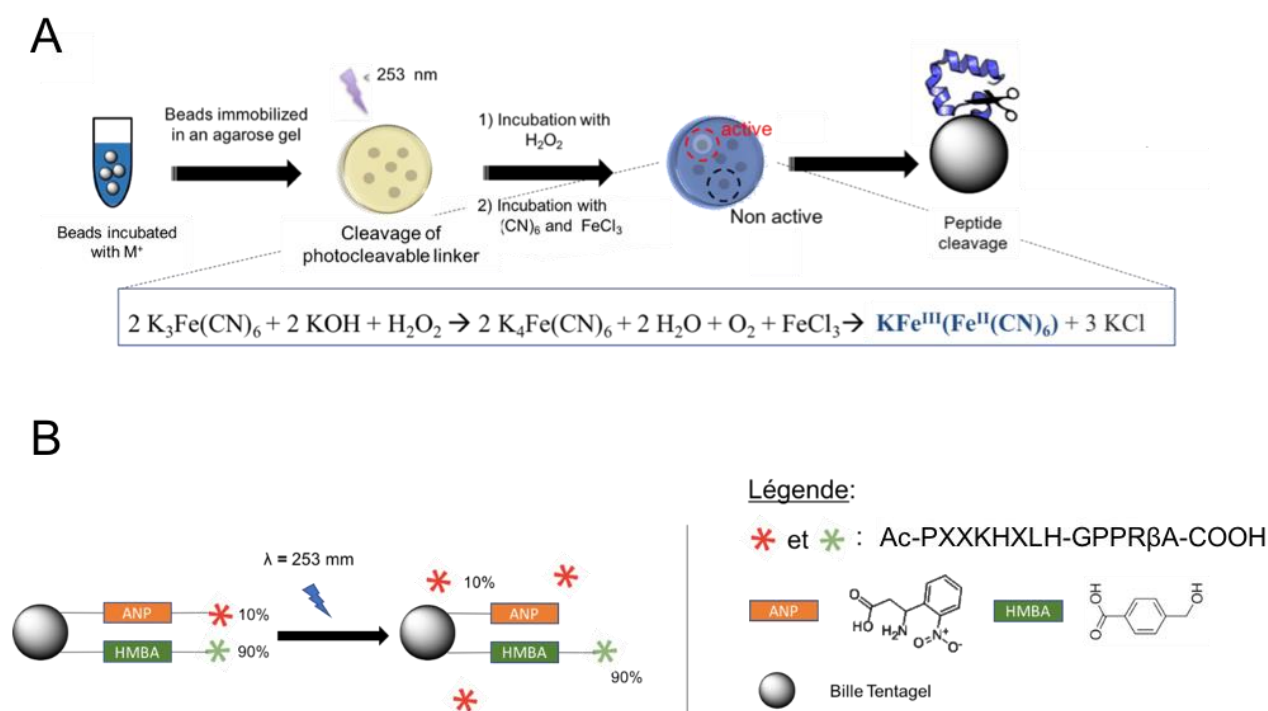


Figure 31. (A) Schéma du criblage des complexes peptidiques par un test d'activité colorimétrique sur gel. (B) Photolyse de l'ANP par rayonnement UV

Les billes portant les complexes peptidiques ont été immobilisées dans un gel d'agarose (2% en masse) thermoréversible. Une irradiation par rayonnement UV (254 nm) pendant 15 minutes permet de rompre le lien photoclivable (ANP) et de permettre aux complexes (soit 20% des complexes peptidiques) ainsi libérés de diffuser autour de la bille (Figure 31B). La diffusion des complexes augmente ainsi leur accessibilité et la zone du gel la surface où ils pourront potentiellement exercer leur activité. Le gel est ensuite incubé dans une solution de H₂O₂ à 0,003% pendant 15 min, lavé puis incubé dans deux solutions de complexes ferriques à 2%, K₃Fe(CN)₆ et FeCl₃. En présence de H₂O₂, K₃Fe(CN)₆, une solution jaune orangée est réduite en ferrocyanure de potassium K₄Fe(CN)₆. K₄Fe(CN)₆ réagit ensuite avec FeCl₃ pour former le bleu de Prusse (K₃Fe^{III}(Fe^{II}(CN)₆)). Lorsqu'un mime de CAT est présent, le milieu

autour de la bille est appauvri en H_2O_2 en raison de sa dismutation accélérée empêchant ainsi la réduction de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ et la formation du bleu de Prusse. Une zone incolore autour de la bille indique alors la présence d'un mime de CAT actif. Ce test d'activité correspond à celui utilisé précédemment pour mettre en évidence l'activité des protéines CAT sur gel d'électrophorèse.¹⁶⁰ L'utilisation de macrobille de Tentagel nous permet de visualiser facilement à l'œil nu les billes actives et de les prélever. Le gel présent autour de chaque bille prélevée est alors dissous à chaud, le métal est décoordonné par des lavages successifs à l'EDTA et les peptides sont clivés dans une solution de NH_4OH à 28% (Figure 31).

2. Mise au point du test colorimétrique de criblage sur gel

Ajustement de la concentration en H_2O_2

Afin de s'assurer de la fiabilité du test colorimétrique, des expériences contrôles ont été effectuées.

Premièrement, des billes portant les peptides mais non incubées dans une solution de sels métalliques ont été criblées. Alors qu'un résultat négatif était attendu, il a été observé autour de toutes les billes des zones incolores, qui marquent l'absence de H_2O_2 autour des billes. Différentes hypothèses ont été émises afin de justifier ces faux positifs :

- a. Il a d'abord été suspecté qu'une réaction photochimique avait lieu au moment de la radiation sous UV donnant lieu à des espèces dérivées de peptides capables de réagir avec H_2O_2 . Cependant, même sans irradiation UV, des faux-positifs pour les peptides seuls ont été observés, invalidant cette hypothèse.
- b. Des contaminations métalliques qui pourraient être responsables de la formation de complexes actifs ont ensuite été envisagées. En effet, des complexes auraient pu être formés par contamination par des cations métalliques présents résiduellement dans les solutions (H_2O distillée) ou provenant du matériel utilisé (spatule en acier). Cette hypothèse a été écartée car des résultats faux-positifs ont également été obtenus pour des lots de billes préalablement lavées à l'EDTA, un fort ligand compétiteur du peptide.¹⁴⁶ De plus, pendant tout le processus, de l'eau ultrapure et du matériel en plastique ont été utilisés, pour minimiser ces contaminations.
- c. Enfin, la dernière hypothèse évoquée était que cette diminution locale de la concentration de H_2O_2 était due à une la réaction entre H_2O_2 et certaines chaînes latérales des peptides. Afin de le vérifier, des billes portant les peptides encore

protégés ont été testées dans les mêmes conditions. Plus aucun faux positif a alors été observé.

- d. Des complexes de fer (issus de FeCl_3 par exemple) actifs sont formés lors de l'étape de détection de H_2O_2

Dans l'objectif de déterminer laquelle des deux dernières hypothèses était la bonne, les billes portant les peptides immobilisés dans le gel ont été incubées avec une solution de H_2O_2 plus concentrée (10% au lieu de 0,003%). Les résultats positifs n'ont plus été observés. Ceci suggère donc que des complexes de fer catalytiques ne sont pas formés (sinon une activité aurait été observée) mais que les résultats précédents sont le résultat d'une réaction stœchiométrique entre les peptides et H_2O_2 . En large excès de H_2O_2 , cette réaction devient négligeable et la décoloration n'est plus observée. Afin de limiter ces faux positifs, il a fallu déterminer par la suite la concentration d' H_2O_2 adaptée pour le test, c'est-à-dire une concentration suffisamment élevée pour que la réaction stœchiométrique avec les peptides soit négligeable mais pas trop élevée pour que la coloration bleue ne sature pas le gel, empêchant la visualisation des halos incolores, indiquant la présence de catalyseurs actifs. Ainsi des essais ont été effectués sur des billes portant des peptides avec leurs chaînes latérales déprotégées sur une gamme d' H_2O_2 allant de 0,005% à 1%. Une solution d' H_2O_2 à 0,015% s'est avérée être la plus adaptée.

Modulation de la pression de sélection

Dans un second temps, afin de sélectionner uniquement les complexes actifs dont la stabilité est la plus grande, nous avons modulé la pression de sélection. Les conditions d'incubation des billes dans les solutions de cations métalliques ainsi que les lavages après incubation (concentration, temps de lavage, température) ont été optimisés jusqu'à obtention d'une sélection satisfaisante (moins de 10% des billes actives). Les billes ont été incubées dans les solutions métalliques pendant 2h à 60°C puis ont été lavées à l'HEPES (50 mM; pH 7,5; 3 x 3mL) puis à l'EDTA (25mM; pH 7,0). Le lavage à l'EDTA permet d'éliminer les cations métalliques liés faiblement aux peptides et/ou cinétiquement labiles. Cependant, cette étape ne garantit pas que les complexes restants sont plus stables ou plus inertes que le complexe EDTA-M car il s'agit d'un processus hétérogène.

Les conditions d'incubation et de lavage ont dû être optimisées pour chaque cation métallique car la stabilité des complexes correspondants est très différente (Tableau 7). Dans le cas de complexes à base de Cu^{2+} , pour obtenir une sélection optimale, les peptides nécessitent d'être incubés dans une solution de cuivre à 10 mM alors qu'une solution plus concentrée a dû être utilisée pour Mn^{2+} et le Fe^{3+} (25 mM). Un lavage avec une solution d'EDTA à 25 mM (pH 7,0) pendant 1 minute était nécessaire pour obtenir une pression de sélection suffisante avec le cuivre alors que pour le Mn un lavage de 2,5 min avec cette même solution était requis. En revanche pour le Fe, ce lavage ne devait pas excéder 30 s. D'une manière générale, les conditions requises liées à la stabilité des complexes suit la même tendance que la série d'Irving-Williams,¹⁴⁶ qui compare la stabilité de complexes de cations de métaux de transition avec des ligands de type polyamine flexibles. Ainsi, L'ion Cu^{2+} a tendance à former des complexes beaucoup plus stables que l'ion Fe^{2+} , lui-même plus stable que l'ion Mn^{2+} (Figure 32).¹⁴⁶ Toutefois dans notre cas c'est un cation fer(III) que nous utilisons.

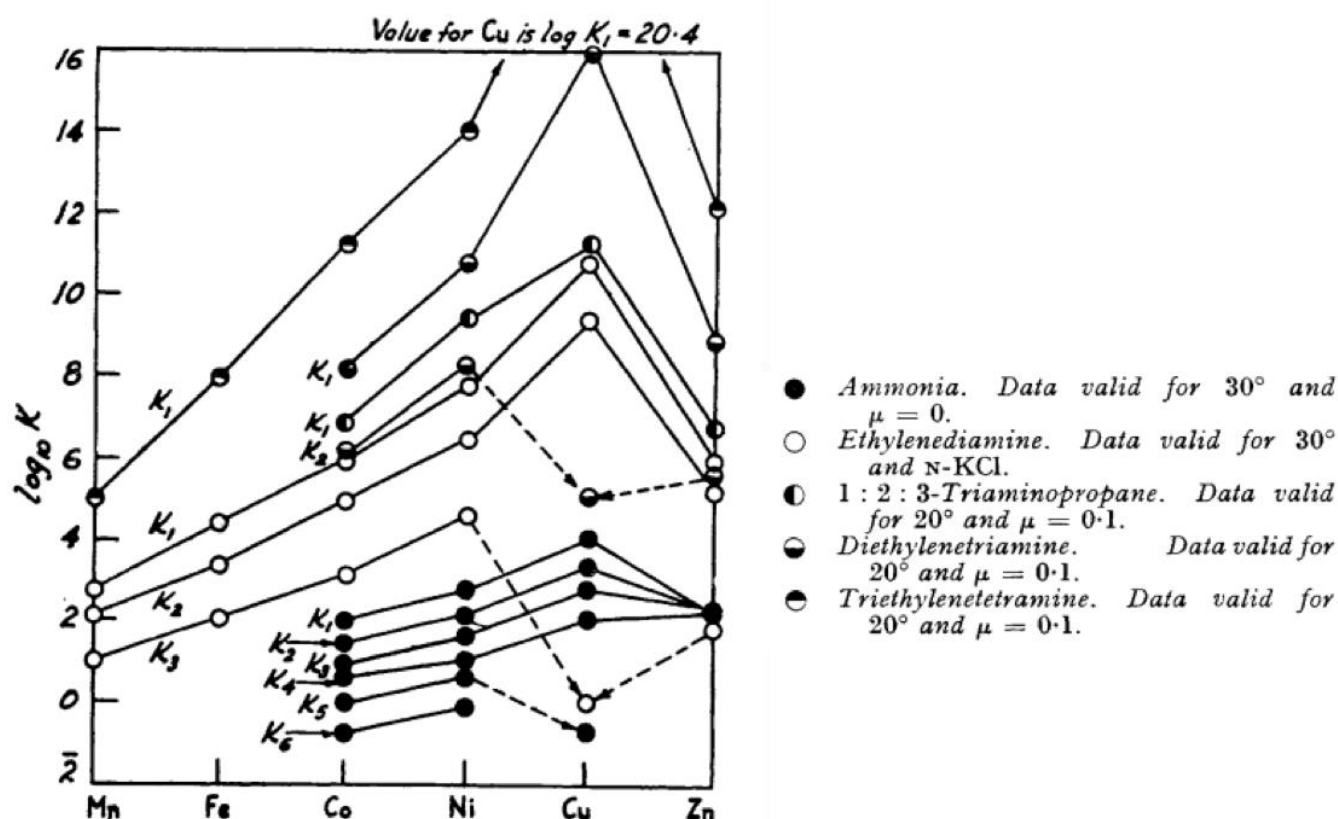


Figure 32. Image provenant de l'article de Irving et Williams représentant la stabilité de cations divalents de métaux de la première série de transition.¹⁴⁶

Tableau 7. Mise au point des conditions d'incubation et de lavage des billes pour obtenir une pression de sélection suffisante c'est-à-dire pour que moins de 20% des billes soient positives

M ⁺	M ⁺ (mM)	EDTA (mM)	Pression de sélection
Cu(CH ₃ COO) ₂	1	50	–
	1	/	–
	10	/	+
	10	1	+
	10	50	–
	10	25	++
	10	25 – (1 min)	+++
MnCl ₂	1	50	–
	1	/	–
	10	/	–
	50	/	+
	50	1	+
	50	50	–
	25	25	++
	25	25 - 2.5 min	+++
FeCl ₃ .6H ₂ O	1	50	–
	1	/	–
	10	/	–
	50	/	+
	50	1	+
	50	50	–
	25	25	++
	25	25 - 30 sec	+++

Légende :

– Pression de sélection trop importante, aucun halo blanc observé

+ Pression de sélection très insuffisante, nombre d'halos blancs > 40 billes

++ Pression de sélection insuffisante, nombre d'halos blancs > 30 billes

+++ Pression de sélection satisfaisante, nombre d'halos blancs ~ 10 billes

*Un lavage à l'HEPES (50 mM, pH7.5) est réalisé en plus pour chaque condition

3. Identification et clivage des billes portant un complexe actif

La sélection sur gel d'agarose en utilisant la procédure adaptée à chaque métal est répétée plusieurs fois. Seize, vingt et sept billes ont été respectivement sélectionnées pour les complexes de cuivre, de manganèse et de fer parmi environ 600 billes testées pour chaque cation métallique. Les billes sélectionnées ont été prélevées individuellement, le gel a été dissous dans l'eau à 100°C puis les billes ont été lavées abondamment avec une solution aqueuse d'EDTA (50 mM, pH 7) pour éliminer ou limiter la pollution par des cations métalliques. Le peptide a ensuite été clivé de la résine en milieu basique (solution de NH_4OH à 28%) puis la solution a été lyophilisée.

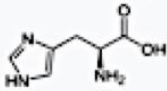
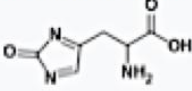
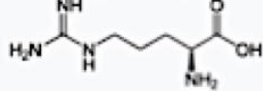
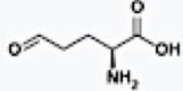
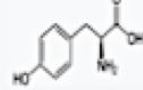
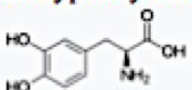
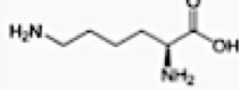
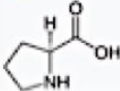
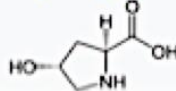
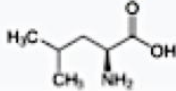
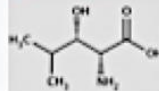
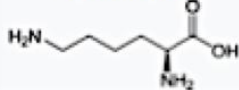
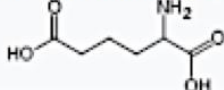
4) Analyse des peptides sélectionnés par spectrométrie MALDI-TOF et identification de leurs structure primaire à l'aide du logiciel Biblio.

1. Analyse et identification des séquence primaires des peptides sélectionnés

Chaque peptide sélectionné est analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (solution 15-25 μM), (Partie expérimentale. voir «Peptide sequence determination by MALDI-TOF mass spectrometry» p. 166). Dans la majorité des échantillons, nous observons sur le spectre les deux pics caractéristiques : le pic correspondant au peptide entier ainsi que celui correspondant au peptide écourté. Ce qui nous a permis, en utilisant le logiciel bib11 développé par Griesinger et al¹⁴⁴ de déterminer sans ambiguïté leur structure primaire. Néanmoins, dans certains cas, l'identification du peptide n'a pas pu avoir lieu, soit parce que la masse observée du peptide entier ne correspondait pas à celle de l'un des 125 peptides composant la bibliothèque, soit parce que la masse du peptide écourté ne correspondait pas à une masse possible compatible avec celle du peptide entier (

Tableau 9). Un clivage du peptide ou une modification chimique au cours du test d'activité pourrait expliquer ce résultat. Les liaisons amide du squelette peptidique ou certaines les chaînes latérales des acides aminés sont des sites d'oxydation possible du peptide en présence de H_2O_2 : l'hydroxylation des groupements aromatiques des chaînes latérales, la conversion de certains résidus d'acides aminés en dérivés carbonylés, le clivage des liaisons amides et la formation d'agrégats sont des réactions probables^{161,162,163} (Tableau 8).

Tableau 8. Oxydation des acides aminés.¹⁶³

Acides aminés			
Naturel	Oxydé	Naturel	Oxydé
Histidine (H) 	2-Oxohistidine 	Arginine (R) 	Glutamic-semialdehyde 
Tyrosine (T) 	3,4-dihydroxyphenylalanine 	Lysine (K) 	Acide 2-aminoadipique 
proline 	4-,5-hydroxyproline 	Leucine (L) 	3-hydroxyleucine 
Lysine (K) 	Acide 2-aminoadipique 		

Pour un même cation métallique, certains peptides ont été retrouvés plusieurs fois, ce qui présage d'une réelle activité catalase des complexes correspondants :

- Dans le cas des peptides à cuivre, la séquence peptidique PHYKHLH a été trouvée deux fois et une séquence très similaire (PHYKHGLH) qui ne diffère de la première que par l'acide aminé non coordonnant en position X_6 a également été trouvée.
- Dans le cas des peptides à manganèse, les séquences peptidiques PYYKHLH et PYYKHLYH ont chacune été trouvées deux fois. Ces deux séquences ne diffèrent également que par l'acide aminé en position X_6 . De plus les séquences comportant

deux tyrosines ont été observées cinq fois, ce qui laisse penser que la présence de tyrosines est nécessaire.

- Dans le cas des peptides à fer, la séquence peptidique PRRKHRLH a été retrouvée deux fois.

-

Tableau 9. Structure primaire et fréquence des peptides sélectionnés par le test d'activité CAT sur gel. Peptide en gras : peptide isolé avec une fréquence supérieure à un. Peptides en vert : peptide ayant montré une activité de type-catalase significative en UV (voir après). Acide aminé en position variable en rouge.

Ac- Pro ¹ -X ² -X ³ -Lys ⁴ -His ⁵ -X ⁶ -Leu ⁷ -His ⁸ -NH ₂					
Cu ²⁺		Mn ²⁺		Fe ³⁺	
Séquences	Fréquence	Séquences	Fréquence	Séquence	Fréquence
PHYKHRLH	2	PYYKHRLH	2	PRRKHRLH	2
PHYKHGLH	1	PYYKH^YLH	2	PRGKH^HLH	1
PRHKHELH	1	PGGKH^ELH	1	PYRKH^HLH	1
PHHKH^HLH	1	PRYKHRLH	1	PHGKH^GLH	1
PHHKH^YLH	1	PRGKH^HLH	1	PYHKH^YLH	1
PGYKH^ELH	1	PHGKH^GLH	1	PRYKH^HLH	1
PYEKHRLH	1	PGRKH^ELH	1		
PHGKH^GLH	1	PYRKHELH	1		
PDRKH^ELH	1	PGHKHELH	1		
PRYKH^GLH	1	PRHKH^GLH	1		
PYGKH^YLH	1	PRYKH^YLH	1		
PYKH^YLH	1	ND	7		
ND	3				

ND : séquences non déterminées

2. Etude statistique des séquences des peptides sélectionnés

Nous avons effectué une étude statistique des peptides identifiés. Il a été observé qu'en fonction du cation métallique choisi, les acides aminés qui ont été retrouvés en position X2, X3, et X6 étaient très différents. Dans le cas des complexes de cuivre(II), dans près de la moitié des cas, les peptides correspondants à des complexes actifs comportaient une histidine en position X2 et une tyrosine en position X3. Dans le cas des peptides issus des complexes de manganèse, en position X2, la tyrosine et l'arginine sont majoritairement retrouvées. En revanche, en position X6, aucune préférence significative n'a été mise en évidence pour les peptides issus de complexes de Mn et de Cu. Enfin, Dans le cas des complexes de fer, pour

chacune des positions X2, X3 et X6 un acide aminé est observé de manière plus abondante : l'arginine en position X2 et X3 et l'histidine en position X6 (

Tableau 10).

Pour les complexes de fer, il est assez étonnant d'observer une prédominance pour l'arginine. Même si l'arginine est un acide aminé théoriquement capable de se coordonner à un cation métallique ou de jouer le rôle de base endogène, ce genre d'interaction est rare. En effet, l'interaction cation métallique-arginine nécessite que l'arginine soit au moins sous forme neutre ($pK_i = 10,8$). Or la déprotonation demande une énergie libre importante de $7-8 \text{ kcal mol}^{-1}$.¹⁶⁴ A ce jour, seules trois métalloenzymes présentant une arginine coordonnée au métal ont été décrites. Il s'agit de complexes de fer (La biotine synthase de *E. coli*), de zinc (la forme variante Arg67 de l'anhydrase carbonique humaine 1) et de manganèse (Arginase inactivée de la *B. caldovelox*).¹⁶⁴

Tableau 10. Taux d'apparition des différents acides aminés aux positions variables X₂, X₃ et X₆.

Ac-PX ₂ X ₃ KHX ₆ LH-NH ₂									
Acide aminé	Cu			Mn			Fe		
	X ₂	X ₃	X ₆	X ₂	X ₃	X ₆	X ₂	X ₃	X ₆
D	8%	/	/	0%	/	/	0%	/	/
E	/	8%	23%	/	0%	31%	/	0%	0%
H	46%	23%	8%	8%	15%	8%	14%	14%	43%
Y	23%	46%	23%	38%	46%	23%	29%	14%	14%
R	15%	8%	23%	31%	15%	23%	57%	43%	29%
G	8%	15%	23%	23%	23%	15%	0%	29%	14%

Ainsi les séquences peptidiques suivantes ont retenu notre attention :

- PHYKHRLH : nommé CuCATm1
- PYYKHRLH : nommé MnCATm1
- PRRKHRLH : nommé FeCATm1

5) Seconde sélection : analyse quantitative de l'activité catalase par spectrométrie UV-visible des complexes sélectionnés

Afin de s'assurer que les peptides sélectionnés donnaient effectivement lieu à des complexes présentant une activité catalase intéressante, tous les complexes sélectionnés par les tests sur gel ont de nouveau été formés afin d'être analysés par spectroscopie UV à partir des solutions de peptide récupérées de chaque bille ([Partie expérimentale voir «Quantitative analysis of catalase activity measured by UV-vis spectroscopy. » p.166](#)). Compte tenu du taux de substitution des billes, des solutions de peptide à 0,5 mM ont été préparées et 10 équivalents de cations métalliques ont été ajoutés.

L'activité catalase de ces complexes (à 4 μM) dans le PBS (50 mM, pH7,5) a été déterminée quantitativement par la méthode développée par Beer et Sizer.¹⁶⁵ Cette méthode consiste à suivre la disparition de H_2O_2 à 240 nm en présence des mimes de catalase dans un tampon phosphate. La cinétique a été enregistrée pendant deux minutes. La dismutation de H_2O_2 par les mimes de catalase suit une cinétique d'ordre 1 et la pente de la courbe $A_{240} = f(t)$ permet d'accéder à la constante de vitesse de la réaction.

Les séquences peptidiques des complexes présentant les constantes de vitesse les plus importantes ont pu être identifiées. Il est important de noter que dans les cas des cations métalliques seuls, des pentes faibles allant de 2,07 à 6,72 $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$ ont été obtenues, ce qui indique qu'ils sont peu efficaces pour catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène.

Pour chaque métal, une séquence peptidique a été retenue.

- Complexe de cuivre : PHYKHLH (nommé CuCATm1) avec une constante de 21,55 $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$
- Complexe de fer : PRGKHLLH (nommé FeCATm2) avec une constante de 18,10 $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$
- Complexe de manganèse : PGGKHELH (nommé MnCATm2) avec une constante de 39,48 $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$

Contrairement au complexe de fer et de manganèse, le complexe de cuivre ayant la meilleure activité correspond également au peptide ayant été sélectionné plusieurs fois lors du test d'activité sur gel : le peptide PHYKHRLH, CuCATm1. Ce peptide a donc été le premier sélectionné pour des investigations complémentaires.

III. CARACTERISATION DU COMPLEXE CuCATm1-Cu²⁺

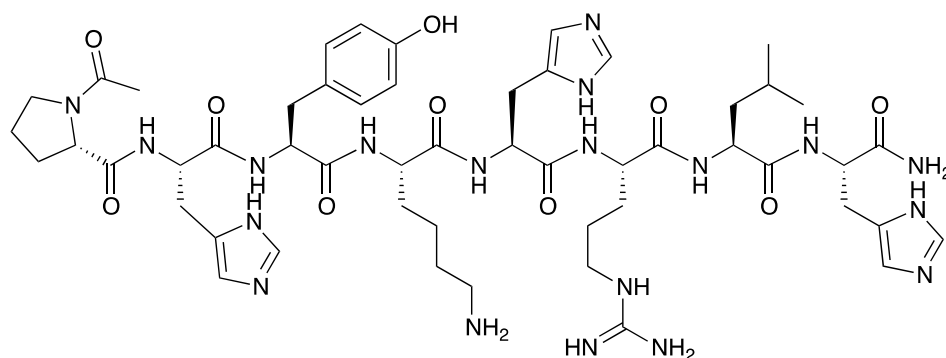


Figure 33 : Peptide CuCATm1

1) Synthèse du peptide CuCATm1 : PHYKHRLH

Le peptide CuCATm1 a été synthétisé sur plus grande échelle (0,2 mmol) sur résine MBHA (0,68 mmol/g) possédant un lien « rink amide » ([partie expérimentale voir «Peptide synthesis on large scale » p. 167](#)). Cette résine permet d'effectuer simultanément en milieu acide la déprotection des chaînes latérales et le clivage du peptide de la résine en lui procurant une extrémité carboxamide. Le peptide a été synthétisé sans la séquence espaceur puis purifié par HPLC et identifié par spectrométrie de masse MALDI-TOF : Ac-PHYKHRLH-NH₂

La présence de la tyrosine dans la séquence permet le dosage du peptide en solution par spectrométrie UV-vis en utilisant la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon.l.c$) et les coefficients d'extinctions molaires décrits dans la littérature.¹⁶⁶ ([Partie expérimentale voir « Peptide stock solution preparation » p.168](#)).

2) Mise en évidence de la formation de complexes et détermination de leur stœchiométrie

Les complexes formés en mélangeant CuCATm1 avec des différents ratios de Cu^{2+} ont été étudiés par différentes techniques analytiques afin de déterminer la stœchiométrie des complexes ainsi que leur stabilité thermodynamique.

1. Titrage par RPE

Des mélanges à différents ratios CuCATm1- Cu^{2+} ont en premier lieu été étudiés par résonance paramagnétique électronique (EPR) en solution dans un tampon MOPS (50 mM, pH 7,5) car il s'agit d'un des tampons les moins coordonnants pour le cuivre ($\log \beta_1 = 4,00$ à pH 7,09).¹⁶⁷

Nous avons obtenu un spectre de RPE pour le contrôle $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dans le tampon MOPS avec une très faible intensité du fait de la dimérisation du sel de cuivre en solution. En effet, selon les analyses structurales bidimensionnelles au rayon X effectuées par Schoening et al¹⁶⁸ et améliorées par une analyse tridimensionnelles par diffraction de neutron de Chidambaram et al¹⁶⁹, les deux ions cuivre sont très proches en solution à une distance de 2.615 Å, ce qui est distance que légèrement plus longue qu'une liaison Cu-Cu métallique (2.56 Å). Ainsi, selon les conditions expérimentales, notamment la température du milieu, les deux cations métalliques peuvent conduire à la formation d'un dimère $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ ($\text{Cu}_2(\text{OAc})_4(\text{H}_2\text{O})_2$) magnétiquement couplés et potentiellement diamagnétique. Ce composé a ainsi tous ses électrons sous forme appariés, le rendant inapproprié à une analyse par RPE (Figure 34)^{168,170}

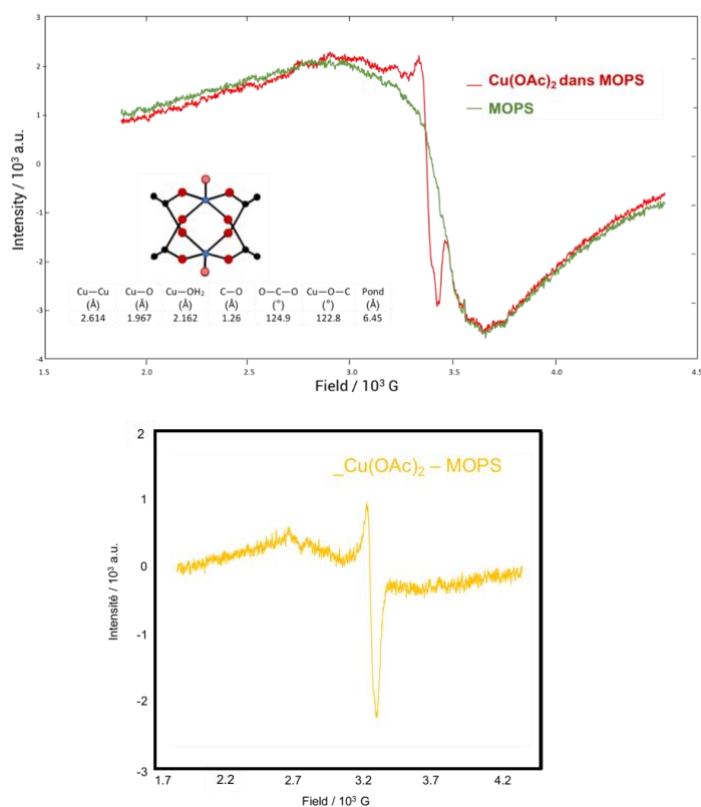


Figure 34. Spectres de résonance paramagnétique électronique dans un tampon MOPS (50 mM, pH 7,5, glycérol 10%) d'une solution de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ à 1mM et structure en rayon-X de $\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OAc})_4$. sphère bleue, Cu; sphère noire, C; sphère rouge pleine, O acétate; sphère rouge hachurée, O eau.¹⁷⁰ Spectre enregistré le 5 mars 2019. avec un pelletier pour un control de température à 298 K sous flux d'argon constant. La gamme de longueurs d'onde a été réglée de 300 nm à 215 nm. La vitesse de balayage, la sensibilité et la bande passante étaient respectivement de 200 nm.min⁻¹, 0,125 s et 1 nm

Les spectres RPE qui sont obtenus lors du titrage de CuCATm1 impliquent donc le complexe. Des solutions congelées avec une concentration totale en ligand (ligand libre et complexé) de 20 μM et différents ratios molaires CuCATm1: Cu^{2+} allant de 1:0,5 à 1:5 ont été préparées avec du cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, et enregistrées à basse température, (partie expérimentale voir « Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (EPR) » p. 170).

En présence de 0,5 équivalent de Cu^{2+} , nous observons sur les spectres RPE les paramètres suivants : $g_{\parallel} = 2.26$, $g_{\perp} = 2.06$ et $A_{\parallel} = 0.178 \text{ cm}^{-1}$ (lu sur le spectre), indiquant une géométrie plane carrée.^{171–173} Ce spectre et ses caractéristiques. est très similaire à celui obtenu pour un complexe présentant une sphère de coordination de type Imidazyl N_4 .^{174,175}

Lors de l'ajout du Cu^{2+} , l'intensité du signal augmente et au-dessus d'un équivalent, un deuxième jeu de signaux apparaît. Cela suggère qu'un premier complexe peut être formé et qu'au-delà d'un équivalent, un second cation de cuivre est complexé, non équivalent au premier, donc qu'un complexe avec une autre géométrie est formé (Figure 35)

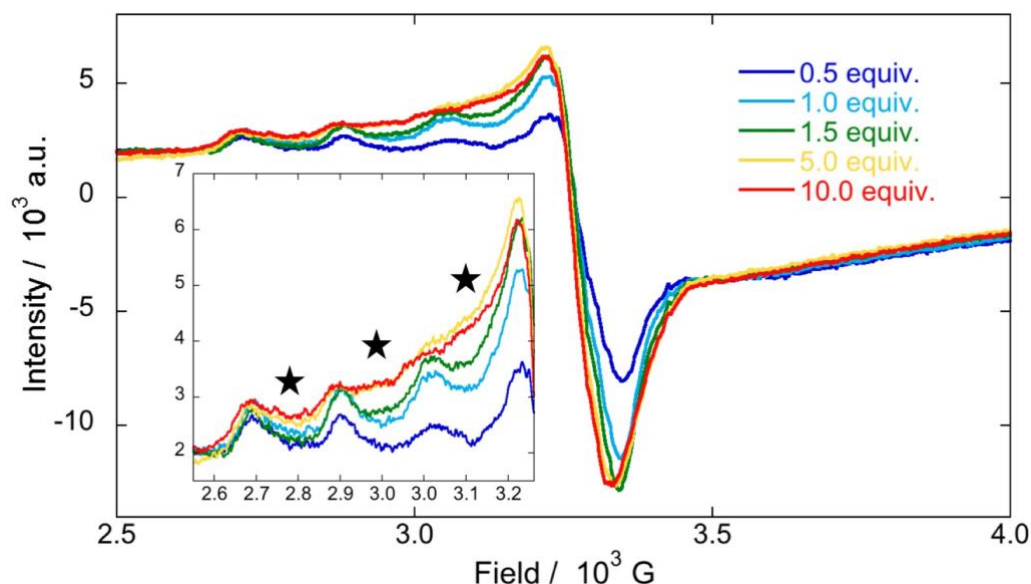


Figure 35. (A) Spectres de résonance paramagnétique électronique dans un tampon MOPS (50 mM, pH 7,5, glycérol 10%) d'un mélange CuCATm1: Cu^{2+} à différents ratios, $[\text{CuCATm1}]_{\text{total}} = 20 \mu\text{M}$. L'encart montre un zoom avec le nouveau jeu de signaux indiqué par des étoiles. Spectre enregistré le 5 mars 2019. avec un pelletier pour un control de température à 298 K sous flux d'argon constant. La gamme de longueurs d'onde a été réglée de 300 nm à 215 nm. La vitesse de balayage, la sensibilité et la bande passante étaient respectivement de 200 nm.min⁻¹, 0,125 s et 1 nm.

2. Titration par dichroïsme circulaire UV-visible

L'investigation de la nature des complexes formés a donc été poursuivie et des titrations ont été réalisées par dichroïsme circulaire UV-visible dans différentes conditions afin de déterminer les effets sur l'organisation du peptide ([Partie expérimentale voir «Titration by circular dichroism \(CD\) p. 171](#))

- Titration par $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dans MOPS (50 mM, pH 7.5)
- Titration par $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dans MOPS (50 mM, **pH 7.0**)

Quelles que soient les conditions, le profil des spectres indique une structure secondaire aléatoire pouvant se justifier par la courte séquence de ce peptide. Les quatre titrations effectuées donnent lieu à des résultats très similaires : il est observé que l'addition de Cu^{2+}

engendre l'augmentation des bandes à 230 nm et à 260 nm jusqu'à atteindre un plateau à deux équivalents. Cela signifie qu'après deux équivalents, l'ajout de cuivre n'a plus aucun impact sur la structure secondaire du peptide.

Ces observations suggèrent que le peptide CuCATm1 est capable de lier jusqu'à deux cations cuivres (Figure 36A) De plus, le changement d'une faible variation de pH n'a pas d'impact sur la stœchiométrie maximale des complexes formés (Figure 36B).

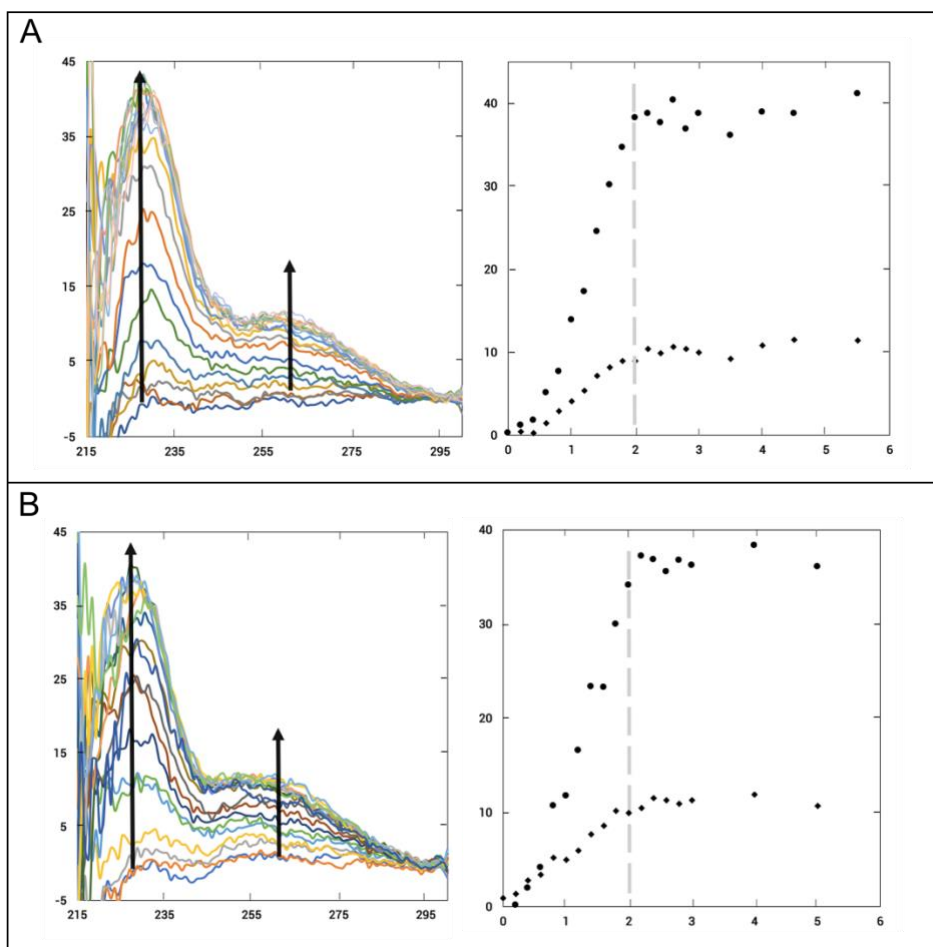


Figure 36. Titrage de $[CuCATm1] = 400 \mu M$ par $Cu(OAc)_2$ par dichroïsme circulaire dans un tampon MOPS (50 mM, 25 ° C), $[CuCATm1] = 200 \mu M$ à pH 7.5 (A) et pH 7 (B). Evolution des intensités des deux maxima à 230 nm (rond) et 260 nm (losange) lors de l'addition de Cu^{2+} . Le plateau est atteint après deux équivalents de Cu^{2+} .

3. Titrage par voltammétrie cyclique

Pour catalyser efficacement la dismutation d' H_2O_2 , le potentiel redox du mime de la CAT est un paramètre clé. Ce potentiel doit être compris entre les potentiels redox des couples O_2/H_2O_2 et H_2O_2/H_2O qui sont de 0,28V et 1,35V vs. NHE respectivement.⁸² (Partie expérimentale voir « Cyclic voltammetry experiments » p. 171).

Titration dans un tampon MOPS à pH 7,5 et pH 7

Les mélanges CuCATm1:Cu²⁺ 1:1, ainsi que Cu(OAc)₂ et le peptide CuCATm1 seul ont été étudiés par voltammétrie cyclique dans un tampon MOPS (50 mM) à pH 7 et pH 7,5. Pour CuCATm1 (en vert sur la Figure 37A) aucune vague n'a été observée dans la gamme de potentiels étudiés. Pour Cu(OAc)₂ (en bleu Figure 37A), deux réductions successives correspondant à Cu(II)→Cu(I) et Cu(I)→Cu(0) sont observées à 0,109 et -0,252 V/NHE respectivement. Il est ensuite observé une grande vague à 0.233 V/NHE qui correspond à l'oxydation du Cu(0) adsorbé à la surface de l'électrode, en Cu(II) (ou encore redissolution anodique). Pour un mélange CuCATm1:Cu²⁺ 1:1, (en rouge sur la Figure 37A) des potentiels anodiques et cathodiques différents de ceux de Cu²⁺ en solution ont été obtenus indiquant la formation d'un ou de complexes.

Un titrage a été effectué par électrochimie (Figure 37B) : lors de l'ajout de Cu²⁺, le courant correspondant au potentiel anodique (à environ 0,5 V vs NHE) augmente linéairement jusqu'à 2 équivalents. Après 2 équivalents, la pente n'est plus la même, montrant qu'après un rapport de 1:2, le système se comporte différemment (Figure 37C gauche). Au-delà du ratio 1:2, le courant correspondant au potentiel de la redissolution anodique est apparu à environ 0,24 V/NHE. Cela indique qu'au-delà de deux équivalents, du Cu²⁺ libre en solution est réduit en Cu⁰ et est adsorbé sur l'électrode. Cette observation souligne le fait que le peptide n'est pas capable de se lier à plus de deux cations de cuivre(II) (Figure 37C droite).

L'ensemble de ces données soutient fortement le fait que le ligand est capable de coordonner deux cations de cuivre.

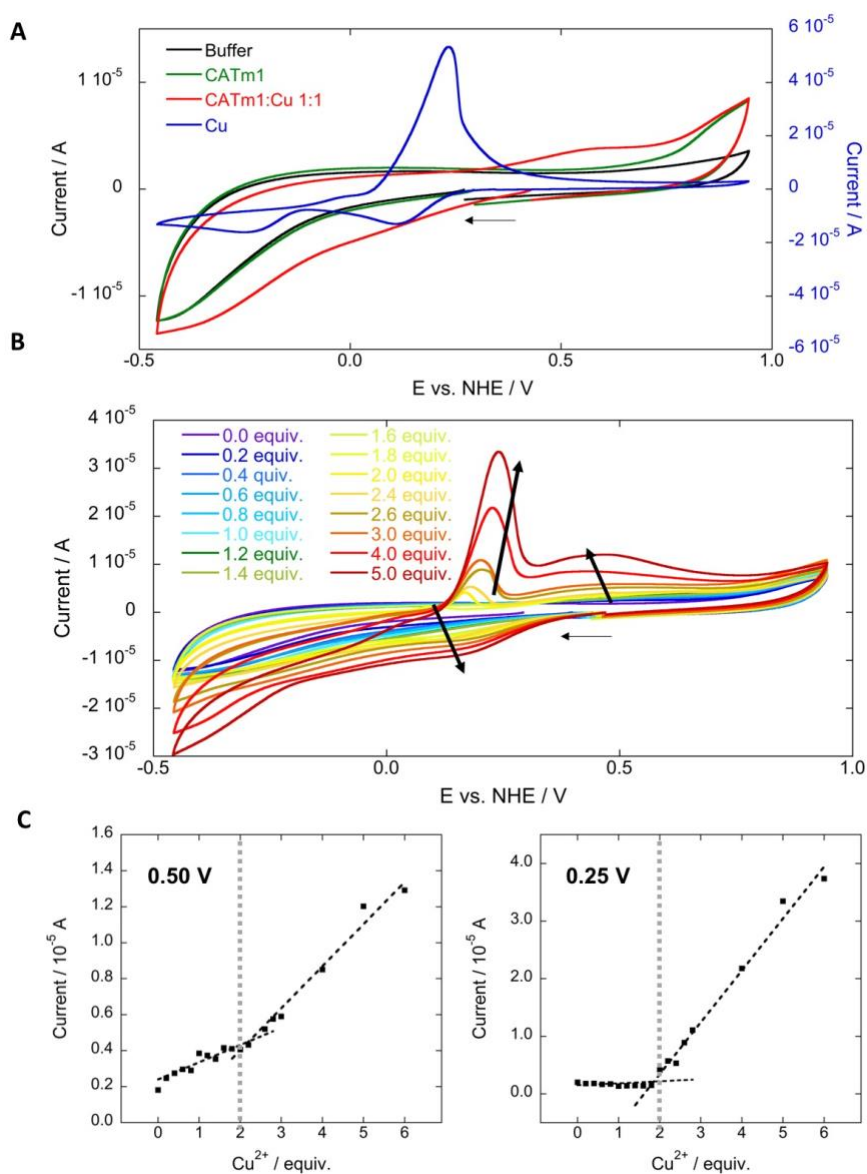


Figure 37. Étude par voltammétrie cyclique dans un tampon MOPS (50 mM; pH 7,5; 25°C) (A) Voltamogrammes de CuCATm1 (1 mM), CuCATm1-Cu²⁺1:1 (1 mM) et Cu(OAc)₂ (1 mM) dans un tampon TRIS; 50 mM; pH 7,5). (B) Titrage de CuCATm1 (1 mM) par Cu(OAc)₂ (C) Évolution du courant au potentiel anodique à 0,5 V vs NHE (gauche) et au potentiel correspondant à la redissolution anodique (0,24 V, droite). Électrode de travail : carbone vitreux (3 mm de diamètre), contre-électrode : platine, électrode de référence : SCE. Vitesse de balayage de 100 mV/s, la petite flèche horizontale indique la direction du balayage initial et les flèches en gras, l'évolution des ondes lors de l'ajout de Cu(OAc)₂.

Cette même étude a également été effectuée à pH 7,0 dans un tampon MOPS (50 mM) (Figure 38A). Dans ce cas, le pic correspondant à la redissolution anodique est apparu dès l'ajout du premier équivalent (Figure 38B, bas). Cela suggère qu'à pH 7,0, le peptide présente une

constante d'affinité pour les deux cations cuivre plus faible qu'à pH 7.5 et que du cuivre libre est présent en solution après l'ajout d'un équivalent.

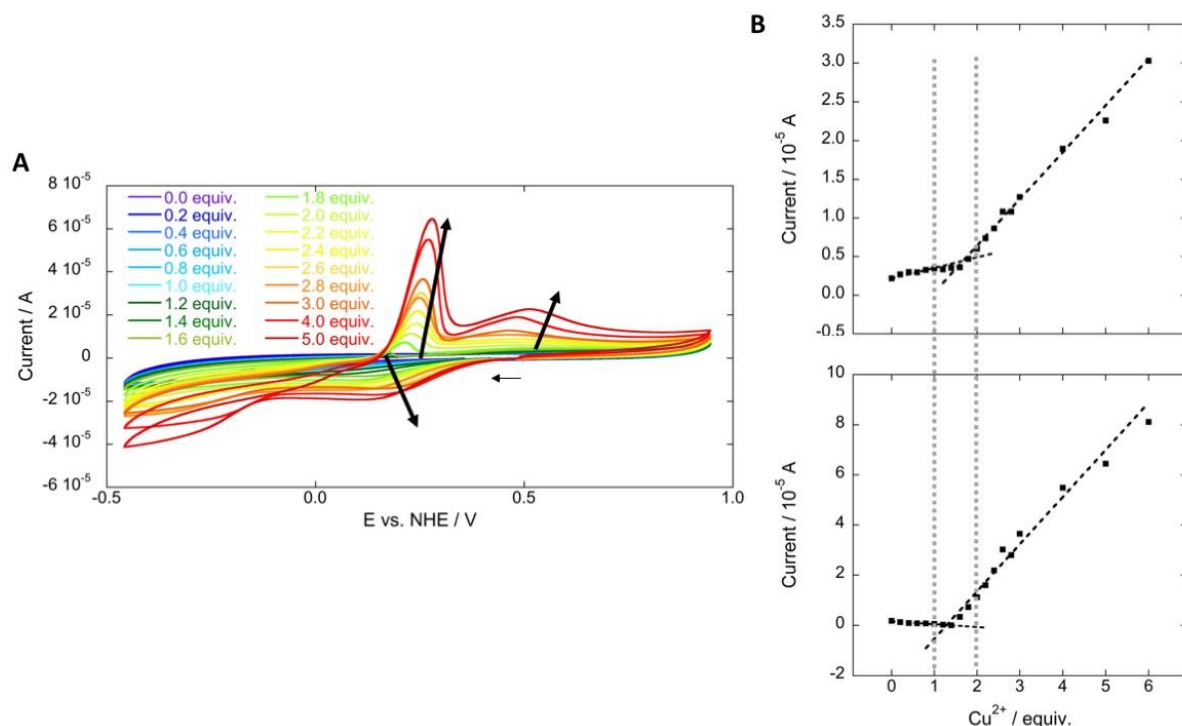


Figure 38. Voltammétrie cyclique dans un tampon MOPS (50 mM; pH 7,0; 25 °C). (A) Titrage de CuCATm1 (1 mM) par Cu(OAc)₂ (B) Évolution du courant au potentiel anodique (Epa 0,5 V vs NHE) (haut) et au potentiel correspondant à la redissolution anodique (0,2 V, bas). Électrode de travail : Carbone vitreux (3 mm de diamètre), contre-électrode : Platine, électrode de référence : SCE. Vitesse de balayage de 100 mV/s, la petite flèche horizontale indique le sens de balayage et les flèches en gras, l'évolution des courants lors de l'addition de Cu(OAc)₂.

Titration dans un tampon TRIS à pH 7.5

Un titrage a été réalisé dans un tampon TRIS (50 mM, pH 7,5), qui est décrit pour se lier au cuivre avec une affinité plus élevée que le MOPS (Figure 39A).^{176,177} La même tendance que celle à pH 7 dans le MOPS a été observée : la vague correspondant à la redissolution anodique est observée avant l'ajout de 2 équivalents de Cu²⁺ (Figure 39B). Cela indique une compétition entre peptide et le tampon TRIS pour la complexation du cuivre(II)

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'à pH 7,0 CuCATm1 est capable de lier deux cations Cu(II) avec une affinité pour le second ion cuivre différentes de celle du premier tandis qu'à pH 7,5 l'affinité du peptide est du même ordre de grandeur pour les deux cuivres. Les potentiels de réduction et d'oxydation du complexe ont été mesurés respectivement à 0,14V / NHE et 0,5V / NHE, et sont donc dans la bonne gamme pour catalyser la dismutation de H₂O₂.

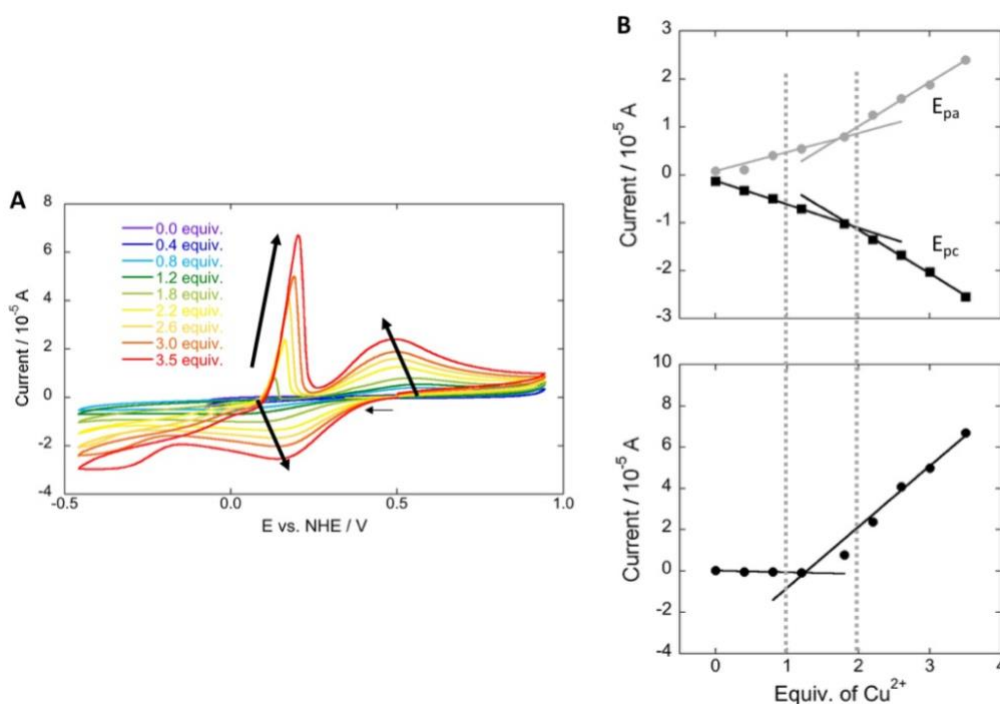


Figure 39. Voltamétrie cyclique dans un tampon TRIS (50 mM, pH 7,5, 25 °C). (A) Titrage de CuCATm1 (1 mM) par $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (B) Évolution du courant au potentiel anodique (E_{pa} 0,5 V vs NHE) et au potentiel cathodique (E_{pc} 0,014 V vs NHE) (haut) et au potentiel correspondant à la redissolution anodique (0,20 V, en bas). Électrode de travail : carbone vitreux (3 mm de diamètre), contre-électrode : platine, électrode de référence : SCE. Vitesse de balayage de 100 mV/s, la petite flèche horizontale indique la direction de balayage et les flèches en gras, l'évolution des courants lors de l'ajout de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$.

4. Analyse par spectroscopie de masse MALDI-TOF

Dans le but d'observer les complexes CuCATm1-Cu^{2+} 1:1 et 1:2, des solutions des différents complexes ont été analysées par MALDI-TOF et électro-spray

Une étude par spectrométrie de masse MALDI-TOF (en anglais Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) a été réalisée. Afin d'observer un signal correspondant aux complexes, nous avons analysé des échantillons avec des concentrations de l'ordre du millimolaire. Premièrement, nous avons analysé une solution contenant un équivalent de cuivre par rapport au peptide. Les pics correspondants au complexe CuCATm1-Cu^{2+} 1:1 ont été observés. Néanmoins, le signal du peptide seul y est également présent à une intensité plus importante que celle du complexe, suggérant soit la formation partielle du complexe 1:1, soit une dissociation importante de ce dernier lors de l'analyse. En effet, ces expériences ont

nécessité l'utilisation d'une matrice acide et une fluence laser relativement importante. Dans ces conditions, pour un mélange CuCATm1:Cu²⁺ 1:2, le pic correspondant au complexe 1:2 n'a pas été observé (Figure 40). En revanche, lorsqu'un fort excès de cuivre a été utilisé, un massif correspondant au complexe 1:2 a pu être mis en évidence.

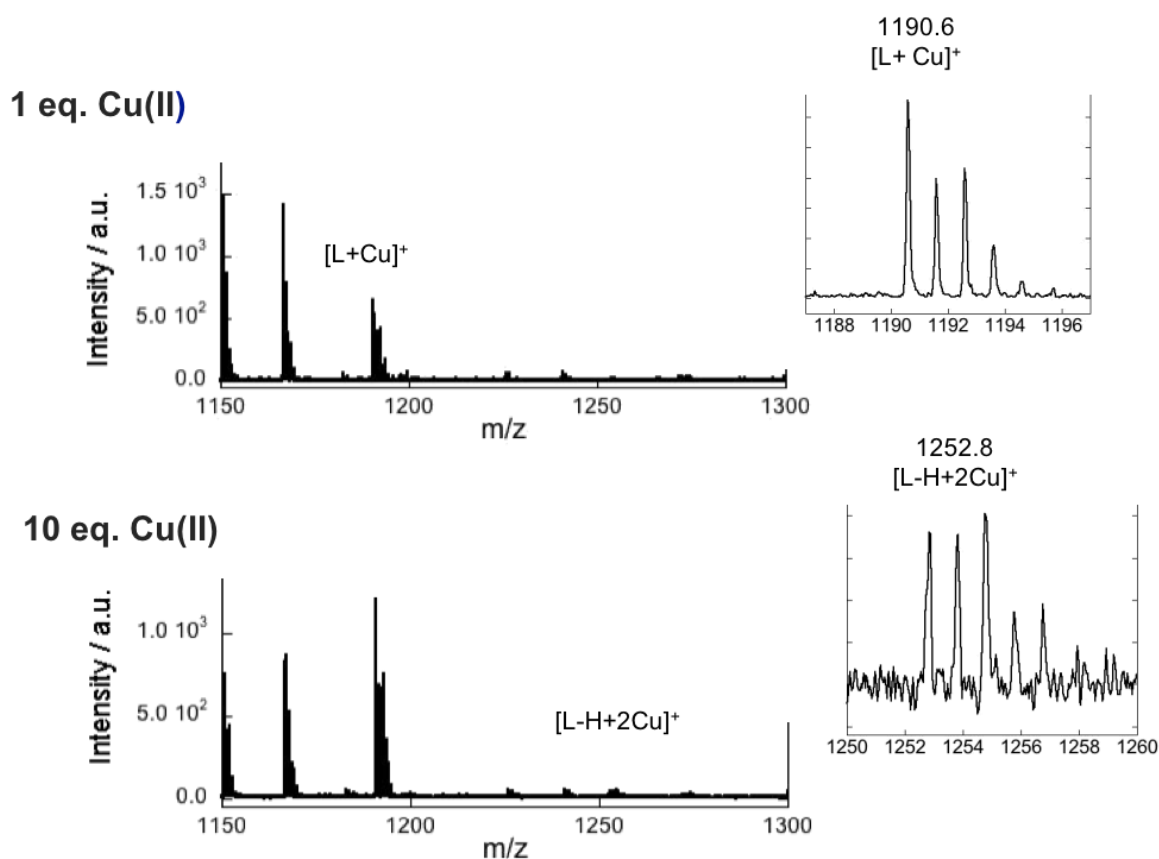


Figure 40. Spectres de masse MALDI-TOF d'une solution du peptide [CuCATm1] = 10 μ M en présence d'un équivalent (haut) ou de dix équivalents (bas) de Cu(OAc)₂. La solution de peptide a été préparée dans un tampon MOPS (50 mM, pH 7,5).

3) Détermination des constantes de dissociation et données thermodynamiques

Les études précédentes laissent donc penser que CuCATm1 est capable de coordonner deux cations de cuivre(II), avec deux sites d'affinités différentes. Ces résultats sont extrêmement encourageants car l'activité catalytique de type catalase est un double processus bi-électronique, ainsi chacun des ions cuivre(II) pourrait apporter un électron en cyclant entre Cu(II) et Cu(I), comme c'est le cas pour la MnCAT entre Mn(II) et Mn(III).

1. Essai par compétition avec le ligand BABA

Nous avons, dans un premier temps, émis l'hypothèse que les deux constantes étaient très différentes. Ainsi, nous avons réalisé une expérience par compétition afin d'obtenir des informations sur la stabilité du complexe 1:1. Ce test mis, au point par Christelle Hureau pour des peptides de type A β ,¹⁷⁸ repose sur une compétition pour la coordination du cuivre(II) entre un peptide et un ligand nommé Baba (acide 4-bis(oxamato)benzoïque), pour lequel la constante d'affinité apparente est connue pour Cu²⁺ à pH 7,5. Le complexe Baba-Cu²⁺, coloré, absorbe fortement à 303 nm. L'ajout d'un ligand compétiteur en quantité croissante, ici CuCATm1, déplace progressivement l'équilibre vers la formation du complexe CuCATm1-Cu²⁺ et induit la disparition de la bande d'absorption de Baba-Cu²⁺ (Figure 41).

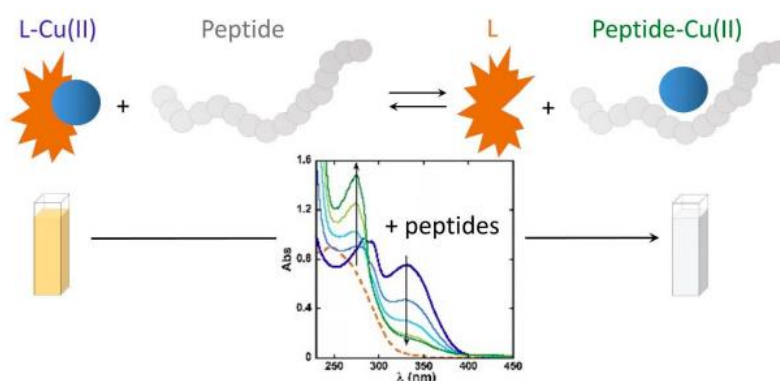


Figure 41. Principe de l'expérience de compétition suivie par UV-Vis. Cette figure est issue de l'article de C. Hureau.¹⁷⁸

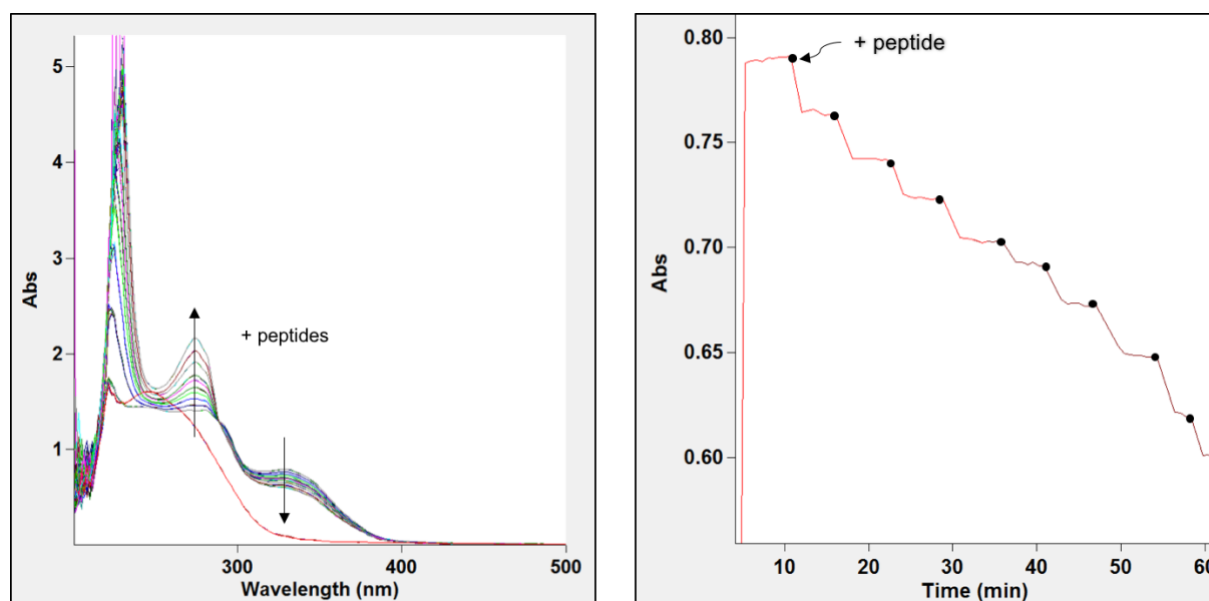


Figure 42. Spectres d'absorption électronique dans l'UV-Visible de l'expérience de compétition avec Baba-Cu dans l'HEPES (50 mM, pH 7,5) après des ajouts successifs de CuCATm1 (gauche). Suivi cinétique de l'absorbance à 303 nm après chaque ajout successif de CuCATm1 représenté par un point noir (droite).

Cette expérience de compétition a été réalisée avec CuCATm1 dans l'HEPES (50 mM ; pH 7,5) puisque c'est dans ce tampon que la constante de dissociation de de Baba-Cu²⁺ a été mesurée. Pour cette expérience, le cation cuivre(II) (45 µM) est ajouté puis un léger excès de Baba (50 µM) pour s'assurer qu'il n'y ait pas de cuivre libre. Enfin, les spectres d'absorption électronique dans l'UV-Visible ont été enregistrés après des ajouts successifs de CuCATm1 (Figure 42 gauche). Avant chaque ajout, il a été vérifié par un suivi cinétique de l'absorbance que l'équilibre thermodynamique avait bien été atteint (Figure 42 droite). (Partie expérimentale voir « Competition assay with Baba ligand » p. 171). La Figure 43 montre l'évolution de l'absorbance de la solution titrée à 330 nm en fonction des ajouts de CuCATm1.

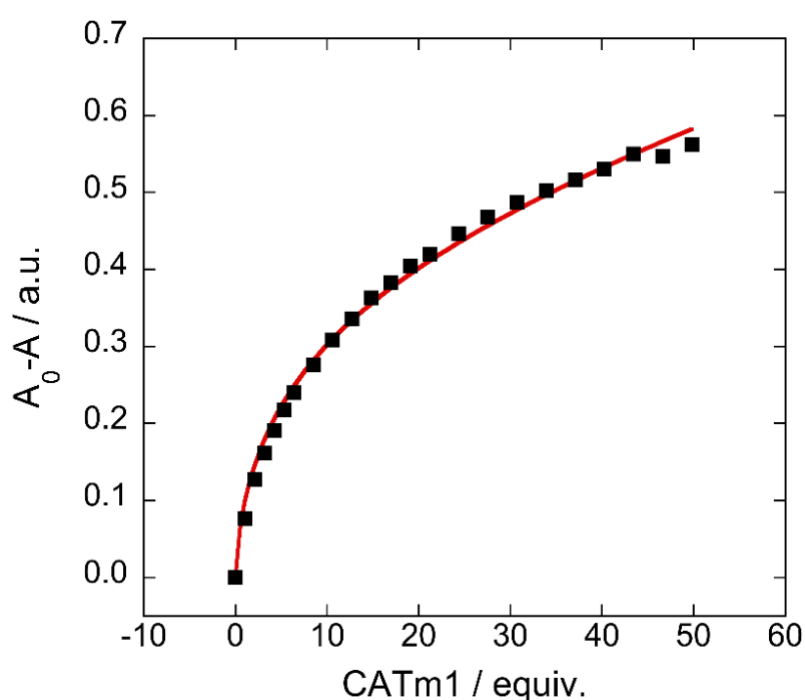


Figure 43. Suivi par spectrométrie UV-vis de l'expérience de compétition avec Baba-Cu ([Baba] = 50 µM et [Cu(OAc)₂] = 45) dans l'HEPES (50 mM, pH 7,5). La ligne rouge représente la courbe modélisée qui se superpose le mieux et conduisant à la détermination d'une constante apparente de $2,6 \cdot 10^{-9}$

Afin de déterminer la constante apparente de dissociation du site le plus affiné à partir de cette expérience, deux équilibres doivent être considérés :

	Baba	+	Cu ^{II}	→	BabaCu		CuCATm1	+	Cu ^{II}	→	CuCATm1Cu
Etat i	C ₂		C ₁		0		n _{eq} C ₁		C ₁		0
Etat eq	C ₂ -x'C ₁		C ₁ (1-x-x')		x'C ₁		(n _{eq} -x)C ₁		C ₁ (1-x-x')		xC ₁

Il est important de noter que Cu^{II} est noté d'une manière simplifiée et qu'il est en fait coordonné à une quantité inconnue de molécules d'eau et/ou d'HEPES.

A partir du tableau d'avancement précédent, il est possible d'écrire

$$\frac{K_{ass}^{CuCATm1Cu}}{K_{ass}^{BabaCu}} = \frac{[CuCATm1Cu] [Baba][Cu^{II}]}{[Cu^{II}][CATm1] [BabaCu]} \quad (\text{Équation 8})$$

Compte tenu des concentrations C₀, C₁ and C₂ et de l'affinité élevée de Baba et CuCATm1 pour le Cu(II), il est supposé qu'il n'y a pas de Cu(II) libre en solution. De ce fait, x'=1-x et l'équation précédente peut s'écrire :

$$\frac{K_{ass}^{CuCATm1Cu}}{K_{ass}^{BabaCu}} = \frac{(xC_1)}{(n_{eq}-x)C_1} \frac{(C_2-(1-x)C_1)}{(1-x)C_1} = \frac{x(C_2-(1-x)C_1)}{(n_{eq}-x)(1-x)C_1}$$

$$\frac{K_{ass}^{CuCATm1Cu}}{K_{ass}^{BabaCu}} = \frac{x(\frac{C_2}{C_1}-1+x)}{(n_{eq}-x)(1-x)} \quad (\text{Équation 9})$$

Cela donne l'équation du second degré : x² + bx + c = 0, avec

$$a = 1 - \frac{K_{ass}^{CuCATm1Cu}}{K_{ass}^{BabaCu}}$$

$$b = \frac{K_{ass}^{CuCATm1Cu}}{K_{ass}^{BabaCu}} (n_{eq} + 1) + \frac{C_2}{C_1} - 1$$

$$c = \frac{K_{ass}^{CuCATm1Cu}}{K_{ass}^{BabaCu}} n_{eq}$$

$$x = \frac{-b + \sqrt{\Delta}}{2a} = \frac{-b + \sqrt{(b^2 - 4ac)}}{2a}$$

Au cours du titrage,

$$A_0 = \varepsilon_{BabaCu(330-450)} I[BabaCu]_0 + \varepsilon_{Baba(330-450)} I[Baba]_0 = \varepsilon_{BabaCu(330-450)} C_1 + \varepsilon_{Baba(330-450)} (C_2 - C_1)$$

et

$$A_{330-450nm} = \varepsilon_{BabaCu(330-450)} I[BabaCu] + \varepsilon_{Baba(330-450)} I[Baba] + \varepsilon_{CuCATm1Cu(330-450)} I[CATm1Cu] + \varepsilon_{CATm1(330-450)} I[CATm1]$$

$$= \varepsilon_{BabaCu(330-450)} (1-x)C_1 + \varepsilon_{Baba(330-450)} (C_2 - C_1 + xC_1) + \varepsilon_{CuCATm1Cu(330-450)} xC_1 + \varepsilon_{CuCATm1(330-450)} (n_{eq} - x)C_1$$

Donc en traçant expérimentalement $A_0 - A_{330-450nm} = f(n_{eq})$, il est possible de modéliser la courbe pour obtenir $K_{ass}^{CuCATm1Cu}$ en utilisant l'équation où x est la solution de l'équation du second degré précédente :

$$A_0 - A_{330-450nm} = xC_1 (\varepsilon_{BabaCu(330-450)} - \varepsilon_{Baba(330-450)} - \varepsilon_{CuCATm1Cu(330-450)} + \varepsilon_{CuCATm1(330-450)}) - \varepsilon_{CuCATm1(330-450)} n_{eq}C_1$$

Cette modélisation a permis ainsi de déterminer une constante de dissociation apparente K_{d1} de $2,6 \cdot 10^{-9}$ (Figure 43, Tableau 11).

2. Etude par titrage calorimétrique isotherme à pH 7 et pH 7.5

Afin de déterminer les constantes d'association dans le MOPS, des titrages par ITC (Isothermal Titration Calorimetry) ont été réalisés à pH 7 et à pH 7,5 (partie expérimentale voir « Isothermal titration calorimetry (ITC) » p. 171).

À pH 7, le thermogramme obtenu a pu être modélisé avec une expression théorique paramétrée pour un système à « 2 sites indépendants », fournie avec le logiciel de l'appareil. Les constantes de dissociation apparentes suivantes ont pu être déterminées : $K_{d1} = 2,34 \cdot 10^{-7}$ et $K_{d2} = 3,62 \cdot 10^{-6}$, confirmant ainsi que le peptide est capable de lier deux cations cuivre(II), avec une différence d'un ordre de grandeur en terme d'affinité. Ceci confirme ce qui a été observé par voltammétrie cyclique et RPE. La première réaction de complexation possède une composante enthalpique largement favorable ($\Delta H1 = -47,49 \text{ kJ mol}^{-1}$) et une composante entropique défavorable ($-T\Delta S1 = 10,7 \text{ kJ mol}^{-1}$) alors que c'est l'inverse pour le deuxième site ($\Delta H2 = 11,02 \text{ kJ mol}^{-1}$ et $-T\Delta S2 = -41,4 \text{ kJ mol}^{-1}$). Cela conduit à une énergie de Gibbs libre de $-36,8$ et $-30,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ respectivement pour le site le plus affiné et le site le moins affiné (Figure 44, Tableau 11).

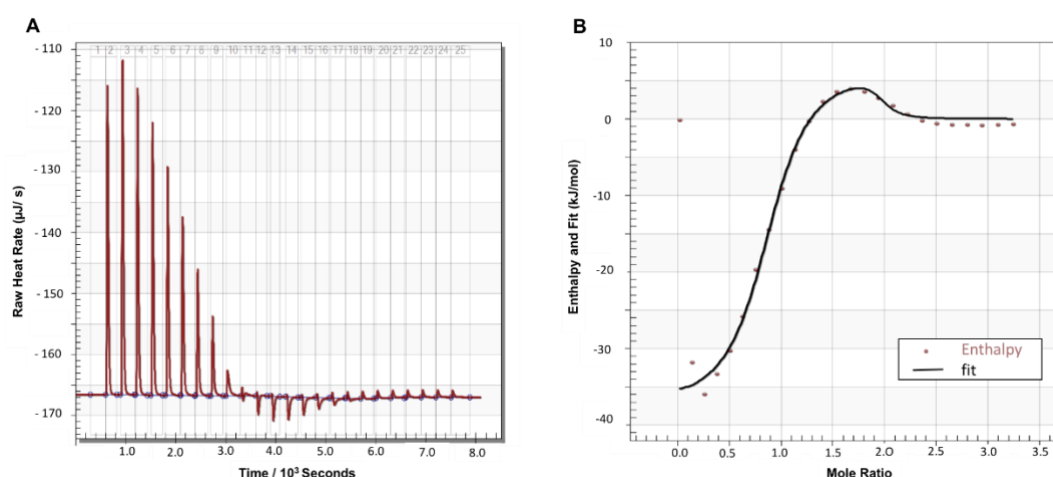


Figure 44. Thermogramme enregistrant l'échange de chaleur lors de l'ajout de CuSO_4 à CuCATm1 à $0,5 \text{ mM}$ (A) et isotherme de liaison ajustée correspondante en utilisant le logiciel fourni par le fabricant (B). L'expérience a été réalisée à pH 7 dans un tampon MOPS (50 mM) et à 25°C .

À pH 7,5, le titrage par ITC n'a pas permis de mesurer la constante de dissociation du site le plus affin, très probablement parce qu'il possède une constante d'association beaucoup plus élevée qu'à pH 7 et que la valeur se trouve en dehors de la gamme dynamique de l'ITC. Néanmoins, pour tenter de déterminer la constante de dissociation apparente du second site (ou site le moins affin), le titrage par ITC a été effectué à partir d'un mélange peptide:Cu(II) de 1:1. Le thermogramme obtenu a pu être modélisé et une constante de dissociation apparente de $K_{d2} = 8,29 \cdot 10^{-5}$ a été déterminée (Figure 45). Il est à noter que pour ce titrage, le temps entre deux injections successives a dû être allongé par rapport à l'expérience à pH 7.0 (10 min entre chaque injection) afin de permettre un retour à la ligne de base. De plus et que la stœchiométrie mesurée n_2 de 0,25 est loin de celle attendue ($n = 1$). Ceci semble indiquer des cinétiques de complexation relativement lentes et que l'hypothèse de deux sites avec des constantes de dissociation très différentes est certainement fausse.

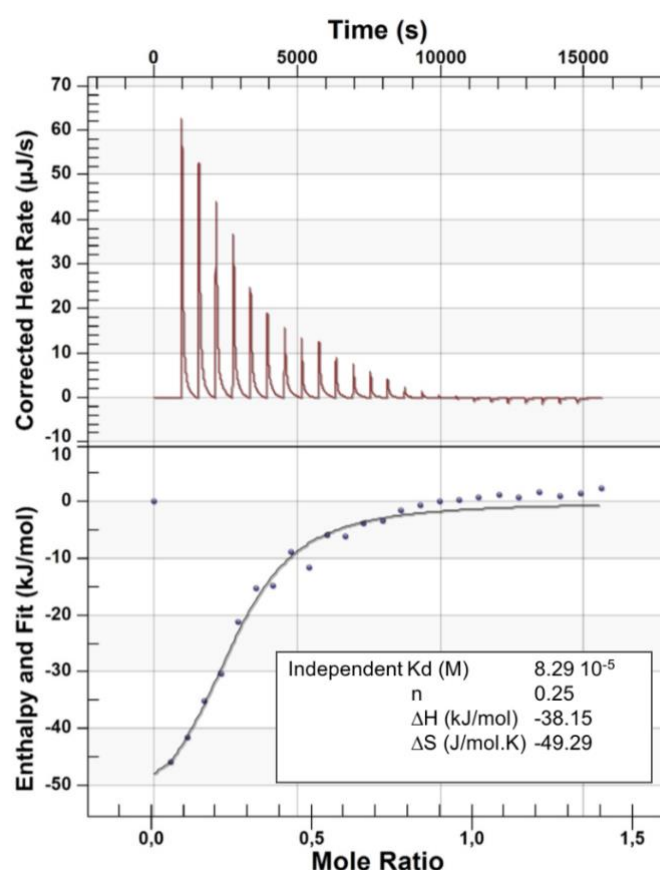


Figure 45. Thermogramme enregistrant l'échange de chaleur lors de l'ajout de CuSO_4 à un mélange 1:1 de CuCATm1:CuSO₄ (2 mM) (en haut) et isotherme de liaison ajusté correspondant en utilisant le logiciel fourni par le fabricant (en bas). L'expérience a été réalisée à pH 7,5 dans du tampon MOPS (50 mM).

Tableau 11. Paramètres thermodynamiques pour la complexation du Cu^{II} avec CuCATm1 mesurés par spectrométrie ITC ou UV à 25 °C ; le 1^{er} site étant le plus affiné et le second le moins affiné.

		pH 7.0	pH 7.5
1 rd Site	n ₁	0.89 ± 0.10	-
	ΔH ₁ (kJ mol ⁻¹)	- 47.49	-
	ΔS ₁ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	- 35.74	-
	K _{d1}	2.3 ± 1.7 10 ⁻⁷	2.26 10 ^{-9(a)}
2 nd Site	n ₂	1.07 ± 0.02	0.25 ± 0.01
	ΔH ₂ (kJ mol ⁻¹)	11.02	- 58.84
	ΔS ₂ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	138.80	- 121.7
	K _{d2}	3.6 ± 1.6 10 ⁻⁶	8.3 ± 4.1 10 ^{-5(b)}

^a Constante de dissociation mesurée par un test de compétition par UV-vis dans l'HEPES (25°C). ^b Mesuré par ITC à partir d'un rapport peptide:Cu²⁺ 1:1 dans un tampon MOPS (25°C).

En raison de la complexité du système et des difficultés à pH 7,5, nous avons souhaité approfondir cette étude, afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus, d'autres études ont été entreprises.

3. Titration par spectrométrie de masse ESI.

En collaboration avec le groupe de Martin Stillman (The University of Western Ontario, London, Canada), spécialiste de l'étude de métalloprotéines par spectrométrie de masse avec une ionisation par électrospray, nous avons réalisé un titrage du peptide CuCATm1 par de l'acétate de cuivre(II) (20 μM), dans le formiate d'ammonium (10 mM) à pH 7,5. Après chaque addition de Cu(II), l'échantillon a été analysé en utilisant la spectrométrie de masse à ionisation électrospray. Les spectres représentatifs sont donnés dans la Figure 46. L'abondance de CuCATm1, CuCATm1:Cu²⁺ 1:1 et CuCATm1: Cu²⁺ 1: 2 a été normalisée à chaque étape du titrage ESI-MS et la quantité de Cu(II) lié a été calculée à partir du spectre de masse pour générer un diagramme de spéciation en fonction de Cu(II) ajouté. ([Partie expérimentale voir « Titration by MALDI ionization mass spectrometry» p. 172](#)) les expériences ont été réalisées en Ontario par Adyn Melenbacher et discuté étroitement entre nos deux groupes)

Il est à noter qu'au ratio CuCATm1:Cu²⁺ 1:1, trois espèces coexistent. Non seulement nous observons en majorité le complexe CuCATm1:Cu²⁺ 1:1 (55%) mais aussi en quantité non négligeable le complexe CuCATm1:Cu²⁺ 1:2 et le peptide libre CuCATm1 (22.5 % chacun). En revanche au ratio CuCATm1:Cu²⁺ 1:2, seul le complexe CuCATm1:Cu²⁺ 1:2 est observé, autrement dit, la totalité du peptide CuCATm1 est complexée avec deux cations.

Les courbes de spéciation obtenues ont été simulées en utilisant *Hyperquad Simulation and Speciation* (HySS) pour fournir les constantes d'association apparentes pour le premier (K₁) et le deuxième (K₂) Cu(II) liés au peptide. Les constantes de dissociation apparentes correspondantes trouvées sont respectivement de 1,12.10⁻⁹ et de 4,79.10⁻⁹ pour le premier et le deuxième site.

Ces résultats invalident la valeur de constante de dissociation obtenu lors de l'expérience par compétition. En effet, l'expérience de compétitions avait été réalisé avec l'hypothèse que kd₁ et kd₂ possédaient des valeurs très différentes donc que la compétition ne mettrait en jeu que le 1^{er} site de complexation. Or d'après l'analyse de spéciation kd₁ et Kd₂ sont d'un même ordre de grandeur et le complexe peptide:Cu²⁺ 1:2 se forme également en présence d'un seul équivalent de cuivre.

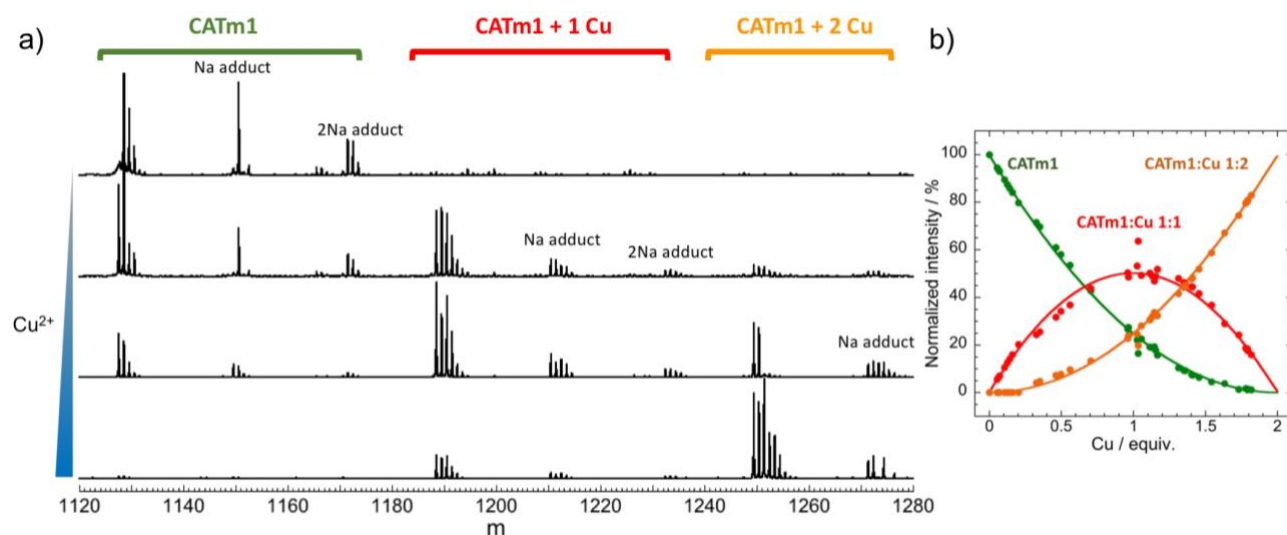


Figure 46. Titrage de CuCATm1 (20 uM) par de l'acétate de cuivre suivit par spectrométrie de masse à ionisation électrospray dans du formiate d'ammonium (10 mM) à pH 7,5. a) Spectres normalisés représentatifs aux ratios CuCATm1: Cu²⁺1:0, 1:0,3, 1:1, 1:1,8 de haut en bas. b) Abondance normalisée de chaque espèce calculée à partir des spectres de masse lors du titrage. La spéciation expérimentale a été ajustée par une spéciation simulée utilisant *Hyperquad Simulation and Speciation* (HySS) à la même concentration. À partir de la spéciation simulée, HySS fournit des constantes d'association cumulatives (β) pour le premier (β_1) et le deuxième (β_2) complexe. A partir de ces constantes d'association cumulatives, les constantes d'association pour chacun des cuivres (K₁) et (K₂) liés au peptide ont été déterminées.

4) Evaluation de l'activité catalase et des constantes cinétiques de dismutation de H_2O_2

Afin de déterminer quantitativement l'activité intrinsèque de type catalase du complexe peptidique redox-actif CuCATm1:Cu^{2+} , de nombreuses méthodes expérimentales ont été mises en œuvre.

1. *Evaluation de l'activité catalase : essai avec le détergent X-Triton*

Nous avons d'abord essayé d'évaluer l'activité catalase par comparaison avec une catalase héminique isolée ([Partie expérimentale voir « Catalase activity assay using X-triton » p. 172](#)). La première approche envisagée était une approche visuelle mettant en jeu le détergent Triton X-100 car Le X-triton a la capacité de piéger le dioxygène et former de la mousse.¹⁷⁹ Le groupe de Mizunoe a ainsi mis en évidence que la hauteur de la mousse formée dans un tube à essai en présence d'une quantité déterminée de H_2O_2 était proportionnelle à la quantité de catalase ajoutée. Ainsi en produisant une courbe de calibration, il est possible d'évaluer l'activité catalase de notre mime par comparaison à celle de la catalase (Figure 47). Dans notre cas, l'ajout de CuCATm1:Cu^{2+} dans une solution d'hydrogène peroxyde contenant du Triton X-100 n'a pas permis la formation de mousse. Ce test ayant été développée pour détecter la présence de la catalase, enzyme très performante ayant une constante cinétique de l'ordre de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, et induisant donc un flux important de gaz, il est possible que cette méthode ne soit pas assez sensible pour que l'activité de notre complexe soit détectable.

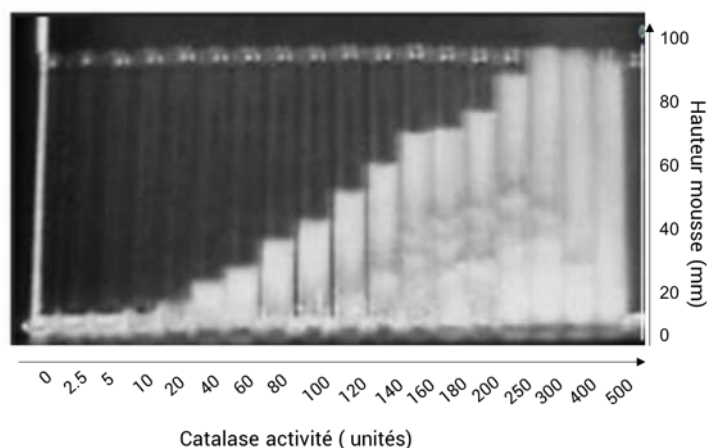


Figure 47. Image de tubes à essai montrant la mousse développée à la suite de l'activité de la catalase. Chaque solution de concentration de catalase (100 ml) a été ajoutée dans un tube Pyrex (13 mm de diamètre 3 100 mm de hauteur, verre borosilicaté; Image issue¹⁷⁹

2. Mesure de l'activité catalytique des mimes par spectroscopie UV-visible

Méthode de Beer et Sizer

En premier lieu, nous avons tenté de déterminer la constante catalytique de de dismutation de H_2O_2 du complexe par un suivi UV-visible de la disparition de H_2O_2 selon la méthode décrite par Beer et Sizer.¹⁶⁵ En effet, H_2O_2 présente un maximum d'absorption à 240 nm, ainsi il est possible de suivre par spectrophotométrie UV-visible sa disparition en présence et en absence de catalyseur. Cependant, lorsqu'un mélange $\text{CuCATm1}:\text{Cu}^{2+}$ a été ajouté, une augmentation de l'absorbance a été observée. Il est probable qu'une réaction entre H_2O_2 et le complexe ait eu lieu, engendrant une modification de la sphère de coordination du cuivre ou une modification structurelle du peptide, formant ainsi une nouvelle espèce qui absorbe plus fortement que le complexe initial à 240 nm (Figure 48). L'effet de la dismutation d' H_2O_2 sur la variation de l'absorbance à cette longueur d'onde devenant ainsi négligeable et rendant le suivi cinétique de la disparition H_2O_2 impossible dans ces conditions.

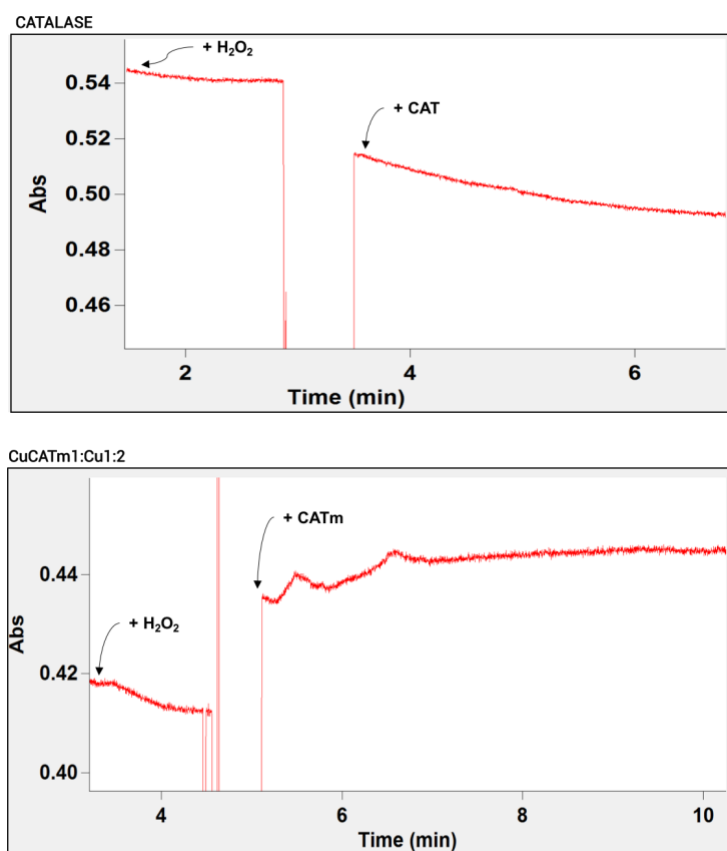


Figure 48. Suivi de l'absorbance à 240 nm d'une solution d' H_2O_2 (0.03%) dans une solution de MOPS (50 mM, pH 7,5) après l'ajout de la CAT (1440-3660 Unités.cl) (figure du haut) ou du complexe $\text{CuCATm}:\text{Cu}^{2+}$ 1:2 (4 μM) (figure du bas). Au début de

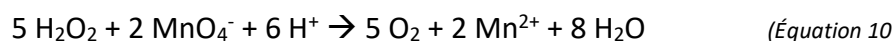
la mesure, une légère diminution de l'absorbance à 240 nm correspondant à la dismutation spontanée d'H₂O₂ est observé. La diminution importante est due à l'ouverture du spectromètre pour l'ajout de la CAT ou du complexe.

Il est à noter que l'expérience de Beer et Sizer avait été réalisée précédemment lors de la caractérisation des hits sélectionnés et avait donné des résultats cohérents (voir chapitre 2.II.5 p.77). Ceci peut sans doute s'expliquer par le fait que les complexes avaient déjà été mis en présence de H₂O₂ lors de la sélection sur gel et avaient déjà subi des modifications. Ainsi, c'est l'activité des espèces déjà modifiées qui avaient été mesurées et seule la dismutation d'H₂O₂ a alors été observée.

Puisque l'observation de l'activité des complexes à 240 nm s'est avérée être problématique nous avons envisagé d'utiliser une méthode permettant de décaler la longueur d'onde du suivi vers le rouge.

Méthode de Van Euler et Josephson

La méthode de Von Euler et Josephson est basée sur la réaction de H₂O₂ avec permanganate de potassium :¹⁸⁰



Le permanganate de potassium est une solution colorée violette qui présente un maximum d'absorption à 525 nm en UV. En présence de H₂O₂, une réaction d'oxydo-réduction avec MnO₄⁻ conduit à la formation de cations de manganèse Mn²⁺ beaucoup moins colorés (couleur cuisse de nymphe émue).

La réaction de l'ion permanganate avec H₂O₂, correspondant à la consommation de H₂O₂ peut être suivie par spectrophotométrie UV-vis à 525 nm (pente P₁, Figure 49). L'ajout d'un mime de catalase (CuCATm1:Cu²⁺ 1:2) qui réagit avec H₂O₂, rentre alors en compétition avec le permanganate. Ainsi, si le mime a une activité catalase, la vitesse de disparition du permanganate devrait être ralentie. Une nouvelle pente, plus faible en valeur absolue (pente P₂, Figure 49) devrait être observée. Plus l'activité catalase du mime est importante plus la différence de pente P1-P2 est importante. Cette méthode permet théoriquement de calculer l'IC₅₀ (concentration à laquelle le mime diminue de moitié la cinétique de la réaction redox) et

d'en déduire la constante cinétique. D'un point de vue expérimental, la mise au point de ce test d'activité s'est révélée être très compliquée. La cinétique de la réaction d'oxydo-réduction entre le MnO_4^- et H_2O_2 étant extrêmement rapide, tout le MnO_4^- était consommé avant que nous puissions ajouter le mime. Afin de ralentir cette cinétique, nous avons tenté d'abaisser la température d'étude dans le spectrophotomètre jusqu'à 0°C . Toutefois cela n'a pas donné de résultats concluants.

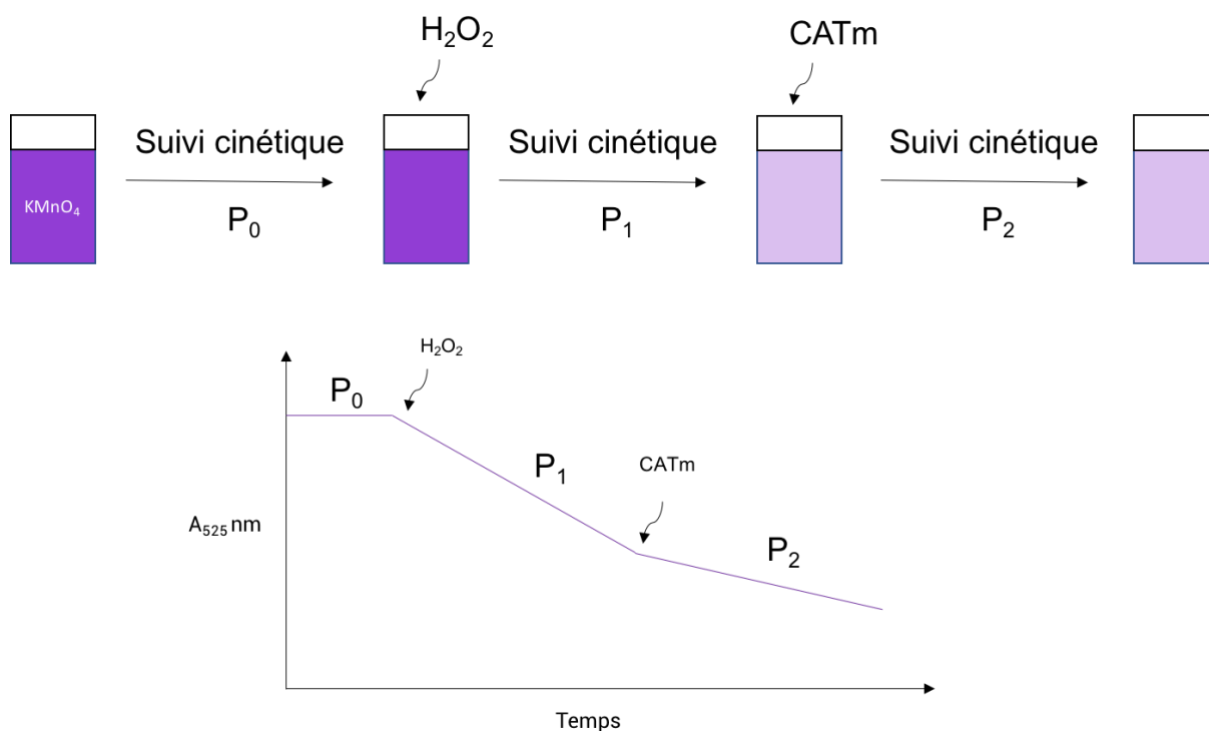


Figure 49. (a) Schéma de l'expérience du test d'activité catalase réalisé par UV-Vis basé sur la méthode de Von Euler et Josephson. (b) Figure représentant théoriquement l'évolution de l'absorbance à 525 nm d'une solution de permanganate de potassium après l'ajout de peroxyde d'hydrogène et d'un mime de CAT.

Méthode de Hadwan et Abed

Nous avons alors entrepris d'utiliser la méthode de Hadwan et Abed qui repose sur la réaction du molybdate d'ammonium avec le peroxyde d'hydrogène qui conduit à la formation d'un produit jaune présentant un maximum d'absorption à 339 nm ([partie expérimentale voir « Catalase activity assay using Hadwan et Abed method by UV-vis spectrometry » p. 173](#)).¹⁸¹

La cinétique de la réaction de type catalase d'un composé peut être mesurée selon la méthode suivante : $\text{CuCATm}1:\text{Cu}^{2+} 1:2$ est ajouté dans un eppendorf contenant une solution d' H_2O_2 . Un volume V_i de cette solution est prélevé et ajouté à des temps donnés dans des cuves contenant du molybdate ammonium dont l'absorbance est ensuite mesurée. Plus le mime de

CAT a une activité importante, plus rapide est la dismutation d' H_2O_2 dans l'éppendorf, ce que l'on peut suivre cinétiquement en suivant la quantité de molybdate restant dans le volume test V_t à différents temps (Figure 50).

L'activité catalase du mime de CAT est déterminée par le calcul de la constante cinétique selon l'équation de réaction de premier ordre suivante :¹⁸¹

$$kU = \frac{2.303}{t} * \log \frac{S^0}{S-M} * \frac{V_t}{V_s} \quad (\text{Équation 11})$$

t: temps.

S^0 : absorbance du tube « control négatif » c'est-à-dire celui sans ajout de CuCATm1

S: absorbance du tube contenant le CATm1

M: absorbance du tube sans peroxyde d'hydrogène (facteur de correction)

V_t : volume total du réactif présent dans le tube.

V_s : volume du tampon.

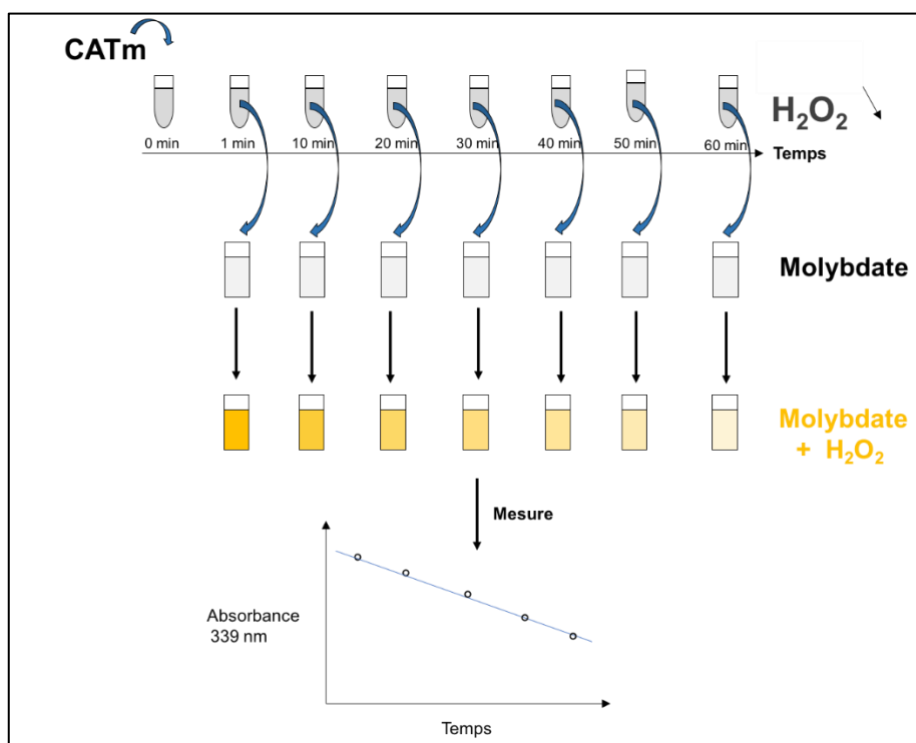


Figure 50. Principe du test d'activité catalase colorimétrique basé sur l'inhibition de la réaction entre le molybdate d'ammonium et le peroxyde d'hydrogène.

Préalablement, deux contrôles ont été réalisés : un contrôle négatif qui consiste à ajouter du tampon à la place du mime de CAT et un contrôle positif en utilisant de la catalase bovine (1440-3660 unités.cl). Les mesures pour les complexes CuCATm1: Cu^{2+} aux ratios 1:1 et 1:2 ont

par la suite été effectuées pour une concentration en complexe à 5 mM. On observe une diminution de l'absorbance à 339 nm pour les deux ratios testés, avec une cinétique pour le complexe 1:2 plus rapide que pour le mélange 1:1, suggérant une activité catalase plus importante. Toutefois, nous observons dans le cas du mélange 1:1, une absorbance initiale (à $t=1$ min) supérieure à celle du contrôle négatif. Cela peut s'expliquer par la formation partielle d'un complexe peptide-Molybdate, absorbant également à 339 nm et dont l'activité catalase n'a pas été évaluée. Ainsi, il n'est pas possible d'affirmer que l'activité que nous observons est due essentiellement au complexe Peptide-Cu.

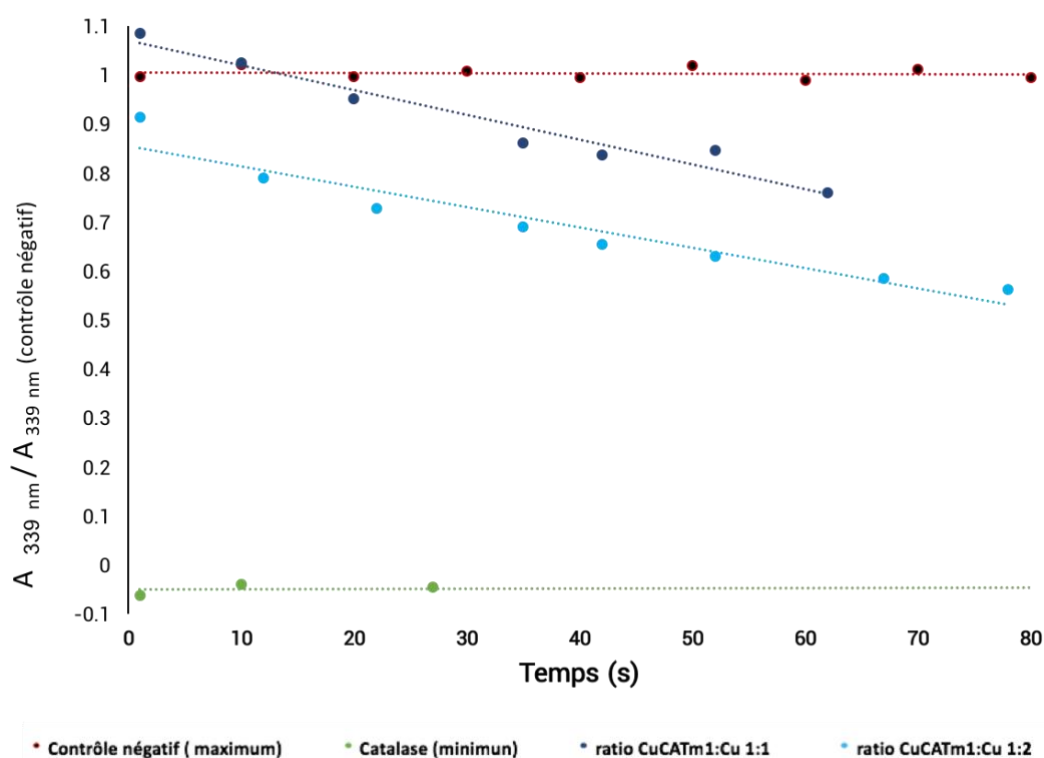


Figure 51. Mesures de l'absorbance à 339 nm d'une solution de molybdate (32,4 mM) en présence d'une solution de peroxyde d'hydrogène (initialement à 20 mM, $V_{TOT}=1,1$ ml, prélèvements $V_i = 110 \mu\text{l}$) ayant réagi durant un temps variable avec de la catalase (1440-3660 unités.cl) ou les complexes CuCATm1:Cu²⁺ au ratios 1:1 ou 1:2 (5 mM).

3. Mesure de l'activité catalytique des mimes par polarographie

Pour caractériser la dismutation du peroxyde d'hydrogène, une alternative à la mesure de disparition de H₂O₂ est la mesure de la formation d'O₂. Différentes méthodes de suivi sont disponibles et nous nous sommes focalisés sur une méthode par polarographie. Celle-ci

repose sur l'utilisation d'une électrode de Clark ([partie expérimentale voir « Catalase activity assay using a Clark-type electrode » p. 173](#)).

L'électrode de Clark est une électrode mise au point en 1953 par le Pr Leland Clark afin de mesurer le niveau de dioxygène dans le sang.¹⁸² Cette électrode composée d'une anode d'argent et d'une cathode en platine a par la suite été optimisée pour mesurer le niveau de dioxygène dissous dans une solution.

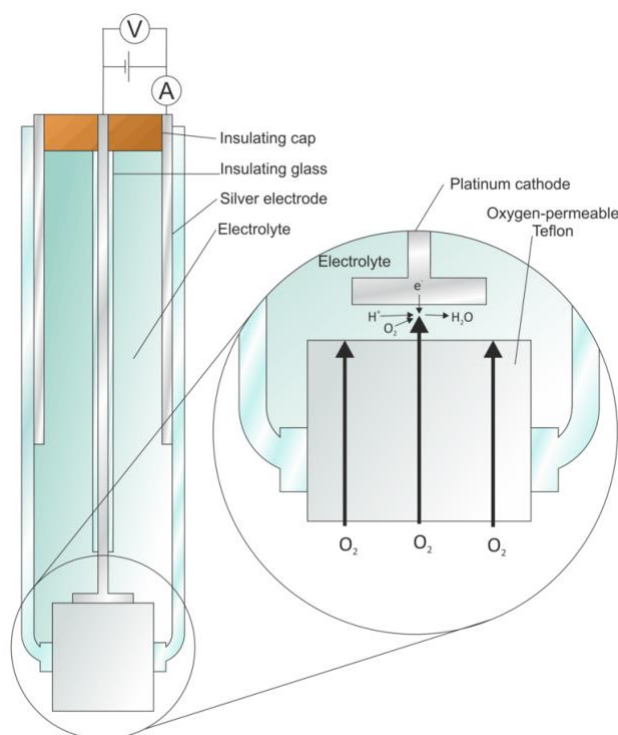
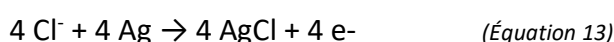
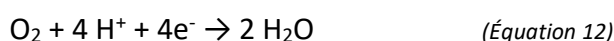


Figure 52. Représentation schématique d'une électrode de Clark.¹⁸³

Le fonctionnement d'une électrode de Clark repose sur la capacité de la molécule d'O₂ à se réduire en molécule d'eau en présence d'électrons fournis par la cathode. La réduction du dioxygène se passe au niveau de la cathode en platine (équation 12) tandis que la réaction d'écrite en équation 13 se déroule au niveau de l'anode.



Une différence de potentiel de l'ordre de 0,8 V entre les deux électrodes induit un courant qui circule entre l'anode et la cathode par un pont salin constitué d'une solution de chlorure de potassium. Ainsi, le courant circulant à travers la cellule est proportionnel au nombre de molécules d'O₂ constamment réduites à la surface de la cathode et donc à la concentration d'O₂ dans le milieu. Afin de séparer les électrodes de l'échantillon liquide, le système électrode-électrolyte est dans une cellule entourée d'une membrane en Téflon imperméable au liquide mais qui permet aux gaz de diffuser.

Pour réaliser la mesure, l'électrode est immergée à l'intérieur d'une solution de H₂O₂ contenant un mime de CAT. Le changement de courant entre la cathode et l'anode permet de déterminer la quantité d'oxygène dissous dans la solution.

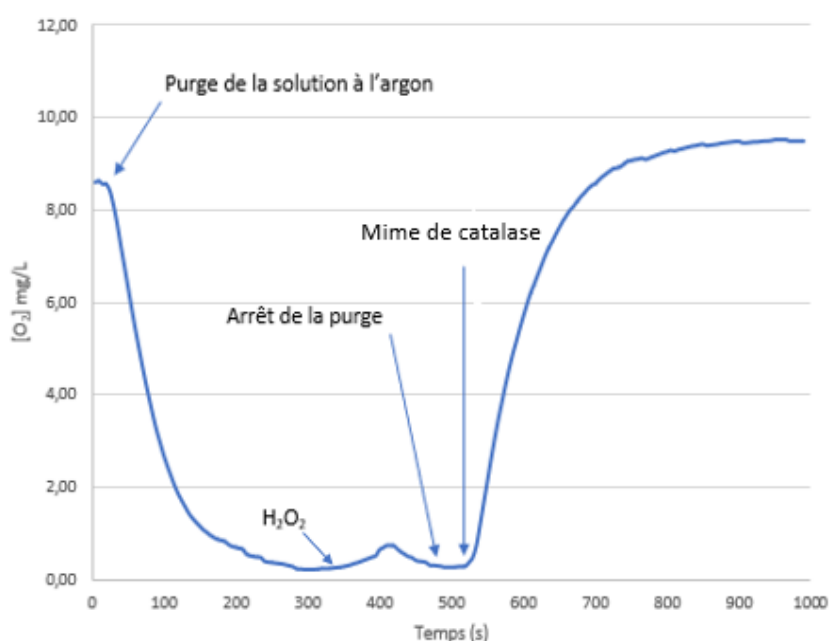


Figure 53. Évaluation de l'activité de type catalase des mimes de CAT redox actifs. Représentation du protocole expérimental réalisé.

Les mesures ont été réalisées selon les protocoles décrits par I. Batinic Haberle.⁸¹

La réaction de dismutation suit une cinétique de second ordre où $[H_2O_2] = 2 [O_2]$. La mesure des vitesses initiales $v_0 = k_{cat} [catalyseur]_0 [H_2O_2]_0$, qui peuvent s'écrire $v_0 = k_{obs} [catalyseur]_0$ dans des conditions de pseudo premier ordre (soit en excès d'H₂O₂) à différentes

concentrations du catalyseur a permis de déterminer les k_{obs} et les constantes catalytiques k_{cat} selon la relation $k_{\text{cat}} = 2k_{\text{obs}} / [\text{H}_2\text{O}_2]_0$ (Figure 54).

Le rendement maximal de production d' O_2 (en %) a été calculé à partir des valeurs mesurées de $[\text{O}_2]_{\text{max obs}}$ à l'aide de l'équation suivante : rendement $\text{O}_2(\%) = (2[\text{O}_2]_{\text{max obs}} / [\text{H}_2\text{O}_2]_0) \times 100$. Le nombre de cycles catalytiques (Turn Over Number, TON) a été calculé comme le nombre maximal de moles d' O_2 produites par mole d'un catalyseur, $\text{TON} = [\text{O}_2]_{\text{max obs}} / [\text{catalyseur}]_0$. Les fréquences des cycles catalytiques (Turn Over Frequency, TOF) en s^{-1} qui représentent les rapports des vitesses initiales sur les concentrations de catalyseurs ont été calculées comme suit : $\text{TOF} = v_0 / [\text{catalyseur}]_0$.

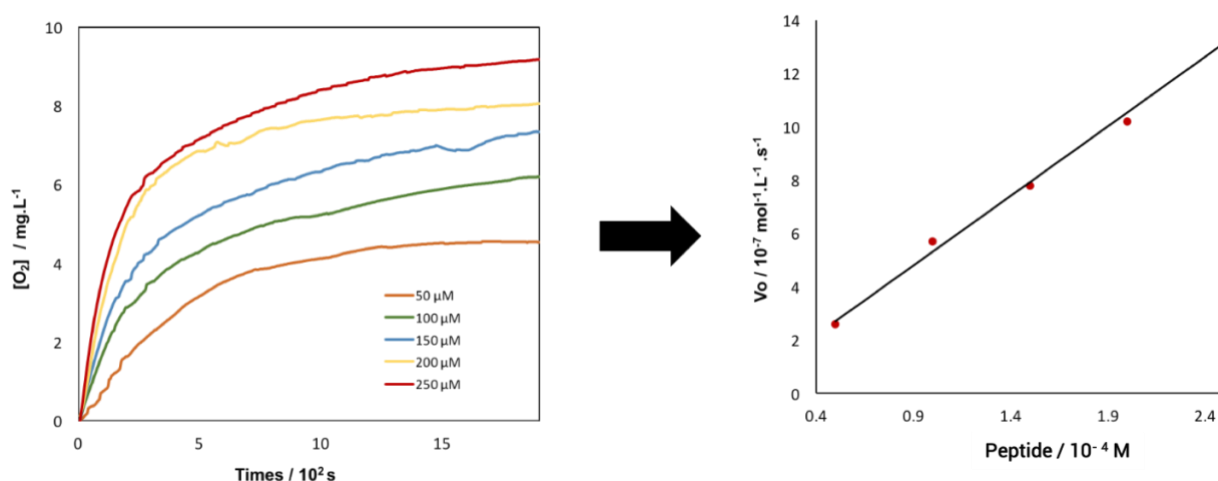


Figure 54. Illustration du processus de détermination de la constante catalytique apparente (k_{cat}) pour un mélange CuCATm1:Cu²⁺ 1:1 (50, 100, 150, 200 ou 250 μM) par mesure des vitesses initiales V_0 à différentes concentrations en ligand.

Mise au point du test d'activité.

Afin de réaliser les mesures par polarographie, les conditions expérimentales ont dû être optimisées.

1. Solubilité des sels de cuivre

Premièrement, il a fallu s'assurer qu'un précipité ne se forme pas lors de l'ajout du sel de cuivre(II) et/ou du peroxyde d'hydrogène dans le tampon. Pour sélectionner le tampon, des tests de solubilités du sel de Cu(II) ont été effectués dans cinq tampons différents à 50 mM et

à pH 7,5 : phosphate de sodium, phosphate de potassium, TRIS, HEPES et MOPS. Deux plus, deux contre-ions pour le cuivre ont été testés, l'acétate et le sulfate. Les solutions métalliques ont été incubées seules ou en présence d'H₂O₂ dans les différents tampons pendant 1 heure. Aucun précipité n'est observé dans les tampons MOPS et TRIS pour les deux solutions de cuivre (Tableau 12). Néanmoins, dans le cas du tampon TRIS, l'ajout d'H₂O₂ engendre la formation d'une importante quantité de bulle d'air, suggérant la formation d'O₂. Le TRIS étant un bon chélateur de Cu²⁺, il est donc possible que le complexe TRIS-Cu²⁺ soit responsable de la dismutation de H₂O₂. Ceci confirme les observations faites lors des expériences de voltammétrie cyclique où la formation d'un complexe Tris-Cu²⁺ a aussi été suspectée. Le tampon MOPS s'est donc révélé être le plus adapté pour la mesure de l'activité catalytique.

Tableau 12. Essais de solubilité du Cu²⁺ dans différents tampons

Tampon Cu ²⁺	Temps d'incubation (min)	H ₂ O milli Q	Phosphate de sodium	Phosphate de potassium	TRIS	HEPES	MOPS
Cu(OAc) ₂	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	60	+++	++	++	+++	+	+++
Cu(OAc) ₂ + H ₂ O ₂	1	+	+++	+++	+++	—	+++
	60	+++	++	—	+++	+	+++
CuSO ₄	1	+++	+	+	+++	+	+++
	60	+++	—	—	+++	+	+++
CuSO ₄ + H ₂ O ₂	1	+++	—	—	+++	—	+++
	60	+++	—	—	+++	—	+++

+++ : Solubilité total

++ : Solubilité partielle (présence d'un dépôt léger sous forme de gel, solution claire)

+: Solubilité faible (formation d'un précipité qui se dissout après agitation, solution légèrement trouble)

— : Insoluble (formation d'un précipité solide)

2. Activité catalytique des sels de cuivre

La seconde étape de mise au point consistait à choisir le sel de cuivre le plus adapté pour la formation du complexe CuCATm1:Cu²⁺. Le cation métallique en solution peut accélérer la dismutation d'H₂O₂ et cette capacité varie en fonction du contre-ion et du tampon choisi. Afin de nous affranchir des erreurs liées à la présence de cuivre libre dans les solutions pour les

mesures d'activité catalytique, nous avons cherché un sel de cuivre ayant une activité de dismutation du peroxyde d'hydrogène la plus faible possible. L'activité de type catalase de quatre solutions de sels de cuivre(II) a été mesurée dans une solution d'H₂O₂ (2.5 mM) dans un tampon MOPS (50 mM à pH7.5).

Une activité catalytique significative a été observée dans le cas de la solution d'acétate de cuivre. Ce résultat pourrait s'expliquer par la possibilité d'obtenir des dimères Cu(OAc)₂. La proximité des deux cuivres pourrait ainsi permettre les réactions d'oxydoréduction à 2 électrons requises. Le sulfate de cuivre s'est avéré être le sel de Cu²⁺ le moins actif (Tableau 13).

Tableau 13. Paramètres décrivant la catalyse de la dismutation de H₂O₂ dans MOPS (50 mM, pH 7,5, 25 ° C) par les solution de cuivre: les taux initiaux de formation d'O₂, le point final (quantité maximale d'O₂ formée), la TON (nombre de cycle), le rendement en O₂ et le TOF (fréquence des cycles).

Cu ²⁺ (0.5mM)	v ₀ (nM s ⁻¹)	Point final ^a	TON	Rendement ^b (%)	TOF ^c (10 ⁻⁶ s ⁻¹)
CuSO ₄	0.6	456.9	0.9	18	1.2
Cu(NO ₃) ₂	6.7	731.6	1.5	29	13
CuCl ₂	3.5	569.7	1.1	23	7.0
Cu(CH ₃ CO ₂) ₂	7.5	591.6	1.2	24	15

^a (max, O₂ μM). ^b Rendement d'O₂. ^c basé sur le taux initial.

Mesure de l'activité catalytique des mimes

Dès lors que les conditions expérimentales ont été validées, les mélanges CuCATm1: Cu²⁺ 1:1 et 1:2 ont été réalisés à partir d'une solution de CuSO₄ et leur activité catalase a été mesurée dans un tampon MOPS (50 mM, pH 7,5) contenant H₂O₂. L'activité d'enzymatique de la catalase bovine a également été mesurée dans les mêmes conditions.

La formation de dioxygène a été observée pour les deux mélanges CuCATm1: Cu²⁺ 1:1 et 1:2. Néanmoins, la constante apparente k_{cat} mesurée pour le rapport peptide:Cu²⁺ 1:2 est 4 fois meilleure que celle pour le mélange 1:1 et 10 fois meilleure que pour le cation Cu²⁺ seul. Il est à rappeler, que selon le diagramme de spéciation (Figure 46), au rapport 1:2, 100% du complexe CATm1: Cu²⁺ 1: 2 est formé. Tandis qu'au rapport 1: 1, il est présent au sein de la solution un mélange de trois espèces (CATm1 et les complexes 1:1 et 1:2). Par conséquent, la

constante cinétique apparente correspond est liée à une contribution de ces 3 espèces. Puisque 2 électrons sont nécessaires pour la catalyse de la dismutation H_2O_2 , comme anticipé, la constante apparente la plus élevée a été obtenue pour le rapport peptide: Cu^{2+} 1: 2 conduisant à la concentration plus élevée du complexe binucléaire.

La constante catalytique k_{cat} pour le complexe 1:2 représente 0,002% de l'activité enzymatique de la CAT bovine mesurée dans les mêmes conditions, ce qui est cohérent avec les activités mesurées pour les porphyrines à manganèse décrites dans la littérature qui varient selon la structure de la porphyrine de 0,0004% à 0,006% de l'activité de l'enzyme purifiée.¹⁸⁴ Un ratio 1:3 CuCATm1: Cu^{2+} ne permet pas d'obtenir une meilleure activité, on observe une constante catalytique 2.5 fois moins bonne que celle pour un ratio 1:2. L'espèce CuCATm1: Cu^{2+} au ratio 1:2 s'avère donc être l'espèce la plus active.

L'expérience a été reproduite pour le complexe 1:2 à pH 7 et une meilleure constante k_{cat} a été observée, ce qui pourrait s'expliquer par une sphère de coordination différente. De plus, le nombre de cycles (TON), la fréquence des cycles (TOF) et le rendement maximum de dismutation d' H_2O_2 ont été calculés et sont rapportés dans le Tableau 14. Dans le cas du complexe 1:2, le TON est d'environ 3,35, ce qui est légèrement plus faible que pour les porphyrines à Mn mais plus élevé que pour les autres complexes à Mn qui possèdent des activités de type CAT. Ce faible TON pourrait s'expliquer par les faibles affinités du complexe avec H_2O_2 comme le montre la valeur élevée du K_M .

Tableau 14. Paramètres décrivant la catalyse de la dismutation de H_2O_2 dans MOPS (50 mM, pH 7,5, 25 °C) par les mélanges CuCATm1: Cu^{2+} à différents ratios : k_{cat} , les taux initiaux de formation d' O_2 , le point final (quantité maximale d' O_2 formée), le TON (nombre de rotation), le rendement en O_2 et le TOF (fréquence de rotation).

	k_{cat} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	v_0 ($\text{nM} \cdot \text{s}^{-1}$)	End point ^a	TON	Yield ^b (%)	TOF ^c (10^{-6}s^{-1})	K_M (mM)
CuCATm1:Cu (50 μM)							
1:1	2.1	0.26	141	2.8	5.5	5.1	1.7
1:2	8.9	0.36	168	3.4	6.7	7.2	10
1:3	3.4	0.71	153	3.1	6.1	14	
1:2 ^d	11.2	0.28	82	1.6	3.3	5.6	
CuSO_4 (100 μM)	0.8	0.20	133	1.3	5.3	2.0	

Catalase (1 nM)	4.5 10 ⁵	0.80	396	4105	15.9	0.8
-----------------	---------------------	------	-----	------	------	-----

^a (max, O₂ μM). ^b Rendement d'O₂. ^c basé sur le taux initial. ^d Dans MOPS (50 mM, 25°C) à pH 7,0.

Cette même bibliothèque a été utilisée pour la découverte d'un mime de SOD dans des travaux précédents.¹⁸⁵ Afin de s'assurer de la sélectivité du test pour la sélection de mime de CAT seulement, le complexe CuCATm1-Cu²⁺ 1:1 a été étudié pour son activité SOD en cuvette par le test Mc Cord et Fridovich.¹⁸⁵ Dans ce test, nous avons mesuré un IC₅₀ du complexe 1:1 de 372 nM, ce qui est seulement 1,6 fois meilleur que le sel de cuivre seul en solution (IC₅₀ = 603 nM). Le complexe CuCATm1-Cu²⁺ a donc une très faible activité SOD. Ceci illustre que le test de criblage par l'activité permet d'identifier des complexes efficaces uniquement pour l'activité choisie.

Inversement, nous avons étudié un des mimes de SOD issus de l'approche combinatoire et celui-ci ne présente pas d'activité de type-CAT.¹⁸⁵

IV. ACTIVITÉ CATALASE DE CATm1 DANS LES CELLULES HELA HYPER

Pour aller plus loin, l'activité de ce nouveau catalyseur CuCATm1:Cu²⁺ a été évaluée sur des cellules HeLa exprimant intracellulairement la protéine HyPer (pour **H**ydrogène **P**eroxyde en anglais) qui est une sonde fluorescente ratiométrique sélective d'H₂O₂.

1) Modèle cellulaire HeLa-Hyper

1. *Ligné Cellulaire HeLa (les cellules d'Henrietta Lacks)*

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse, prélevées sans consentement et en secret en 1951 par le professeur Gey à Henrietta Lacks, une Afro-américaine atteinte d'un cancer du col de l'utérus.¹⁸⁶ Les cellules HeLa sont des cellules infectées par le Papillomavirus Humain (HPV). Elles ont la particularité de posséder entre 76 et 80 chromosomes par cellule contre 46 pour les cellules normales. Les cellules HeLa possèdent deux caractéristiques exceptionnelles, rendant cette lignée cellulaire idéale pour la recherche biomédicale.¹⁸⁶ Elles constituent la première lignée cellulaire immortalisée de source humaine, c'est-à-dire que ces cellules ont la capacité de se diviser en continu sans jamais mourir si elles sont cultivées dans les conditions de cultures adéquates, contrairement aux cellules « non-immortalisées » qui meurent en général en quelques jours, voire quelques heures. Cette propriété des HeLa est

due à la présence d'une télomérase hyperactive qui permet la reconstruction instantanée des télomères à chaque division cellulaire inhibant ainsi le processus de vieillissement cellulaire.¹⁸⁷ Ces cellules possèdent aussi une vitesse de division et de développement exceptionnellement rapide. Elles ont la capacité de doubler leur nombre en seulement 24 h. En effet, dans le cas des cellules HeLa, le génome du HPV s'est inséré pr du gène du c-myc, un oncogène qui favorise la division cellulaire et inhibe l'apoptose. L'insertion du gène de la HPV proche de c-myc va avoir pour conséquence sa surexpression ce qui va engendrer une division et une prolifération anormalement rapide des cellules HeLa (Figure 55).¹⁸⁸

Les cellules d'Henrietta Lacks sont ainsi une lignée cellulaire parfaite pour effectuer des travaux de recherche et sont aujourd'hui présentes dans la majorité des laboratoires de biologie du monde.

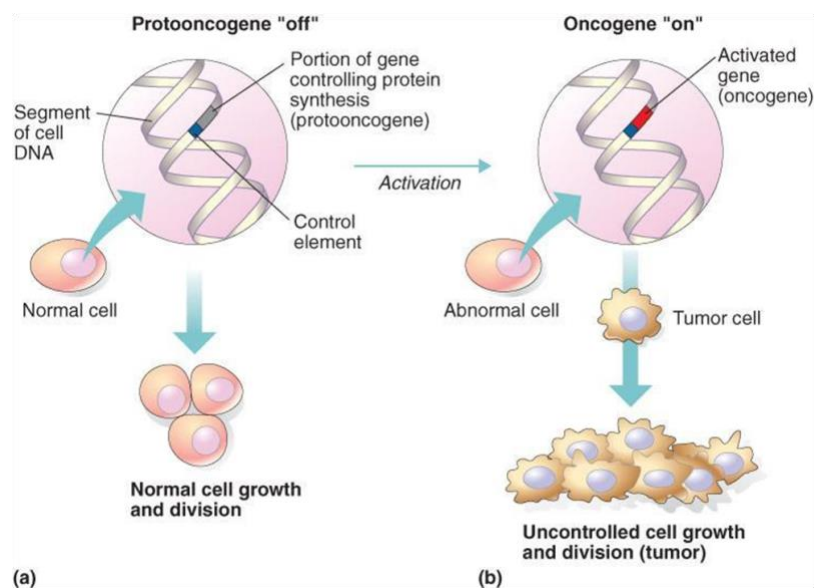


Figure 55. Représentation d'une division et d'une prolifération cellulaire chez une cellule saine (Proto oncogène inactif) (a) et chez une cellule anormale (oncogène actif) (b). L'altération d'une copie d'un proto-oncogène produit une protéine dont l'activité diffère fortement de celle du produit normale (par exemple expression très augmentée ou encore présence du produit dans des cellules inappropriées). Cette protéine mutée stimule de façon constante la division cellulaire qui ne sera plus régulée normalement. Cette altération est dite dominante car la production de protéine altérée par une seule des deux copies du proto-oncogène est nécessaire et suffisante pour altérer sa fonction. Figure issue du site <https://i.pinimg.com/originals/5c/fd/a2/5cfd a261bc4f1cdec7b30c5bb0df1ce3.png>, prélevée le 1 août 2020.

2. *Hyper : sonde ratiométrique sélective de peroxyde d'hydrogène*

Les cellules HeLa produisant de manière naturelle H_2O_2 ont été utilisées par le Dr Belousov en 2005 pour la mise en place d'une méthode de détection et de quantification d' H_2O_2 dans des cellules vivantes par l'expression d'une protéine nommée HyPer.¹⁸⁹ HyPer est un capteur fluorescent ratiométrique génétiquement codé de H_2O_2 basé sur une protéine fluorescente jaune à permutation circulaire (cpYFP) intégrée dans le domaine de régulation d'*Escherichia coli* OxyR (OxyR-RD).^{189,190} La protéine cpYFP est un chromophore hautement sensible au changement conformationnel de la protéine. Ainsi, le signal de fluorescence produit par cpYFP est dépendant de la conformation de la protéine et en conséquence de son environnement direct.^{191,192} Quant au domaine Oxy-RD, sa conformation est sensible à H_2O_2 . Oxy-R possède deux cystéines en position 199 et 208. En absence d' H_2O_2 , la cystéine 199 se trouve dans une poche hydrophobe de la protéine, tandis qu'en présence d' H_2O_2 , la cystéine 199 forme un dérivé d'acide sulfénique, sort de la poche hydrophobe et forme un pont disulfure avec la Cys208, provoquant de ce fait une forte modification de la conformation de la protéine.^{193–195} L'outil Hyper constitue l'intégration de la protéine cpYFP dans le domaine de sensibilité à H_2O_2 de Oxy-R entre les acides aminés 205 et 206 à l'aide d'un court espaceur peptidique. Dans cette nouvelle protéine, la formation de pont disulfure dans le domaine oxyR-RD en présence d' H_2O_2 va engendrer la modification des propriétés spectrales de cpYFP (Figure 55A).

Hyper est une sonde ratiométrique avec une signature fluorescente spécifique comportant deux pics d'excitation à 420 nm et 500 nm et un pic d'émission à 516 nm. La présence d' H_2O_2 va engendrer, de manière indépendante de la quantité de protéine présente, la diminution du pic d'excitation à 420 nm et proportionnellement l'augmentation du pic d'excitation à 500 nm. Par conséquent, la mesure par fluorescence du rapport $I(491/530) / I(405/530)$ va permettre de mesurer les niveaux de H_2O_2 dans la cellule.^{196,197} De plus Hyper étant spécifique à H_2O_2 et l'oxydation des cystéines étant réversible, il est possible de suivre en temps réel l'évolution de la quantité de H_2O_2 .

Hyper est ainsi un outil puissant qui est utilisé dans de nombreux laboratoires afin d'évaluer la concentration de H_2O_2 dans les cellules dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Alternativement cet outil est utilisé dans l'objectif d'étudier le rôle de H_2O_2 dans différents systèmes vivants et/ou d'étudier l'effet de composés sur sa concentration.¹⁹⁸

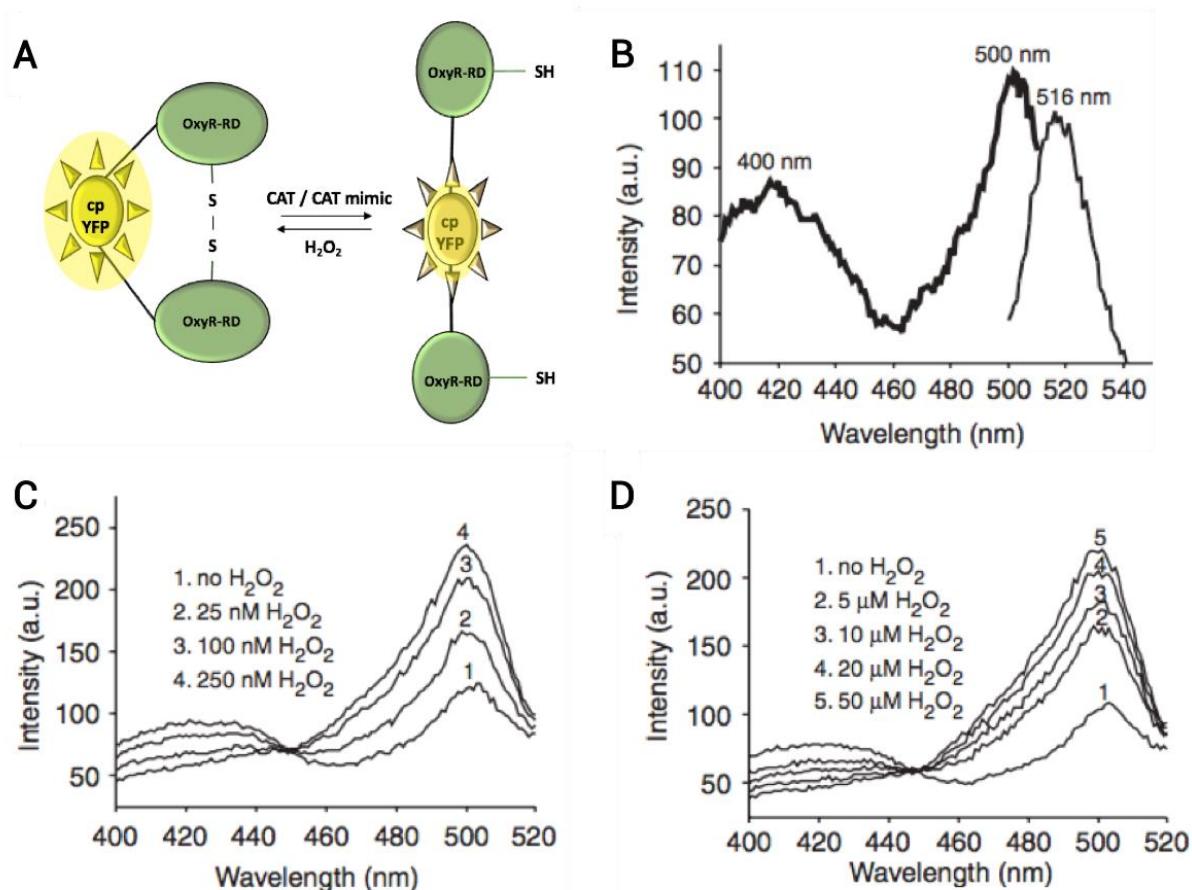


Figure 56. Schéma de HyPer à l'état oxydé et réduit constitué de cpYFP inséré dans le domaine Oxy-RD de E-coli. La présence de H_2O_2 induit la formation d'un pont disulfure et une augmentation de la fluorescence (A). Spectres d'excitation et d'émission de Hyper avec des maxima d'excitation à 400 nm et 500 nm et un maximum d'émission à 516nm (B). Spectres d'excitation d'HyPer mesuré dans du Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0.5 mM 2-mercaptoethanol avec la quantité d' H_2O_2 indiquée. Les spectres ont été mesurés pour une émission à 530 nm (C). Spectres d'excitation d'HyPer mesuré dans des bactéries E.coli après l'ajout de la quantité d' H_2O_2 indiquée. Les spectres ont été mesurés pour une émission à 530 nm (D). Figure adaptée de Belousov (2016).¹⁸⁹

2) Etude de l'activité du complexe CuCATm1:Cu²⁺ dans les cellules HeLa-HyPer

L'activité du complexe CuCATm1:Cu²⁺ a été étudiée dans des cellules HeLa-HyPer1 qui ont été préparées en utilisant des cellules de la lignée HeLa Flp-In. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Sophie Vriz au Collège de France par Marion Thauvin ([partie expérimentale voir « Experiments on HeLa HyPer cells » p. 174](#)). Il est important de noter que H_2O_2 est essentiellement produit extracellulairement, au niveau des membranes plasmiques

et que, en revanche, la détection de H_2O_2 est cytoplasmique (détecteur exprimé dans les cellules). Ceci est possible car H_2O_2 extracellulaire diffuse à travers le membrane plasmique.

Les niveaux de H_2O_2 ont été évalués en mesurant le rapport $I(491/530) / I(405/530)$. Ce rapport a dans un premier temps été mesuré pendant 60 minutes pour plusieurs cellules (typiquement 10 à 25 cellules) dans du tampon MOPS (50 mM, pH 7,5) avant et après l'addition des composés suivants :

- solution de mélanges aux ratios CuCATm1: Cu^{2+} 1:1 et 1:2 à 250 μM
- contrôles : CuCATm1 à 250 μM et CuSO_4 à 500 μM

Les rapports de l'intensité $I(491/530) / I(405/530)$ ont été normalisés par rapport aux cellules avant l'ajout des composés testés et ont été rapportés sur la Figure 57. Dans cet essai, les cellules n'ont pas été stressées, par conséquent, les effets mesurés sont les effets des mimes de CAT sur la concentration de H_2O_2 basale. Comme le montre la Figure 57, l'ajout du mélange CuCATm1: Cu^{2+} 1:2 engendre une diminution rapide de la concentration de H_2O_2 qui se stabilise après 40 min (diminution de 28%). La même tendance a été observée pour l'ajout du mélange CuCATm1: Cu^{2+} 1:1, mais dans une moindre mesure que pour celle au ratio 1:2. Pour le peptide CuCATm1, une légère diminution de la concentration de H_2O_2 a également été observée. Toutefois après 20 min, la concentration d' H_2O_2 augmente à nouveau et se rapproche rapidement de son niveau initial. L'addition de Cu^{2+} a entraîné une diminution de la concentration de H_2O_2 , en revanche celle-ci n'excède pas 19%.

Ces données indiquent fortement le fait que le complexe CuCATm1: Cu^{2+} 1:2 est l'espèce efficace pour la dismutation de H_2O_2 . La dismutation de H_2O_2 nécessitant deux centres métalliques, la diminution observée suite à l'ajout de la solution CuCATm1: Cu^{2+} au ratio 1:1 peut s'expliquer soit par une dimérisation du complexe 1:1, soit par la présence d'une faible quantité de complexe CuCATm1: Cu^{2+} 1:2.

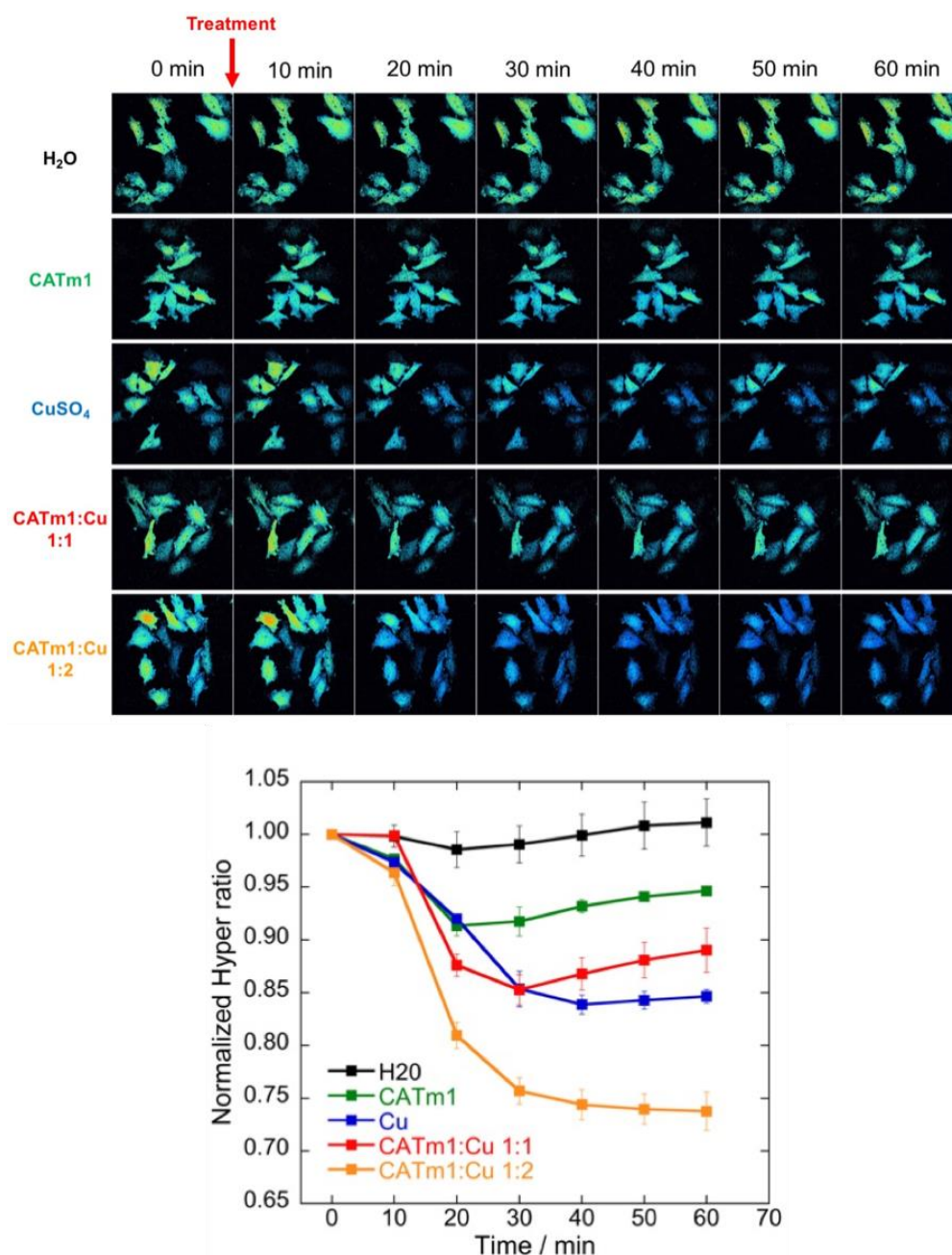


Figure 57. Concentration de H_2O_2 dans les cellules HeLa HyPer mesurée par fluorescence pendant 60 min après traitement avec H_2O (cellules témoins), le peptide CuCATm1 (250 μM), $CuSO_4$ (500 μM), le mélange CuCATm1 : Cu^{2+} 1:1 (250 μM) ou le mélange CuCATm1: Cu^{2+} 1:2 (250 μM). Le panneau du bas représente la moyenne des ratios pour 2 ou 3 expériences indépendantes.

Une seconde expérience, présentée en Figure 58, a été réalisée afin d'éventuellement mettre en évidence un impact durable de nos mimes sur la concentration d' H_2O_2 . Pour cela, nous avons incubé les cellules HeLa Hyper dans un milieu cellulaire contenant les composés redox-actifs (complexes ou contrôles) et suivi la fluorescence. Au bout de 40 min d'incubation, le milieu cellulaire a été substitué par un nouveau milieu sans composé. Il est alors observé une augmentation rapide de la concentration d' H_2O_2 . Cette observation nous permet d'émettre

deux hypothèses. Soit le complexe actif n'a pas pénétré les cellules et ne s'est donc pas accumulé dans le cytoplasme pour prendre en charge H_2O_2 intracellulaire, soit il a pénétré mais il n'est pas présent en quantité suffisante pour avoir un effet significatif.

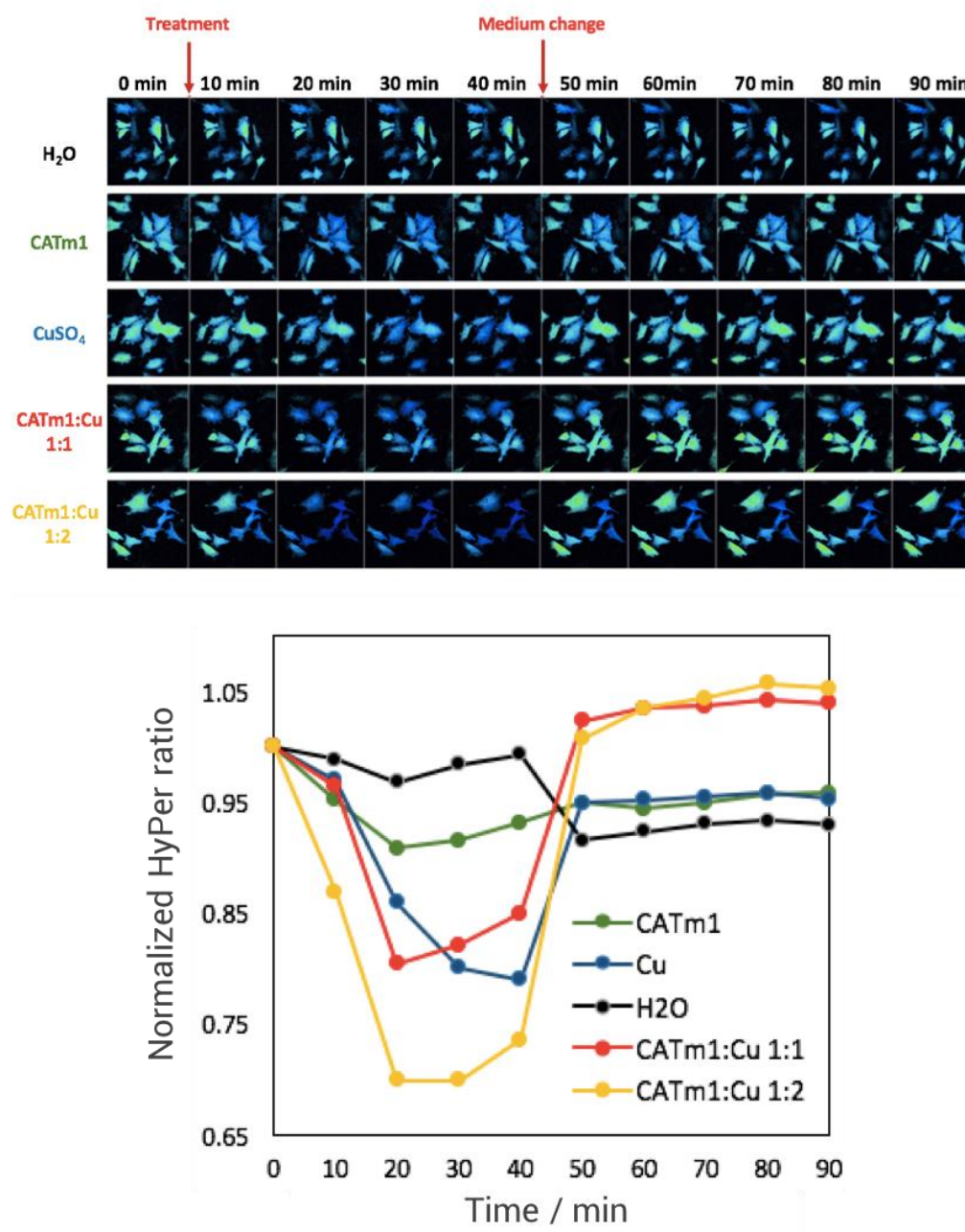


Figure 58. Taux de H_2O_2 dans les cellules HeLa Hyper mesuré par fluorescence pendant 90 min après traitement avec H_2O (cellules témoins), peptide CuCATm1 (250 μM), CuSO_4 (500 μM), complexe CuCATm1- Cu^{2+} 1:1 (250 μM) ou complexe CuCATm1- Cu^{2+} 1:2 (250 μM) et un changement du milieu cellulaire à 40 min. Le panneau de droite représente la moyenne du rapport pour 2 ou 3 expériences indépendantes.

Pour conclure, grâce à cette stratégie combinant une bibliothèque de complexes avec une sélection par un test d'activité sur gel, nous avons pu découvrir un complexe de cuivre(II) mimant l'activité de la catalase in vitro et sur un modèle cellulaire. À notre connaissance, à ce jour, ce complexe est le premier mime de catalase peptidique identifié. Ainsi, ces résultats mettent en évidence l'efficacité et le potentiel de notre approche et permet de valider notre stratégie. Néanmoins, dans la perspective d'utiliser ces mimes dans des milieux biologiques et étant donné que les cellules abondent en ligands pouvant rentrer en compétition avec le peptide pour la complexation du cuivre, il nous est apparu important d'améliorer la stabilité du complexe CuCATm1-Cu²⁺ 1:2 et donc potentiellement son activité cellulaire. C'est pourquoi, le chapitre suivant est consacré au développement de mimes de seconde génération.

Chapitre 3 : SECONDE GENERATION DE METALLOPETIDES : OPTIMISATION DU COMPLEXE CuCATm1-Cu²⁺

L'activité modeste et les faibles TON mesurés nous laissent penser que la dissociation des complexes dans les conditions cellulaires (milieu de culture, cytosol) est possible. C'est pourquoi, afin d'améliorer la stabilité et donc l'activité du complexe CuCATm1:Cu²⁺ 1:2, de nouveaux peptides inspirés de la séquence peptidique de CuCATm1 ont été conçus selon deux stratégies différentes qui seront détaillées dans ce chapitre. Notamment, nous avons tenté d'introduire un repliement de type coude au sein des peptides pour générer des structures plus compactes. C'est pourquoi, ce chapitre débute par un état de l'art sur les motifs de type coude β et les différentes stratégies développées pour les mimer.

I. Introduction : Induction d'un repliement de type coude- β au sein d'un peptide

1) Structure secondaire des protéines et activité.

Les structures secondaires et tertiaires des protéines jouent un rôle essentiel dans l'activité biologique de ces dernières. En effet, les interactions protéine-protéine (iPP) contrôlent l'essentiel des processus cellulaires. Or ces interactions ne sont possibles que grâce à une compatibilité structurelle (Figure 59).^{199–201} Les iPP sont en grande majorité concentrées dans une petite région de la protéine dite « hot spot » qui contribue de manière significative à l'énergie libre de la liaison PP. Par conséquent, l'une des stratégies les plus communes pour mimer une protéine consiste à concevoir rationnellement une molécule qui reproduit la structure secondaire ou tertiaire du hot spot.^{202,203} Ainsi, à ce jour plusieurs mimes structuraux comprenant des petites molécules et des peptides ont été développés.²⁰⁴ Toutefois, il est peut-être extrêmement difficile de concevoir un petit peptide naturel avec moins de 15 résidus pouvant former une structure secondaire stable et cela s'avère quasi impossible pour une structure tertiaire.²⁰⁵ Néanmoins plusieurs méthodes ont été développée pour contraindre les peptides à reproduire les conformations en hélice- α , feuillet- β , coude- β .^{204,206–}

Nous nous intéressons ici aux stratégies mises en place afin d'introduire un repliement de type coude- β eu sein d'une courte séquence peptidique.

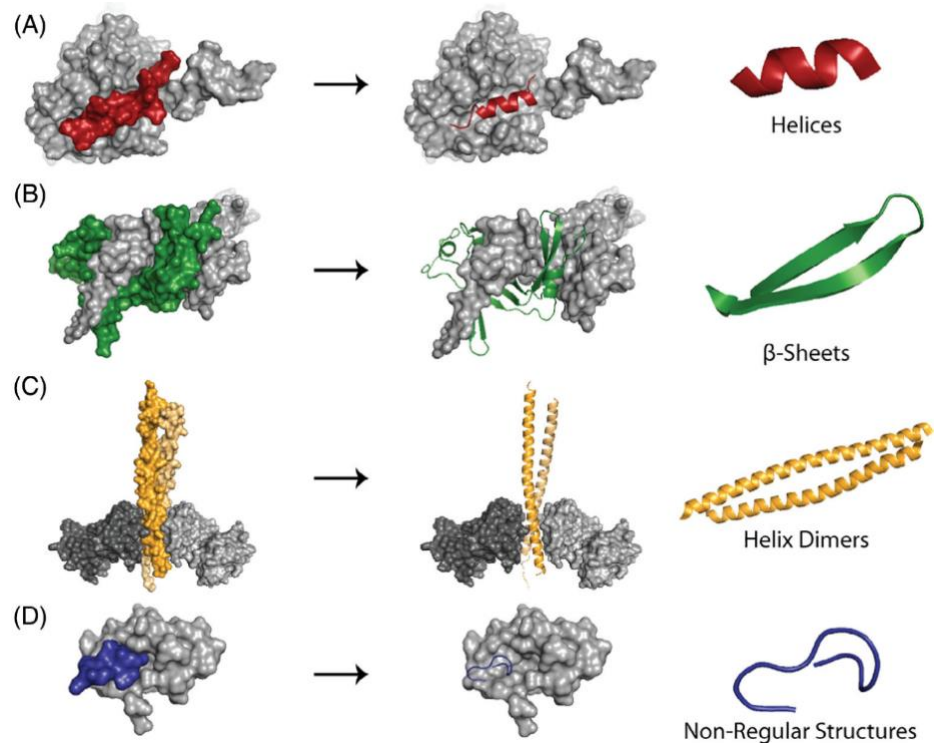


Figure 59. Exemples d'interfaces d'interaction protéine-protéine dans le cas (A) d'hélices α , (B) feuillets- β - (C) dimères, et (D) boucles irrégulières. Codes PDB: (A) 1BXL (Bcl-xL / Bak); (B) 1F3U (Rap30 / Rap74); (C) 3CL3 (vFLIP / IKK γ); (D) 1NPO (neurophysine II bovine / ocytocine).²⁰⁴

2) Le motif coude- β (β -turn)

Le motif coude- β est un type de structure secondaire non régulière de protéine. Cette structure permet de changer la direction de la chaîne polypeptide de près de 180° permettant ainsi à la protéine de se replier sur elle-même.^{209–211} Cette conformation joue souvent un rôle clé dans les interactions protéine-protéine en particulier dans le cas de reconnaissance des protéines par leurs récepteurs.²¹² Par exemple, la somatostatine qui est un peptide cyclique de 14 acides aminés est reconnu par 5 récepteurs GPCRs, sstR1-5. Des études réalisées sur 5 analogues de la somatostatine ont démontré le rôle clé du coude- β dans la reconnaissance du peptide par ses récepteurs.²¹²

1. Classification

Le motif coude- β se définit par la succession de quatre acides aminés désignés par les termes i , $i+1$, $i+2$ et $i+3$ et d'une distance entre le $C\alpha$ du résidu 1 et le $C\alpha$ du résidu 4 inférieure ou égale à 7 Å (Figure 60).^{213,214}

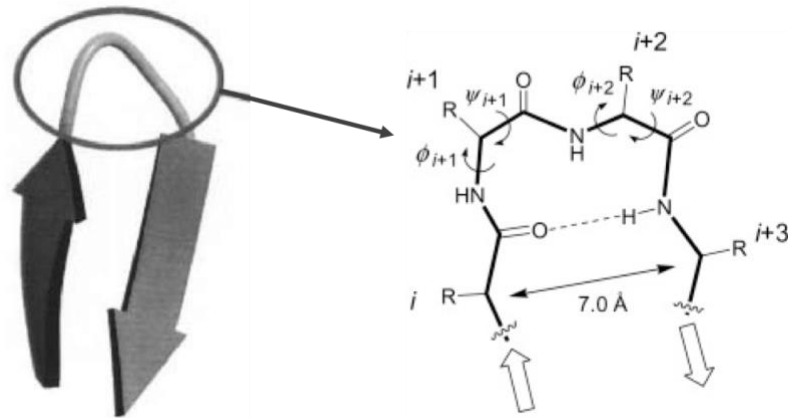


Figure 60. Schéma d'un coude- β . Figure adaptée de l'article ²¹⁵

Ball et al. ont réalisé une vaste étude sur des nombreux coudes- β et ont mis en évidence qu'il existe des caractéristiques topographiques communes au sein de ces unités de structures secondaires. Ball propose ainsi une classification des structures en coude- β basée sur les angles de torsion du squelette des résidus $i+1$ et $i+2$. Les valeurs des angles ϕ_{i+1} , ψ_{i+1} , ϕ_{i+2} et ψ_{i+2} permettent de classer les coudes- β en différents types

Tableau 15).^{213,214} Les types I et II , les plus communs, concernent près des deux tiers de protéines contenant un coude- β et sont stabilisés par une liaison hydrogène entre le CO du résidu i et le NH du résidu $i+3$. Les types I et II se différencient par l'orientation de la liaison amide entre les résidus $i+2$ et $i+3$. Les types I' et II' sont respectivement une conformation miroir du squelette peptidique des type I et II avec une inversion des signes des angles (Figure 61).^{211,216}

Cette classification est aujourd'hui utilisée pour la conception de petites molécules qui miment les structures de type coude- β .

Tableau 15. Classification des types de coude- β ²¹⁷

Turn Type	Φ_2 (deg.)	Ψ_2 (deg.)	Φ_3 (deg.)	Ψ_3 (deg.)
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30
IV	A turn with two or more angles differing by at least 40° from the above			
V	-80	80	80	-80
V'	80	-80	-80	80
VI	A <i>cis</i> Pro at position 3			
VII	A kink in the protein chain created by $\Psi_2 \approx 180^\circ$ and $ \Phi_3 < 60^\circ$ or $ \Psi_3 < 60^\circ$ and $\Psi_3 \approx 180^\circ$			

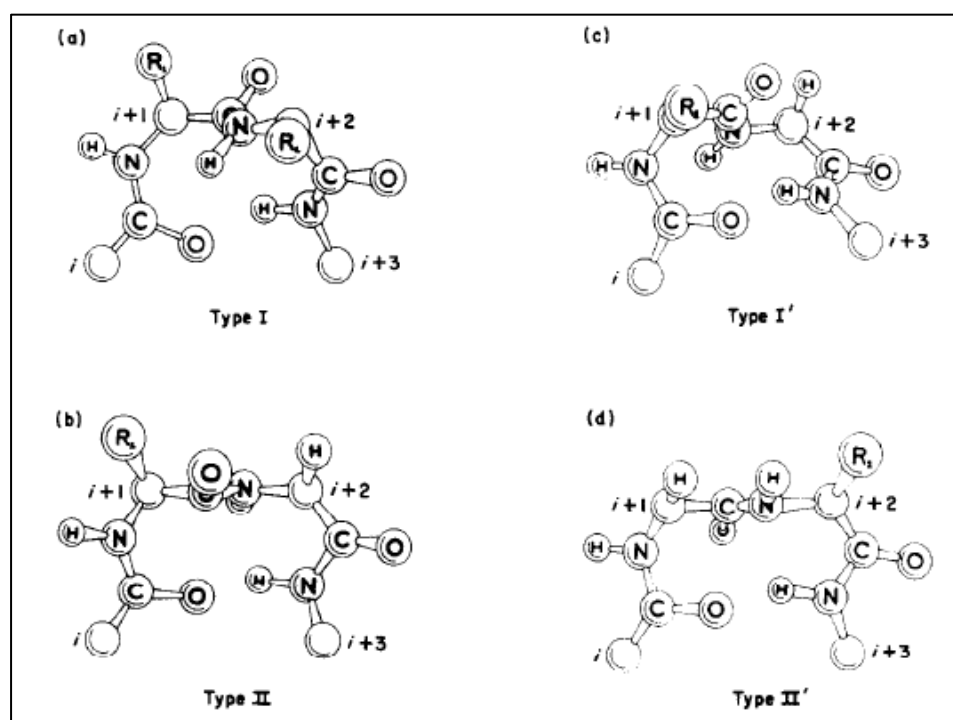


Figure 61. Conformation en coude- β de (a) type I, (b) type II, (c) type I', (d) type II'. R_x correspond aux différentes chaînes latérales. Une glycine est représentée à la position $i + 2$ pour le type II, I' et à la position $i + 1$ pour le type II'. Cela est dû au fait que cette acide aminé est très souvent observé à ces positions.²¹⁸

2. Agent thérapeutique et mime de type coude-β

Au sein de nombreuses protéines une conformation en coude-β est nécessaire à la bio-activité.²¹² Cela est notamment le cas des peptides tels que la somatostatine, l'hormone de stimulation des mélanocytes, la bradykinine et l'hormone lutéinisante.²¹⁹

Plusieurs exemples dans la littérature présentent des approches concluantes pour reproduire et stabiliser les conformations en coude-β afin d'augmenter, entre autre la spécificité pour un récepteur particulier.²¹⁵ L'élaboration de mimes synthétiques permet également d'améliorer la stabilité métabolique de ces potentiels agents thérapeutiques. De nombreux mimes peptidiques possédant une structure en coude-β ont été conçus en tant qu'agents anticancéreux, hormones, agents pour le traitement de maladies cardiovasculaires ou pour le traitement de maladies neurologiques et neurodégénératives, inhibiteurs de trouble inflammatoire chronique, anti thrombotique ou opiacés.²¹⁵

L'exemple le plus connu est celui de la sandostatine (ou octréotide), un inhibiteur de croissance. Cet octapeptide est un analogue de la somatostatine avec un tryptophane en position 8 et une lysine en position 6 afin d'induire un coude-β de type II' dans le peptide. La sandostatin est aujourd'hui commercialisé pour des patients acromégales ou dans le cas de maladies diarrhéiques telles que les tumeurs intestinales.^{220,221}

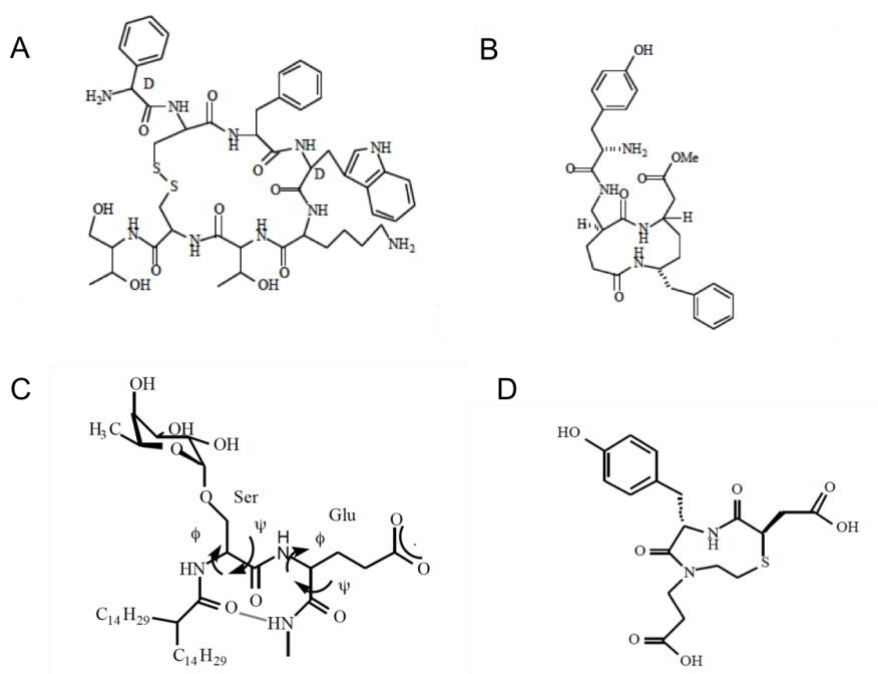


Figure 62. Exemple de mimes possédant une conformation en coude-β. (A) structure de l'octreotide. (B) structure de la seconde génération de mime d'enkephaline. (C) dipeptide Ser-Glu formant un coude-β de type II et II. (D) inhibiteurs puissants basés sur la séquence LDV.²¹⁵

3. Stratégies pour l'induction d'un repliement en coude-β

Il existe différentes approches pour induire un coude-β au sein d'un peptide.²¹⁵

La première stratégie consiste à utiliser certains acides aminés ou séquences d'acides aminés connus pour avoir une forte tendance à former naturellement des coudes-β. La glycine de par sa flexibilité et la proline de par sa structure cyclique ont été identifiées comme des acides aminés favorisant la formation de coude-β.²²² Les acides aminés hydrophiles présentent également une forte tendance à former un coude-β du fait de l'exposition au solvant des chaînes latérales hydrophiles.²²³ Hutchinson et Thornton²²² présentent une étude qui consiste à analyser une bibliothèque de coudes-β afin de déterminer la prédominance des acides aminés présents aux positions *i*, *i*+1, *i*+2 et *i*+3. Les résultats ont pu être rationalisés pour chaque type de coude-β. Les propriétés de chaque acide aminé (conformation préférée, capacité à former une liaison hydrogène ou d'autres types d'interactions) permettant de stabiliser une conformation particulière dans l'espace (Tableau 16).

Tableau 16. Acide amine prépondérant au position *i*, *i*+1, *i*+2 et *i*+3 pour la stabilisation des différents types de coude-β

	i	i+1	i+2	i+3
I	Asn, Asp, Ser, Cys	Pro (Glu, Ser)	Asp, Ser, Asn, Thr	Gly, (Trp, Met)
II	Pro, Tyr	Pro	Gly, (Asn)	Cys, Ser, Lys
I'	Tyr	Asp, Gly, His	Gly	Lys
II'	Tyr, Val	Gly	Asp, Asn, Ser	Thr, Gly
VIII	Pro, Gly, Asp	Pro (Glu, Ser)	Asn, Asp	Val (Phe, Ile)
VI			Cis-Pro	

Les acides aminés entre parenthèse sont ceux qui ont une prédominance plus faible, d'après la ref ²²²

La seconde approche pour stabiliser un mime de coude-β au sein d'un peptide consiste à imposer des contraintes conformationnelles de sorte à ce que les résidus d'acides aminés adoptent des angles déterminés engendrant la formation d'un coude β :

- Remplacer stratégiquement les acides aminés L en acides aminés D.²²⁴
- Remplacer des liaisons amides dans la chaîne peptidique.²²⁵

- Utiliser des acides aminés inhabituels tels que des résidus d'acides aminés N-méthylé²²⁶, N-hydroxylé²²⁷ ou α -methyl²²⁸

La dernière approche qui est celle la plus souvent utilisée consiste à réaliser une cyclisation des peptides linéaires²²⁴ ou à incorporer aux positions i+1 et i+2 un espaceur organique.^{229,230} Ces espaceurs sont souvent des composés cycliques, certains sont listés dans le Tableau 17.²¹⁵

Tableau 17. Exemple de mimes de coude- β générés par cyclisation avec différents liens²¹⁵

	Templates	Turn	Peptide or Protein involved
1.	Lactam bridged dipeptides	Type II'	Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)
2.	m-(aminomethyl)benzoic acid (Mamb)	Type II', Type I	RGD mimetic
3.	(3S,10S)-(6E)-2-azacyclodec-6-enone	Type I	Substance P
4.	11-membered bislactam ring	Type I, II	Enkephalin
5.	3(S)-amino-10(R)-carboxy-1,6-diaza-cyclodeca-2,7-dione	Type II	-
6.	1,5- cyclooctadiene derivative	Type II', Type I	-
7.	1-(2-nitrophenyl)thiosemicarbazide	Type II'	Bradykinin, Neurokinin
8.	2-(3'-aminopropynyl)-aniline	-b	-
9.	Oxazolopiperidin-2-ones	Type II'	-
10.	Bicyclic turned dipeptide (BTD)	Type II', Type II	Gramicidin-S, LHRH, Enkephalin, Tendamistat
11.	Azabicyclo amino acid	Type I	Tachykinin
12.	Endo-cis-(2S,3R) bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3- dicarbonyl		
13.	Azodicarbonyl derivative	Type I	-
14.	Spiro β -lactam	Type II	-
15.	Benzodiazepines	Type I-VI	Gramicidin
16.	Bicyclic diketopiperazine	Type I	Malarial protein, RGD mimetic
17.	Tricyclic diketopiperazine	Type I	Malarial protein
18.	β -D-Glucose	-b	Somatostatin, Substance P
19.	Bicyclic ring	-b	-
20.	Spirolactam	Type II, Type II'	-
21.	Spiro bicyclic ring	Type II	-

^bcould not be classified to a particular type of turn.

4. Induction de la conformation de type coude- β par la proline et ses dérivés

La proline est un acide aminé avec une conformation très différente des autres acides aminés. C'est le seul acide aminé dont l'amine N-terminale est secondaire. Son extrémité N-terminale

est impliquée dans un cycle à 5 atomes qui l'empêche de réaliser des liaisons hydrogène et impose de fortes contraintes conformationnelles.^{211,219,231} L'amide issue de l'amine de la proline a une probabilité d'environ 0,3 d'être en configuration cis tandis que pour les autres acides aminés cette probabilité est de l'ordre 10^{-3} .²³²

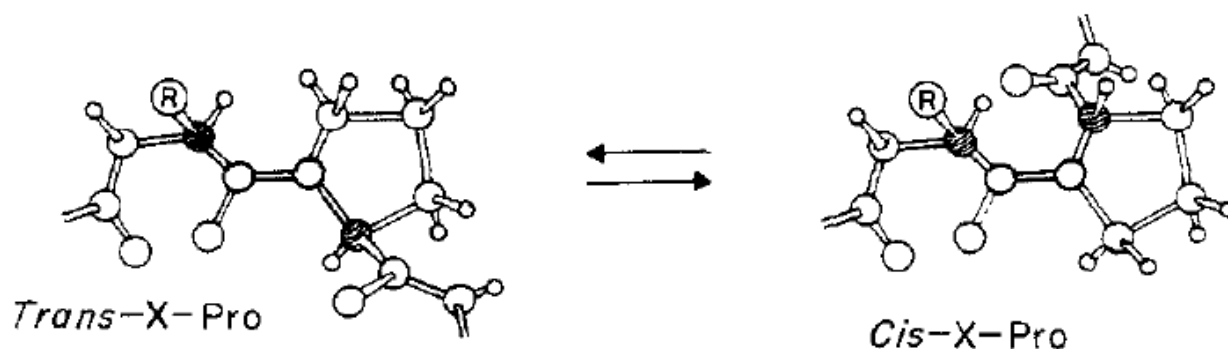


Figure 63. Configuration trans et cis d'un dipeptide X-Pro.²³²

Les propriétés particulières de la proline expliquent qu'elle ait été identifiée comme ayant un effet significatif sur les structures secondaires des protéines. Par conséquent, la présence de proline est fortement associée à la formation de coude- β . Elle est principalement placée en position $i+1$.²³³

Des études structurales ont été réalisées afin d'analyser l'effet de la proline ou de séquences présentant une succession de prolines sur la conformation des protéines. Il a été montré que

- Le motif **X-cisPro** conduit à la formation de coudes- β de type VIa et VIb
- Le motif **X-Pro-Pro-X** conduit à la formation de coude- β de type VI avec les deux prolines en position centrale (positions $i+1$ et $i+2$)
- Le Motif **Pro-X-Pro** conduit à la formation de coude- β de type I ou II avec la seconde proline souvent en position $i+1$
- Le motif **Pro-Gly** conduit, dans 48% des cas, à une structure en coude- β avec la Pro en position $i+1$ et la glycine en Position $i+2$.

La proline est donc très communément utilisée pour concevoir des peptides naturels avec un repliement de type coude- β .²³²⁻²³⁴

II. Conception, synthèse et caractérisation du complexe peptidique CuCATm1-coudé : Cu^{2+}

1) Conception du peptide CuCATm1-coudé (CuCATm1-c)

Comme initialement nous pensions qu'il y avait deux sites d'affinités différentes, il a été décidé de synthétiser un peptide constitué de la séquence de CuCATm1 : *PHYKHRLH* répétée deux fois de façon palindromique en omettant la proline de la séquence (voir Figure 64). Nous émettions l'hypothèse que cette nouvelle séquence permettrait d'obtenir un peptide capable de lier 2 cuivres avec une très bonne affinité et donc de former un complexe 1:2 bénéficiant d'une stabilité plus importante que celle observée pour CuCATm1: Cu^{2+} . Entre les deux fragments peptidiques, une séquence Pro-Gly a été introduite afin de favoriser en repliement en coude β dans la chaîne peptidique.^{235–237} Cette conformation coudée devrait promouvoir la coopérativité des deux fragments peptidiques pour la complexation des deux cations métalliques cuivre(II) et éventuellement diminuer le coût entropique en pré-organisant le peptide pour la chélation (Figure 64).

Le peptide CuCATm1-c (CuCATm1-coudé) de séquence Ac-HLRHKYHPGHYKHRLH-NH₂ a été synthétisé sur une résine MBHA (0,68 mmol/g) munie d'un espaceur amide et son extrémité N-terminale a été acétylée. La concentration de la solution stock de peptide a été mesurée par spectroscopie UV-visible à 280 nm, en utilisant la valeur du coefficient d'extinction de la tyrosine décrite dans la littérature.^{166,238}

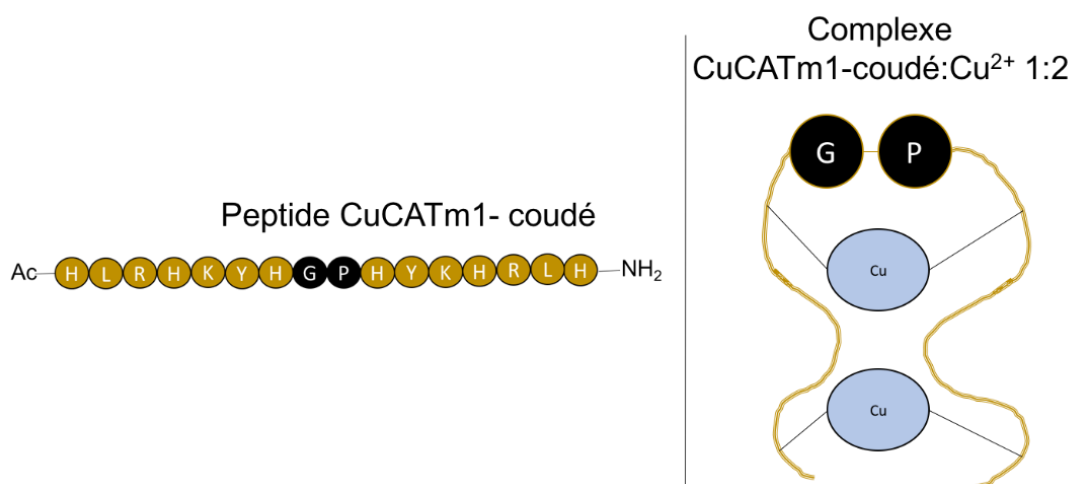


Figure 64. Séquence peptidique de CuCATm1-c et schéma hypothétique du complexe CuCATm1-c : Cu^{2+} 1 :2

2) Caractérisation du complexe CuCATm1-c : Cu²⁺

1. Détermination de la stoechiométrie par dichroïsme circulaire

Le complexe CuCATm1-c:Cu²⁺ a été étudié par dichroïsme circulaire. Le peptide a été titré par une solution de Cu(OAc)₂ dans un tampon MOPS (50 mM) à pH 7 et 7,5. L'addition de Cu²⁺ à la solution peptidique engendre une augmentation des bandes à 226 nm et à 260 nm. Un plateau est atteint autour de trois et quatre équivalents à pH 7,5 et 7 respectivement. Contrairement à notre prédiction, cette observation montre que le peptide CuCATm1-coudé est capable de lier de 3 à 4 cations de cuivre en fonction du pH du milieu et non pas deux (Figure 65).

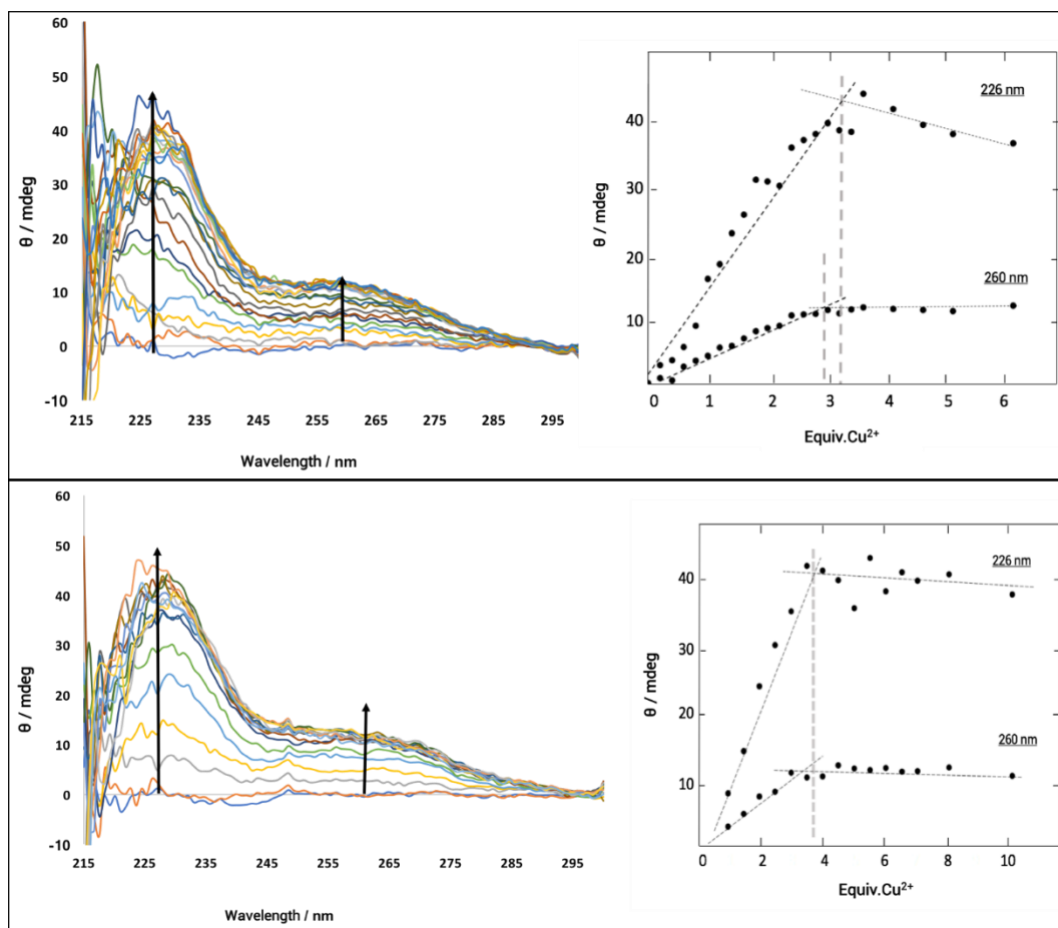


Figure 65. Titration de CuCATm1-coudé avec Cu²⁺ par dichroïsme circulaire dans un tampon MOPS (50 mM, 25 °C), [CuCATm1-coudé] = 200 μM. Les graphes de droite montre l'évolution des deux maxima à 226 et 260 nm lors de l'addition de Cu²⁺. Le plateau est atteint autour de 3 équivalents de Cu²⁺ à pH 7,5 (haut) et de 4 équivalents à pH 7 (Bas)

2. **Modélisation de la conformation du peptide CuCATm1-c par dynamique moléculaire**

Pour aider à interpréter ce résultat, une modélisation du peptide CuCATm1-c a été réalisée par une expérience de dynamique moléculaire par Rose Hoste. La dynamique moléculaire repose sur la paramétrisation des liaisons et des angles d'une molécule, qui fait d'un système quantique complexe est transformé en un réseau de ressorts et de masses dont l'énergie de la structure peut être minimisée numériquement. Les répulsions stériques de ce système de ressorts, mais aussi les interactions électrostatiques et de Van Der Waals sont prises en compte. Ainsi, la dynamique moléculaire permet d'identifier la conformation la plus probable d'un peptide.

La séquence du peptide CuCATm1-c a été utilisée pour générer un premier fichier de coordonnées sur le serveur PEP-FOLD.²³⁹ La séquence est comparée à une bibliothèque de séquences déjà caractérisées afin de générer la conformation la plus probable. Une fois cette première conformation obtenue, un recuit simulé est effectué. L'expérience de recuit consiste à lancer une dynamique à 300 K du peptide dans une boîte d'eau contenant un électrolyte (NaCl à 0.137 M, la concentration physiologique). La température est ensuite brusquement montée et maintenue à 500 K, puis graduellement redescendue à 300 K. Cette variation de température permet au peptide d'explorer l'intégralité de son paysage conformationnel et de s'affranchir d'un blocage dans un minimum local (voir Figure 66). La conformation obtenue à la fin du recuit est alors de façon plus probable la conformation la plus stable par le peptide ([partie expérimentale voir « Modeling of the conformation of the CuCATm1-c peptide by molecular dynamics » p.175](#)).

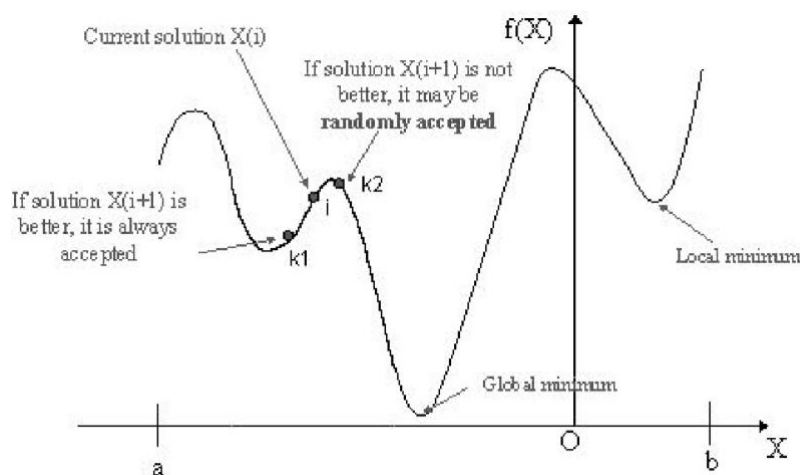


Figure 66. Principe du recuit simulé

Cette étude de modélisation prédit que le peptide CuCATm1-c forme bien un coude avec la séquence **HPGH**, toutefois, le peptide semble présenter ses chaînes latérales vers l'extérieur du coude. Les chaînes latérales ne sont donc pas projetées vers l'intérieur, comme on pourrait l'espérer afin de favoriser la formation de complexe où les deux brins peptidiques coordonnent le même cation métallique (Figure 67, A). Ce résultat suggère que l'orientation des chaînes latérales vers l'extérieur permettrait de diminuer l'encombrement stérique et ainsi d'obtenir un système thermodynamiquement plus stable. Ainsi, les brins peptidiques de part et d'autre du coude semblent être indépendantes et complexer deux cuivres chacun comme cela a été observé pour CuCATm1 (Figure 67,B).

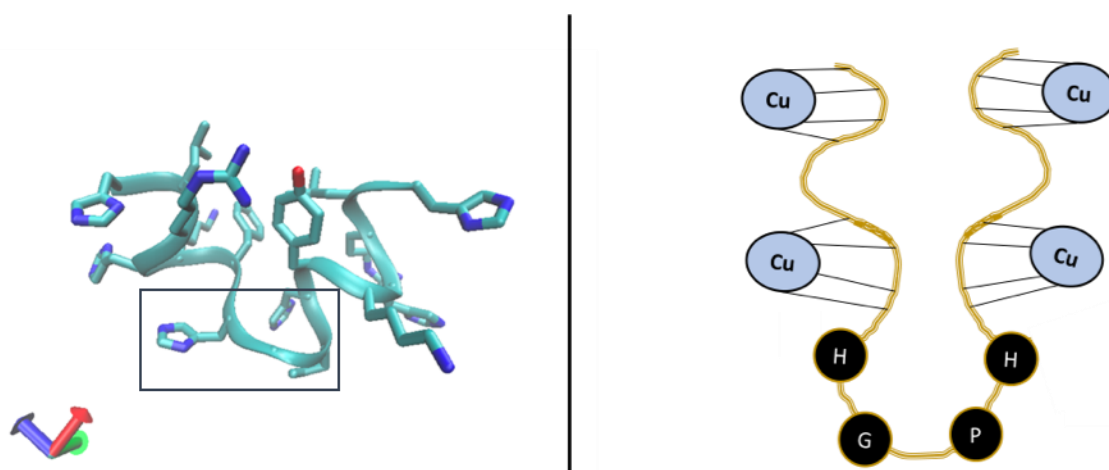


Figure 67. Conformation la plus stable obtenue par modélisation du peptide CuCATm1-c par CHARMM (gauche) et schéma hypothétique du complexe CuCATm1-c : Cu²⁺ 1 :4 (droite).

Néanmoins, la modélisation a été réalisée pour le peptide libre en milieu aqueux et ne prend pas en compte l'ajout du cuivre. Il est très probable que l'ajout du cuivre modifie très largement cette conformation.

3. Détermination de la stabilité des complexes par ITC

Afin d'obtenir des informations sur la stabilité des complexes CuCATm1-c:Cu²⁺ 1:x, les constantes de dissociation apparentes ont été mesurées par titrage calorimétrique isotherme (ITC) à pH 7 et 7,5 dans un tampon MOPS (50 mM). Pour une concentration de CuCATm1-c connue, des ajouts de 0,14 équivalents de Cu(OAc)₂ ont été successivement réalisés de 0 à 3.5

équivalents. Les thermogrammes obtenus ont été extrapolés en utilisant un modèle « Multiple sites » fourni par le logiciel de l'appareil. Les extrapolations réalisées avec ce modèle « Multiple sites » ont convergé vers un système avec deux sites de fixation, fournissant ainsi les informations pour 2 des 3 ou 4 sites de complexation. Dans les deux cas, les courbes simulées se superposent très mal avec les courbes expérimentales.

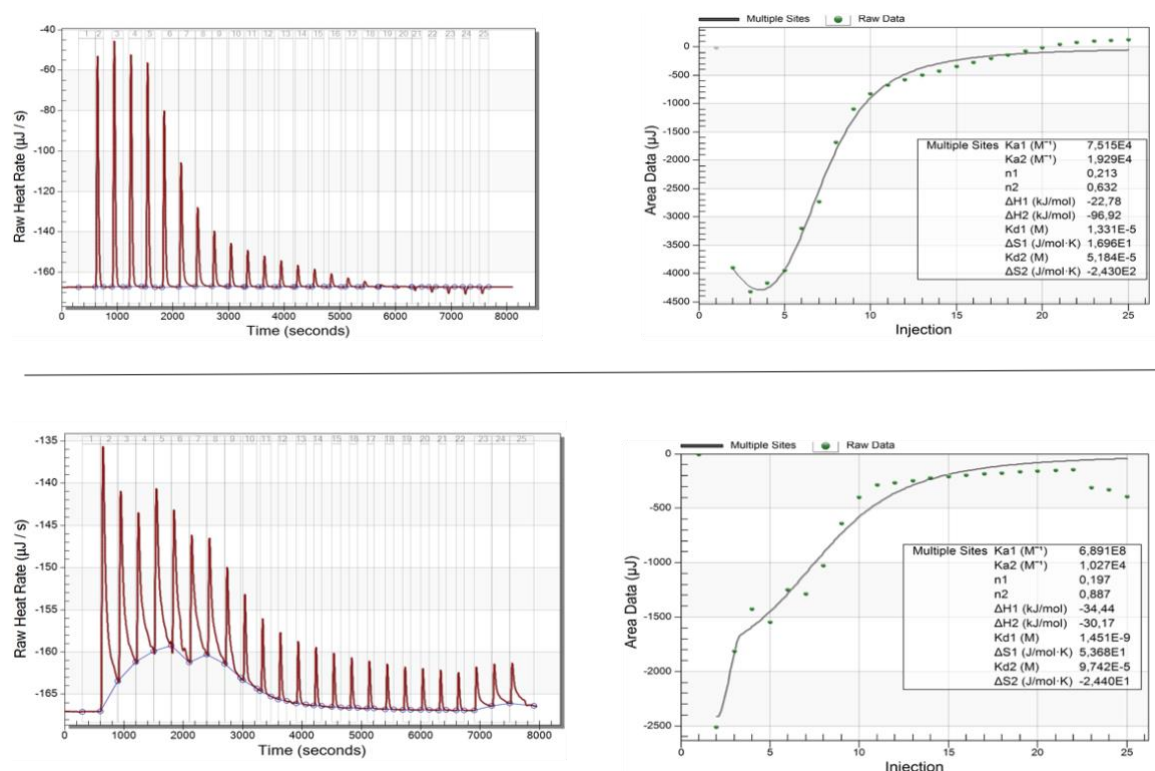


Figure 68. Thermogrammes obtenus lors de l'ajout de CuSO_4 à CuCATm1-c à $200 \mu\text{M}$ et l'isotherme de liaison ajustée correspondante en utilisant le logiciel fourni par le fabricant). L'expérience a été réalisée à pH 7 (haut) et pH 7,5 (bas) dans du tampon MOPS (50 mM) et à 25°C .

À pH 7, les constantes de dissociations apparentes K_{d1} et K_{d2} ont été respectivement mesurées à $1,30 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ et $9,74 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$. Les deux réactions de complexation possèdent une composante enthalpique largement favorable ($\Delta H1 = -22,78 \text{ kJ mol}^{-1}$ et $\Delta H2 = -96,92 \text{ kJ mol}^{-1}$) et une composante entropique favorable pour le premier site ($-\Delta S1 = -5,06 \text{ kJ mol}^{-1}$) et très défavorable pour le seconde site ($-\Delta S2 = 72,4 \text{ kJ mol}^{-1}$). Cela conduit à une énergie globale de Gibbs libre de $-27,84$ et $-24,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ respectivement pour le premier et le deuxième site. Cependant les stœchiométries obtenues par ces simulations sont aberrantes, en particulier pour le premier site où elle est proposée à 0,213. Ceci suggère qu'il existe probablement des complexes avec plusieurs peptides autour d'un cuivre et que les deux constantes mesurées

ne correspondent pas aux constantes de deux sites de fixation des cations métalliques 1 :1 et 1 :2.

Le thermogramme obtenu à pH 7,5 ne permet d'obtenir des valeurs exploitables. En effet, entre chaque injection, le système ne revient pas à l'équilibre puisque le pic de chaleur est très large et ne revient pas à la ligne de base. Ainsi, l'intégration des pics est probablement entachée d'une importante erreur. Afin d'obtenir des valeurs plus exploitables, il aurait fallu répéter l'expérience en allongeant l'intervalle de temps séparant chaque injection. Avant d'aller plus loin dans la caractérisation des ces complexes, nous avons évalué l'activité de type catalase de ces nouveaux complexes.

3) Analyse de l'activité Catalase du complexe CuCATm1-coudé : Cu^{2+}

1. Mesure de l'activité catalase par spectroscopie UV

L'activité catalase des complexes CuCATm1-c: Cu^{2+} a été évaluée par spectrophotométrie UV-vis selon la méthode développée par Hadwan et Abed basée sur la réaction du molybdate d'ammonium avec le peroxyde d'hydrogène (voir chapitre 2.III.4.2 p.98).¹⁸¹

La cinétique de réaction de disparition d' H_2O_2 a été mesurée pendant 2h pour des mélanges CuCATm1-c: Cu^{2+} à des ratios 1:1, 1:2, 1:3 et 1:4. Dans les quatre expériences, une diminution de l'absorbance à 339 nm est observée. Cela signifie que dans les quatre cas, les complexes formés sont capables de diminuer la quantité d' H_2O_2 en solution. La différence d'activité entre les 4 espèces semble négligeable (Figure 69). Néanmoins, en comparant avec le complexe CuCATm1: Cu^{2+} , les complexes coudés semblent avoir une vitesse initiale et une activité plus importante (Figure 70). En effet, dans le cas des complexes coudés, une diminution de l'absorbance de l'ordre de 52 % est observée dès la première minute. Cette absorbance continue à diminuer avec le temps mais plus lentement. Par comparaison, dans le cas des mélanges CuCATm1: Cu^{2+} 1:1 et 1:2, une diminution progressive de 41 % au bout de 60 min est observée sans que le plateau ne soit atteint. Les complexes coudés CuCATm1-c: Cu^{2+} ont une activité catalase plus importante que les complexes CuCATm1 : Cu^{2+} . Néanmoins, il semblerait que leurs TON soient moins importants que ceux de CuCATm1 : Cu^{2+} . De plus, comme indiqué

précédemment, il est important de prendre en considération la formation du complexe CuCATm1-c : Mo pouvant influencer sur l'absorbance mesurée.

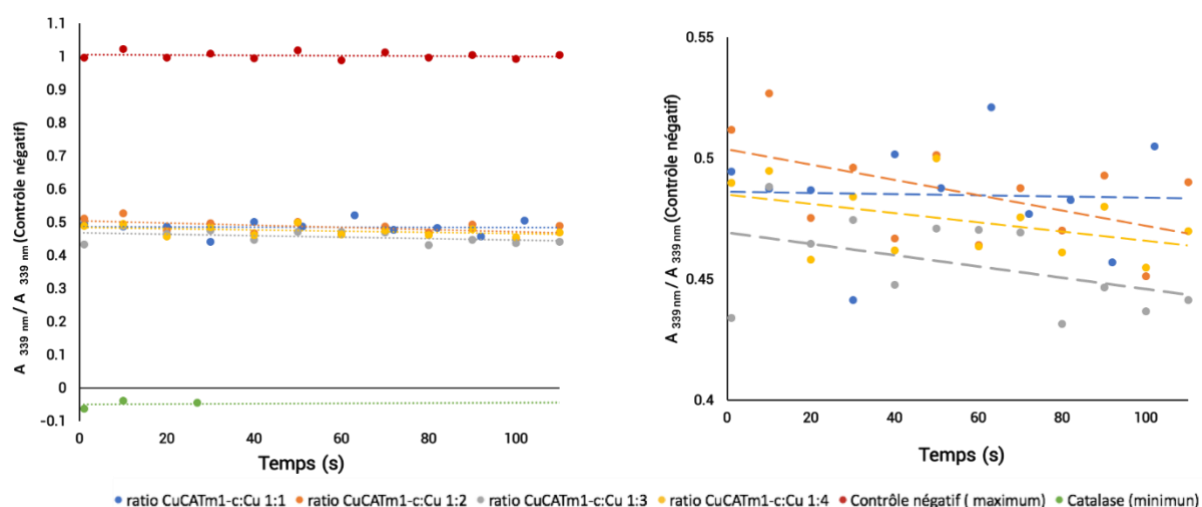


Figure 69. Evaluation de l'activité catalase de mélanges CuCATm1-c : Cu²⁺ (450 µM) à différents ratios par la mesure de l'absorbance à 339 nm de la solution de molybdate par spectrométrie UV-visible. A gauche, le graphique répertorie toutes les conditions, à droite seuls les mélanges CuCATm1-c: Cu²⁺ sont représentés. Le contrôle négatif correspond à l'ajout d'H₂O₂ sans complexe.

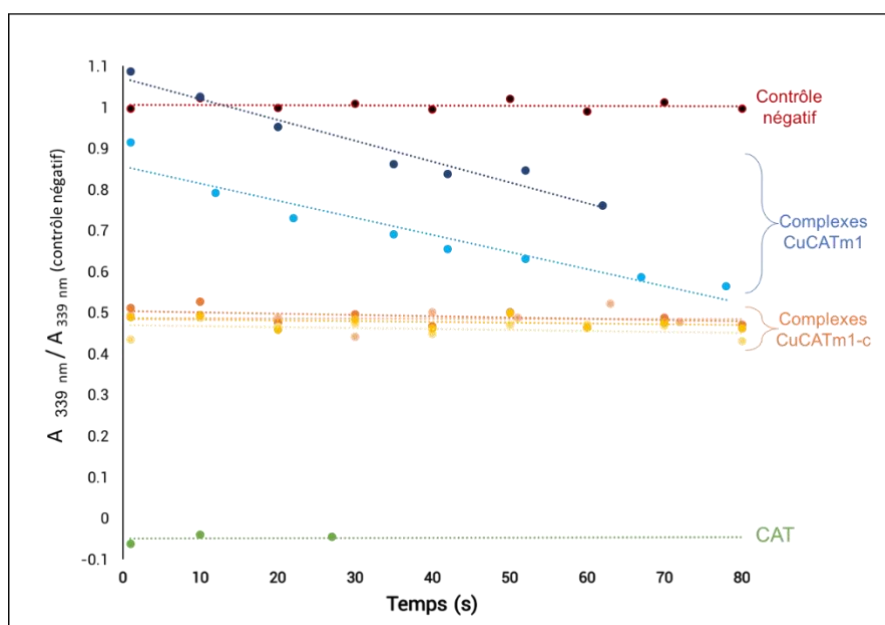


Figure 70. Graphique comparatif de l'activité catalase de mélanges CuCATm1 :Cu²⁺ (bleu foncé 1:1 et bleu clair 1:2) et des mélanges CuCATm1-c : Cu²⁺ (tons orange-rouge) à 450 µM par la mesure de l'absorbance à 339 nm de la solution de Molybdate par spectrométrie UV-visible. Le contrôle négatif correspond à l'ajout d'H₂O₂ sans le complexe.

Il apparaît clairement que cette méthode ne permet pas d'accéder aux vitesses initiales puisque, que cela soit pour la catalase ou pour les mimes testés, dès la première mesure, l'absorbance a fortement diminué et évolue peu. C'est pourquoi les mesures ont à nouveau été réalisées en utilisant une électrode de Clark.

2. Mesure de l'activité catalase avec une électrode de Clark

L'activité catalase des mélanges complexes CuCATm1-c : Cu²⁺ (1 mM) à différents ratios a été mesurée par polarographie dans un tampon MOPS à pH 7,5 (Figure 71).

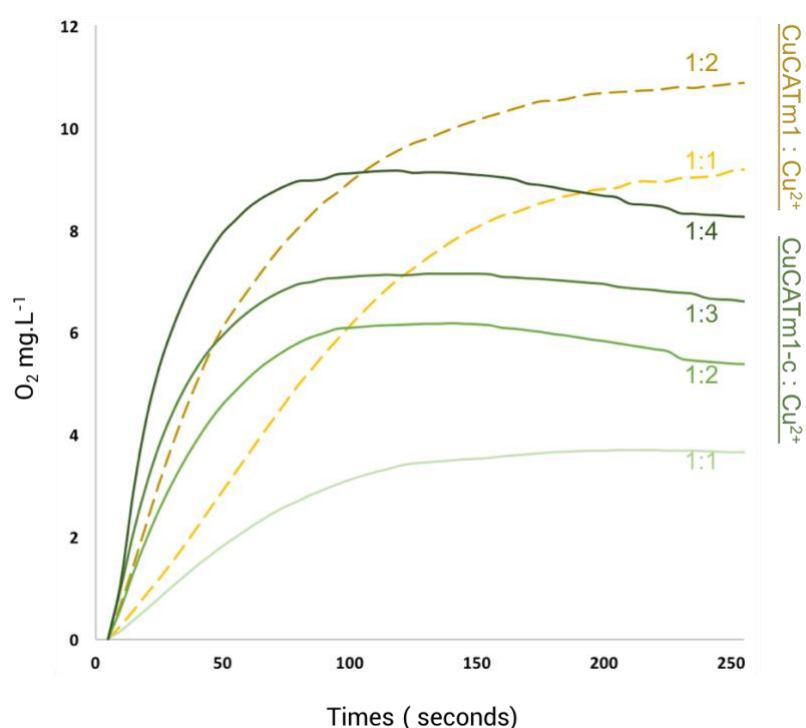


Figure 71. Suivi cinétique de la formation d'O₂ à l'aide d'une électrode de Clark des mélanges CuCATm1:Cu²⁺ (1 mM) et CuCATm1-c:Cu²⁺ (1 mM) à différents ratios.

- La vitesse initiale (v_0), le nombre de cycles (TON), la fréquence des cycles (TOF) et le rendement maximum de la réaction de dismutation d'H₂O₂ ont été déterminés et sont rapportés dans le
- *Tableau 18.* Les données obtenues sont en adéquation avec les résultats observés lors des expériences précédentes d'UV-vis et de dichroïsme circulaire:
- Pour une même concentration en peptide, il s'avère que les mélanges CATm1-c: Cu²⁺ 1 :3 et 1 :4 présentent une vitesse initiale 1,5 à 2 fois plus importante que le mélange

CuCATm1:Cu²⁺ 1:2 avec v_0 (CuCATm1-c: Cu²⁺ 1:4) = 2 v_0 (CuCATm1 : Cu²⁺ 1 :2). Ces résultats confirment que pour CuCATm1-c, les 2 segments peptiques (de part et d'autre du coude) se comportent de façon indépendante : pour un peptide CuCATm1-c, il y a deux peptides CuCATm1

- Dans le cas des mélanges CuCATm1-c:Cu²⁺, les TON mesurés sont du même ordre de grandeur que ceux observés pour le complexe CuCATm1 : Cu²⁺.

Tableau 18. Paramètres décrivant la catalyse de la dismutation de H₂O₂ dans MOPS (50 mM, pH 7,5, 25 °C) pour des mélanges CuCATm1-c:Cu²⁺ : les taux initiaux de formation d'O₂, le point final (quantité maximale d'O₂ formée), le TON (nombre de cycles), le rendement en O₂ et le TOF (fréquence des cycles). Les mesures ont été effectuées à différents ratio CuCATm1-c:Cu²⁺ pur une concentration en ligand de 1 mM

	v_0 (nM. s ⁻¹)	Point final ^a	TON	Rendement ^b (%)	TOF ^c (10 ⁻⁶ s ⁻¹)
CuCATm1 : Cu ²⁺ (1 mM)					
1 :2	4,49	343	0,34	13,7	4,49
CuCATm1-c : Cu ²⁺ (1 mM)					
1 :1	1,24	115	0,12	4,6	1,24
1 :2	3,79	193	0,19	7,7	3,79
1 :3	6,25	223	0,22	8,9	6,25
1 :4	8,94	286	0,29	11,5	8.94

^a (max, O₂ μM). ^b Rendement d'O₂. ^c basé sur le taux initial.

En conclusion, cette stratégie a très certainement conduit au développement d'un catalyseur constitué de deux complexes de cuivre bimétalliques CuCATm1:Cu²⁺ 1:2 indépendants et similaires.

III. Conception, synthèse et caractérisation des complexes peptidiques de seconde génération CuCATm1-(x) : Cu²⁺

Toujours pour améliorer la stabilité et l'activité de type catalase du catalyseur redox-actif, une seconde stratégie a été entreprise. Celle-ci est également basée sur la répétition de CuCATm1, néanmoins dans ce cas, il a été tenté de dupliquer, de manière non-palindromique, uniquement la séquence qui nous semblait être impliquée dans la complexation du premier

cuivre et que nous pensions être le site de meilleure affinité. Cette stratégie devrait théoriquement nous permettre d'obtenir un peptide capable de lier uniquement deux ions cuivres et obtenir un complexe peptide:Cu²⁺, possédant des constantes de dissociation K_{d1} et K_{d2} proches de la meilleure constante (K_{d1}) obtenue pour le complexe CuCATm1:Cu²⁺, c'est-à-dire de l'ordre de 10⁻⁹ M. Ainsi nous devrions obtenir un complexe CuCATm1-(x):Cu²⁺ 1:2 plus stable que CuCATm1:Cu²⁺ et potentiellement plus actif.

1) Conception des peptides de la seconde génération

1. *Détermination des acides aminés impliqués dans la complexation du premier cuivre*

Dans un premier temps, il a fallu identifier la séquence du peptide CuCATm1 impliquée dans la complexation du premier cuivre. Les essais de cristallisations du complexe n'ayant rien donné, nous nous sommes basés sur des données RPE, des observations en fluorescence et des données statistiques obtenues lors du test de sélection des hits.

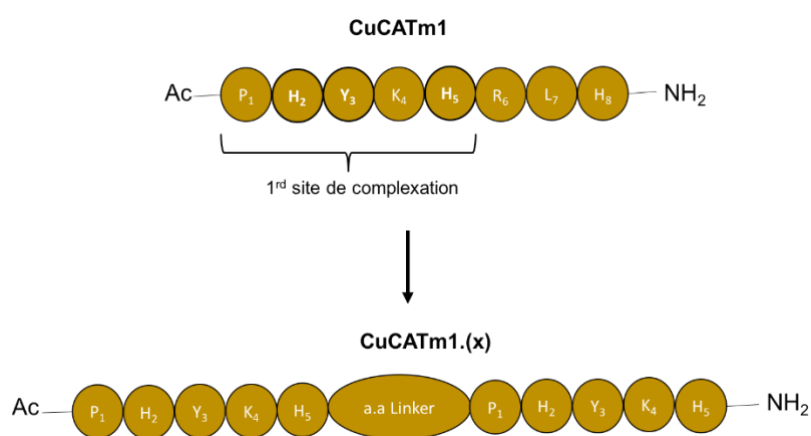


Figure 72. Conception des peptides de seconde génération : CuCATm1.(x)

L'histidine (2), la tyrosine (3) et l'arginine (6) du peptide CuCATm1 correspondent aux acides aminés qui ont été sélectionnés puisqu'il s'agit des positions variables de la librairie (Voir chapitre 2.II.4.1 P.72). D'après les études statistiques effectuées sur les complexes de cuivre(II) sélectionnés, l'histidine et la tyrosine sont présentes dans la moitié des complexes sélectionnés respectivement en position 2 et 3, tandis qu'aucune préférence n'est observée pour l'acide aminé en position 6 (Voir Voir chapitre 2.II.4.1 p.75). Nous pouvons donc penser que l'histidine (2) et la tyrosine (3) sont affectées et/ou impliquées dans la complexation du cuivre, contrairement à l'arginine (6).

De plus, le titrage du peptide par du cuivre lors d'expériences par spectroscopie de fluorescence montre un quenching de la fluorescence de la tyrosine dès les premiers ajouts de cuivre(II), ce qui suggère la participation ou la proximité de cet acide aminé avec le premier site de fixation de cuivre (Figure 73). Un quenching quasi-total est observé après l'ajout de deux équivalents.

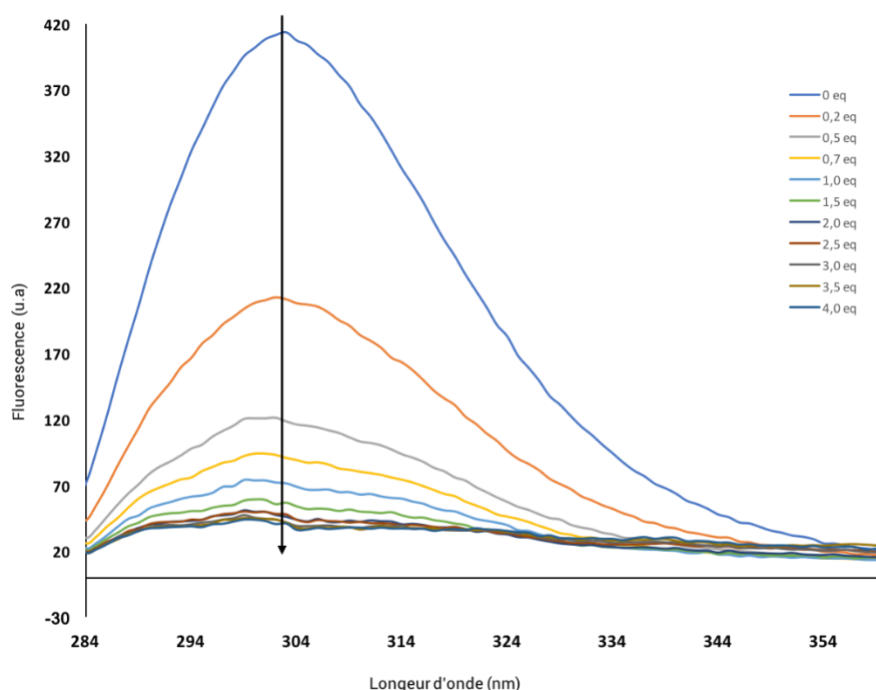


Figure 73. Spectres d'émission de la tyrosine de CuCATm1 (10 μ M) lors d'ajouts de Cu^{2+} dans du MOPS (50 mM, pH 7,5), équivalents indiqués en légende. Excitation effectuée à 275 nm.

Le peptide CuCATm1 provient de la bibliothèque JRF1 basée sur plusieurs séquences polyhistidine, dont la séquence $\text{H}(\text{ZZH})_n$ identifiée comme une séquence fournissant aux peptides une très bonne constante d'affinité pour le cuivre. De plus, les paramètres obtenus par l'analyse du spectre RPE, nous informent d'une potentielle sphère de coordination de type Imidazoyle N_4 .^{174,175} Il est donc probable que l'histidine (5) soit également impliquée dans la coordination du premier cuivre.

Ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse que le premier cuivre se fixe au groupement imidazole des histidines (en position 2 et 5) et à deux amidates du squelette peptidique ou un amidate et un phénolate. Ainsi, la séquence $\text{P}_1\text{H}_2\text{Y}_3\text{K}_4\text{H}_5$ a été suggérée comme site de complexation du premier cation cuivre. Les acides aminés de la seconde

génération de peptide (CuCATm1.(x)) ont donc été basés sur la duplication de cette séquence (Figure 72).

2. Évaluation de l'intérêt de la lysine dans la stabilité et l'activité catalase du complexe CATm1:Cu

Par la suite, nous nous sommes posés la question du rôle de la lysine (4). La lysine est un acide aminé qui possède une amine primaire protonée à pH physiologique et qui n'est a priori par coordonnante. De plus, la longue chaîne latérale de cet acide aminé encombre peut-être le site de coordination et peut ainsi potentiellement diminuer l'affinité du peptide pour le métal. Afin de déterminer la nécessité ou non de conserver la lysine, il a été décidé de synthétiser et caractériser un nouveau peptide en remplaçant la lysine par une alanine : Ac-P₁H₂Y₃**A**₄H₅R₆L₇H₈-NH₂, nommé **CuCATm1.Ala**. L'alanine de par sa petite taille et sa chaîne latérale non chargée n'interviendra pas dans complexation et est ainsi l'acide aminé de substitution de choix.^{240,241}

Caractérisation du peptide CATm1-Ala par dichroïsme circulaire et ITC

Le peptide CuCATm1-Ala a été caractérisé par dichroïsme circulaire dans le MOPS à pH 7,5 (Figure 74). Comme dans le cas de ses homologues, le titrage du peptide par une solution de Cu(OAc)₂ conduit à l'augmentation des bandes à 230 nm et à 260 nm. Un plateau est atteint après l'ajout de 2 équivalents de cuivre, ce qui indique que CuCATm1-Ala est également capable de lier deux cations métalliques. Néanmoins, les données obtenues par l'expérience de compétition par spectroscopie UV-visible et les données issues de l'expérience d'ITC (Figure 74) tendent à suggérer que la substitution de la lysine par l'alanine en position 4 permet l'obtention d'un peptide CuCATm1-Ala plus affin pour le cuivre que le peptide CuCATm1. En effet, nous obtenons par l'expérience de compétition avec le ligand Baba et par ITC des constantes de dissociation K_{d1} et K_{d2} respectivement de 5.0 10⁻¹¹ M et 9.75 10⁻⁵ M (pour CuCATm1, K_{d1} de 2.3 10⁻⁹ et K_{d2} de 8.3 10⁻⁵). Ces données sont à nouveau à prendre avec précaution car nous avons vu avec CuCATm1 que ces expériences montraient des biais importants. En effet, la valeur K_{d1} est correcte uniquement si le deuxième site de coordination à une constante d'association beaucoup plus faible avec Cu²⁺ que le premier, ce qui n'est pas le cas pour CuCATm1. De plus la modélisation de la courbe d'ITC conduit à nouveau à une stoechiométrie aberrante de 0,171 Cu par ligand. Compte tenu du fait que ces constantes de

dissociation sont globalement plus faibles, il est tout de même raisonnable de penser que l'affinité pour les cations a été améliorée.

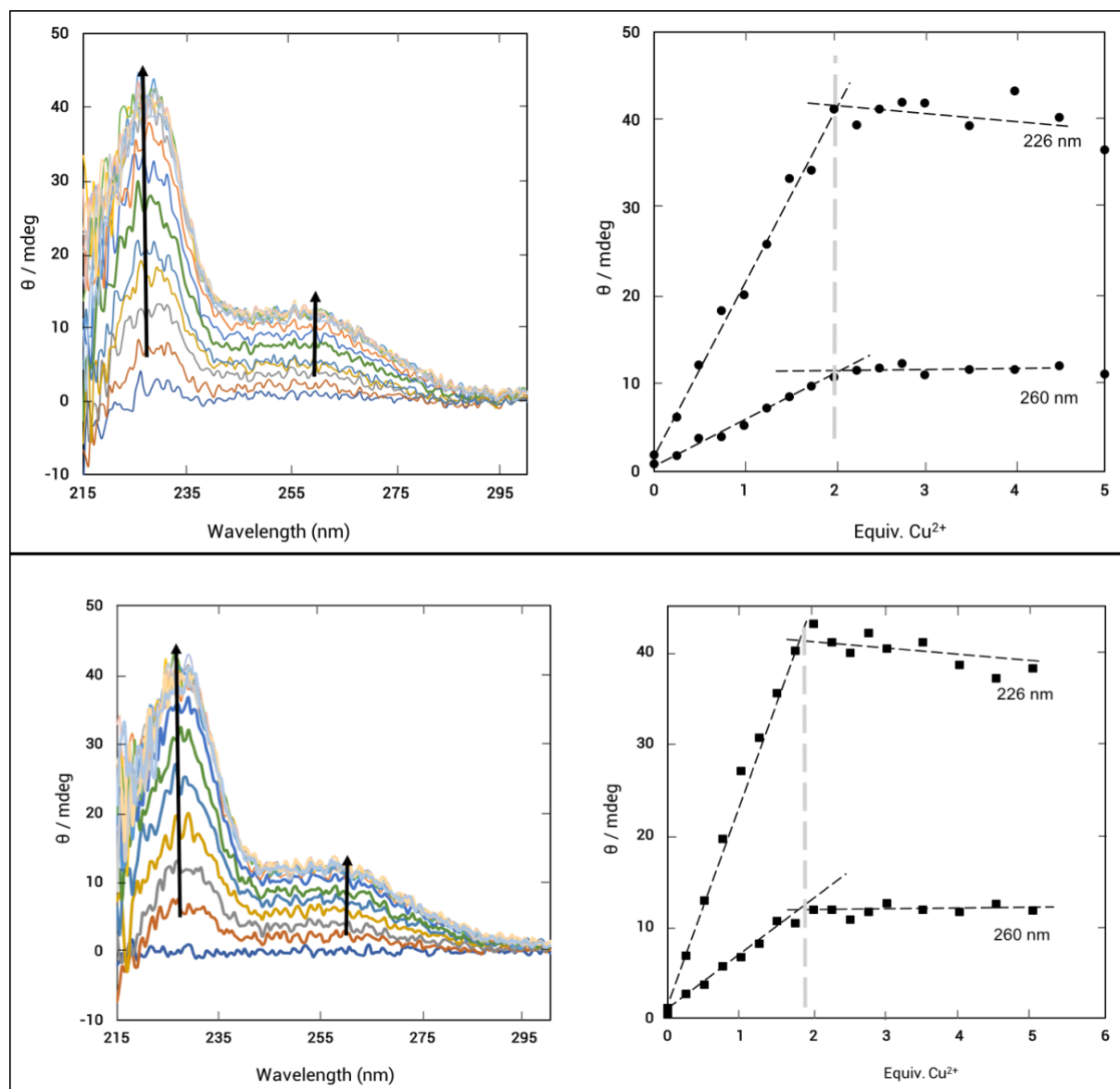


Figure 74. Titration de CuCATm1-Ala avec CuSO_4 (haut) ou $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (bas) par dichroïsme circulaire dans un tampon MOPS (50 mM, pH 7,5, 25 °C), $[\text{CuCATm1-Ala}] = 400 \mu\text{M}$. Les courbes de droite montrent l'évolution des deux maxima à 226 et 260 nm lors de l'addition de Cu^{2+} . Le plateau est atteint autour de 2 équivalents de Cu^{2+}

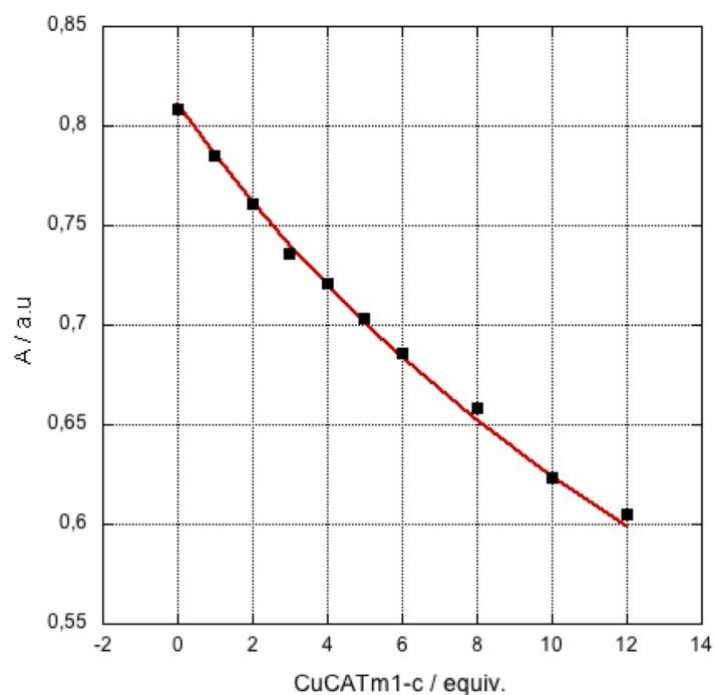


Figure 75. Suivi par spectrophotométrie UV-vis de l'expérience de compétition de CuCATm1-c avec Baba-Cu ($[Baba] = 50 \mu M$ et $[Cu(OAc)_2] = 45$) dans l'HEPES (50 mM, pH 7,5). La ligne rouge représente la courbe modélisée (équation chapitre 2.III.3.1 p88) qui se superpose le mieux et conduisant à la détermination d'une constante apparente de $5,0 \cdot 10^{-11}$

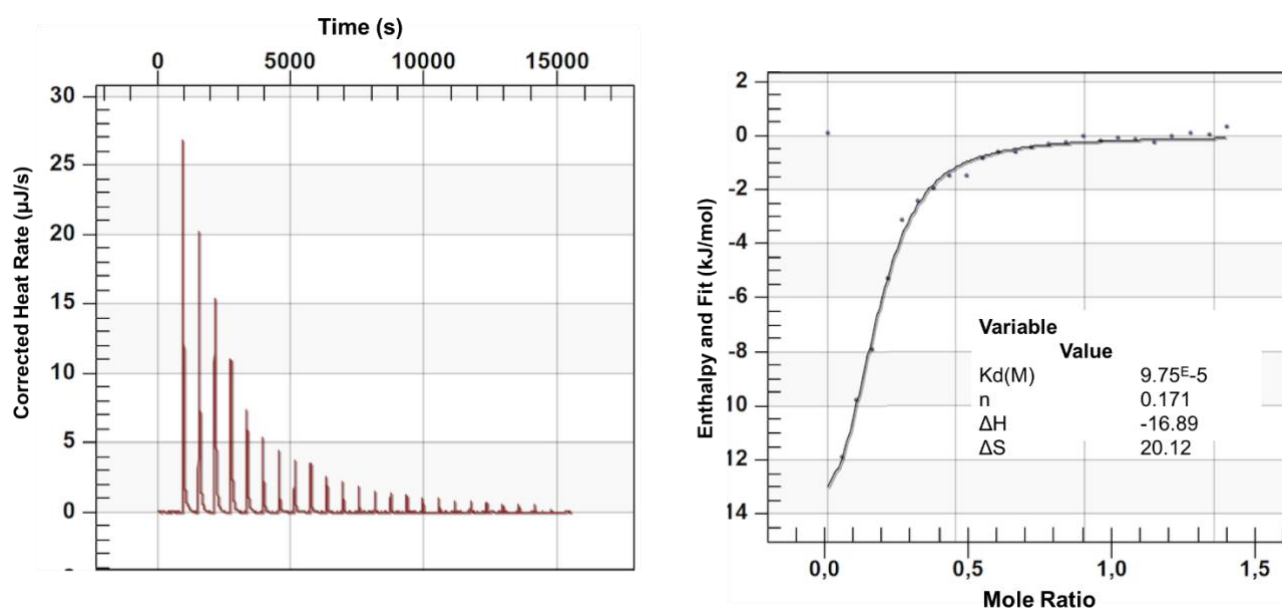


Figure 76. Thermogrammes obtenus lors de l'ajout de $Cu(OAc)_2$ à CuCATm1-Ala:Cu²⁺ 1:1 à 2 mM (gauche) et l'isotherme de liaison ajustée correspondante en utilisant le logiciel fourni par le fabricant (droite). L'expérience a été réalisée à pH 7,5 dans du tampon MOPS (50 mM) et à 25° C.

Évaluation de l'activité catalase du complexe CuCATm1.Ala : Cu²⁺ par polarographie

Afin de mesurer l'impact de cette potentielle amélioration de l'affinité sur l'activité catalase du complexe CuCATm1.Ala:Cu²⁺ 1:2, l'activité catalytique a été évaluée en utilisant une électrode de Clark dans le MOPS à pH 7,5.

Tableau 19. Tableau comparatif des paramètres décrivant la catalyse de la dismutation de H₂O₂ dans MOPS (50 mM, pH 7,5, 25 °C) pour les mélanges CuCATm1: Cu et CuCATm1.Ala:Cu : k_{cat} , les taux initiaux de formation d'O₂, le point final (quantité maximale d'O₂ formé), la TON (nombre de cycles), le rendement en O₂ et le TOF (fréquence des cycles).

	k_{cat} (M. ¹ . s ⁻¹)	v_0 (nM. s ⁻¹)	Point final ^a	TON	Rendement ^b (%)	TOF ^c (10 ⁻⁶ s ⁻¹)
CuCATm1:Cu (200μM)						
1:1	2,1	0,26	141	2,8	5,5	5,1
1:2	8,9	1,02	262	1,3	10,5	76,4
CuCATm1.Ala:Cu (200μM)						
1:1	1,8	0,91	164	0,8	6,6	4,6
1:2	2,5	2,28	282	1,4	11,2	11,4

^a (max, O₂ μM). ^b Rendement d'O₂. ^c basé sur le taux initial

La formation de dioxygène a été suivie pour le mélange CuCATm1.Ala:Cu²⁺ aux ratios 1:1 et 1:2. Des constantes catalytiques de 1,8 et 2,5 M.¹.s⁻¹ ont été respectivement mesurées pour CuCATm1.Ala:Cu²⁺ aux ratios 1:1 et 1:2. Le k_{cat} et le TOF mesurés pour le ratio CuCATm1.Ala-Cu²⁺ 1:2 sont respectivement 3,5 fois et 6 fois moins bons que ceux observés pour CuCATm1-Cu²⁺ 1:2. Il s'avère donc que la substitution de la lysine par l'alanine a pour conséquence la diminution de l'activité catalase du complexe (Tableau 19). Cette diminution de l'activité peut s'expliquer par une diminution de la solubilité du peptide en l'absence de la lysine car la lysine possède un pKa de 10,2 et est chargée positivement (NH₃⁺) à pH physiologique. En effet, lors du test d'activité, la formation d'un précipité a été observée et l'expérience s'est avérée être peu reproductible, empêchant l'obtention d'une constante cinétique k_{obs} fiable. Il a donc été décidé de conserver la lysine pour la conception des peptides de seconde génération CuCATm1.(x).

3. Le Choix des espaceurs

Quatre peptides dits de seconde génération ont été conçus et synthétisés en dupliquant la séquence PHYKH. Plusieurs espaceurs ont été envisagés (Figure 77).

- Le peptide CuCATm1.1 correspond au peptide sans espaceur.
- Dans le cas des peptides CuCATm1.2 et CuCATm1.3, les séquences sont séparées respectivement d'une et deux glycines.
- Enfin, dans le cas du peptide CuCATm1.4, les séquences sont séparées de deux glycines, en omettant la proline dans la seconde séquence répliquée. Ceci nous permettra d'évaluer la nécessité d'avoir un coude dans la structure du peptide puisque comme évoqué précédemment, les enchainements PG favorisent la formation de coude.²³³

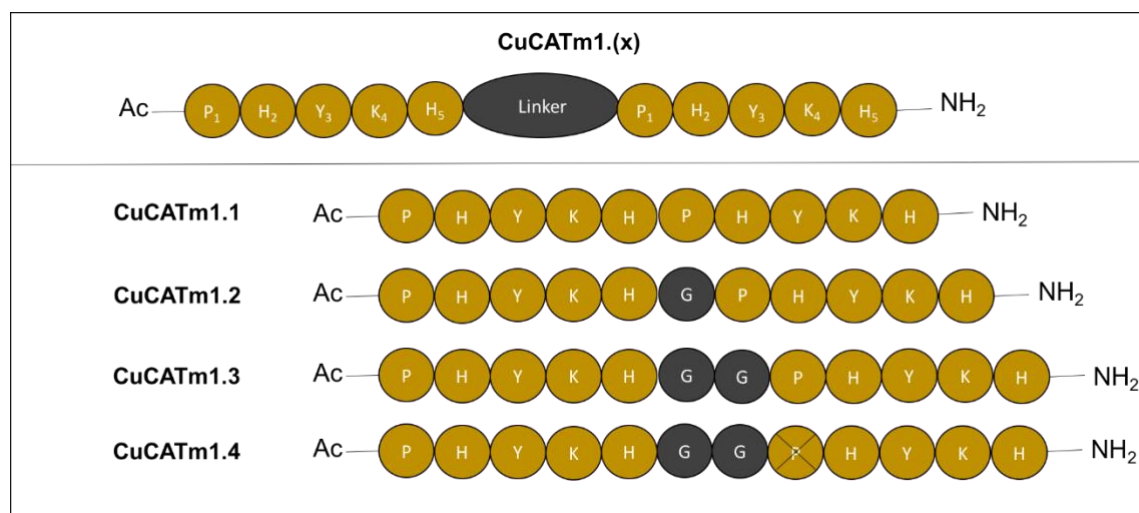


Figure 77. Séquences des peptides de seconde génération CuCATm1.(x) basées sur la répétition de la séquence PHYKH, identifiée comme premier site de complexation au cuivre du peptide CuCATm1.

2) Caractérisation et analyse de l'activité catalase des complexes de la seconde génération

1. Préparation des peptides de seconde génération

Les quatre peptides de la seconde génération CuCATm1.(x) ont été synthétisés (0,2 mmol/peptide) sur une résine MBHA (0,68 mmol/g) et ont été préparés avec l'amine terminale acétylée et sous la forme carboxamide. Ils ont par la suite été purifiés par HPLC et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La concentration des solutions stock de

peptides a été mesurée par spectrophotométrie UV-visible en utilisant la valeur du coefficient d'extinction molaire de la tyrosine décrit dans la littérature.^{166,238}

2. Analyse de l'activité catalase des complexes CuCATm1.1 ; CuCATm1.2 / CuCATm1.3 / CuCATm1.4

L'activité catalase des complexes de seconde génération CuCATm1.(x):Cu²⁺ a été évaluée par polarographie dans le MOPS à pH 7,5.

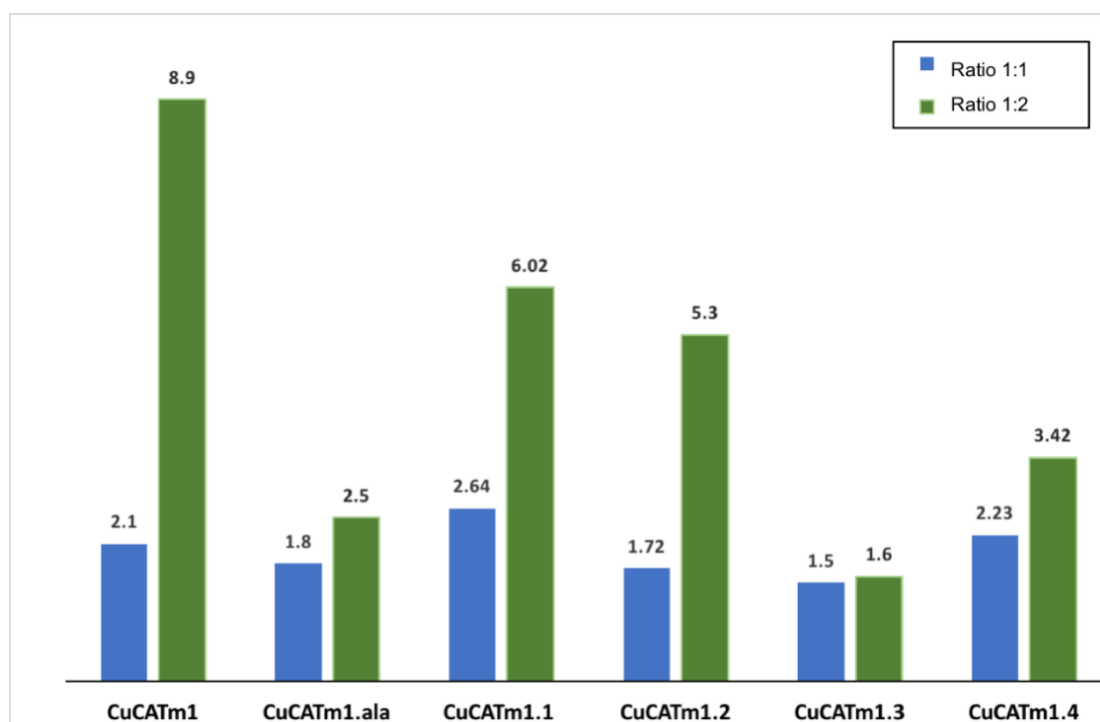


Figure 78. Constante cinétique k_{cat} ($M^{-1} s^{-1}$) déterminées pour les peptides de la seconde génération pour des mélanges à des ratios CuCATm1.x: Cu²⁺ de 1:1 et 1:2 (50, 100, 150, 200 et 250 μM) dans le MOPS à pH 7,5.

Il s'est avéré être très compliqué d'obtenir des résultats reproductibles, notamment pour le complexe CuCATm1.1:Cu²⁺. De plus, les quatre peptides de la seconde génération semblent donner des complexes qui possèdent des constantes cinétiques k_{cat} plus faibles que celles observées pour le peptide parent CuCATm1. Néanmoins le TON et le TOF du mélange CuCATm1.1:Cu²⁺ 1:2 sont respectivement 1,2 et 2 fois plus importants que ceux mesurés pour les complexes CuCATm1:Cu²⁺ 1:2 dans les mêmes conditions de réaction. Ainsi, il est intéressant d'évaluer la stabilité des complexes de seconde génération. En effet, une stabilité plus importante pour ces espèces au ratio 1:2 par rapport au complexe CuCATm1:Cu²⁺ pourrait être intéressante puisque que les espèces réactives pourraient exister plus

longtemps, et conduire ainsi à une meilleure activité antioxydante, en particulier dans les systèmes cellulaires.

Tableau 20. Tableau comparatif des paramètres décrivant la catalyse de la dismutation de H_2O_2 dans MOPS (50 mM, pH 7,5, 25 °C) par les peptides de seconde génération et le peptide parent (CuCATm1) au ratio peptide: Cu^{2+} de 1:2 : k_{cat} , les taux initiaux de formation d' O_2 , le point final (quantité maximale d' O_2 formée), la TON (nombre de cycles), le rendement en O_2 et le TOF (fréquence des rotation).

Complexe 1:2 (50 μ M)	k_{cat} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	v_0 (nM. s^{-1})	Point final ^a	TON	Rendement ^b (%)	TOF ^c ($10^{-6} s^{-1}$)
CuCATm1	8,9	0,36	168	3,4	6,7	7,2
CuCATm1.1	6,02	0,73	206	4,1	8,3	14,7
CuCATm1.2	5,3	0,35	134	2,7	5,4	7
CuCATm1.3*	1,6	0,50	172	3,4	6,9	10
CuCATm1.4	3,42	0,39	214	4,3	8,6	7,7

3. Caractérisation des peptides de seconde génération par spectroscopie de fluorescence.

Afin de réaliser une étude systématique des différents complexes issus des peptides de seconde génération, nous avons mis au point une expérience par spectroscopie de fluorescence, qui est une technique facile à mettre en œuvre et rapide. Nous avons donc réalisé des expériences de titrage en regardant l'extinction de fluorescence de la tyrosine induite par la présence de cuivre(II) ([partie expérimentale voir « Titration by fluorescence » p. 175](#)).

En effet, le peptide CuCATm1 et les peptides CuCATm1.(x) possèdent respectivement une ou deux tyrosines dans leur séquence qui émettent à 303 nm après excitation à 275 nm. L'ajout d'acétate de cuivre(II), conduit à la formation de complexes CuCATm1.(x): Cu^{2+} . Du fait de son caractère paramagnétique, le cuivre(II) peut induire un quenching de la fluorescence de la tyrosine et donc une diminution de l'intensité de la bande d'émission. Le suivi de l'intensité de fluorescence en fonction de l'ajout de cuivre(II) permet d'obtenir des informations quant à la stœchiométrie des complexes et éventuellement de déterminer les constantes de dissociation des complexes.

Afin de pouvoir comparer la stabilité des complexes de la seconde génération avec celle du complexe CuCATm1.Cu²⁺, les expériences de titrations par fluorescence ont été mises au point pour CuCATm1 puis réalisées pour les peptides de la seconde génération : CuCATm1-c, CuCATm1.1, CuCATm1.2, CuCATm1.3, CuCATm1.4.

- **Effets cinétiques :**

Lors de ces expériences, du cuivre(II) CuSO₄ a été ajouté successivement aux solutions peptidiques (10 μM) et après chaque ajout, le spectre de fluorescence a été enregistré. Ces expériences ont été réalisées dans le MOPS (50 mM à pH 7,5 et pH 7) à 25 °C. Nous avons rapporté pour chaque expérience des courbes montrant l'évolution de l'absorbance à 330 nm en fonction de l'équivalent de cuivre ajouté. Afin de déterminer les constantes apparentes d'association des deux sites de coordination, nous avons tenté de modéliser les courbes obtenues en utilisant le programme MatLab et les équations décrits par Thordarson.²⁴²

Pour tous les peptides, les courbes n'ont pas pu être modélisées en considérant des complexes peptide:Cu²⁺ 1:2. En effet, soit les courbes théoriques se superposaient très mal avec les courbes expérimentales, soit les valeurs obtenues pour les constantes étaient aberrantes. La **Figure 79** illustre cela pour le peptide CuCATm1 et le peptide CuCATm1.2. La modélisation n'a pas abouti dans le cas des complexes CuCATm1.1:Cu²⁺ et CuCATm1.3:Cu²⁺. Dans le cas de CuCATm1.2:Cu²⁺, la constante d'association apparente calculée par la modélisation fournie des valeurs de $K_{ass1} = 2.1 \cdot 10^6$ et $K_{ass2} = -1.06 \cdot 10^4$. Il est aberrant d'obtenir une valeur négative pour une constante d'association. L'impossibilité de modéliser les courbes de titrage des complexes CuCATm1.1:Cu²⁺ et CuCATm1.3:Cu²⁺ et le résultat non pertinent dans le cas de la modélisation pour CuCATm1.2:Cu²⁺ indiquent que les complexes de la seconde génération ne suivent pas un système de coordination d'un peptide pour deux cuivres dans ces conditions expérimentales.

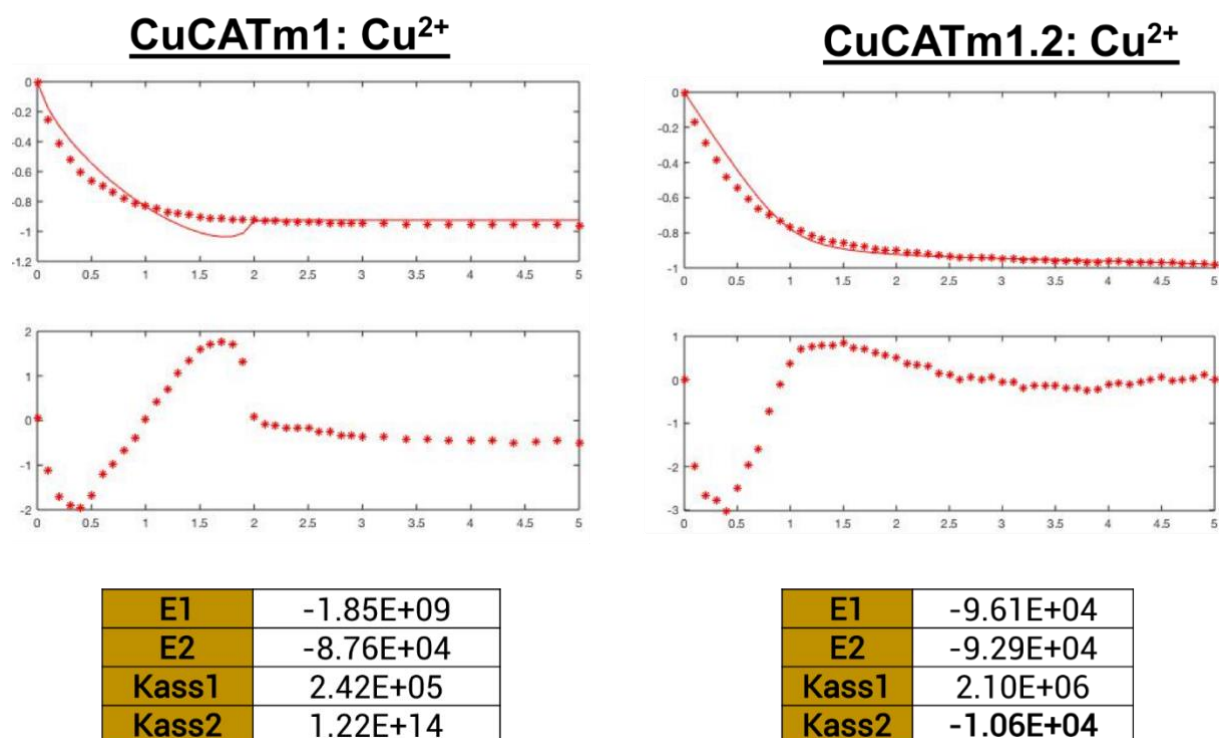
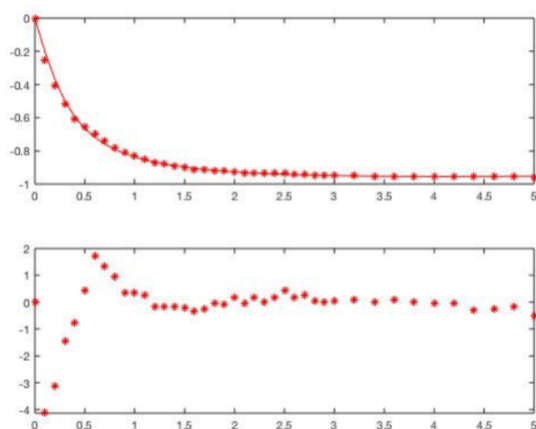


Figure 79. (Courbes du Haut) Titrage des peptides CuCATm1 = 10 μM (gauche) et CuCATm1.2 = 10 μM (droite) par du Cu²⁺ suivi par spectrométrie de fluorescence dans le MOPS (50 mM, pH 7,5). Les points rouges correspondent aux valeurs expérimentales et la ligne rouge représente la courbe modélisée pour un complexe **peptide:Cu 1:2** qui se superpose le mieux et conduisant à l'obtention de valeurs pour les constantes d'associations apparentes. Les courbes du bas représentent l'erreur entre les points expérimentaux et les points de la courbe modélisée.²⁴³ Dans le tableau, sont rapportés les paramètres de la modélisation où E1 et E2 correspondent respectivement à la différence entre le coefficient de fluorescence du complexe peptide:Cu²⁺ 1:1 et celui du peptide seul ($\Phi_{LCu} - \Phi_L$) et à la différence entre le coefficient de fluorescence du complexe peptide:Cu²⁺ 1:2 et celui du peptide seul ($\Phi_{LCu2} - \Phi_L$).

Les modélisations selon un modèle peptide:Cu²⁺ 1:2 n'ayant pas été concluantes, nous avons décidé de modéliser les courbes en utilisant un modèle peptide:Cu²⁺ 2:1. En effet, il semblerait qu'une rupture de pente soit visible à 0,5 équivalent. Des courbes théoriques se superposant convenablement avec les courbes expérimentales ont pu être obtenues, excepté pour CuCATm1.1 (**Figure 80**). Néanmoins des valeurs aberrantes ont été obtenues pour CuCATm1. Il semblerait, d'après ces résultats, que des complexes peptide:Cu²⁺ 2:1 soient formés avec les peptides de seconde génération. Cependant, pour obtenir des résultats fiables, il serait nécessaire de travailler à une plus faible concentration en ligand afin d'avoir un mélange d'espèces lorsque le complexe 2:1 est formé et ainsi obtenir des courbes plus « arrondies ». Cependant, le rendement quantique de la tyrosine étant relativement faible, il est difficile de diminuer la concentration des peptides. C'est pourquoi des expériences de

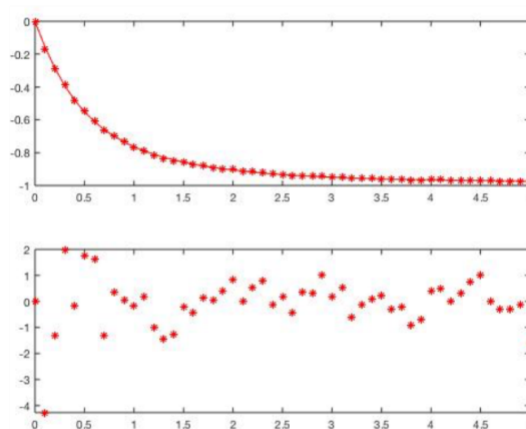
compétition ont d'abord été entreprises pour CuCATm1.1. Ces expériences ont été inspirées du travail de Christelle Hureau²⁴⁴ qui utilise la glycine comme compétiteur pour la complexation du cuivre(II).

CuCATm1: Cu²⁺



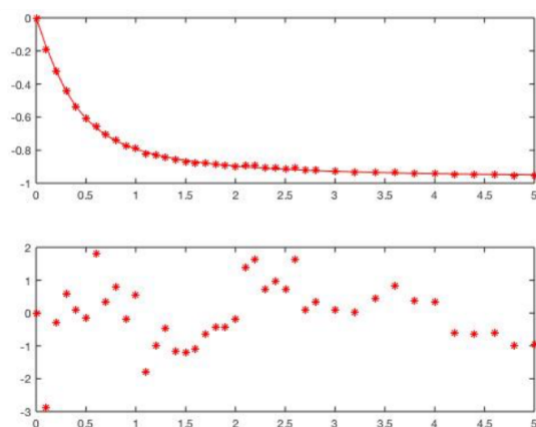
E1	-4.11E+09
E2	-1.12E+05
Kass1	9.41E-01
Kass2	1.64E+11

CuCATm1.2: Cu²⁺



E1	-9.26E+04
E2	-1.64E+05
Kass1	1.09E+05
Kass2	1.44E+05

CuCATm1.3: Cu²⁺



E1	9.24E+04
E2	-1.21E+05
Kass1	1.30E+05
Kass2	4.05E+05

Figure 80. Titration des peptides CuCATm1 = 10 μ M (haut-gauche), CuCATm1.2 = 10 μ M (haut-droite) et CuCATm1.3 = 10 μ M (bas) par Cu²⁺ suivi par spectroscopie de fluorescence dans le MOPS (50 mM, pH 7,5). (Courbes du Haut) Les points rouges correspondent aux valeurs expérimentales et la courbe rouge représente la courbe modélisée pour un complexe **peptide:Cu 2:1** qui se superpose le mieux et conduisant à l'obtention de valeurs pour les constantes d'associations apparentes. Les courbes du bas représentent l'erreur entre les points expérimentaux et les points de la courbe modélisée. Dans le tableau, sont rapportés les paramètres de la modélisation où E1 et E2 correspondent respectivement à la différence entre le coefficient de fluorescence du complexe peptide:Cu²⁺ 1:1 et celui du peptide seul ($\Phi_{\text{Cu}} - \Phi_{\text{L}}$) et à la différence entre le coefficient de fluorescence du complexe peptide:Cu²⁺ 2:1 et celui du peptide seul ($\Phi_{\text{L2Cu}} - \Phi_{\text{L}}$).

La glycine est un faible compétiteur dont la constante d'association avec Cu^{2+} est connue. Cette expérience de compétition consiste à ajouter successivement du Cu^{2+} dans une solution peptidique de CATm1.1 en présence de différentes concentrations de glycine. Le peptide va rentrer en compétition avec la glycine pour la complexation de cuivre. On peut ainsi obtenir la constante d'association apparente de CATm1.1: Cu^{2+} en présence de concentrations connues du compétiteur.

Lors de ces expériences, du cuivre(II) a été ajouté successivement dans la solution de CuCATm1.1 (10 μM) en présence de 0,4 ; 2 ; 4 ou 8 mM de glycine dans du MOPS (50 mM, pH 7,5) à 25°C. La **Figure 81** représente les courbes montrant l'évolution de l'absorbance à 330 nm en fonction des ajouts de Cu^{2+} à différentes concentrations de glycine. Plus la concentration de glycine est importante, moins le cuivre(II) ajouté se complexe au peptide et moins le quenching est important.

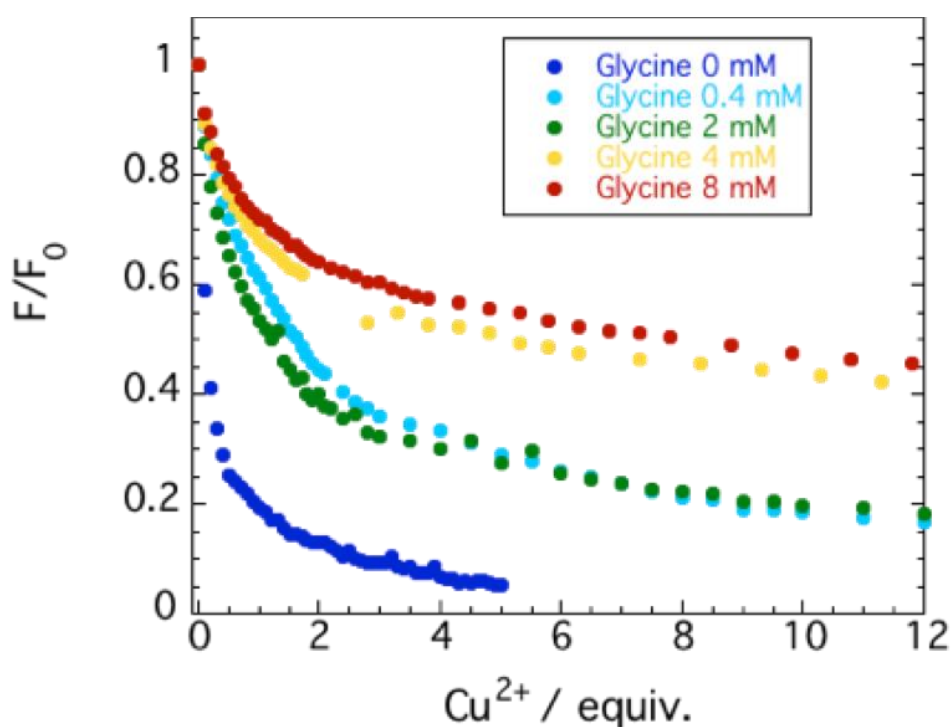


Figure 81. Titration fluorescence de CATm1.1 par l'ajout de cuivre(II) suivi par fluorescence, $[\text{CATm1.1}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{MOPS}] = 50 \text{ mM}$, pH 7,5, en présence de diverses concentrations de glycine, $[\text{Gly}] = 0$ (bleu foncé), 0,4 (bleu clair), 2 (vert), 4 (jaune) et 8 mM (rouge).

A nouveau, les courbes obtenues n'ont pu être modélisées que pour un modèle peptide: Cu^{2+} 2:1 et les valeurs sont rapportées dans le **Tableau 21**. Cependant, la modélisation de ces courbes, bien qu'elle semble correcte, conduit à des valeurs aberrantes puisqu'une très faible

valeur de K_{ass1} a été obtenue alors que la pente de la courbe est très importante au début du titrage.

Le fait de ne pas pouvoir modéliser correctement ces courbes ainsi que l'observation d'un événement à 0,5 équivalent pour CuCATm1, suggérant la présence d'un complexe peptide: Cu^{2+} 2:1, sont contradictoires avec ce que nous avons observé précédemment dans le cas du complexe CuCATm1: Cu^{2+} où un complexe 1:2 a clairement été mis en évidence. Il est donc très probable que l'équilibre thermodynamique n'ait pas été atteint après chaque ajout de cuivre lors de titrages.

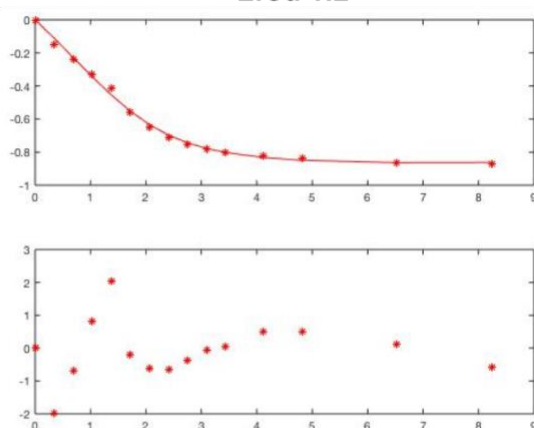
Il a donc été décidé de répéter les titrages en attendant d'avoir atteint l'équilibre thermodynamique après chaque ajout de cuivre(II). Cet équilibre s'est avéré être assez lent et est atteint après environ 30 min pour chaque ajout de 0,25 eq de Cu(II) . Les titrages ont été réalisés pour chaque peptide à une concentration d'approximativement 20 μ M (**Figure 82**).

Tableau 21. Valeur des constantes d'association obtenues par modélisation en présence de diverses concentrations de glycine pour un modèle peptide: Cu^{2+} 2:1.

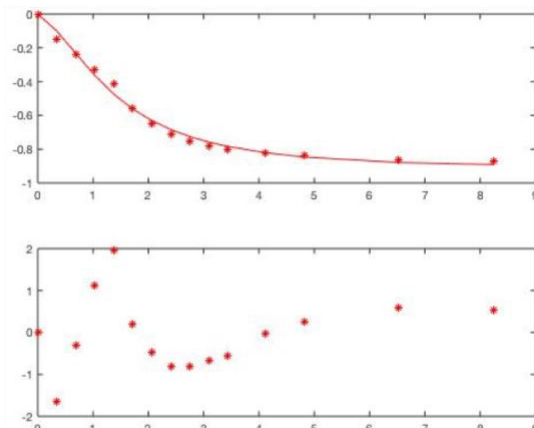
	Peptide:Cu 2:1			
Glycine (mM)	0.4	2	4	8
E1	-1.39E+07	-3.93E+06	-9.52E+07	-1.66E+08
E2	-9.78E+04	-9.58E+04	-5.21E+04	-3.98E+04
Kass1	2.29E+01	7.55E+00	9.09E+00	9.09E+00
Kass2	3.07E+08	1.79E+09	2.42E+09	3.44E+09

CuCATm1: Cu²⁺

L:Cu 1:2



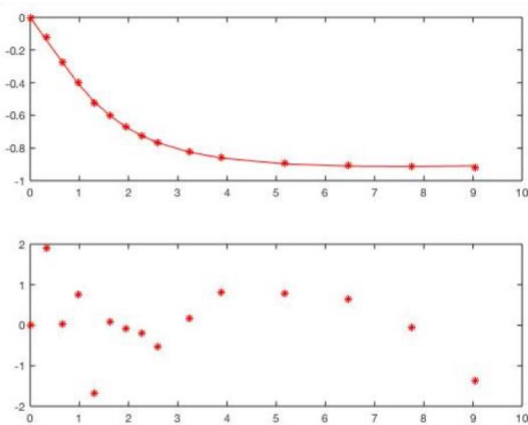
L:Cu 2:1



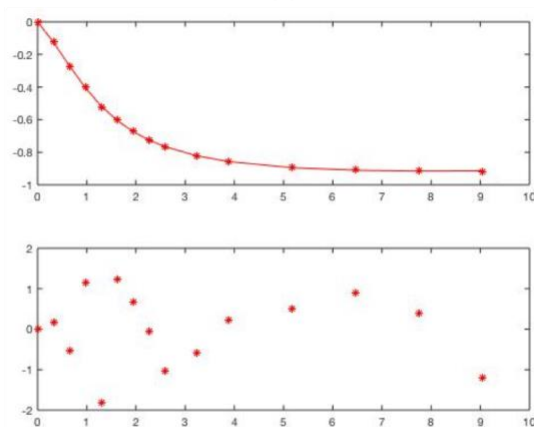
E1	-3.34E+04	-7.22E+04
E2	-6.83E+04	7.86E+08
Kass1	7.43E+05	1.80E+05
Kass2	9.99E+04	2.48E+04

CuCATm1.1: Cu²⁺

L:Cu 1:2

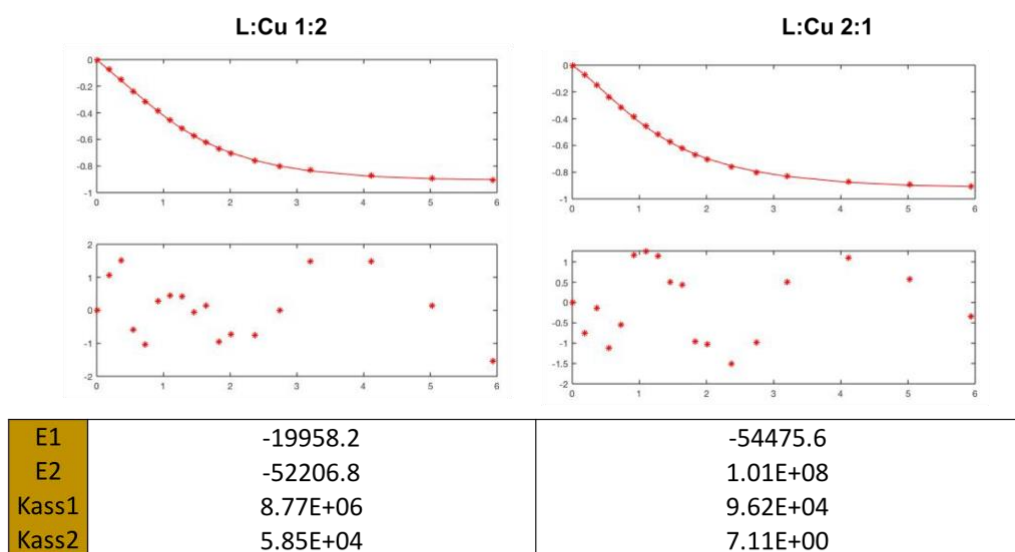


L:Cu 2:1

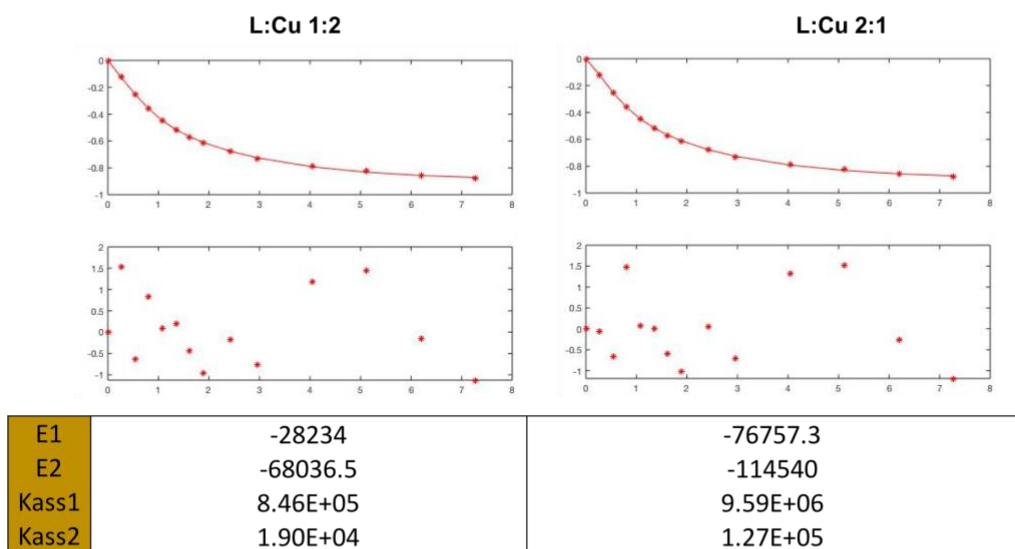


E1	-27422.3	-73862.9
E2	-72422.3	767581
Kass1	8.04E+07	1.43E+05
Kass2	7.32E+04	1.80E+03

CuCATm1.2: Cu²⁺



CuCATm1.3: Cu²⁺



CuCATm1.4: Cu²⁺

E1	-76757.3	-111813
E2	-114540	-1.96E+09
Kass1	9.59E+06	5.46E+05
Kass2	1.27E+05	-5.95E-01

Figure 82. Titration des peptides CuCATm1= 10 μ M , CuCATm1.1=10 μ M , CuCATm1.2 = 10 μ M et CuCATm1.3 = 10 μ M par du Cu²⁺ suivi par spectrométrie de fluorescence dans le MOPS (50 mM, pH 7,5). (Courbes du Haut) Les points rouges correspondent aux valeurs expérimentales et la ligne rouge représente la courbe modélisée pour un complexe **peptide:Cu 1:2** et **peptide:Cu 2:1** qui se superpose le mieux et conduisant à l'obtention de valeurs pour les constantes d'associations apparentes. Les courbes du bas représentent l'erreur entre les points expérimentaux et les points de la courbe modélisée.

Contrairement aux titrages réalisés précédemment, chaque courbe obtenue a pu être modélisée pour un système Peptide:Cu 1:2. Les constantes d'association apparentes Ka_{app} ont pu être obtenues et sont cohérentes. Il est à noter que ces courbes ont également pu être modélisées pour des systèmes peptide:Cu²⁺ 2:1. Dans ce cas, pour tous les peptides, les valeurs E2 correspondant à la différence entre le coefficient de fluorescence entre les complexes peptide:Cu²⁺ 2:1 et celui des peptides seuls sont positives ($\Phi_{L2Cu} - \Phi_L$), ce qui est incompatible avec le fait qu'une extinction de fluorescence est observée. Ces dernières modélisations ne rendent donc pas compte de ce qui est observé, suggérant que nous ne sommes pas dans une situation où les complexes peptide:Cu 2:1 sont majoritairement présents (Figure 82).

Cependant, pour CuCATm1, le modèle peptide:Cu²⁺ 2:1 conduit à des constantes mesurées très en deçà de celles mesurées par spectrométrie de masse. Compte tenu du fait que les mesures par spectrométrie de masse ont été réalisées dans le formiate d'ammonium, les constantes d'association ont été recalculées (Tableau 4) pour donner des constantes conditionnelles en prenant en compte la compétition avec le MOPS qui est décrit pour conduire à la formation de complexes LCu avec le cuivre(II).¹⁶⁷ Ces constantes conditionnelles ont été calculées en utilisant l'équation suivante :

$$Ka_{cond} = Ka_{app} \times \left(1 + \frac{[MOPS]_0}{Kd_{MOPS}(1 + 10^{-pH + pKa^{MOPS}})}\right) \quad (\text{Équation 14})$$

Où Ka_{cond} , est la constante d'association conditionnelle, Ka_{app} est la constante issue de la modélisation, Kd_{MOPS} est la constante de dissociation du complexe MOPS:Cu²⁺ 1:1 issue de la littérature et pKa^{MOPS} est le pKa du MOPS.

Tableau 22. Constantes d'associations (Ka_{cond}) et de dissociations (Kd_{cond}) corrigées de la contribution du tampon MOPS pour les deux sites de complexation du cuivre des peptides de seconde génération ($10\mu M$) et de CuCATm1 ($10\mu M$) à partir des constantes d'association apparentes (Ka_{app}) obtenues par modélisation des courbes de titrage par fluorescence pour des modèles L:Cu 1:2.

Modélisation L:Cu 1:2				
		Ka_{app}	Ka_{cond}	Kd_{cond}
CuCATm1	1 ^{er} site	$7.43 \cdot 10^5$	$2.58 \cdot 10^8$	$3.88 \cdot 10^{-9}$
	2 nd site	$9.99 \cdot 10^4$	$3.46 \cdot 10^7$	$2.89 \cdot 10^{-8}$
CuCATm1.1	1 ^{er} site	$8.04 \cdot 10^7$	$2.79 \cdot 10^{10}$	$3.59 \cdot 10^{-11}$
	2 nd site	$7.32 \cdot 10^4$	$2.54 \cdot 10^7$	$3.94 \cdot 10^{-8}$
CuCATm1.2	1 ^{er} site	$8.77 \cdot 10^6$	$3.04 \cdot 10^9$	$3.29 \cdot 10^{-10}$
	2 nd site	$5.85 \cdot 10^4$	$2.03 \cdot 10^7$	$4.93 \cdot 10^{-8}$
CuCATm1.3	1 ^{er} site	$8.46 \cdot 10^5$	$2.93 \cdot 10^8$	$3.41 \cdot 10^{-9}$
	2 nd site	$1.90 \cdot 10^4$	$6.58 \cdot 10^6$	$1.52 \cdot 10^{-7}$
CuCATm1.4	1 ^{er} site	$9.59 \cdot 10^6$	$3.33 \cdot 10^9$	$3.01 \cdot 10^{-10}$
	2 nd site	$1.27 \cdot 10^5$	$4.41 \cdot 10^7$	$2.27 \cdot 10^{-8}$

Les constantes d'association kd_1 de $3,88 \cdot 10^{-9}$ et kd_2 $2,89 \cdot 10^{-8}$ obtenues pour le mélange CuCATm1:Cu²⁺ 1:2 dans cette expérience par fluorescence sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par spectrométrie de masse ($1,12 \cdot 10^{-9}$ et $4,79 \cdot 10^{-9}$ pour Kd_1 et Kd_2 respectivement). Afin d'expliquer les petits écarts observés, il a été tenté de corriger les données de fluorescence de l'effet « filtre interne » ou « inner filter effect » en anglais comme mentionné dans le travail de C. Hureau.²⁴⁴ Ce phénomène induit une diminution du signal d'émission car l'excitation de la solution n'est pas homogène du fait de l'atténuation de l'excitation par l'échantillon lui-même (seule la surface excitée fluoresce beaucoup). Afin de prendre en considération cet effet, il a fallu déterminer la concentration en chacune des espèces lors des titrages :

Soit les deux équilibres :

$\text{CuCATm1} + \text{Cu(II)} = (\text{CuCATm1})\text{Cu}$ et $(\text{CuCATm1})\text{Cu} + \text{Cu(II)} = \text{CuCATm1Cu}_2$ avec

$$K_1 \frac{[(\text{CuCATm1})\text{Cu}]}{[\text{CuCATm1}][\text{Cu(II)}]}$$

Et

$$K_2 \frac{[\text{CuCATm1Cu}_2]}{[(\text{CuCATm1})\text{Cu}][\text{Cu(II)}]}$$

Alors nous avons :

$$[\text{CuCATm1}]_0 = [\text{CuCATm1}] + [(\text{CuCATm1})\text{Cu}] + [(\text{CuCATm1})\text{Cu}_2] \quad (\text{Équation 15})$$

$$\text{et } [\text{Cu(II)}]_0 = [\text{Cu(II)}] + [(\text{CuCATm1})\text{Cu}] + 2[(\text{CuCATm1})\text{Cu}_2] \quad (\text{Équation 16})$$

En combinant ces équations avec les expressions de K_1 et K_2 il est possible d'écrire la concentration des différentes espèces en fonction de $[\text{CuCATm1}]_0$ et de $[\text{Cu(II)}]$ uniquement :

$$[\text{CuCATm1}] = \frac{[\text{CuCATm1}]_0}{1 + K_1[\text{Cu(II)}] + K_1K_2[\text{Cu(II)}]^2} \quad (\text{Équation 17})$$

$$[(\text{CuCATm1})\text{Cu}] = \frac{K_1[\text{Cu(II)}][\text{CuCATm1}]_0}{1 + K_1[\text{Cu(II)}] + K_1K_2[\text{Cu(II)}]^2} \quad (\text{Équation 18})$$

et

$$[(\text{CuCATm1})\text{Cu}_2] = \frac{K_1K_2[\text{Cu(II)}]^2[\text{CuCATm1}]_0}{1 + K_1[\text{Cu(II)}] + K_1K_2[\text{Cu(II)}]^2} \quad (\text{Équation 19})$$

En considérant que la fluorescence suit une loi équivalente à la loi de Beer-Lambert, alors la fluorescence mesurée s'écrit :

$$F = E_{\text{CuCATm1}}[\text{CuCATm1}] + E_{(\text{CuCATm1})\text{Cu}}[(\text{CuCATm1})\text{Cu}] + E_{(\text{CuCATm1})\text{Cu}_2}[(\text{CuCATm1})\text{Cu}_2] + E_{\text{Cu(II)}}[\text{Cu(II)}]$$

La fluorescence du cuivre(II) étant négligeable par rapport à celle des autres espèces, on peut écrire :

$$F = E_{\text{CuCATm1}}[\text{CuCATm1}] + E_{(\text{CuCATm1})\text{Cu}}[(\text{CuCATm1})\text{Cu}] + E_{(\text{CuCATm1})\text{Cu}_2}[(\text{CuCATm1})\text{Cu}_2]$$

En utilisant les expressions des différentes espèces (3-5), il devient possible d'exprimer la fluorescence en fonction de [Cu(II)] uniquement :

$$F = \frac{E_{CuCATm1} + E_{CuCATm1Cu}K_1[Cu(II)] + E_{CuCATm1Cu2}K_1K_2[Cu(II)]^2}{1 + K_1[Cu(II)] + K_1K_1[Cu(II)]^2} [CuCATm1]_0$$

ou

$$\Delta F = \frac{E_{CuCATm1} + E_{CuCATm1Cu}K_1[Cu(II)] + E_{CuCATm1Cu2}K_1K_2[Cu(II)]^2}{1 + K_1[Cu(II)] + K_1K_1[Cu(II)]^2} [CuCATm1]_0 - \Phi_{CuCATm1}[CuCATm1]_0$$

et d'obtenir une équation du second degré de type :

$$A[Cu(II)]^2 + B[Cu(II)] + C = 0$$

$$\begin{aligned} \text{où} \quad A &= E_{CuCATm1Cu2}K_1K_2[CuCATm1]_0 - \Delta F K_1 K_2 \\ B &= E_{CuCATm1Cu}K_1[CuCATm1]_0 - \Delta F K_1 \\ C &= -\Delta F \end{aligned}$$

La racine de ce polynôme :

$$\frac{-B - \sqrt{\Delta}}{2A}$$

où Δ est le discriminant permet de recalculer la valeur de la concentration en cuivre en tout point du titrage à partir des paramètres trouvés par modélisation des courbes. La concentration des autres espèces peut alors être également recalculée en utilisant les équations 3 à 5. Une fois ces concentrations connues, nous avons recalculé l'intensité de fluorescence que nous aurions dû obtenir. Pour cela, comme la fluorescence F^M d'une molécule M s'écrit :

$$F^M = \Phi_M[M]10^{-(abs(x)+abs(y))} \text{ où } x \text{ et } y \text{ sont les dimensions de la cuve (du trajet optique)}$$

Dans notre cas $y \ll x$, il est donc possible d'écrire :

$$\begin{aligned} F &= (\phi_{CuCATm1}[CuCATm1] + \phi_{CuCATm1Cu}[(CuCATm1)Cu] \\ &\quad + \phi_{CuCATm1Cu2}[(CuCATm1)Cu2])10^{-abs(x)} \end{aligned}$$

avec

$$abs(x) = \varepsilon_{CuCATm1}[CuCATm1]x + \varepsilon_{CuCATm1Cu}[(CuCATm1)Cu]x \\ + \varepsilon_{CuCATm1Cu2}[(CuCATm1)Cu2]x + \varepsilon_{Cu(II)}[Cu(II)]x$$

Il est donc nécessaire de déterminer les différents coefficients d'extinction molaires (ε) et de fluorescence (Φ) de CuCATm1 et des mélanges CuCATm1:Cu²⁺ 1:1 et 1:2. Les coefficients ont aussi été déterminés pour Cu(OAc)₂ et les mélanges 2:1, 1:3 et 1:4 (Figure 83 et Tableau 23 ci-dessous), (partie expérimentale voir « Extinction coefficients determination » p. 176 et « Fluorescence coefficients determination » p. 176)

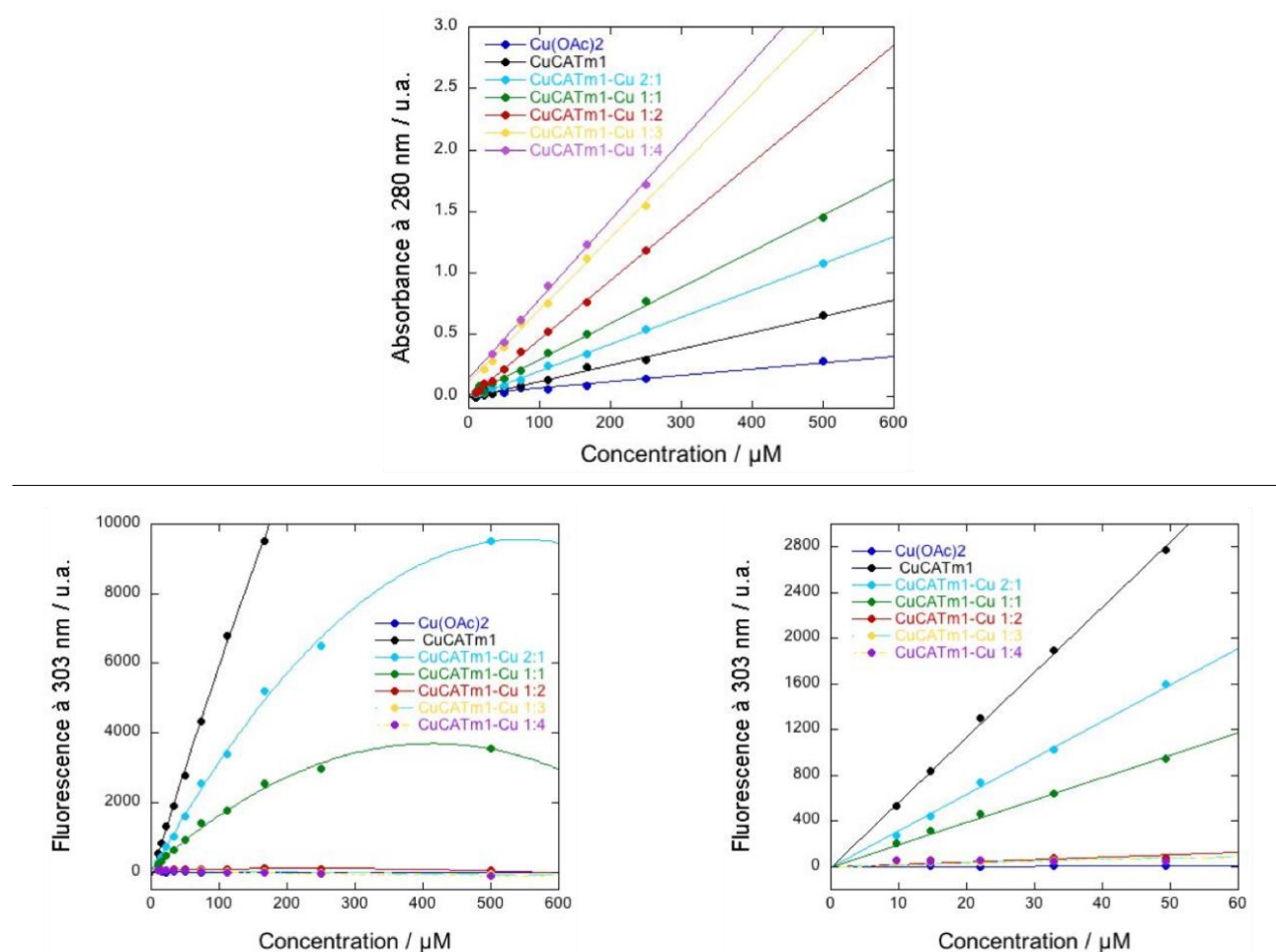


Figure 83. Mesure de l'absorbance à 280 nm en UV-vis (haut) et de la fluorescence à 303 nm (bas) pour le Cu(OAc)₂, le peptide libre et les complexes CuCATm1:Cu²⁺ à différentes concentration. Le graphique en bas à droit est un zoom de celui de gauche entre 0 et 60 μM.

Tableau 23. Coefficients d'extinction molaires à 280 nm ($\epsilon_{280\text{ nm}}$) et de fluorescence à 303 nm ($\Phi_{303\text{ nm}}$) de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, CuCATm1 et des mélanges CuCATm1: Cu^{2+}

	$\text{Cu}(\text{OAc})_2$	CuCATm1	CuCATm1: Cu^{2+}				
			2:1	1:1	1:2	1:3	1:4
$\epsilon_{280\text{ nm}}$ ($\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)	511,2	1336,4	2193,4	2930,1	4786,4	5854,2	6430,4
$\Phi_{303\text{ nm}}$ (L mol^{-1})	154280	56941000	31944000	19528000	2028700	1451200	1486200

Grâce aux données du Tableau 23, l'absorbance dans la dimension x ainsi que la fluorescence ont pu être recalculées. Cependant, la modélisation de cette nouvelle courbe (Figure 84 et Tableau 24) ne permet pas de retrouver les valeurs obtenues par spectrométrie de masse.

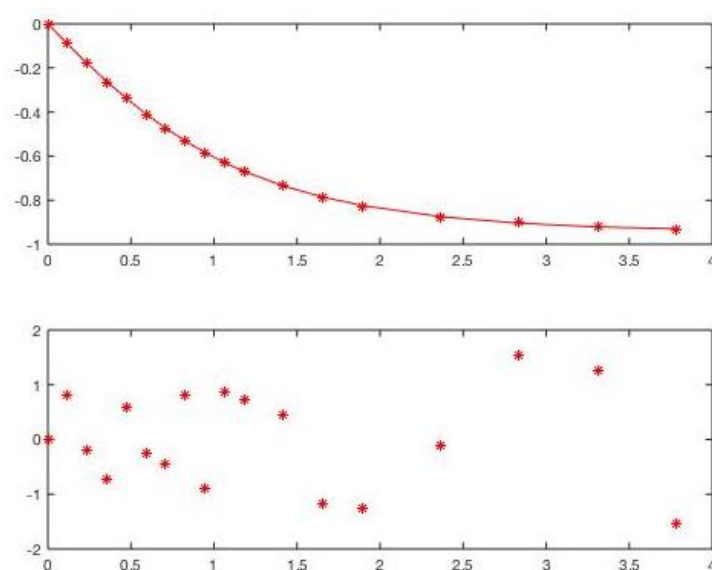


Figure 84. Titration des peptides CuCATm1 = $10\text{ }\mu\text{M}$ par du Cu^{2+} . Suivi par spectrométrie de fluorescence dans le MOPS (50 mM, pH 7,5). (Courbes du Haut) Les points rouges correspondent aux valeurs expérimentales corrigées et la ligne rouge représente la courbe modélisée pour un complexe **peptide:Cu 1:2** qui se superpose le mieux et conduisant à l'obtention de valeurs pour les constantes d'associations apparentes. Les courbes du bas représentent l'erreur entre les points expérimentaux et les points de la courbe modélisée.

Tableau 24. Constantes d'associations ($K_{a\text{ cond}}$) et de dissociations ($K_{d\text{ cond}}$) corrigées de la contribution du tampon MOPS et de l' « inert filter effect » pour les deux sites de complexation du cuivre de CuCATm1 ($\approx 10\text{ }\mu\text{M}$) à partir des constantes d'association apparentes ($K_{a\text{ app}}$) obtenue par modélisation des courbes de titrage par fluorescence pour des modèles L:Cu 1:2.

CuCATm1 :Cu 1 :2	Ka	Ka_{cond}	Kd_{cond}
1 ^{er} site	$1,5\text{ }10^5$	$5,2\text{ }10^7$	$1,92\text{ }10^{-8}$
2 nd site	$1,3\text{ }10^5$	$4,4\text{ }10^7$	$2,29\text{ }10^{-8}$

Ceci peut certainement s'expliquer par le fait que lors de la détermination des coefficients, lorsque que le peptide et le cuivre(II) sont mélangés à un ratio donné (1:1 ou 1:2), 100% du complexe correspondant n'est pas formé car il existe vraisemblablement un mélange. Les coefficients sont donc entachés d'une erreur.

Bien que des valeurs identiques à celles obtenues par spectrométrie de masse n'aient pas pu être obtenues pour CuCATm1, les titrages par fluorescence ont tout de même permis de comparer les différents complexes mesurés dans les mêmes conditions.

Ainsi, il semblerait que :

- l'affinité du premier site de complexation du peptide CuCATm1.1 a été considérablement améliorée. Ce site est 100 fois plus affin pour le cuivre(II) ($K_{d1} = 3.59 \cdot 10^{-11}$) que le premier site de complexation du peptide CuCATm1. Quant à l'affinité du second site, elle semble avoir été très peu impactée, car nous restons dans le même ordre de grandeur ($K_{d2} = 3.94 \cdot 10^{-8}$).
- Dans le cas du complexe CuCATm1.2:Cu²⁺, il semble que nous ayons amélioré la constante d'association du premier site d'un facteur 10, mais légèrement réduit la constante du second site.
- Dans le cas du complexe CuCATm1.3:Cu²⁺, l'affinité du premier site de complexation reste du même ordre de grandeur que le premier site de CuCATm1. Néanmoins, l'affinité du second site est très fortement diminuée. Le K_{d2} de $1.52 \cdot 10^{-7}$ est 100 fois plus grande que le K_{d2} de CuCATm1.
- Dans le cas du complexe CuCATm1.4:Cu²⁺, il est observé une augmentation significative du 1^{er} site de complexation mais également du 2nd site de complexation.

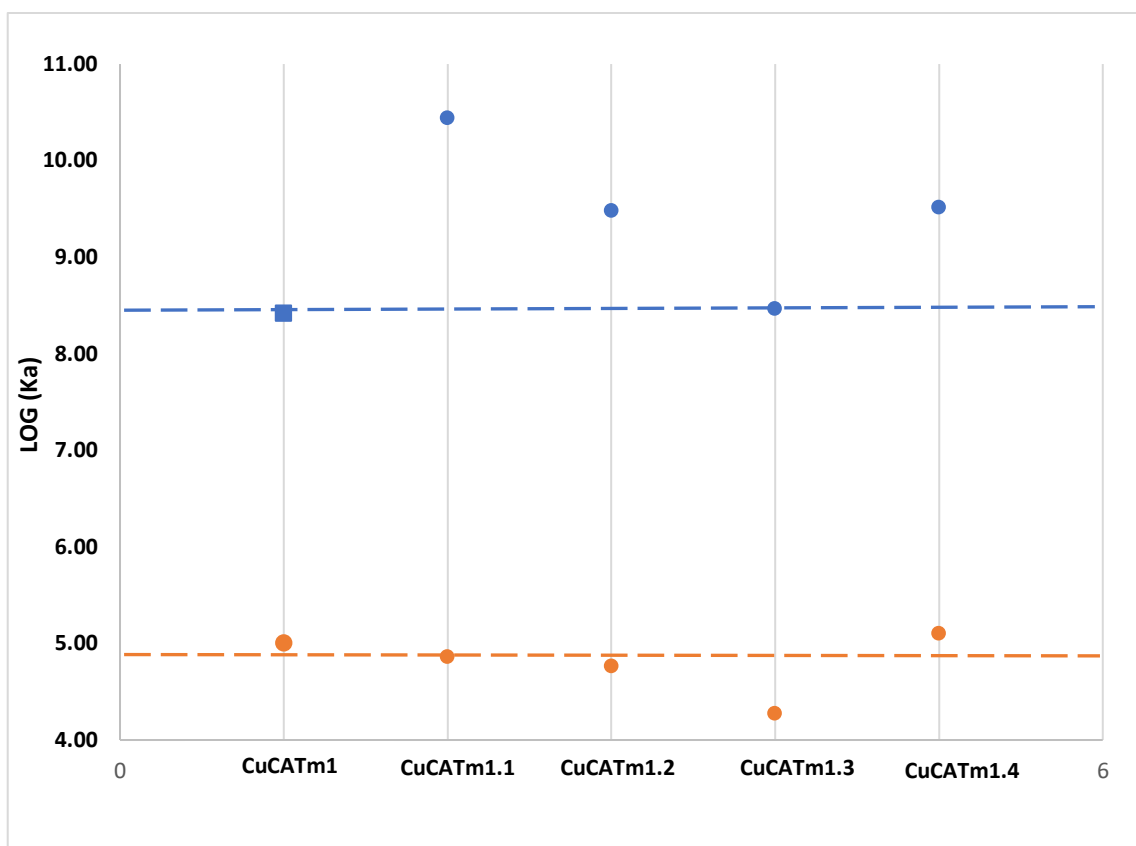


Figure 85. Stabilité des sites de coordination du cuivre pour les peptides de seconde génération. Les $\log(Ka_{cond})$ sont rapportés pour chacun des sites d'un même peptide et comparés à la valeur du complexe parent (CuCATm1:Cu²⁺ 1:2) (droites en pointillés). Les points bleus représentent les $\log(Ka_{cond})$ des complexes formés dans le premier site et les points orange ceux des complexes formés dans le second site. Des points bleus au-dessus de la ligne bleue signifie que la stabilité du complexe du premier site a été améliorée par rapport à celle du complexe du premier site de CuCATm1. Des points orange sous la ligne orange signifie en revanche que la stabilité du complexe du second site a été diminuée par rapport à celle du second site de CuCATm1.

3) Conclusion et perspectives

Pour conclure, il apparaît clairement que la duplication de la séquence PHYKH ne permet pas d'obtenir deux sites de coordination de forte affinité pour le cuivre. Cette duplication de la séquence a, tout de même, permis d'améliorer significativement la stabilité du complexe formé dans le premier site sans toutefois déstabiliser celle du second. Cependant, plus le nombre de résidus glycine entrant dans les séquences chélatantes PHYKH augmente, plus le complexe formé dans le second site de coordination est déstabilisé. Ceci laisse penser que la séquence PHYKH n'est pas suffisante à elle seule pour coordonner les deux cuivres. En effet, si PHYKH était la séquence chélatante, pour CuCATm1.3 qui présente deux fois cette séquence

séparée par 2 glycines (AcPHYKHGGPHYKH-NH₂) et donc potentiellement deux complexes bien séparés, des valeurs similaires pour les deux sites auraient dû être obtenues.

Au regard des paramètres catalytiques mesurés, le peptide CuCATm1.1 dont le premier site de coordination a une affinité pour le cuivre 100 fois supérieure à celle de CuCATm1, est un bon candidat pour des investigations plus approfondies. En effet, le mélange CuCATm1.1:Cu²⁺ 1:2 présente un TON plus élevé et un TOF deux fois supérieur à celui du mélange CuCATm1:Cu²⁺ 1:2. L'activité du mélange CuCATm1.1:Cu²⁺ 1:2 sera donc mesurée en conditions biologiques sur le modèle cellulaire HeLa-Hyper.

Il est important de rappeler que ces expériences de titrage ont semblé montrer que les peptides de seconde génération ont tendance à former dans un premier temps des complexes Peptide:Cu²⁺ 2:1 puis à évoluer vers des espèces Peptide:Cu²⁺ 1:1 puis 1:2 plus stables thermodynamiquement. Il serait donc intéressant de réaliser ces titrages par spectrométrie de masse afin de confirmer ces observations et de mieux appréhender la cinétique de ces évolutions.

Il apparaît ici que la conception rationnelle de complexes plus efficaces et plus stables est extrêmement difficile. Pour le développement de nouvelles générations de complexes, il serait donc plus efficace et pertinent d'adopter à nouveau l'approche combinatoire présentée au chapitre précédent pour générer une nouvelle librairie.

Les informations obtenues sur l'affinité et l'activité de type CAT des différents complexes synthétisés au cours de nos travaux nous permettent de mener une réflexion sur la conception d'une nouvelle librairie. Cette conception s'appuie sur les conclusions suivantes :

1. l'étude statistique effectuée sur notre première bibliothèque ([chapitre 2.II.4.2 p.75](#)) nous informe de l'importance de conserver l'histidine en position X₂ et la tyrosine en position X₃.
2. l'analyse par RPE du complexe CuCATm1 (P₁H₂Y₃K₄H₅R₆L₇H₈):Cu²⁺ nous informe que le complexe adopte une sphère de coordination de type imidazoyle N₄. De plus la séquence H(ZZH)_n est identifiée comme une séquence fournissant aux peptides une très bonne constante d'affinité pour le cuivre(II). Il est donc logique de trouver de manière consensuelle une histidine en position 5.

3. l'analyse des résultats obtenus pour les peptides de seconde génération (CuCATm1.(x):

P₁H₂Y₃K₄H₅X₆P₇H₈Y₉K₁₀H₁₁) permettent d'en déduire les conclusions suivantes :

- la fluorescence de la tyrosine étant fortement impactée lors de l'ajout des deux premiers équivalents de cuivre(II), il est très probable que le phénol (ou la forme phénolate) intervienne dans la complexation des deux cuivres, peut-être en jouant le rôle de pont comme c'est le cas dans des complexes de cuivre(II) décrits dans la littérature.^{245,246}
- les peptides CuCATm1.(x) possèdent normalement une répétition du premier site de complexation du cuivre de CuCATm1. Par conséquent, si on fait l'hypothèse de deux sites séparés, on aurait pu avoir des constantes d'affinités pour le cuivre(II) identiques, avec une stœchiométrie différente. Mais ces constantes sont différentes. Il est donc fort probable que les acides aminés immédiatement après l'histidine 5 participent à la complexation du premier cuivre et que la séquence P₁H₂Y₃K₄H₅ ne soit pas suffisante.
- Le peptide CuCATm1.1 : P₁H₂Y₃K₄H₅P₆H₇Y₈K₉H₁₀ est celui avec le K_{d1} le plus bas. Or celui-ci présente le motif **HXXHXXH**, identifié comme une séquence fournissant aux peptides une très bonne constante d'affinité pour le cuivre. On peut donc émettre l'hypothèse que l'histidine en position 7 est également impliquée dans la complexation du premier cuivre.

Compte tenu de ces conclusions, il semble important de garder le motif P₁H₂Y₃K₄H₅P₆H₇ et de l'étendre pour coordonner avec une plus grande affinité le second cuivre. Il serait également intéressant d'évaluer l'intérêt de garder les prolines en position 1 et 6 et la lysine en position 4. En effet, nous avons vu que l'intérêt principal de celle-ci était probablement d'augmenter la solubilité du peptide. Khelydja

Une proposition de future librairie est donc donnée dans le Tableau 25:

Tableau 25. Proposition de séquence pour la seconde librairie

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CuCATm1	P	H	Y	K	H	R	L	H		
CuCATm1.1	P	H	Y	K	H	P	H	Y	K	H
bibliothèque	X	H	Y	X	H	X	H	H	X	H
	P, K, G, A			K, G, A		R, P, G			G, H, Y	

X : positions où de la diversité serait introduite

En bleu figure la séquence de CuCATm1, en jaune celle de CuCATm1.1 et en vert les acides aminés communs aux deux séquences et qui sont conservés.

En position 1, 4 et 6 seraient investigués l'importance des prolines et de la lysine. Les acides aminés des séquences originales ainsi que des acides aminés non coordonnants seraient introduits. En position 9, il serait testé l'introduction d'une glycine ou d'un acide aminé coordonnant qui pourrait participer à la coordination du second cuivre et ainsi augmenter la constante d'affinité.

Chapitre 4 : Conclusions

I. Conclusion

Par la stratégie combinatoire dite « one bead-one compound » ou OBOC nous avons pu synthétiser sur support solide une bibliothèque de 125 peptides. La synthèse réalisée selon une stratégie « split and pool » a permis d'introduire une grande diversité au sein de la bibliothèque de ligands et conduire à tester un grand nombre de complexes à base de cuivre(II), de manganèse(II) ou de fer(III). Ainsi, 375 metalloptides ont été potentiellement formés, et testés pour leur activité catalase par un test colorimétrique sur gel. Les complexes les plus efficaces pour la dismutation de H_2O_2 et les plus stables ont été sélectionnés. Ces complexes ont ensuite été identifiés par spectrométrie de masse. Une seconde sélection fonctionnelle a été réalisée avec un test d'activité en spectrophotométrie UV-vis : l'analyse quantitative de l'activité catalase des complexes s'appuyant sur la variation de l'absorbance à 240 nm liée à la quantité H_2O_2 dans le milieu. Cette deuxième sélection a ainsi mis en évidence plusieurs complexes ayant une activité significative. Un « hit », CuCATm1, a été synthétisé sur une plus grande échelle et purifié. Nous avons montré qu'il était possible de former des complexes avec un ou deux cations métalliques par ligand peptidique. Différents ratios CuCATm1: Cu^{2+} ont été investigués et les complexes correspondants caractérisés en détail par différentes méthodes analytiques (résonance paramagnétique électronique (RPE), dichroïsme circulaire (DC), électrochimie...). Les constantes d'affinité ont été estimées par calorimétrie (Isothermal titration calorimetry, ITC), par une expérience de compétition par spectrophotométrie UV-visible ou par spectrométrie de masse. L'activité catalytique du complexe a été évaluée en utilisant une électrode de Clark qui permet de mesurer le dégagement de O_2 lors de la réaction de dismutation d' H_2O_2 . Le mélange CuCATm1: Cu^{2+} 1:2 est celui qui a conduit aux meilleurs résultats, ce qui était cohérent avec l'intervention de deux électrons (un par cation métallique) pour catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène. Ce même complexe CuCATm1: Cu^{2+} a démontré une capacité à réduire de 30 % la concentration basale d' H_2O_2 dans les cellules HeLa. Cette approche combinatoire, couplée à un test de sélection par l'activité et la stabilité, a donc conduit à la découverte un premier complexe peptidique de cuivre (CATm1) Cu_2 mimant l'activité catalytique de la CAT et actif sur

un modèle cellulaire. Ce complexe s'inscrit donc dans la famille émergente des médicaments catalytiques. Nous allons par la suite étudier ce complexe sur un modèle de l'inflammation médié par le stress oxydant dont nous disposons au laboratoire. Enfin, cette stratégie peut être appliquée à la découverte d'une large gamme de catalyseurs peptidiques pour d'autres activités dès lors qu'un criblage basé sur l'activité peut être mis en œuvre.

Pour améliorer la stabilité et l'activité catalase, d'autres complexes ont été conçus. Dans un premier temps, nous avons synthétisé le peptide CuCATm1-coudé basé sur la duplication en palindrome de la totalité de la séquence peptidique de CuCATm1 afin de favoriser la coopérativité des deux fragments pour une meilleure complexation du cuivre. Les deux fragments peptidiques ont été séparés par une séquence Pro-Gly afin d'insérer un coude- β et de permettre au peptide de se replier sur lui-même pour diminuer le coût entropique en le pré-organisant. Non seulement le peptide CuCATm1.c s'est avéré être capable de lier jusqu'à quatre cuivres mais en plus il n'a pas permis d'accroître l'activité du complexe initial : on a simplement dupliqué la séquence sans effet coopératif. Cette approche étant peu concluante, nous avons synthétisé quatre peptides dits de seconde génération basés sur la répétition du fragment PHYKH de CuCATm1, la séquence potentiellement impliquée dans la complexation du premier cuivre. Les deux fragments peptidiques ont été séparés ou non par un espaceur Pro-Gly ou Gly-Gly afin d'introduire une diversité dans leur structure secondaire et d'évaluer l'effet de la conformation sur l'activité. Les résultats nous indiquent que la duplication de la séquence PHYKH ne permet pas d'obtenir un complexe plus efficace pour la catalyse de dismutation de H_2O_2 que le complexe CuCAT1 : Cu^{2+} . Néanmoins, cette stratégie a permis d'identifier un peptide CuCATm1.1 avec une affinité significativement plus importante pour le premier cuivre sans déstabiliser celui du second. Le complexe correspondant sera donc caractérisé de manière plus approfondie et son activité sera mesurée en condition biologique dans les cellules HeLa-Hyper.

La conception rationnelle de complexes plus efficaces que CuCATm1 s'étant avérée difficile, une nouvelle génération de complexes sera développée en adoptant à nouveau une approche combinatoire et en utilisant toutes les informations obtenues lors de ces études.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Chemicals

All chemicals and solvents were of synthesis grade and were used as received without further purification. Common solvents for solid support synthesis and L-amino acids were obtained from either Sigma Aldrich, Novabiochem or Iris biotech GMBH.

II. Instruments

- MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Voyager DE-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) in positive mode using as matrix a solution of α - Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) at 10 mg/mL in $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{CF}_3\text{COOH}$ (50:50:0.2) containing 0.1% TFA. Calibration was performed using external standards (Proteomix 4, LaserBio Labs Sofia-Antipolis, France).
- Electrospray ionization mass spectrometry was performed on a Bruker MicrOTOF II with the following parameters: capillary voltage = 4200 V, Nebulizer = 2.0 Bar, Dry gas flow = 4.0 L/min, Dry Temp = 200 °C, Capillary exit voltage = 100 V.
- Analytical HPLC was performed on an Agilent Technologies 1200 Series equipped with a multiple wavelength absorbance detector, using a Proto 200 C18 3 μm Higgins Analytical Inc. 100 x 4.6 mm column.
- Preparative HPLC was performed on a Waters 600 HPLC Pump equipped with a Waters 2487 dual wavelength absorbance detector, using a Column VP 260/16 C18 Hter 5 μm
- CATm1 peptide was synthesized on an Advanced ChemTech automated synthesizer at the IBPS SU, FR3631 peptide synthesis core facility and purified by HPLC as described.
- UV-vis spectrometry was performed on a Cary 300 bio in a double beam mode with the buffer in the reference cell at 25°C
- Electron Paramagnetic Resonance (EPR) data were recorded using an Elexsys E500 Bruker spectrometer, operating at a microwave frequency of approximately 9.44 GHz. Spectra were recorded using a microwave power of 20

mW across a sweep width of 250 mT (centered at 310 mT) with modulation amplitude of 0.5 mT. Experiments were carried out at 110 K using a liquid nitrogen cryostat. This machine is the EPR machine from Laboratoire de chimie et pharmacologique et toxicologique, Paris 5, after application to the national network Renard.

- Circular dichroism (CD) spectra (215-300 nm) were collected on a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan).
- Cyclic Voltammetry measurement were performed using a Metrohm potentiostat (AUTOLAB model). All measurements were carried out in the indicated buffer. Glassy carbon (GC), a platinum plate and SCE KCl saturated were used as working electrode, counter and reference electrode, respectively; all potential values are reported versus the SCE reference electrode. Dissolved dioxygen was removed by bubbling the solution with nitrogen gas. Between each measurement the working electrode was washed with distilled water and manually polished using sand paper.
- Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were performed on a TA Instrument (New Castle, DE) NanoITC calorimeter and analyzed using the provided software.
- Clark-type electrode: the ability of the complex to catalyze H_2O_2 was measured by polarimetry. An O_2 -sensitive Clark-type electrode OD InLab 605-ISM purchased from Mettler Toledo was used. Prior to measurements, the electrode was calibrated in ambient air then in a provided 0% dissolved oxygen solution.

III. Procedures and data analysis

1) Peptide library synthesis on solid support

Linkers coupling and first amino acid grafting. The peptides library was synthesized manually on solid support by using standard Fmoc chemistry on 1 gram of Tentagel macrobeads (loading: 0.24 mmol/g, 280-300 μm). First, orthogonal linkers (6 equiv.) coupling was performed with a solution of HMBA and 3-N-Fmoc-amino-3-(2-

nitrophenyl)propionic acid (Fmoc - ANP) linkers (10:1) with HOBT and DIC (1 equiv.) in DMF for 1h. Standard deprotection conditions of Fmoc group were employed (20% piperidine in DMF for 1 min then 10 min at room temperature) followed by washings with NMP. Then the first amino acid was introduced by treatment with the symmetrical anhydride of β Ala (6 equiv.) in the presence of 4- dimethylaminopyridine (0.1 equiv.) in DMF for 1h.

Amino acid coupling reactions (without capping). The coupling reactions were performed in NMP (3 mL) with HOBT (3 equiv.) and HBTU (3 equiv.) as coupling agents and in basic conditions (diisopropylethylamine, DIEA, 6 equiv.). The resin was shaken for 45 to 60 min at room temperature. After each reaction, solvents and soluble reagents were removed under vacuum and the resin was washed 5 times with NMP. Completion of the reaction was monitored by the Kaiser test, which indicates the presence of free amine by a blue coloration of the bead. The amino acid coupling was repeated as many times as necessary until a negative Kaiser test was obtained. Then, standard deprotection conditions of Fmoc group were employed (20% piperidine in DMF for 1 min then 10 min at room temperature) followed by washings with NMP (5 $\times$ 3 mL).

Amino acid coupling reactions (with capping). By using Bibilo software, the positions in the library that required capping were identified, then manual calculation of truncated peptide molar mass allowed for the determination of which commercially available capping reagent combination was required to obtain a non-degenerate mass ladder. The 12th coupling required simultaneous capping since it is a mass encoding step. Coupling then involved treatment with a mixture of the desired amino acid and mass cap (85:15, 10 equiv.), N,N diisopropylcarbodiimide (DIC), and N-hydroxybenotriazole (HOBt) in 10:10 ratio in DMF for 1 hour. The mass caps were: BocD for E, BocW for H, BocF for Y, BocL for R and BocA for G.

Split and pool strategy. The ninth, twelfth and the thirteenth coupling were performed after splitting the resin. The resin was split into 5 approximately equal portions. Then, each batch reacted with a different amino acid using standard coupling conditions. After the reaction, all five batches were pooled together and the next coupling was performed.

A final acetylation was performed on the last amino acid (Proline) by a solution of acetic anhydride in dichloromethane (DCM) (3 mL, 10/90 v:v) for 1 h at room temperature. Solvents and soluble reagents were removed by filtration. The resin was washed with DCM (5 x 3 mL) then by methanol (3 x 3 mL). The resin was dried under vacuum for 1h. Finally, deprotection of the lateral chains was carried out in acidic conditions with TFA/H₂O/Trisopropylsilane (95%/2.5%/2.5%) for 2 h at room temperature. The resin was then washed sequentially by TFA, DCM and HEPES buffer (Figure S1).

2) Complexes formation

Beads (ca. 50 mg) were inserted in PP syringe with a frit and were washed with HEPES (50 mM, pH 7.5) solution (3 × 1 mL). The beads were incubated for 2h at 60°C with 2 mL of a Cu(OAc)₂, FeCl₃·6H₂O or MnCl₂ solution (respectively at 10, 25 and 25 mM) in HEPES (50 mM, pH 7.5). After incubation, the solution was removed by filtration and the beads were washed with HEPES (50 mM, pH 7.5, 1 × 1 mL), a EDTA solution (25 mM between 1 and 2.5 min, 1 × 1 mL) then again with HEPES (50 mM, pH 7.5, 3 × 1 mL) to increase the selectivity pressure.

3) Combinatorial screening and selection

The beads (approximately 50-100) were introduced in a small beaker and molten agarose (10 mL, 2% in HEPES 50 mM, pH 7.5) was added. The solution was poured into a Petri dish, so that the beads were as evenly distributed in the dish as possible. The solution was kept at room temperature for 10 minutes to allow the formation of a gel. The agarose gel was then placed under a UV lamp (electronic dual light transilluminator) at 254 nm during 10-15 min to cleave the photocleavable linker. The gel was then incubated with a H₂O₂ solution (10 mL, 0.015%, 10 min) then rinsed extensively with H₂O milliQ. The water was poured off. A 2% FeCl₃ solution (0.6 mg in 30 mL H₂O milliQ) and a 2% potassium ferricyanide solution (0.6 mg in 30 mL H₂O milliQ) were poured together directly on top of the gel. The solution became blue and the gel was incubated for 3 minutes then extensively washed by H₂O milliQ. Beads with white halos were cut from the agarose gel with a tip of a 1 mL pipette and transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube. The residual agarose surrounding the selected bead was melted away in distilled H₂O (1 mL) at 110°C. The selected bead was subsequently washed with EDTA (0.5 M;

pH 7.0), then extensively with H₂O for the metal decoordination. Peptides were cleaved from the bead by treatment with NH₄OH (28%, 50 µL) overnight at room temperature. After cleavage, the solution was freeze-dried, and the peptide residue resuspended in an H₂O milliQ (100 µL) as a library stock solution.

4) Peptide sequence determination by MALDI-TOF mass spectrometry

1 µL of peptide stock solutions was mixed with 1 µL of matrix solution and 1 µL of the mixture solution was placed on the MALDI plate and allowed to crystallize. Peptides sequencing was carried out with the Software developed by C. Griesinger et al.¹⁴⁴(Example Figure S86).

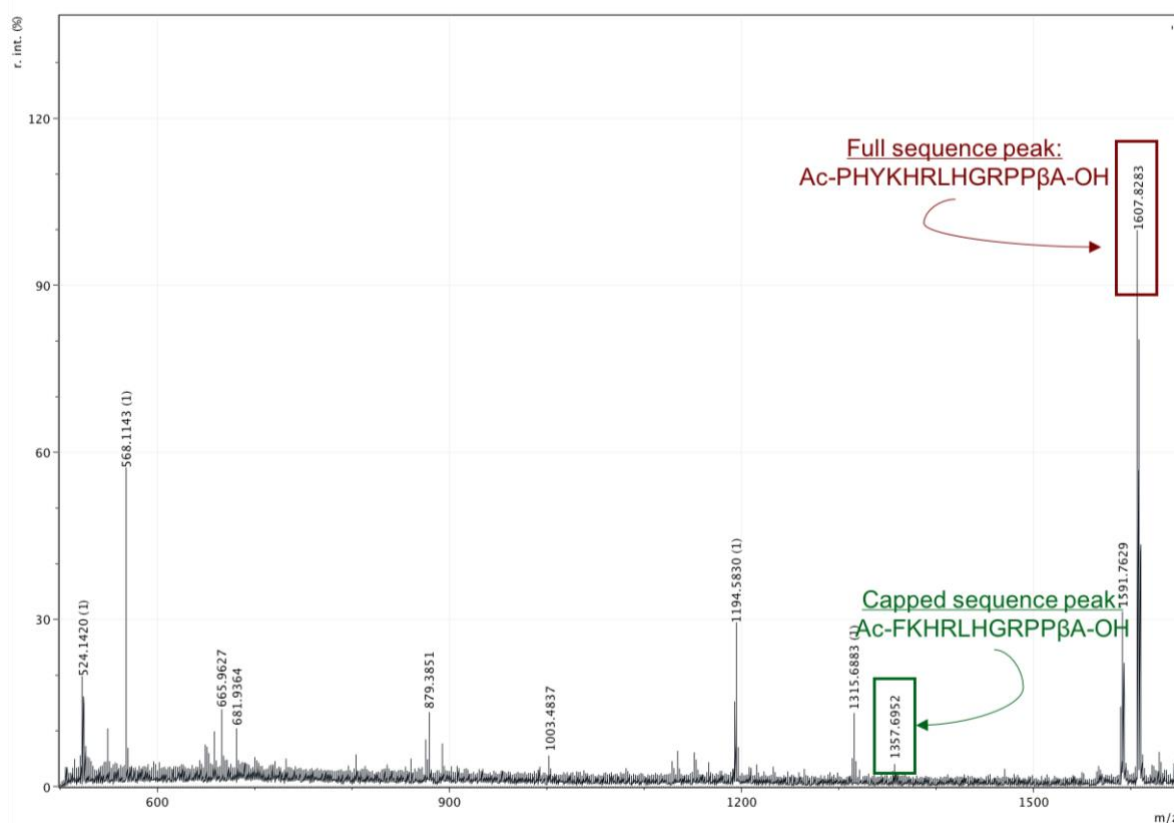


Figure S86 Mass spectrum of a cleaved bead and attribution of the peaks of the peptide CuCATm1. Beads have two characteristic mass peaks: one corresponding to the mass of the full peptide and one corresponding to the capped peptide.

5) Quantitative analysis of catalase activity measured by UV-vis spectroscopy.

Samples preparation: Metal stock solutions (5 mM) were prepared from metal solids ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; MnCl_2 ; $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) dissolved in HEPES solution (50 mM, pH 7.5). Catalase stock solution was prepared from crystals of beef liver catalase (3.3 mg) dissolved in phosphate buffer (916 μL , 50 mM, pH 7.0). The solution was then diluted 50 times.

The peptide solutions obtained previously after cleavage of the beads were freeze-dried and the peptides were diluted into aqueous solutions containing the desired metal cation salt (10 μL , 5 mM of the metal). This led to solutions with peptides concentrations of ca 0.5 mM and 10 equivalents of the metals. The resulting solutions were heated at 55°C for 90 minutes.

Catalase activity measurement: A UV-Vis spectrophotometer (CARY 300 Bio) was used with a temperature controlled at 25°C with a sand baths with thermostatic temperature control. Complexes samples (800 μL), prepared from the stock solutions of complexes diluted down to 4 μM in PBS buffer (0.5 M, pH 7.0) were introduced into a quartz cuvette (1 cm path length, 1.5 ml). A H_2O_2 solution (1 μL , 30% solution, v:v) was added, the solution was manually mixed by shaking the cuvette during 3-5 seconds. The absorbance at 240 nm was followed for 10 minutes. The reaction followed a first order kinetics during the 2 first minutes. The same procedure was applied for the controls: the catalase sample and the metal cation samples.

The dismutation of H_2O_2 by CAT mimic follows a kinetics of order 1 so the slope of the curve $A_{240} = f(t)$ allows accessing the rate constant of the reaction. With k_{app} in min^{-1} and k in $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$.

$$v = k [\text{complex}]$$
$$k_{\text{app}} = k * [\text{complex}]$$

6) Peptide synthesis on large scale

Peptides synthesis was conducted by SPPS using Fmoc-Rink Amide MBHA (resin with a loading capacity of 0.69 mmol/g). Solid-phase peptide synthesis was performed manually with standard Fmoc-protected amino acids and HOBt/HBTU coupling reagents. The coupling reactions were performed in 4 mL of NMP solution of amino acid (3 equiv/ equiv resin) with hydroxybenzotriazole (HOBt) (3 equiv/equiv resin), (2-(1Hbenzatriazole-1-yl)-1,1,3,3- tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (3 equiv/equiv resin) and diisopropylethylamine (6 equiv/equiv resin). After each coupling,

the standard peptide Fmoc- deprotection procedures were performed in piperidine (20% piperidine in DMF for 1 min then 10 minutes at room temperature). Final acetylation was performed with a solution of acetic anhydride in dichloromethane DCM (3 mL, 10/90, v:v) for 1 h at room temperature. Solvents and soluble reagents were removed by filtration. The resin was successively washed with DCM (5 x 3 mL) then methanol (3 x 3mL) and dried under vacuum for 1h. Simultaneous lateral chains deprotection and bead cleavage were performed using a solution of TFA/H₂O/Trisopropylsilane (95%/2.5%/2.5%; 3 mL) for 2h at room temperature. The samples became red/orange. The solution was collected by filtration in a 50 mL round bottom flask and beads were washed 3 times with pure TFA (3 x 3 mL). The TFA solutions were combined and TFA was removed under reduced pressure. The crude solid was precipitated in cold diethyl ether directly in the round bottom flask. The solid and the solution were transferred into a 50 mL tube and centrifuged and then the solution was discarded. The solid was washed two more times with Et₂O. The peptide was dissolved in 20 mL of deionized H₂O and freeze-dried. The peptide was purified by reverse phase HPLC on a VP260/16 semipreparative column with a linear gradient from 5 to 30% acetonitrile in water both containing 0.1% TFA over 30 min. High purity (> 95%) was confirmed by analytical HPLC (PROTO200 C18 column from 5% to 100% acetonitrile in water and 0.1% TFA over 10 min) and the expected mass was found by MALDI- TOF mass spectrometry. The list of the synthesized peptides is provided in

7) Peptide stock solution preparation

Stock solutions of the peptides were prepared by dissolving peptide powders in milliQ water. Stock solutions concentrations were then determined by measuring the UV-vis spectrum of a diluted solution (1 µl in 449 µl of milliQ water) and using the extinction coefficient at 276 nm of the tyrosine Tyr considered as free tyrosin ($\epsilon_{276} = 1280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) or at 205 nm (ϵ_{205}) for the peptide without tyrosine (

Table 26)

Table 26. Peptides masse and HPLC characterization and epsilon at 276 and 205 nm

Name	Sequence	[M+H] +	HPLC *	ϵ_{27} 6	ϵ_{205M}^{126} 9
CuCATm1	Ac-PHYKHLH-NH ₂	1128.4	3'84"	1280	42490
MnCATm1	Ac-PYYKHLH-NH ₂	1154.35	4'32"	2560	43370
MnCATm2	Ac-PGGKHELH-NH ₂	915.5	3'65"	0	29860
FeCATm1	Ac-PRRKHLH-NH ₂	1140.6	3'64"	0	33910
FeCATm2	Ac-PRGKHLH-NH ₂	1022.6	3'59"	0	36410
CuCATm1-c	Ac- HLRHKYHPGHYKRRH -NH ₂	2157.456	4'04"	2560	84980
CuCATm1. a	Ac-PHYAHLH-NH ₂	1071.191	4'07"	1280	42490
CuCATm1. 1	Ac-PHYKHPHYKH- NH ₂	1384.7	3'74"	2560	57980
CuCATm1. 2	Ac-PHYKHGPHYKH- NH ₂	1441.5	3'73"	2560	60760
CuCATm1. 3	Ac-PHYKHGGPHYKH- NH ₂	1498.2	3'72"	2560	63540
CuCATm1. 4	Ac-PHYKHGGHYKH- NH ₂	1401.5	3'64"	2560	60760

ϵ in cm⁻¹ M⁻¹

*Retention time in HPLC: 5% - 95% ACN-TFA (99.9/0.1) in H₂O-TFA (99.9/0.1) during 10 min

8) Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (EPR)

EPR experiments were carried out at 110 K using liquid nitrogen cryostat. EPR samples (200 μ L) were prepared from stock solution of peptides diluted down to 0.2 mM in MOPS buffer (0.5M, pH7.5). Cu²⁺ was added from 50 mM stock solution of CuSO₄ in water to form the complexes. Samples were frozen in an ethanol/liquid nitrogen solution in quartz tube after addition of 10% glycerol as a cryoprotectant and stored in liquid nitrogen until used.

9) Titration by circular dichroism (CD)

Spectra of solutions of CuCATm1, CuCATm1.a (400 μ M) or CuCATm1-c (200 μ M) in MOPS buffer (50 mM, pH 7.5) were recorded before and after successive additions of CuSO₄. A 1 mm cell was used and the spectra were recorded with a Peltier temperature controller set at 298 K under constant nitrogen flush. The wavelength range was set from 300 nm to 215 nm. The scan rate, the sensitivity, and bandwidth were respectively 200 nm.min⁻¹, 0.125 s, and 1 nm. Each spectrum was an average of three scans.

10) Cyclic voltammetry experiments

All measurements were carried out in a buffer (MOPS or TRIS at pH 7.5 or 7). Glassy carbon (GC), a platinum plate and SCE KCl saturated were used as the working electrode, counter and reference electrode, respectively. All potential values are reported versus the SCE reference electrode. Dissolved dioxygen was removed by bubbling the solution with dinitrogen gas. Between each measurement the working electrode was washed with distilled water and polished with sand paper.

11) Competition assay with Baba ligand

A UV-vis spectrophotometer (CARY 300 Bio) possessing a “scanning kinetic module” was used with a temperature controlled at 25°C. Baba (acide 3,4-bis(oxamato)benzoïque) solution (50 μ M) was prepared in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.5) into a quartz cuvette (1 cm path length), then acetate copper solution in water (45 μ M) was added. The absorbance was recorded at 330 nm and successive additions of peptide were performed. After each peptide addition, the absorbance at 330 nm was monitored and, once the thermodynamic equilibrium was reached, the absorbance at 330 nm was reported.

The resulting curve has been obtained using the equation given in the manuscript (“Essai par compétition avec le ligand BABA” p.88) where the association constant is a parameter which is automatically adjusted by KaleidaGraph software

12) Isothermal titration calorimetry (ITC)

Titration at pH 7: Titrations were performed by injecting 10 μ L aliquots of 5 mM CuSO₄

into the calorimeter cell containing the peptide solution (0.5 mM) diluted in MOPS buffer (50 mM; pH 7), with 10 min between two injections. The experiments were performed at 25°C. Data were analyzed using the program NanoAnalyze provided by TA Instruments.

13) Titration by MALDI ionization mass spectrometry

CuCATm1:Cu²⁺ complexes formation was investigated using MALDI-TOF mass spectrometry. 1 µL of 10 µM mixtures of CuCATm1:Cu²⁺ at different ratios (1:1 or 1:2 or 1:10) were mixed with 1 µL of HCA matrix (10 mg/mL) solution in a mixture H₂O/MeCN 1:1 v:v. 1 µL of the resulting solutions were deposited on a MALDI plate and allowed to crystallize at room temperature and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.

14) Titration by electrospray ionization mass spectrometry

1 mM Cu(OAc)₂•H₂O was titrated into 20 µM CuCATm1 peptide solution in a 10 mM ammonium formate solution at pH 7.5. After each addition of Cu(II), the sample was measured using electrospray ionization mass spectrometry. The abundance of apo CuCATm1, CuCATm1-Cu₁, and CuCATm1-Cu₂ were normalized from each step in the ESI-MS titration. The amount of Cu(II) bound was calculated from the mass spectra to generate the speciation as a function of Cu(II) added. This speciation was simulated using Hyperquad Simulation and Speciation (HySS). The same concentrations of peptide and Cu(II) as the experimental data were used in the HySS simulation. 2.0 mol. eq. of Cu(II) were added in the simulated titration. HySS uses cumulative (β) binding constants and the simulated cumulative constant for the first (β₁) and second (β₂) Cu(II) binding to the peptide were adjusted until the simulation fit the experimental data. From these cumulative binding constants, the stepwise binding constants for the first (logK₁) and second (logK₂) Cu(II) bound to the peptide were found to be 8.95 and 8.34, respectively.

15) Catalase activity assay using X-triton

Complexes solutions (100-µL-1mM) were added in test tubes (10 mm diameter, 100 mm height). Subsequently, 100 µL of 1% Triton X-100 and 100 µL of hydrogen peroxide solution

(30% in water) were added to the solutions, mixed thoroughly and were then incubated at room temperature for 15 minutes

16) Catalase activity assay using Hadwan et Abed method by UV-vis spectrometry

Complexes solutions (peptide:metal 1:1 or 1:2) at 5 mM ([peptide]) were prepared in water into low binding Eppendorfs. A solution of hydrogen peroxide was added to reach a final concentration of 20 mM. 110 μ L of the resulting solution was taken every 10 min for 90 min and immediately added to a solution of ammonium molybdate in water (400 μ L, 32.4 mM) in a quartz micro UV cuvette (1 cm path length, 0.5 mL). The absorbance at 339 nm was measured at 25°C using a UV-vis spectrometer. The experiments were repeated for control samples, namely: nothing, peptide solutions (5 mM) and Cu(OAc)₂ solutions (5 mM and 10 mM).

17) Catalase activity assay using a Clark-type electrode

The experiments were carried out in MOPS buffer (0.1 M, pH 7.5) in a micro cell sealed with a rubber septum to avoid the introduction of O₂ from the air. The dissolved dioxygen was removed by bubbling the solution with dinitrogen gas. Hydrogen peroxide solution (15%, 1 μ L) was added. The dioxygen from the spontaneous dismutation of hydrogen peroxide was removed by bubbling the solution with dinitrogen gas. Finally, the sample was injected through the septum to the stirred H₂O₂ solution. Reaction rates were determined by measurement of the O₂ evolved over time as described in reference 3⁸¹. The initial rates v_0 were measured from the initial slope of dioxygen formation at several complex concentrations (50, 100, 150, 200 and 250 μ M). Then k_{obs} corresponds to the slope of the linear fit of $v_0 = f[\text{catalyst}]$ (Figure 54). The apparent second-order rate constant in M⁻¹ s⁻¹ (k_{cat}) were determined from k_{obs} since $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 [\text{O}_2]$; $k_{\text{cat}} = 2 k_{\text{obs}} / [\text{H}_2\text{O}_2]_0$.

Complementary kinetics parameters were determined at 50 μ M of the catalysts in 5 mM H₂O₂ solution in MOPS (50 mM) at pH 7.5. The maximal yield of O₂ production (in %) was calculated from the measured $[\text{O}_2]_{\text{max obs}}$ values using the following equation:

$$\text{Yield O}_2 (\%) = (2[\text{O}_2]_{\text{max obs}}/[\text{H}_2\text{O}_2]_0) * 100.$$

The TON was calculated as maximal number of O₂ moles produced per mole of a catalyst, $\text{TON} = [\text{O}_2]_{\text{max obs}} / [\text{Catalyst}]_0$.

The TOF values in s⁻¹ which represents the ratios of initial rates per concentrations of catalysts were calculated as followed: $\text{TOF} = v_0 / [\text{Catalyst}]_0$.

18) Experiments on HeLa HyPer cells

Cell culture. Stable cell line HeLa HyPer1 was prepared using the HeLa Flp-In cell line, which was kindly provided by Stephen Taylor²⁷⁰ and cultured at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. HyPer1 expression in this stable cell line was controlled by doxycycline, added 24 h after seeding. The cells were cultured for an additional 24 h before being processed for analysis.

Pharmacological treatments.

- Cells were incubated with or without antioxidant during 1 hr at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. (first experience in HeLa-Hyper Cell)
- Cells were incubated with or without antioxidant during 40 min at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere then the cell medium was substituted with a new medium without compound (second experience in HeLa-Hyper Cell)

Imaging. Imaging was performed with a CSU-W1 Yokogawa spinning disk coupled to a Zeiss Axio Observer Z1 inverted microscope equipped with a sCMOS Hamamatsu camera and a 63× objective (63×/1.4 oil WD: 0.17 mm) oil objective. DPSS 100 mW 405 nm and 150 mW 491 nm lasers and a 525/50 bandpass emission filter were used. **H₂O₂ levels quantification and statistical analysis.** Images were processed with the Fiji software, to obtain the HyPer1 ratio of the emission at 530 nm (491/530)/ (405/530). HyPer ratio was then measured for several cells, and normalized to the ratio value of the control condition. Data were analyzed using GraphPad Prism 8 and expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was calculated using an ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

19) Modeling of the conformation of the CuCATm1-c peptide by molecular dynamics

Initial coordinates for the peptide were obtained from the I-TASSER server.²⁷¹ They were put through a simulated annealing protocol to explore their behaviour. To do so, a water box of 250 Å³ was designed with the peptide in its center. Charmm NVT simulations were then performed using charmm-gui to prepare the input files^{272,273} which were modified to allow for the changes in temperature. The initial heating of the system was done over 2 ns, from 300K to 600K, held at 600K for 2 ns and cooled back down to 300K over 8 ns. A subsequent 5 ns at 300K were performed

20) Titration by fluorescence

Emission spectra were recorded after excitation at 275 nm at 298 K. The spectra were recorded from 280 nm to 400 nm with a 1 nm data interval and at a scan speed of 200 nm/min. The excitation and emission slits were both set at 5 nm. Quartz micro cuvette (0.5 mL) were used.

Peptide titration with Cu(OAc)₂: Spectra of peptide solutions (10 μM or 20 μM) in MOPS buffer (50 mM, pH 7.5 or pH 7) were recorded before and after successive additions of Cu(OAc)₂. The solution was gently mixed and fluorescence recorded. Each spectrum was an average of two spectra and the emission value at 303 nm was reported to generate the titration curves. To ensure that the systems were at the thermodynamic equilibrium, the fluorescence at 303 nm was monitored and Cu(OAc)₂ was added only when a stable intensity was obtained.

With Glycine competitor for CuCATm1.2: When glycine was used, glycine was added to the buffer to reach the expected concentration (0.4 mM ; 2 mM ; 4 mM ou 8 mM) prior to record the first emission spectrum.

The resulting curve has been obtained using the Matlab program providing by Thordarson²⁴² and from 1:1 or 1:2 or 2:1 complexes

21) Extinction coefficients determination

The CuCATm1:Cu²⁺ mixtures at the ratios 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 1:4, the peptide CuCATm1 and Cu(OAc)₂ were prepared in MOPS buffer (50 mM, pH 7.5) at 1 mM then successively diluted to prepare solution at 500 μM, 250 μM, 125 μM, 62.5 μM, 31.25 μM, 15.6 μM and 7.8 μM. After each dilution, the solution was gently mixed and the absorbance was measured at 280 nm.

22) Fluorescence coefficients determination

Emission spectra were recorded after excitation at 275 nm at 298 K. The spectra were recorded from 280 nm to 400 nm with a 1 nm data interval and at a scan speed of 200 nm/min. The excitation and emission slits were both set at 5 nm. Quartz micro cuvette (0.5 mL) were used.

The CuCATm1:Cu²⁺ mixtures at the ratios 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 1:4, the peptide CuCATm1 and Cu(OAc)₂ were prepared in MOPS buffer (50 mM, pH 7.5) at 1 mM then successively diluted to prepare solution at 500 μM, 250 μM, 125 μM, 62.5 μM, 31.25 μM, 15.6 μM and 7.8 μM. After each dilution, the solutions were gently mixed and fluorescence emission spectra recorded. Each spectrum was an average of two spectra and the emission value at 303 nm was reported.

ANNEXE

I. METHODES DE CARACTERISATION DES PEPTIDES

Les métallopeptides, de par leur double nature peptidique et métallique, peuvent être étudiés par de nombreuses techniques spectroscopiques. Quelques-unes seront précisées ci-dessous.

1) La spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse est aujourd'hui communément utilisée dans le cas de caractérisation d'une variété de familles moléculaires grâce à la mesure de leur masse.²⁷⁴

Cette technique comporte 4 phases (Figure 87) : (1) Dans un premiers temps, la molécule d'intérêt (électrolyte) est ionisée en phase gazeuse. (2) Il s'ensuit la séparation des ions formés dans des analyseurs en fonction de leur rapport m/z , m étant la masse de la molécule et z sa charge. (3) Les ions sont ensuite convertis en un courant électronique et amplifiés par un détecteur. (4) Le signal une fois traité est représenté sous forme de spectre de masse.

Il existe plusieurs sources d'ionisations et types d'analyseurs permettant d'obtenir des résultats et des informations différentes (Figure 87). Selon la méthode utilisée, il est également possible de quantifier et/ou d'imager le composé.^{123,274,275}

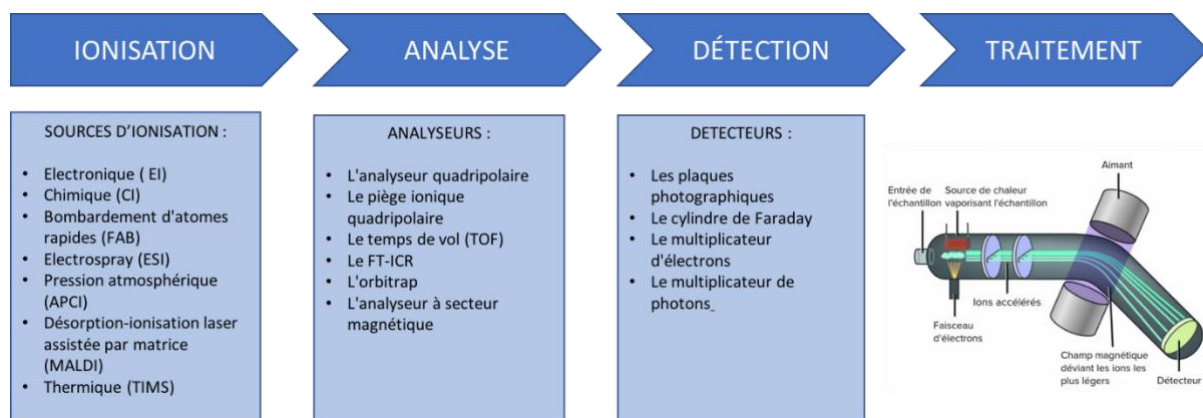


Figure 87. Description des 4 étapes de la spectrométrie de masse et les différentes techniques associées 1. L'ionisation, 2. Analyse, 3. Détection et 4. Traitement. (Bas, droite) Figure représentant un dispositif de spectromètre de masse.

Dans le cas de caractérisation de peptide, les combinaisons « source d'ionisation/analyseur » les plus souvent utilisées sont la MALDI-TOF et l'ESI-TOF^{276,277} (Figure 88).

- La Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)²⁷⁸ est une ionisation indirecte du peptide (ou du complexe). Premièrement, un faisceau de laser ionise une matrice dans un mélange matrice/peptide (ou complexe peptidique). La matrice

ionisée se charge à son tour d'ioniser le peptide par le transfert de sa charge. On obtiens ainsi des ions mono ou multichargés de la forme $[M + nH]^{n+}$

- L'Ionisation par Electrospray (ESI)²⁷⁶ est une ionisation par champs magnétique intense. Les ions formés se retrouvent dans une chambre d'ionisation sous forme de microgouttes. Les solvants sont progressivement évaporés à l'aide de « gaz chauffé ». Les gouttes deviennent moins volumineuses, la densité de charge augmente, ce qui mène à leur explosion et à la formation de microgouttelettes contenant des ions peptidiques. Ce procédé se répète, jusqu'à la totale déshydratation des ions peptidiques multichargé.
- L'analyse par temps de vol (TOF),²⁷⁷ mesure le temps que met l'ion à parcourir la distance «source d'ionisation – détecteur ». Le temps de vol permet la mesure du rapport m/z , les ions ayant le rapport le plus faible seront les plus rapides. Afin d'améliorer la résolution de cet analyseur, l'analyse par TOF peut être utilisée en mode «réflectron» par l'ajout d'un miroir électrostatique qui permet d'augmenter la distance de vol sans changer la distance réelle « source d'ionisation – détecteur».

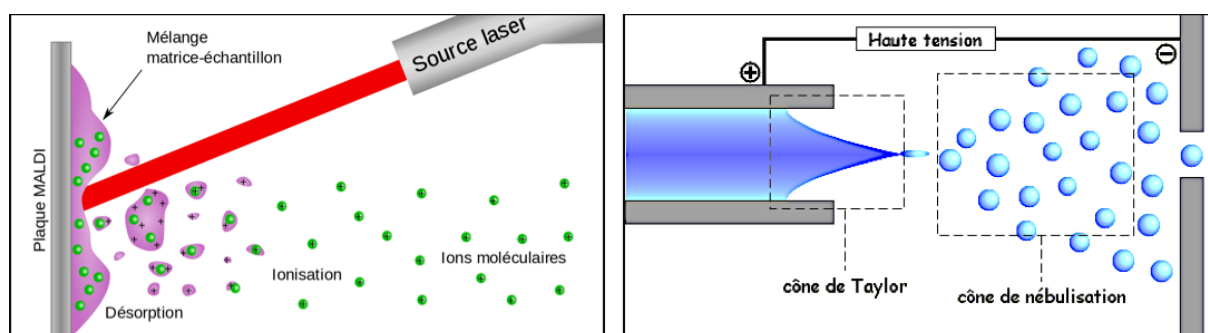


Figure 88. Représentation du principe d'ionisation (droite) par une source MALDI d'échantillon(en vert) co-cristallisé avec une matrice(en violet) sur et plaque (gauche) et par une source ESI en mode positive sous haute tension (gauche).^{279,280}

2) L'analyse par dichroïsme circulaire.

Les acides aminés sont des molécules chirales qui absorbent donc différemment la lumière circulairement polarisée à droite et celle circulairement polarisée gauche. Les peptides sont ainsi des molécules dites optiquement actives et peuvent ainsi être étudiés à l'aide de spectromètres de dichroïsme circulaire.^{281,282} Le profil du spectre de dichroïsme circulaire d'un peptide est caractéristique de la structure secondaire de ce dernier. Ainsi nous pouvons déterminer par du dichroïsme circulaire entre 180-260 nm (zone d'absorption de la liaison

peptidique) si le peptide possède une structure secondaire en hélices α , en feuillets β , une structure désordonnée... (Figure 89). L'environnement dans lequel se trouve le peptide influe significativement sur la forme et l'intensité du signal mesuré. La méthode de dichroïsme circulaire permet ainsi d'obtenir des informations sur l'effet d'un changement des conditions expérimentales sur la structure secondaire du peptide. L'effet du pH, de la température, du solvant, du tampon, d'interactions moléculaires peut ainsi être étudié. La caractérisation par dichroïsme circulaire est donc parfaitement adaptée à l'étude de l'interaction peptide-métal dans le cas d'un métallopeptide.

Le dichroïsme circulaire comporte plusieurs avantages techniques : sa réalisation ne nécessite qu'une très faible quantité de composé, il n'y a aucune contrainte liée à la taille ou à la masse du composé et la mesure est non destructive ce qui permet de récupérer le composé.

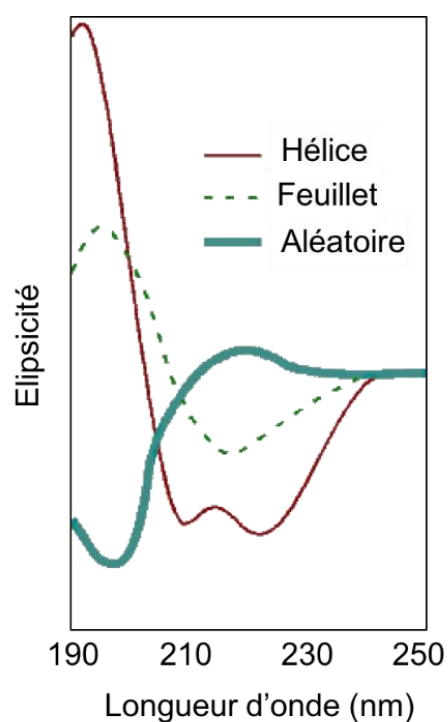


Figure 89. Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des structures secondaires de protéines.

3) L'analyse par spectroscopie ultraviolet-visible

L'analyse par spectroscopie ultraviolet-visible (UV-visible) est une méthode de spectroscopie électronique qui repose sur la notion d'absorbance du composé. Le composé à analyser, essentiellement sous forme dissoute dans une cuve est soumis à un rayonnement lumineux allant de 200 à 1000 nm (l'ultraviolet, visible et proche infrarouge). Le rayonnement envoyé à l'échantillon par le spectroscope est ainsi caractérisé par son intensité I_0 et sa longueur d'onde

λ (Figure 90). Les conditions expérimentales, telles que la polarité du solvant ou le pH ont une influence non négligeable sur le maximum d'absorption ou le coefficient d'extinction de la solution. Ainsi l'analyse par spectrométrie UV-vis permet la quantification et l'obtention d'informations du composé en solution.

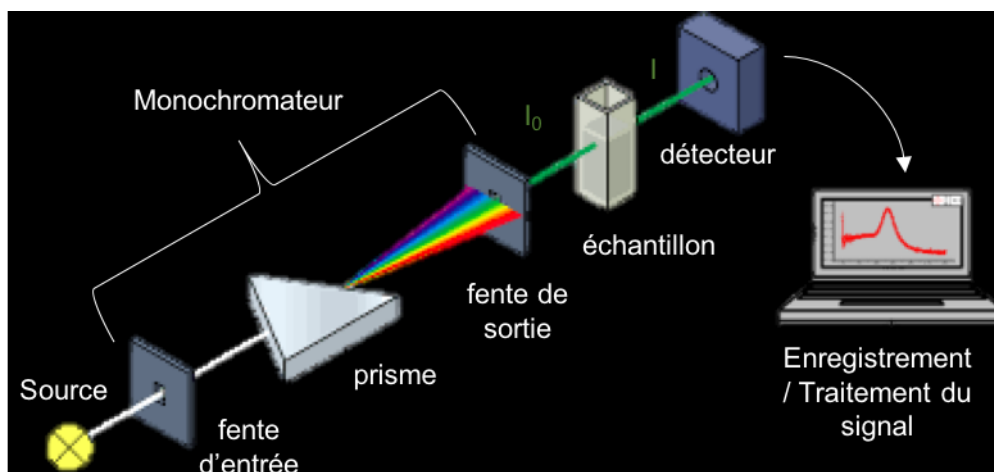


Figure 90. Dispositif du mécanisme par spectrométrie UV-vis en mode monochromateur (gauche) ou polychromateur (droite)

La loi de Beer-Lambert permet la réalisation d'études quantitatives de l'échantillon.

Loi de Beer-Lambert : $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$

A_{λ} : Absorbance à une longueur d'onde λ (sans unité)

ϵ_{λ} : Coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l : Trajet optique (cm)

c : Concentration de la solution ($mol \cdot L^{-1}$)

L'analyse par spectrométrie UV-vis est une méthode de choix pour l'analyse de complexes à base de métaux de transition ou de peptides. Les métaux de transition absorbent souvent la lumière visible, cela se traduit par leur coloration (Figure 91). L'interaction des cations métalliques avec d'autres espèces, tel qu'un ligand, modifie les propriétés d'absorbance du métal et du ligand. Quant aux peptides, ils possèdent des bandes d'absorption dans l'ultraviolet proche (entre 200 et 400 nm) : les liaisons amides des peptides absorbent à 200 nm (transition $\pi-\pi^*$) et les acides α -aminés aromatiques à 280 nm (tyrosine, phénylalanine et tryptophane).

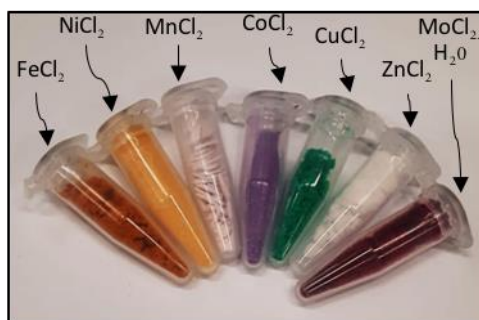


Figure 91. Eppendorfs contenant différents chlorures de métaux (II), chacun ayant une couleur caractéristique dû à son absorbance dans le visible.

4) Le titrage calorimétrique isotherme

Le Titrage calorimétrique isotherme (ITC) comme son nom l'indique est une méthode de titration de composés basée sur la mesure de la chaleur. Cette méthode permet l'étude et la quantification de phénomènes d'association ou de dissociation de biomolécules par le dégagement ou l'absorption de chaleur. L'étude du transfert thermique par ITC, lors du titrage d'un peptide par un cation métallique (ou inversement) permet de caractériser l'interaction peptide-métal. Les paramètres thermodynamiques tels que l'enthalpie (ΔH) et l'entropie (ΔS) de réaction ainsi que des données telles que la constante dissociation (K_D) ou la stœchiométrie (n) peuvent ainsi être précisément déterminés. Néanmoins, tout paramètre expérimental ayant un impact sur l'interaction peptide-cation métallique (pH, solvant, impureté, concentration) doit être parfaitement contrôlé afin d'obtenir des données exploitables (Figure 92).

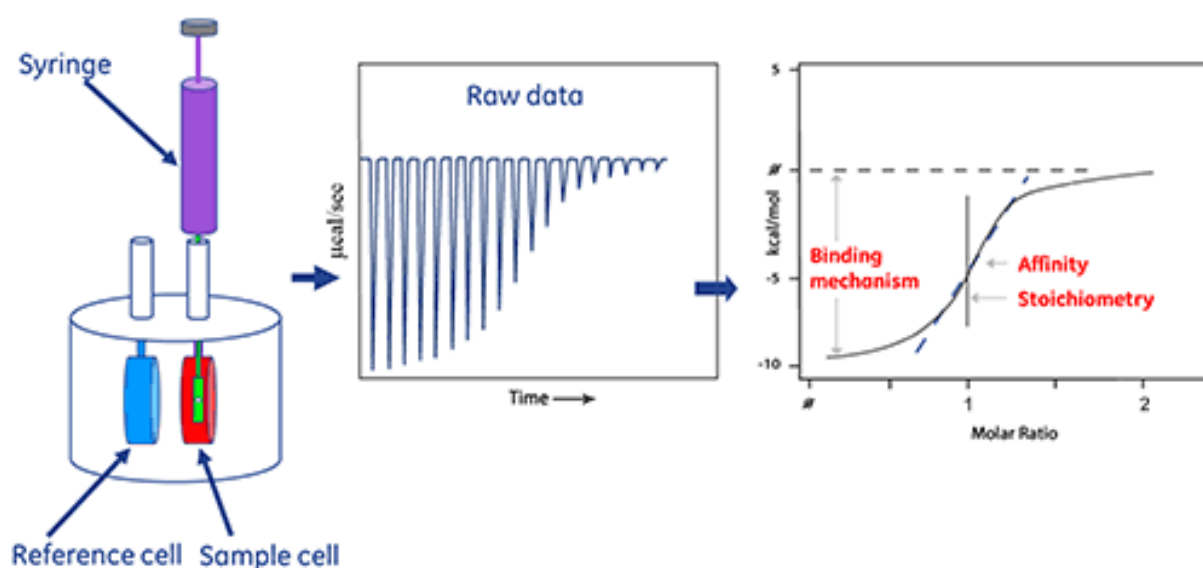


Figure 92. Représentation schématique d'un microcalorimètre et exemple d'un thermogramme permettant de calculer les paramètres thermodynamiques.²⁸³

5) La résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de spectroscopie permettant de détecter et d'étudier les espèces qui possèdent des électrons non appariés tels que les cations de métaux de transition ou les composés radicalaires. En effet, ils ont la capacité d'absorber et de réémettre l'énergie d'une onde électromagnétique en présence du champ magnétique. Cela se traduit par la transition entre les différents sous-niveaux d'énergie créés par la présence d'un champ magnétique (Figure 93). L'étude d'un composé par RPE consiste à mesurer la position en terme de champ magnétique cette transition électronique pour une énergie de transition donnée ($h\nu$). La champ auquel se produit la transition est caractéristique du composé et est très sensiblement affecté par l'environnement local de la molécule. Dans le cas de métallopeptides, une étude par RPE permet dans un premier temps d'identifier le métal impliqué dans le complexe (nature, nombre) et les acides aminés à proximité du métal (dans la cas de noyaux présentant un spin nucléaire), ainsi de caractériser la géométrie du site de coordination.²⁸⁴

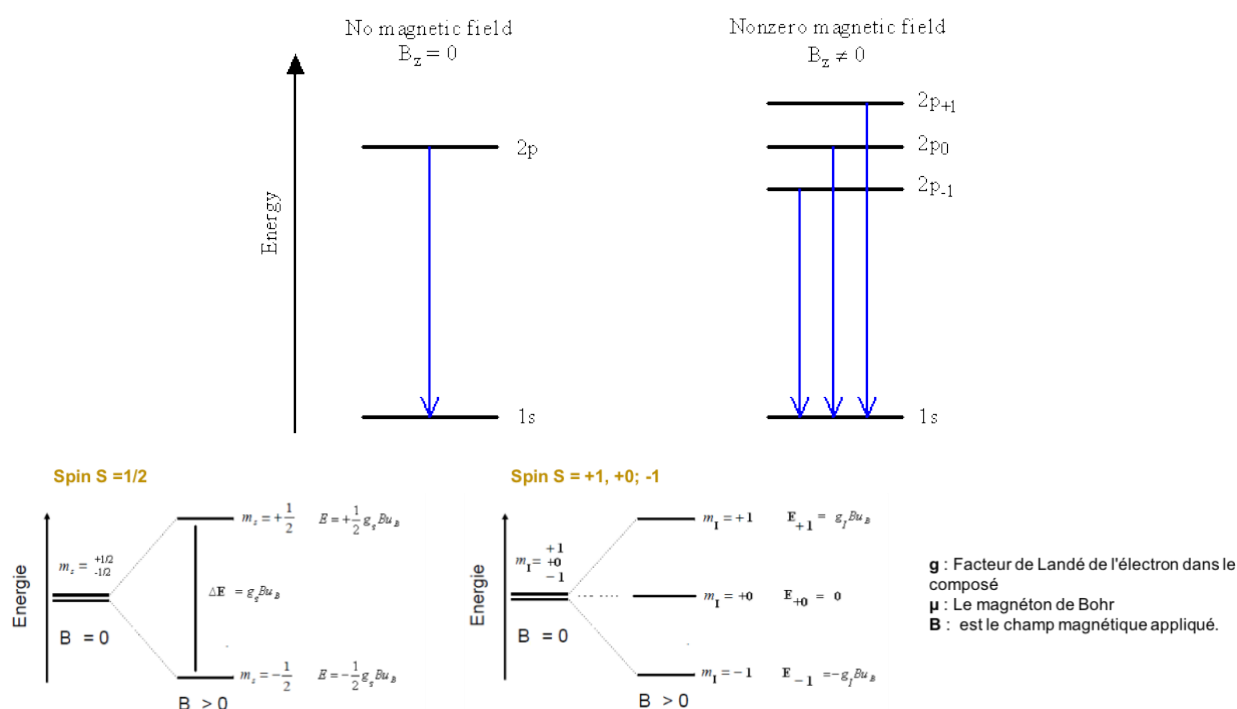


Figure 93. Levée de dégénérescence des niveaux d'énergie dans le cas d'un spin $1/2$ (gauche) et spin $+1$ (droite) du fait d'un champ magnétique externe.

D'autres techniques telles que la RMN ou la potentiométrie permettent d'obtenir des informations sur la structure et la nature de complexes peptidiques mais ces dernières ne seront pas traitées dans ce manuscrit.

Références

- (1) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochem. J.* **1984**, 219 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>.
- (2) Wong, H.-S.; Dighe, P. A.; Mezera, V.; Monternier, P.-A.; Brand, M. D. Production of Superoxide and Hydrogen Peroxide from Specific Mitochondrial Sites under Different Bioenergetic Conditions. *J. Biol. Chem.* **2017**, 292 (41), 16804–16809. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.789271>.
- (3) Bedard, K.; Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* **2007**, 87 (1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.
- (4) Wientjes, F. B. P4OPhox, a Third Cytosolic Component of the Activation Complex of the NADPH Oxidase to Contain Src Homology 3 Domains. 5.
- (5) Takeya, R.; Ueno, N.; Kami, K.; Taura, M.; Kohjima, M.; Izaki, T.; Nunoi, H.; Sumimoto, H. Novel Human Homologues of P47^{phox} and P67^{phox} Participate in Activation of Superoxide-Producing NADPH Oxidases. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (27), 25234–25246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212856200>.
- (6) Quinn, M. T.; Evans, T.; Bokoch, G. M. EVIDENCE FOR EQUIMOLAR TRANSLOCATION OF OXIDASE COMPONENTS. 5.
- (7) Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiological Reviews* **1979**, 59 (3), 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>.
- (8) Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* **2002**, 82 (1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- (9) Prabhakar, N. R. Oxygen Sensing by the Carotid Body Chemoreceptors. *Journal of Applied Physiology* **2000**, 88 (6), 2287–2295. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.6.2287>.
- (10) Duprat, F.; Girard, C.; Jarretou, G.; Lazdunski, M. Pancreatic Two P Domain K⁺ Channels TALK-1 and TALK-2 Are Activated by Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species: Pancreatic K_{2P} Channels TALK-1 and TALK-2 Are Activated by NOS and ROS. *The Journal of Physiology* **2005**, 562 (1), 235–244. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.071266>.
- (11) López-Barneo, J.; Pardal, R.; Montoro, R. J.; Smani, T.; García-Hirschfeld, J.; Ureña, J. K⁺ and Ca²⁺ Channel Activity and Cytosolic [Ca²⁺] in Oxygen-Sensing Tissues. *Respiration Physiology* **1999**, 115 (2), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(99\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(99)00016-X).
- (12) Frenette, P. S.; Wagner, D. D. Adhesion Molecules. *N Engl J Med* **1996**, 334 (23), 1526–1529. <https://doi.org/10.1056/NEJM199606063342308>.

- (13) Thews, O.; Lambert, C.; Kelleher, D. K.; Biesalski, H. K.; Vaupel, P.; Frank, J. Impact of Reactive Oxygen Species on the Expression of Adhesion Molecules in Vivo. In *Oxygen Transport to Tissue XXX*; Liss, P., Hansell, P., Bruley, D. F., Harrison, D. K., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer US: Boston, MA, 2009; Vol. 645, pp 95–100. https://doi.org/10.1007/978-0-387-85998-9_15.
- (14) Slater, A. F. G.; Stefan, C.; Nobel, I.; Van Den Dobbela, D. J.; Orrenius, S. Signalling Mechanisms and Oxidative Stress in Apoptosis. *Toxicology Letters* **1995**, 82–83, 149–153. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03474-9](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03474-9).
- (15) Dumont, A.; Schmitz, M. L. Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis Is CD95-Independent, Requires the Release of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species and the Activation of NF- κ B. *Oncogene* **1999**, 18, 747–757.
- (16) Wyllie, A. H.; Kerr, J. F. R.; Currie, A. R. Cell Death: The Significance of Apoptosis. In *International Review of Cytology*; Elsevier, 1980; Vol. 68, pp 251–306. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62312-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62312-8).
- (17) Clément, M. V.; Stamenkovic, I. Superoxide Anion Is a Natural Inhibitor of FAS-Mediated Cell Death. *EMBO J.* **1996**, 15 (2), 216–225.
- (18) Mironczuk-Chodakowska, I.; Witkowska, A. M.; Zujko, M. E. Endogenous Non-Enzymatic Antioxidants in the Human Body. *Advances in Medical Sciences* **2018**, 63 (1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.
- (19) Sies, H. Strategies of Antioxidant Defense. *Eur J Biochem* **1993**, 215 (2), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>.
- (20) Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L.; Fernández-Mejía, C. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*; Morales-Gonzalez, J. A., Ed.; InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/51788>.
- (21) Sheng, Y.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A.-F.; Teixeira, M.; Valentine, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (7), 3854–3918. <https://doi.org/10.1021/cr4005296>.
- (22) Abreu, I. A.; Cabelli, D. E. Superoxide Dismutases—a Review of the Metal-Associated Mechanistic Variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2010**, 1804 (2), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>.
- (23) Okado-Matsumoto, A.; Fridovich, I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver: Cu,Zn-SOD IN MITOCHONDRIA. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (42), 38388–38393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105395200>.

- (24) Marklund, S. L. Human Copper-Containing Superoxide Dismutase of High Molecular Weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1982**, 79 (24), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7634>.
- (25) Marklund, S. L.; Holme, E.; Hellner, L. Superoxide Dismutase in Extracellular Fluids. *Clinica Chimica Acta* **1982**, 126 (1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90360-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90360-6).
- (26) Deby, C.; Goutier, R. New Perspectives on the Biochemistry of Superoxide Anion and the Efficiency of Superoxide Dismutases. *Biochemical Pharmacology* **1990**, 39 (3), 399–405. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90043-K](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90043-K).
- (27) Teoh, M. L. T.; Sun, W.; Smith, B. J.; Oberley, L. W.; Cullen, J. J. Modulation of Reactive Oxygen Species in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* **2007**, 13 (24), 7441–7450. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0851>.
- (28) Putnam, C. D. et al. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. 15.
- (29) Domínguez, L.; Sosa-Peinado, A.; Hansberg, W. Catalase Evolved to Concentrate H₂O₂ at Its Active Site. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, 500 (1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.017>.
- (30) Obinger, C. Catalases and Hydrogen Peroxide Metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2012**, 525 (2), 93–94. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.07.005>.
- (31) Barynin, V. V.; Whittaker, M. M.; Antonyuk, S. V.; Lamzin, V. S.; Harrison, P. M.; Artymiuk, P. J.; Whittaker, J. W. Crystal Structure of Manganese Catalase from *Lactobacillus Plantarum*. 14.
- (32) Holmes, R. S.; Masters, C. J. Species Specific Features of the Distribution and Multiplicity of Mammalian Liver Catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1972**, 148 (1), 217–223. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(72\)90134-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90134-8).
- (33) Antonyuk, S. V.; Melik-Adamyan, V. R.; Popov, A. N.; Lamzin, V. S.; Hempstead, P. D.; Harrison, P. M.; Artymiuk, P. J.; Barynin, V. V. Three-Dimensional Structure of the Enzyme Dimanganese Catalase from *Thermus Thermophilus* at 1 Å Resolution. *Crystallogr. Rep.* **2000**, 45 (1), 105–116. <https://doi.org/10.1134/1.171145>.
- (34) Brigelius-Flohé, R.; Maiorino, M. Glutathione Peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2013**, 1830 (5), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>.
- (35) Tosatto, S. C. E.; Bosello, V.; Fogolari, F.; Mauri, P.; Roveri, A.; Toppo, S.; Flohé, L.; Ursini, F.; Maiorino, M. The Catalytic Site of Glutathione Peroxidases. *Antioxidants & Redox Signaling* **2008**, 10 (9), 1515–1526. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2055>.

- (36) Karthikeyan, J. Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants in Selected Piper Species. 6.
- (37) Sies, H.; Stahl, W.; Sundquist, A. R. Antioxidant Functions of Vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1992**, 669 (1), 7–20. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb17085.x>.
- (38) Zujko, M.; Witkowska, A.; Waśkiewicz, A.; Sygnowska, E. Estimation of Dietary Intake and Patterns of Polyphenol Consumption in Polish Adult Population. *Advances in Medical Sciences* **2012**, 57 (2), 375–384. <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0026-6>.
- (39) Sies, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Exp Physiol* **1997**, 82 (2), 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.
- (40) Kubota, R.; Asayama, S.; Kawakami, H. Catalytic Antioxidants for Therapeutic Medicine. *Journal of Materials Chemistry B* **2019**, 7 (20), 3165–3191. <https://doi.org/10.1039/C8TB03365J>.
- (41) Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P. Oxidative Stress. **2017**, 37.
- (42) Tönnies, E.; Trushina, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *JAD* **2017**, 57 (4), 1105–1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>.
- (43) Choudhury, G.; MacNee, W. Role of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathology of Ageing in COPD: Potential Therapeutic Interventions. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **2017**, 14 (1), 122–135. <https://doi.org/10.1080/15412555.2016.1214948>.
- (44) Murray, C. J.; Lopez, A. D. Alternative Projections of Mortality and Disability by Cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* **1997**, 349 (9064), 1498–1504. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)07492-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07492-2).
- (45) Duni, A.; Liakopoulos, V.; Rapsomanikis, K.-P.; Dounousi, E. Chronic Kidney Disease and Disproportionally Increased Cardiovascular Damage: Does Oxidative Stress Explain the Burden? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 2017, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2017/9036450>.
- (46) Putri, A. Y.; Thaha, M. Role of Oxidative Stress on Chronic Kidney Disease Progression. *Acta Med Indones* **2014**, 46 (3), 9.
- (47) Cachofeiro, V.; Goicochea, M.; de Vinuesa, S. G.; Oubiña, P.; Lahera, V.; Luño, J. Oxidative Stress and Inflammation, a Link between Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. *Kidney International* **2008**, 74, S4–S9. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.516>.
- (48) Bashan, N.; Kovsan, J.; Kachko, I.; Ovadia, H.; Rudich, A. Positive and Negative

Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Physiological Reviews* **2009**, 89 (1), 27–71. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2008>.

(49) Golbidi, S.; Alireza Ebadi, S.; Laher, I. Antioxidants in the Treatment of Diabetes. *CDR* **2011**, 7 (2), 106–125. <https://doi.org/10.2174/157339911794940729>.

(50) Khansari, N.; Shakiba, Y.; Mahmoudi, M. Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *IAD* **2009**, 3 (1), 73–80. <https://doi.org/10.2174/187221309787158371>.

(51) Federico, A.; Morgillo, F.; Tuccillo, C.; Ciardiello, F.; Loguercio, C. Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Human Carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **2007**, 121 (11), 2381–2386. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>.

(52) Sies, H. Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. *Redox Biology* **2017**, 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.

(53) Cadenas, E.; Davies, K. J. A. Guest Editors: Enrique Cadenas and Kelvin J. A. Davies. *oxidative stress* 9.

(54) Genestra, M. Oxyl Radicals, Redox-Sensitive Signalling Cascades and Antioxidants. *Cellular Signalling* **2007**, 19 (9), 1807–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>.

(55) Alfonso-Prieto, M.; Biarnés, X.; Vidossich, P.; Rovira, C. The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131 (33), 11751–11761. <https://doi.org/10.1021/ja9018572>.

(56) Whittaker, J. W. Non-Heme Manganese Catalase – The ‘Other’ Catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2012**, 525 (2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.008>.

(57) Nelson, D. P.; Kiesow, L. A. Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25° C (with Molar Extinction Coefficients of H₂O₂ Solutions in the UV). *Analytical Biochemistry* **1972**, 49 (2), 474–478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4).

(58) Zhang, J. Synthesis, Crystal Structure and Properties of a New Dinuclear Manganese(III) Complex: A Mimic for Catalase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2001**, 86 (2–3), 573–579. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00209-4).

(59) Alfonso-Prieto, M.; Vidossich, P.; Rovira, C. The Reaction Mechanisms of Heme Catalases: An Atomistic View by Ab Initio Molecular Dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2012**, 525 (2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.004>.

(60) Stillman, M. Biological Inorganic Chemistry. Structure and Reactivity. Herausgegeben von Ivano Bertini, Harry B. Gray, Edward I. Stiefel und Joan S. Valentine. *Angew. Chem.* **2007**,

119 (46), 8895–8896. <https://doi.org/10.1002/ange.200785504>.

(61) Huang, X.; Groves, J. T. Oxygen Activation and Radical Transformations in Heme Proteins and Metalloporphyrins. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (5), 2491–2553. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00373>.

(62) Allgood, G. S.; Perry, J. J. Characterization of a Manganese-Containing Catalase from the Obligate Thermophile *Thermoplasma Acidophilum*. *J. BACTERIOL.* **1986**, *168*, 5.

(63) Shank, M.; Barynin, V.; Dismukes, G. C. Protein Coordination to Manganese Determines the High Catalytic Rate of Dimanganese Catalases. Comparison to Functional Catalase Mimics. *Biochemistry* **1994**, *33* (51), 15433–15436. <https://doi.org/10.1021/bi00255a025>.

(64) Waldo, G. S.; Penner-Hahn, J. E. Mechanism of Manganese Catalase Peroxide Disproportionation: Determination of Manganese Oxidation States during Turnover. *Biochemistry* **1995**, *34* (5), 1507–1512. <https://doi.org/10.1021/bi00005a006>.

(65) Khangulov, S. V.; Barynin, V. V.; Antonyuk-Barynina, S. V. Manganese-Containing Catalase from *Thermus Thermophilus* Peroxide-Induced Redox Transformation of Manganese Ions in Presence of Specific Inhibitors of Catalase Activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1990**, *1020* (1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90089-M](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90089-M).

(66) Greenwald, R. A. Superoxide Dismutase and Catalase as Therapeutic Agents for Human Diseases a Critical Review. *Free Radical Biology and Medicine* **1990**, *8* (2), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90092-W](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90092-W).

(67) Rosenfeld, W.; Evans, H.; Concepcion, L.; Jhaveri, R.; Schaeffer, H.; Friedman, A. Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia by Administration of Bovine Superoxide Dismutase in Preterm Infants with Respiratory Distress Syndrome. *The Journal of Pediatrics* **1984**, *105* (5), 781–785. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(84\)80307-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(84)80307-8).

(68) Cuevas, P.; Carceller-Benito, F.; Reimers, D. Administration of Bovine Superoxide Dismutase Prevents Sequelae of Spinal Cord Ischemia in the Rabbit. *Anat Embryol* **1989**, *179* (3), 251–255. <https://doi.org/10.1007/BF00326590>.

(69) Emerit, J.; Loeper, J.; Chomette, G. Superoxide Dismutase in the Treatment of Post-Radiotherapeutic Necrosis and of Crohn's Disease. *Bull Eur Physiopathol Respir* **1981**, *17 Suppl*, 287.

(70) Playter, R. F.; Ellett, E. W.; Brown, C. D.; Lynd, F. T. Superoxide Dismutase Drug Study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1980**, *176* (7), 586, 598.

(71) Brainard, J.; Hanna, C.; Petursson, G. Evaluation of Superoxide Dismutase (Orgotein) in Medical Treatment of Canine Cataract. *Archives of Ophthalmology* **1982**, *100* (11), 1832–

1834. <https://doi.org/10.1001/archopht.1982.01030040812022>.

(72) Nirankari, V. S. Superoxide Radical Scavenging Agents in Treatment of Alkali Burns: An Experimental Study. *Arch Ophthalmol* **1981**, 99 (5), 886. <https://doi.org/10.1001/archopht.1981.03930010886020>.

(73) Guy, J.; Ellis, E. A.; Hope, G. M.; Rao, N. A. Influence of Antioxidant Enzymes in Reduction of Optic Disc Edema in Experimental Optic Neuritis. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* **1986**, 2 (5–6), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0748-5514\(86\)80035-6](https://doi.org/10.1016/S0748-5514(86)80035-6).

(74) Gerdes, J. S. Superoxide Dismutase in Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia. *The Journal of Pediatrics* **1985**, 106 (6), 1057–1058. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(85\)80269-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(85)80269-9).

(75) Jakab, N. I.; Jancsó, A.; Gajda, T.; Gyurcsik, B.; Rockenbauer, A. Copper(II), Nickel(II) and Zinc(II) Complexes of N-Acetyl-His-Pro-His-His-NH₂: Equilibria, Solution Structure and Enzyme Mimicking. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102 (7), 1438–1448. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.01.006>.

(76) Karlsson, J. O. G.; Ignarro, L. J.; Lundström, I.; Jynge, P.; Almén, T. Calmangafodipir [Ca₄Mn(DPDP)₅], Mangafodipir (MnDPDP) and MnPLED with Special Reference to Their SOD Mimetic and Therapeutic Properties. *Drug Discovery Today* **2015**, 20 (4), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.008>.

(77) Seguí, J.; Gironella, M.; Sans, M.; Granell, S.; Gil, F.; Gimeno, M.; Coronel, P.; Piqué, J. M.; Panés, J. Superoxide Dismutase Ameliorates TNBS-Induced Colitis by Reducing Oxidative Stress, Adhesion Molecule Expression, and Leukocyte Recruitment into the Inflamed Intestine. *Journal of Leukocyte Biology* **2004**, 76 (3), 537–544. <https://doi.org/10.1189/jlb.0304196>.

(78) Chihichin, D. G.; Kotseruba, V. A.; Levchenko, O. A.; Masanovets, G. N.; Seyfullina, I. I.; Kamalov, G. L. Catalase Activity of Cobalt(II) Complexes with N,N,N',N'-Tetrasubstituted Thiocarbamoylsulfenamides. *Russian Journal of General Chemistry* **2013**, 83 (5), 915–927. <https://doi.org/10.1134/S107036321305006X>.

(79) Sigel, H. Catalase and Peroxidase Activity of Cu²⁺ Complexes. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1969**, 8 (3), 167–177. <https://doi.org/10.1002/anie.196901671>.

(80) Fisher, A. E. O.; Maxwell, S. C.; Naughton, D. P. Catalase and Superoxide Dismutase Mimics for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Inorganic Chemistry Communications* **2003**, 6 (9), 1205–1208. [https://doi.org/10.1016/S1387-7003\(03\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S1387-7003(03)00223-5).

(81) Tovmasyan, A.; Maia, C. G. C.; Weitner, T.; Carballal, S.; Sampaio, R. S.; Lieb, D.; Ghazaryan, R.; Ivanovic-Burmazovic, I.; Ferrer-Sueta, G.; Radi, R.; Reboucas, J. S.;

- Spasojevic, I.; Benov, L.; Batinic-Haberle, I. A Comprehensive Evaluation of Catalase-like Activity of Different Classes of Redox-Active Therapeutics. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *86*, 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.018>.
- (82) Signorella, S.; Palopoli, C.; Ledesma, G. Rationally Designed Mimics of Antioxidant Manganoenzymes: Role of Structural Features in the Quest for Catalysts with Catalase and Superoxide Dismutase Activity. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *365*, 75–102. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.005>.
- (83) Signorella, S.; Hureau, C. Bioinspired Functional Mimics of the Manganese Catalases. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256* (11–12), 1229–1245. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.003>.
- (84) Jiang, X.; Liu, H.; Zheng, B.; Zhang, J. Coordination Modes of Bridge Carboxylates in Dinuclear Manganese Compounds Determine Their Catalase-like Activities. *Dalton Trans.* **2009**, No. 40, 8714. <https://doi.org/10.1039/b907687e>.
- (85) Solís, V.; Palopoli, C.; Daier, V.; Rivière, E.; Collin, F.; Moreno, D. M.; Hureau, C.; Signorella, S. Tuning the Mn II 2 /Mn III 2 Redox Cycle of a Phenoxo-Bridged DiMn Catalase Mimic with Terminal Carboxylate Donors. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *182*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.01.013>.
- (86) Triller, M. U.; Hsieh, W.-Y.; Pecoraro, V. L.; Rompel, A.; Krebs, B. Preparation of Highly Efficient Manganese Catalase Mimics ¹. *Inorganic Chemistry* **2002**, *41* (21), 5544–5554. <https://doi.org/10.1021/ic025897a>.
- (87) Shin, B. K.; Kim, M.; Han, J. Hydrogen Peroxide Disproportionation by the [TPA₂Mn₂(μ-Cl)₂]₂⁺ Complex. *Polyhedron* **2010**, *29* (12), 2560–2568. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2010.05.029>.
- (88) Catalysis and Kinetics of Hydrogen Peroxide Disproportionation by Dinuclear Manganese(III) Complexes of 1,5-Bis(Salicylidenamino)Pentan-3-ol and the 5-Bromophenyl-Substituted Derivative.
- (89) Suh, J.; Chei, W. S. Metal Complexes as Artificial Proteases: Toward Catalytic Drugs. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12* (2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.028>.
- (90) Noffke, A. L.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. Designing Organometallic Compounds for Catalysis and Therapy. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (43), 5219. <https://doi.org/10.1039/c2cc30678f>.
- (91) Soldevila-Barreda, J. J.; Sadler, P. J. Approaches to the Design of Catalytic Metallodrugs. *Current Opinion in Chemical Biology* **2015**, *25*, 172–183.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.01.024>.

(92) Henninot, A.; Collins, J. C.; Nuss, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (4), 1382–1414. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00318>.

(93) Lu, Y.; Yeung, N.; Sieracki, N.; Marshall, N. M. Design of Functional Metalloproteins. *Nature* **2009**, *460* (7257), 855–862. <https://doi.org/10.1038/nature08304>.

(94) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26* (10), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.

(95) Banting, F. G.; Best, C. H.; Collip, J. B.; Campbell, W. R.; Fletcher, A. A. Pancreatic Extracts in The Treatment of Diabetes Mellitus. *Diabetes* **1956**, *5* (1), 69–71. <https://doi.org/10.2337/diab.5.1.69>.

(96) Shampo, M. A.; Kyle, R. A. Frederick Banting—Nobel Laureate for Discovery of Insulin. *Mayo Clinic Proceedings* **2005**, *80* (5), 576. <https://doi.org/10.4065/80.5.576>.

(97) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discovery Today* **2015**, *20* (1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>.

(98) Di, L. Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties. *AAPS J* **2015**, *17* (1), 134–143. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>.

(99) Puente, X. S.; Gutiérrez-Fernández, A.; Ordóñez, G. R.; Hillier, L. W.; López-Otín, C. Comparative Genomic Analysis of Human and Chimpanzee Proteases. *Genomics* **2005**, *86* (6), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.07.009>.

(100) Werle, M.; Bernkop-Schnürch, A. Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs. *Amino Acids* **2006**, *30* (4), 351–367. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0289-3>.

(101) Decaffmeyer, M.; Thomas, A.; Brasseur, R. Les médicaments peptidiques : mythe ou réalité ? *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008**, *8*.

(102) Lien, S.; Lowman, H. B. Therapeutic Peptides. *Trends in Biotechnology* **2003**, *21* (12), 556–562. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.005>.

(103) Edman, P.; Högfeldt, E.; Sillén, L. G.; Kinell, P.-O. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 283–293. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0283>.

(104) Bergmann, M. SYNTHESIS AND DEGRADATION OF PROTEINS IN THE LABORATORY AND IN METABOLISM. *Science* **1934**, *79* (2055), 439–445. <https://doi.org/10.1126/science.79.2055.439>.

- (105) Chojj. La Dégradation d'Edman avec générique acide aminé de la chaîne peptidique. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5878673> (accessed Sep 1, 2020).
- (106) Walsh, C. T.; O'Brien, R. V.; Khosla, C. Nonproteinogenic Amino Acid Building Blocks for Nonribosomal Peptide and Hybrid Polyketide Scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (28), 7098–7124. <https://doi.org/10.1002/anie.201208344>.
- (107) Dancojocari. Structure et classification des 21 acides aminés protéinogènes des eucaryotes. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9176441> (accessed Sep 1, 2020).
- (108) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85 (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- (109) Kim, S.-T. Peptide Coupling Agents. In *Encyclopedia of Toxicology*; Elsevier, **2014**; pp 786–787. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00642-4>.
- (110) Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* **2009**, 35 (3), 161–214. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x>.
- (111) Guzman, F.; Barberis, S.; Illanes, A. Peptide Synthesis: Chemical or Enzymatic. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, 10 (2), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-13>.
- (112) Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J. Use of Peptide Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, 81 (13), 3998–4002. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.13.3998>.
- (113) Gorman, J. J. An Apparatus for Simultaneous Manual Solid-Phase Synthesis of Multiple Peptide Analogs. *Analytical Biochemistry* **1984**, 136 (2), 397–406. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90235-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90235-5).
- (114) Houghten, R. A. General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, 82 (15), 5131–5135. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.15.5131>.
- (115) Lam, K. S.; Kazmierskit, W. M. A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-Binding Activity. **1991**, 354, 3.
- (116) Dibó, G. Combinatorial Chemistry Has Matured in the Last Three Decades: Dedicated to Professor Árpád Furka on the Occasion of His 80th Birthday. *Molecular Diversity* **2012**, 16 (1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/s11030-011-9351-0>.
- (117) Furka, Á.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. General Method for Rapid Synthesis

of Multicomponent Peptide Mixtures. *International Journal of Peptide and Protein Research* **2009**, 37 (6), 487–493. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1991.tb00765.x>.

(118) Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchňák, V. The “One-Bead-One-Compound” Combinatorial Library Method. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (2), 411–448. <https://doi.org/10.1021/cr9600114>.

(119) Liu, R.; Li, X.; Lam, K. S. Combinatorial Chemistry in Drug Discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2017**, 38, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.017>.

(120) Bionda, N.; Fleeman, R. M.; de la Fuente-Núñez, C.; Rodriguez, M. C.; Reffuveille, F.; Shaw, L. N.; Pastar, I.; Davis, S. C.; Hancock, R. E. W.; Cudic, P. Identification of Novel Cyclic Lipopeptides from a Positional Scanning Combinatorial Library with Enhanced Antibacterial and Antibiofilm Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 108, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.032>.

(121) Trinh, T. B.; Upadhyaya, P.; Qian, Z.; Pei, D. Discovery of a Direct Ras Inhibitor by Screening a Combinatorial Library of Cell-Permeable Bicyclic Peptides. *ACS Comb. Sci.* **2016**, 18 (1), 75–85. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.5b00164>.

(122) Corson, A. E.; Armstrong, S. A.; Wright, M. E.; McClelland, E. E.; Bicker, K. L. Discovery and Characterization of a Peptoid with Antifungal Activity against *Cryptococcus Neoformans*. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7 (12), 1139–1144. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00338>.

(123) Guan, M.; Yao, W.; Liu, R.; Lam, K. S.; Nolta, J.; Jia, J.; Panganiban, B.; Meng, L.; Zhou, P.; Shahnazari, M.; Ritchie, R. O.; Lane, N. E. Directing Mesenchymal Stem Cells to Bone to Augment Bone Formation and Increase Bone Mass. *Nat Med* **2012**, 18 (3), 456–462. <https://doi.org/10.1038/nm.2665>.

(124) Aquino, C.; Sarkar, M.; Chalmers, M. J.; Mendes, K.; Kodadek, T.; Micalizio, G. C. A Biomimetic Polyketide-Inspired Approach to Small-Molecule Ligand Discovery. *Nature Chem* **2012**, 4 (2), 99–104. <https://doi.org/10.1038/nchem.1200>.

(125) Mamidala, R.; Majumdar, P.; Jha, K. K.; Bathula, C.; Agarwal, R.; Chary, M. T.; Majumder, H. K.; Munshi, P.; Sen, S. Identification of Leishmania Donovanii Topoisomerase 1 Inhibitors via Intuitive Scaffold Hopping and Bioisosteric Modification of Known Top 1 Inhibitors. *Sci Rep* **2016**, 6 (1), 26603. <https://doi.org/10.1038/srep26603>.

(126) Daguer, J.-P.; Zambaldo, C.; Ciobanu, M.; Morieux, P.; Barluenga, S.; Winssinger, N. DNA Display of Fragment Pairs as a Tool for the Discovery of Novel Biologically Active Small Molecules. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (1), 739–744. <https://doi.org/10.1039/C4SC01654H>.

(127) Samain, F.; Ekblad, T.; Mikutis, G.; Zhong, N.; Zimmermann, M.; Nauer, A.; Bajic, D.; Decurtins, W.; Scheuermann, J.; Brown, P. J.; Hall, J.; Gräslund, S.; Schüler, H.; Neri, D.;

- Franzini, R. M. Tankyrase 1 Inhibitors with Drug-like Properties Identified by Screening a DNA-Encoded Chemical Library. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (12), 5143–5149. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00432>.
- (128) Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T. Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery. **1991**, *354*, 3.
- (129) Blondelle, S. E.; Pérez-Payá, E.; Houghten, R. A. Synthetic Combinatorial Libraries: Novel Discovery Strategy for Identification of Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40* (5), 1067–1071. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.5.1067>.
- (130) Licini, G.; Scrimin, P. Metal-Ion-Binding Peptides: From Catalysis to Protein Tagging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (38), 4572–4575. <https://doi.org/10.1002/anie.200301668>.
- (131) Hellinga, H. W. Construction of a Blue Copper Analogue through Iterative Rational Protein Design Cycles Demonstrates Principles of Molecular Recognition in Metal Center Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (39), 10055–10066. <https://doi.org/10.1021/ja980054x>.
- (132) Schnepf, R.; Hörth, P.; Bill, E.; Wieghardt, K.; Hildebrandt, P.; Haehnel, W. *De Novo* Design and Characterization of Copper Centers in Synthetic Four-Helix-Bundle Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (10), 2186–2195. <https://doi.org/10.1021/ja001880k>.
- (133) Francis, M. B.; Jacobsen, E. N. Discovery of Novel Catalysts for Alkene Epoxidation from Metal-Binding Combinatorial Libraries. **5**.
- (134) Berkessel, A. Discovery of Peptide-Zirconium Complexes That Mediate Phosphate Hydrolysis by Batch Screening of a Combinatorial Undcapeptide Library. **4**.
- (135) Berkessel, A.; Riedl, R. Combinatorial de Novo Synthesis of Catalysts: How Much of a Hit-Structure Is Needed for Activity? *J. Comb. Chem.* **2000**, *2* (3), 215–219. <https://doi.org/10.1021/cc990073i>.
- (136) Huang, X.; Pieczko, M. E.; Long, E. C. Combinatorial Optimization of the DNA Cleaving Ni(II)·Xaa-Xaa-His Metallotriptide Domain[†]. *Biochemistry* **1999**, *38* (7), 2160–2166. <https://doi.org/10.1021/bi982587o>.
- (137) Martin, L.; Cornille, F.; Turcaud, S.; Meudal, H.; Roques, B. P.; Fournié-Zaluski, M.-C. Metallopeptidase Inhibitors of Tetanus Toxin: A Combinatorial Approach. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (3), 515–525. <https://doi.org/10.1021/jm981066w>.
- (138) Soleilhac, J.-M.; Cornille, F.; Martin, L.; Lenoir, C.; Fournié-Zaluski, M.-C.; Roques, B. P. A Sensitive and Rapid Fluorescence-Based Assay for Determination of Tetanus Toxin Peptidase Activity. *Analytical Biochemistry* **1996**, *241* (1), 120–127.

<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0385>.

- (139) Rau, H. K.; DeJonge, N.; Haehnel, W. Combinatorial Synthesis of Four-Helix Bundle Hemoproteins for Tuning of Cofactor Properties. *4*.
- (140) Vincent, A.; Fores, J. R.; Tauziet, E.; Quévrain, E.; Dancs, Á.; Conte-Daban, A.; Bernard, A.-S.; Pelupessy, P.; Coulibaly, K.; Seksik, P.; Hureau, C.; Selmeczi, K.; Policar, C.; Delsuc, N. An Easy-to-Implement Combinatorial Approach Involving an Activity-Based Assay for the Discovery of a Peptidyl Copper Complex Mimicking Superoxide Dismutase. *Chem. Commun.* **2020**, 56 (3), 399–402. <https://doi.org/10.1039/C9CC07920C>.
- (141) Moffet, D. A.; Certain, L. K.; Smith, A. J.; Kessel, A. J.; Beckwith, K. A.; Hecht, M. H. Peroxidase Activity in Heme Proteins Derived from a Designed Combinatorial Library. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (31), 7612–7613. <https://doi.org/10.1021/ja001198q>.
- (142) Franz, K. J.; Maglathlin, R. L.; Imperiali, B. A Powerful Combinatorial Screen to Identify High-Affinity Terbium(III)-Binding Peptides. *ChemBioChem* **2003**, 4 (4), 272–276. <https://doi.org/10.1002/cbic.200390047>.
- (143) Minogue, E. M.; Havrilla, G. J.; Taylor, T. P.; Warner, B. P.; Burrell, A. K. An Ultra High Throughput, Double Combinatorial Screening Method of Peptide–Metal Binding. *New J. Chem.* **2006**, 30 (8), 1145–1148. <https://doi.org/10.1039/B603347D>.
- (144) Hoffmann, C.; Blechschmidt, D.; Krüger, R.; Karas, M.; Griesinger, C. Mass Spectrometric Sequencing of Individual Peptides from Combinatorial Libraries via Specific Generation of Chain-Terminated Sequences. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, 4 (1), 79–86. <https://doi.org/10.1021/cc010057x>.
- (145) Sóvágó, I.; Várnagy, K.; Lihi, N.; Grenács, Á. Coordinating Properties of Peptides Containing Histidyl Residues. *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, 327–328, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.04.015>.
- (146) Irving, H.; Williams, R. J. P. 637. The Stability of Transition-Metal Complexes. *J. Chem. Soc.* **1953**, No. 0, 3192–3210. <https://doi.org/10.1039/JR9530003192>.
- (147) Bóka, B.; Myari, A.; Sóvágó, I.; Hadjiliadis, N. Copper(II) and Zinc(II) Complexes of the Peptides Ac-HisValHis-NH₂ and Ac-HisValGlyAsp-NH₂ Related to the Active Site of the Enzyme CuZnSOD. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, 98 (1), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.09.012>.
- (148) Kállay, C.; Várnagy, K.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sanna, D.; Sóvágó, I. Thermodynamic and Structural Characterization of the Macrochelates Formed in the Reactions of Copper(II) and Zinc(II) Ions with Peptides of Histidine. *Inorganica Chimica Acta* **2009**, 362 (3), 935–945. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2008.01.022>.

- (149) Csire, G.; Timári, S.; Asztalos, J.; Király, J. M.; Kiss, M.; Várnagy, K. Coordination, Redox Properties and SOD Activity of Cu(II) Complexes of Multihistidine Peptides. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2017**, *177*, 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.033>.
- (150) Facchin, G.; Torre, M. H.; Kremer, E.; Baran, E. J.; Mombrú, A.; Pardo, H.; Araujo, M. P.; Batista, A. A.; Costa-Filho, A. J. Cu(II) Complexation with His–Gly and His–Ala. X-Ray Structure of [Cu(His–Gly)₂(H₂O)₂]·6H₂O. *Inorganica Chimica Acta* **2003**, *355*, 408–413. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00295-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00295-0).
- (151) Harford, C.; Sarkar, B. 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. <https://doi.org/10.1021/ar9501535>.
- (152) Gonzalez, P.; Bossak, K.; Stefaniak, E.; Hureau, C.; Raibaut, L.; Bal, W.; Faller, P. N-Terminal Cu-Binding Motifs (Xxx-Zzz-His, Xxx-His) and Their Derivatives: Chemistry, Biology and Medicinal Applications. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (32), 8029–8041. <https://doi.org/10.1002/chem.201705398>.
- (153) Neupane, K. P.; Aldous, A. R.; Kritzer, J. A. Macrocyclization of the ATCUN Motif Controls Metal Binding and Catalysis. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (5), 2729–2735. <https://doi.org/10.1021/ic302820z>.
- (154) Myari, A.; Malandrinos, G.; Deligiannakis, Y.; Plakatouras, J. C.; Hadjiliadis, N.; Nagy, Z.; Sòvágó, I. Interaction of Cu²⁺ with His–Val–His and of Zn²⁺ with His–Val–Gly–Asp, Two Peptides Surrounding Metal Ions in Cu,Zn-Superoxide Dismutase Enzyme. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2001**, *85* (4), 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00204-5).
- (155) Trapaidze, A.; Hureau, C.; Bal, W.; Winterhalter, M.; Faller, P. Thermodynamic Study of Cu²⁺ Binding to the DAHK and GHK Peptides by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) with the Weaker Competitor Glycine. *J Biol Inorg Chem* **2012**, *17* (1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0824-5>.
- (156) Medici, S.; Peana, M.; Delogu, L. G.; Zoroddu, M. A. Mn(II) and Zn(II) Interactions with Peptide Fragments from Parkinson's Disease Genes. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (15), 4378. <https://doi.org/10.1039/c2dt12168a>.
- (157) Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P.; Keough, T. Generation and Screening of Combinatorial Peptide Libraries Designed for Rapid Sequencing by Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (14), 3900–3906. <https://doi.org/10.1021/ja00119a002>.
- (158) Yu, Z.; Chu, Y.-H. COMBINATORIAL EPITOPE SEARCH" PITFALLS OF

LIBRARY DESIGN. 4.

- (159) Yu, Z.; Tu, J.; Chu, Y.-H. Confirmation of Cross-Reactivity between Lyme Antibody H9724 and Human Heat Shock Protein 60 by a Combinatorial Approach. *Anal. Chem.* **1997**, 69 (22), 4515–4518. <https://doi.org/10.1021/ac9708405>.
- (160) Weydert, C. J.; Cullen, J. J. Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue. *Nature Protocols* **2010**, 5 (1), 51–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>.
- (161) Michaeli, A.; Feitelson, J. REACTIVITY OF SINGLET OXYGEN TOWARD AMINO ACIDS AND PEPTIDES. *Photochem Photobiol* **1994**, 59 (3), 284–289. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05035.x>.
- (162) Davies, M. J. Singlet Oxygen-Mediated Damage to Proteins and Its Consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, 305 (3), 761–770. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9).
- (163) Stadtman, E. R.; Levine, R. L. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids* **2003**, 25 (3–4), 207–218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>.
- (164) Di Costanzo, L.; Flores, L. V.; Christianson, D. W. Stereochemistry of Guanidine-Metal Interactions: Implications for L-Arginine-Metal Interactions in Protein Structure and Function. *Proteins* **2006**, 65 (3), 637–642. <https://doi.org/10.1002/prot.21127>.
- (165) Beers, R. F.; Sizer, I. W. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. *J. Biol. Chem.* **1952**, 195 (1), 133–140.
- (166) Edelhoch, H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins *. *Biochemistry* **1967**, 6 (7), 1948–1954. <https://doi.org/10.1021/bi00859a010>.
- (167) Anwar, Z. M.; Azab, H. A. Ternary Complexes in Solution. Comparison of the Coordination Tendency of Some Biologically Important Zwitterionic Buffers toward the Binary Complexes of Some Transition Metal Ions and Some Amino Acids. *J. Chem. Eng. Data* **1999**, 44 (6), 1151–1157. <https://doi.org/10.1021/je9901031>.
- (168) van Niekerk, J. N.; Schoening, F. R. L. A New Type of Copper Complex as Found in the Crystal Structure of Cupric Acetate, $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Acta Cryst* **1953**, 6 (3), 227–232. <https://doi.org/10.1107/S0365110X53000715>.
- (169) Brown, G. M.; Chidambaram, R. Dinuclear Copper(II) Acetate Monohydrate: A Redetermination of the Structure by Neutron-Diffraction Analysis. *Acta Crystallogr B Struct Crystallogr Cryst Chem* **1973**, 29 (11), 2393–2403. <https://doi.org/10.1107/S0567740873006758>.

- (170) Catterick, J.; Thornton, P. Structures and Physical Properties of Polynuclear Carboxylates. In *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*; Elsevier, 1977; Vol. 20, pp 291–362. [https://doi.org/10.1016/S0065-2792\(08\)60041-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2792(08)60041-2).
- (171) Bonomo, R. P. EPR Reinvestigation of the Copper(II)-Imidazole System. *Inorganic Chemistry* **1988**, 27 (14), 2510–2512.
- (172) Valentine, J. S.; Mota de Freitas, D. Copper-Zinc Superoxide Dismutase: A Unique Biological “Ligand” for Bioinorganic Studies. *Journal of Chemical Education* **1985**, 62 (11), 990. <https://doi.org/10.1021/ed062p990>.
- (173) Pantoliano, M. W.; Valentine, J. S.; Nafie, L. A. Spectroscopic Studies of Copper(II) Bound at the Native Copper Site or Substituted at the Native Zinc Site of Bovine Erythrocuprein (Superoxide Dismutase). *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104 (23), 6310–6317. <https://doi.org/10.1021/ja00387a027>.
- (174) Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural Implications Derived from the Analysis of Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Natural and Artificial Copper Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, 165 (2), 691–708. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90298-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90298-7).
- (175) Sakaguchi, U.; Addison, A. W. Spectroscopic and Redox Studies of Some Copper(II) Complexes with Biomimetic Donor Atoms: Implications for Protein Copper Centres. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1979**, No. 4, 600. <https://doi.org/10.1039/dt9790000600>.
- (176) Scheller, K. H.; Abel, T. H. J.; Polanyi, P. E.; Wenk, P. K.; Fischer, B. E.; Sigel, H. Metal Ion/Buffer Interactions. *European Journal of Biochemistry* **1980**, 107 (2), 455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb06051.x>.
- (177) Mash, H. E.; Chin, Y.-P.; Sigg, L.; Hari, R.; Xue, H. Complexation of Copper by Zwitterionic Aminosulfonic (Good) Buffers. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (3), 671–677. <https://doi.org/10.1021/ac0261101>.
- (178) Conte-Daban, A.; Borghesani, V.; Sayen, S.; Guillon, E.; Journaux, Y.; Gontard, G.; Lisnard, L.; Hureau, C. Link between Affinity and Cu(II) Binding Sites to Amyloid- β Peptides Evaluated by a New Water-Soluble UV–Visible Ratiometric Dye with a Moderate Cu(II) Affinity. *Anal. Chem.* **2017**, 89 (3), 2155–2162. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04979>.
- (179) Iwase, T.; Tajima, A.; Sugimoto, S.; Okuda, K.; Hironaka, I.; Kamata, Y.; Takada, K.; Mizunoe, Y. A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach. *Scientific Reports* **2013**, 3 (1). <https://doi.org/10.1038/srep03081>.
- (180) Euler, H. V.; Josephson, K. Über Katalase. I. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1927**, 452 (1), 158–181. <https://doi.org/10.1002/jlac.19274520112>.

- (181) Hadwan, M. H.; Abed, H. N. Data Supporting the Spectrophotometric Method for the Estimation of Catalase Activity. *Data in Brief* **2016**, *6*, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>.
- (182) Clark, L. C.; Wolf, R.; Granger, D.; Taylor, Z. *Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography*. *Journal of Applied Physiology* **1953**, *6* (3), 189–193. <https://doi.org/10.1152/jappl.1953.6.3.189>.
- (183) O'Connell, L. A schematic representation of Clark's 1962 invention, the Oxygen Electrode
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d6/Clark_Oxygen_Electrode.png.
- (184) Tovmasyan, A.; Maia, C. G. C.; Weitner, T.; Carballal, S.; Sampaio, R. S.; Lieb, D.; Ghazaryan, R.; Ivanovic-Burmazovic, I.; Ferrer-Sueta, G.; Radi, R.; Reboucas, J. S.; Spasojevic, I.; Benov, L.; Batinic-Haberle, I. A Comprehensive Evaluation of Catalase-like Activity of Different Classes of Redox-Active Therapeutics. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *86*, 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.018>.
- (185) Vincent, A.; Fores, J. R.; Tauziet, E.; Quévrain, E.; Dancs, Á.; Conte-Daban, A.; Bernard, A.-S.; Pelupessy, P.; Coulibaly, K.; Seksik, P.; Hureau, C.; Selmeczi, K.; Policar, C.; Delsuc, N. An Easy-to-Implement Combinatorial Approach Involving an Activity-Based Assay for the Discovery of a Peptidyl Copper Complex Mimicking Superoxide Dismutase. *Chem. Commun.* **2019**. <https://doi.org/10.1039/C9CC07920C>.
- (186) Scherer, W. F. J~PITH~LIAL CELLS (STRAIN HELA) DERIVED I~FROM AN EPIDEI~FOID CARCINOMA OF THE CERVIX. 21.
- (187) Ivanković, M.; Ćukušić, A.; Gotić, I.; Škrobot, N.; Matijašić, M.; Polančec, D.; Rubelj, I. Telomerase Activity in HeLa Cervical Carcinoma Cell Line Proliferation. *Biogerontology* **2007**, *8* (2), 163–172. <https://doi.org/10.1007/s10522-006-9043-9>.
- (188) Ambros, P. F.; Karlic, H. I. Chromosomal Insertion of Human Papillomavirus 18 Sequences in HeLa Cells Detected by Nonisotopic in Situ Hybridization and Reflection Contrast Microscopy. *Hum Genet* **1987**, *77* (3), 251–254. <https://doi.org/10.1007/BF00284479>.
- (189) Belousov, V. V.; Fradkov, A. F.; Lukyanov, K. A.; Staroverov, D. B.; Shakhbazov, K. S.; Terskikh, A. V.; Lukyanov, S. Genetically Encoded Fluorescent Indicator for Intracellular Hydrogen Peroxide. *Nat Methods* **2006**, *3* (4), 281–286. <https://doi.org/10.1038/nmeth866>.
- (190) Markvicheva, K. N.; Bogdanova, E. A.; Staroverov, D. B.; Lukyanov, S.; Belousov, V. V. Imaging of Intracellular Hydrogen Peroxide Production with HyPer upon Stimulation of HeLa Cells with EGF. In *Redox-Mediated Signal Transduction*; Hancock, J. T., Conway, M. E., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2019; Vol. 1990, pp

85–91. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9463-2_7.

(191) Nagai, T.; Sawano, A.; Park, E. S.; Miyawaki, A. Circularly Permuted Green Fluorescent Proteins Engineered to Sense Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98 (6), 3197–3202. <https://doi.org/10.1073/pnas.051636098>.

(192) Tsien, R. Y.; Baird, G.; Diego, S. (54) CIRCULARLY PERMIUTED FLUORESCENT PROTEIN INDICATORS. 59.

(193) Aslund, F.; Zheng, M.; Beckwith, J.; Storz, G. Regulation of the OxyR Transcription Factor by Hydrogen Peroxide and the Cellular Thiol--Disulfide Status. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96 (11), 6161–6165. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6161>.

(194) Choi, H.-J.; Kim, S.-J.; Mukhopadhyay, P.; Cho, S.; Woo, J.-R.; Storz, G.; Ryu, S.-E. Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor. *Cell* **2001**, 105 (1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00300-2).

(195) Zheng, M. Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. *Science* **1998**, 279 (5357), 1718–1722. <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1718>.

(196) Mishina, N. M.; Markvicheva, K. N.; Bilan, D. S.; Matlashov, M. E.; Shirmanova, M. V.; Liebl, D.; Schultz, C.; Lukyanov, S.; Belousov, V. V. Chapter Three - Visualization of Intracellular Hydrogen Peroxide with HyPer, a Genetically Encoded Fluorescent Probe. In *Methods in Enzymology*; Cadenas, E., Packer, L., Eds.; Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part A; Academic Press, 2013; Vol. 526, pp 45–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405883-5.00003-X>.

(197) Gauron, C.; Meda, F.; Dupont, E.; Albadri, S.; Quenech'Du, N.; Ipendey, E.; Volovitch, M.; Del Bene, F.; Joliot, A.; Rampon, C.; Vríz, S. Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Controls Axon Pathfinding during Zebrafish Development. *Developmental Biology* **2016**, 414 (2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.004>.

(198) Steinhorn, B.; Sorrentino, A.; Badole, S.; Bogdanova, Y.; Belousov, V.; Michel, T. Chemogenetic Generation of Hydrogen Peroxide in the Heart Induces Severe Cardiac Dysfunction. *Nat Commun* **2018**, 9 (1), 4044. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06533-2>.

(199) Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. A. Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality. *Chemistry & Biology* **2014**, 21 (9), 1102–1114. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.001>.

(200) Modell, A. E.; Blosser, S. L.; Arora, P. S. Systematic Targeting of Protein–Protein Interactions. *Trends in Pharmacological Sciences* **2016**, 37 (8), 702–713.

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.008>.

(201) Milroy, L.-G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C. Modulators of Protein–Protein Interactions. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (9), 4695–4748. <https://doi.org/10.1021/cr400698c>.

(202) Sawyer, N.; Watkins, A. M.; Arora, P. S. Protein Domain Mimics as Modulators of Protein–Protein Interactions. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (6), 1313–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00130>.

(203) Watkins, A. M.; Arora, P. S. Structure-Based Inhibition of Protein–Protein Interactions. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *94*, 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.047>.

(204) Merritt, H. I.; Sawyer, N.; Arora, P. S. Bent into Shape: Folded Peptides to Mimic Protein Structure and Modulate Protein Function. *Pept Sci* **2020**, *112* (1). <https://doi.org/10.1002/pep2.24145>.

(205) Zimm, B. H.; Bragg, J. K. Theory of the Phase Transition between Helix and Random Coil in Polypeptide Chains. *The Journal of Chemical Physics* **1959**, *31* (2), 526–535. <https://doi.org/10.1063/1.1730390>.

(206) Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (31), 8896–8927. <https://doi.org/10.1002/anie.201412070>.

(207) Davis, J. M.; Tsou, L. K.; Hamilton, A. D. Synthetic Non-Peptide Mimetics of α -Helices. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 326–334. <https://doi.org/10.1039/B608043J>.

(208) Garner, J.; Harding, M. M. Design and Synthesis of α -Helical Peptides and Mimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (22), 3577. <https://doi.org/10.1039/b710425a>.

(209) Venkatachalam, C. M. Stereochemical Criteria for Polypeptides and Proteins. V. Conformation of a System of Three Linked Peptide Units. *Biopolymers* **1968**, *6* (10), 1425–1436. <https://doi.org/10.1002/bip.1968.360061006>.

(210) Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. Chain Reversals in Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1973**, *303* (2), 211–229. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90350-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90350-4).

(211) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. β -Turns in Proteins. *Journal of Molecular Biology* **1977**, *115* (2), 135–175. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90094-8).

(212) Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Over One Hundred Peptide-Activated G Protein-Coupled Receptors Recognize Ligands with Turn Structure. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (3), 793–826. <https://doi.org/10.1021/cr040689g>.

- (213) Ball, J. B.; Hughes, R. A.; Alewood, P. F.; Andrews, P. R. β -Turn Topography. *Tetrahedron* **1993**, 49 (17), 3467–3478. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90207-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90207-8).
- (214) Ball, J. B.; Alewood, P. F. Conformational Constraints: Nonpeptide β -Turn Mimics. *J. Mol. Recognit.* **1990**, 3 (2), 55–64. <https://doi.org/10.1002/jmr.300030202>.
- (215) Suat, K.; Jois, S. Design of β -Turn Based Therapeutic Agents. *CPD* **2003**, 9 (15), 1209–1224. <https://doi.org/10.2174/1381612033454900>.
- (216) Chou, K.-C. Prediction of Tight Turns and Their Types in Proteins. *Analytical Biochemistry* **2000**, 286 (1), 1–16. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4757>.
- (217) Giannis, A.; Ruebsam, F. ChemInform Abstract: Peptidomimetics in Drug Design. *ChemInform* **2010**, 28 (45), no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.199745312>.
- (218) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. Analysis and Prediction of the Different Types of β -Turn in Proteins. 12.
- (219) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. Turns in Peptides and Proteins. In *Advances in Protein Chemistry*; Elsevier, 1985; Vol. 37, pp 1–109. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60063-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60063-7).
- (220) Mattern, R.-H.; Moore, S. B.; Tran, T.-A.; Rueter, J. K.; Goodman, M. Synthesis, Biological Activities and Conformational Studies of Somatostatin Analogs. *Tetrahedron* **2000**, 56 (50), 9819–9831. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00889-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00889-9).
- (221) Souers, A. J.; Virgilio, A. A.; Rosenquist, Å.; Fenuik, W.; Ellman, J. A. Identification of a Potent Heterocyclic Ligand To Somatostatin Receptor Subtype 5 by the Synthesis and Screening of β -Turn Mimetic Libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (9), 1817–1825. <https://doi.org/10.1021/ja983742p>.
- (222) Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. A Revised Set of Potentials for β -Turn Formation in Proteins. *Protein Sci.* **1994**, 3 (12), 2207–2216. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031206>.
- (223) Marcelino, A. M. C.; Gierasch, L. M. Roles of β -Turns in Protein Folding: From Peptide Models to Protein Engineering. *Biopolymers* **2008**, 89 (5), 380–391. <https://doi.org/10.1002/bip.20960>.
- (224) Hruby, V. J.; al-Obeidi, F.; Kazmierski, W. Emerging Approaches in the Molecular Design of Receptor-Selective Peptide Ligands: Conformational, Topographical and Dynamic Considerations. *Biochemical Journal* **1990**, 268 (2), 249–262. <https://doi.org/10.1042/bj2680249>.
- (225) Geyer, A.; Mueller, G.; Kessler, H. Conformational Analysis of a Cyclic RGD Peptide Containing a Ψ [CH₂-NH] Bond: A Positional Shift in Backbone Structure Caused by a Single Dipeptide Mimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116 (17), 7735–7743.

<https://doi.org/10.1021/ja00096a034>.

(226) Rajeswaran, W. G.; Hocart, S. J.; Murphy, W. A.; Taylor, J. E.; Coy, D. H. *N*-Methyl Scan of Somatostatin Octapeptide Agonists Produces Interesting Effects on Receptor Subtype Specificity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (9), 1416–1421. <https://doi.org/10.1021/jm000361p>.

(227) Takeuchi, Y.; Marshall, G. R. Conformational Analysis of Reverse-Turn Constraints by *N*-Methylation and *N*-Hydroxylation of Amide Bonds in Peptides and Non-Peptide Mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5363–5372. <https://doi.org/10.1021/ja970855k>.

(228) Ro, S.; Lee, H.-J.; Ahn, I.-A.; Shin, D.-K.; Lee, K.-B.; Yoon, C.-J.; Choi, Y.-S. Torsion Angle Based Design of Peptidomimetics: A Dipeptidic Template Adopting β -I Turn (Ac-Aib-AzGly-NH₂). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9* (7), 1837–1841. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00094-3).

(229) DeMarco, S. J.; Henze, H.; Lederer, A.; Moehle, K.; Mukherjee, R.; Romagnoli, B.; Robinson, J. A.; Brianza, F.; Gombert, F. O.; Lociuoro, S.; Ludin, C.; Vrijbloed, J. W.; Zumbrunn, J.; Obrecht, J.-P.; Obrecht, D.; Brondani, V.; Hamy, F.; Klimkait, T. Discovery of Novel, Highly Potent and Selective β -Hairpin Mimetic CXCR4 Inhibitors with Excellent Anti-HIV Activity and Pharmacokinetic Profiles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14* (24), 8396–8404. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.003>.

(230) MacDonald, M.; Aube, J. Approaches to Cyclic Peptide Beeta Turn Mimics. *COC* **2001**, *5* (4), 417–438. <https://doi.org/10.2174/1385272013375517>.

(231) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. Analysis and Prediction of the Different Types of β -Turn in Proteins. *Journal of Molecular Biology* **1988**, *203* (1), 221–232. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90103-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90103-9).

(232) MacArthur, M. W.; Thornton, J. M. Influence of Proline Residues on Protein Conformation. *Journal of Molecular Biology* **1991**, *218* (2), 397–412. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90721-H](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90721-H).

(233) Chatterjee, B.; Saha, I.; Raghothama, S.; Aravinda, S.; Rai, R.; Shamala, N.; Balaram, P. Designed Peptides with Homochiral and Heterochiral Diproline Templates as Conformational Constraints. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (20), 6192–6204. <https://doi.org/10.1002/chem.200702029>.

(234) Schimmel, P. R.; Flory, P. J. Conformational Energies and Configurational Statistics of Copolypeptides Containing L-Proline. *Journal of Molecular Biology* **1968**, *34* (1), 105–120. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90237-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90237-4).

(235) Morris, A. L.; MacArthur, M. W.; Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. Stereochemical Quality of Protein Structure Coordinates. *Proteins* **1992**, *12* (4), 345–364.

<https://doi.org/10.1002/prot.340120407>.

(236) Morgan, A. A.; Rubenstein, E. Proline: The Distribution, Frequency, Positioning, and Common Functional Roles of Proline and Polyproline Sequences in the Human Proteome. *PLoS ONE* **2013**, *8* (1), e53785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053785>.

(237) Baldwin, R. L. The Search for Folding Intermediates and the Mechanism of Protein Folding. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125948>.

(238) Gill, S. C.; von Hippel, P. H. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry* **1989**, *182* (2), 319–326. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7).

(239) Shen, Y.; Maupetit, J.; Derreumaux, P.; Tufféry, P. Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (10), 4745–4758. <https://doi.org/10.1021/ct500592m>.

(240) Morrison, K. L.; Weiss, G. A. Combinatorial Alanine-Scanning. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5* (3), 302–307. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00206-4).

(241) Weiss, G. A.; Watanabe, C. K.; Zhong, A.; Goddard, A.; Sidhu, S. S. Rapid Mapping of Protein Functional Epitopes by Combinatorial Alanine Scanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (16), 8950–8954. <https://doi.org/10.1073/pnas.160252097>.

(242) Thordarson, P. Determining Association Constants from Titration Experiments in Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (3), 1305–1323. <https://doi.org/10.1039/C0CS00062K>.

(243) Rusling, J.; Kumosinski, T. Nonlinear Computer Modeling of Chemical and Biochemical Data. In *Nonlinear Computer Modeling of Chemical and Biochemical Data*; Academic press, 1996; p 13.

(244) Alies, B.; Renaglia, E.; Rózga, M.; Bal, W.; Faller, P.; Hureau, C. Cu(II) Affinity for the Alzheimer's Peptide: Tyrosine Fluorescence Studies Revisited. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (3), 1501–1508. <https://doi.org/10.1021/ac302629u>.

(245) Berti, E.; Caneschi, A.; Daignebonne, C.; Dapporto, P.; Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Guerri, A.; Micheloni, M.; Paoli, P.; Pontellini, R.; Rossi, P. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Dinuclear Metal Complexes with an Aza-Phenolic Ligand: Crystal Structures, Magnetic Properties, and Solution Studies. *Inorg. Chem.* **2003**, *42* (2), 348–357. <https://doi.org/10.1021/ic0204070>.

(246) Rajput, A.; Kumar, A.; Sengupta, A.; Tyagi, P.; Arora, H. Copper (II) Dimers Stabilized

- by Bis(Phenol) Amine Ligands: Theoretical and Experimental Insights. *New J. Chem.* **2018**, 42 (15), 12621–12631. <https://doi.org/10.1039/C8NJ02591F>.
- (247) Poole, L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, 80, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>.
- (248) Pirotte, N.; Stevens, A.-S.; Fraguas, S.; Plusquin, M.; Van Roten, A.; Van Belleghem, F.; Paesen, R.; Ameloot, M.; Cebrià, F.; Artois, T.; Smeets, K. Reactive Oxygen Species in Planarian Regeneration: An Upstream Necessity for Correct Patterning and Brain Formation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 2015, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2015/392476>.
- (249) Chen, Y.; Love, N. R.; Amaya, E. Tadpole Tail Regeneration in *Xenopus*. *Biochemical Society Transactions* **2014**, 42 (3), 617–623. <https://doi.org/10.1042/BST20140061>.
- (250) Love, N. R.; Chen, Y.; Ishibashi, S.; Kritsiligkou, P.; Lea, R.; Koh, Y.; Gallop, J. L.; Dorey, K.; Amaya, E. Amputation-Induced Reactive Oxygen Species Are Required for Successful *Xenopus* Tadpole Tail Regeneration. *Nat Cell Biol* **2013**, 15 (2), 222–228. <https://doi.org/10.1038/ncb2659>.
- (251) Gauron, C.; Meda, F.; Dupont, E.; Albadri, S.; Quenech'Du, N.; Ipendey, E.; Volovitch, M.; Del Bene, F.; Joliot, A.; Rampon, C.; Vríz, S. Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Controls Axon Pathfinding during Zebrafish Development. *Developmental Biology* **2016**, 414 (2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.004>.
- (252) Jelcic, M.; Enyedi, B.; Niethammer, P. Quantitative Imaging of Endogenous and Exogenous H₂O₂ Gradients in Live Zebrafish Larvae. In *NADPH Oxidases*; Knaus, U. G., Leto, T. L., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2019; Vol. 1982, pp 283–299. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_17.
- (253) Simkin, J.; Gawriluk, T. R.; Gensel, J. C.; Seifert, A. W. Macrophages Are Necessary for Epimorphic Regeneration in African Spiny Mice. *eLife* **2017**, 6, e24623. <https://doi.org/10.7554/eLife.24623>.
- (254) Meda, F.; Rampon, C.; Dupont, E.; Gauron, C.; Mourton, A.; Queguiner, I.; Thauvin, M.; Volovitch, M.; Joliot, A.; Vríz, S. Nerves, H₂O₂ and Shh: Three Players in the Game of Regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2018**, 80, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.015>.
- (255) Cordeiro, J. V.; Jacinto, A. The Role of Transcription-Independent Damage Signals in the Initiation of Epithelial Wound Healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, 14 (4), 249–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3541>.

- (256) Niethammer, P.; Grabher, C.; Look, A. T.; Mitchison, T. J. A Tissue-Scale Gradient of Hydrogen Peroxide Mediates Rapid Wound Detection in Zebrafish. *Nature* **2009**, *459* (7249), 996–999. <https://doi.org/10.1038/nature08119>.
- (257) Yoo, S. K.; Freisinger, C. M.; LeBert, D. C.; Huttenlocher, A. Early Redox, Src Family Kinase, and Calcium Signaling Integrate Wound Responses and Tissue Regeneration in Zebrafish. *The Journal of Cell Biology* **2012**, *199* (2), 225–234. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203154>.
- (258) van der Vliet, A.; Janssen-Heininger, Y. M. W. Hydrogen Peroxide as a Damage Signal in Tissue Injury and Inflammation: Murderer, Mediator, or Messenger?: Hydrogen Peroxide in Tissue Damage Responses. *J. Cell. Biochem.* **2014**, *115* (3), 427–435. <https://doi.org/10.1002/jcb.24683>.
- (259) Rampon, C.; Volovitch, M.; Joliot, A.; Vriza, S. Hydrogen Peroxide and Redox Regulation of Developments. *Antioxidants* **2018**, *7* (11), 159. <https://doi.org/10.3390/antiox7110159>.
- (260) Dudzińska, E.; Gryzinska, M.; Ognik, K.; Gil-Kulik, P.; Kocki, J. Oxidative Stress and Effect of Treatment on the Oxidation Product Decomposition Processes in IBD <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/7918261/> (accessed Mar 26, 2020). <https://doi.org/10.1155/2018/7918261>.
- (261) Biasi, F.; Leonarduzzi, G.; Oteiza, P. I.; Poli, G. Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Targets. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *19* (14), 1711–1747. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4530>.
- (262) Rezaie, A.; Parker, R. D.; Abdollahi, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? *Dig Dis Sci* **2007**, *52* (9), 2015–2021. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9622-2>.
- (263) Zhu, H.; Li, Y. R. Oxidative Stress and Redox Signaling Mechanisms of Inflammatory Bowel Disease: Updated Experimental and Clinical Evidence. *Exp Biol Med (Maywood)* **2012**, *237* (5), 474–480. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011358>.
- (264) Kruidenier, L.; Kuiper, I.; van Duijn, W.; Marklund, S. L.; van Hogezaand, R. A.; Lamers, C. B.; Verspaget, H. W. Differential Mucosal Expression of Three Superoxide Dismutase Isoforms in Inflammatory Bowel Disease. *J. Pathol.* **2003**, *201* (1), 7–16. <https://doi.org/10.1002/path.1407>.
- (265) Mathieu, E.; Bernard, A.-S.; Delsuc, N.; Quévrain, E.; Gazzah, G.; Lai, B.; Chain, F.; Langella, P.; Bachelet, M.; Masliah, J.; Seksik, P.; Policar, C. 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. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02695>.

(266) Nouaille, S.; Ribeiro, L. A.; Miyoshi, A.; Pontes, D.; Le Loir, Y.; Oliveira, S. C.; Langella, P.; Azevedo, V. Heterologous Protein Production and Delivery Systems for *Lactococcus Lactis*. *Genet. Mol. Res.* **2003**, *2* (1), 102–111.

(267) LeBlanc, J. G.; del Carmen, S.; Miyoshi, A.; Azevedo, V.; Sesma, F.; Langella, P.; Bermúdez-Humarán, L. G.; Watterlot, L.; Perdigon, G.; de Moreno de LeBlanc, A. Use of Superoxide Dismutase and Catalase Producing Lactic Acid Bacteria in TNBS Induced Crohn's Disease in Mice. *Journal of Biotechnology* **2011**, *151* (3), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.11.008>.

(268) An Export-Specific Reporter Designed for Gram-Positive Bacteria: Application to *Lactococcus Lactis* - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9537391/> (accessed Jun 22, 2020).

(269) Anthis, N. J.; Clore, G. M. Sequence-Specific Determination of Protein and Peptide Concentrations by Absorbance at 205 Nm: Sequence-Specific Protein Concentration at 205 Nm. *Protein Science* **2013**, *22* (6), 851–858. <https://doi.org/10.1002/pro.2253>.

(270) Tighe, A.; Staples, O.; Taylor, S. Mps1 Kinase Activity Restrains Anaphase during an Unperturbed Mitosis and Targets Mad2 to Kinetochores. *Journal of Cell Biology* **2008**, *181* (6), 893–901. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712028>.

(271) Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction. *Nat Protoc* **2010**, *5* (4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.

(272) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoseck, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.

(273) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (1), 405–413.

<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.

(274) Menet, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**, 2011 (437), 41–53. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71211-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71211-4).

(275) Moore, C. Mass Spectrometry. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Inc., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2000; p 1301191913151518.a01. <https://doi.org/10.1002/0471238961.1301191913151518.a01>.

(276) Loo, J. A.; Udseth, H. R.; Smith, R. D. Peptide and Protein Analysis by Electrospray Ionization-Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **1989**, 179 (2), 404–412. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90153-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90153-X).

(277) Nielen, M. W. F. Maldi Time-of-Flight Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. 36.

(278) Zenobi, R.; Knochenmuss, R. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. 30.

(279) Mikayé. Principe d'une source MALDI (Désorption ionisation laser assistée par matrice) <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25204006> (accessed Sep 1, 2020).

(280) Gbdivers. Source d'ionisation par électrospray. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5706051> (accessed Sep 1, 2020).

(281) Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. How to Study Proteins by Circular Dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2005**, 1751 (2), 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>.

(282) Woody, R. W. [4] Circular Dichroism. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1995; Vol. 246, pp 34–71. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)46006-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)46006-3).

(283) Titration Calorimétrique Isotherme (ITC) <https://www.malvernpanalytical.com/fr/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry>.

(284) Telser, J. ChemInform Abstract: Applications of Ligand-Field Analysis: Inspiration from Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Coordination Complexes of Transition Metal Ions. *ChemInform* **2008**, 39 (1). <https://doi.org/10.1002/chin.200801231>.

RÉSUMÉ

Les mimes de la catalase (CATm) sont des complexes métalliques capables de réduire le stress oxydant en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène. Le choix d'utiliser des peptides comme ligand est motivé par les propriétés intrinsèques des peptides à savoir une synthèse aisée et versatile et une bonne biocompatibilité. Pourtant, la conception rationnelle de séquences peptidiques permettant de coordonner des métaux et aboutir à des complexes ayant une activité catalase reste un réel défi, ce qui explique qu'à ce jour, aucun complexe de ce type n'ait été décrit dans la littérature. Pour contourner cette difficulté, nous avons développé une approche combinatoire « one-bead-one-complex » associée à une sélection basée sur l'activité catalase et la stabilité des complexes. Une librairie de 375 complexes a été générée et nous avons découvert un premier complexe peptidique de cuivre dinucléaire mimant l'activité de la catalase. Ce complexe a été étudié en détail en utilisant différentes méthodes analytiques et caractérisé pour son activité CAT hors contexte biologique et dans des modèles cellulaires. Inspirés par ce complexe, d'autres complexes ont été synthétisés et caractérisés.

MOTS CLÉS

Complexes métalliques. Mime de Catalase. Peptides. Antioxydant. Chimie bio-inorganique. Espèces réactives de l'oxygène.

ABSTRACT

Catalase mimics (CATm) are metal complexes capable to reduce oxidative stress by catalysing hydrogen peroxide dismutation. The use of peptides as ligand is motivated by the intrinsic properties of peptides: easy and versatile synthesis and good biocompatibility. However, the rational design of peptide sequences able to coordinate metals and that result in complexes with catalase activity remains a real challenge, which may explain why, to date, no complex of this type has been described in the literature. To circumvent this difficulty, we have developed a “one-bead-one-complex” combinatorial approach associated with a selection based on Catalase activity and complex stability. A library of 375 complexes was generated and we have discovered a first peptidyl di copper complex mimicking Catalase activity. This complex has been studied in detail using different analytical methods and characterized for its CAT activity out of biological context and in cells. Inspired by this first complex, others complexes have been synthesized and characterized.

KEYWORDS

Peptidyl metal complexes. Catalase mimics. Antioxidant. Bioinorganic chemistry, Reactive oxygen species