



HAL
open science

Etude de l'interaction de la thioflavine T et de complexes de ru(ii) avec le peptide amyloïde bêta dans le cadre de la maladie d'alzheimer

Hélène Eury

► **To cite this version:**

Hélène Eury. Etude de l'interaction de la thioflavine T et de complexes de ru(ii) avec le peptide amyloïde bêta dans le cadre de la maladie d'alzheimer. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2013. Français. NNT : 2013INPT0140 . tel-04312647

HAL Id: tel-04312647

<https://theses.hal.science/tel-04312647>

Submitted on 28 Nov 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Chimie Organométallique et de Coordination

Présentée et soutenue par :

Mme HELENE EURY

le lundi 16 décembre 2013

Titre :

ETUDE DE L'INTERACTION DE LA THIOFLAVINE T ET DE
COMPLEXES DE RU (II) AVEC LE PEPTIDE AMYLOÏDE BÊTA DANS LE
CADRE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie de Coordination (L.C.C.)

Directeur(s) de Thèse :

MME ISABELLE SASAKI

M. OLIVIER SAUREL

Rapporteurs :

M. FEDERICO CISNETTI, UNIVERSITE CLERMONT-FERRAND 2

M. OLIVIER SENEQUE, CEA GRENOBLE

Membre(s) du jury :

M. ERIC BENOIST, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. ALAIN MILON, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

Mme CHRISTINA SIZUN, CNRS GIF SUR YVETTE, Membre

Mme ODILE DECHY CABARET, INP TOULOUSE, Membre

M. PETER FALLER, CNRS TOULOUSE, Membre

M. RICHARD ORTEGA, UNIVERSITE BORDEAUX 1, Membre

Remerciements

Une thèse demande un investissement personnel important. Pendant trois ans, nous mangeons, dormons et ne pensons qu'à notre thèse. Mais la thèse est avant tout une aventure humaine faite de rencontres et surtout d'amitiés qui je l'espère perdureront au-delà de ces trois ans. Le doctorat aura été la période la plus difficile mais aussi l'une des plus belles de ma vie. Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à son écriture....

Merci au Dr Olivier Sénèque et au Dr Federico Cisnetti qui ont référé ce travail avec beaucoup d'attention et de rapidité. Je tiens également à remercier les différents membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail ainsi que pour la discussion scientifique qui a eu lieu au cours de ma soutenance.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Chimie de Coordination et l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale sous la direction d'Isabelle Sasaki, Chargée de Recherches au CNRS, que je remercie pour sa complétude dans l'encadrement de ma thèse, et d'Olivier Saurel, Ingénieur de Recherche au CNRS que je tiens à remercier pour ses remarques pertinentes, sa disponibilité et la patience dont il a fait preuve au cours de ces trois dernières années et qui a été nécessaire pour m'initier à la RMN.

Côté IPBS, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'ensemble des membres, présents et passés, de l'équipe RMN pour leur accueil et leur soutien au cours de mes séjours plus ou moins prolongés. Un merci tout particulier à Virginie pour ton soutien et les discussions shopping dans ton bureau. Greg, merci pour ce séjour inoubliable à Lisbonne on y retourne quand ? Merci au docteur Cala pour la bonne ambiance dans le bureau. Merci à Muriel pour les papotages et les soirées jeux de sociétés. Je n'oublie pas non plus Parth et le futur Dr Bichet.....

Côté LCC, je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Peter Fallér pour m'avoir accueilli au sein de son équipe il y a quatre ans lors de mon stage de Master 2. Merci pour ta disponibilité, les discussions scientifiques mais surtout pour ton soutien et ta confiance. Un énorme merci à Manu pour m'avoir accueilli dans son bureau durant la période de rédaction mais également pour sa constante bonne humeur et sa gentillesse. Une pensée particulière pour Viviane et Martine. Merci à vous deux, vous avez été d'un soutien énorme pendant ces derniers mois.

Je ne trouve pas les mots pour remercier comme il se doit Christelle. Cette thèse n'aurait pu aboutir sans ta patience, ton soutien, tes conseils, ta disponibilité constante (physique, par mail ou téléphone) et ton investissement dans cette thèse. Merci pour avoir pris le temps de lire et corriger mon travail et plus particulièrement le chapitre III. Je souhaite à tout étudiant d'avoir la chance de travailler avec toi. Je tiens également à remercier Laurent qui a dû subir ma thèse à la maison ! Des tonnes de chocolats ne seraient pas suffisantes pour vous remercier !

Merci également à tous les étudiants de l'équipe : Olivia, Pascal, Maud, Minh, Suzanna, Thais, Samantha, Maureen, Marie, Antoine, Sabrina, Clémence et tous les étudiants qui ont passés quelques mois ou semaines dans notre équipe et ont largement contribué à la bonne ambiance qui y règne.

La plupart des résultats présentés dans ce manuscrit n'auraient pu voir le jour sans l'aide précieuse de

-Fabrice Colin pour la spectro de masse, merci de t'être acharné sur ces complexes de Ru(II) qui n'en font qu'à leurs têtes mais aussi pour les vacances passées à l'ESRF,

-Lionel Rechignat pour la RPE, promis les séries de 20 tubes c'est fini !,

-Christian Bijani pour la RMN, merci pour ta gentillesse et surtout pour m'avoir écouté râler pendant des heures.

Je souhaite également remercier l'ESRF qui a largement contribué à la rédaction de cette thèse ! Ainsi que l'ensemble du personnel administratif ou non de l'IPBS et du LCC avec une pensée particulière pour Michel (le gardien) pour ta gentillesse et ta bonne humeur même très tôt le matin et Michel (du magasin) pour avoir relié ma thèse en un temps record et m'avoir soutenu pendant ces dernières années.

Au cours de ces trois ans, j'ai eu la chance de rencontrer des gens formidables et j'espère n'oublier personne !

Lors de mon arrivée au laboratoire il y a 4 ans, je me suis retrouvée perdue au milieu de garçons d'apparence sérieuse mais j'ai vite appris que l'habit ne fait pas le moine... Merci à Bruno pour les discussions sans fin, ton soutien mais surtout pour la *Bruno touch* qui est indescriptible. Merci aux fameux Aurélien Honreadt et Gilles Caillot pour les soirées moutons célestes, suit up et surtout pour les dimanches matins dans mon canapé, les chansons de Glee et le théâtre des rêves. Merci d'avoir été là, votre amitié m'est précieuse.

Merci à Fabien, le beau gosse de l'Ariège parti s'exiler à Marseille, pour m'avoir soutenu tous les jours au cours de la rédaction. Tu es et resteras mon chouchou.

Un énorme merci à ma chieuse préférée Emelyne ! Je m'attends toujours à te voir quand quelqu'un ouvre la porte. Tu me manques énormément et j'ai hâte de te voir sur Paris. Merci d'avoir été là dans les bons et les moins bons moments.

Merci à Sarah pour ta gentillesse et ton sourire. On se retrouve quand tu veux pour une bière au De Danu ! Je te souhaite d'avoir trouvé ta voie mais ne nous oublie pas.

Merci à Anna ou plutôt Mme Bastien ! Tu entres dans la période difficile de la rédaction et si tu as besoin je suis là !

Sabrina, il m'est très difficile d'écrire ces mots sans pleurer. Je ne sais pas par où commencer... Ton arrivée dans l'équipe a été une bouffée d'oxygène. Merci pour tes blagues pourries : qu'est-ce t'a mangé ? du cassoulet !, pour m'avoir fait goûter du cheval, pour m'avoir fait traverser Toulouse parce que ce n'était pas chronodrive mais auchan drive, pour les bières du vendredi et aussi du samedi soir, pour m'avoir appris à jouer à la belotte,... Et j'en passe. Merci pour tout ! J'ai beaucoup de chance de t'avoir rencontré et encore plus de faire partie de tes amis. Je n'oublie pas non plus ton Thibaud d'amour..... Merci à vous deux.

Dr Dib, comment te dire à quel point tu as été un soutien ces dernières années... Alors merci pour les pauses cafés à la bibliothèque, les fous rires lors de mes nombreux passages dans le bureau G072, pour avoir essayé de m'apprendre l'anglais, pour m'avoir écoutée et soutenue mais surtout merci pour avoir fait de moi une addict à la cuisine libanaise et particulièrement aux gâteaux. Merci pour cet été, sans toi la rédaction n'aurait pas été la même. Tu as été mon mari du labo et plus que tout un ami ! Un dernier merci pour m'avoir permis de connaître mon Nabilou...

Nabil ou le prince du Maroc, comme on le dit souvent il n'y a pas de merci entre nous mais je tiens quand même à te dire merci. Merci pour créer l'ambiance, pour ta gentillesse et ton humour. J'ai perdu les 2 ans pendant lesquels on ne se parlait pas mais j'ai maintenant le privilège de te connaître.

Je tiens également à remercier Dieu Grec pour être venu m'aider à répéter et je lui souhaite bon courage pour me supporter lors des TP de chimie analytique. Je ne t'échangerais pas contre un autre cette fois-ci et j'espère avoir la chance de faire partie de tes amis.

Certains jeudi soirs, les lumières du labo restent allumées plus longtemps que d'habitude... et à y regarder de plus près, il s'agit de l'apéro du LCC. Grâce à ces apéros j'ai eu la chance de rencontrer mes chagasses d'amour :

Pauline, la méchante chagasse : merci pour les quizzes au Killarney, les discussions dans mon bureau : radio LCC ne serait pas la même sans toi ! Merci d'être mon amie tout simplement !

Aurélié, l'ultimate chagasse : merci pour le petit poney, pour cet été (le tournoi de foot aura définitivement scellé notre amitié), pour ton naturel et pour m'avoir donné envie de porter du vernis à ongle.

Nadia, la chagasse blonde : tu es l'une des personnes les plus adorables que je connaisse. Merci pour le poulet au citron et les papotages entre filles. Merci de m'avoir soutenue et d'être mon amie.

Marlène, la gentille chagasse : pour moi tu représentes la gentillesse incarnée. Tu t'énerves parfois ????

Justine, la chagasse junior : merci d'être inutile..... Il te reste pas mal de progrès à faire avant de faire partie des chagasses du LCC mais je te fais confiance pour y arriver.

Mais aux apéros du LCC, il n'y a pas que les chagasses , il y a aussi :

Maître Hameau, c'est toi le grand méchant ! Merci de me supporter au quotidien et promis je vais me faire plus discrète dans l'équipe M. Yohan, merci d'être toujours de bonne humeur et de t'occuper de ma méchante chagasse. Merci de mettre la misère à mon chéri au squash. Tous les deux, vous m'impressionnez par votre détermination et votre implication au travail. J'espère vous ressemblez un peu... mais pas trop !

Le beau gosse de l'équipe D, Kévin, merci d'être le tyran de mon cœur ! Merci d'avoir cru que j'étais une jeune permanente du labo. Merci pour ta franchise et ton amitié. Bien évidemment dans l'équipe D, il y a la star internationale de foot et sa femme chanteuse reconnue de son labo : merci à Clève et Amelle pour votre sourire quotidien ! Vous être trop mimis ne changez rien.

Merci à Carine pour m'avoir soutenue au quotidien ces derniers mois sur facebook. Merci pour ta gentillesse et ta franchise. Merci pour l'aventure parisienne au Palais de la Découverte ! Promis quand je viens en Belgique je t'amène des crayons !

Je n'oublie pas non plus Joëlle, Rémy, Jérémy, Khaldoun, Mahmoud et Bahjat. Je vous souhaite de réussir tout ce que vous entreprendrez dans le futur.

Un merci tout particulier pour mes coupines de D-Smart : Alison et Juliette ! Merci pour les déjeuners entre filles, de m'avoir écouté me plaindre et d'avoir été là ces derniers mois. La langue française est riche et je suis connue pour mon débit de paroles mais là je sèche. Alors je vous dirais simplement Merci !

Un énorme merci à mes amis d'ici ou d'ailleurs qui même si ils n'ont pas toujours compris en quoi consistait mon travail ont toujours été là pour moi :

Mélanie, on se connaît depuis plus de 15 ans et nos vies ont pris des chemins différents et pourtant nous sommes toujours aussi complices que lorsqu'on avait 12 ans (le papotage téléphonique hebdomadaire y est pour beaucoup). Tu es une personne merveilleuse qui a toujours été là pour moi et j'espère que notre amitié continuera pour les 15 prochaines années. Tu es bien plus qu'une amie. J'en profite pour remercier Benoit : merci d'avoir rendu ma meilleure amie heureuse et de lui avoir offert le plus cadeau du monde Noa.

Yann, même si je ne suis pas la fille la plus chaude que tu connaisse, merci d'être mon ami. Nos bières du samedi me manquent beaucoup ! Tu es parti pour la capitale et que je ne te vois pas aussi souvent que je le voudrais, mais tu es un des mes amis les proches et je ne te remercierais jamais assez pour ton soutien.

Une pensée particulière pour Guich, les vendredis matins sur les bancs de la fac resteront à jamais gravés dans ma mémoire. Greg, merci pour les week-ends du 14 juillet, la semaine parisienne qui a été plus qu'extraordinaire et même si tu es l'ami de Kévin j'espère que tu es aussi un peu le mien. Chloé et Clément, merci pour votre soutien depuis Lamalou les bains et pour les week-ends à vos côtés qui m'ont toujours aidé à décompresser.

Merci à Nolan et Briguite d'être mes amis. Une spéciale dédicace Mickaël : tu es l'une des personnes qui comptent le plus pour moi. Merci d'être là tous les jours du petit-déjeuner au diner !

Merci à mes parents, mes grands-parents, mon adorable petit frère Bertrand et ma « belle-sœur » Marina. Sans vous je ne serais pas là aujourd'hui. Vous m'avez toujours poussé à me dépasser et m'avez donné les moyens d'y arriver. Merci pour tout ! J'ai une pensée pour ma famille, Hélène et Gilbert, Stéphanie, Jean-Marie et Nathan, Julien et Lama, et ma belle-famille , Véronique, Zaza, James , Laëtitia, Axelle, Jade , Eliot et Valérian : vous m'avez soutenu et encouragé pendant 3 ans ! Je pense en particulier à mes filleules Clara et Sara. Je souhaite également remercier Karima qui me connaît depuis toujours et qui a toujours su me motiver. Tu es un exemple pour moi.

Je tiens à remercier celui qui a toujours cru en moi, Kévin. Cette thèse n'aurait pu aboutir sans toi, ton soutien sans faille et ta confiance en moi. Je ne trouve pas les mots pour te dire à quel point tu as contribué à ce travail. Merci pour avoir supporté ces trois ans qui n'ont pas été faciles tous les jours. Cette thèse est aussi la tienne. Merci infiniment pour tout ce que tu m'apportes.

Résumé :

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de dégénérescences neurofibrillaires et l'accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau. Ces plaques contiennent principalement un peptide nommé amyloïde- β ($A\beta$) sous forme agrégée. Le processus d'agrégation des peptides $A\beta$ en plaques amyloïdes représente une étape clé dans l'apparition de la pathologie, la coordination du cuivre, et également du zinc, favorisant la formation d'espèces agrégées impliquées dans la neurotoxicité. Notre objectif consiste à concevoir des complexes bifonctionnels avec d'une part un analogue de la Thioflavine T (ThT) et d'autre part un complexe de Ru(II). Ce travail de thèse s'articule donc selon ces deux axes.

I- Nous nous sommes d'abord intéressés à l'interaction entre le peptide $A\beta$ et la Thioflavine T (ThT), fluorophore classiquement utilisé pour étudier l'agrégation du peptide $A\beta$. Cette interaction a été étudiée principalement par spectroscopie RMN. Les résultats obtenus ont permis d'identifier le site d'interaction de la ThT au peptide $A\beta$. Par la suite, les effets de la ThT et du Zn(II) sur l'agrégation du peptide $A\beta$ ont été évalués en combinant la spectroscopie RMN et de fluorescence. A partir des données obtenues, nous avons montré que la ThT et le Zn(II) ne sont pas inertes sur la cinétique d'agrégation du peptide $A\beta$. Les résultats ont également révélé des différences importantes concernant les informations apportées par la fluorescence et la RMN.

II- La coordination du cuivre et du zinc implique principalement les noyaux imidazoles des résidus histidines. Afin d'empêcher la coordination de ces ions métalliques aux peptides $A\beta$, une stratégie thérapeutique innovante consiste en l'utilisation de complexes platinoïdes comportant des sites labiles et capables de se lier aux résidus histidines du $A\beta$. En raison de la toxicité des complexes de Pt(II), nous avons envisagé la synthèse de complexes de Ru(II), principalement basés sur le motif *fac*-Ru(CO)₃²⁺. Différents complexes avec des ligands de type glycinate, hydroxyquinolinate et éthylènediamine ont été synthétisés. L'étude de leur interaction avec le peptide $A\beta$ a été réalisée par différentes techniques spectroscopiques (RMN, RPE, fluorescence, spectrométrie de masse). Les résultats obtenus ont montré, en particulier, que les complexes sont capables d'inhiber l'agrégation du peptide $A\beta$ induite par le zinc.

Abstract :

The Alzheimer's disease is characterized by the presence of neurofibrillary tangles and amyloid plaques in the brain. These plaques are formed by aggregated amyloid- β ($A\beta$) peptide. The $A\beta$ aggregation represents a key event in the appearance of the pathology, copper and zinc coordination favoring the formation of aggregated species involved in the neurotoxicity. Our objective consists in designing bifunctional complexes with, on one hand, a Thioflavine T (ThT) analog and, on the other hand, a Ru(II) complex : this thesis is thus centered around these two axes.

I- In this context, we first investigated the interaction between $A\beta$ and ThT, which is a classical dye commonly used to study the aggregation process. This interaction was mainly studied by NMR spectroscopy. Our first results allowed us to identify the interaction site of the ThT with the $A\beta$ peptide. Then, the ThT and Zn(II) effects on the aggregation process were assessed by NMR and fluorescence spectroscopy. From the obtained data, we showed that ThT and Zn (II) are involved in the aggregation kinetic. The results also revealed important differences concerning the information brought by fluorescence and NMR.

II- Copper and zinc coordination mainly implies imidazole ring of the histidine residues. In order to prevent the coordination of these metallic ions to $A\beta$, an innovative therapeutic strategy consists of the use of platinoid complexes containing labile sites which are able to bind the $A\beta$ histidine residues. Because of Pt(II) complexes toxicity, we envisaged the synthesis of Ru(II) complexes, mainly based on *fac*-Ru(CO)₃²⁺ motive. Different complexes with glycinate, hydroxyquinolate or ethylenediamine ligand were synthesized. The study of their interaction with the $A\beta$ peptide was realized by various spectroscopy techniques (RMN, RPE, fluorescence, mass spectrometry and demonstrated that the complexes are able to prevent the $A\beta$ aggregation induced by zinc.

Abréviations

Unité de mesure

M molaire

mM millimolaire

nM nanomolaire

pM picomolaire

μM micromolaire

mg milligramme

g gramme

μl microlitre

ml millilitre

m mètre

cm centimètre

Da dalton

PM poids moléculaire

K kelvin

°C degré Celcius

s seconde

h heure

éq équivalent

Peptides, protéines, acides aminés

Aβ amyloïde-bêta

ADN acide désoxyribonucléique

AICD « APP intracellular domain »

Ala alanine

APP « amyloid precursor protein »

Arg arginine

ARN acide ribonucléique

Asn asparagine

Asp aspartate

BACE « beta site APP cleaving enzyme »

CCO cytochrome c oxydase

CCS « copper chaperon superoxide dismutase »

C83 fragment C83 (possédant 83 acides aminés) de l'APP

C99 fragment C99 (possédant 99 acides aminés) de l'APP

Gln glutamine

Gly glycine

Glu glutamate

hCtr1 « human Copper transporter »

His histidine

Im imidazole

Leu Leucine

Lys Lysine

Phe phénylalanine

Ser sérine

SOD superoxyde dismutase

Trp tryptophane

Tyr Tyrosine

Val Valine

Métaux

Au or

Ag argent

Bi bismuth

Cu cuivre

Fe fer

Ga gallium

Gd gadolinium

Ir iridium

Os osmium

Pd palladium

Pt platine

Rh rhodium

Ru ruthénium
Tc technetium
Ti titane
V vanadium

Méthodes

DC dichroïsme circulaire
ESI-MS « electrospray ionization mass spectrometry »
HPLC « High Performance Liquid chromatography »
IR infra-rouge
IRM imagerie par résonance magnétique
RMN résonance magnétique nucléaire
RPE résonance paramagnétique électronique
TEM microscopie à transmission électronique
TEP tomographie à émission de positrons
UV-Vis ultra-violet visible
XANES « X-Ray Absorption Near Edge Structure »
XAS « X-Ray Absorption Spectroscopy »

Divers

ACN acétonitrile
AINS Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens
ANS 1-anilinonaphtalène-8-sulfonate
BHE Barrière Hémato-Encéphalique
CORM « CO Releasing Molecules »
CQ clioquinol
DO densité optique
DMSO diméthylsulfoxyde
DOSY « Diffusion Ordered Spectroscopy »
DTPA acide diéthylentriaminepentaacétique
 ϵ coefficient d'extinction molaire
EDTA acide éthylènediamine tetraacétique
EMA agence européenne des médicaments

EtOH éthanol

Hepes acide 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonique

HQ hydroxyquinoline

IC50 concentration d'inhibition 50 %

Ka constante d'association

Kd constante de dissociation

MA maladie d'Alzheimer

MeOH méthanol

MM masse molaire

NAMI « New Anti-Tumor Metastasis Inhibitor »

NMDA N-Méthyl-D-Aspartate

NOESY « Nuclear Overhauser SpectroscopY »

PIPES acide 1,4-piperazinediethane sulfonique

ROS "Reactive oxygen species"

SDS sodium deodecyl sulfate

ThT thioflavine T

TFE trifluoroéthanol

TOCSY « Total Correlation SpectroscopY »

TSP sodium 3-(triméthylsilyl)propionate

Tris Tris(Hydroxymethyl)aminomethane

ZnT « Zinc Transporter »

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	6
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	8
I-A LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	8
I-A-1-a Une démence neurodégénérative	9
I-A-1-a-i Les signes cliniques	9
I-A-1-a-ii Les signes histopathologiques	10
I-A-1-b Le diagnostic.....	11
I-A-1-b-i Les tests neuropsychologiques	11
I-A-1-b-ii L'imagerie cérébrale.....	12
I-A-1-c Les facteurs de risque.....	13
I-A-1-c-i L'âge et le sexe	13
I-A-1-c-ii Le cholestérol.....	13
I-A-1-c-iii Les mutations génétiques.....	14
I-A-1-d Un enjeu de santé publique.....	14
I-A-2 <i>Plaques amyloïdes</i>	15
I-A-2-a Le peptide A β	16
I-A-2-a-i Origine du peptide A β : la protéine APP	16
I-A-2-a-ii Génération du peptide A β : clivage de l'APP	16
I-A-2-a-iii Le peptide A β	17
I-A-2-b Les fibres amyloïdes	18
I-A-2-b-i Structure des fibres amyloïdes.....	18
I-A-2-b-ii Toxicité des espèces agrégées	20
I-A-2-b-iii Espèces amorphes ou fibrillaires	20
I-A-2-c L'hypothèse de la cascade amyloïde.....	20
I-A-3 <i>Les voies thérapeutiques actuelles</i>	22
I-A-3-a Prévention de la production d'A β	22
I-A-3-a-i Stimulation de l' α -sécrétase	22
I-A-3-a-ii Inhibition des β et γ -sécrétases	23
I-A-3-b Dégradation du peptide A β	25
I-A-3-c Inhibition de l'agrégation d'A β	25
I-A-3-d Autres approches envisagées	26
I-B THIOFLAVINE T ET LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	28
I-B-1 <i>Agrégation et fluorophores</i>	28
I-B-1-a Présentation des principaux fluorophores utilisés.....	28
I-B-1-a-i ANS et bis-ANS.....	29
I-B-1-a-ii Le Nile Red.....	30
I-B-1-a-iii Le Congo Red.....	30
I-B-1-b Fluorophores et caractérisation des protéines	31

<i>I-B-2 La Thioflavine T (ThT)</i>	31
I-B-2-a Généralités.....	32
I-B-2-b ThT et fibres amyloïdes	32
I-B-2-c-i Interaction ThT-fibres amyloïdes.....	33
I-B-2-c-i Site d'interaction	33
I-B-2-c ThT et agrégation	34
I-B-2-c-i La nucléation.....	34
I-B-2-c-ii L'élongation.....	34
I-C LES METAUX EN BIOLOGIE.....	36
<i>I-C-1 Les métaux : indispensables pour l'organisme</i>	36
I-C-1-a Les métaux essentiels.....	36
I-C-1-a-i Le cuivre	37
I-C-1-a-ii Le Zinc	38
I-C-1-a-iii Le Fer.....	39
I-C-1-b Dérégulation des métaux et maladies	40
<i>I-C-2 Les métaux en chimie médicinale</i>	42
I-C-2-a Outils diagnostics	42
I-C-2-b Agents thérapeutiques.....	43
I-C-2-b-i Le Platine (Pt)	43
I-C-2-b-ii Le Ruthénium (Ru).....	45
I-D LES METAUX ET LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	49
<i>I-D-1 Le rôle des métaux dans la maladie d'Alzheimer</i>	49
I-D-1-a Stress oxydant et MA.....	49
I-D-1-a-i Définition du stress oxydant	49
I-D-1-a-ii Stress oxydant et MA.....	50
I-D-1-b Métaux et MA.....	51
<i>I-D-2 Les métaux et le peptide Aβ</i>	53
I-D-2-a Cuivre et A β	53
I-D-2-a-i Coordination	53
I-D-2-a-ii Effet sur l'agrégation	55
I-D-2-a-iii Effet sur la toxicité	56
I-D-2-b Zinc et A β	56
I-D-2-b-i Coordination	56
I-D-2-b-ii Effet sur l'agrégation et la toxicité	57
I-D-2-c L'hypothèse de la cascade amyloïde et les métaux	57
<i>I-D-3 Les métaux : une nouvelle cible thérapeutique ?</i>	58
I-D-3-a Chélateurs d'ions métalliques	58
I-D-3-a-i Les premiers chélateurs	58
I-D-3-a-ii Le clioquinol et ses dérivés.....	59
I-D-3-a-iii Des chélateurs vectorisés.....	61
I-D-3-b Complexes de Pt, Ru et autres métaux de transition	63
I-D-3-b-i Des complexes de Pt.....	63
I-D-3-b-ii ... ou de Ru comme anti-MA	64
I-D-3-b-iii Vers l'utilisation d'autres métaux de transition	65

CONCLUSION	66
BIBLIOGRAPHIE	68
CHAPITRE II. TECHNIQUES UTILISEES ET MODELE D'ETUDE	74
INTRODUCTION	74
II-A SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	74
<i>II-A-1 Généralités</i>	74
<i>II-A-2 Paramètres caractéristiques de la spectroscopie de fluorescence</i>	76
II-A-2-a Le rendement quantique de fluorescence	76
II-A-2-b L'intensité de fluorescence	76
II-A-2-c La durée de vie de fluorescence	78
II-A-2-d Fluorescence de la Thioflavine T	78
II-A-2-e Les avantages et inconvénients de la fluorescence	80
II-B LA RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	80
<i>II-B-1 La TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)</i>	81
<i>II-B-2 La NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy)</i>	82
II-C PEPTIDE A β 28 ET CONDITIONS EXPERIMENTALES	87
<i>II-C-1 Le peptide Aβ28 et fixation du Zn(II)</i>	87
<i>II-C-2 Attribution des résonance ¹H-RMN du peptide Aβ28</i>	88
II-C-2-a Méthodologie d'attribution	89
II-C-2-a-i Préparation de l'échantillon	89
II-C-2-a-ii Identification du système de spin (TOCSY)	90
II-C-2-a-iii Détermination de la structure primaire	91
II-C-2-b Attribution du peptide A β 28	92
II-C-2-b-i Séquence du peptide A β 28	93
II-C-2-b-ii Tableau d'attribution	94
BIBLIOGRAPHIE	96

**CHAPITRE III. INTERACTION DE LA THT AVEC LE PEPTIDE A β 28 SOUS
FORME MONOMERIQUE**

INTRODUCTION	97
PUBLICATION	99
INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES	101

CHAPITRE IV. AGREGATION DU PEPTIDE A β 28 : RMN VS FLUORESCENCE DE LA ThT.....115

INTRODUCTION	115
IV-A PARAMETRES INFLUENÇANT LA CINÉTIQUE D'AGREGATION DU PEPTIDE A β 28.....	116
IV-A-1 Rappel sur le mécanisme d'agrégation et utilisation de la fluorescence de la ThT	116
IV-A-2 Traitement du peptide A β 28 à haut pH : vers une monomérisation.....	118
IV-A-3 Dépendance de la concentration en peptide A β 28 sur la cinétique d'agrégation	119
IV-A-4 Dépendance du pH sur l'agrégation du peptide A β 28	120
IV-A-5 Effet de la nature du tampon et de sa concentration sur l'agrégation du peptide A β 28.....	121
IV-A-6 Effet de la température sur l'agrégation du peptide A β 28	122
IV-A-7 Effet de l'agitation sur l'agrégation du peptide A β 28.....	124
IV-A-8 Importance de l'interface air-liquide	125
Conclusions :	127
IV-B AGREGATION DU PEPTIDE A β 28 EN PRESENCE DE ZN(II)	128
IV-B-1 Suivi d'agrégation par spectroscopie de fluorescence de la ThT.....	128
IV-B-2 Agrégation du peptide A β 28 suivie par spectroscopie RMN ¹ H.....	131
IV-B-2-a En version 1D.....	132
IV-B-2-b Analyse des cartes NOESY.....	135
IV-B-3 Agrégation du peptide A β 28 caractérisée par RMN : conclusion	141
IV-C EFFET DE LA ThT SUR L'AGREGATION D'A β 28	142
IV-C-1 Etude par spectroscopie de fluorescence	142
IV-C-2 Etude par spectroscopie RMN ¹ H.....	144
IV-C-3 Effet de la ThT sur la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 : conclusion ...	146
IV-D CONCLUSION : RMN VS FLUORESCENCE DANS L'AGREGATION DU PEPTIDE A β 28 EN PRESENCE DE ThT	147
BIBLIOGRAPHIE :	155

CHAPITRE V. VERS DES COMPLEXES DE RU(II) ACTIFS CONTRE LA MALADIE D'ALZHEIMER. 157

INTRODUCTION :	157
V-A SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COMPLEXES DE RU(II)	161
V-A-1 Choix des ligands.....	161
V-A-1-a Glycine	161
V-A-1-b 8-hydroxyquinoline et ses dérivés.....	162
V-A-1-c Ethylène diamine.....	162
V-A-2 Synthèse et caractérisation des complexes de Ru(II).....	164
V-A-2-a Synthèse des complexes	164
V-A-2-b Structures cristallographiques	165
V-B-1 Conditions expérimentales.....	167

V-B-1-a Choix du fluorophore.....	167
V-B-1-b Effet du DMSO	170
<i>V-B-2 Effet des complexes Ru(CO)₃Cl(L) sur la cinétique d'agrégation du peptide Aβ28</i>	171
V-B-2-a Par spectroscopie de fluorescence : résultats.....	171
V-B-2-b Discussion	173
V-C EFFET DES COMPLEXES DE RU(II) SUR LA COORDINATION DU CU(II) AU PEPTIDE Aβ28.	174
<i>V-C-1 Rappel sur la coordination du Cu(II) au peptide Aβ.....</i>	174
<i>V-C-2 Effet des complexes de Ru(II) sur la coordination du Cu(II) au peptide Aβ28..</i>	175
<i>V-C-3 Effet des complexes de Ru(II) sur l'agrégation induite par le Zn(II) et la coordination du Cu(II) au peptide Aβ28 : bilan.....</i>	178
V-D COORDINATION DES COMPLEXES AU PEPTIDE Aβ	179
<i>V-D-1 Etude par RMN ¹H et masse de l'interaction des complexes hydrosolubles avec le peptide Aβ28.....</i>	179
V-D-1-a Etude par spectroscopie RMN ¹ H	179
V-D-1-a Etude par spectrométrie de masse : HPLC/MS	182
<i>V-D-2 Etude par RMN ¹H et masse des complexes solubilisés dans le DMSO avec le peptide Ab28.....</i>	186
V-D-2-a Etude par RMN ¹ H	186
V-D-2-b Etude par spectrométrie de masse : HPLC/MS.....	188
V-E BILAN	192
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	194
BIBLIOGRAPHIE	196
CONCLUSION GENERALE.....	198
ANNEXE I.....	A-1
ARTICLE 1	A-4
ARTICLE 2	A-10
ARTICLE 3	A-21
ARTICLE 4	A-31
ANNEXE II: MATERIELS ET METHODES.....	A-34
ANNEXE III: SYNTHESSES	A-39
ANNEXE IV: STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES	A-48

Introduction

Introduction Générale

La mémoire est définie comme étant une activité biologique et psychique qui permet d'emmagasiner, de conserver et de restituer des informations. Chez plus de 35 millions de personnes à travers le monde, cette capacité à se souvenir d'événements passés s'altère jusqu'à devenir inexistante à cause d'une dégénérescence neuronale. Ces personnes souffrent de la forme de démence la plus répandue dans le monde : la maladie d'Alzheimer. Avec l'allongement de l'espérance de vie, le nombre de patients atteints par la maladie d'Alzheimer va augmenter au cours des prochaines décennies. Cette pathologie a été décrite pour la première fois en 1907 et depuis de nombreuses avancées ont permis de mieux comprendre les mécanismes conduisant à cette neurodégénérescence. Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore élucidés ce qui rend cette maladie incurable à l'heure actuelle et en fait un enjeu majeur de santé publique.

La présence de plaques amyloïdes dans le cerveau des patients Alzheimer est l'un des principaux marqueurs de la maladie. Ces plaques sont constituées principalement d'un peptide sous forme agrégée appelé peptide amyloïde- β ($A\beta$). Ce peptide est présent dans tous les cerveaux sains sous forme monomérique. Le passage de cette forme soluble à un état agrégé représente donc une étape charnière de la maladie qu'il est nécessaire de comprendre.

En plus du peptide $A\beta$, les plaques amyloïdes contiennent également une concentration élevée en ions métalliques tels que le $Cu(II)$ et le $Zn(II)$. Il est proposé que ces ions jouent un rôle clé dans le processus d'agrégation ainsi que dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont létales pour les cellules. Il n'existe à ce jour aucun traitement actif contre la maladie d'Alzheimer malgré de très nombreuses recherches en ce sens.

Notre étude se place dans ce contexte. Deux parties complémentaires sont présentées dans ce manuscrit. La première partie a pour objectif d'apporter des éléments de réponse quant au mécanisme d'agrégation du peptide $A\beta$ étudié par spectroscopie RMN et de fluorescence. Elle traite aussi de l'interaction du fluorophore ThT (marqueur fluorescent des fibres amyloïdes) avec le peptide $A\beta$. La seconde partie présente l'utilisation de complexes de $Ru(II)$ comme inhibiteur/ralentisseur de l'agrégation du peptide $A\beta$, ouvrant ainsi une potentielle nouvelle voie thérapeutique dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Le chapitre I présente la maladie d'Alzheimer de façon générale : du développement de la maladie aux traitements actuellement disponibles. Le rôle des ions métalliques en biologie et par rapport à la maladie d'Alzheimer sont également brièvement exposés. La détection des fibres amyloïdes par des marqueurs fluorescents est également abordée dans ce chapitre.

Le chapitre II décrit des études menées principalement par spectroscopie RMN sur l'interaction entre le peptide A β 28 sous forme monomérique et la Thioflavine T (ThT). La ThT est un fluorophore très largement utilisé comme marqueur de la formation des fibres amyloïdes en général, et en particulier des fibres d'amyloïdes- β . Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis à publication.

Le chapitre III concerne l'agrégation du peptide A β 28 étudiée par spectroscopies de fluorescence et RMN ^1H . Après une brève introduction des spectroscopies de fluorescence et RMN, les différents facteurs influençant l'agrégation du peptide A β sont présentés. L'effet du Zn(II) et de la ThT sur l'agrégation du peptide A β sont plus particulièrement détaillés.

Enfin, le chapitre IV présente la synthèse et les études physico-chimiques en présence du peptide A β 28, de complexes de Ru(II) potentiellement actifs contre l'agrégation du peptide A β liée à la maladie d'Alzheimer. La coordination au peptide A β 28 des différents systèmes de Ru(II), de formule générale $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{L})^{0/+}$ avec L un ligand bidenté, est étudiée par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse. Des facteurs influençant le taux de complexation sont proposés. Par ailleurs, l'effet de la coordination des complexes de Ru(II) sur la modification du site de coordination du Cu(II) est déduit directement d'études par spectroscopie RPE. De même, l'effet sur la coordination du Zn(II), est obtenu indirectement d'après des études d'agrégation du peptide induite par le Zn(II).

Chapitre I : Introduction

Chapitre I. Introduction

I-A La maladie d'Alzheimer

La première partie de ce chapitre a pour objectif de présenter la maladie d'Alzheimer (MA) et montrer à quel point cette maladie encore incurable à ce jour est complexe. Les différents aspects de la maladie seront abordés allant des symptômes au développement de la maladie. Les traitements ainsi que les méthodes de diagnostic actuels seront brièvement présentés.

I-A-1 Une démence neurodégénérative

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies progressives liées à un dysfonctionnement au sein du tissu nerveux conduisant à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux. Ces maladies touchent différentes régions du système nerveux et selon ces régions les fonctions affectées peuvent concerner la motricité comme dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou la maladie de Parkinson, la perception et le langage comme dans la maladie de Pick. Dans certaines de ces maladies plusieurs régions du cerveau sont touchées ce qui conduit à des anomalies motrices mais également psychiques comme dans la chorée de Huntington ou la maladie de Creutzfeld-Jakob.

La plupart de ces maladies neurodégénératives sont qualifiées de démences. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la démence est « une altération progressive de la mémoire et de l'idéation, suffisamment marquée pour handicaper les activités de la vie quotidienne, apparue depuis au moins 6 mois et avec la présence d'au moins un trouble suivant : langage, calcul, jugement, altération de la pensée abstraite ou modification de la personnalité ». La plus fréquente de ces démences est la maladie d'Alzheimer (MA) qui affecte la mémoire de plusieurs millions de personnes à travers le monde et touche plus particulièrement les personnes de plus de 65 ans comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre.

I-A-1-a Les symptômes

I-A-1-a-i Les signes cliniques ^[1]

La MA se caractérise par une perte progressive des fonctions cognitives dont les premiers symptômes sont la perte de la mémoire à court terme et des altérations comportementales comme l'apathie, le désintérêt ou l'irritabilité. Cette phase de la maladie peut facilement passer inaperçue ou être interprétée, à tort, comme la conséquence d'un état dépressif.

Au cours du développement de la maladie, d'autres troubles vont apparaître comme les difficultés de langage, de motricité ainsi que la désorientation des repères temporels et parfois même spatiaux et la perte des souvenirs plus anciens accompagnée d'une incapacité à reconnaître son entourage. Il découle de ces symptômes une altération de la personnalité avec des comportements délirants (agitation, hallucinations, fugues,...).

Au stade final de la maladie, la perte d'autonomie est totale : la marche devient impossible entraînant un alitement continu avec un état grabataire. La communication est difficile puisqu'elle ne peut se faire que par le toucher ou le regard. Le décès survient 8 à 12 ans en moyenne après l'apparition des premiers symptômes. Ces différentes étapes sont résumées dans la figure I-1.

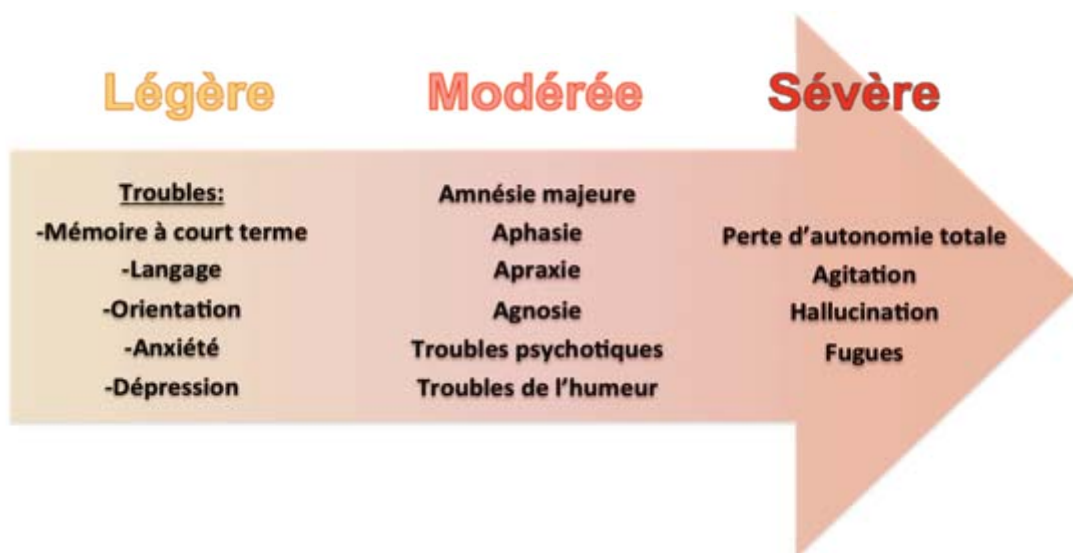


Figure I-1: Evolution au cours du temps et principaux symptômes de la maladie d'Alzheimer.

I-A-1-a-ii Les signes histopathologiques

La taille du cerveau ^[2]

Les patients atteints de la MA présentent des altérations neuropathologiques incluant notamment une atrophie du cerveau (Fig. I-2) et la perte de synapses dans le cortex cérébral. L'une des régions les plus touchées est l'hippocampe qui joue un rôle primordial dans les mécanismes de la mémoire. Il existe une relation directe entre l'évolution de la maladie et la taille du cerveau chez les personnes souffrant de la MA.

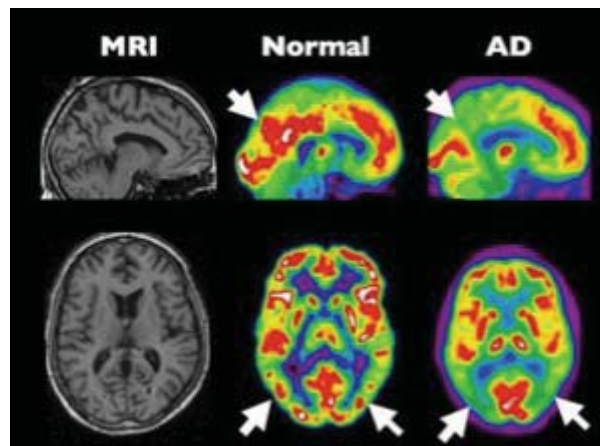


Figure I-2: Comparaison de cerveaux de personnes saines et atteintes par la maladie d'Alzheimer par images obtenus par IRM (à gauche) et TEP révélant le glucose (au milieu et à droite). Les patients atteints d'Alzheimer montrent une forte diminution du métabolisme énergétique (crédit photo : Institut Douglas) .

Les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires

L'un des marqueurs caractéristiques de la MA est la présence anormale de plaques amyloïdes au niveau extracellulaire dans le cerveau des patients décédés (Fig. I-3, (c)). Ces plaques ont été observées pour la première fois par Alois Alzheimer en 1906 ^[3], au microscope après coloration à l'argent de Bielschowsky (nitrate d'argent) de section du cortex cérébral d'une patiente décédée. Elles sont majoritairement constituées d'un peptide de 40 à 42 acides aminés appelé peptide amyloïde β ($A\beta$). La formation de ces plaques ainsi que leur rôle dans la MA seront abordés dans le paragraphe I-A-2 (cf p. 15).

Le second marqueur de la MA décrit par Alois Alzheimer est la présence au niveau intracellulaire d'enchevêtrements neurofibrillaires (Fig. I-3, (b)). Ces enchevêtrements sont constitués de la protéine tau hyperphosphorylée ^[4]. Ce second marqueur n'est pas spécifique de

la maladie d'Alzheimer. Il est retrouvé dans d'autres maladies neurodégénératives aussi appelées « taupathies ».

La protéine tau est responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules qui sont des constituants essentiels du cytosquelette des neurones et joue un rôle important dans le transport cellulaire ^[5]. Sous forme hyperphosphorylée, la protéine tau se dissocie des microtubules modifiant ainsi leur stabilisation et conduisant à la dégénérescence neuronale ^[6].

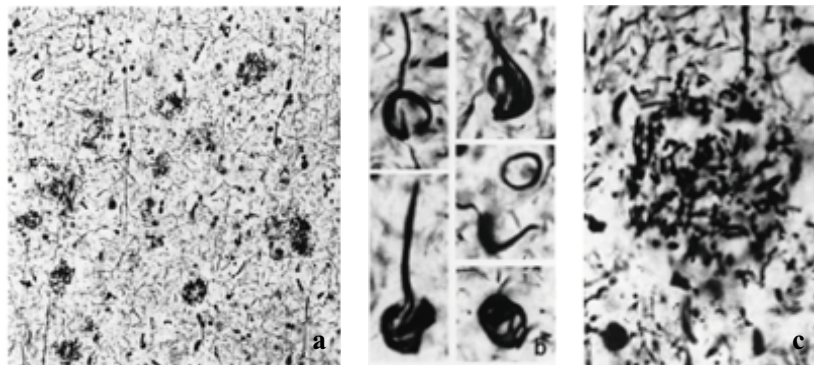


Figure I-3: Section du cortex du cerveau d'un patient révélée à l'argent de Bielschowsky (a) mettant en évidence la présence de neurofibrilles (b) et de plaques amyloïdes (c) (d'après la référence [3]).

I-A-1-b Le diagnostic

Le seul diagnostic définitif de la MA ne peut être établi que lors de l'autopsie du cerveau du patient décédé basé sur la présence des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires. Toutefois, la combinaison de signes cliniques, de tests neuropsychologiques et de techniques d'imageries cérébrales comme l'IRM ou la tomographie à émission de positrons (TEP) permettent d'établir un premier diagnostic chez les personnes vivantes.

I-A-1-b-i Les tests neuropsychologiques

Dans les années 80, un groupe américain spécialiste de la MA, le NINCDS-ADRDA, a proposé les premiers critères de diagnostic de la maladie qui sont regroupés autour de 4 axes : des tests cognitifs, une évaluation fonctionnelle, une évaluation comportementale et des échelles de classification globale de sévérité.

Actuellement ces tests sont toujours pratiqués car il n'existe pas encore de marqueur spécifique de la MA et sont accompagnés d'examen complémentaires (cf § I-A-1b-ii) [7]. D'autres pathologies possèdent les mêmes symptômes que la MA comme la dépression ou la démence vasculaire qui conduit à la détérioration des capacités cognitives et de la mémoire due à une anomalie de la circulation sanguine qui provoque un manque d'oxygénation de certaines zones du cerveau.

I-A-1-b-ii L'imagerie cérébrale

Les examens pratiqués en parallèle des tests neuropsychologiques sont en général le scanner cérébral ou l'IRM. Cependant, ces examens ne permettent pas de mettre en évidence les lésions spécifiques de la MA. En effet, l'amincissement du cortex cérébral est visible dans d'autres pathologies de la personne âgée mais ils permettent d'éliminer d'autres causes comme la présence d'une tumeur ou d'un hématome intra-cérébral.

L'imagerie cérébrale ne peut détecter les stades précoces de la maladie. Or une détection précoce de la maladie permettrait de retarder son évolution. Les techniques d'imagerie nucléaire telles que le TEP ou la tomographie par émission monophotonique (SPECT) sont en cours de développement. Ces techniques non-invasives possèdent de nombreux avantages parmi lesquels celui de pouvoir établir une cartographie fonctionnelle *in vivo* des systèmes neuronaux avec une excellente résolution spatiale (5 à 10 mm pour la TEP).

En 2012, l'EMA (Agence Européenne des Médicaments) a approuvé l'utilisation d'un radiotracer, le Florbetapir ¹⁸F (ou Amyvid), en imagerie TEP [8-10] (Fig. I-4). Cette molécule possède une forte affinité pour le peptide Aβ (Kd = 3,7 nM) [9] et montre une bonne corrélation entre les images TEP *in vivo* et la présence histologique *post mortem* du peptide Aβ. Ce dépistage précoce va faciliter la prise en charge des malades et permettre un allongement de la durée de vie du patient.

La découverte d'un tel composé représente une avancée majeure de la recherche dans la lutte contre la MA.

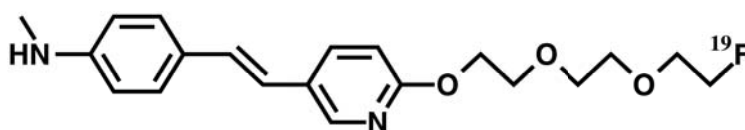


Figure I-4: Structure du radiotracer Florbetapir ¹⁸F.

I-A-1-c Les facteurs de risque

La présence des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires sont les marqueurs histologiques de la maladie. Cependant, les causes exactes de leurs formations restent floues. Il semblerait que certains facteurs, également appelés facteurs de risque, aient une influence sur la progression et l'apparition de la maladie.

I-A-1-c-i L'âge et le sexe

Avoir un âge avancé est le premier facteur qui rentre en ligne de compte dans le développement de la MA. En effet, 5% des personnes de 65 ans et 15% des plus de 85 ans souffrent d'Alzheimer. De plus, le risque d'être diagnostiqué Alzheimer double tous les 5 ans après 65 ans (www.alz.co.uk/research/statistics).

L'espérance de vie des femmes étant plus longue que celle des hommes, la MA touche plus de femmes que d'hommes. Un autre facteur pourrait expliquer cette différence : la diminution du taux d'oestrogènes chez les femmes suite à la ménopause. Des essais cliniques réalisés en présence d'hormone ainsi que des analyses génétiques de la biosynthèse des oestrogènes liée à la MA semblent confirmer cette hypothèse et indiquent un possible rôle de ces dernières dans la pathologie ^[11].

I-A-1-c-ii Le cholestérol

Le clivage de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) en peptide A β , constituant principal des plaques amyloïdes (cf § I-A-2-a-ii, p. 16), a lieu dans des domaines riches en cholestérol ^[12]. Ainsi un taux élevé de cholestérol favoriserait le dépôt de plaques amyloïdes au niveau du tissu nerveux ^[13] et une faible concentration en cholestérol empêcherait la formation de peptide A β ^[14]. Par ailleurs, le cholestérol est un constituant essentiel des membranes cellulaires et est donc nécessaire au bon fonctionnement des neurones (développement et plasticité). Dans la MA son transport est altéré. Il semblerait donc qu'il y ait une relation entre MA et cholestérol. Cependant, l'effet du taux de cholestérol sur la MA reste controversé.

I-A-c-1-iii Les mutations génétiques

L'origine génétique de la MA représente 5% des cas. Cette forme de la maladie est liée à un facteur héréditaire et est appelée « maladie d'Alzheimer familiale ». La plupart des personnes atteintes du syndrome de Down (ou trisomie 21) souffrent de démence de type Alzheimer de façon précoce (aux alentours de 40 ans). Ils expriment 1,5 fois plus l'APP que les individus sains du fait d'une mutation codant pour cette protéine sur le chromosome 21. D'autres mutations sont à l'origine du développement de la MA avant 60 ans ^[15]. Ces mutations vont affecter des gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport du cholestérol ou dans l'activité des enzymes responsables du clivage de l'APP. Ainsi des mutations sur deux gènes situés sur les chromosomes 1 et 14, codant respectivement pour les protéines présénilines 2 et 1 (ces protéines s'associent aux γ -sécrétases responsables de la génération de peptide A β à partir de l'APP, cf § I-A-2-a-ii, p. 17) ont été identifiées. A ce jour, plus de 150 mutations génétiques ont été identifiées et semblent responsables de la transmission génétique de la maladie.

I-A-1-d Un enjeu de santé publique

La MA est la forme de démence la plus répandue dans le monde avec plus de 35 millions de personnes touchées. En France, elle touche environ 860 000 personnes et constitue donc la quatrième cause de décès après le cancer, les maladies cardio-vasculaires et les accidents de la route. Avec le vieillissement de la population et sans traitement efficace à l'heure actuelle, le nombre de malades devrait atteindre deux millions en France à l'horizon 2020.

Actuellement, la majorité des patients sont à la charge de leur famille. La dépense moyenne pour la prise en charge d'un patient est d'environ 2000 euros par mois dont 50% à la charge du patient et de sa famille. Ce qui représente un budget annuel d'une dizaine de milliards d'euros pour la France.

La MA affectant au moins une personne sur 20 à l'âge de la retraite et au moins un octogénaire sur 4, l'évolution démographique promet à cette maladie une prévalence importante. Il est donc nécessaire de trouver rapidement un traitement efficace pour lutter contre ce problème majeur de santé publique.

I-A-2 Plaques amyloïdes

Il existe de nombreuses maladies associées à la formation de dépôts amyloïdes extracellulaires, constituées par des enchevêtrements de fibres, à partir de protéines normalement solubles. Ces maladies sont regroupées sous le nom d'amyloses et elles sont classées en trois groupes distincts : les maladies neurodégénératives, comme la MA, dans lesquelles l'agrégation a lieu dans le cerveau. Les amyloïdoses non neuropathiques localisées dans lesquelles l'agrégation a lieu dans un type de tissu précis autre que le cerveau. Par exemple, l'agrégation de l'amyline dans le foie entraîne l'apparition d'un diabète de type II. Puis les amyloïdoses non neuropathiques systémiques dont les dépôts sont retrouvés dans différents tissus de l'organisme comme la polyneuropathie amyloïde familiale (rare) qui est causée par l'agrégation de la protéine Transthyrétine mutée.

Dans de rares cas, la formation de fibres amyloïdes a été conservée par l'évolution pour générer des nanostructures naturelles exploitées par l'organisme ^[16,17]. Par exemple, chez l'araignée, les fibres de spidroïne forment la soie de la toile de la *Nephila Edulis* ^[18]. Chez l'être humain, un fragment de la glycoprotéine Pmel17 polymérise en fibres amyloïdes afin de séquestrer la mélanine, durant la biogenèse des mélanosomes ^[19].

Dans le cas de la MA, les dépôts amyloïdes sont des agrégats denses de peptide A β organisés en fibrilles.

I-A-2-a Le peptide A β

I-A-2-a-i Origine du peptide A β : la protéine APP ^[20]

L'APP est une protéine exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme mais ses fonctions physiologiques ne sont pas encore bien connues. De nombreuses études ont montré que l'APP joue un rôle important dans l'homéostasie des ions métalliques comme le cuivre, le fer ou le calcium. Elle semble également intervenir dans différents processus comme l'adhésion cellulaire, la restauration des fonctions neuronales après une lésion ou encore dans la croissance neuritique.

I-A-2-a-ii Génération du peptide A β : clivage de l'APP

L'APP est métabolisée via deux voies biologiques : la voie amyloïdogénique (production de peptide amyloïde) et non-amyloïdogénique [21]. Ces deux voies se distinguent par les enzymes intervenant dans le clivage de la protéine et par la nature des métabolites formés lors de ce clivage (Fig. I-5).

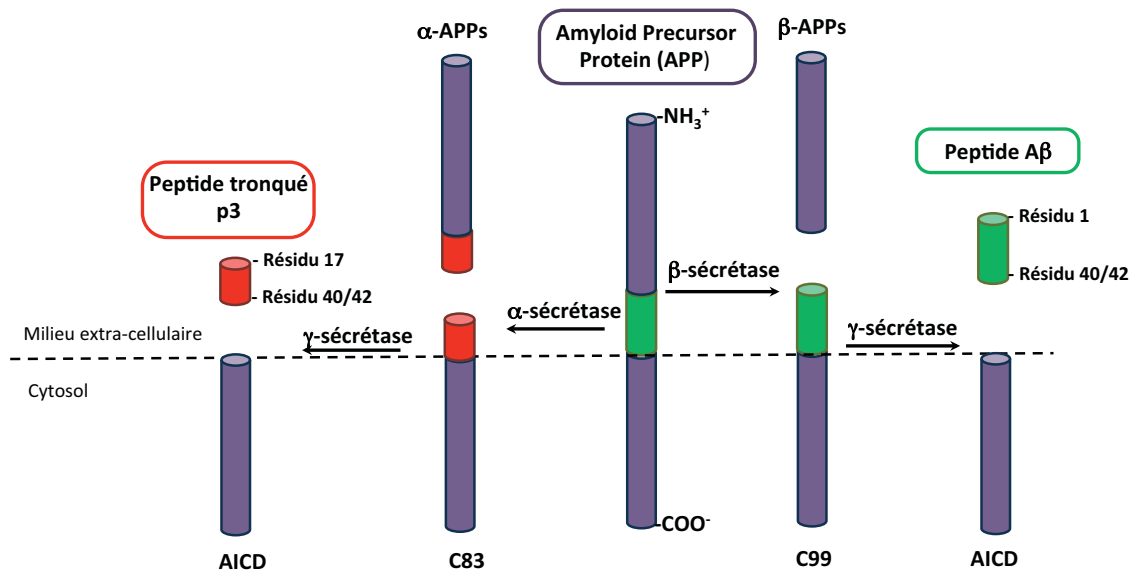


Figure I-5: Formation du peptide A β issu du clivage de l'APP par les β - et γ -sécrétases.

Dans la voie non-amyloïdogénique, l'enzyme responsable de la coupure de l'APP est l' α -sécrétase. Cette enzyme va cliver la protéine près du domaine transmembranaire pour générer un large ectodomaine soluble : α -APPs et laisser un fragment dans la membrane de 83 acides aminés : C83. La voie amyloïdogénique fait intervenir une β -sécrétase qui produit l'ectodomaine β -APPs et un fragment de 99 résidus ou C99. Ce dernier est le substrat d'une troisième enzyme la γ -sécrétase. L'hydrolyse de C99 par cette enzyme va conduire à la formation des peptides A β 40 et A β 42. Le fragment C83 peut également être clivé par la γ -sécrétase et générer une forme tronquée du peptide A β au niveau de sa partie N-terminale, le p3 (A β 17-40 ou A β 17-42) et le domaine AICD (APP IntraCellular Domain).

Dans le cas de la MA, les modifications du métabolisme de l'APP et en particulier l'augmentation de l'activité de la β -sécrétase vont conduire à la surproduction de peptide A β . Ces changements d'activité peuvent avoir plusieurs origines comme une augmentation du stress oxydant ou une perturbation de l'homéostasie des métaux.

I-A-2-a-iii Le peptide A β

La coupure de l'APP par les enzymes β - et γ -sécrétases conduit principalement à un peptide A β de 40 acides aminés (A β 40). Cependant, d'autres formes plus ou moins longues sont également produites et notamment le peptide A β 42 qui représente environ 5 à 10% des peptides A β . Ces deux peptides, A β 40 et A β 42, sont présents sous forme soluble chez les individus sains (Fig. I-6). Cependant, une augmentation de la production de peptides A β va conduire à son accumulation formant ainsi des dépôts amyloïdes, ou plaques séniles, dans le cerveau des malades d'Alzheimer^[22].

1 40 42
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Figure I-6: Séquence peptidique des peptides A β 40 et A β 42 (code à 1 lettre).

Le peptide A β est généré tout au long de la vie sans forcément déclencher de pathologie. Il doit certainement posséder un rôle physiologique mais ce dernier est encore largement méconnu. Une hypothèse actuelle propose un rôle dans l'homéostasie des métaux^[23].

I-A-2-b Les fibres amyloïdes^[24]

Les peptides A β ont tendance à agréger. C'est la raison pour laquelle ils sont majoritairement retrouvés sous forme de fibres dans le cerveau des malades. Ces fibres ont tendance à interagir entre elles pour former les plaques amyloïdes.

De façon générale, les peptides A β sont des peptides majoritairement hydrophobes. Le peptide A β 42, plus hydrophobe, possède une solubilité dans l'eau faible et par conséquent sa capacité à agréger est plus forte (environ 70 fois plus que le peptide A β 40 *in vitro*). Cela pourrait expliquer que le peptide A β 42 soit retrouvé en quantité plus importante dans les plaques amyloïdes que le peptide A β 40^[25].

Ce phénomène d'agrégation dépend donc de la nature du peptide mais est également sensible à de nombreux facteurs environnementaux tels que le pH, la concentration du peptide ou encore la présence d'ions métalliques.

I-A-2-b-i Structure des fibres amyloïdes

Le processus d'agrégation du peptide consiste au passage d'un peptide non-structuré soluble à une structure en feuillets- β . Ces feuillets- β vont interagir entre eux principalement par des interactions hydrophobes conduisant à la formation de fibres [24-26].

Des études cinétiques ont montré que la fibrillation comporte deux étapes : une étape lente de nucléation suivie d'une étape rapide d'élongation [27]. La formation de ces fibres se ferait alors par un mécanisme de nucléation [28] dans lequel un noyau, formé de plusieurs monomères de peptide A β , va croître pour former de longs protofilaments qui vont s'enrouler pour former des fibres amyloïdes matures (Fig. I-7).

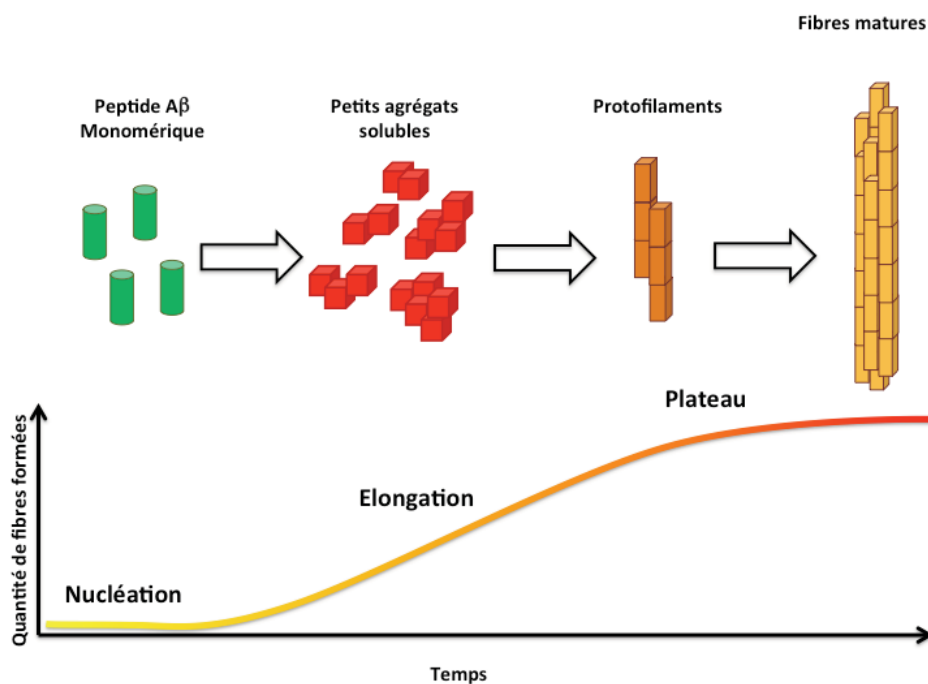


Figure I-7: Représentation schématique du processus de formation des fibres amyloïdes (adaptée de la réf. [29]).

Un modèle proposé pour la structure des fibres formées *in vitro* est bien décrit dans la littérature. Ce modèle structural a pu être obtenu à partir de données expérimentales (RMN du solide, diffraction des rayons X et microscopie électronique) [30-35].

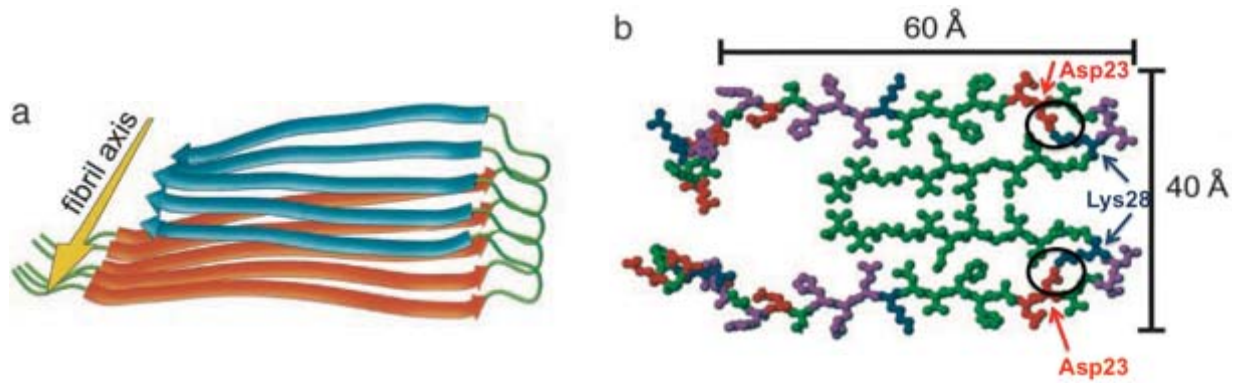


Figure I-8: Modèle structural des fibres d'Aβ40, (a) représentation en ruban, (b) représentation atomique (en vert les résidus hydrophobes, en violet les résidus polaires, en bleu les résidus chargés positivement et en rouge ceux chargés négativement). Le cercle noir correspond à la liaison électrostatique entre l'Asp23 et la Lys28 (d'après la réf. [32][11]).

Dans la structure obtenue par RMN du solide ^[32], les peptides sont organisés en couche de deux feuillets-β, orientés perpendiculairement à l'axe de la fibre (Fig. I-8). Dans cette structure, les premiers acides aminés (1 à 11) n'ont pas de structure définie, puis les résidus 12-24 ainsi que 30-40/42 sont impliqués dans la formation des feuillets-β. Les résidus 25-29 forment une boucle entre les feuillets. La formation des feuillets-β est favorisée par la présence d'une liaison électrostatique entre l'aspartate 23 (chargé négativement) et la lysine 28 (chargée positivement) ^[36]. Cependant, il existe des différences entre les modèles structuraux proposés qui peuvent s'expliquer, entre autre, par le fait que la structure dépend du mécanisme d'agrégation : les peptides Aβ40 et Aβ42 n'agrègent pas selon les mêmes mécanismes ^[28].

I-A-2-b-ii Toxicité des espèces agrégées

L'agrégation du peptide en plaques amyloïdes représente une étape importante dans la maladie d'Alzheimer puisqu'elles sont l'un des marqueurs de la maladie. Au cours de l'agrégation du peptide, plusieurs formes co-existent en équilibre. Il est donc difficile de déterminer laquelle de ces formes est responsable de la toxicité : oligomérique ? fibrillaire ? ^[37,38]

I-A-2-b-iii Espèces amorphes ou fibrillaires

Le terme d'agrégat sera utilisé de manière indifférenciée pour désigner tout type d'agrégats, qu'il s'agisse d'agrégats fibrillaires ou amorphes. Une fibre amyloïde est constituée d'un empilement de peptides organisés en feuillets- β . Au contraire, un agrégat amorphe n'aura pas de structure tridimensionnelle bien définie et aura plus tendance à précipiter que les agrégats de type fibrillaire.

I-A-2-c L'hypothèse de la cascade amyloïde

En résumé, les plaques amyloïdes sont retrouvées dans tous les cerveaux des patients atteints de la MA. Ces plaques sont principalement constituées du peptide $A\beta$ sous forme agrégée. Ce peptide est présent sous forme monomérique soluble chez les individus sains. Le passage de la forme soluble à agrégée représente alors une étape clé dans la maladie qu'il est nécessaire de comprendre.

A partir des différents éléments décrits précédemment, une explication liant la MA à la formation des plaques amyloïdes a été envisagée : l'hypothèse de la cascade amyloïde ^[37]. Le peptide $A\beta$ est issu du clivage par les β et γ -sécrétases de l'APP. Les peptides sont alors sous forme monomérique soluble et non toxique pour les cellules. Au cours du développement de la maladie, les peptides $A\beta$ sont produits en plus grande quantité et/ou subissent une diminution de leur dégradation. Ces deux événements conduisent à leur accumulation. Les peptides ne sont plus sous forme monomérique soluble mais sous forme oligomérique. Ils vont alors se structurer en feuillets- β stabilisés par des interactions électrostatiques. Ces feuillets- β vont alors interagir entre eux pour former des protofibrilles, des fibres et par la suite des plaques amyloïdes qui sont toxiques pour les neurones (Fig. I-9).

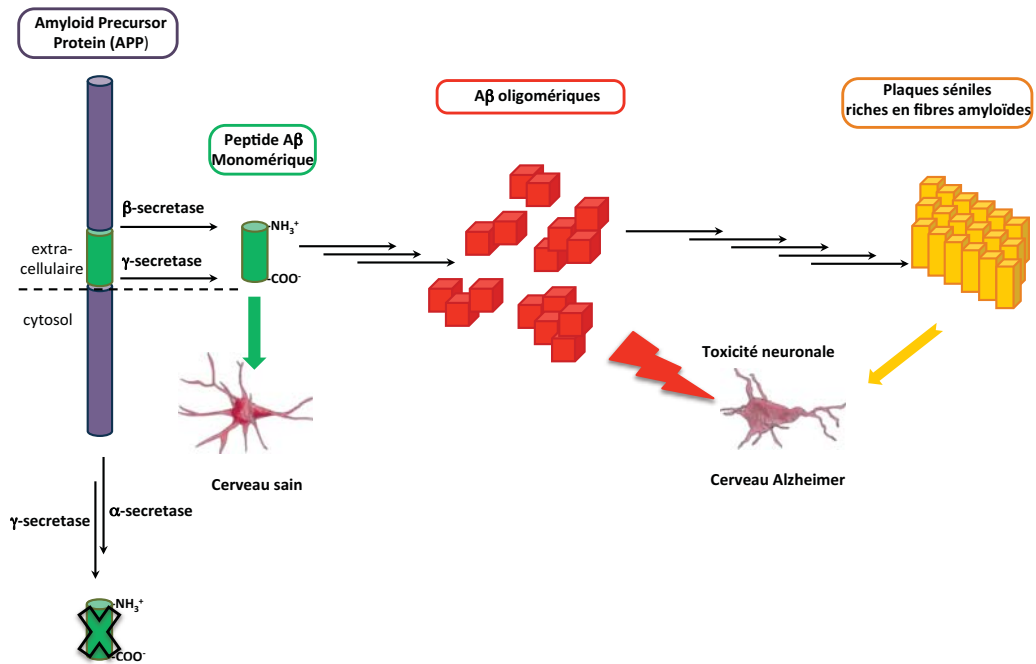


Figure I-9: Hypothèse de la cascade amyloïde (d'après la réf. [39]).

Plusieurs éléments indiquent que les espèces les plus toxiques vis-à-vis des neurones seraient les espèces oligomériques c'est-à-dire les espèces intermédiaires entre le peptide monomérique et les fibres amyloïdes ^[40-42]. En effet, les plaques amyloïdes semblent relativement inertes comparativement à des formes plus petites. Cependant, la difficulté rencontrée à isoler ce type d'intermédiaires ne permet pas d'apporter une réponse précise à ce jour. Malgré de nombreuses recherches, les mécanismes de l'agrégation et de la toxicité liés à ce processus ne sont pas encore clairement définis.

I-A-3 Les voies thérapeutiques actuelles

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif efficace contre la maladie d'Alzheimer. En France, quatre molécules sont administrées aux patients souffrant de la MA dont 3 appartiennent à la famille des anticholinestérases (Donépézil, Galantamine et Rivastigmine), le quatrième est un anti-glutamate (Mémantine). Les lésions caractéristiques de la MA, les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires, sont accompagnées d'une diminution de l'acétylcholine qui un neurotransmetteur impliqué dans la communication entre les neurones. Les anticholinestérases ont pour action d'empêcher la dégradation de cette molécule. La Mémantine a pour but de bloquer les récepteurs du glutamate, molécule

responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ces quatre molécules ont montré une efficacité dans les domaines de la cognition. Cependant, ces traitements sont des traitements symptomatiques qui vont ralentir la progression de la maladie mais ne peuvent pas guérir les patients. D'autres approches thérapeutiques sont envisagées basées sur l'hypothèse de la cascade amyloïde qui ciblent directement le peptide A β .

I-A-3-a Prévention de la production d'A β

L'une des approches thérapeutiques consiste à prévenir la production du peptide A β . Le peptide A β est issu du clivage de l'APP par les enzymes β et γ -sécrétases. Développer des molécules capables d'agir sur les fonctions catalytiques de ces enzymes sans modifier leurs autres fonctions physiologiques semble une stratégie intéressante. De plus, l'APP est également un substrat de l'enzyme α -sécrétase qui ne produit pas de peptide A β natif mais des formes tronquées. Une autre approche consisterait donc à stimuler l'activité de l' α -sécrétase de façon à empêcher la libération du peptide A β .

I-A-3-a-i Stimulation de l' α -sécrétase

L' α -sécrétase, métalloprotéase à zinc, intervient dans le métabolisme non amyloïdogène de l'APP en la transformant en α -APPs qui est un fragment soluble aux propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices. La stimulation de cette voie se fait au détriment de la production de peptide A β par la voie amyloïdogénique. En effet, des études pré-cliniques ont montré que EHT0202 protège les neurones corticaux contre le peptide A β 42 du fait de l'induction du fragment α -APPs. De plus, son administration régulière réduit les quantités de peptide A β 42 dans le cerveau et le liquide céphalo-rachidien du rat. La molécule EHT0202, en phase clinique IIA, est capable de stimuler l'activité de l' α -sécrétase^[43].

I-A-3-a-ii Inhibition des β et γ -sécrétases

Cibler spécifiquement ces enzymes pourrait permettre de contrôler directement la production de peptide A β à partir de l'APP.

Inhibiteurs de la β -sécrétase

La β -sécrétase ou BACE-1 (β site APP Cleaving Enzyme 1) est une cible privilégiée des thérapies actuellement en cours de développement. En effet, non seulement cette enzyme est directement impliquée dans la libération du peptide A β mais la structure de son domaine protéase est connue ce qui facilite la conception d'inhibiteurs.

Ainsi la molécule KMI-429 (Fig. I-10) a montré une inhibition totale de la BACE 1 à de faible concentration ^[44] impliquant une réduction de la quantité de peptide A β 40/42 soluble mais également insoluble chez des souris transgéniques (modèles de la MA). D'autres molécules ^[45-48] ont été développées et montrent une excellente inhibition de l'enzyme. Cependant, la taille imposante du site actif de l'enzyme impose de concevoir des molécules de haut poids moléculaire qui ne franchiront que très difficilement la barrière hémato-encéphalique (BHE). De plus, ces inhibiteurs nécessitent une sélectivité pour la BACE-1. La BACE-2, son homologue, intervient dans la vascularisation des tissus. Son inhibition aurait alors de graves conséquences.

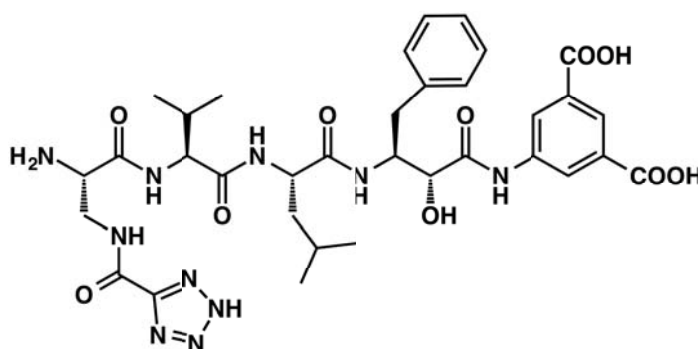


Figure I-10: Structure de l'inhibiteur KMI-429.

Inhibiteurs de la γ -sécrétase

Le Semagacestat ou LY-450139 ^[49], testé en phase III, est un inhibiteur de la γ -sécrétase qui a montré, *in vitro* et *in vivo*, une réduction significative du taux de plaques amyloïdes. Malgré ce résultat encourageant, aucune amélioration des symptômes dont souffraient les patients n'a été observée. Au contraire, dans certains cas une aggravation des problèmes de mémoire et des difficultés dans l'exécution des tâches quotidiennes ont été constatées. Le développement d'inhibiteur de la γ -sécrétase semble interférer avec d'autres voies de transduction du signal nerveux et ne représente donc pas une cible thérapeutique exploitable.

Modulation des sécrétases

Les AINS (Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens) sont une alternative en tant que candidat anti-amyloïde. Ces molécules agissent comme « bithérapie » puisqu'ils sont capables d'inhiber à la fois la γ -sécrétase et diminuer l'expression de la BACE 1.

Certains AINS, comme le naproxène (Fig. I-11) ont montré une réduction de la production d'A β 42 avec la libération de peptides A β plus courts et moins toxiques comme le peptide A β 38 ^[50]. Ces molécules modifient l'activité de la γ -sécrétase mais ne sont pas des l'inhibiteur de cette dernière. Cependant la plupart des études cliniques menées n'ont montré aucune amélioration significative des fonctions cognitives.

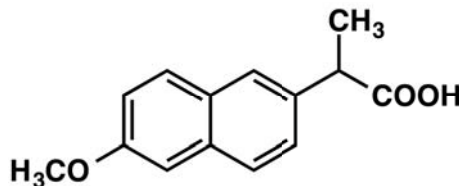


Figure I-11: Structure de l'AINS naproxène.

Les sécrétases représentent une cible thérapeutique de premier choix. Cependant, le manque de spécificité des molécules développées ou encore le rôle de ces enzymes dans d'autres processus physiologiques rendent difficile la mise un point d'un traitement efficace.

I-A-3-b Dégradation du peptide A β

L'accumulation de peptide A β dans le cerveau semble être le résultat de deux événements : une surproduction de peptide mais également une diminution de la dégradation du peptide. Une autre approche thérapeutique consiste donc à favoriser la dégradation du peptide A β par stimulation des protéases telles que la plasmine ^[51,52]. En effet, cette dernière est supposée participer au métabolisme extracellulaire du peptide A β sous la régulation du plasminogène PAI. Les agrégats d'A β peuvent stimuler l'expression de PAI et activer la formation de plasmine qui en retour hydrolyse le peptide. Ce processus d'auto-régulation est naturellement présent dans le cerveau sain. Cependant, dans les cerveaux Alzheimer, PAI est

faiblement exprimé ce qui pourrait être à l'origine de la diminution de dégradation du peptide A β et donc de son accumulation dans le cerveau.

PAZ-417 a été identifiée comme une molécule stimulant la production de plasmine. Son administration chez des souris transgéniques (modèles de la MA) entraîne une réduction du taux d'A β et des déficits cognitifs. La molécule est actuellement en cours d'évaluation clinique en essai de phase I.

I-A-3-c Inhibition de l'agrégation d'A β

Une alternative à la prévention de la production et à la dégradation de peptide A β est d'inhiber l'agrégation du peptide en formes oligomériques toxiques. Des recherches menées dans ce sens ont montré que l'utilisation de peptide mimétiques de A β ^[53], porteurs de modifications comme la présence de résidu proline, défavorise la formation de feuillets- β . Cependant, leur utilisation reste difficile. En effet, malgré leur hydrophobicité et leur faible solubilité dans l'eau, ces peptides traversent difficilement la BHE et peuvent être à l'origine de réponses immunologiques indésirables de par leurs propriétés antigéniques.

Des recherches s'orientent vers l'utilisation de molécules plus petites comme le DAPH (Fig. I-12) qui réduit la quantité de fibrilles et la toxicité *in vitro* ^[54]. Il est proposé que certains polyphénols, qui ont des propriétés antioxydantes, agissent comme des inhibiteurs de la fibrillation comme la curcumine (Fig. I-12) qui réduit le taux de plaques amyloïdes chez la souris transgénique ^[55,56].

L'utilisation de ces molécules est toutefois limitée dans l'hypothèse où les espèces les plus toxiques ne sont pas les plaques amyloïdes mais les espèces oligomériques.

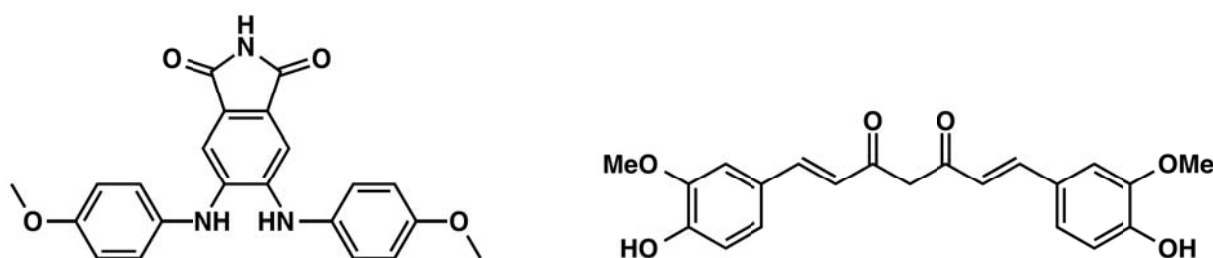


Figure I-12: Représentation des inhibiteurs de l'agrégation : le DAPH (à gauche) et la curcumine (à droite).

I-A-3-d Autres approches envisagées

D'autres approches plus ou moins controversées sont également en cours de développement comme l'immunisation contre A β . A la fin des années 90, Solomon a montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre le peptide A β 42 inhibent à la fois son agrégation *in vitro* mais peuvent aussi resolubiliser des précipités fibrillaires d'A β 42 [57]. Depuis, des essais cliniques explorent la piste vaccinale (immunisation active), l'immunisation passive (sérothérapie) ou spécifique [58-60].

Des essais cliniques d'immunisation active avec le peptide A β 42 pré-agrégé ont montré que 6% des patients ont développé des encéphalites méningées graves suite aux essais de vaccination. Ils ont donc été interrompus. De plus, dans la mesure où le peptide peut franchir la BHE, il faut garder à l'esprit que l'immunisation pourrait être responsable de l'accélération des processus de formation de plaques dans le cerveau [61].

L'immunisation passive avec des anticorps anti-A β devrait être moins toxique que l'immunisation active car associée à un risque plus faible de réponse auto-immune [61]. Comme dans le cas de l'immunisation active, plusieurs études montrent que les anticorps permettent de réduire les plaques chez des souris transgéniques [62,63]. Certains de ces anticorps sont actuellement testés cliniquement comme le Bapineuzumab, en phase d'essai clinique II et le Solanezumab en phase III [64].

L'immunisation spécifique doit encore faire ses preuves. En effet, les études cliniques en phase III du Gammagard viennent récemment d'être stoppées. Cette molécule n'apportait aucune amélioration cognitive (www.alzforum.org).

Différentes pistes thérapeutiques sont en cours de développement. Malgré le nombre important d'essais cliniques, aucune molécule n'est suffisamment spécifique ou efficace pour empêcher l'agrégation du peptide A β sans affecter d'autres fonctions physiologiques. La recherche d'un médicament efficace contre la MA nécessite d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques. C'est la raison pour laquelle de plus en plus d'études s'intéressent aux rôles des métaux dans la maladie. Ces derniers pouvant alors représenter une voie thérapeutique innovante.

I-B Thioflavine T et la maladie d'Alzheimer

Cette seconde partie de l'introduction aborde l'utilisation de la Thioflavine T (ThT) comme sonde fluorescente pour étudier l'agrégation du peptide A β . Après une brève présentation des fluorophores habituellement utilisés pour suivre l'agrégation de manière générale, nous verrons pourquoi la ThT est particulièrement adaptée à l'étude du processus d'agrégation du peptide A β .

I-B-1 Agrégation et fluorophores

La cascade amyloïde, une des origines possibles de la MA, correspond au passage du peptide A β sous forme monomérique soluble à une forme agrégée, insoluble. La caractérisation de ce processus d'agrégation et des différents types d'agrégats formés en terme de taille, de forme ou de morphologie nécessite l'utilisation de plusieurs méthodes complémentaires. Idéalement, ces techniques doivent être capables de détecter d'important changement conformationnel du peptide en fonction de son état d'agrégation. La spectroscopie de fluorescence répond à ce critère, c'est une méthode très sensible qui est largement utilisée dans l'analyse des protéines.

I-B-1-a Présentation des principaux fluorophores utilisés^[65]

En 1965, Stryer a montré que l'interaction du fluorophore ANS (1-anilino-8-naphthalène-sulfonate) avec une cavité hydrophobe était accompagnée d'une augmentation de sa fluorescence ainsi qu'un déplacement de son pic d'émission vers les plus hautes énergies. Depuis l'ANS et son analogue dimérique, le bis-ANS, sont largement utilisés dans la caractérisation des protéines. Le Nile Red a été utilisé pour la première fois pour la détection de lipides intracellulaires et pour suivre les changements conformationnels de diverses protéines. Dans le cadre de l'agrégation et caractérisation des fibres amyloïdes le Congo Red et la ThT sont les fluorophores les plus utilisés. Ces fluorophores (Fig. I-13) vont être succinctement présentés dans le tableau (Tableau I-1). Les caractéristiques spectroscopiques et l'utilisation de la ThT seront détaillées dans la suite du chapitre.

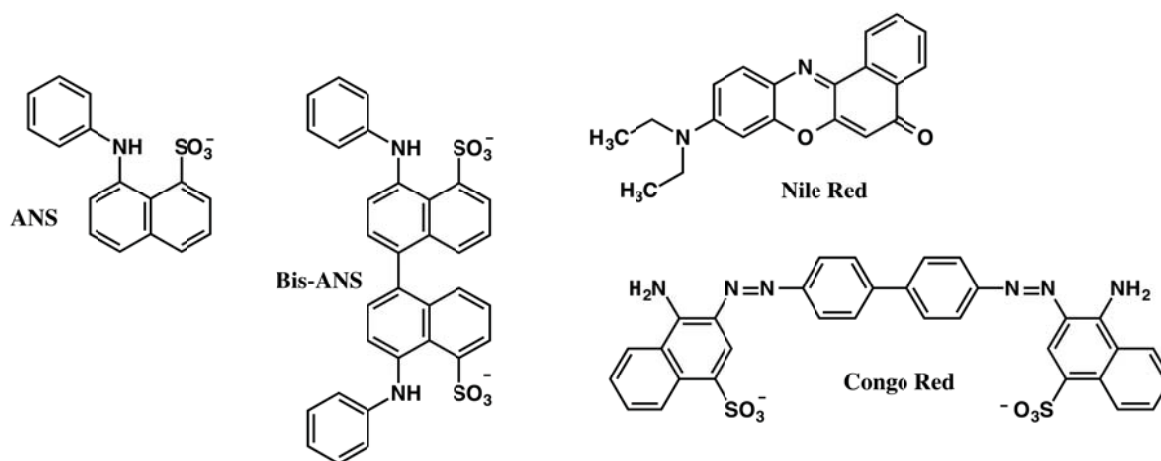


Figure I-13: Représentation des fluorophores couramment utilisés: ANS, bis-ANS, Nile Red et Congo Red.

I-B-1-a-i ANS et bis-ANS

Les propriétés de fluorescence du ANS et bis-ANS (Fig. I-13) sont très sensibles à l'environnement (polarité, viscosité et température). Le pic d'émission de ces deux fluorophores ainsi que leur rendement quantique est fonction de la constante diélectrique du solvant utilisé mais également de leur interaction avec les protéines. En effet, il est proposé que l'ANS et le bis-ANS se lient aux protéines via des interactions hydrophobes et électrostatiques. Plus précisément, l'interaction avec les protéines se fait entre les charges négatives, portées par les groupements sulfonates des fluorophores, et les charges positives portées par les acides aminés de la protéine comme l'histidine, l'arginine ou la lysine. Cependant, des interactions de type Van der Waals sont également nécessaires pour stabiliser cette interaction

Par ailleurs, la différence de taille entre l'ANS et le bis-ANS va conduire à des différences au niveau du nombre et de l'affinité des sites de liaison aux protéines. Plusieurs protéines montrent une plus grande affinité pour le bis-ANS et de ce fait une augmentation de la fluorescence plus importante que pour l'ANS. Ces deux fluorophores vont être utilisés comme senseur des changements conformationnels des protéines (formation de surface hydrophobe) au cours de l'agrégation de ces dernières.

I-B-1-a-ii Le Nile Red

Comme pour l'ANS et le bis-ANS, les propriétés de fluorescence du Nile Red (Fig. I-13) dépendent fortement de la polarité du solvant utilisé et plus son environnement est polaire, plus la fluorescence du Nile Red va être importante. C'est pour cette raison que le Nile Red est utilisé comme sonde des changements conformationnels des protéines et plus particulièrement sur la formation de surfaces hydrophobes qui peuvent se créer au cours de l'agrégation ou de la structuration de protéines de la même façon que l'ANS.

I-B-1-a-iii Le Congo Red

Le Congo Red (Fig. I-13) est très utilisé pour colorer les fibres amyloïdes présentes dans les tissus via des interactions non-ioniques. L'interaction avec les fibres amyloïdes provoque un déplacement du maximum d'absorbance en UV (490 à 540 nm) et induit du dichroïsme circulaire entre 300 et 600 nm. De nombreux modèles d'interaction entre le Congo Red et les fibres amyloïdes ont été proposés et sont résumés dans la revue de Frid ^[66].

Tableau I-1: Propriétés spectroscopiques et application du ANS, bis-ANS, Nile Red et Congo Red.

Fluorophore	Excitation (nm)	Emission (nm)	UV-Vis (nm)	Coeff. Extinction molaire (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Solution stock	Application
ANS	350-380	505	350 (eau)	5000	Eau, éthanol	Surface hydrophobe, structuration, agrégation
Bis-ANS	385-400	515	385 (eau)	16790	Eau, éthanol, méthanol	Surface hydrophobe, structuration, agrégation
Nile Red	540-580	660	552 (DMSO)	19600	DMSO, éthanol, DMF	Surface hydrophobe, structuration, agrégation
Congo Red	550		498 (eau) 505 (éthanol)	45000 (eau) 59300 (éthanol)	10 à 40% éthanol	fibrillation

I-B-1-b Fluorophores et caractérisation des protéines

L'utilisation de ce type de fluorophores est particulièrement informative lors des études de dénaturation/structuration des protéines et permet de mettre en évidence l'absence ou non de passages par des intermédiaires plus ou moins structurés (ou molten intermediates). En présence de tels intermédiaires, l'intensité de fluorescence ainsi que la position du maximum d'émission sont modifiées reflétant ainsi la formation de surfaces hydrophobes.

Ces fluorophores sont très utilisés dans l'étude de l'agrégation des protéines. Par exemple, l'ANS et le bis-ANS sont révélateurs des premiers états d'agrégation qui sont présents à de très faible concentration et ont une durée de vie très courte.

D'autres applications peuvent nécessiter l'utilisation de ces sondes fluorescentes comme dans la visualisation des protéines par microscopie de fluorescence qui permet d'obtenir des informations sur l'état agrégé ou non des protéines.

La principale application de ces fluorophores concerne la détection des fibres amyloïdes avec la ThT comme fluorophore privilégié de par ses propriétés de fluorescence très adaptées en présence de ces fibres.

I-B-2 La Thioflavine T (ThT)

Beaucoup de molécules organiques, en présence de fibres amyloïdes, présentent des changements au niveau de leur absorbance ou de leur fluorescence ce qui permettrait de les utiliser en tant que sonde optique pour mettre en évidence l'existence de ces fibres dans les tissus humains ou dans des échantillons tests. Cependant, la plupart de ces molécules ont tendance à inhiber la formation des fibres amyloïdes.

Historiquement, la ThT est utilisée comme colorant pour détecter la présence de fibres amyloïdes dans les coupes histologiques des cerveaux de patients décédés [67]. Depuis, grâce à sa solubilité dans l'eau et son affinité pour les fibres amyloïdes, la ThT est utilisée *in vitro* pour suivre l'agrégation du peptide A β en fibres amyloïdes [39]. Elle est connue dans la littérature pour interagir spécifiquement avec les fibres amyloïdes et est considérée comme inerte vis-à-vis de la formation de ces dernières.

I-B-2-a Généralités ^[39,68,69]

La ThT, molécule chargée positivement, est composée d'un noyau de type aniline et d'un fragment de type benzothiazole (Fig. I-14). Dans cette conformation « libre », les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la ThT sont 385 et 485 nm respectivement. En présence de fibres amyloïdes, la ThT va former un complexe fluorescent avec les fibres qui ne possède pas les mêmes caractéristiques spectroscopiques : les pics d'excitation et d'émission en fluorescence sont à 440 et 490 nm. Les caractéristiques spectroscopiques ainsi que les propriétés d'interaction dans les fibres de la ThT sont plus explicitées dans le chapitre II (cf § II-A-2-d, p. 78).

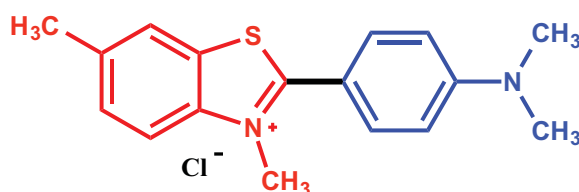


Figure I-14: Représentation de la ThT avec en rouge le fragment benzothiazole et en bleu le fragment aniline.

I-B-2-b ThT et fibres amyloïdes

La ThT possède une bonne affinité pour les fibres amyloïdes ($K_d \sim 1 \mu\text{M}$) ^[70] et elle n'interagit pas avec les espèces monomériques du peptide A β qui ne sont pas ou très peu structurées. Elle interagit cependant avec les espèces oligomériques mais dans ce cas son augmentation de fluorescence ne sera pas aussi importante (multipliée par 1.5) qu'en présence de fibres ($\gg 100$ fois plus) ^[71]. De nombreuses études sont menées pour connaître l'origine de ces propriétés uniques, elles visent à comprendre au niveau moléculaire et thermodynamique le mode d'interaction de la ThT avec les fibres amyloïdes.

I-B-2-c-i Interaction ThT-fibres amyloïdes

Différentes études ont proposé que l'interaction entre la ThT et les fibres amyloïdes se ferait au niveau de cœur hydrophobe du peptide, entre la Leu17 et l'Asp23 par des interactions de type π -stacking avec les résidus aromatiques (Phe). Par ailleurs, la ThT serait orientée de façon parallèle à l'axe des fibres formées d'un empilement de feuillets β (Fig. I-15) ^[72,73]. Cependant aucune structure du complexe ThT-fibres amyloïdes n'a été résolue à ce jour.

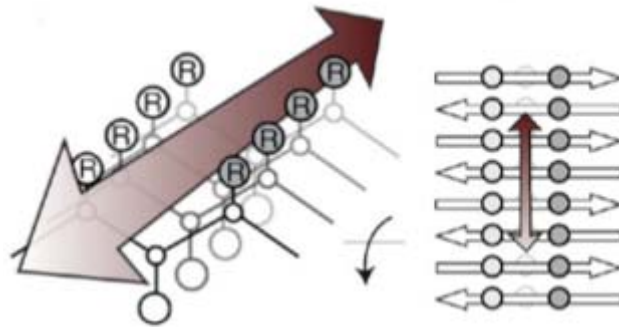


Figure I-15: Représentation de l'orientation supposée de la ThT de façon parallèle à l'axe des feuillets- β .

I-B-2-c-i Site d'interaction

La résolution structurale du complexe ThT-fibre permettrait en effet de déterminer avec précision le mode d'interaction de la ThT. Récemment, l'équipe de Turoverov a montré que la ThT aurait deux modes d'interaction possibles aux fibres amyloïdes. Chacun de ce mode est caractérisé par un coefficient d'extinction molaire, une constante d'affinité ainsi qu'un nombre de site de liaison et un rendement quantique ^[68]. Une autre étude propose que la ThT possède trois sites de fixation distincts aux fibres amyloïdes ^[70]. Il est également proposé que 5 résidus hydrophobes ou aromatiques consécutifs soient nécessaires pour la liaison de la ThT au peptide A β ce qui expliquerait le ratio 1:4 à 1:35 de ThT:A β monomérique détecté dans les fibres ^[74].

La ThT est un fluorophore utilisé depuis le début des années 60 pour caractériser la présence de fibres amyloïdes. Cependant cette interaction est encore mal décrite à ce jour et plusieurs questions restent sans réponse. Connaître précisément le mode d'interaction de la

ThT n'est pas seulement important d'un point de vue fondamental, les dérivés de la ThT sont des molécules intéressantes en tant que marqueurs (imagerie) mais également en tant que vecteurs de molécules actives contre la MA (cf § I-D-3-a-iii, p. 61).

I-B-2-c ThT et agrégation

L'agrégation du peptide A β en fibres amyloïdes est un processus multi-étape. Des facteurs thermodynamiques et cinétiques sont impliqués dans l'agrégation du peptide A β et les différents intermédiaires formés au cours de ce processus peuvent coexister à chaque étape de l'agrégation. Un mécanisme communément admis pour la formation et la croissance des fibres est un processus en deux étapes successives : la nucléation et l'élongation. La cinétique de la réaction est dépendante des constantes de vitesse de nucléation et d'élongation ^[29].

I-B-2-c-i La nucléation

Le peptide A β est non-structuré sous forme monomérique et en solution les monomères vont s'associer de façon à former des noyaux. La formation de ces noyaux nécessite plusieurs étapes d'association qui ne sont pas thermodynamiquement favorisées à cause du coût énergétique nécessaire à cette association. La formation de ces noyaux représente donc l'étape limitante dans la formation des fibres.

Dans cette étape de nucléation, les peptides ne sont pas structurés au départ. La proportion de feuillets- β va augmenter au cours du temps. Par conséquent aucun changement de fluorescence de la ThT ne sera observé dans les toutes premières étapes de l'agrégation.

I-B-2-c-ii L'élongation

Une fois les noyaux générés, les assemblages fibrillaires vont commencer à se former ce qui correspond à la phase d'élongation énergétiquement favorisée. Ceci va se traduire par une brusque et rapide augmentation de la fluorescence de la ThT indiquant la formation de feuillets- β . En effet, cette phase correspond à l'étape durant laquelle les espèces intermédiaires de l'agrégation vont se structurer en feuillets- β puis en fibres amyloïdes. A partir du moment où les fibres se forment, la fluorescence ne va plus augmenter et un plateau

sera alors observé. Les changements de fluorescence observés au cours de l'agrégation sont représentés de façon schématique par une sigmoïde (Fig. I-16) dans laquelle l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de fibres formées si la concentration en ThT n'est pas limitante.

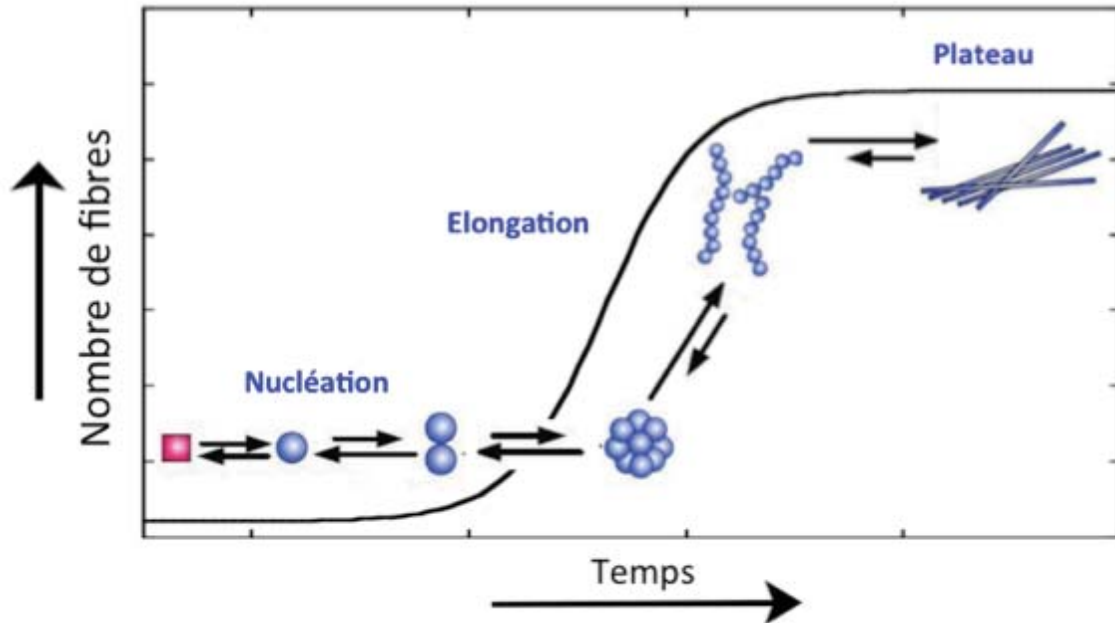


Figure I-16: Courbe théorique du processus d'agrégation qui possède une allure de sigmoïde

I-C Les métaux en biologie

Les métaux, présents sous forme ionique, ont un rôle essentiel en biologie. La troisième partie de ce chapitre consiste en une présentation de ces ions métalliques ainsi que leurs rôles dans les systèmes biologiques et comment leur dérégulation peut avoir de graves conséquences. Dans ce manuscrit, les termes métaux et ions métalliques sont utilisés de façon indifférenciée tout en sachant qu'il s'agit ici d'un abus de langage.

I-C-1 Les métaux : indispensables pour l'organisme

En biologie, les métaux peuvent être classés en deux catégories :

- les métaux essentiels qui ont une fonction physiologique au sein de l'organisme tels que le calcium, le cuivre, le zinc, le fer, le manganèse, etc.
- les métaux non-essentiels (ou toxiques) comme le cadmium, le mercure ou le plomb. Ces métaux ne possèdent pas de rôles biologiques connus et présentent, le plus souvent, une forte toxicité pour les organismes vivants. Il est alors nécessaire pour ces organismes de développer des processus qui vont limiter l'accumulation de ces métaux ou qui vont les modifier de façon à les rendre moins toxiques.

I-C-1-a Les métaux essentiels

Les métaux essentiels interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques. Les métaux les plus répandus dans le corps humain sont le sodium, le magnésium, le potassium et le calcium. Ils sont nécessaires à la conduction du signal nerveux, la contraction musculaire, la stabilisation des acides nucléiques et interviennent dans une multitude de processus biologiques. D'autres métaux sont présents sous forme de traces c'est-à-dire qu'ils représentent moins de 0.01% de la masse corporelle. Ces métaux traces sont principalement représentés par les métaux de transitions de la première ligne : le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le fer (Fe), leur rôle est détaillé dans la suite de ce sous-chapitre.

Ces métaux sont indispensables au bon fonctionnement des fonctions physiologiques. Cependant, à de fortes concentrations, ils peuvent devenir toxiques. De même, une carence de ces éléments peut être létale (Fig. I-17) ^[75].

Les organismes vivants doivent donc mettre en œuvre des processus de régulation afin de maintenir l'homéostasie de ces métaux essentiels nécessaires au bon fonctionnement des systèmes biologiques.

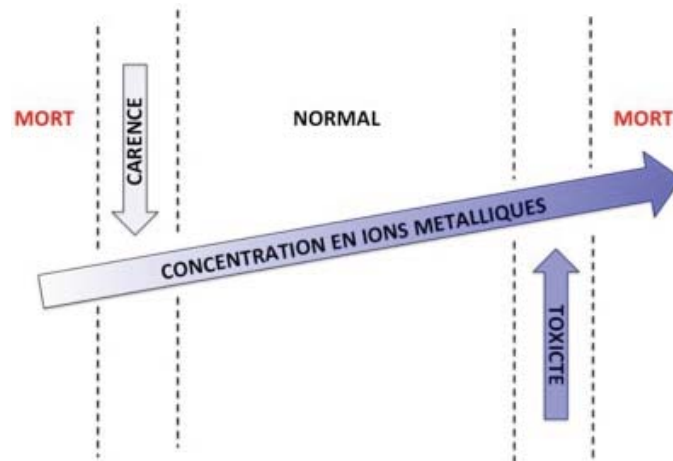


Figure I-17: Effet de la concentration en ions métalliques sur le métabolisme

I-C-1-a-i Le cuivre^[76]

Généralités

Le cuivre (Cu) est présent à l'état de trace dans le corps humain avec une concentration comprise entre 1.4 et 2.1 mg/kg. Malgré sa faible concentration, le Cu est extrêmement important à niveau de l'activité redox de la cellule. En effet, le cuivre existe sous deux états d'oxydation : Cu(I) et Cu(II). La majorité des enzymes qui utilisent le Cu sont impliquées dans des processus d'oxydation/réduction (galactose oxydase, nitrile reductase, ...), dans la chaîne respiratoire (cytochrome c oxydase) et également dans le métabolisme du Fer (ceruloplasmine) ou la production d'espèces réactives de l'oxygène (SuperOxyde Dismutase ou SOD). Les centres actifs d'enzymes à base de Cu peuvent être classés dans trois familles selon la sphère de coordination du Cu :

- le Type I ou protéines à cuivre « bleues » dans lesquelles le Cu est coordonné par 2 atomes d'azote et 2 atomes de soufre. Ces enzymes permettent le transfert d'électron comme les cupredoxines.
- le Type II où la sphère de coordination du Cu est composée de 2 atomes d'azote et/ou 2 atomes d'oxygène. Ce type d'enzyme est généralement impliqué dans la catalyse de la production d'espèces oxygénées.

- le Type III dont le centre est un dimère de Cu où les deux ions sont liés par un pont oxo ou hydroxo. Ces enzymes sont des oxydases à centres multiples.

Rôle du cuivre dans la neurotransmission ^[77]

Le transport du cuivre jusqu'au cerveau requiert le passage de la BHE via des transporteurs transmembranaires du cuivre. L'entrée du cuivre, au préalable réduit en Cu(I), dans les cellules neuronales se fait par la protéine hCtr1 (pour Human Copper Transporter). Une fois dans la synapse, le cuivre est pris en charge par différentes protéines, connue sous le nom de protéines chaperonnes du cuivre, comme Atox1, CCS (Copper Chaperon Superoxide Dismutase) ou Cox17. Ces protéines chaperonnes vont transférer le Cu(I) jusqu'à des protéines spécifiques que sont la SOD, la CCO (Cytochrome C Oxidase) ou l'ATP7A.

L'ATP7A transfère le Cu(I) à l'ATP7B qui va le libérer dans la fente synaptique, le Cu(I) est alors oxydé en Cu(II). Sous cette forme, le Cu(II) va venir activer les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Ces récepteurs régulent la consolidation des souvenirs mais également la mort du neurone.

I-C-1-a-ii Le Zinc ^[76,78]

Généralités

Le zinc est essentiel à toutes formes de vie. Il est retrouvé à hauteur de 2 g dans le corps humain. L'ion Zn(II) n'est pas redox actif c'est-à-dire qu'il ne peut intervenir dans des réactions oxydo-réduction comme le Cu car il n'existe pas sous différents états d'oxydation (son orbitale d est complète). De ce fait, il est généralement considéré comme étant moins toxique que le cuivre ou le fer.

Le zinc est connu pour participer à plus de 300 réactions enzymatiques dans lesquelles sa présence est requise pour assurer la fonction enzymatique. Un certain nombre de protéases peuvent se lier au zinc comme les carboxypeptidases qui sont des enzymes impliquées dans la digestion ou les métalloprotéases matricielles qui ont un rôle dans le développement embryonnaire, la motilité cellulaire, la cicatrisation et la reproduction.

Rôle dans la neurotransmission ^[79]

La protéine ZnT3, présente dans le cerveau, est responsable du transport du Zn du cytoplasme vers les vésicules synaptiques des terminaisons glutamatergiques. Ces vésicules vont ensuite être transportées vers la terminaison présynaptique. Le glutamate et le zinc qu'elles contiennent vont être libérés dans la fente synaptique par exocytose. Le Zn(II) va alors jouer un rôle dans la modulation des récepteurs NMDA. Le Zn(II) semble également jouer un rôle dans la plasticité synaptique et particulièrement dans la potentialisation et la dépression à long terme qui sont supposés être les mécanismes responsables de l'apprentissage et de la mémoire.

I-C-1-a-iii Le Fer ^[76]

Le corps humain contient 3-4 g de Fer dont la majorité est complexée par l'hémoglobine présente dans les globules rouges du sang. Le fer possède des états d'oxydation allant de -II à +VI. D'un point de vue biologique, les deux états d'oxydation les plus retrouvés sont le Fe(II) et Fe(III). Le Fe(III) est facilement réduit en Fe(II) par des réducteurs présents dans le milieu tels que l'ascorbate. Le Fe(IV) et Fe(V) sont seulement présent sous forme d'intermédiaires dans les mécanismes catalytiques de certaines enzymes à Fer. Le Fer est retrouvé dans trois différentes classes de protéines :

- les protéines hémiques comme l'hémoglobine, la myoglobine les cytochromes
- combiné au soufre, le Fer forme des cofacteurs Fe/S. Ces clusters Fe/S peuvent ensuite s'insérer dans des apoprotéines de type ferredoxines, nitrogénase et hydrogénase.
- les protéines non-hémiques telles que la ribonucléotide réductase intervenant dans la synthèse de l'ADN, des oxidases et oxygénases qui catalysent les étapes essentielles à la biosynthèse d'antibiotiques comme l'isopenicilline.

Le Fer est redox actif comme le Cu et de ce fait possède la capacité de catalyser la formation de radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène) en présence d'oxygène. Le Fer est retrouvé dans les vésicules synaptiques mais son rôle dans la synapse n'est pas encore élucidé ^[79].

I-C-1-b Dérégulation des métaux et maladies ^[76]

Les ions métalliques décrits précédemment ont tous des fonctions biologiques spécifiques essentielles à la vie. Le moindre problème dans la régulation de leur réservoir intracellulaire peut conduire à la formation d'espèces toxiques comme les radicaux libres létales pour les cellules. La cellule doit mettre en œuvre des systèmes complexes pour maintenir l'équilibre entre l'importance des ions métalliques et leur capacité à devenir toxiques.

Une mauvaise régulation du fer peut conduire à une anémie par un manque de fer dans l'hémoglobine ou à cause d'une diminution de nombre de globules rouges dans le sang. Ce manque de fer va se traduire principalement par de la fatigue qui peut également être le signe d'une autre pathologie, l'hémochromatose. Cette dernière correspond à un excès de fer principalement au niveau du foie, du cœur et du système endocrinien. Le fer est impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou neuroferritinopathie qui affecte les fonctions cognitives et motrices des malades.

La maladie de Menkes est une maladie génétique liée au chromosome X associée à un manque de cuivre. Cette carence en Cu va se traduire par un retard de croissance, des problèmes neurologiques et une hypopigmentation. Un excès de cuivre dans le foie et le cerveau est le principal symptôme de la maladie de Wilson entraînant cirrhose, défaillances hépatiques et neurologiques ainsi que des problèmes psychiatriques. La céruloplasmine est une oxydase à centre multiple qui lie 95% du cuivre présent dans le sang et qui est responsable du transport du cuivre dans le corps humain. Des mutations sur le gène responsable de sa biosynthèse vont entraîner une acéruoplaminémie qui est caractérisée par une dégénérescence de la rétine, du diabète, des tremblements,

Comme le fer, une modification de l'homéostasie du cuivre est retrouvée dans de nombreux désordres neurodégénératifs comme la maladie du prion ou de Huntington qui ont pour conséquence une détérioration des fonctions motrices, cognitives et psychiatriques.

A cause de son implication dans de nombreux processus biologiques, les symptômes d'une carence en zinc vont être variés allant de la perte des cheveux à des désordres psychologiques. Le zinc est également important pour le développement du système immunitaire. Un manque de zinc va donc altérer la résistance aux bactéries et aux virus. Une

insuffisance en zinc contribuerait aux décès d'environ 800 000 enfants de moins de 5 ans à travers le monde. Un excès de zinc est très rarement rencontré et le plus souvent, il résulte d'une consommation de nourriture contaminée par des containers galvanisés. Un surplus en zinc va se traduire par de la fatigue, de la fièvre et des irritation intestinales mais va également interférer avec les taux de cuivre et de fer.

Le cuivre, le fer et le zinc jouent des rôles importants dans un grand nombre de processus biologiques malgré leur faible concentration dans l'organisme. Leur mauvaise régulation peut devenir extrêmement toxique comme montré précédemment (Fig. I-18). Leurs mécanismes d'assimilation sont largement connus. Cependant, il reste de nombreux points à élucider concernant les mécanismes responsables de leur régulation intracellulaire nécessaire pour maintenir l'équilibre entre nécessité et toxicité.

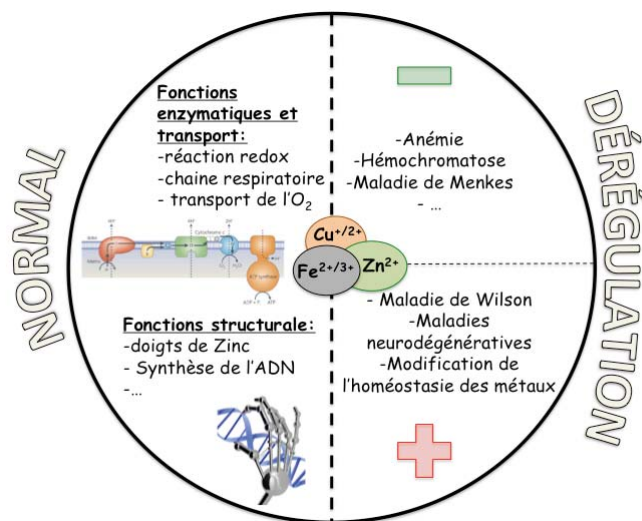


Figure I-18: Rôle des ions métalliques dans le métabolisme cellulaire et les conséquences de leur dérégulation

I-C-2 Les métaux en chimie médicinale ^[80,81]

Avec la découverte du cisplatine, $cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, comme molécule active contre le cancer, la place des métaux dans la chimie médicinale devient de plus en plus importante. En effet, comparativement aux molécules purement organiques, les métaux offrent une diversité structurale considérable. Un carbone avec quatre substituants différents va exister sous la forme de deux énantiomères. Tandis qu'un métal de géométrie octaédrique avec six substituants possède 30 stéréoisomères différents. De par leur capacité à perdre ou gagner des électrons, les métaux sont le siège de transferts électroniques. Cette activité redox peut être bénéfique d'un point de vue activité thérapeutique avec notamment l'activation du complexe par réduction de son état d'oxydation. Une autre propriété intéressante à l'utilisation de complexes métalliques en chimie médicinale est leur capacité à échanger leur ligand. Cette caractéristique peut se révéler très précieuse notamment dans la préparation des complexes.

Dans la suite de ce paragraphe, différents exemples de métaux utilisés en chimie médicinale dans le cadre d'une application thérapeutique ou comme outils au diagnostic vont être présentés. L'utilisation de complexes à base de Ruthénium sera plus détaillée.

I-C-2-a Outils diagnostiques ^[82]

Diagnostiquer le plus précocement et rapidement possible une pathologie est l'un des objectifs de la chimie médicinale. Une détection à un stade précoce de la maladie permet de mettre en place des traitements efficaces et de réduire les coûts de traitement (hospitalisation, médicaments,...). L'imagerie médicale est l'une des techniques les plus utilisées dans l'établissement d'un diagnostic. En effet, elle est non-invasive pour le patient et permet une évaluation rapide du fonctionnement d'un organe.

Les sondes radioactives permettent de visualiser une cible spécifique tout en exposant le malade à une radioactivité comparable à celle reçue lors d'une radiographie. L'un des isotopes le plus couramment utilisé est le Technetium 99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ^[83,84]. Une des alternatives à son utilisation est le gallium (Ga) qui possède deux isotopes radioactifs : le ^{67}Ga et le ^{68}Ga ^[83,85]. Contrairement à ces métaux, le gadolinium (Gd) n'est pas utilisé en médecine nucléaire mais comme agent de contraste pour l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ^[86-88].

Les métaux, cités ici, ne représentent que les métaux les plus couramment utilisés dans l'imagerie. Cette liste n'est pas exhaustive et de nouvelles sondes à base de métaux comme le bismuth^[89], le titane^[90] ou l'or^[91] sont en cours de développement.

I-C-2-b Agents thérapeutiques

En plus de leur utilisation pour l'imagerie médicale, les métaux de transition sont également développés dans un but thérapeutique avec comme chef de file le Platine et le Ruthénium. La grande majorité de ces complexes sont actifs contre le cancer (platine, ruthénium, or, titane, bismuth, ...) ^[89,90,92]. Les métaux de transition ont également des activités anti-bactériennes (sels d'argent), anti-parasitaires (ferrocényle) et sont utilisés dans le traitement contre le diabète (vanadium) ou l'arthrite (or) ^[81,93,94]. Les propriétés thérapeutiques de certains de ces métaux sont résumées dans le tableau I-2.

Ti Cancer	V Diabète Cancer VIH Tuberculose	Ru Immunosuppresseur Cancer Malaria Antibiotique	Rh Infection bactérienne Cancer Malaria	Pd VIH Cancer
Ag Anti-bactérien Alliages dentaires	Os Leishmaniose Arthrite rhumatoïde	Pt Cancer VIH Microbes	Au Cancer VIH Asthme Arthrite rhumatoïde	Bi Cancer Ulcère Microbes

Tableau I-2: Propriétés thérapeutiques de certains métaux de transition

I-C-2-b-i **Le Platine (Pt)**

En 1964, Barnett Rosenberg a découvert les propriétés anti-tumorales du cisplatine, *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂, lors de ces travaux sur l'influence du champ électrique sur la croissance bactérienne ^[95]. Malgré les réticences à utiliser des métaux lourds en tant qu'agent thérapeutique, le cisplatine est rapidement entré en phase d'essai clinique et a montré de très bons effets sur des tumeurs à un stade avancé. Il est utilisé dans le traitement de nombreux

cancers comme le cancer des ovaires, des testicules ou de la langue. Il contribue également au traitement contre le cancer de l'œsophage ou du cou [96].

Cependant, il reste inactif contre certains cancers. Un inconvénient supplémentaire est l'apparition de forme de résistance après l'administration du complexe. De plus, les effets secondaires rencontrés sont sévères et limitent donc la dose injectée.

De nouveaux composés anti-cancéreux à base de Pt ont donc été développés [97] et certains sont actuellement utilisés dans les traitements anti-cancéreux [98]. Une approche consiste à modifier les propriétés chimiques et biologiques du platine via son état d'oxydation. Les complexes de Pt les plus actifs sont des complexes de Pt(II). Il est admis que les complexes de Pt(IV) sont cinétiquement plus inertes comparativement au Pt(II), c'est-à-dire que les complexes de Pt(IV) vont pouvoir atteindre la cible désirée sans subir de modification. Par exemple, un complexe de Pt(IV) est administré. Une fois dans le milieu physiologique, il va être activé par réduction passant de l'état d'oxydation +IV à +II dans les cellules cancéreuses et ainsi jouer son rôle de molécule thérapeutique. Les molécules cancéreuses sont connues pour avoir un niveau élevé de glutathion par rapport au tissu sain créant ainsi un environnement réducteur. Si le complexe de Pt(II) quitte cet environnement, il sera facilement oxydé en Pt(IV) par l'oxygène moléculaire ou des enzymes oxydantes présentes dans les cellules saines et ainsi redevenir inerte pour les tissus sains. Le complexe de Pt est donc activé par réduction. Il s'agit de la stratégie *prodrug*.

La réduction du Pt(IV), cinétiquement inerte, par des réducteurs biologiques en Pt(II), actif va entraîner, entre autre, une modification des propriétés pharmacocinétiques du complexe. Le complexe JM-216 (Fig. I-19) est un complexe de Pt(IV) activé par réduction en Pt(II) et actuellement en phase clinique III [99].

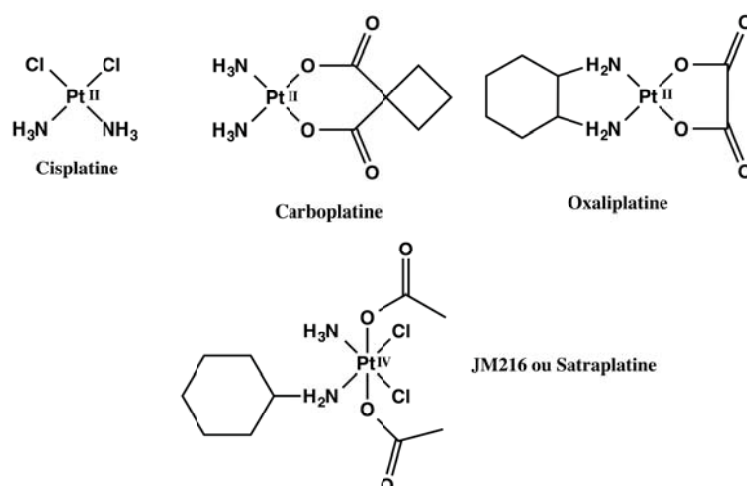


Figure I-19: Représentation des complexes cisplatine, carboplatine et oxaliplatine utilisés dans le traitement contre le cancer ainsi que du complexe JM216 qui est au degré d'oxydation +IV et qui pourra être activé par réduction.

Malgré, l'approche *prodrug*, les complexes de Pt peuvent présenter une cytotoxicité élevée contre les cellules saines et ne sont pas actifs contre tous les types de cancer. Une alternative est de développer des complexes métalliques analogues au Pt en terme de réactivité mais présentant une cytotoxicité moins importante. Pour ces différentes raisons, des complexes à base de ruthénium sont en cours de développement.

I-C-2-b-ii Le Ruthénium (Ru)

Introduction

Le Ruthénium (Ru) a été découvert en 1844 par le chimiste russe Karl Karlovich Klaus. Il est très rare, 74^{ème} élément le plus abondant sur terre, et il est retrouvé dans des minerais. Il peut être obtenu à partir de pentlandite (sulfure de Fer et de Nickel) qui contient de petites quantités de Ru ou il peut être extrait de combustible nucléaire où il contiendra des isotopes radioactifs. Le Ru a 26 isotopes dont 7 sont stables : ^{96}Ru , ^{98}Ru , ^{99}Ru , ^{100}Ru , ^{101}Ru , ^{102}Ru et ^{104}Ru . L'isotope le plus abondant est le ^{102}Ru (31.6%). Le Ru est généralement utilisé pour ses propriétés catalytiques mais également pour augmenter la résistance du titane face à la corrosion.

Caractéristiques chimiques

Le Ru est l'élément du tableau périodique qui possède le plus grand nombre de degré d'oxydation : de -II à +VIII. Il adopte plusieurs géométries en fonction de son état d'oxydation qui sont une bipyramide trigonale (Ru(0) et Ru(II)), un octaèdre (Ru(II) et Ru(III)) ou un tétraèdre (Ru(VI), Ru(VII) et Ru(VIII)). La majorité des complexes de Ru utilisés sont aux degrés d'oxydation +II, +III et +IV.

La capacité du Ru à exister sous différents degrés d'oxydation et différentes géométries lui confèrent des propriétés uniques en fonction de son degré d'oxydation : forte aptitude au transfert d'électron, acide fort de Lewis ainsi qu'un potentiel redox relativement bas.

Propriétés du Ruthénium pour une application en biologie ^[100-102]

Le Ru possède trois propriétés importantes qui en font un candidat innovant pour une application thérapeutique : sa vitesse d'échange de ligand (similaire à celle du Pt), ses divers états d'oxydation disponibles et sa capacité à mimer le fer dans sa liaison avec certaines molécules biologiques.

L'échange de ligand est un facteur très important pour une application biologique. Très peu de médicaments atteignent leur cible sans avoir subi de modifications. Par ailleurs, l'échange de ligand peut être une étape d'activation permettant d'obtenir les propriétés thérapeutiques attendues mais peut également conduire à une désactivation du complexe.

Le Ru peut exister sous trois degrés d'oxydation en milieu physiologique : II, III et IV. Les complexes de Ru(III) sont généralement plus inertes d'un point de vue biologique que les complexes de Ru(II) ou Ru(IV). Les réducteurs biologiques tels que l'ascorbate ou le glutathion peuvent facilement réduire le Ru(III) ou le Ru(IV) et l'oxygène moléculaire ainsi que le cytochrome c peuvent oxyder le Ru(II). Ce caractère redox peut être exploité pour améliorer l'efficacité du Ru en tant qu'agent thérapeutique comme dans le cas du platine, les complexes de Ru peuvent être activés par réduction.

Il est proposé que la faible toxicité du Ru soit due à sa capacité à mimer le fer dans sa liaison avec des molécules biologiques comme l'albumine ou la transferrine ^[100,101]. L'activation par réduction du Ru(III) en Ru(II) contribue également à la faible toxicité des complexes de Ru(II) étant donné que le Ru(III) est plus inerte cinétiquement que le Ru(II)^[102].

Ru et applications biologiques

Les complexes organométalliques à base de Ru présentent une forte activité en tant qu'immunosuppresseur, contre de nombreuses maladies parasitaires telles que la malaria ou la maladie de Chagas. De plus, coordonné à un antibiotique organique, le Ru permet d'augmenter son activité qui peut être due à la capacité du Ru à se lier de la même façon que le fer aux protéines présentes dans la cellule ^[100].

Le Ru est principalement utilisé en biologie pour ses propriétés anti-cancer. En effet, plusieurs complexes de Ru(II), Ru(III) ou Ru(IV) possédant des ligands de type amine, diméthylsulfoxyde (DMSO), imine ou N-hétérocycliques sont capables de se lier à l'ADN.

Cependant, la plupart de ces complexes sont très peu solubles dans l'eau ce qui est nécessaire pour permettre une efficacité et un transport vers les cellules cancéreuses. Afin d'augmenter l'hydrosolubilité des complexes de Ru, une solution consiste à utiliser des complexes possédant une charge globale non-nulle comme le NAMI-A (New Anti-tumour Metastasis Inhibitor ; -A signifiant qu'il s'agit du premier de la série) ou *trans*-[RuCl₄(DMSO)Im]-ImH (Im=imidazole). (Fig. I-20).

Le NAMI-A, premier complexe de Ru(III) a été entré en phase d'essais cliniques, est une molécule en phase clinique II ^[103]. Ce complexe est caractérisé par une cytotoxicité de l'ordre de 0,1 mM, une sélectivité pour le cancer de la langue, efficace sur les différents stade de croissance des métastases et une meilleure activité que le cisplatine sur les métastases responsables du cancer de la langue ^[104,105]. Le NAMI-A est facilement hydrolysable en solution aqueuse à pH 7.4 et il est proposé que son activité anti-métastatique soit due à la formation de l'espèce *trans*-[Ru^{III}(Cl)₄(H₂O)(Im)]⁻ ^[106]. Ce qui ferait du NAMI-A une prodrug qui est activée par réduction du Ru(III) en Ru(II) dans les cellules cancéreuses.

Un dérivé du NAMI-A plus stable, le KP1019 ^[107], également en phase d'essai clinique II, a montré une bonne réactivité contre des tumeurs modèles du cancer du colon ainsi que sur des tumeurs primaires (Fig. I-20). Le KP1019 interagit avec l'ADN de façon similaire au cisplatine mais de façon 15 fois moins intense que ce dernier en terme de liaison avec l'ADN.

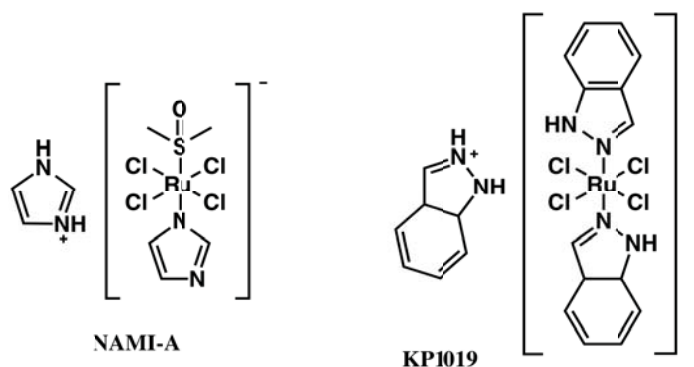


Figure I-20: Représentation du NAMI-A (à gauche) et de KP1019 (à droite).

Les complexes RM175, RAPTA-T et RDC11 (Fig. I-21) « cassent » la règle d'activation par réduction ^[104]. En effet, ces complexes sont à base de Ru(II) et n'ont pas besoin d'être réduits pour être activés. Seuls les complexes RM175 et RDC11 sont présentés ici.

Le complexe RM175 est un complexe organométallique possédant une liaison métal-carbone directe qui devrait être actif face aux cancers résistants au cisplatine. L'activité de ce complexe reposerait sur son mode de coordination à l'ADN. En effet, RM175 possède un ligand bicyclique de type arène. En plus, de la liaison conventionnelle aux résidus guanine de l'ADN, le complexe RM175 peut également interagir avec l'ADN par une intercalation du ligand arène. Ceci a été confirmé par le groupe de Brabec qui a montré des « dommages » plus prononcés de l'ADN pour des complexes possédant un ligand arène bicyclique comparativement aux complexes avec un seul cycle ^[108,109]. Le complexe RM175 semble actif contre le cancer du sein *in vitro* mais à ce jour il n'existe aucune étude clinique sur ce composé.

En se focalisant sur les propriétés anti-tumorales du complexe RDC11 (RDC pour Ruthenium Derived Compound), il semblerait que ce complexe empêche la croissance de diverses tumeurs implantées chez la souris. Contrairement au cisplatine, ce complexe ne cause pas d'effets secondaires sévères au niveau du foie, des reins ou du système neuronal sensoriel. De plus ce complexe a montré une bonne activité face aux lignées cellulaires résistantes au cisplatine. Il semblerait qu'en modifiant les ligands des complexes de type RDC, il serait alors possible de générer un complexe anticancéreux qui puisse cibler différents types de cancers ^[110].

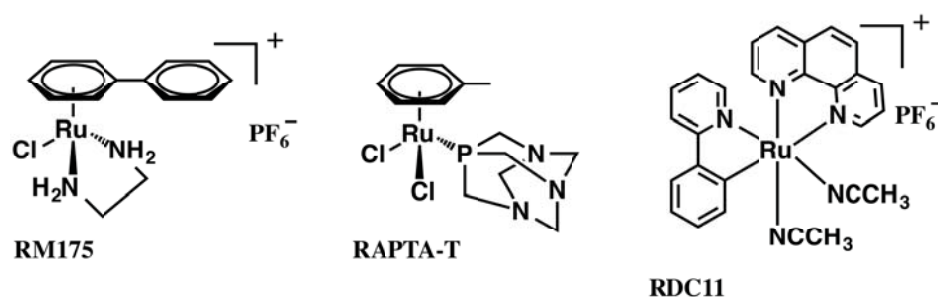


Figure I-21: Représentation des complexes RM175, RAPTA-T et RDC11.

L'utilisation de molécules inorganiques est une approche de plus en plus utilisée en chimie médicinale que se soit au niveau diagnostique ou thérapeutique de par leurs propriétés redox, leur activité ainsi que leur toxicité qui peuvent être contrôlées. A l'heure actuelle, les métaux de transitions sont largement utilisés dans le traitement contre le cancer mais leur domaine d'activité peut s'étendre à d'autres pathologies. En effet, plusieurs études ont montré que des complexes de Pt(II) sont des molécules actives contre la maladie d'Alzheimer ^[111-113] et très récemment, une publication décrit l'interaction d'un complexe de Ru(II) avec le peptide A β ^[114].

I-D Les métaux et la maladie d'Alzheimer

Dans la dernière partie de cette introduction, le rôle des ions métalliques dans la MA et plus particulièrement avec le peptide A β va être présenté. Ces derniers ne sont pas inertes vis-à-vis de la toxicité et de l'agrégation du peptide A β ce qui a amené à les inclure dans l'hypothèse de la cascade amyloïde. De plus, leur présence ouvre de nouvelles cibles thérapeutiques contre la MA qui seront présentées à la fin de cette partie.

I-D-1 Le rôle des métaux dans la maladie d'Alzheimer

La perte progressive des neurones et l'accumulation anormale de dépôts de protéines conduisent à la neurodégénération du cerveau. L'origine des maladies neurodégénératives est multifactorielle : génétique, environnementale, ... mais leurs causes premières sont toujours débattues. De nombreuses études indiquent qu'une altération de l'homéostasie des métaux pourrait accélérer voir induire le processus de neurodégénération.

I-D-1-a Stress oxydant et MA

I-D-1-a-i Définition du stress oxydant

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies liées à l'âge, la majorité des malades ont plus de 65 ans. Ceci est directement relié au stress oxydatif (peroxydation des lipides, oxydation des protéines, de l'ADN et de l'ARN) qui est l'une des principales hypothèses pour expliquer le processus de vieillissement et qui joue un rôle important dans les mécanismes de neurodégénération ^[115,116]. Le stress oxydatif peut être défini comme une perturbation de l'équilibre entre la production de radicaux libres et l'activité antioxydante de la cellule. Lors de cette perturbation, les molécules oxydées vont s'accumuler et entraîner des dysfonctionnements. Dans le cas des cellules très sensibles comme les neurones, l'absence de défense vis-à-vis de la production de radicaux libres va conduire à la mort neuronale. Dans les conditions physiologiques, les radicaux libres, produits à partir de l'oxygène moléculaire présent dans les cellules, sont le superoxyde (O $_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (HO \cdot) et l'oxyde nitrique (NO \cdot).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyxynitrite ($ONOO^-$) ne sont pas des radicaux libres mais sont des oxydants de la cellule et peuvent conduire à la formation de radicaux libres via différentes réactions chimiques (Fig. I-22) ^[117].

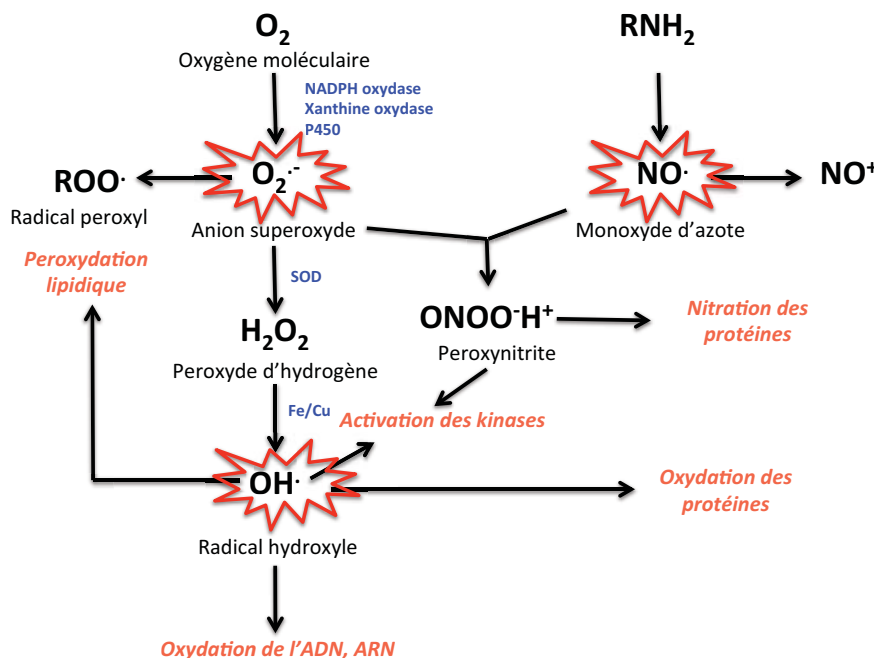


Figure I-22 : Espèces réactives de l'oxygène responsable du stress oxydatif et leur réactivité sur les molécules biologiques.

I-D-1-a-ii Stress oxydant et MA

Le stress oxydant semble jouer un rôle important dans la MA ^[38]. L'un des marqueurs de la maladie est la présence de plaques amyloïdes constituées du peptide $A\beta$ et certaines preuves indiquent qu'il y aurait une corrélation entre le stress oxydatif et la formation des plaques amyloïdes. En effet, la production de peptide $A\beta$ est considérée comme une réponse à l'augmentation du stress oxydant au niveau du cerveau. Par ailleurs, une fois que le peptide $A\beta$ a atteint une concentration suffisante, il va induire la production de radicaux libres liée à la complexation des ions métalliques possédant un caractère redox. Donc plus il y a de peptide et plus il y a de radicaux libres qui entraînent la production de peptide $A\beta$ générant ainsi un cycle sans fin ^[117,118].

I-D-1-b Métaux et MA

Le vieillissement est caractérisé par une altération de l'homéostasie des métaux et de leur distribution dans les différents organes. Les mécanismes responsables de cette perturbation ne sont encore clairement établis mais une explication possible est qu'avec l'âge, des failles apparaissent dans les systèmes de régulation des ions métalliques. En effet, la concentration en ions métalliques augmente dans de nombreux tissus, en particulier dans le cerveau, avec l'âge ^[119]. De nombreuses études ont montré que le métabolisme des ions métalliques est altéré chez les malades Alzheimer et les concentrations en cuivre, zinc et fer sont plus élevées que la normale, plus particulièrement au niveau des plaques amyloïdes et dans leur environnement immédiat comme au niveau des neuropiles (Tableau I-3) ^[119,120]. Les neuropiles correspondent au tissu nerveux de la substance grise situé entre les neurones.

	Cuivre (µM)	Fer (µM)	Zinc (µM)
Plaques séniles	393	940	1055
Neuropile - malade d'Alzheimer	304	695	786
Neuropile - contrôle sain	69	338	346

Tableau I-3: Concentration en ions métalliques dans les plaques amyloïdes et neuropiles des patients atteints de la MA et le contrôle sain (d'après la réf. [119]).

De plus, comme indiqué sur la figure I-23, l'agrégation du peptide Aβ a lieu dans la fente synaptique dans laquelle une concentration élevée en Zn(II) (200 à 300µM comparativement à une concentration de l'ordre du nano/micromolaire dans le fluide cérebrospinal ou CSF) peut être transitoirement présente suite à l'excitation neuronale (cf § I-C-1-a-ii). Les neurones « riches » en Zn(II) font partie de la famille des neurones glutamatergiques situés dans l'hippocampe qui est une région du cerveau impliquée dans les mécanismes de la mémoire et l'une des premières touchées par la MA.

Le Zn(II) libéré dans la fente synaptique n'est pas fortement lié aux ligands biologiques, principalement le glutamate. Il est donc considéré comme étant labile « labile Zn pool ». Il est donc capable d'interagir avec le peptide Aβ, même si l'affinité du Zn pour le peptide Ab est de l'ordre du micromolaire. Concernant le cuivre, la situation est moins claire mais certaines études indiquent qu'il est également labile et présent à des concentrations élevées (10 à 100µM comparées à une concentration de l'ordre du micromolaire dans le CSF) dans la fente synaptique et il est retrouvé dans certains neurones glutamatergiques.

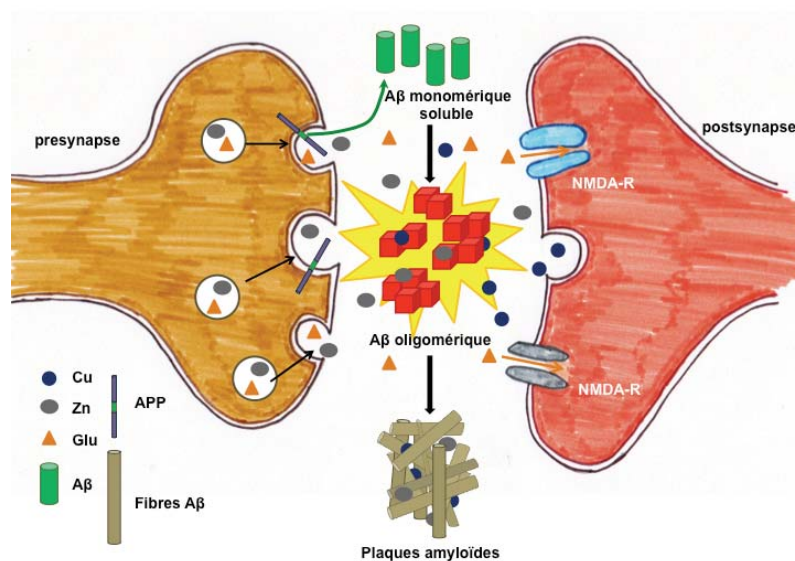


Figure I-23: Représentation de la fente synaptique où le Zn, le Cu et le peptide A β sont retrouvés en concentration anormalement élevée.

Le cuivre et le fer sont capables de catalyser la production d'espèces réactives oxygénées (ou ROS) de par leur capacité à exister sous différents états d'oxydation dans le milieu physiologique (cf § I-C-1-a-i, p. 37 et I-C-1-a-iii, p. 39). Dans la cellule, le fer est principalement lié à la ferritine. Il est supposé être peu lié au peptide A β ^[121]. Son implication dans la MA ne sera donc pas abordé dans ce manuscrit.

Le Cu(II) va être réduit en Cu(I) par l'ascorbate, principal réducteur biologique extracellulaire. Le Cu(I) va rapidement transférer son électron à l'oxygène moléculaire pour former le superoxyde et revenir à l'état Cu(II). Ce cycle va continuer tant que la quantité de réducteur et d'oxydant est suffisante. La réduction du Cu(II) en Cu(I) mène également à la formation de peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyl (Fig. I-24) ^[118].

Les ions métalliques présentent une forte activité redox dans les conditions physiologiques. Leur forte présence dans les plaques amyloïdes permet d'anticiper qu'ils jouent un rôle dans le processus d'agrégation du peptide A β mais également sur la toxicité qui en résulte.

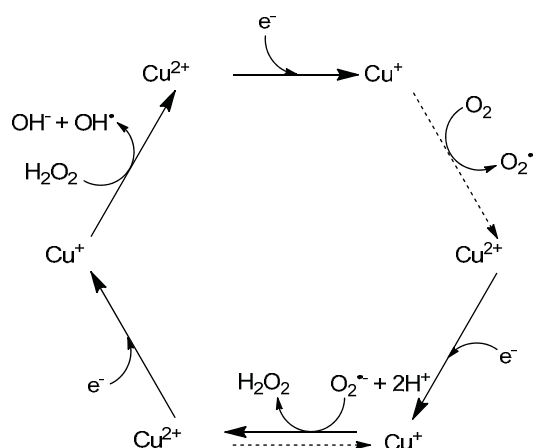


Figure I-24: Catalyse de la production de ROS par le cuivre (adaptée de la réf. [94])

I-D-2 Les métaux et le peptide A β

Le peptide A β est capable de complexer les ions métalliques qui sont présents dans les plaques amyloïdes à des concentrations élevées. Identifier les sites de fixation de ces métaux et comprendre en quoi ils peuvent influencer l'agrégation et la toxicité du peptide A β vont ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Les sites de fixation des métaux se situent sur les 16 premiers acides aminés (A β 16) de la séquence (cf Fig. I-6) ^[122-124]. Les études d'interaction peptide-métal sont généralement réalisées sur ce peptide car en plus de contenir les sites de fixation des métaux, il n'agrège pas ce qui facilite grandement ces études.

I-D-2-a Cuivre et A β

I-D-2-a-i **Coordination** ^[121]

Cu(II) et peptide A β

Le Cu(II) possède deux sites de fixation sur le peptide A β avec des constantes d'affinité différentes indiquant la présence d'un site de forte affinité ($^{\text{cond}}K_a \sim 10^{-10} \text{ M}^{-1}$) et un site d'affinité plus faible ($^{\text{cond}}K_a \sim 5 \cdot 10^{-7} - 10^{-8} \text{ M}^{-1}$). Le site de forte affinité se situe sur la partie N-terminale du peptide allant des résidus 1 à 16 ^[125].

Des études d'interaction du Cu(II) avec des peptides plus longs comme le peptide A β 28 (qui contient les 28 premiers acides aminés) ont permis de mettre en évidence le second site de fixation du Cu(II). Cependant, il est très difficile de l'identifier de par sa faible affinité (100 fois moins affin que le premier site). Par ailleurs, le Cu(II) est présent dans les plaques amyloïdes en sous-stoechiométrie par rapport au peptide A β , ce second site d'affinité ne présente donc pas d'intérêt biologique. Dans la suite du manuscrit, seul le site de forte affinité est décrit.

Les nombreuses études sur la coordination du Cu(II) au peptide A β ont montré la coexistence de deux espèces au pH physiologique usuellement appelées composante **I** (majoritaire à bas pH) et composante **II** (majoritaire à haut pH). Ces deux espèces possèdent des signatures spectroscopiques différentes ce qui a permis de pouvoir identifier leur mode de coordination au Cu(II). En plus des études spectroscopiques, des études de potentiométrie et calorimétrie ont montré que la composante **II** résulte d'une déprotonation de la composante **I**.

La composante **I** est un complexe pyramidale à base carrée qui fait intervenir dans le plan équatorial une amine (Asp1), deux imidazoles (His6 et His13/His14) et la fonction carbonyle d'une liaison peptidique. En ce qui concerne la position apicale, le site de coordination est toujours débattue mais il est proposé que la coordination implique une fonction carboxylate (Asp1, Glu3, Asp7 ou Glu11). La composante **II** possède un environnement très similaire à la composante **I** : dans le plan équatorial on retrouve l'amine (Asp1), un imidazole (His6, His13 ou His14), une fonction amide déprotonnée (Asp1-Ala2) et un groupement carbonyle (Ala2-Glu3). La position apicale est occupée par la fonction carboxylate de l'aspartate 1 (Fig. I-25).

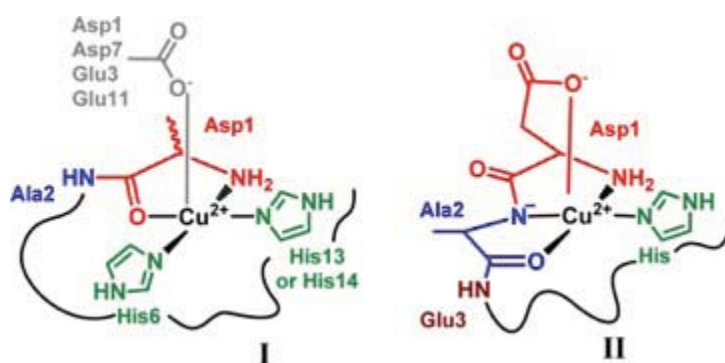


Figure I-25: Représentation schématique des composantes **I** et **II** proposées pour la coordination du Cu(II) au peptide A β .

Cu(I) et peptide A β

Le cuivre possède un caractère redox. Il peut également exister sous la forme Cu(I). L'effet du caractère redox du cuivre en présence de peptide A β sera abordé dans le paragraphe I-D-2-a-iii (cf p. 56). L'affinité du Cu(I) pour le peptide A β n'est pas aussi étudiée que celle du Cu(II). Il n'existe à l'heure actuelle que peu d'études, contradictoires, quant à la valeur de la constante d'affinité ($\sim 10^{-8}/10^{-7} \text{ M}^{-1}$) du Cu(I) pour le peptide A β [126-128].

Le mode de coordination du Cu(I) pour le peptide A β a pu être déterminé à partir des données obtenues par RMN et XAS (Spectroscopie d'Absorption des Rayons-X) [129]. Le complexe formé est de géométrie linéaire dans laquelle le Cu(I) est lié via les deux résidus histidines 13 et 14 (Fig. I-26).

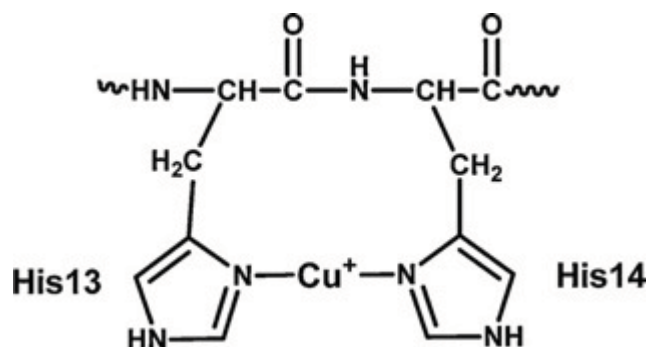


Figure I-26: Représentation schématique de la coordination du Cu(I) au peptide A β

I-D-2-a-ii Effet sur l'agrégation

La coordination du cuivre au peptide A β n'est pas inerte vis-à-vis du processus d'agrégation. Cependant son effet sur l'agrégation est toujours débattu. Le Cu(II) est considéré comme un promoteur de l'agrégation. En présence d'une quantité sous-stoechiométrique de Cu(II), le peptide A β 42 va former des fibres amyloïdes [130-132]. Cependant, la présence d'un excès de Cu(II) par rapport au peptide A β 40/42 va conduire à la formation d'oligomères sphériques (10-20 nm) ainsi que d'agrégats amorphes insolubles qui ne pourront s'organiser en fibres par la suite [131,133,134]. A contrario, d'autres études montrent que la présence de Cu(II) aurait un effet inhibiteur sur l'agrégation du peptide A β [135,136]. L'effet du cuivre sur l'agrégation semble dépendre des conditions expérimentales.

I-D-2-a-iii Effet sur la toxicité ^[137-139]

Le stress oxydant, responsable de la toxicité liée à la MA peut être induit par la présence de cuivre qui est capable de catalyser la production de ROS (cf § I-C-1-b, p. 40). Il est donc supposé que le complexe Cu-A β peut contribuer à la production de ROS dans la MA. Le cuivre ne va pas seulement catalyser l'oxydation des lipides ou des protéines, responsable de la mort neuronale mais il peut également être responsable de l'oxydation des chaînes latérales du peptide A β ajoutant des atomes d'oxygène pour former la méthionine sulfoxyde ou sulfone en position 35, modifiant les lysines en position 16 et 28 ^[138]. La tyrosine en position 10 est également visée puisque de nombreuses modifications ont été observées comme la formation de dityrosine ou nitrotyrosine ^[139]. Très récemment, il a été montré que les résidus Asp 1 forme, après décarboxylation et déamination, un résidu pyruvate ou isocyanate ^[137]. De plus, les résidus His 13 et 14 sont également touchés en formant des oxo-histidines ^[137]. Par ailleurs, des produits d'oxydation des histidines ont pu être isolés des plaques amyloïdes. Ces résidus sont directement impliqués dans la coordination du Cu(II) et du Zn(II), leur oxydation va donc conduire à une modification de cette coordination. Il est attendu un effet sur l'agrégation du peptide.

I-D-2-b Zinc et A β

I-D-2-b-i Coordination ^[29,140,141]

Contrairement au cuivre, le zinc forme majoritairement un complexe 1:1 avec le peptide A β avec une constante d'affinité de $\sim 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. Classiquement, la coordination du Zn(II) implique 4 à 6 ligands. De par sa structure électronique (d^{10}), la coordination du Zn(II) ne peut être étudiée que par RMN, via le déplacement chimique des acides aminés directement impliqués dans sa sphère de coordination, et par XAS. Des études RMN sur la formation du complexe Zn(II)-A β ont démontré l'implication des 3 résidus histidines (His6, His13 et His14) dans la coordination du centre métallique. Cependant, l'identification des ligands additionnels reste controversée : Asp1, Arg5, Glu11, ou une molécule d'eau exogène. Etant donné l'implication des résidus histidines, le Glu11 semble être le candidat le plus probable ^[142]. La coordination d'un quatrième voire cinquième ligand peut dépendre de la longueur du peptide ainsi que des conditions expérimentales. Ces facteurs peuvent influencer le mode de coordination du Zn(II). Par ailleurs, il n'est pas à exclure que différents complexes

Zn(II)-A β avec 4 ou 5 ligands peuvent coexister. Un possible modèle du complexe Zn(II)-A β est obtenu à partir de ces différents éléments (Fig. I-27).

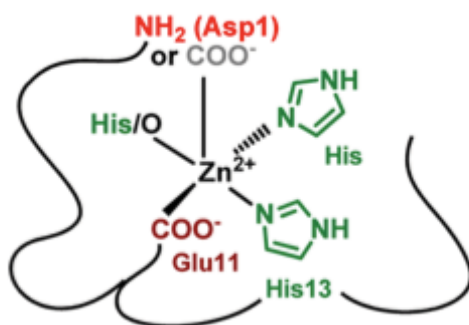


Figure I-27: Représentation du modèle proposé pour la coordination du Zn(II) au peptide A β .

I-D-2-b-ii Effet sur l'agrégation et la toxicité ^[143]

Contrairement au cuivre et au fer, le Zn(II) ne possède pas d'activité redox et n'induit donc pas de production de ROS. Cependant, la présence de Zn(II), même à de faible concentration accélère l'agrégation du peptide en formant des agrégats de type amorphe qui sont supposés moins toxiques que les agrégats formés sans Zn(II). Le caractère cytoprotecteur du Zn(II) n'est pas clairement établi. En effet, certaines études ont montré que le Zn(II) peut induire des agrégats toxiques sous certaines conditions ^[144,145].

Il faut donc retenir que le Zn(II) ne va pas intervenir directement au niveau du stress oxydatif mais peut largement contribuer à la formation des plaques amyloïdes.

I-D-2-c L'hypothèse de la cascade amyloïde et les métaux

Les ions métalliques sont présents dans les plaques amyloïdes à des concentrations élevées. Etant données les propriétés redox du cuivre et du fer qui vont favoriser la production de ROS et la capacité du zinc à promouvoir l'agrégation, leur présence a été intégrée dans l'hypothèse de la cascade amyloïde (Fig. I-28) ^[146].

En effet, les espèces les plus toxiques sont supposées être les espèces oligomériques qui vont pouvoir produire des ROS suite à leur métallation avec les ions cuivre et/ou fer. De la même façon, la complexation au zinc va favoriser la formation des plaques amyloïdes.

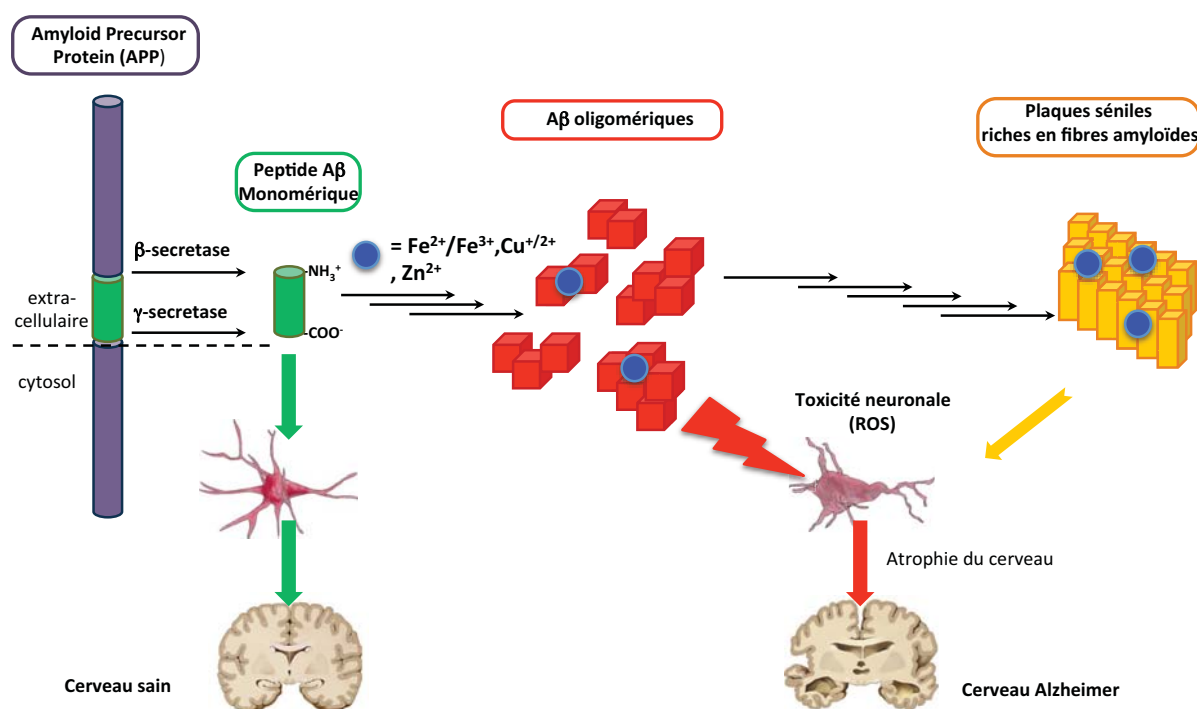


Figure I-28: Hypothèse de la cascade amyloïde revisitée et tenant compte du rôle des métaux.

I-D-3 Les métaux : une nouvelle cible thérapeutique ?

La présence des ions métalliques et leur rôle dans la MA ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour lutter contre cette maladie. Plusieurs stratégies, présentées dans ce paragraphe, sont en cours de développement et certaines des molécules conçues montrent une très bonne activité *in vitro* et *in vivo*.

I-D-3-a Chélateurs d'ions métalliques ^[147]

Etant donné les effets négatifs de la coordination des ions métalliques (Cu, Fe et Zn) au peptide Aβ (production de ROS et modification des propriétés d'agrégation), il n'est pas surprenant que la première stratégie thérapeutique envisagée soit la chélation de ces ions métalliques.

I-D-3-a-i Les premiers chélateurs

A la fin des années 90, il a été montré que l'agrégation du peptide A β induit par le Cu(II) et le Zn(II) était réversible en présence des chélateurs d'ions métalliques. Ces résultats encourageants ont permis d'envisager un traitement avec des chélateurs d'ions métalliques qui pourraient permettre la solubilisation des dépôts amyloïdes. Dans ce but, la capacité des chélateurs d'ions métalliques connus comme l'EDTA (acide éthylène diaminetetraacétique), le DTPA (acide diéthylène triaminepentaacétique) et leurs dérivés (Fig. I-29) à solubiliser les plaques amyloïdes dans le cerveau de patients décédés a été évaluée [148-150]. Cependant, l'utilisation de ces chélateurs *in vivo* est très limitée puisqu'ils ne peuvent franchir la BHE et qu'ils ne sont pas spécifiques pour les métaux visés [147].

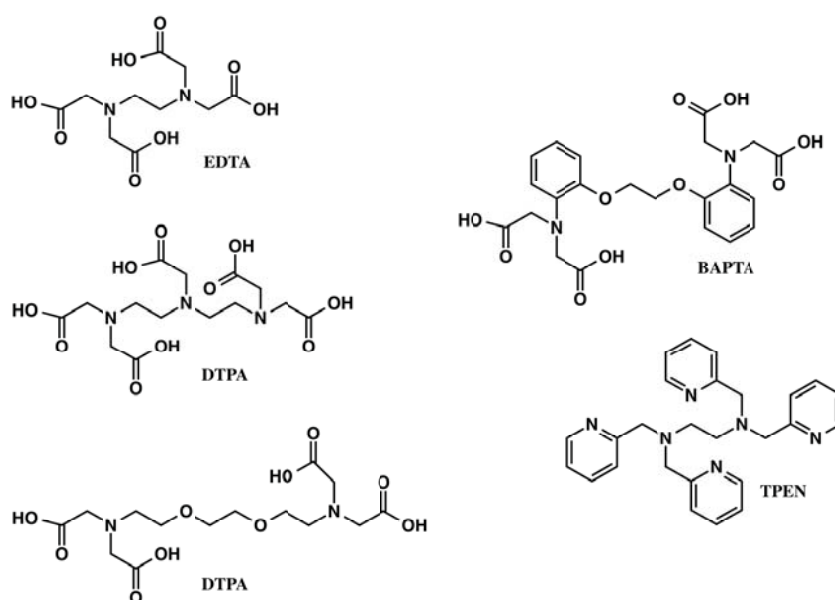


Figure I-29: Représentation des ligands EDTA et DTPA ainsi que quelques dérivés.

Peu de temps après, le clioquinol, petite molécule capable de lier le Cu(II) et le Zn(II), a semblé particulièrement adaptée pour une utilisation en tant que chélateur des ions métalliques dans la MA [151].

I-D-3-a-ii Le clioquinol et ses dérivés*Le clioquinol (CQ)*

A l'origine, le CQ (Fig. I-30) est utilisé comme antibiotique pour traiter les désordres intestinaux. Mais sa capacité à passer la BHE et son affinité pour le Cu(II) et Zn(II) ont fait de lui un candidat potentiel comme traitement contre la MA. En effet, le clioquinol forme les complexes $\text{Cu}(\text{CQ})_2$ et $\text{Zn}(\text{CQ})_2$ avec des constantes de stabilité de $1,2 \times 10^{-10}$ et $7,0 \times 10^{-8} \text{ M}^{-2}$ [152]. De plus, le clioquinol est une molécule qui a déjà été évaluée et approuvée comme traitement dans les années 70.

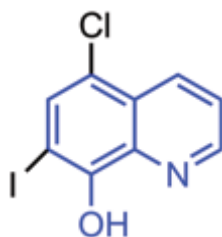


Figure I-30: Représentation du clioquinol (CQ) avec le squelette 8-HQ en bleu.

Afin de prouver son efficacité thérapeutique vis-à-vis de la MA, le CQ a été administré à des modèles de souris transgéniques pour la MA qui ont montré une diminution de 50% des dépôts amyloïdes par comparaison avec des souris non-traitées sans signe de toxicité [151]. Ces résultats prometteurs ont permis au CQ d'être évalué en phase d'essai clinique I puis en phase II. Le CQ n'est pas allé plus loin dans les essais cliniques à cause de ses effets néfastes (altération du métabolisme de la vitamine B12, modification de la distribution en fer provoquant douleurs abdominales et décoloration verte de la langue) et de son inefficacité à améliorer les fonctions cognitives des malades [153]. L'une des hypothèses avancées est que du fait de la présence de l'iode, le clioquinol n'est pas stable avec formation de produits de dégradation toxiques [154]. De nouvelles molécules ont été développées à partir du squelette 8-hydroxyquinoline (8-HQ) du CQ (Fig. I-30).

Le Bis-8HQ et dérivés

En présence d'ions métalliques (Cu(II), Zn(II) et Fe(III)) et de peptide A β 42, le bis-8HQ (Fig. I-31) montre une meilleure inhibition de l'agrégation du peptide comparativement au CQ ainsi qu'une inhibition de la production de ROS *in vitro*. A partir de ces données, des dérivés du bis-8HQ ont été synthétisés (Fig. I-31) et leur capacité anti-agrégation et anti-ROS évaluées par rapport au CQ et au bis-8HQ [155].

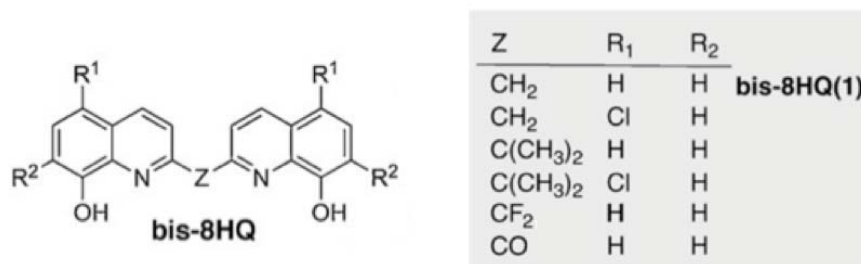


Figure I-31: Représentation du bis-8HQ et des ses dérivés

Tous les composés sont de meilleurs chélateurs du Cu(II) et du Zn(II) que le CQ mais les études physico-chimiques en présence de peptide ont montré que les modifications apportées n'ont pas fortement amélioré les propriétés anti-agrégation et anti-ROS du composé original bis-8HQ. L'une de ces molécules, PA1637, a été testée sur un modèle de souris non-transgéniques auxquelles des oligomères d'A β 42 ont été injectés par voie intracérébroventriculaire afin de provoquer des déficits cognitifs de la MA. Le composé PA1637 a montré qu'il était capable, après 3 semaines de traitement, d'empêcher les pertes de mémoire épisodiques provoquées par l'injection des oligomères d'A β 42 [156]. Ce résultat très encourageant fait du PA1637 un candidat potentiel comme molécule active contre la MA.

Le PBT2 [157-159]

Le chélateur le plus avancé en terme d'essai clinique est le PBT2, actuellement en phase d'essai clinique II, qui possède un squelette basé sur le 8HQ mais dont la structure exacte n'est pas connue. Cependant, à partir des brevets publiés, Orvig [147] a pu établir que le PBT2 ne possédait pas d'iode mais un groupement diméthylaminométhyle ainsi que deux chlores. La position de ces substituants sur les deux cycles aromatiques n'a pu être déterminée. Des études *in vitro* de ce ligand ont montré qu'il est capable d'empêcher la production de ROS ainsi que la formation d'agrégats induit par le Cu(II) ou le Zn(II). Son administration à des souris transgéniques a permis de diminuer la présence de plaques

amyloïdes et une amélioration des fonctions cognitives. Le PBT2 est un ionophore c'est-à-dire qu'il n'est pas seulement capable de chélater le Cu(II) et le Zn(II) mais il peut également les transporter à l'intérieur de la cellule. En effet, la présence de Zn(II) et également de Cu(II) au niveau intracellulaire a des effets bénéfiques sur la régulation de l'activité synaptique.

I-D-3-a-iii Des chélateurs vectorisés

Dans le but d'améliorer l'efficacité des chélateurs et de les adresser spécifiquement au peptide A β , une approche envisagée est d'utiliser des dérivés de molécules connues pour leur affinité avec le peptide A β .

La Thioflavine T (ThT) est un fluorophore utilisé pour caractériser la formation de fibres amyloïdes (cf § I-B-2, p. 31). Cette propriété fait de la ThT une molécule d'adressage idéale (Fig. I-32).

Une stratégie a consisté à combiner les propriétés chélatantes du CQ à la ThT. A l'aide d'études *in silico*, deux molécules ont été sélectionnées : HBX (2-(2-hydroxyphényl)benzoxazole) et HBT (2-(2-hydroxyphényl)benzothiazole) (Fig. I-32). Ces molécules présentent des constantes d'affinité pour le Cu(II) et le Zn(II) similaire au CQ en présence de peptide A β 40 soluble ^[160].

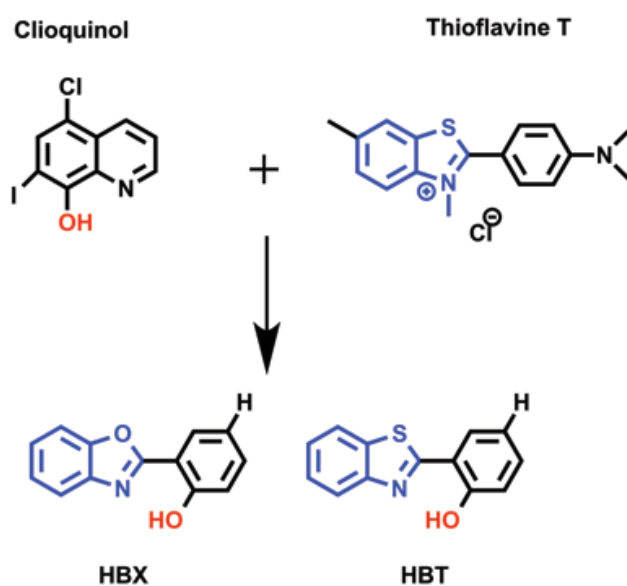


Figure I-32: Représentation de la ThT (en haut à droite) et des ligands HBX et HBT (combinaison du CQ (rouge) et de la ThT (bleu))

Les molécules décrites ne représentent qu'une partie des molécules en cours de développement en tant que chélateur des ions métalliques. D'autres ligands à base de phénantroline, salen, salan, hydroxamates, etc montrent également de bonnes propriétés anti-ROS et anti-agrégation^[147].

La chélation des ions métalliques est une stratégie viable mais qui présente certaines limites dont la plus importante concerne l'affinité pour les métaux. Le chélateur ne doit pas être trop « fort » : les ions métalliques sont indispensables à de nombreux processus biologiques. De plus, il est nécessaire que le chélateur soit spécifique d'un ion métallique afin de ne pas interférer dans d'autres processus biologiques impliquant le calcium ou le sodium par exemple.

I-D-3-b Complexes de Pt, Ru et autres métaux de transition^[161]

La coordination des ions métalliques au peptide A β se fait principalement via les noyaux imidazoles des résidus histidines (cf § I-D-2-a-i, p. 53 et I-D-2-b-i, p. 56). Concevoir des molécules qui vont pouvoir venir se lier spécifiquement à ses résidus représente une stratégie innovante. En effet, en empêchant la coordination des ions métalliques (Cu, Fe et Zn) par d'autres ions/complexes métalliques (Pt, Ru), l'oligomérisation et donc l'agrégation du peptide A β seraient alors affectées voire empêchées. Etant donné l'importance des résidus histidines, cibler les noyaux imidazoles représente une stratégie innovante.

I-D-3-b-i Des complexes de Pt...

Afin de valider cette approche, une série de complexes de Pt possédant des ligands de type phénantroline (Fig. I-33), connu pour interagir avec le peptide, ont été synthétisés et leur activité vis-à-vis de l'agrégation et de la production de ROS évaluée^[111].

Les études en présence de peptide A β , de Cu(II) et des complexes de Pt ont montré que ces derniers sont capables de modifier la coordination du Cu(II) au peptide A β en se fixant aux résidus histidines du peptide, d'inhiber la formation d'agrégats ainsi que la production de ROS en présence de Cu(II). Des études *in vivo*, réalisées sur des souris, ont montré que la présence de ces complexes permettait de rétablir la plasticité synaptique inhibée par la présence de peptide A β . D'autres complexes de Pt(II) ont été développés^[112,113] comme par exemple le complexe Pt(phényl-méthylpyridine)(DMSO)Cl qui a été synthétisé dans l'équipe (Fig. I-33). Ce complexe a montré une bonne réactivité vis-à-vis de l'agrégation

induite par le Zn(II) en étant capable de l'inhiber cependant il ne peut inhiber la production de ROS alors qu'il est capable de modifier la coordination du Cu(II) au peptide ^[162]. Ce type de complexe permet donc d'obtenir un effet spécifique du métal (Cu ou Zn).

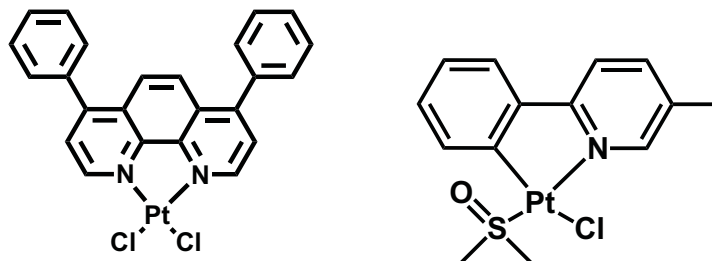


Figure I-33: Représentation des complexes Pt(4,7-diphényl-1,10-phénantroline)Cl₂ (à gauche) et Pt(phényl-méthylpyridine)(DMSO)Cl (à droite)

I-D-3-b-ii ... ou de Ru comme anti-MA

Les complexes de Pt(II) pouvant présenter une certaine cytotoxicité, des complexes à base de Ru ont été mis au point. En plus d'être moins toxique, le Ru possède une forte affinité pour les noyaux imidazoles ^[163].

L'étude de l'interaction entre le complexe Ru(CO)₃Cl₂(thiazole) ^[114] (Fig.I-34) et le peptide Aβ₂₈ a montré la formation d'un complexe Aβ-Ru via les résidus histidines après libération des ligands thiazole et chlorures. En effet, l'ajout du complexe Ru(CO)₃Cl₂(thiazole) sur le peptide Aβ₂₈ se traduit sur le spectre RMN du peptide par l'apparition des signaux du ligand thiazole « libre » et un élargissement sélectif des pics des trois histidines ainsi que de la Tyr₁₀. La même expérience a été réalisée avec le peptide amyloïde murin. Ce peptide possède trois mutations dont une sur l'histidine 6. Les résultats obtenus indiquent que l'histidine 6 n'est pas essentielle à la coordination du Ru(II). La liaison du centre métallique au peptide de fait principalement via les histidines 13 et 14.

De plus, une étude par spectrométrie de masse après addition du complexe sur les peptides Aβ₂₈ et Aβ₄₂ a mis en évidence une augmentation de 185 Da des différents états de protonation du peptide. Cette augmentation de masse correspond au fragment Ru(CO)₃²⁺ suggérant que c'est ce fragment qui est lié aux résidus histidines 13 et 14 après libération des ligands thiazole et chlorures. Cette coordination laisse supposer que la coordination du Cu(II) ainsi que du Zn(II) au peptide Aβ va être fortement modifiée. En dépit

de ces résultats encourageants, aucune étude en présence de complexe sur l'agrégation et la production de ROS n'a été réalisée.

Un complexe binucléaire Pt/Ru, $[(bpy)_2Ru(dpp)PtCl_2]Cl_2$ (Fig. I-34) a montré une sélectivité pour le peptide A β . Il est également capable d'inhiber l'agrégation du peptide ainsi que la production de ROS ^[164].

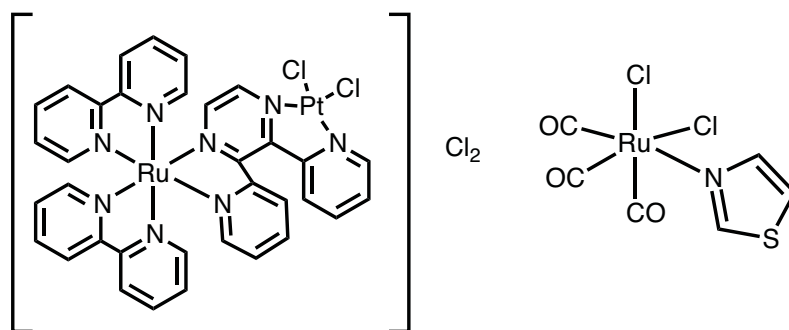


Figure I-34 : Représentation du complexe binucléaire Pt/Ru (à gauche) et du complexe $Ru(CO)_3Cl_2(thiazole)$ (à droite)

Ces deux études indiquent que l'utilisation de complexes à base de Ru semble une voie thérapeutique viable.

I-D-3-b-iii Vers l'utilisation d'autres métaux de transition

Une récente étude a montré que des complexes à base de rhodium (Rh) et d'iridium (Ir) (Fig. I-35) sont capables d'empêcher l'agrégation du peptide A β 40 ^[165]. Ces complexes semblent être de potentiels agents thérapeutiques contre la MA.

Les études par microscopie de fluorescence et TEM ont montré que ces complexes ralentissaient fortement le processus d'agrégation. Les complexes les plus efficaces sont ceux contenant un ligand phénylpyridine. Cette efficacité est certainement due à un effet stérique. Et de façon surprenante, les complexes à base de Rh semblent plus efficaces que les complexes d'Ir laissant supposer que la liaison au peptide est très dépendante de la capacité du centre métallique à se lier aux résidus histidines.

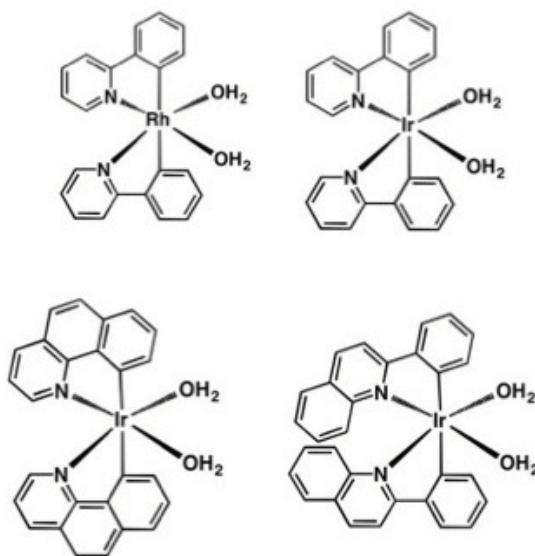


Figure I-35: Complexes de Rh et Ir potentiellement actifs contre la MA

La présence des ions métalliques ouvre de nouvelles voies thérapeutiques prometteuses. De façon à optimiser l'activité de ces nouvelles molécules contre la MA, il est nécessaire de comprendre les mécanismes du processus d'agrégation.

Conclusion

La maladie d'Alzheimer est une pathologie complexe qui est toujours incurable à l'heure actuelle. Les mécanismes de formation des plaques amyloïdes n'étant pas clairement élucidés, il est très difficile de concevoir un traitement efficace, les médicaments actuels ne traitant pas directement les causes de la maladie mais seulement ces effets. Il est donc nécessaire de comprendre comment le peptide A β passe d'une forme monomérique soluble dans le cerveau des patients sains à une forme agrégée dans le cerveau des patients Alzheimer.

La Thioflavine T (ThT) est le fluorophore classiquement utilisé pour étudier la cinétique d'agrégation du peptide A β . La ThT possède des propriétés spectroscopiques à peu près uniques en présence de fibres amyloïdes. En présence de peptide monomérique, l'intensité de fluorescence de la ThT ne change pas. Cependant, en présence de fibres amyloïdes, la fluorescence de la ThT va être exaltée. Cette interaction n'est pas clairement élucidée. Il est suggéré que la ThT interagit peu voire pas du tout avec les espèces monomériques qui ne sont pas ou très peu structurées. Cependant, ne pas observer d'augmentation de fluorescence de la ThT en présence du peptide monomérique ne signifie pas forcément qu'il n'existe aucune interaction entre eux. Le chapitre III présente les résultats obtenus lors de l'étude, principalement par spectroscopie RMN ^1H , de l'interaction entre la ThT et le peptide A β 28 sous forme monomérique (peptide modèle contenant à la fois les sites de fixation de ions métalliques et une partie plus hydrophobe responsable de l'agrégation).

Le chapitre IV consiste en l'étude de l'agrégation du peptide A β 28. En effet, les structures du peptide A β monomérique et sous forme de fibres amyloïdes sont bien décrites dans la littérature mais il existe peu d'informations concernant les espèces oligomériques intermédiaires. Le peptide monomérique ne possède pas de structure particulière tandis que les fibres amyloïdes sont organisées en feuillets- β . Il est proposé qu'au cours de l'agrégation, le peptide va progressivement se structurer en feuillets- β . Ces feuillets- β vont par la suite interagir entre eux pour former des fibres amyloïdes dont l'accumulation conduit à la formation des plaques séniles. Une partie de mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte. L'étude de l'agrégation du peptide A β 28 par spectroscopie de fluorescence et RMN a pour but de caractériser les espèces oligomériques intermédiaires de l'agrégation. Après une étape

d'optimisation des conditions expérimentales principalement réalisée par spectroscopie de fluorescence de la ThT, l'agrégation du peptide A β 28 a été étudiée par spectroscopie RMN ^1H . Ces travaux m'ont amené à étudier de plus près l'influence de la ThT sur la cinétique d'agrégation. Cette dernière est supposée inerte sur la cinétique d'agrégation cependant il n'existe aucune donnée expérimentale confirmant ou infirmant cette hypothèse.

Plusieurs données indiquent que les ions métalliques (Cu, Zn et Fe) jouent un rôle important dans la maladie d'Alzheimer, en particulier le Cu et le Zn qui favoriseraient l'agrégation du peptide A β . De plus, le Cu semble être impliqué dans la toxicité liée à l'agrégation du peptide A β par sa capacité à catalyser la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'implication de ces ions métalliques dans la maladie d'Alzheimer ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques. Une de ces stratégies consiste en l'utilisation de complexes métalliques qui vont être capables de se lier au peptide A β via les résidus histidines qui sont les sites de coordinations privilégiés du Cu et du Zn. Ainsi la coordination du Cu et du Zn serait empêchée et par la suite l'agrégation du peptide A β ainsi que la production de ROS. L'un des objectifs de ma thèse a été de concevoir des complexes de Ru(II) possédant des propriétés anti-agrégation et anti-ROS et pouvant être facilement vectorisés par la suite par des dérivés de la ThT. En effet, la ThT est connue pour interagir spécifiquement avec les fibres amyloïdes et des modifications structurales peuvent la rendre plus affine pour les espèces plus précoces de l'agrégation. La synthèse de ces complexes ainsi que les études physico-chimiques réalisées en présence de peptide A β 28 sont présentées dans le chapitre IV.

Bibliographie

- [1] F. Eustache, B. Lechevalier, F. Viader, **1996**, La mémoire: Neuropsychologie clinique et modèles cognitifs.
- [2] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631–639.
- [3] M. Goedert, M. G. Spillantini, *Science* **2006**, *314*, 777–781.
- [4] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, L. I. Binder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 4913–4917.
- [5] G. Lee, R. L. Neve, K. S. Kosik, *Neuron* **1989**, *2*, 1615–1624.
- [6] G. T. Bramblett, M. Goedert, R. Jakes, S. E. Merrick, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *Neuron* **1993**, *10*, 1089–1099.
- [7] M. Sarazin, B. Dubois, *Rev. Prat.* **2005**, *55*, 1879–1890.
- [8] M. Romano, E. Buratti, *Drugs Today* **2013**, *49*, 181–193.
- [9] S. R. Choi, J. A. Schneider, D. A. Bennett, T. G. Beach, B. J. Bedell, S. P. Zehntner, M. J. Krautkramer, H. F. Kung, D. M. Skovronsky, F. Hefti, C. M. Clark, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2012**, *26*, 8–16.
- [10] N. Okamura, K. Yanai, *IDrugs* **2010**, *13*, 890–899.
- [11] S. C. Janicki, N. Schupf, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2010**, *10*, 359–366.
- [12] R. Eehalt, P. Keller, C. Haass, C. Thiele, K. Simons, *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 113–123.
- [13] J. Wang, K. Ohno-Matsui, I. Morita, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2012**, *424*, 704–709.
- [14] M. Simons, P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C. G. Dotti, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 6460–6464.
- [15] L. Bertram, C. M. Lill, R. E. Tanzi, *Neuron* **2010**, *68*, 270–281.
- [16] M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S. J. Hultgren, *Science* **2002**, *295*, 851–855.
- [17] D. Claessen, R. Rink, W. de Jong, J. Siebring, P. de Vreugd, F. G. H. Boersma, L. Dijkhuizen, H. A. B. Wosten, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1714–1726.
- [18] J. M. Kenney, D. Knight, M. J. Wise, F. Vollrath, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4159–4163.
- [19] C. Delevoeye, F. Giordano, G. van Niel, G. Raposo, *Med. Sci.* **2011**, *27*, 153–162.
- [20] N. N. Nalivaeva, A. J. Turner, *FEBS Letters* **2013**, *587*, 2046–2054.
- [21] D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741–766.
- [22] T. Iwatsubo, A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, Y. Ihara, *Neuron* **1994**, *13*, 45–53.
- [23] D. Puzzo, O. Arancio, *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *33*, S111–S120.
- [24] A. B. Clippingdale, J. D. Wade, C. J. Barrow, *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 227–249.
- [25] D. M. Holtzman, J. C. Morris, A. M. Goate, *Sci. Trans. Med.* **2011**, *3*, 1–17.
- [26] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22364–22372.
- [27] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury Jr, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693–4697.
- [28] G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, D. B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 330.
- [29] P. Faller, C. Hureau, O. Berthoumieu, *Inorg. Chem.* **2013**, DOI 10.1021/ic4003059.
- [30] S. B. Malinchik, H. Inouye, K. E. Szumowski, D. A. Kirschner, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 537–545.
- [31] C. S. Goldsbury, S. Wirtz, S. A. Müller, S. Sunderji, P. Wicki, U. Aebi, P. Frey, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 217–231.

- [32] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16742–16747.
- [33] O. N. Antzutkin, J. J. Balbach, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, J. Reed, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 13045–13050.
- [34] O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, J. J. Balbach, R. Tycko, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15436–15450.
- [35] O. N. Antzutkin, J. J. Balbach, R. Tycko, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3326–3335.
- [36] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17342–17347.
- [37] J. Hardy, *Science* **2002**, *297*, 353–356.
- [38] W. Klein, *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 219–224.
- [39] S. Noël, S. Cadet, E. Gras, C. Hureau, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, DOI 10.1039/c3cs60086f.
- [40] C. A. McLean, R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush, C. L. Masters, *Ann. Neurol.* **1999**, *46*, 860–866.
- [41] D. Moechars, I. Dewachter, K. Lorent, D. Reversé, V. Baekelandt, A. Naidu, I. Tesseur, K. Spittaels, C. V. Haute, F. Checler, E. Godaux, B. Cordell, F. Van Leuven, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 6483–6492.
- [42] L. Mucke, E. Masliah, G.-Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, L. McConlogue, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 4050–4048.
- [43] L. Désiré, E. Blondiaux, J. Carrière, R. Haddad, O. Sol, P. Fehlbauer-Beurdeley, R. Einstein, W. Zhou, M. P. Pando, *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *34*, 469–483.
- [44] M. Asai, C. Hattori, N. Iwata, T. C. Saido, N. Sasagawa, B. Szabó, Y. Hashimoto, K. Maruyama, S.-I. Tanuma, Y. Kiso, S. Ishiura, *J. Neurochem.* **2006**, *96*, 533–540.
- [45] I. Hussain, J. Hawkins, D. Harrison, C. Hille, G. Wayne, L. Cutler, T. Buck, D. Walter, E. Demont, C. Howes, A. Naylor, P. Jeffrey, M. I. Gonzalez, C. Dingwall, A. Michel, S. Redshaw, J. B. Davis, *J. Neurochem.* **2007**, *100*, 802–809.
- [46] N. Marks, M. J. Berg, *Neurochem. Int.* **2008**, *52*, 184–215.
- [47] J. N. Freskos, Y. M. Fobian, T. E. Benson, M. J. Bienkowski, D. L. Brown, T. L. Emmons, R. Heintz, A. Laborde, J. J. McDonald, B. V. Mischke, J. M. Molyneaux, J. B. Moon, P. B. Mullins, D. B. Prince, D. J. Paddock, A. G. Tomasselli, G. Winterrowd, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 73–77.
- [48] J. N. Freskos, Y. M. Fobian, T. E. Benson, J. B. Moon, M. J. Bienkowski, D. L. Brown, T. L. Emmons, R. Heintz, A. Laborde, J. J. McDonald, B. V. Mischke, J. M. Molyneaux, P. B. Mullins, D. B. Prince, D. J. Paddock, A. G. Tomasselli, G. Winterrowd, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 78–81.
- [49] R. S. Doody, R. Raman, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, F. He, X. Sun, R. G. Thomas, P. Aisen, *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 341–350.
- [50] D. Beher, E. E. Clarke, J. D. J. Wrigley, A. C. L. Martin, A. Nadin, I. Churcher, M. S. Shearman, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 43419–43426.
- [51] N. N. Nalivaeva, L. R. Fisk, N. D. Belyaev, A. J. Turner, *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 212–224.
- [52] M. A. Leissring, W. Farris, A. Y. Chang, D. M. Walsh, X. Wu, X. Sun, M. P. Frosch, D. J. Selkoe, *Neuron* **2003**, *40*, 1087–1093.
- [53] S. P. Handattu, C. E. Monroe, G. Nayyar, M. N. Palgunachari, I. Kadish, T. van Groen, G. M. Anantharamaiah, D. W. Garber, *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *36*, 335–347.
- [54] B. J. Blanchard, A. Chen, L. M. Rozeboom, K. A. Stafford, P. Weigele, V. M. Ingram, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 14326–14332.

- [55] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 27–37.
- [56] F. Yang, G. P. Lim, A. N. Begum, O. J. Ubeda, M. R. Simmons, S. S. Ambegaokar, P. P. Chen, R. Kayed, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892–5901.
- [57] B. Solomon, R. Koppel, E. Hanan, T. Katzav, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 452–455.
- [58] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Nature* **1999**, *400*, 173–177.
- [59] S. Gilman, M. Koller, R. S. Black, L. Jenkins, S. G. Griffith, N. C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M. B. Rovira, F. Forette, J. M. Orgogozo, AN1792(QS-21)-201 Study Team, *Neurology* **2005**, *64*, 1553–1562.
- [60] R. C. Dodel, Y. Du, C. Depboylu, H. Hampel, L. Frölich, A. Haag, U. Hemmeter, S. Paulsen, S. J. Teipel, S. Brettschneider, A. Spottke, C. Nölker, H. J. Möller, X. Wei, M. Farlow, N. Sommer, W. H. Oertel, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **2004**, *75*, 1472–1474.
- [61] E. M. Sigurdsson, B. Frangione, T. Wisniewski, *Drug Dev. Res.* **2002**, *56*, 135–142.
- [62] F. Bard, C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, I. Lieberburg, R. Motter, M. Nguyen, F. Soriano, N. Vasquez, K. Weiss, B. Welch, P. Seubert, D. Schenk, T. Yednock, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 916–919.
- [63] R. B. DeMattos, K. R. Bales, D. J. Cummins, J. C. Dodart, S. M. Paul, D. M. Holtzman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 8850–8855.
- [64] H. O. Tayeb, E. D. Murray, B. H. Price, F. I. Tarazi, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2013**, *13*, 1075–1084.
- [65] A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1487–1499.
- [66] P. Frid, S. V. Anisimov, N. Popovic, *Brain Res. Rev.* **2007**, *53*, 135–160.
- [67] P. S. Vassar, C. F. Culling, *Arch. Pathol.* **1959**, *68*, 487–498.
- [68] A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 2538–2544.
- [69] A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 11519–11524.
- [70] A. Lockhart, *J. Biol. Chem.* **2004**, *280*, 7677–7684.
- [71] A. A. Reinke, J. E. Gestwicki, *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 399–411.
- [72] C. Rodríguez-Rodríguez, A. Rimola, L. Rodríguez-Santiago, P. Ugliengo, A. Álvarez-Larena, H. Gutiérrez-de-Terán, M. Sodupe, P. González-Duarte, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1156.
- [73] M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, A. M. Donald, *J. Struct. Biol.* **2005**, *149*, 30–37.
- [74] M. Biancalana, S. Koide, *BBA - Proteins and Proteomics* **2010**, *1804*, 1405–1412.
- [75] P. Faller, C. Hureau, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15910–15920.
- [76] M. R. Bleackley, R. T. A. MacGillivray, *Biomaterials* **2011**, *24*, 785–809.
- [77] Y. H. Hung, A. I. Bush, R. A. Cherny, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *15*, 61–76.
- [78] C. T. Chasapis, A. C. Loutsidou, C. A. Spiliopoulou, M. E. Stefanidou, *Arch. Toxicol.* **2011**, *86*, 521–534.
- [79] H. Tamano, A. Takeda, *Metallomics* **2011**, *3*, 656.
- [80] G. Gasser, N. Metzler-Nolte, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 84–91.
- [81] N. Chavain, C. Biot, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2729–2745.
- [82] M. Fani, H. R. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 11–30.

- [83] M. D. Bartholomä, A. S. Louie, J. F. Valliant, J. Zubieta, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2903–2920.
- [84] M. L. Bowen, C. Orvig, *Chem. Commun.* **2008**, 5077.
- [85] V. Ambrosini, D. Campana, P. Tomassetti, G. Grassetto, D. Rubello, S. Fanti, *Eur. J. Radiol.* **2011**, *80*, e116–e119.
- [86] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.* **2008**, 3027.
- [87] Y. Liu, N. Zhang, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5363–5375.
- [88] L. Telgmann, M. Sperling, U. Karst, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *764*, 1–16.
- [89] J. A. Salvador, S. A. Figueiredo, R. M. Pinto, S. M. Silvestre, *Fut. Med. Chem.* **2012**, *4*, 1495–1523.
- [90] K. M. Buettner, A. M. Valentine, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1863–1881.
- [91] S. Akhter, M. Z. Ahmad, F. J. Ahmad, G. Storm, R. J. Kok, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 1225–1243.
- [92] C.-M. Che, R. W.-Y. Sun, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9554.
- [93] N. Farrell, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Elsevier, **2003**, pp. 809–840.
- [94] D. Rehder, *Fut. Med. Chem.* **2012**, *4*, 1823–1837.
- [95] B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas, *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- [96] J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 3611–3616.
- [97] M. Hartmann, B. K. Keppler, *Comm. Inorg. Chem.* **1995**, *16*, 339–372.
- [98] D. D. Rosa, L. R. F. Medeiros, M. I. Edelweiss, P. R. Pohlmann, A. T. Stein, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *6*, CD005342.
- [99] M. D. Hall, T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49–67.
- [100] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, *Plat. Met. Rev.* **2001**, *45*, 62–69.
- [101] C. S. Allardyce, A. Dorcier, C. Scolaro, P. J. Dyson, *Appl. Organometal. Chem.* **2005**, *19*, 1–10.
- [102] S. Page, *Education in Chemistry* **2012**, 26–29.
- [103] A.-L. Lainé, C. Passirani, *Curr. Op. Pharmacol.* **2012**, *12*, 420–426.
- [104] A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, G. Sava, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106*, 90–99.
- [105] J. M. Rademaker-Lakhai, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3717–3727.
- [106] M. Bacac, A. C. G. Hotze, K. V. D. Schilden, J. G. Haasnoot, S. Pacor, E. Alessio, G. Sava, J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 402–412.
- [107] C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson, B. K. Keppler, *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 2140–2155.
- [108] H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 173–186.
- [109] H. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3064–3082.
- [110] A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, G. Sava, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106*, 90–99.
- [111] K. J. Barnham, V. B. Kenche, G. D. Ciccotosto, D. P. Smith, D. J. Tew, X. Liu, K. Perez, G. A. Cranston, T. J. Johanssen, I. Volitakis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 6813.
- [112] V. B. Kenche, L. W. Hung, K. Perez, I. Volitakes, G. Ciccotosto, J. Kwok, N. Critch, N. Sherratt, M. Cortes, V. Lal, C. L. Masters, K. Murakami, R. Cappai, P. A. Adlard, K. J. Barnham, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3374–3378.
- [113] I. Sasaki, C. Bijani, S. Ladeira, V. Bourdon, P. Faller, C. Hureau, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6404.
- [114] D. Valensin, P. Anzini, E. Gaggelli, N. Gaggelli, G. Tamasi, R. Cini, C. Gabbiani,

- E. Michelucci, L. Messori, H. Kozłowski, G. Valensin, *Inorg Chem* **2010**, *49*, 4720–4722.
- [115] D. Allsop, J. Mayes, S. Moore, A. Masad, B. J. Tabner, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1293–1298.
- [116] M. A. Lovell, *J. Alzheimers Dis.* **2009**, *16*, 471–483.
- [117] F. Molina-Holgado, R. C. Hider, A. Gaeta, R. Williams, P. Francis, *Biometals* **2007**, *20*, 639–654.
- [118] A. I. Bush, *Neurobiol. Aging* **2002**, *23*, 1031–1038.
- [119] C. S. Atwood, X. Huang, R. D. Moir, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Met. Ions Biol. Syst.* **1999**, *36*, 309–364.
- [120] M. A. Lovell, J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell, W. R. Markesbery, *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158*, 47–52.
- [121] C. Hureau, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2164–2174.
- [122] V. Minicozzi, F. Stellato, M. Comai, M. D. Serra, C. Potrich, W. Meyer-Klaucke, S. Morante, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10784.
- [123] J. W. Karr, L. J. Kaupp, V. A. Szalai, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13534–13538.
- [124] C. D. Syme, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18169–18177.
- [125] B. Alies, E. Renaglia, M. Rózgá, W. Bal, P. Faller, C. Hureau, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1501–1508.
- [126] H. A. Feaga, R. C. Maduka, M. N. Foster, V. A. Szalai, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1614–1618.
- [127] B. Alies, B. Badei, P. Faller, C. Hureau, *Chemistry* **2012**, *18*, 1161–1167.
- [128] Z. Xiao, L. Gottschlich, R. van der Meulen, S. R. Udagedara, A. G. Wedd, *Metallomics* **2013**, *5*, 501.
- [129] C. Hureau, V. Bolland, Y. Coppel, P.-L. Solari, E. Fonda, P. Faller, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 995–1000.
- [130] C. J. Sarell, S. R. Wilkinson, J. H. Viles, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41533–41540.
- [131] D. P. Smith, G. D. Ciccotosto, D. J. Tew, M. T. Fodero-Tavoletti, T. Johanssen, C. L. Masters, K. J. Barnham, R. Cappai, *Biochemistry* **2007**, *46*, 2881–2891.
- [132] J. W. Karr, V. A. Szalai, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5006–5016.
- [133] S. Jun, J. R. Gillespie, B.-K. Shin, S. Saxena, *Biochemistry* **2009**, *48*, 10724–10732.
- [134] V. Tõugu, A. Karafin, K. Zovo, R. S. Chung, C. Howells, A. K. West, P. Palumaa, *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 1784–1795.
- [135] J. Zou, K. Kajita, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *113*, 2334–2337.
- [136] B. Raman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16157–16162.
- [137] L.-E. Cassagnes, V. Hervé, F. Nepveu, C. Hureau, P. Faller, F. Collin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 11110–11113.
- [138] K. J. Barnham, A. I. Bush, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 222–228.
- [139] K. P. Kepp, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5193–5239.
- [140] V. Tõugu, P. Palumaa, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2219–2224.
- [141] C. Migliorini, E. Porciatti, M. Luczkowski, D. Valensin, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 352–368.
- [142] S. Zirah, *J. Biol. Chem.* **2005**, *281*, 2151–2161.
- [143] S. S. Leal, H. M. Botelho, C. M. Gomes, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2253–2270.
- [144] M. P. Cuajungco, G. J. Lees, *Brain Res.* **1998**, *799*, 118–129.
- [145] I. Solomonov, E. Korkotian, B. Born, Y. Feldman, A. Bitler, F. Rahimi, H. Li, G. Bitan, I. Sagi, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20555–20564.
- [146] P. Faller, C. Hureau, *Dalton Trans.* **2009**, 1080–1094.
- [147] C. Rodríguez-Rodríguez, M. Telpoukhovskaia, C. Orvig, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2308–2332.

- [148] X. Huang, C. S. Atwood, R. D. Moir, M. A. Hartshorn, J. P. Vonsattel, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26464–26470.
- [149] R. A. Cherny, J. T. Legg, C. A. McLean, D. P. Fairlie, X. Huang, C. S. Atwood, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23223–23228.
- [150] C. S. Atwood, G. Perry, H. Zeng, Y. Kato, W. D. Jones, K.-Q. Ling, X. Huang, R. D. Moir, D. Wang, L. M. Sayre, M. A. Smith, S. G. Chen, A. I. Bush, *Biochemistry* **2004**, *43*, 560–568.
- [151] R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y. Kim, X. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *Neuron* **2001**, *30*, 665–676.
- [152] E. Ferrada, V. Arancibia, B. Loeb, E. Norambuena, C. Olea-Azar, J. P. Huidobro-Toro, *Neurotoxicology* **2007**, *28*, 445–449.
- [153] X. Mao, A. D. Schimmer, *Toxicol. Lett.* **2008**, *182*, 1–6.
- [154] S. R. Bareggi, U. Cornelli, *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2010**, *18*, 41–46.
- [155] C. Deraeve, C. Boldron, A. Maraval, H. Mazarguil, H. Gornitzka, L. Vendier, M. Pitié, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 682–696.
- [156] J. Ceccom, F. Coslédan, H. Halley, B. Francès, J. M. Lassalle, B. Meunier, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43105.
- [157] P. J. Crouch, M. S. Savva, L. W. Hung, P. S. Donnelly, A. I. Mot, S. J. Parker, M. A. Greenough, I. Volitakis, P. A. Adlard, R. A. Cherny, C. L. Masters, A. I. Bush, K. J. Barnham, A. R. White, *J. Neurochem.* **2011**, *119*, 220–230.
- [158] L. Lannfelt, K. Blennow, H. Zetterberg, S. Batsman, D. Ames, J. Harrison, C. L. Masters, S. Targum, A. I. Bush, R. Murdoch, J. Wilson, C. W. Ritchie, PBT2-201-EURO study group, *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 779–786.
- [159] N. G. Faux, C. W. Ritchie, A. Gunn, A. Rembach, A. Tsatsanis, J. Bedo, J. Harrison, L. Lannfelt, K. Blennow, H. Zetterberg, M. Ingelsson, C. L. Masters, R. E. Tanzi, J. L. Cummings, C. M. Herd, A. I. Bush, *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20*, 509–516.
- [160] C. Rodríguez-Rodríguez, N. Sánchez de Groot, A. Rimola, A. Álvarez-Larena, V. Lloveras, J. Vidal-Gancedo, S. Ventura, J. Vendrell, M. Sodupe, P. González-Duarte, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1436–1451.
- [161] D. Valensin, C. Gabbiani, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2357–2366.
- [162] F. Collin, I. Sasaki, H. Eury, P. Faller, C. Hureau, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2130.
- [163] R. J. Sundberg, R. F. Bryan, I. F. Taylor Jr, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 381–392.
- [164] A. Kumar, L. Moody, J. F. Olaivar, N. A. Lewis, R. L. Khade, A. A. Holder, Y. Zhang, V. Rangachari, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 691–701.
- [165] B. Y.-W. Man, H.-M. Chan, C.-H. Leung, D. S.-H. Chan, L.-P. Bai, Z.-H. Jiang, H.-W. Li, D.-L. Ma, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 917.

Chapitre II : Techniques utilisées et modèle d'étude

Chapitre II. Techniques utilisées et modèle d'étude

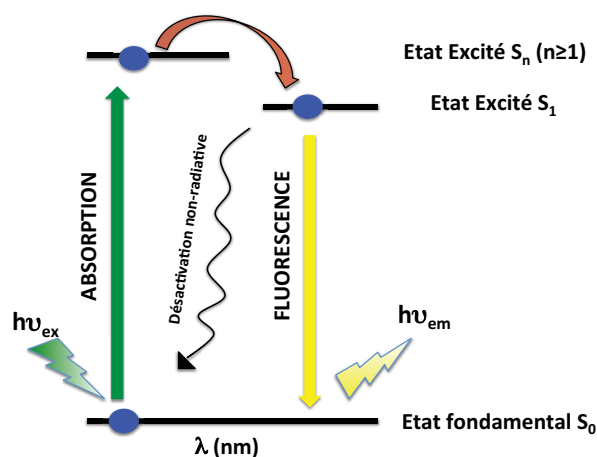
Introduction :

Dans ce chapitre, nous présentons les techniques spectroscopiques principalement utilisées au cours de cette thèse que sont la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Après un bref rappel des principes fondamentaux, les différentes expériences utilisées seront présentées et illustrées d'exemples en relation avec notre étude. L'attribution du peptide A β 28 dans des conditions proches du milieu physiologiques est également détaillée ici.

II-A Spectroscopie de fluorescence

II-A-1 Généralités

La fluorescence s'opère souvent sur des molécules polyaromatiques ou hétérocycliques appelées fluorophores. Suite à l'absorption d'un photon, les électrons du fluorophore passent d'un état fondamental à un état excité. Le retour à l'état fondamental se fait via une désactivation radiative. Ce processus est illustré par le diagramme d'états électroniques ou diagramme de Jablonski (Fig. II-1).



Le fluorophore, à température ambiante, est essentiellement dans son état électronique de plus basse énergie, l'état fondamental S_0 . Durant la phase d'excitation, un photon d'énergie $h\nu_{ex}$ est appliqué à partir d'une source externe (comme un laser). Ce photon va être absorbé par la molécule la faisant passer à un état électronique excité S_n en 10^{-15} secondes environ.

Cet état excité à une durée de vie limitée, 10^{-11} à 10^{-9} s. Durant cette phase, l'énergie de l'état S_2 peut se dissiper partiellement par vibrations et donner lieu à un état relaxé S_1 . Un photon d'énergie $h\nu_{em}$, d'énergie plus faible que celle du photon absorbé et donc de longueur d'onde plus grande ($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$), sera émis faisant revenir le fluorophore à son état fondamental en émettant de la lumière appelée fluorescence.

La différence d'énergie ou de longueur d'onde observée est appelée déplacement de Stokes ou « Stoke's shift » (Fig. II-2). La détection d'une espèce fluorescente est d'autant plus facile que le déplacement de Stokes est grand.

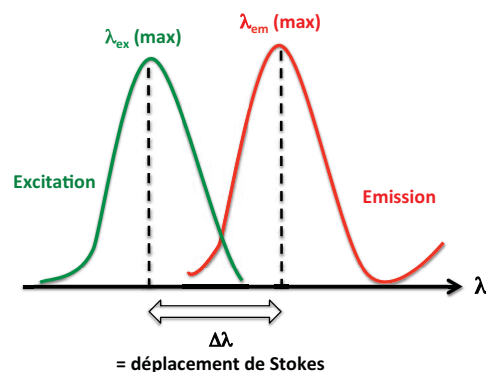


Figure II-2: Représentation de la différence d'énergie entre l'état excité et l'état d'émission ou déplacement de Stokes.

Un fluorophore est caractérisé par des longueurs d'onde d'émission et d'excitation (Fig. II-2) mais également par un rendement quantique de fluorescence (Φ), un coefficient d'extinction molaire (ϵ) ainsi qu'une intensité de fluorescence (I_f) et une durée de vie (τ_f).

II-A-2 Paramètres caractéristiques de la spectroscopie de fluorescence

II-A-2-a Le rendement quantique de fluorescence : Φ^M

L'efficacité de fluorescence pour une molécule (M) donnée est déterminée par le rendement quantique (Φ^M). Ce rendement traduit l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation pour un fluorophore donné et correspond au rapport entre le nombre de photons émis (I_f^M) et le nombre de photons absorbés par le fluorophore (I_a^M) (Eq.1).

$$\Phi^M = \frac{I_f^M}{I_a^M} \quad (\text{Eq.1})$$

La valeur du rendement quantique est comprise entre 0 et 1 et les meilleurs fluorophores ont un rendement quantique proche de 1. Par ailleurs, le rendement quantique varie en fonction de l'environnement (concentration, pH, polarité, présence d'espèces extinctives).

II-A-2-b L'intensité de fluorescence : I_f^M

L'intensité de fluorescence, I_f^M , est donc proportionnelle au rendement quantique (Φ^M) ainsi qu'à l'intensité absorbée, I_a^M (cf Eq.1). L'efficacité avec laquelle la lumière est absorbée est caractérisée par l'absorbance qui suit la loi de Beer-Lambert (Eq.2).

$$I_a^M = I_i - I_t = I_i(1 - 10^{-\varepsilon_{\lambda_{exc}}^M [M] \cdot l}) \quad (\text{Eq.2})$$

avec I_i l'intensité lumineuse incidente, I_t l'intensité lumineuse transmise, $\varepsilon_{\lambda_{exc}}^M$ le coefficient d'extinction molaire de la molécule M correspondant à la longueur d'onde d'excitation, $[M]$ sa concentration et l le trajet optique.

Quand l est très petit, l'équation 2 devient (Eq.3) :

$$I_a^M = I_i \cdot \ln 10 \cdot \varepsilon_{\lambda_{exc}}^M \cdot l \cdot [M] \quad (\text{Eq.3})$$

et par la suite l'intensité de fluorescence I_f^M (Eq.4) est donnée en remplaçant I_a^M dans l'équation 1.

$$I_f^M = I_i \cdot \Phi^M \cdot \ln 10 \cdot \varepsilon_{\lambda_{exc}}^M \cdot l \cdot [M] \quad (\text{Eq.4})$$

Soit une relation linéaire entre la concentration du fluorophore et l'intensité de fluorescence. Cette relation est vraie dans le cas où l'absorbance du fluorophore à la longueur d'onde d'excitation ou d'émission est faible ($A \leq 0.05$). Cependant, dans le cas où l'absorbance n'est pas faible, l'intensité de lumière I_i diminue à travers l'échantillon et l'intensité de fluorescence n'est plus directement proportionnelle à la concentration. Le même effet est observé en présence de molécules qui absorbent à la longueur d'onde d'excitation ou d'émission du fluorophore. Cet effet est appelé *inner filter effect* et l'expression de l'intensité de fluorescence devient alors (Eq.5) :

$$I_f^M = \varphi^M \cdot [M] \cdot I_i \quad (\text{Eq.5})$$

avec $I_i(x, y) = I_0 10^{-(\text{abs}(x)+\text{abs}(y))}$ et $\varphi^M = \Phi^M \cdot \ln 10 \cdot \varepsilon_{\lambda_{exc}}^M \cdot l$

où $I_i(x, y)$ correspond à l'intensité aux points x et y , I_0 à l'intensité maximale, $\text{abs}(x) = \varepsilon_{\lambda_{exc}}^M \cdot [M] \cdot x$ et $\text{abs}(y) = \varepsilon_{\lambda_{emi}}^M \cdot [M] \cdot y$ (x et y sont les dimensions de la cuvette parallèles et perpendiculaires au rayon d'excitation).

Finalement, pour une molécule M , l'intensité de fluorescence s'exprime de la façon suivante en tenant compte de l'*inner filter effect* (Eq.6) :

$$I_f^M = \psi^M \cdot [M] \cdot 10^{-(\text{abs}(x)+\text{abs}(y))} \text{ avec } \psi^M = I_0 \cdot \varphi^M \quad (\text{Eq.6})$$

D'autres phénomènes peuvent influencer l'intensité de fluorescence. En solution, des molécules peuvent entrer en collision avec le fluorophore, l'énergie électronique sera alors convertie en énergie cinétique et de vibrations (désactivation non-radiative). Il s'agit dans ce cas de quenching dynamique. Lorsque le fluorophore entre en collision avec lui-même, on parle d'auto-quenching. Par ailleurs, le fluorophore peut former un complexe non-fluorescent, le quenching est alors statique. Une faible concentration de fluorophore est généralement utilisée de façon à s'affranchir des problèmes d'*inner filter effect* et d'auto-quenching.

L'absorbance due à d'autres phénomènes (par exemple la turbidité) contribue également à l'*inner filter effect*.

II-A-2-c La durée de vie de fluorescence : τ_f

Une autre caractéristique importante en fluorescence est le temps de vie de fluorescence (τ_f). Il correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité. Dans la plupart des cas, ce temps de vie est de l'ordre de la nanoseconde. La durée de vie dépend de l'environnement du fluorophore et peut donc être un moyen pour suivre les changements subtils de cet environnement.

II-A-2-d Fluorescence de la Thioflavine T

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la Thioflavine T (ThT) est un fluorophore largement utilisé pour étudier l'agrégation du peptide A β à cause de sa spécificité pour les fibres amyloïdes ($K_d \sim \mu\text{M}$)^[1]. En effet, la ThT possède des caractéristiques de fluorescence presque uniques en présence de fibres amyloïdes.

La ThT, molécule chargée positivement, est composée d'un noyau de type aniline et d'un fragment de type benzothiazole qui tournent librement autour de la liaison C-C qu'ils partagent (Fig. II-3, **A**). Dans cette conformation « libre », la ThT absorbe à 412 nm ($\epsilon = 33000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Fig. II-3, **D**) et ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont 385 et 485 nm (Fig. II-3-**B** et **C**) respectivement associées à un rendement quantique (Φ) de 0.0001 dans l'eau (Fig. II-3, **E**). En présence de fibres amyloïdes, la ThT va voir sa fluorescence exaltée à cause de la restriction de la rotation de la liaison C-C entre les deux fragments de la ThT une fois liée aux fibres amyloïdes. La ThT ne possède plus les mêmes caractéristiques spectroscopiques : le maximum d'absorbance est à 440 nm (Fig. II-3, **D**) et les pics d'excitation et d'émission en fluorescence sont à 440 et 490 nm (Fig. II-3, **B** et **C**). Ces changements sont accompagnés d'une forte augmentation du rendement quantique, multiplié par 4400 soit $\Phi=0.44$ (Fig. II-3, **E**)^[2,3].

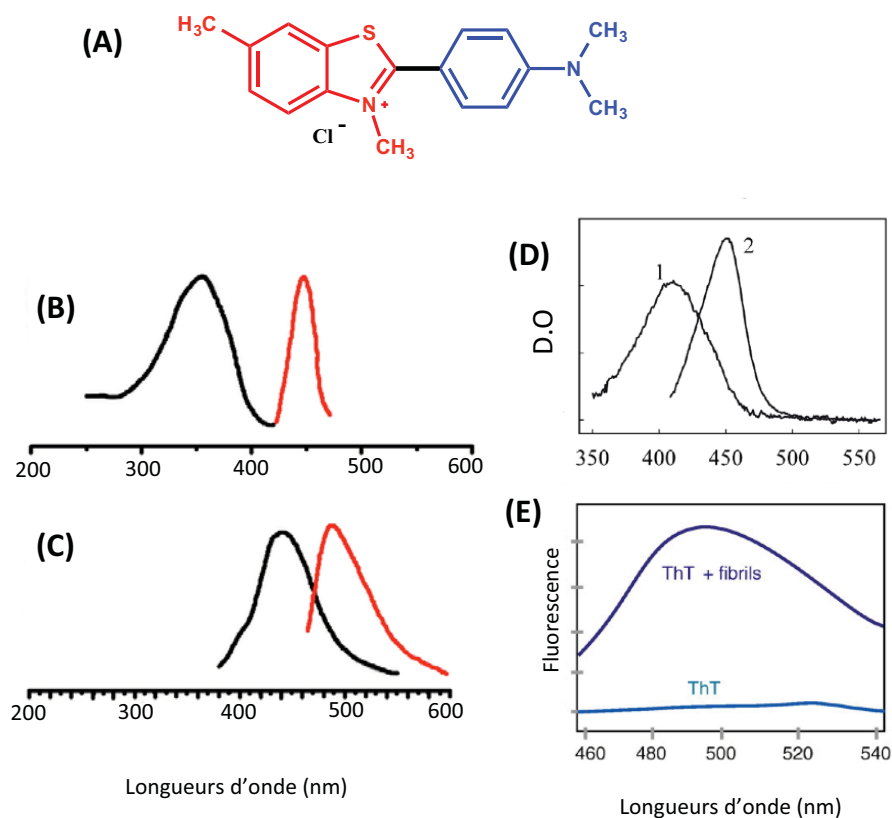


Figure II-3: (A) Représentation de la ThT avec en rouge le fragment benzothiazole, en bleu le fragment aniline et en noir la liaison C-C autour de laquelle se fait la rotation. (B) et (C) Spectre d'excitation et d'émission de la ThT seule (spectre noir) et en présence de fibres (spectre rouge) dans l'eau [4]. (D) Spectre d'absorbance de la ThT seule (1) et en présence de fibres (2) dans l'eau [5]. (E) Fluorescence de la ThT en absence et en présence de fibres reflétant l'augmentation du rendement quantique [3].

Cependant, de nombreuses questions concernant la ThT restent sans réponse. En effet, il est proposé dans la littérature que la ThT possède plusieurs sites de fixation pour le peptide A β mais l'identification de ces sites est toujours débattue. Par ailleurs, son interaction avec les fibres est encore mal décrite à ce jour. En effet, comment et à quelle vitesse s'insère-t-elle dans les fibres ?

II-A-2-e Les avantages et inconvénients de la fluorescence

Dans l'étude de l'agrégation du peptide A β , la spectroscopie de fluorescence présente de nombreux avantages. En effet, cette technique est facile à utiliser et elle est peu consommatrice de matériel, dans notre cas, de peptide A β . Elle permet d'effectuer des mesures in situ car il est admis, généralement, que la présence de ThT ne module ni la cinétique d'agrégation ni la structure des agrégats. La fluorescence va permettre de visualiser les changements conformationnels du peptide A β entre la forme monomérique et la forme fibrillaire.

Cependant malgré ses nombreuses qualités, la spectroscopie de fluorescence présente des limites dans l'étude de l'agrégation. En effet, l'intensité de fluorescence de la ThT va dépendre de nombreux paramètres comme les conditions expérimentales telles que le pH, la température, la présence de solvant polaire comme le DMSO, etc mais également de la nature des agrégats formés (amorphes ou fibrillaires). La ThT présente une forte spécificité pour les fibres amyloïdes et interagit peu avec les espèces amorphes [6]. De plus, la fluorescence va nous renseigner sur la présence de fibres amyloïdes mais ne permet pas d'accéder à la quantité de fibres formées et à leur taille. Il est donc nécessaire d'utiliser des techniques spectroscopiques complémentaires pour accéder à ces informations.

II-B La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Pour notre étude, nous avons utilisé deux séquences à deux dimensions du type TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) [7,8] et NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) [9]. La RMN bidimensionnelle est composée de quatre phases : la préparation de spins, le temps d'évolution, le temps de mélange et la période de détection (Fig. II-4).

Ces phases sont détaillées pour chacune des expériences présentées dans la suite du paragraphe.

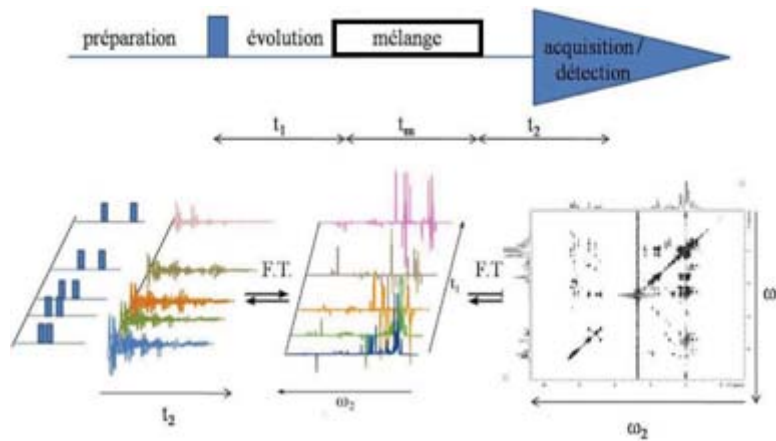


Figure II-4: Principe de la RMN à deux dimensions. Durant la période d'évolution, l'expérience est répétée un grand nombre de fois en faisant varier régulièrement t_1 .

II-B-1 La TOCSY (Total Correlation SpectroscopY)

L'expérience TOCSY consiste en un transfert d'aimantation entre les protons d'un même système de spin créant ainsi des corrélations entre ces protons. Ces corrélations sont détectées tant qu'il existe un couplage scalaire entre chaque proton. En effet, le transfert d'aimantation peut se faire jusqu'à 5 ou 6 liaisons, selon le temps de mélange et est interrompu en cas de couplage trop petit ou nul. La séquence TOCSY est représentée sur la figure II-5 (a).

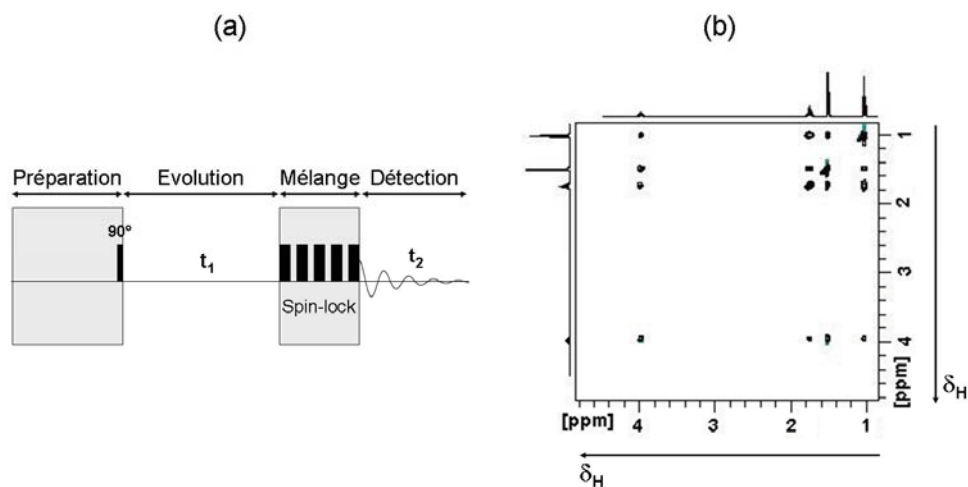


Figure II-5: (a) Séquence d'impulsion de la TOCSY, (b) exemple de carte TOCSY obtenue après la transformée de Fourier.

La période de préparation de cette séquence est constituée d'un délai permettant le retour à l'équilibre de l'aimantation et d'une impulsion à 90° qui bascule l'aimantation proton dans le plan transversal. La période d'évolution est un délai t_1 . Pendant cette durée, les spins évoluent librement sous l'effet du déplacement chimique et du ou des couplage(s) scalaire ^1H - ^1H . La durée de t_1 est incrémentée régulièrement permettant de générer la seconde dimension en plus de la dimension d'acquisition (t_2) en fin de séquence. La phase de mélange correspond à un spin-lock constitué de plusieurs impulsions à 180° . Durant cette phase, un transfert de polarisation, via les couplages J, s'opère vers les protons appartenant au même système de spins. Prenons l'exemple d'un système AMX : si les spins A sont excités, l'aimantation sera d'abord transférée de A vers M. Puis, si le spin lock est appliqué pendant une durée suffisamment longue, l'aimantation passera de M vers X. Ainsi l'aimantation de A diffusera vers tous les déplacements chimiques appartenant au même système de spins. Enfin, au cours de la période de détection le signal est physiquement enregistré. Les déplacements chimiques et les couplages ^1H - ^1H sont détectés pendant t_2 . Sur la carte RMN obtenue, la diagonale correspond à la projection dans le plan du spectre 1D. Les taches hors diagonales correspondent aux corrélations TOCSY (Fig. II-5, (b)). Les taches hors-diagonale sont symétriques par rapport à celle-ci.

Le spectre TOCSY présente plusieurs avantages : cette séquence conduit à des raies en absorption pure et positives ce qui permet une résolution maximale.

II-B-2 La NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy)

L'expérience NOESY est basée sur l'effet NOE. Afin d'expliquer cet effet, nous allons considérer une molécule contenant deux protons non-équivalents et sans couplage scalaire, A et B. Le spectre RMN 1H de la molécule consiste alors en deux singulets à δ_A et δ_B ppm (Fig.II-6, a). Supposons, que pendant l'enregistrement du spectre, les spins A sont saturés par l'application d'un champ radiofréquence à la fréquence de résonance de A. Le premier effet de la saturation est la disparition du signal du proton A. Le second effet est la possible variation d'intensité du proton B, si les deux spins ont une interaction dipolaire non négligeable. Comme le montre la figure II-10, le signal de B peut être plus fort (Fig. II-6, b), plus faible (Fig. II-6, c) ou inversé (Fig. II-6, d).

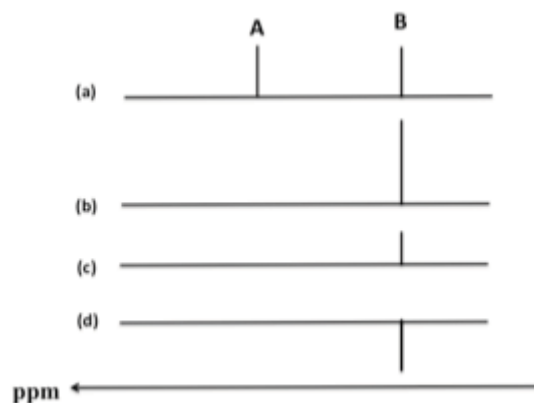


Figure II-6: Spectre RMN schématisé montrant les différents effets NOE possibles.

Ce phénomène est connu sous le nom d'effet nucléaire Overhauser (NOE). Le NOE est un aspect de la relaxation nucléaire qui ne peut avoir lieu que si une interaction dipolaire existe entre deux noyaux proches dans l'espace. L'interaction dipolaire dépend du mouvement moléculaire et donc de la viscosité de la solution. Ce mécanisme de relaxation est proportionnel à $1/r^6$ avec r la distance entre deux noyaux. L'interaction dipolaire diminue très rapidement avec la distance et elle va donc être observée pour des noyaux qui sont proches dans l'espace ($\sim 5 \text{ \AA}$).

La NOESY est la version à deux dimensions de la mesure de l'effet NOE dont la séquence est représentée sur la figure II-7. L'effet NOE décrit précédemment concerne la répartition des populations après saturation d'un spin. Dans l'expérience NOESY, il n'y a pas de saturation de spin mais une inversion des spins ce qui crée une aimantation longitudinale exclusivement et donc une inversion des populations de spins des différents niveaux énergétiques.

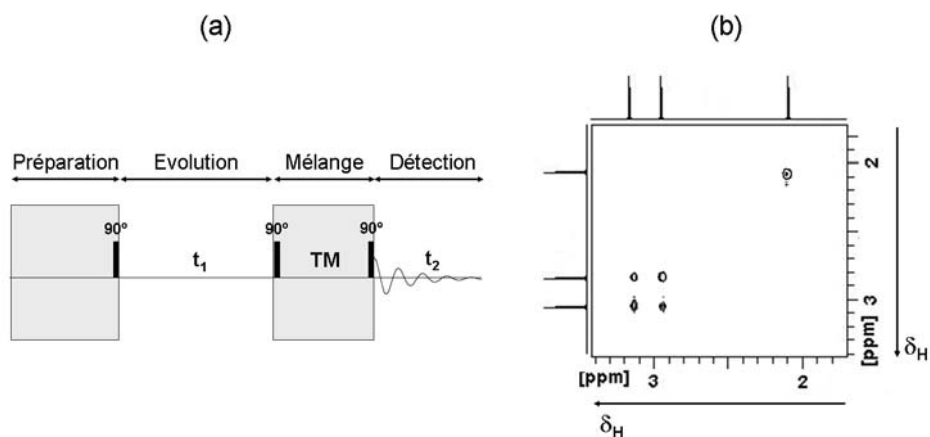


Figure II-7: (a) Séquence d'impulsion de la NOESY. (b) Exemple de carte NOESY obtenue après la transformée de Fourier.

Les périodes de préparation, d'évolution et de détection sont les mêmes que pour l'expérience TOCSY. La différence avec cette dernière se situe au niveau de la période de mélange qui est constituée de deux impulsions à 90° séparée par un délai T_M (entre 200 ms et 1s). Durant la période de mélange, les aimantations sont orientées suivant l'axe z. Si le délai T_M est convenablement choisi, il permet à l'aimantation de passer partiellement sur d'autres sites protons par un processus de relaxation croisée. Comme pour la TOCSY, le spectre obtenu est symétrique par rapport à la diagonale et présente des taches de corrélation indiquant une proximité spatiale. Les taches de corrélations peuvent également être observées suite à un échange chimique pendant le temps de mélange.

L'intensité relative I de l'effet NOE se quantifie par la mesure du volume du pic de corrélation et peut être modélisée par la relation suivante (Eq.7):

$$I_{NOE} = \frac{T_M \tau_c}{r^6} \quad (\text{Eq.7})$$

avec T_M le temps de mélange, τ_c le temps de corrélation et r la distance entre les deux noyaux. L'intensité des NOE peut alors être modélisée par la courbe représentée sur la figure II-8. Selon le temps de corrélation et la fréquence du spectromètre RMN, il n'est pas possible de détecter les corrélations NOE.

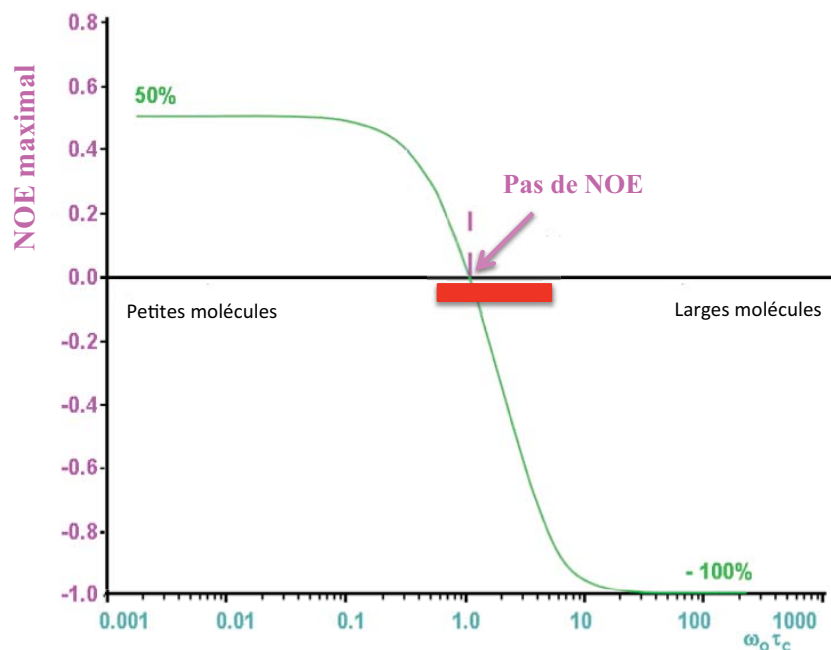


Figure II-8: Intensité des taches de corrélation NOE en fonction du temps de corrélation et de la fréquence du champ magnétique.

L'intensité relative de la tache NOE est également dépendante du temps de corrélation des protons observés qui caractérise la mobilité relative des deux protons voisins dans l'espace. Ce temps de corrélation dépend donc du poids moléculaire de la molécule, de la viscosité du milieu ainsi que de la température. L'accroissement maximal est de 50% dans le cas d'un temps de corrélation de l'ordre de 10^{-9} s soit une très forte mobilité (Fig.II-14). Pour des temps de corrélation plus long que $1 \cdot 10^{-9}$ s, l'accroissement sera de -1 indiquant une mobilité moins importante.

Cependant, l'intensité relative des taches NOE n'est pas linéaire avec l'augmentation du temps de mélange (Fig.II-9, gauche). Cette non-linéarité provient de la diffusion de spin. En effet, dans certaines conditions, les chemins de relaxation indirects sont plus efficaces que les chemins directs. Par exemple, la relaxation passant de A à B puis à C est plus efficace que celle allant directement de A à C (Fig. II-9, droite). C'est ce qu'on appelle la diffusion de spin et dans ce cas une tache de corrélation est observée et son intensité ne reflète en aucun cas la distance entre les deux noyaux. Ce phénomène de diffusion de spin est généralement observé lors de l'utilisation de temps de mélange long. Pour contourner ce problème, il faut utiliser un temps de mélange plus court.

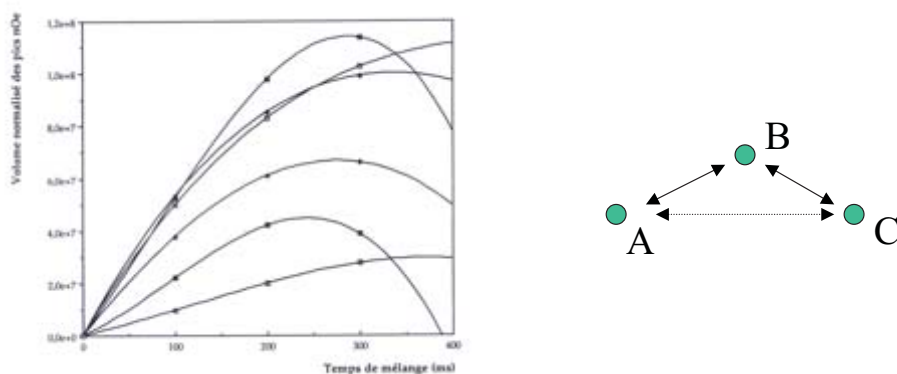


Figure II-9: A gauche, graphique représentant l'intensité des pics NOE en fonction du temps de mélange illustrant la diffusion de spin schématisé par la figure de droite.

Au niveau structural, l'interprétation des cartes NOESY, d'un point de vue qualitatif (présence ou non de NOE) et quantitatif (intensité relative des pics) va permettre de déterminer la conformation d'une molécule. En effet, la présence d'une tache de corrélation entre deux protons indique qu'ils sont distants de 5 Å au maximum et, de façon simplifiée, plus la tache sera intense et plus ils seront proches. Il est alors possible d'établir des contraintes sur les distances et ainsi déterminer la conformation d'une molécule. Cette séquence est très utilisée en biologie structurale afin de caractériser le repliement de protéines (hélice α , feuillet β). Cet aspect de la NOESY sera abordé dans la suite du chapitre.

II-C Peptide A β 28 et conditions expérimentales

La troisième partie de ce chapitre présente le modèle de l'étude c'est-à-dire le peptide A β 28 ainsi que l'utilisation du Zn(II). En effet, dans le chapitre IV, l'effet du Zn(II) sur l'agrégation sera présenté. Dans ce contexte, l'attribution des résonances des protons du peptide A β 28 a été réalisée. La méthodologie d'attribution sera présentée et appliquée au peptide A β 28.

II-C-1 Le peptide A β 28 et fixation du Zn(II)

Comme décrit dans le premier chapitre, l'agrégation du peptide A β est un processus central du développement de la MA dont le mécanisme est encore obscur à ce jour. De plus, il semblerait que les espèces intermédiaires oligomériques de l'agrégation soient les espèces intervenant dans la neurotoxicité liée à la MA. Plusieurs intermédiaires de l'agrégation du peptide A β ont été observés allant du dimère à de larges agrégats. Cependant, la nature exacte des espèces entraînant la mort neuronale (dimère ? trimère ? n-mère ?) n'est pas connue à ce jour. L'étude des conditions influençant l'agrégation et la formation d'intermédiaires est donc d'un grand intérêt, et en ce sens nous sommes intéressés à l'influence du zinc présent en concentration importante dans les plaques amyloïdes. Le cuivre est également présent en quantité importante dans les plaques amyloïdes mais son effet sur l'agrégation reste controversé, contrairement au zinc qui semble être favorable. De plus le zinc est capable de se lier à d'autres protéines comme α -synucléine (maladie de Parkinson) ou le prion (maladie de Creutzfeld-Jacob) ^[10]. L'étude de l'influence du zinc sur l'agrégation de peptide et/ou protéine amyloïdogénique dépasse largement le cadre de la MA. L'agrégation ou l'auto-assemblage de peptides via l'utilisation d'ions métalliques comme modulateur est aussi un sujet d'intérêt pour les bio/nanotechnologies.

Il est clair que le site de fixation du zinc est localisé dans la partie N-terminale du peptide A β (acides aminés 1 à 16) et implique principalement les résidus histidines ^[11], mais la coordination exacte reste inconnue. Le peptide A β 16 (Fig. II-10) représente un bon modèle pour étudier la coordination des ions métalliques mais il n'agrège pas.

DAEFRHDSGYEVHHQK

Figure II-10 : Séquence peptidique du peptide A β 16 (code à une lettre). Les résidus histidines, impliqués dans la coordination du Zn(II) sont en rouge

Le but du chapitre IV est d'évaluer l'effet du zinc et de la ThT sur la cinétique d'agrégation du peptide A β par différentes techniques spectroscopiques (fluorescence et RMN ^1H , principalement) afin d'apporter des éléments de réponse quant à son mécanisme. Il est donc nécessaire d'utiliser un peptide capable d'agréger. Nous avons choisi de travailler avec le peptide A β 28 (Fig. II-11), contenant le site de fixation du zinc dans sa partie N-terminale et une partie plus hydrophobe qui est responsable de l'agrégation. Le peptide A β 28 forme des fibres amyloïdes classiques et étant plus court que les peptides natifs A β 40 et A β 42, il agrège beaucoup plus lentement et à plus forte concentration, rendant ainsi possible les études spectroscopiques avec un suivi dans le temps ^[12]. De surcroit, les expériences d'agrégation sont reproductibles entre différentes préparations de peptide A β 28 (fournisseur, lot, manipulateur,...) ce qui n'est pas le cas pour A β 40.

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK

Figure II-11 : Séquence peptidique du peptide A β 28 (code à une lettre)

Une partie de l'étude de l'influence du zinc et de la ThT a été réalisée par RMN ^1H . Il a donc été nécessaire de réaliser l'attribution du peptide A β 28.

II-C-2 Attribution des résonance ^1H -RMN du peptide A β 28

La structure du peptide A β (40/42) a été résolue dans différents milieux tels que des micelles mimant les membranes cellulaires ^[13-17] ou dans un mélange TFE/eau ^[18-21] ou encore dans le DMSO ^[22]. La grande majorité de ces études est réalisée à pH acide (pH~3) ^[19,21,23]. En effet, à ce pH le peptide est sous forme monomérique et n'agrége pas. Ces conditions n'étant pas celles du milieu physiologique, nous avons travaillé dans des

conditions plus proches du milieu physiologique c'est-à-dire dans 10 mM de tampon phosphate, pH 7.4.

II-C-2-a Méthodologie d'attribution

L'attribution des signaux RMN de peptides se déroule en plusieurs étapes, dont la stratégie a été définie par Wüthrich [24]: un échantillon de peptide (ou protéine) est solubilisé à une concentration suffisante (0.1 à 0.5 mM) dans des conditions de pH et de température fixées. La première étape consiste en l'attribution de tous les protons du peptide par acide aminé (un système de spin) à l'aide de la TOCSY. Les taches de corrélation détectées sont exclusivement intra-résidus. En effet, la présence du C=O empêche le transfert de aimantation. La seconde étape permet de relier les acides aminés entre eux en fonction de leur emplacement dans la chaîne peptidique et donc d'accéder à la structure primaire du peptide. Ces données sont obtenues grâce à la NOESY.

II-C-2-a-i Préparation de l'échantillon

Comme expliqué précédemment, l'attribution du peptide n'étant pas connue dans des conditions physiologiques, nous avons travaillé dans 10 mM de tampon phosphate à pH 7,4 de façon à être le plus proche possible du pH physiologique. Les conditions de pH et de tampon étant fixées, il a fallu optimiser les conditions de température. L'observation des protons amides est importante lors de l'attribution, il est donc nécessaire de ralentir au maximum l'échange de ces derniers avec l'eau en jouant sur la température (la température influence fortement le phénomène d'échange). Des spectres RMN ont donc été enregistrés à différentes températures allant de 5 à 30°C (Fig. II-12). Les résultats montrent que 10°C est la température idéale pour observer le maximum de protons amides et différencier les protons aromatiques comparativement aux autres températures.

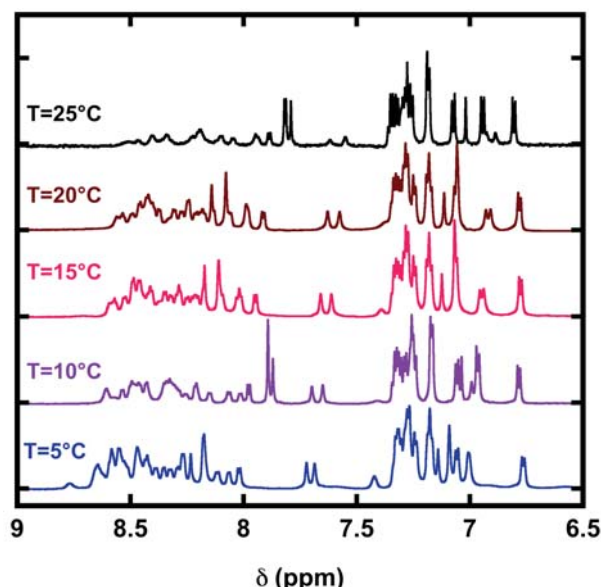


Figure II-12: Effet de la température sur le spectre RMN du peptide A β 28.
 Conditions expérimentales: [A β 28]=500 μ M, 10 mM de tampon phosphate pH 7,4, 90/10 H₂O/D₂O.

De la même façon, différentes concentrations en peptide ont été essayées. Le peptide A β 28 est un peptide qui agrège au cours du temps. L'enregistrement des données RMN nécessite un certain temps. Il faut alors déterminer la concentration idéale en peptide permettant à la fois d'avoir un peptide stable dans le temps et suffisante pour pouvoir détecter toutes les corrélations nécessaires à l'attribution du peptide. Des spectres entre 100 et 500 μ M de peptide ont été enregistrés et les résultats obtenus ont montré qu'une concentration de 500 μ M permettait d'obtenir des spectres résolus en un temps raisonnable sans que le peptide n'agrège.

L'attribution du peptide a donc été réalisée dans les conditions suivantes : 500 μ M en peptide A β 28 dans 10mM de tampon phosphate à pH 7,4, 90/10 H₂O/D₂O à 10°C.

II-C-2-a-ii Identification du système de spin (TOCSY)

Dans le paragraphe II-B-1, nous avons vu que le transfert d'aimantation qui a lieu dans l'expérience TOCSY permet de créer des corrélations entre les protons d'un même système de spin. Dans le cas d'un peptide (ou d'une protéine), un système de spin correspond à un acide aminé (Fig. II-13, à gauche). Par les données TOCSY, nous allons pouvoir identifier les différents acides aminés de la séquence peptidique.

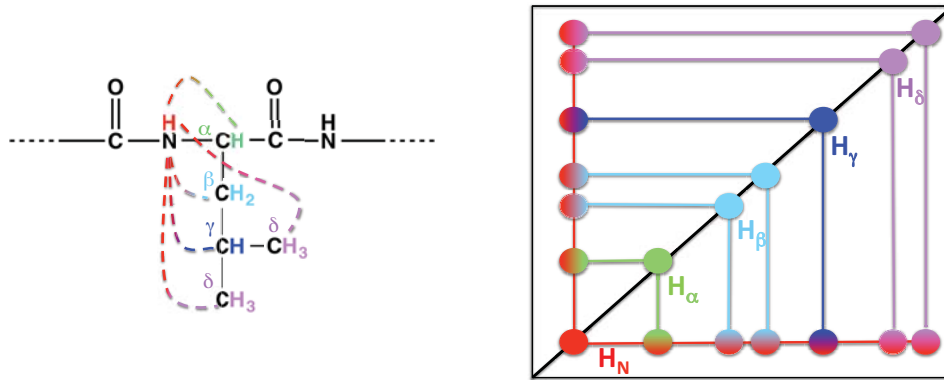


Figure II-13: Exemple d'un système de spin, la leucine, avec les corrélations de type HN-Hx détectées (à gauche) et l'allure de son spectre TOCSY (à droite).

Etant donné la symétrie de la carte 2D, les taches verticales et horizontales sont identiques et permettent d'identifier tous les systèmes de spins grâce à leur chemin de corrélation spécifique (Fig. II-13, à droite). En effet, les acides aminés ont des systèmes de spins différenciables en fonction de leurs chaînes latérales.

II-C-2-a-iii Détermination de la structure primaire

Après avoir identifié les différents systèmes de spins, la seconde étape consiste à relier les acides aminés entre eux de façon à déterminer la structure primaire du peptide (ou de la protéine). Pour cela l'expérience NOESY est utilisée. Cette expérience donne des informations de distance par la corrélation des interactions spin-spin directe entre le proton H α d'un résidu (i) et le proton amide du résidu (i+1) comme le montre la figure II-14.

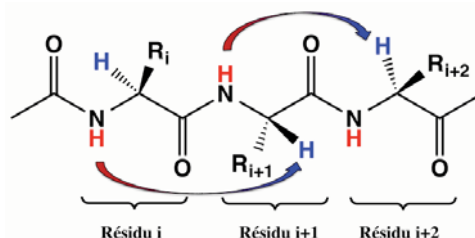


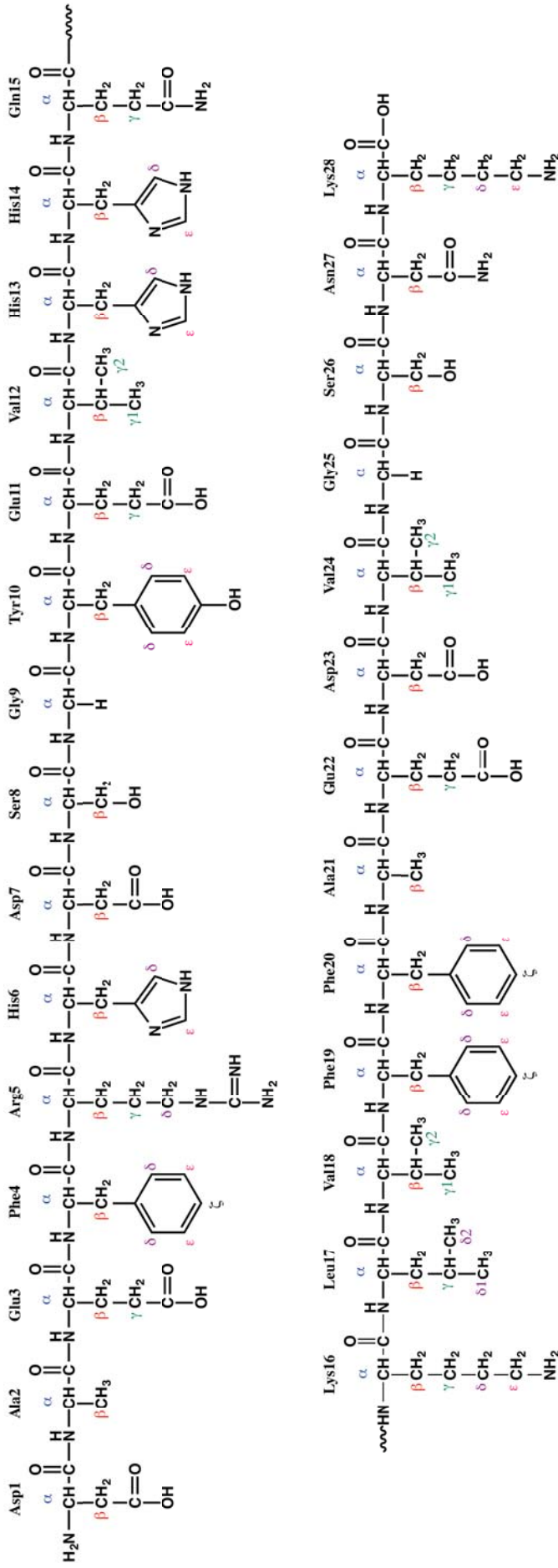
Figure II-14: Corrélations détectées par l'expérience NOESY.

Lorsque l'attribution séquentielle est achevée, il reste les taches de corrélations renseignant sur la proximité dans l'espace à i+2, i+3, i+4 des résidus identifiés. L'examen des effets NOE participe à la détermination de la structure secondaire en informant sur l'existence de motifs ou d'éventuels repliements de la protéine ^[25]. L'analyse du spectre NOESY du peptide A β 28 dans 10 mM de tampon phosphate à pH 7,4 n'a pas révélé de structure secondaire particulière : le peptide est sous forme « random coil ».

II-C-2-b Attribution du peptide A β 28

II-C-2-b-i Séquence du peptide A β 28

Pour plus de clarté, la séquence du peptide A β 28 est représentée sur la figure II-15 dans laquelle chaque proton de chaque acide aminé est identifié selon la nomenclature classiquement utilisée en RMN structurale.



II-C-2-b-ii Tableau d'attribution

Comme le montre le tableau II-1, la grande majorité des signaux ont pu être attribués à l'aide du logiciel CARA (version 1.8). L'attribution du peptide est une étape essentielle. Grâce à ces données, nous allons pouvoir étudier l'évolution des pics de chaque acide aminé au cours de la cinétique d'agrégation.

Résidu	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ
Asp1	Non vu	4.13	2.68-2.80			
Ala2	Non vu	4.29	1.36-1.37			
Glu3	8.52	4.20	1.83-1.92	2.17-2.19		
Phe4	8.35	4.56	3.01		7.16 (^{2,6} H)	7.25 (^{3,5} H)
Arg5	8.19	4.27	1.62-1.74	1.49	3.12	
His6	Non vu	4.54	3.05-3.10		7.88 (² H)	7.03 (⁴ H)
Asp7	8.40	4.62	2.66			
Ser8	8.46	4.37	3.87-3.91			
Gly9	8.59	3.88-3.94				
Tyr10	8.01	4.52	2.94-3.03		7.06 (^{2,6} H)	6.78 (^{3,5} H)
Glu11	8.44	4.18	1.89-1.92	2.12-2.21		
Val12	8.13	3.94	1.95	0.78-0.87		
His13	Non vu	4.53	3.04		7.83 (² H)	6.94 (⁴ H)
His14	Non vu	4.59	3.01-3.08		7.85 (² H)	6.96 (⁴ H)
Gln15	8.44	4.26	1.97-2.06	2.32		
Lys16	8.44	4.27	1.67-1.74	1.37	1.44	2.97
Leu17	8.31	4.32	1.57-1.61	1.45	0.85-0.91	
Val18	8.04	4.02	1.90	0.75-0.83		
Phe19	8.31	4.58	2.91-2.99		7.30 (^{2,6} H)	7.17 (^{3,5} H)
Phe20	8.27	4.57	2.94-3.09		7.32 (^{2,6} H)	7.24 (^{3,5} H)
Ala21	8.29	4.22	1.36-1.37			
Glu22	8.42	4.21	1.92-2.04	2.27		
Asp23	8.48	4.65	2.63-2.74			
Val24	8.20	4.15	2.19	0.96		
Gly25	8.59	3.98				
Ser26	8.22	4.46	3.88			
Asn27	8.54	4.74	2.77-2.85			
Lys28	7.96	4.16	1.71-1.83	1.39	1.66	2.99

Tableau II-1: Attribution du peptide A β 28 dans 10 mM de tampon phosphate, pH 7.4, T=10°C.

La spectroscopie de fluorescence ainsi que la spectroscopie RMN sont deux techniques complémentaires qui vont nous permettre d'étudier à la fois la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 mais également la coordination des complexes de Ru(II) synthétisés au peptide A β 28 ainsi que leurs effets sur sa cinétique d'agrégation.

Bibliographie

- [1] S. Noël, S. Cadet, E. Gras, C. Hureau, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, DOI 10.1039/c3cs60086f.
- [2] A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 11519–11524.
- [3] A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 2538–2544.
- [4] P. Kumaraswamy, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, *FEBS Journal* **2009**, *276*, 5960–5972.
- [5] A. I. Sulatskaya, K. K. Turoverov, I. M. Kuznetsova, *Spectros. Int. J.* **2010**, *24*, 169–172.
- [6] A. Morimoto, K. Irie, K. Murakami, Y. Masuda, H. Ohigashi, M. Nagao, H. Fukuda, T. Shimizu, T. Shirasawa, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52781–52788.
- [7] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528.
- [8] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 355–360.
- [9] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207–213.
- [10] L. Breydo, V. N. Uversky, *Metallomics* **2011**, *3*, 1163.
- [11] C. Hureau, V. Balland, Y. Coppel, P.-L. Solari, E. Fonda, P. Faller, *J Biol Inorg Chem* **2009**, *14*, 995–1000.
- [12] D. A. Kirschner, H. Inouye, L. K. Duffy, A. Sinclair, M. Lind, D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 6953–6957.
- [13] S.-A. Poulsen, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *J. Struc. Biol.* **2000**, *130*, 142–152.
- [14] J. T. Pedersen, K. Teilum, N. H. H. Heegaard, J. Østergaard, H.-W. Adolph, L. Hemmingsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2011**, *50*, 2532–2535.
- [15] Y. R. Chen, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24414–24422.
- [16] D. Noy, I. Solomonov, O. Sinkevich, T. Arad, K. Kjaer, I. Sagi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1376–1383.
- [17] J. Talafous, K. J. Marcinowski, G. Klopman, M. G. Zagorski, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7788–7796.
- [18] M. G. Zagorski, C. J. Barrow, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5621–5631.
- [19] K. J. Marcinowski, H. Shao, E. L. Clancy, M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11082–11091.
- [20] H. Shao, S. Jao, K. Ma, M. G. Zagorski, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 755–773.
- [21] A. Wahlström, L. Hugonin, A. Perálvarez-Marín, J. Jarvet, A. Gräslund, *FEBS Journal* **2008**, *275*, 5117–5128.
- [22] C. J. Barrow, M. G. Zagorski, *Science* **1991**, *253*, 179–182.
- [23] J. P. Lee, E. R. Stimson, J. R. Ghilardi, P. W. Mantyh, Y. A. Lu, A. M. Felix, W. Llanos, A. Behbin, M. Cummings, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5191–5200.
- [24] K. Wüthrich, *Science* **1989**, *243*, 45–50.
- [25] K. Wüthrich, **1986**, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*.

Chapitre III : Interaction de la ThT
avec le peptide A β 28 sous forme
monomérique

Chapitre III. Interaction de la ThT avec le peptide A β 28 sous forme monomérique

Introduction :

La Thioflavine T (ThT) est un marqueur très utilisé, à la fois *in vitro* et en milieu biologique, pour la détection par spectroscopie de fluorescence, des structures fibrillaires de peptides amyloïdogéniques. En effet, lors de l'interaction avec les fibres, le rendement quantique de fluorescence de la ThT est amplifié d'un facteur $\sim 10^4$.

Dans cet article, nous décrivons l'étude par spectroscopie RMN de l'interaction de la ThT avec le peptide amyloïde- β , A β 28, sous forme monomérique. Le peptide A β 28 est un modèle des peptides natifs A β 40 et A β 42, impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Bien qu'étant plus court (28 acides aminés *vs.* 40 et 42), ce peptide a conservé la capacité d'agrégation des peptides natifs, puisqu'il contient le cœur central hydrophobe (séquence LVFFA) impliqué dans le processus de nucléation, première phase du mécanisme d'agrégation. Néanmoins, sa propension à l'agrégation est faible (surtout en l'absence d'ions métalliques) et permet donc d'étudier les formes monomériques à des concentrations relativement élevées.

Nous avons donc mis en évidence une interaction de la ThT avec le cœur hydrophobe (résidus LVFFA) d'A β 28, et ce, en particulier par la détection de l'apparition de taches NOes intermoléculaires. De plus, cette interaction est confirmée par des mesures du coefficient de diffusion, qui a aussi permis d'évaluer la constante de dissociation ThT-A β 28 qui est de l'ordre de 2 mM. Enfin, une simulation par dynamique moléculaire a permis d'obtenir une description du mode de liaison ThT - A β 28, confirmant l'interaction privilégiée avec le cœur hydrophobe. Il est à noter que toutes les études expérimentales et théoriques pointent vers une interaction assez dynamique avec plusieurs sites de fixation, avec des échanges relativement rapides, principalement situés autour des résidus LVFFA.

Cette étude démontre clairement que, contrairement à ce qu'il est généralement admis, la ThT est capable d'interagir avec des structures peptidiques non fibrillaires. Néanmoins, dans ce cas, son rendement de fluorescence n'est pas amplifié et dans notre cas l'affinité est moins forte. Par ailleurs, ce travail ouvre la voie vers de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, des analogues de ThT pourraient inspirer des molécules soit de ciblage des monomères soit dédiées à la détection des formes précoces du processus d'agrégation.

COMMUNICATION

Thioflavine T does interact with monomeric Amyloid- β peptide

Cite this: DOI: 10.1039/x0xx00000x

H. Eury,^{a,b,c} G. Czaplicki,^{b,c} I. Sasaki, P. Faller,^a A. Milon,^{b,c} C. Hureau,^a and O. Saurel^{b,c*}Received 00th January 2012,
Accepted 00th January 2012

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

While the fluorescent dye Thioflavin T (ThT) is widely used for monitoring amyloid fibril formation, NMR data and molecular dynamics simulations obtained here give the first structural characterization of an interaction between ThT and monomeric amyloid- β peptide. ThT binds transiently to the hydrophobic stretch LVFFA, a key domain for oligomerization.

Amyloid deposits occur in several diseases, in particular in neurodegenerative disorders like Alzheimer's disease or Parkinson disease¹. At molecular level, amyloid fibrils are constituted by a peptide oligomer with cross- β sheets perpendicular to the long fibril axis (cross- β -motif). In the specific case of amyloid- β fibrils, Tycko and coll. described an in-register, parallel structure maximizing contacts between hydrophobic side chains². The molecular determinants of amyloid fibril formation are poorly understood, but a general kinetic mechanism has been proposed. The kinetics is characterized by a typical sigmoidal time course, with a lag phase (which corresponds to the nucleation step) followed by a steep increase (elongation phase) and a plateau (thermodynamic equilibrium) (ESI, Fig. S1)³. The nucleation phase corresponds to the formation of a nucleus (the highest energy state) of unknown number of A β molecules and is considered to be the rate limiting step. Small and soluble oligomers (with 2 to 20-mers) have been assumed to be the most toxic species and hence responsible for the pathological processes of amyloid diseases⁴. The most widely used method to follow A β fibrillization is based on thioflavin T (ThT, Fig. 1, top) fluorescence. ThT fluorescence is very sensitive and specific to interaction with amyloid fibrils⁵ and is assumed to have a moderate impact on the aggregation kinetics and aggregate structures⁶. However, the molecular details of the interaction between ThT and amyloid fibrils are still largely unknown and controversial. More recently, it has been proposed that ThT can also interact with entities before elongation, such as oligomers and monomers without the dramatic increase of the fluorescence intensity characteristic of the interaction with fibrils^{7,8}. Nevertheless the NMR study was performed at pH 4.0⁷, a value quite far from physiological pH.

In the present communication, we provide the first clear evidence and structural characterization of A β 28 monomer – ThT interaction at pH 7.4 using NMR and molecular dynamics simulations.

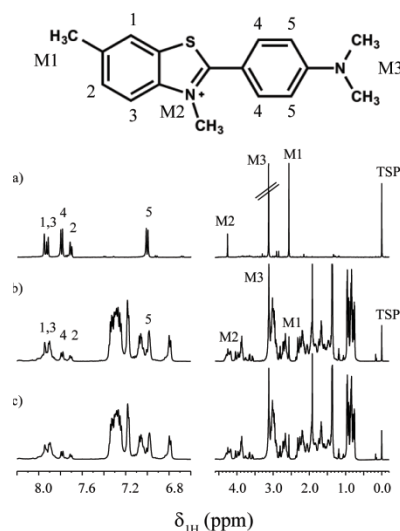


Figure 1: Illustration of ThT molecule and 1D ¹H NMR spectra of a) ThT alone, b) ThT in presence of A β 28 at t=0h and c) at t=12h.

Compared to the full-length peptides A β 40 and A β 42, A β 28 is more soluble and its aggregation kinetic is slower and more reproducible. Nevertheless, its fibrils have a very similar structure to those of A β 40/42⁹. We first characterized the aggregation kinetics by ThT fluorescence and NMR spectroscopies of a 500 μ M solution of A β 28 to ensure that A β 28 did not aggregate significantly over the first 24 hours. At 12 hours, we detected by fluorescence only a very low fraction of fibrils that represented $\leq 2\%$ compared to the control experiment performed in presence of 0.5 equivalent of Zn(II), a known trigger of A β 28 fibrillization¹⁰ (ESI Fig. S2a). In addition, no line broadening was observed on the proton spectrum, indicating that before 12 hours the sample is composed of monomers or small

oligomers (< 6-mers) (ESI Fig. S2b). Consequently, all the NMR experiments were performed within less than 12 hours.

Then, interaction between ThT and A β 28 were probed by 1D and 2D NMR at pH 7.4. As seen in Figure 1, bottom, no modification of either the ThT or the A β 28 signals is observed in the 1D NMR spectrum within 12 hours. In contrast, in the 2D NOESY spectra of ThT with A β 28 we observed intramolecular transferred NOEs within ThT resonances at pH 7.4 (ESI, Fig. S3) in line with the previous report of Benaki *et al.*⁷. Several intermolecular contacts could be identified unambiguously (for full assignment of A β 28 in the same conditions, see ESI Table 1); the most obvious ones were between the methyl group (Me) of the benzothiazole ring, M1 at 2.56 ppm, and the peptide side chain's Me of L17, V18, A21, V24 and aromatic protons of F19 and F20 (Fig. 2a). We could also observe intermolecular crosspeaks between the benzamine ring Me and the same peptide residues (Fig. 2b). Finally, intermolecular NOEs were observed between ThT aromatic protons (i.e. H1 on the benzothiazole and H4 on the benzamine) with L17, V18 and F19 (Fig. 2c). Taken together, these data show that ThT binds to the hydrophobic core of the A β 28 around the LVFFA motif. The NOE pattern indicates that the bound state cannot be described by one single structure but rather by a set of ThT complexes around the LVFFA sequence.

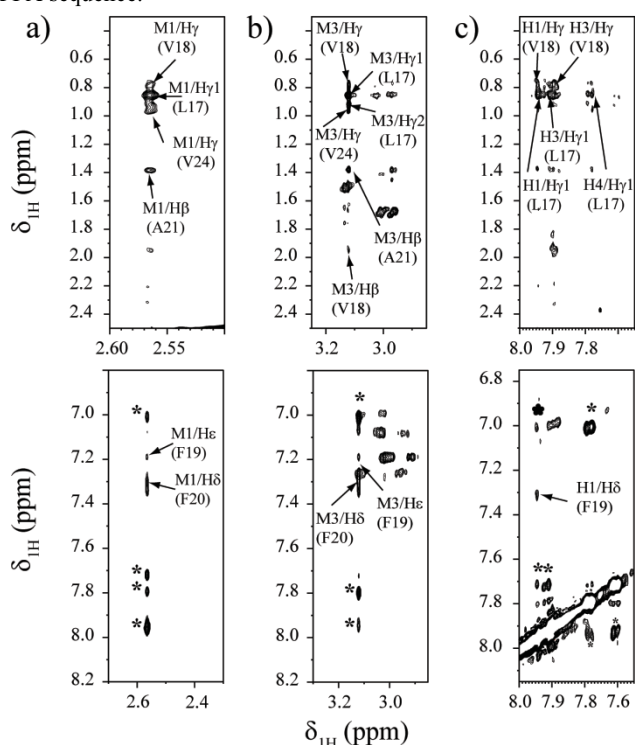


Figure 2: 2D NOESY spectrum of ThT (140 μ M) in the presence of A β 28 (500 μ M) in a 10 mM phosphate buffer pH 7.4 at 25 $^{\circ}$ C. The panels a), b) and c) show NOEs cross peaks with the methyls M1, M3 and aromatic signals of ThT respectively. Intermolecular NOEs are annotated explicitly on the spectrum while intramolecular NOEs are annotated by an asterisk.

Then, we measured the translational diffusion coefficients by gradient echo spectroscopy. We obtained $1.5 \cdot 10^{-10} \pm 0.1 \text{ m}^2/\text{s}$ for

A β 28 at 25 $^{\circ}$ C, in agreement with the value reported by Benaki *et al.*⁷ for the same monomeric peptide at pH 4.0 ($1.66 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$). Concerning ThT, we found $5.2 \cdot 10^{-10} \pm 0.1 \text{ m}^2/\text{s}$ for ThT alone, and $4.5 \cdot 10^{-10} \pm 0.1 \text{ m}^2/\text{s}$ immediately upon addition of A β 28, in line with the interaction of the ThT with the monomeric peptide (ESI, Fig. S4). The intensity decay for the ThT – A β complex is fitted by a single diffusion coefficient, whose value is intermediate between those of ThT and A β monomer. This indicates fast exchange between a ThT-bound and ThT-free form, and a 20% bound fraction. This corresponds to a dissociation constant, K_d , of about 2 mM, between ThT and monomeric A β 28. This is the first report on the affinity between ThT and A β monomers. Maezawa *et al.* determined by Surface Plasmon Resonance that ThT binds to A β 40/42 oligomers with a K_d of about 0.5 μ M⁸, while a K_d of 0.75 μ M was determined on A β 40 by fluorescence¹¹. The 3 orders of magnitude difference in binding affinity is in part due to the difference in peptide length but most likely to the difference between monomer and aggregated states which provide a stronger binding pocket to ThT.

In order to get a dynamic description of the binding mode at atomic resolution, we performed molecular dynamic (MD) simulations. Two 10 ns long dynamics were performed, starting with two different ThT positions with respect to A β 28. In the first one, the ThT center of gravity was placed 5 \AA away from F19. In the second run, ThT was moved 4 residues towards the peptide N-terminus, thus near N15 (see ESI material and methods). In the first MD, the peptide rapidly unfolded to random coil while the ThT molecule established stable contacts over the entire simulation with the LVFFA cluster, with multiple and transient hydrophobic interactions between Me M1, M3 and Me of L, V and A residues. To check whether the MD depended on the starting ThT position, ThT was shifted toward N15: Figure 3a shows the average distance between ThT and A β residues at three times along the MD run. Within 2 ns of MD, the ThT molecule clearly shifted towards the hydrophobic cluster (i.e. grey bar), where it remained for the last 8 ns, establishing hydrophobic contacts in line with the intermolecular NOEs observed (Fig. 3). A detailed analysis of the MD simulations indicated that the ThT flipped and adopted the following privileged contacts: methyl group M1 of the benzothiazole moiety with A21, the benzamine moiety with F20 for aromatic protons and with L17 for methyl groups M3 (ESI, Fig S5a-c). This privileged orientation is illustrated in ESI, Fig. 5d-e with Me-Me hydrophobic contact and possible transient π - π stacking between the aromatic rings of the benzamine moiety and F19. These views should be considered as instantaneous pictures among other conformers, nevertheless the binding epitope described by the hydrophobic core L17 to A21 is clearly demonstrated.

Our data on the monomeric A β 28 are consistent with MD simulations on A β (16-22) composed of eight in-register anti-parallel β -strands. Authors demonstrated that ThT could bind to two major binding sites, the central channel of the lower and upper sheet layers delimited respectively by F19-F19 and V18-F20¹². In addition, it has been shown that in large excess of ThT with respect to A β 42, ThT

inhibited oligomers formation, especially small oligomers with a molecular mass of 18-36 kDa¹³. In line with this result, it has also been recently shown that ThT can interfere with A β 40 aggregation promoting fibrils formation.¹⁴ In this context, ThT could prevent the early stage of oligomers formation considering the importance of the hydrophobic core in the aggregation mechanism¹⁵. To the best of our knowledge, beside this simulation no structural data was reported in the literature about the binding site of ThT with monomeric A β peptides. The results described herein are therefore the first experimental evidence about the binding interaction of ThT with central hydrophobic core of the monomeric A β .

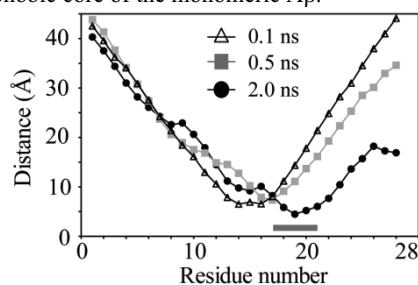


Figure 3: a) ThT shift towards the hydrophobic cluster of A β 28 (gray bar) illustrated by the average distance between ThT molecule and A β 28 residues at three distinct running times (i.e. 0.1, 0.5 and 2.0 ns) of a MD simulation.

Conclusions

We have demonstrated, based on NMR experimental evidence, that ThT binds specifically to A β 28 peptide in its monomeric form at pH 7.4, although with a weak affinity (Kd in the mM range). This questions the common belief that ThT binds only to amyloid fibrils in line with its wide use to monitor fibrils formation by fluorescence. Based on specific intermolecular NOE contacts and molecular dynamics simulations we have established a model of the ThT – A β interaction, which involves exchange between several transient species. Although the interactions involved in the ThT - A β adduct are weak, they are expected to have an impact on the aggregation process, as ThT binds to the region proposed to make the first peptide-peptide contacts. Future ongoing studies will be dedicated to the study of ThT interaction with small oligomers (forms prior to elongation) since several reports demonstrated the role of oligomers rather than fibrils or monomers in neurodegeneration process and cognitive deficits^{4, 16}. In this context, analogs of ThT could be considered as starting points to design molecules which specifically target A β monomers or oligomers in a curative strategy against AD. ThT could also inspire the design of new molecular probes specific of the early stages of the aggregation mechanism aiming at developing early diagnosis tool against AD¹⁷.

Notes and references

^a CNRS; LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination) ; 205, route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France and ^bUniversité de Toulouse; UPS, INPT ; LCC ; F-31077 Toulouse, France

^c Institute of Pharmacology and Structural Biology, Université de Toulouse, UPS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

^d IPBS, UMR 5089, CNRS, 205 route de Narbonne, BP 64182, 31077 Toulouse, France

† Footnotes: NMR experiments were performed on the PICT - Genotoul platform of Toulouse and funded by CNRS, Université de Toulouse-UPS, Ibis, European structural funds and the Midi-Pyrénées region. The PRES of the Toulouse University and the Region Midi-Pyrénées are acknowledged for the financial support of the doctoral fellowship of H. E..

Electronic Supplementary Information (ESI) available: []. See DOI: 10.1039/c000000x/

1. F. Chiti and C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, **75**, 333-366.
2. R. Tycko, *Biochemistry*, 2003, **42**, 3151-3159.
3. P. Faller, C. Hureau and O. Berthoumieu, *Inorg. Chem.*, 2013, DOI: **10.1021/ic4003059**.
4. C. Glabe, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 29639-29643.
5. N. Amdursky, Y. Erez and D. Huppert, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **45**, 1548-1557.
6. A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova and K. K. Turoverov, *J. Phys. Chem. B.*, 2012, **116**, 2538-2544.
7. D. Benaki, K. Stathopoulou, L. Leondiadis, N. Ferderigos, M. Pelecanou and E. Mikros, *J. Pept. Sci.*, 2009, **15**, 435-441.
8. I. Maezawa, H. S. Hong, R. Liu, C. Y. Wu, R. H. Cheng, M. P. Kung, H. F. Kung, K. S. Lam, S. Oddo, F. M. Laferla and L. W. Jin, *J. Neurochem.*, 2008, **104**, 457-468.
9. D. A. Kirschner, H. Inouye, L. K. Duffy, A. Sinclair, M. Lind and D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 6953-6957.
10. F. Collin, I. Sasaki, H. Eury, P. Faller and C. Hureau, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2130-2132.
11. C. Wu, Z. Wang, H. Lei, W. Zhang and Y. Duan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1225-1232.
12. C. Wu, Z. Wang, H. Lei, Y. Duan, M. T. Bowers and J. E. Shea, *J. Mol. Biol.*, 2008, **384**, 718-729.
13. M. Necula, R. Kaye, S. Milton and C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 10311-10324.
14. M. D'Amico, M. G. Di Carlo, M. Groenning, V. Militello, V. Vetri and M. Leone, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 1596-1601.
15. A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio and R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 16742-16747.
16. W. L. Klein, *J. Alzheimers Dis.*, 2013, **33**, S49-S65.
17. S. Noël, S. Cadet, E. Gras and C. Hureau, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 7747-7762.

Thioflavine T does interact with monomeric Amyloid- β peptide

H. Eury, G. Czaplicki, P. Faller, I. Sasaki, A. Milon, C. Hureau and O. Saurel*

Electronic Supplementary Information (ESI)

Table of content

Materiel and Methods	p. 103
ESI table 1:	p. 106
ESI Figure S1:	p. 106
ESI Figure S2:	P. 108
ESI Figure S3:	p. 110
ESI Figure S4:	p. 111
ESI Figure S5:	p. 112
ESI References:	p. 114

Material and Methods

Chemical and samples preparation

Peptides: A β 28 peptide (sequence DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK) was bought from GeneCust (Dudelange, Luxembourg) with purity grade > 98%.

Stock solutions of peptide were prepared by dissolving the powder in milliQ water or D₂O (resulting pH ~ 2). Peptide concentration was then determined by UV-visible absorption of Tyr10 considered as free tyrosine ($\epsilon_{276}-\epsilon_{296}$) = 1410 M⁻¹cm⁻¹ at pH~2. The stock solution was adjusted at pH~12. Then, the solutions were diluted down to the appropriate concentration in peptide during sample preparation. All pH values are given with a \pm 0.2 pH unit error.

Zinc solutions: Zn(II) used was from ZnSO₄.H₂O and purchased from Sigma. Stock solution of Zn(II) (~0.1M) was prepared in H₂O.

Phosphate buffer were bought from Sigma-Aldrich.

ThioflavinT (ThT) was bought from Acros organics. Stock solution of ThT (10mM) were prepared in in H₂O.

Fluorescence measurements

ThT, A β 28, and Zn(II) were mixed in a 10 mM phosphate buffer pH 7.4 and placed in a 384-well microplate. The final concentrations were 500 μ M for A β 28, 10 to 140 μ M for ThT and 0 or 250 μ M for Zn(II). The time course of ThT fluorescence was then measured with a FLUOstar Optima (BMG Labtech) multiplate reader (excitation, 440 nm; emission, 490 nm; bandwidth for emission and excitation, 10 nm) at T=25°C.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) measurements

A β 28 samples were freshly prepared from a D₂O stock solution and diluted to about 500 μ M in 90/10 H₂O/D₂O or in pure D₂O at pH 7.4. ThT was directly added to the NMR tube at the final concentration of 140 μ M. In D₂O, the pD was measured using a classical glass electrode according to pD= pH_{reading}+ 0.4¹. Experiments were performed on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe (¹H, ¹³C, ¹⁵N). All chemical shifts were referenced at 0.00 ppm relative to internal TSP (sodium 3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3-d₄). Proton 1D-NMR and 2D-NMR spectra were collected at 25°C in pure D₂O, except for the sample dedicated to resonance assignment of A β 28 in 90/10 (H₂O:D₂O).

A β 28 peptide assignments were performed using 2D TOCSY with a mixing time of 80 ms at 10 KHz of radiofrequency field (DIPSI-2) and two 2D NOESY with mixing times of 140 and 400 ms. Both experiments were recorded with 4k x 512 complex data points and with a recycle delay of 2 s and 32

scans. NOESY spectra in the presence of ThT were acquired within 12 hours, with mixing times of 150 and 400 ms and using 4k x 512 data points and with 32 repetition scans.

The diffusion coefficient (D) were obtained using stimulated echo experiment with bipolar gradient and Watergate experiment ². The pseudo 2Ds were acquired with a gradient ramp from 2 % to 95 % in 16 linear steps, a diffusion time (Δ) of 0.2 s, and diffusion gradient lengths (δ) of 0.9 and 1.6 ms for ThT alone and in presence of A β peptide respectively. The gradients were calibrated at 57.15 G/cm relatively to the self-diffusion coefficient of water.

All NMR data were processed using TopSpin 2.1 software (Bruker). A β 28 assignment was performed using Cara 1.3v8 software (www.nmr.ch) and diffusion coefficients were determined using the T1/T2 package of Topspin 2.1 by fitting the raw data with a single coefficient diffusion entity.

Molecular Dynamic simulations

Molecular dynamics (MD) simulations were performed with the Amber 9 package^{3,4}. A periodic box has been created with the sizes of 50 x 50 x 115 Å, in the center of which a 28-residue peptide was placed in the extended conformation. One ThT molecule was added to the system and positioned near the peptide, with the M1 methyl group oriented toward the decreasing residue numbers. The box was solvated with 7175 H₂O molecules (TIP3P model), and finally two Na⁺ ions were added at random positions to compensate the global charge of the system. We have performed two runs of MD simulations, each of them 10 ns long. The initial position of the ThT molecule was different in each of the two runs. In the first one, the ligand was placed at the distance of 5 Å between the center of gravity of ThT and that of F19. In the second run, ThT was moved 4 residues towards the N-terminal of the peptide.

Each run started with energy minimization of the solvent using the Steepest Descent algorithm for 1000 iterations, during which the Cartesian coordinates of the atoms of the remainder of the system were restrained using a harmonic potential with the force constant equal to 100 kcal/mol/Å². Next, 1500 iterations of the Conjugate Gradients algorithm followed, with weakly restrained solute (10 kcal/mol/Å²). Then, a 20 ps MD run was performed with constant volume, while temperature was varied linearly between 0 and 300 K, the integration step was 1 fs. This was followed by a 100 ps MD run with constant pressure at 300 K. The temperature control was achieved using the Langevin dynamics with the collision frequency parameter γ equal to 1.0 ps⁻¹. The pressure was controlled by the anisotropic Berendsen barostat with the pressure relaxation time $\tau_p = 2$ ps. Bonds involving hydrogen atoms were constrained with the SHAKE algorithm ⁵. Throughout the calculations a cutoff of 12 Å was used for electrostatic interactions. At the end of this step the system was equilibrated, with constant values of the total energy, volume, pressure and density. Finally, a production run of 10 ns was performed with the integration step of 2 fs, with atomic coordinates saved every 10 ps. After the run the resultant trajectory was visualized and analyzed.

The data shown in Figure 3a have been extracted from the second MD run. We have calculated the distance between the center of gravity of the ThT molecule and that of each of the residues in the peptide, as represented by the N, CA and C atoms, for each frame of the trajectory. Then, the distances have been averaged over 10 consecutive frames, centered on three selected simulation times: 0.1 ns, 0.5 ns and 2 ns.

ESI table 1

Primary sequence of A β 28 peptide:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK

¹H chemical shifts of A β 28 at pH 7.4

All the ¹H signals were assigned on the basis of chemical shifts by using ¹H-¹H TOCSY and ¹H-¹H NOESY experiments for A β 28 (500 μ M) in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 90/10 H₂O/D₂O at 10°C.

All chemical shifts were referenced at 0.00 ppm relative to internal TSP.

Résidu	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ
Asp1		4.13	2.68-2.80			
Ala2		4.29	1.36-1.37			
Glu3	8.52	4.20	1.83-1.92	2.17-2.19		
Phe4	8.35	4.56	3.01		7.16	7.25
Arg5	8.19	4.27	1.62-1.74	1.49	3.12	
His6		4.54	3.05-3.10		7.88	7.03
Asp7	8.40	4.62	2.66			
Ser8	8.46	4.37	3.87-3.91			
Gly9	8.59	3.88-3.94				
Tyr10	8.01	4.52	2.94-3.03		7.06	6.78
Glu11	8.44	4.18	1.89-1.92	2.12-2.21		
Val12	8.13	3.94	1.95	0.78-0.87		
His13		4.53	3.04		7.83	6.94
His14		4.59	3.01-3.08		7.85	6.96
Gln15	8.44	4.26	1.97-2.06	2.32		
Lys16	8.44	4.27	1.67-1.74	1.37	1.44	2.97
Leu17	8.31	4.32	1.57-1.61	1.45	0.85-0.91	
Val18	8.04	4.02	1.90	0.75-0.83		
Phe19	8.31	4.58	2.91-2.99		7.30	7.17
Phe20	8.27	4.57	2.94-3.09		7.32	7.24
Ala21	8.29	4.22	1.36-1.37			
Glu22	8.42	4.21	1.92-2.04	2.27		
Asp23	8.48	4.65	2.63-2.74			
Val24	8.20	4.15	2.19	0.96		
Gly25	8.59	3.98				
Ser26	8.22	4.46	3.88			
Asn27	8.54	4.74	2.77-2.85			
Lys28	7.96	4.16	1.71-1.83	1.39	1.66	2.99

ESI figure S1

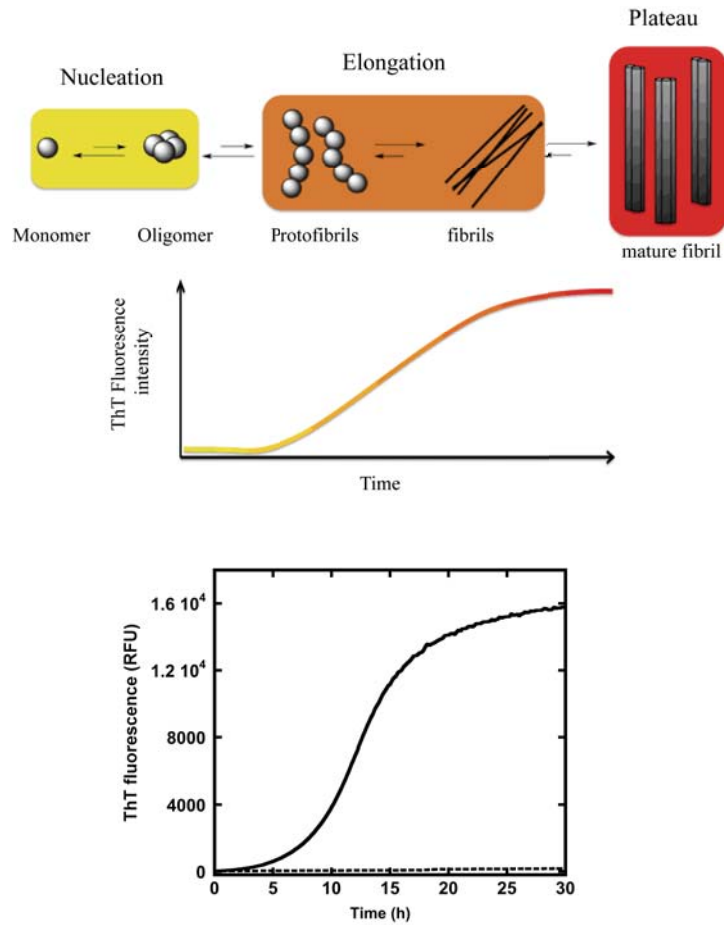
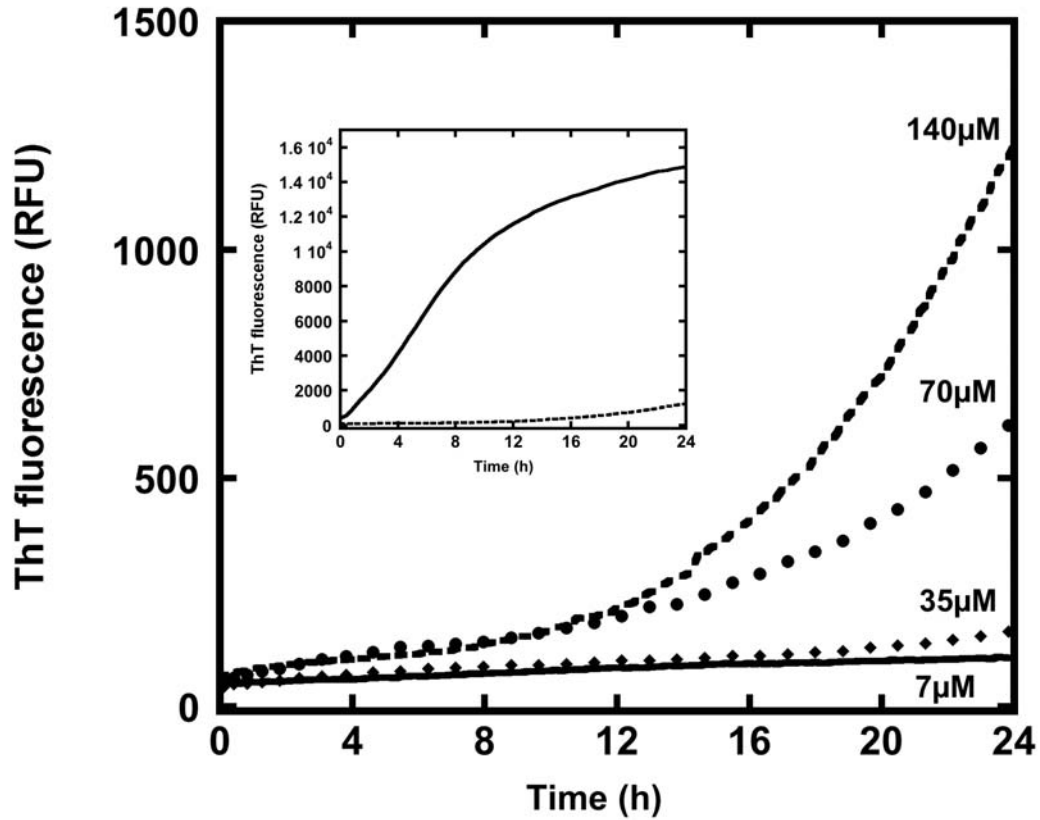


Figure S1: Illustration of the kinetic mechanism of amyloid peptide aggregation probed by fluorescence spectroscopy (top). Experimental aggregation kinetic on Ab28 peptide triggered by zinc (II) addition (dashed line without Zn and plain line with 250 μM Zn(II)) : 10 μM ThT, 500 μM Aβ28, 10 mM, phosphate buffer pH 7.4, 25°C.

ESI figure S2

Sample characterization

A) ESI figure S2a



Aggregation kinetic of a solution of A β 28 (500 μ M) solution in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 and 25 °C reported by ThT fluorescence at different ThT concentrations: 10 μ M (plain line), 50 μ M (diamonds), 100 μ M (circles) and 140 μ M (dashed line)

This experiment indicated that in our conditions, A β 28 peptide is mainly monomeric or oligomeric since the fluorescence intensity at 12 hours is only about 2% of the fluorescence intensity in the same conditions but with 250 μ M of Zn(II), known to promote aggregation as illustrated in the inset (plain line).

B) ESI figure S2b

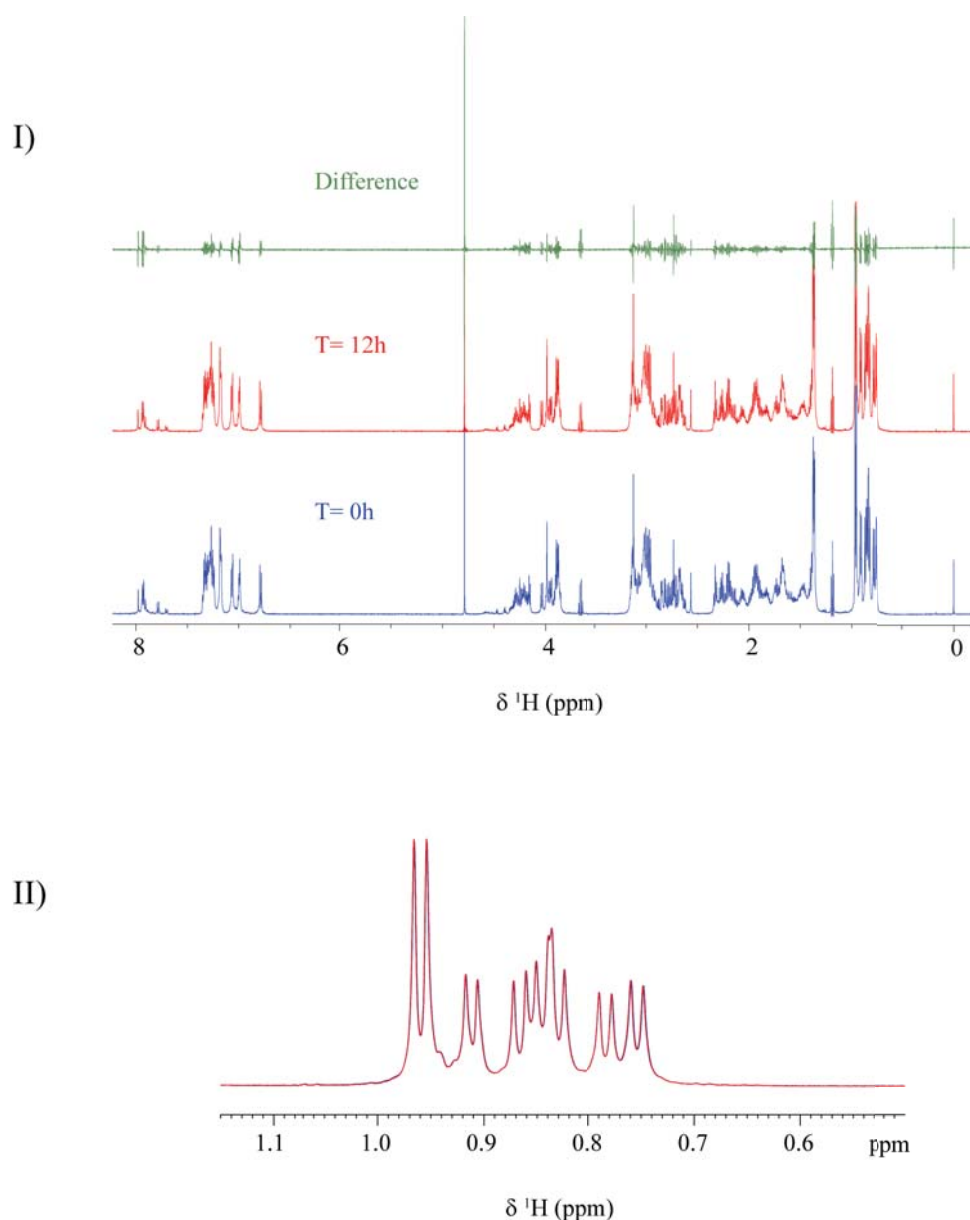


Figure 2b, Time evolution of 1D ¹H NMR spectra over 12 hours. Figure I) represents a superimposition of spectra at t=0 (i.e. immediately after the sample preparation) and at 12 hours respectively in blue and red colors, in green the difference between the two spectra. Figure II) corresponds to superimposition of the spectra at times 0 and 12 hours (blue and red) zoomed in the methyl region of Aβ₂₈ amino acids.

Neither signal loss nor line broadening could be observed during 12 hours on Aβ₂₈ demonstrating the stability of the sample during the experiment. The fairly low fraction of aggregated species detected by fluorescence spectroscopy is below the limit of sensitivity by NMR spectroscopy.

ESI figure S3 Transferred Noes

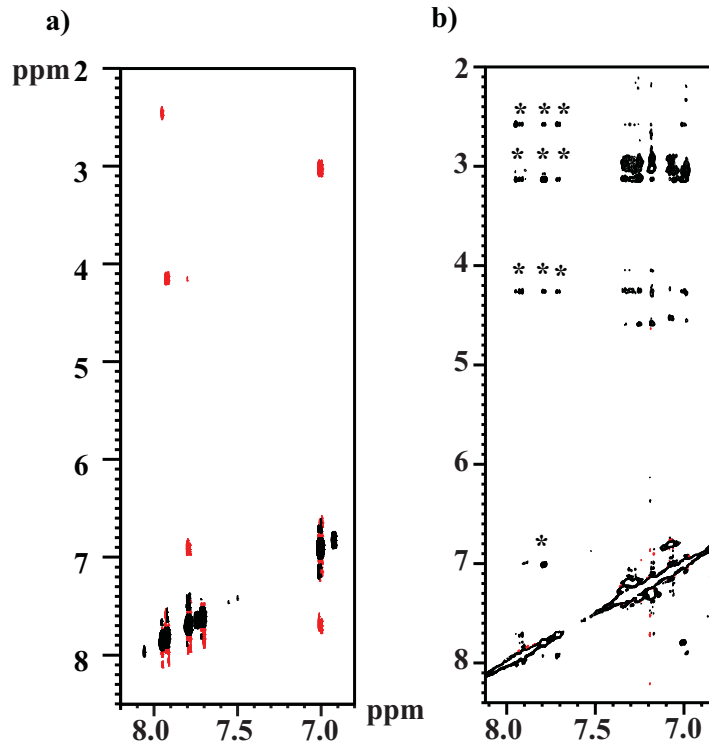


Figure 3 represents NOESY spectra of solutions of ThT at 140 μM in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 and 25 $^{\circ}\text{C}$ without, panel a), and with 500 μM of Ab28, panel b). Figure 4a) displays intra-molecular NOes for ThT with cross-peaks of opposite sign compared to diagonal peaks, characteristic of positive Noes, as expected for a molecule of this molecular weight. In presence of A β 28, we observed transferred NOes since the sign of the intermolecular ThT cross peaks (asterisk marks) became positive, acquiring the NOe sign of A β 28 peptide.

ESI figure S4

Diffusion coefficient measurement

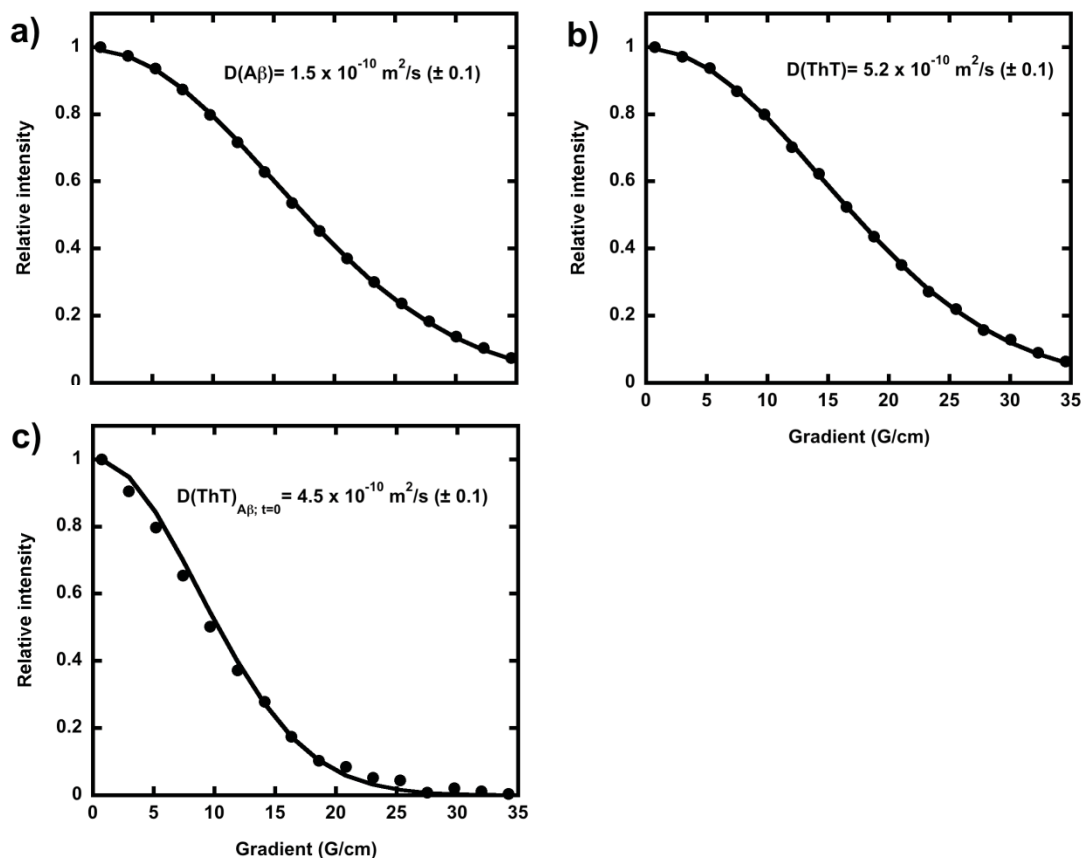
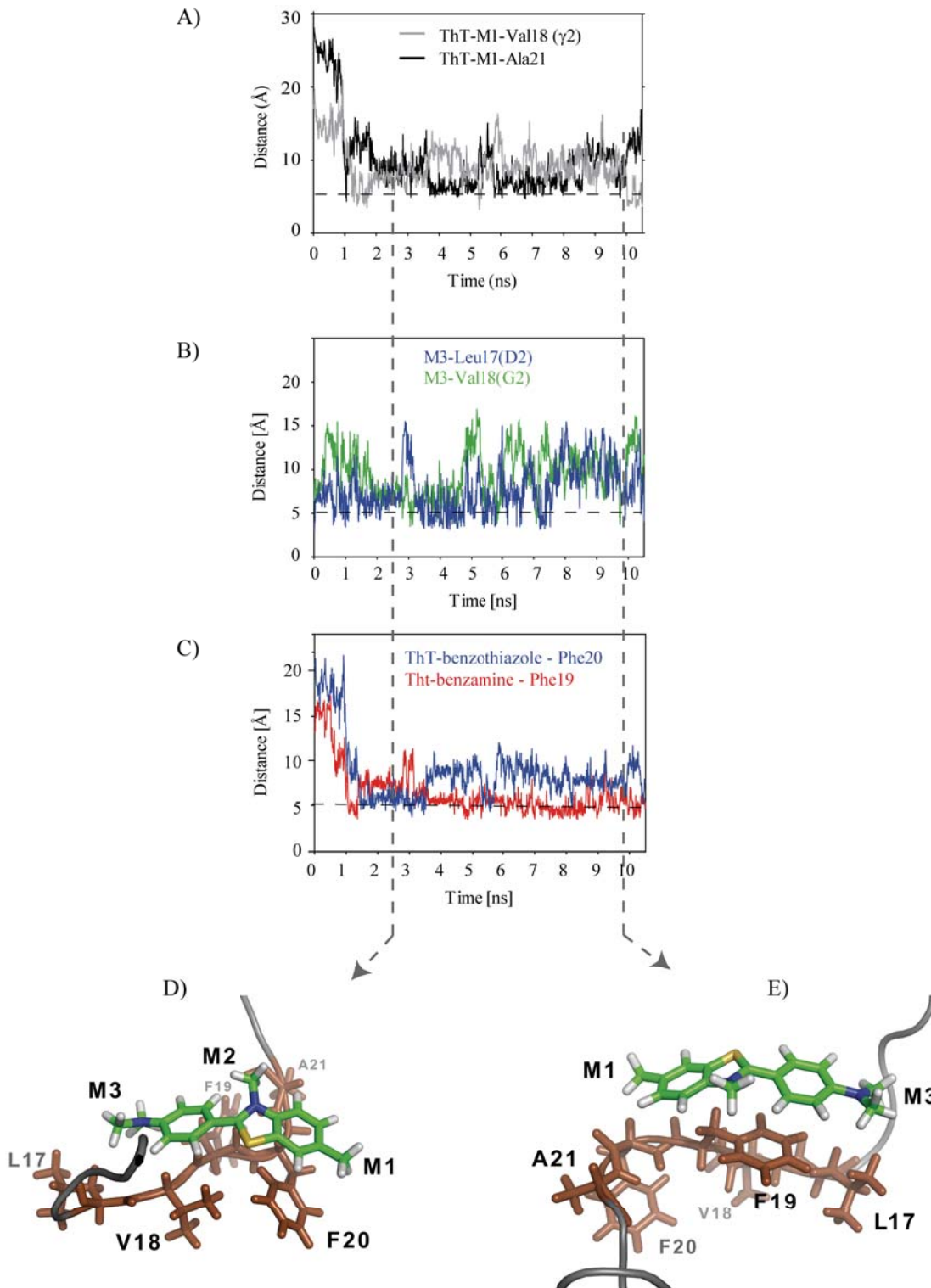


Figure 4 represents NMR signal decay as a function of gradient strength during a stimulated echo experiment with bipolar gradients; a) Aβ28 (-CH₃ of Val24) alone, b) ThT (M1 signal) alone and c) ThT (M1 signal) in presence of Aβ28. The diffusion coefficient reported within each panel was determined by fitting the experimental points with a single component exponential decay. We measured a ThT diffusion coefficient in presence of Aβ28 of $4.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ significantly slower than ThT alone ($5.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) but far from the value of Aβ28 at only $1.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ($D_{A\beta 28}$). The diffusion coefficient of the ThT is decreased by its interaction with Aβ28, therefore we measured an apparent diffusion coefficient (D_{ThT^*}) due to a fast exchange between ThT free and ThT bound to Aβ28 during the diffusion delay. Assuming a single diffusing entity for the ThT free, ThT bound and Aβ28 peptide and that the diffusion coefficient of Aβ is not affected upon ThT binding ($D_{\text{ThTb}} = D_{A\beta 28}$), we could calculate a fraction of ThT bound equal to $20 \pm 5\%$ using the relation $[\text{ThT}_f] \cdot D_{\text{ThTf}} + [\text{ThT}_b] \cdot D_{\text{ThTb}} = D_{\text{ThT}^*}$. We could thus determine a dissociation constant K_d of $\sim 2 \text{ mM}$.

ESI figure S5

Molecular Dynamic simulations



Figures 5 a-c) represent the trajectory of the molecular dynamic simulation illustrated by the temporal fluctuations of the distance along the 10ns of simulations between: a) the centers of gravity of ThT methyl group M1 and methyl protons of V18 and A21 residues of A β 28, b) the centers of gravity of ThT methyl protons M3 and methyl protons of Leu17 and V18 residues of A β 28 and c) the centers of gravity of the ThT benzothiazole and benzamine aromatic cycles with the aromatic side chain of F20 and F19 respectively. This trajectory corresponded to the second run where the initial position of the ThT molecule was placed at the distance of 5 Å between the center of gravity of ThT and that of 15N, four residues toward the N terminus from the center of the hydrophobic core LVFFA of A β 28. The dashed line at 5 Å illustrated the distance compatible with experimental observation of NOEs by NMR spectroscopy. During both simulations, ThT molecule flipped and moved toward the hydrophobic core LVFFA within 2 ns and remained located at the same region. This is illustrated by figures 5 d) and e) which represents two snapshots at 2.56 ns and 9.95 ns respectively; the localization with respect to the hydrophobic cluster (brown color) is stable during 8 ns of simulation but highly dynamic due to the flexibility of the random coil A β 28 peptide with transient methyl-methyl or aromatic- aromatic hydrophobic contacts.

ESI REFERENCES

- (1) Glasoe, P. K.; Long, F. A. *The Journal of Physical Chemistry* **1960**, *64*, 188.
- (2) Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1995**, *115*, 260.
- (3) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1668.
- (4) Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2013**, *3*, 198.
- (5) Kräutler, V.; van Gunsteren, W. F.; Hünenberger, P. H. *Journal of Computational Chemistry* **2001**, *22*, 501.

Chapitre IV : Agrégation du peptide
A β 28 : RMN vs Fluorescence
de la ThT

Chapitre IV. Agrégation du peptide A β 28 : RMN vs fluorescence de la ThT.

Introduction :

L'une des caractéristiques principales de la maladie d'Alzheimer est le passage du peptide A β sous forme monomérique soluble à une forme agrégée insoluble. L'agrégation du peptide A β est influencée par la présence d'ions métalliques tels que le Zn(II) et le Cu(II) [1-5]. *In vivo*, le rôle des ions métalliques est encore à l'état d'hypothèse mais leur influence est clairement démontré par des expériences *in vitro*. Par contre, il n'existe pas de consensus dans la littérature quant à l'impact des ions métalliques sur l'agrégation. Autrement dit, selon les conditions (pH, concentration, nature du peptide) les ions métalliques peuvent accélérer ou ralentir l'agrégation et changer les structures ainsi que les quantités relatives des agrégats formés. Généralement, l'effet du Zn(II) sur la formation des fibres amyloïdes est présent sur l'étape de nucléation et touche peu l'étape d'élongation (cf § I-D-2-b-ii, p. 57) [5]. Un cas bien étudié dans notre groupe est celui du peptide amyloïdogénique A β 11-28 où le Zn(II) déclenche l'agrégation en favorisant l'étape de nucléation [6-8].

Une des techniques spectroscopiques les plus utilisées pour étudier l'agrégation du peptide A β est la fluorescence de la Thioflavine T (ThT) [9-11]. La fluorescence de la ThT est exaltée lorsqu'elle se fixe sur des agrégats fibrillaires. Cette technique a l'avantage d'être très simple (addition d'un fluorophore extrinsèque), sensible et peu coûteuse. Cependant, cette technique a ses limites puisqu'elle ne permet pas, entre autre, d'identifier clairement les espèces intermédiaires de l'agrégation. Pour pallier à ce manque d'information, la RMN est un outil bien adapté. En effet, la RMN a permis de caractériser le peptide A β sous forme monomérique (RMN liquide) [12,13] ainsi que sous forme fibrillaire (RMN solide) [14,15]. Cependant, ces différentes études ont été réalisées dans des conditions différentes de celles du milieu physiologique (pH~3, présence de détergents, TFE ou DMSO, etc). De plus, qu'en est-il des espèces oligomériques intermédiaires ? Il n'existe que peu d'informations structurales concernant ces espèces.

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'influence du Zn(II) sur l'agrégation du peptide A β 28 par spectroscopie de fluorescence de la ThT. Une fois les conditions expérimentales optimisées, l'agrégation du peptide a été étudiée par RMN ^1H afin d'obtenir des éléments de réponse quant au mécanisme de l'agrégation et de les corrélés à ce qui est observé par fluorescence. Par ailleurs, l'influence de la ThT, proposée ou supposée inerte dans la littérature, sur la cinétique d'agrégation a également été étudiée par fluorescence et RMN ^1H .

IV-A Paramètres influençant la cinétique d'agrégation du peptide A β 28

L'agrégation est dépendante de nombreux facteurs tels que le pH ou la température. Il est donc important d'étudier les différents facteurs influençant la cinétique d'agrégation. Dans cette première partie, nous allons présenter l'influence des différents paramètres expérimentaux sur la cinétique d'agrégation (concentration en peptide et en tampon, pH, température, agitation, état initial du peptide, interface air-liquide) et ainsi montrer les difficultés rencontrées pour obtenir des données reproductibles. Ces études ont été menées par spectroscopie de fluorescence de la ThT.

Remarque liminaire : La valeur des concentrations de ThT utilisées correspond à la concentration théorique basée sur la masse molaire. Néanmoins, par dosage UV-Visible, il a été possible de déterminer à posteriori ^[16], que la pureté de la ThT est d'environ 70% (cf Annexe II, p. A-34).

IV-A-1 Rappel sur le mécanisme d'agrégation et utilisation de la fluorescence de la ThT

Le mécanisme exact de l'agrégation n'est pas élucidé. Cependant il existe un mécanisme communément admis pour les peptides de type amyloïde : le modèle de nucléation. Ce modèle peut être décrit par trois phases successives : la nucléation, l'élongation et le plateau. La nucléation correspond à la formation de noyaux à partir de

monomères de peptides Aβ, natifs ou non structurés, stabilisés par des liaisons intermoléculaires. Ces noyaux vont par la suite diriger la croissance de l'agrégation formant un empilement de peptides structurés en feuillets-β (ou protofibrilles et protofibres). Cette étape de croissance correspond à la phase d'élongation. Il est admis que le plateau est la phase finale de l'agrégation : la formation de fibres s'arrête par manque de peptide pour continuer l'empilement. Cette cinétique a la forme d'une sigmoïde qui est le plus souvent suivie par l'augmentation d'intensité de fluorescence de la ThT (Fig. IV-1). L'équation de cette sigmoïde est (Eq. 1):

$$F(t) = F_0 + \frac{A}{1+e^{-k(t-t_{1/2})}} \quad (\text{Eq. 1})$$

avec $F(t)$ la fluorescence à l'instant t , F_0 la fluorescence de la ligne de base avant l'agrégation, A l'amplitude, k la vitesse d'élongation, $t_{1/2}$ temps nécessaire pour atteindre la moitié de la valeur de l'intensité de fluorescence maximale [8,17].

Lors de ces études, l'intensité de fluorescence au plateau ainsi que la valeur du $t_{1/2}$ seront particulièrement importantes. De même Δ , temps nécessaire pour passer à 10% à 90% de l'intensité maximale, sera un paramètre très utilisé dans la suite du manuscrit et qui s'exprime en fonction de k soit $\Delta = 2 \ln 9/k$. Ces paramètres devraient donc refléter la vitesse d'agrégation du peptide (Fig. IV-1).

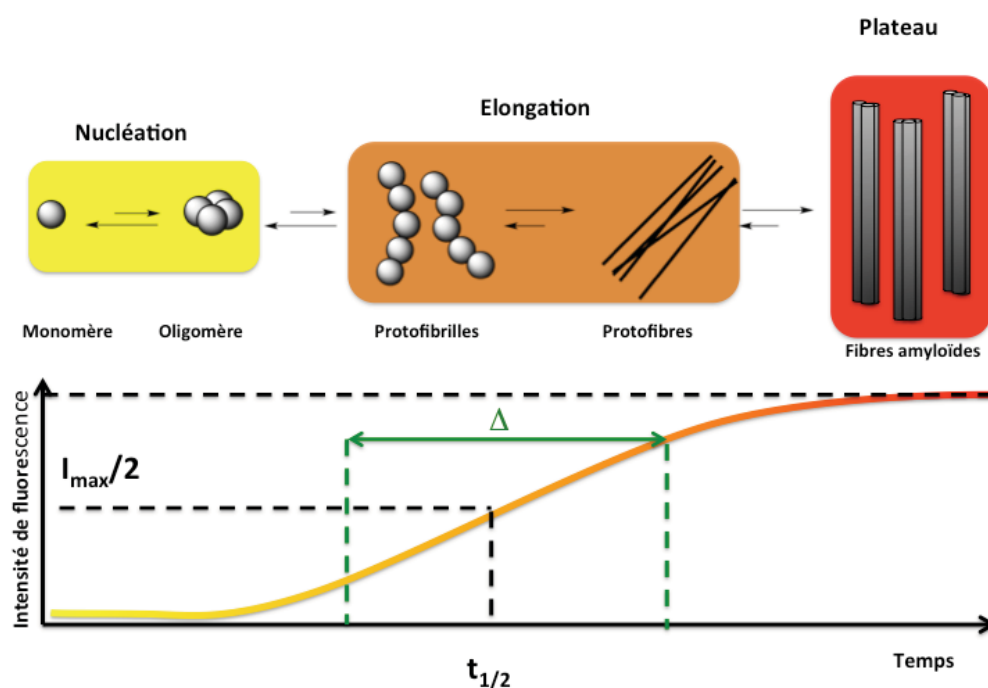


Figure IV-1: Mécanisme d'agrégation du peptide amyloïde et son suivi par spectroscopie de fluorescence de la ThT

IV-A-2 Traitement du peptide A β 28 à haut pH : vers une monomérisation

Afin d'obtenir des cinétiques d'agrégation reproductibles, il est nécessaire de partir du même état initial. L'état le mieux défini des peptides A β est le monomère. Ceci semble être aussi la forme de départ lors de l'agrégation dans la MA, car le peptide est présent sous forme monomérique soluble dans le cerveau des patients sains. Il est donc important de partir de la forme monomérique pure afin d'étudier les différents facteurs influençant la cinétique d'agrégation et d'obtenir des données reproductibles. La présence, même en faible quantité, de noyaux influence de façon drastique la cinétique d'agrégation du peptide ^[18].

Une méthode simple et efficace consiste à pré-incuber la solution stock de peptide A β 28 à pH ~12. Ce traitement est supposé suffisant pour monomériser les noyaux présents ^[8]. Le suivi par fluorescence de la ThT (Fig. IV-2) montre que des échantillons du peptide seul de la même solution stock, non traité à haut pH, ne présentent pas la même intensité de fluorescence à t=0 et agrègent à des vitesses différentes dans exactement les mêmes conditions expérimentales de concentration, pH et température (ronds et carrés noirs). Ces résultats indiquent une hétérogénéité de taille des pré-agrégats de peptide au niveau de la solution stock. La même expérience est réalisée à partir d'une solution traitée au préalable à haut pH. La fluorescence à t=0 est quasiment absente indiquant une absence des pré-agrégats. De plus, sur 8h aucune augmentation de la fluorescence n'est observée. Ceci est vraisemblablement dû à l'absence de noyaux qui pourraient déclencher l'agrégation du peptide monomérique. Le même comportement est retrouvé pour les deux cinétiques d'agrégation (ronds et carrés rouges). Donc le traitement à pH~12 permet d'obtenir un échantillon stock de peptide plus homogène et constitué principalement de peptide monomérique. Ceci a permis par la suite d'obtenir des expériences plus reproductibles.

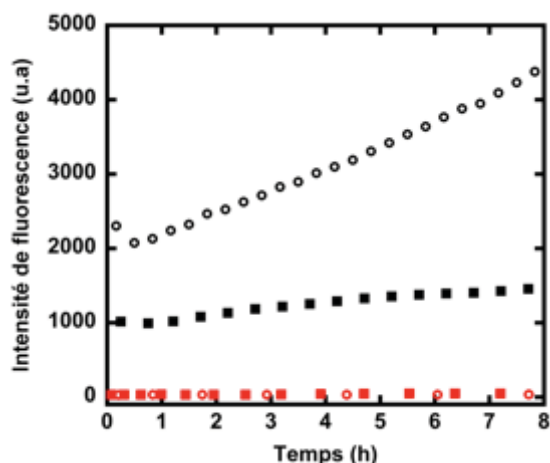


Figure IV-2: Fluorescence de la ThT au cours du temps du peptide A β 28 provenant d'un même lot (ronds et carrés) avec (rouge) et sans (noir) préincubation à pH 12.
Conditions expérimentales : [A β 28]=500 μ M, [Tampon phosphate]=10 mM, pH 7.4 et [ThT]=10 μ M, T=25°C

Toutes les expériences présentées dans la suite du manuscrit ont été réalisées à partir d'aliquotes de solutions de peptide à environ 2 mM, pré-incubées à pH~12 et conservées au congélateur (-20°C).

IV-A-3 Influence de la concentration en peptide A β 28 sur la cinétique d'agrégation

Dans cette étude, nous avons utilisé 0.5 équivalent de Zn(II) qui sert de déclencheur de l'agrégation et dont l'effet sera discuté dans la partie IV-B de ce chapitre. Comme attendu et comme le montre la figure IV-3 (panneau de gauche), la cinétique d'agrégation dépend de la concentration en peptide. En effet, plus il y a de peptide et plus l'intensité de fluorescence au niveau du plateau est importante indiquant que la quantité de fibres formées dépend de la quantité de peptide initiale.

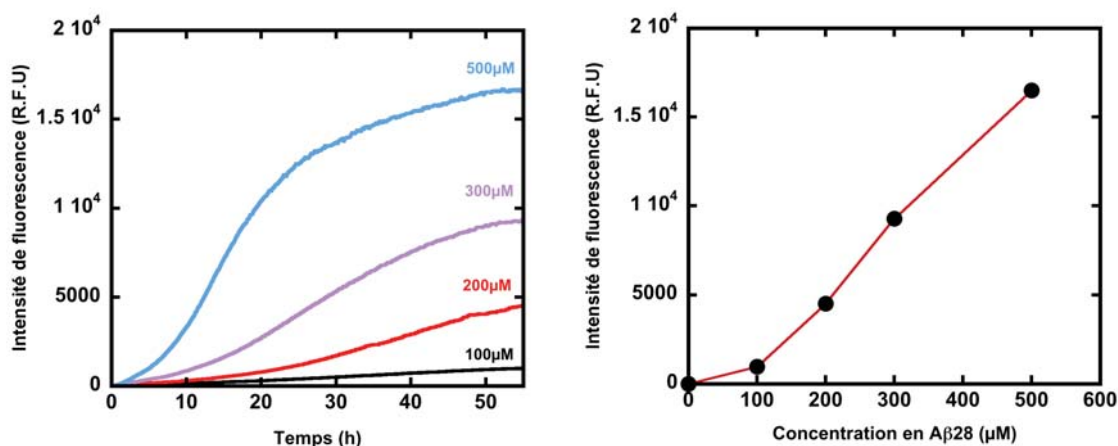


Figure IV-3: Fluorescence de la ThT en fonction de la concentration en peptide A β 28.
 Conditions expérimentales: [A β 28]=100 à 500 μ M, [Zn(II)]=0.5 μ g/peptide, [ThT]=10 μ M dans 10mM de tampon Phosphate pH 7.4, T=25°C

Concernant la cinétique d'agrégation, nous observons une accélération de la phase de nucléation et de la phase d'élongation avec l'augmentation de la concentration entre 100 et 500 μ M de peptide A β 28. La figure IV-3 (panneau de droite) représente l'intensité de fluorescence à t=50h selon la concentration en peptide. La quantité de fibres formées dépend également de la concentration en peptide initiale mais de façon non linéaire. L'allure de la courbe (Fig. IV-3, panneau de droite) suggère que la formation de fibres nécessite une quantité minimale en peptide (i.e. > 100 μ M) (en deçà d'une concentration critique, il n'y a pas d'agrégation) et que la concentration en fibres formées n'est pas linéaire avec la concentration en peptide et/ou Zn(II). L'interprétation détaillée de cette expérience nécessite des données qui seront déterminées dans la suite de ce chapitre, et sera donc faite dans la partie conclusion (cf § IV-D, p. 147).

IV-A-4 Influence du pH sur l'agrégation du peptide A β 28

Comme mentionné précédemment, l'agrégation du peptide A β dépend de nombreux paramètres notamment du pH. Nous avons donc étudié la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 à pH 6.5 (100mM en tampon Pipes) et pH 7.4 (100mM en tampon Hepes) (Fig. IV-4). Les tampons Hepes et Pipes font partie de la famille des tampons de Good (tampons zwitterioniques) et possèdent des propriétés physico-chimiques très proches^[19].

De ce fait seule l'influence du pH est évaluée, la nature du tampon ne devrait pas trop influencer la cinétique d'agrégation dans ce cas. Dans cette étude, nous avons utilisé 0 (courbe rouge) et 0.5 équivalent (courbe noire) de Zn(II) .

A pH 6.5, le peptide sans Zn(II) commence à agréger assez rapidement avec une cinétique d'élongation relativement lente (courbe rouge). A contrario, à pH 7.4, le peptide sans Zn(II) n'agrège pas (courbe rouge) sur 90h. A pH 6.5 et 7.4 en présence de Zn(II) (courbe noire), une augmentation très rapide de la fluorescence de la ThT est observée ainsi qu'une phase de nucléation courte (cf Fig. IV-4 encadré), $t_{1/2}$ =1h et 3h à pH 6.5 et 7.4 respectivement. De même, la cinétique d'élongation est très rapide. La nature de ces tampons ne semble donc pas idéales pour étudier les différentes phases de l'agrégation en particulier à pH 6.5.

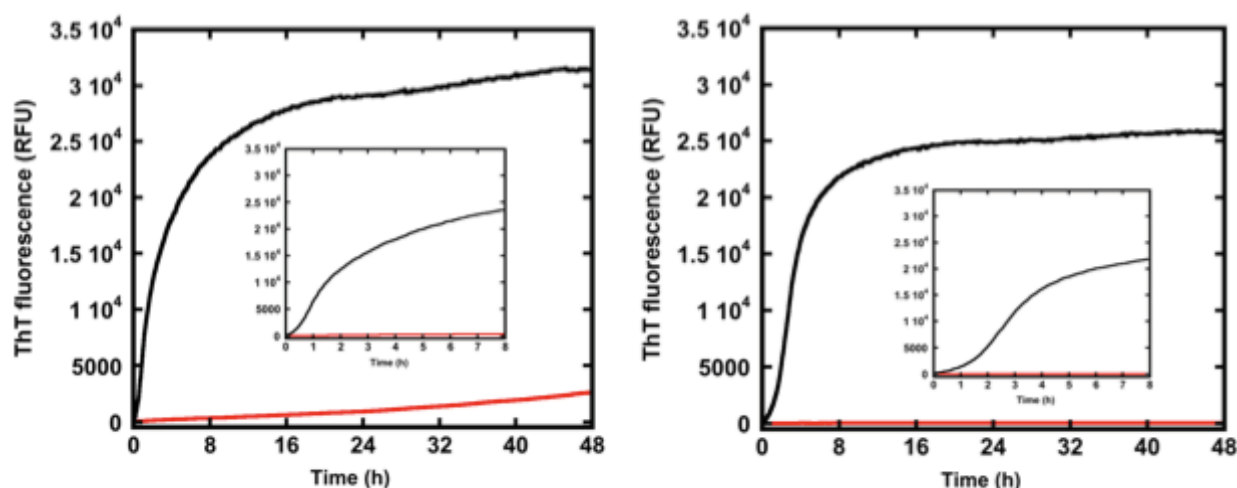


Figure IV-4: Fluorescence de la ThT au cours du temps du peptide A β 28 dans 100 mM de Tampon Pipes, pH 6.5 (à gauche) ou 100 mM de Tampon Hepes, pH 7.4 (à droite) avec (noir) et sans (rouge) Zn(II) entre 0 et 48h. L'intensité de fluorescence entre 0 et 8h est également représentée indiquant une phase de nucléation très rapide. Conditions expérimentales: [A β 28]=500 μ M, [Zn(II)]= 250 μ M et [ThT]=10 μ M, T=25°C

IV-A-5 Effet de la nature du tampon et de sa concentration sur l'agrégation du peptide A β 28

Dans le chapitre I, nous avons vu que le Zn(II) favorise l'agrégation du peptide A β . Afin de pouvoir étudier son effet sur l'agrégation, il est nécessaire d'utiliser un tampon approprié. En effet, certains tampons (comme le TRIS) sont coordinants vis-à-vis des ions métalliques ^[20]. Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet du tampon et de sa concentration.

Dans le paragraphe précédent, nous avons établi que la cinétique d'agrégation est dépendante du pH et que le pH 7.4 nous permet de mieux différencier les phases de ce processus. Nous avons donc étudié l'effet des tampons Hepes et Phosphate à pH 7,4 (Fig. IV-5). Lors de cette étude 0.5 équivalent de Zn(II) sont utilisés pour déclencher l'agrégation.

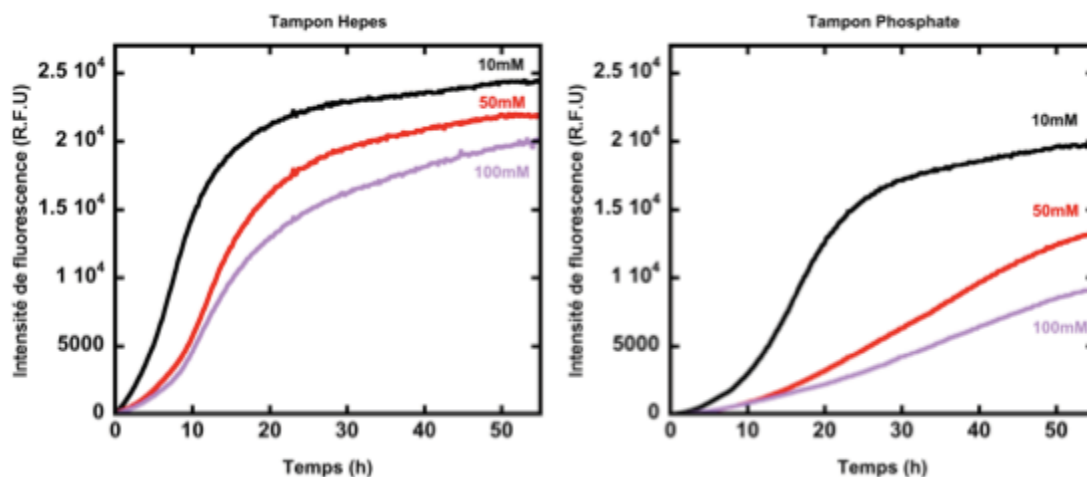


Figure IV-5: Suivi de fluorescence de la ThT au cours du temps en fonction du tampon et de sa concentration. Conditions expérimentales: [A β 28]=500 μ M, [Zn(II)]=250 μ M, [ThT]=10 μ M dans 10, 50 ou 100mM de tampon Hepes (à gauche) ou Phosphate (à droite) à pH 7,4, T=25°C.

Dans le tampon Hepes, la cinétique d'agrégation démarre instantanément quelle que soit la concentration en tampon avec une étape de nucléation très courte, ce qui n'est pas le cas le tampon Phosphate où l'étape de nucléation est beaucoup plus lente. L'allure des courbes est très proche de la sigmoïde théorique attendue dans le tampon Hepes et 10 mM de tampon Phosphate. Par ailleurs, plus la concentration en tampon est élevée et plus le $t_{1/2}$ est grand quel que soit le tampon. De façon générale, pour une concentration en tampon donnée, la cinétique d'agrégation est plus lente dans le tampon Phosphate que dans le tampon Hepes. Enfin, pour les cinétiques d'agrégation dans 50 ou 100 mM de tampon Phosphate, l'allure de la courbe s'éloigne de la sigmoïde théorique dans notre intervalle de temps.

La différence de comportement entre les deux tampons provient probablement du pouvoir coordinant des tampons. Les tampons sont des compétiteurs vis-à-vis du peptide dans la coordination du Zn(II). Le tampon Phosphate est connu pour lier le Zn(II) et entraîner sa précipitation. Par contre, l'affinité du Zn(II) pour le tampon Hepes est considérée comme très faible. En conséquence, la quantité de Zn(II) disponible pour se lier au peptide A β est plus faible dans le cas du tampon Phosphate (à concentration égale). Ceci est renforcé par le fait que l'augmentation de la concentration en tampon a le même effet que la diminution de la

concentration en Zn(II) sur la cinétique d'agrégation (cf Fig. IV-9, p. 128). Il est également possible qu'une précipitation du complexe Zn(II)-phosphate soit observée à des concentrations élevées en tampon Phosphate, ce qui entrainerait une libération plus lente et prolongée ^[21] du Zn(II) dans le tampon Phosphate.

Malgré une interférence plus importante du tampon phosphate que du tampon Hepes c'est ce tampon qui a été choisi (notamment pour utiliser le même tampon que pour les études RMN). Cependant, il a été utilisé à une concentration faible pour minimiser son pouvoir coordinant, concentration qui par ailleurs est la concentration physiologique. Donc, toutes les études de cinétiques d'agrégation présentées par la suite seront réalisées dans 10 mM de tampon Phosphate à pH 7,4.

IV-A-6 Effet de la température sur l'agrégation du peptide A β 28

La cinétique d'agrégation du peptide A β et d'autres peptides amyloïdogéniques dépend de la température. Nous avons donc mesuré la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 à 25°C et 37°C afin d'évaluer à quel point la température influence le $t_{1/2}$, *i.e* la vitesse d'agrégation. Le pH dépend de la température mais dans ce cas, le changement de pH (± 0.2 unité pH) est négligeable, seul l'effet de la température est mesuré.

La figure IV-6 indique clairement que la vitesse d'agrégation (y compris la phase d'élongation) augmente avec la température. A 25°C, le $t_{1/2}$ est de 14h, $\Delta=15$ h et passe à $t_{1/2}=5$ h et $\Delta=11$ h à 37°C. La température influence donc fortement la vitesse d'agrégation du peptide A β 28. Ces données sont en accord avec les résultats précédemment obtenus par Kusumoto *et al* ^[22].

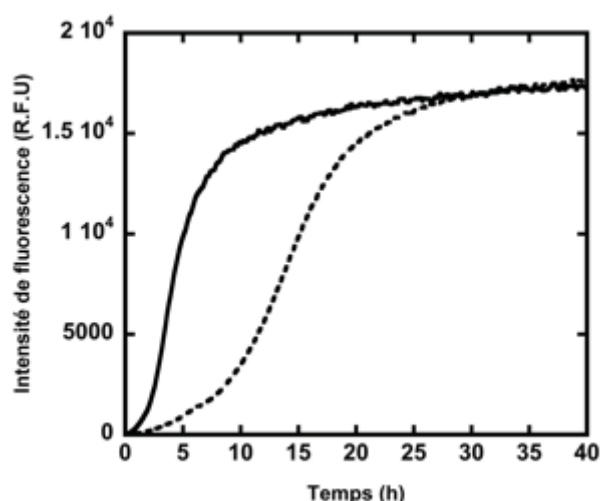


Figure IV-6: Fluorescence de la ThT au cours du temps du peptide A β 28 à 25°C (ligne pointillée) ou 37°C (ligne pleine). Conditions expérimentales: [A β 28]=500 μ M, [Zn(II)]= 250 μ M, [ThT]=10 μ M dans 10mM de tampon Phosphate, T=25 ou 37°C.

A 37°C, l'étape de nucléation est très courte. Il est important de noter que l'intensité de fluorescence au plateau est la même. Nous avons vu dans le paragraphe IV-A-3 (p. 119) que l'intensité de fluorescence dépend de la concentration en peptide si la concentration en ThT n'est pas limitante. Dans les conditions de concentrations utilisées ici, la totalité de la ThT est intercalée dans les fibres et la température ne modifie pas la quantité de ThT intercalée mais la vitesse avec laquelle elle s'incorpore dans les fibres.

La cinétique d'agrégation à 25°C permet de mieux différencier les trois phases de la cinétique d'agrégation comparativement à la cinétique à 37°C. Les études présentées dans la suite de ce chapitre ont été réalisées à 25°C.

IV-A-7 Effet de l'agitation sur l'agrégation du peptide A β 28

L'effet de l'agitation a également été évaluée. L'hypothèse est que l'agitation va favoriser les contacts intermoléculaires pour les fibres relativement longues qui diffusent lentement ou sédimentent. Ceci pourrait se traduire par une cinétique d'agrégation plus rapide. La figure IV-7 représente les cinétiques d'agrégation du peptide sans (courbe pointillée) et avec agitation avant chaque mesure d'intensité de fluorescence (courbe rouge).

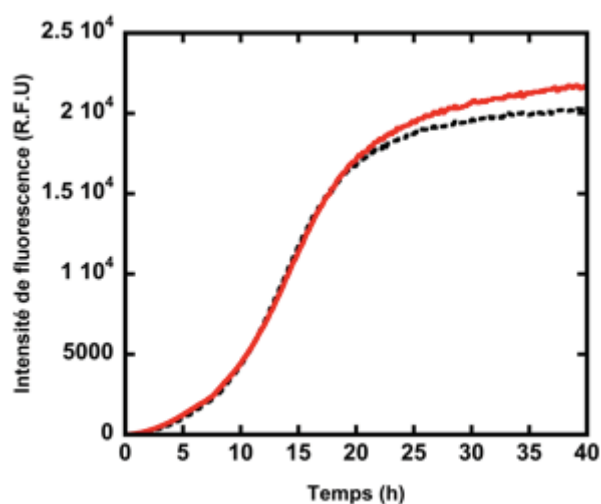


Figure IV-7 : Fluorescence de la ThT au cours du temps du peptide A β 28 sans (courbe noire) et avec agitation (courbe rouge) entre chaque point. Conditions expérimentales: [A β 28]=500 μ M, [Zn(II)]= 250 μ M, [ThT]=10 μ M dans 10mM de tampon Phosphate pH 7,4, T=25°

Les courbes obtenues sont superposables indiquant que l'agitation dans le fluorimètre n'est pas suffisante pour avoir un effet sur la cinétique d'agrégation. Il semblerait que l'agitation favorise la formation de fibres. En effet, il y a une légère augmentation de l'intensité de fluorescence au plateau dans le cas de l'expérience avec agitation comparativement à celle obtenue sans agitation. Cependant, cette différence d'intensité étant inférieure à 5%, elle peut être attribuée à l'erreur expérimentale. L'effet de l'agitation sur la quantité de fibres formées n'est donc pas directement mesurable par spectroscopie de fluorescence.

Lors des expériences RMN, le tube est statique. Afin de rester dans les mêmes conditions et ne pas introduire d'artefact dû à l'agitation de la plaque, toutes les études ont été réalisées sans agitation.

IV-A-8 Importance de l'interface air-liquide

Le peptide A β est amphiphile de par la présence d'un domaine hydrophile (partie N-terminale) et d'un segment hydrophobe (partie C-terminale). Le peptide A β est soluble dans l'eau sous forme non-structurée [23,24]. Par ailleurs, un milieu riche en lipides comme les membranes cellulaires accélère le processus d'agrégation [25-27].

L'interface entre les membranes cellulaires et le milieu extracellulaire peut être modélisée par l'interface air/liquide et il est documenté que cette interface influence l'agrégation [26,28]. Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si la surface d'adsorption de l'interface air/liquide influence la cinétique d'agrégation. Cette surface dépend du type de plaque utilisée pour la mesure soit 96 soit 384 puits.

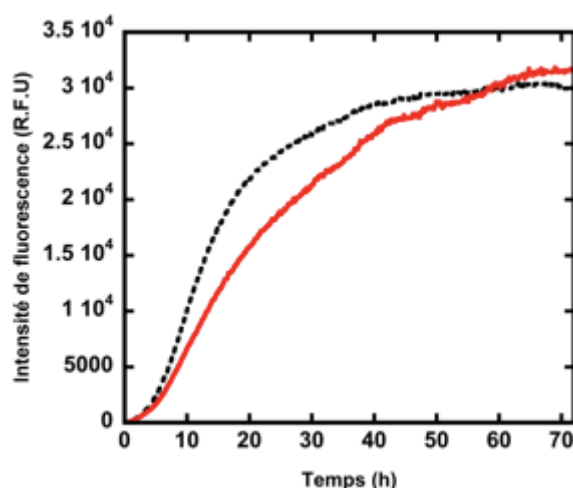


Figure IV-8: Fluorescence de la ThT en fonction du temps du peptide A β 28 dans la plaque 96 puits (courbe noire) et 384 puits (courbe rouge). Conditions expérimentales: [A β 28]=500 μ M, [Zn(II)]= 250 μ M, [ThT]=10 μ M dans 10mM de tampon Phosphate pH 7,4, T=25°

Pour un même volume d'échantillon (100 μ L), la courbe pointillée noire de la figure IV-8 représente la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 dans une plaque 96 puits (surface du puit ~ 38 mm²) et la courbe rouge la même cinétique dans une plaque 384 puits (surface du puit ~ 11 mm²). La mesure du $t_{1/2}$ indique 13h pour la cinétique dans la plaque 96 puits contre 20h pour la plaque 384 puits. L'intensité de fluorescence au plateau ne semble pas être affectée par la différence de surface entre les deux plaques. Il faut noter que la surface de contact avec le puit est également modifiée entre les deux types de plaques ce qui peut influencer la cinétique d'agrégation.

Lors des études sur l'effet du Zn(II) et de la ThT sur la cinétique d'agrégation, nous avons principalement utilisé des plaques 96 puits.

Conclusions :

D'après ces différentes expériences, nous avons pu établir les conditions expérimentales adaptées pour étudier les trois phases de l'agrégation du peptide A β 28 et ainsi essayer de caractériser les espèces intermédiaires formées au cours de ce processus en RMN ^1H :

- $500\mu\text{M}$ en peptide A β 28 au préalable traité à haut pH afin de le monomériser.
- 10mM en tampon phosphate. Le tampon phosphate ne donne pas de signal en RMN et permet une cinétique assez lente ce qui va faciliter son étude par RMN.
- $\text{pH } 7.4$ qui permet de mieux contrôler l'agrégation, le peptide seul n'agrègeant pas sans la présence d'un déclencheur (comme le Zn(II)). En outre, ce pH correspond aux conditions physiologiques.
- $T=25^\circ\text{C}$ qui permet une cinétique d'agrégation assez lente.

III-B Agrégation du peptide A β 28 en présence de Zn(II)

D'un point de vue structural, l'agrégation du peptide A β 28 correspond au passage d'un monomère non-structuré ou « random coil » à des espèces fibrillaires structurées en feuillets- β . Ce changement de structure va avoir des conséquences sur la fluorescence de la ThT (comme vu précédemment) mais également sur l'allure des spectres RMN ^1H du peptide. Dans cette troisième partie, nous allons étudier l'effet du Zn(II) sur l'agrégation du peptide A β 28 par spectroscopie de fluorescence et également par spectroscopie RMN ^1H .

IV-B-1 Suivi d'agrégation par spectroscopie de fluorescence de la ThT

Le Zn(II) est retrouvé en quantité importante dans les plaques amyloïdes ^[29]. Il a été établi qu'il favorise l'agrégation. Il est souvent considéré comme un déclencheur ^[6,7]. L'agrégation du peptide A β 28 (500 μM), en présence de quantités croissantes de Zn(II) (0 à 500 μM) a été mesurée par fluorescence de la ThT (10 μM) dans 10 mM de tampon phosphate pH 7.4 (Fig.IV-9, panneau de gauche).

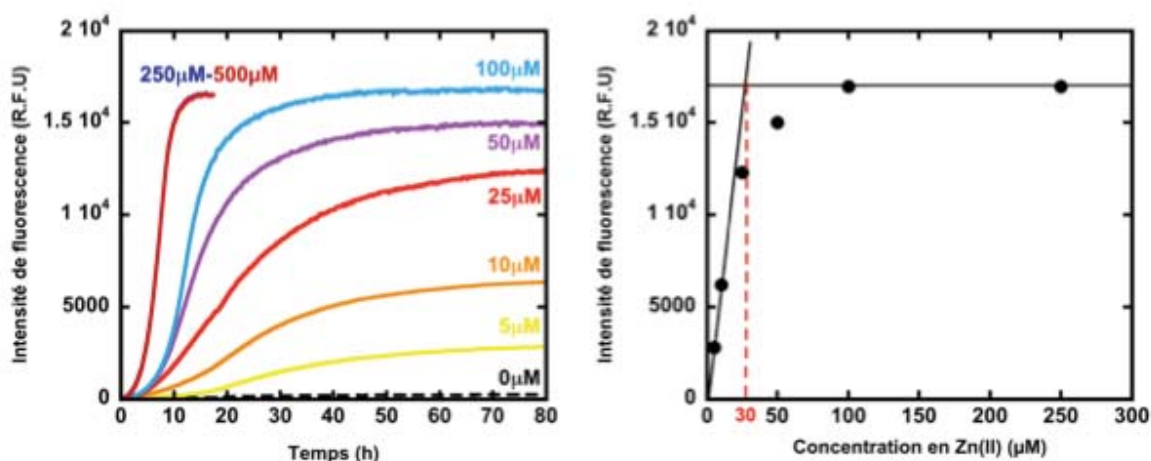


Figure IV-9: Fluorescence de la ThT au cours du temps du peptide A β 28 en présence de différentes concentrations en Zn(II) par rapport au peptide (à gauche). L'intensité de fluorescence de la ThT au plateau en fonction de la concentration en Zn(II) est reportée sur la figure de droite.
Conditions expérimentales : [A β 28]= 500 μM , [Tampon Phosphate]=10mM pH 7.4 , [ThT]=10 μM et [Zn(II)]= 0 à 500 μM , T=25°C

En absence de Zn(II), il n'y a pas d'augmentation de fluorescence de la ThT indiquant que le peptide A β 28 n'agrège pas (courbe pointillée noire) sur une période de 80h. En présence de Zn(II), une augmentation de la fluorescence de la ThT est observée au cours du temps, et ce même pour une faible concentration (5 μ M). Le Zn(II) peut donc être considéré comme un déclencheur de l'agrégation. De plus, le Zn(II) est promoteur de l'agrégation : plus la quantité de Zn(II) est importante et plus les phases de nucléation et d'élongation sont rapides comme le montrent les valeurs du $t_{1/2}$ et du Δ (Tableau IV-1).

Concentration en Zn(II) (μM et en nombre d'éq. par rapport au peptide)	5 0.01	10 0.02	25 0.05	50 0.1	100 0.2	250 0.5	500 1
Intensité au plateau	2900	6300	12400	15000	17000	17000	17000
$t_{1/2}$ (h)	29	24	21	15	13	7	7
Δ (h)	45	44	40	27	19	6	6

Tableau IV-1 : Valeurs des $t_{1/2}$ (h), Δ (h) et intensité de fluorescence de la ThT au plateau en fonction de la concentration (ou nombre d'équivalent) en Zn(II).

L'intensité de fluorescence au plateau dépend de la quantité de Zn(II). Jusqu'à 25 μ M (soit 0.05 μ eq/A β) de Zn(II) l'intensité de fluorescence augmente de façon quasi proportionnelle avec la concentration en Zn(II). Au-delà, l'augmentation est moins forte et il semble qu'un plateau soit atteint à partir de 100 μ M. Normalement, l'intensité de fluorescence au plateau est considérée comme proportionnelle à la quantité de fibres amyloïdes formées. Ceci voudrait dire que 100 μ M (0.2 μ eq/A β) de Zn(II) sont suffisant pour former la quantité maximale de fibres amyloïdes (ce qui n'implique pas forcément que la totalité du peptide soit sous forme de fibres). Mais ceci n'est vrai que si la quantité de ThT n'est pas limitante ce qui n'est probablement pas le cas dans nos conditions (10 μ M de ThT, 500 μ M de peptide A β 28) En effet, si l'intensité de fluorescence n'augmente plus ce n'est pas le signe que le peptide est entièrement sous forme de fibres mais que la totalité de la ThT est intercalée dans les fibres présentes. Ces données indiqueraient alors qu'à 30 μ M de Zn(II) (cf Fig. IV-9, panneau de droite) la totalité de la ThT présente dans l'échantillon, soit 10 μ M, est intercalée dans les fibres. En d'autres termes au delà de cette concentration, la valeur au plateau est limitée par la quantité de ThT (10 μ M).

Ces résultats ont amené plusieurs questions: la quantité de ThT insérée dans les fibres est-elle dépendante de la quantité de Zn(II) utilisée lors de l'agrégation ? Si oui, quelle est la quantité maximale de ThT qui peut s'insérer dans les fibres ? Est-il alors possible de déterminer le nombre de molécules de ThT par molécules de peptide ? Des éléments de réponse à ces questions seront apportés dans la partie IV-C de ce chapitre.

Afin de confirmer que le Zn(II) déclenche et promeut l'agrégation du peptide A β 28, les échantillons de peptide incubés pendant 24h avec ou sans Zn(II), préparés dans les mêmes conditions que celles utilisées lors du suivi de l'agrégation par spectroscopie de fluorescence, ont été analysés par TEM (Microscopie Electronique à Transmission). En accord avec ce qui a été observé par fluorescence de la ThT, il n'y a pas de formation de fibres sans Zn(II). De même, la présence de Zn(II) entraîne la formation de fibres d'environ 10 nm de diamètre (Fig.IV-10). La présence de fibre corrèle avec l'intensité élevée de fluorescence de ThT. En effet, la ThT possède une bonne affinité pour les fibres amyloïdes, mais interagit peu avec les agrégats amorphes^[30].

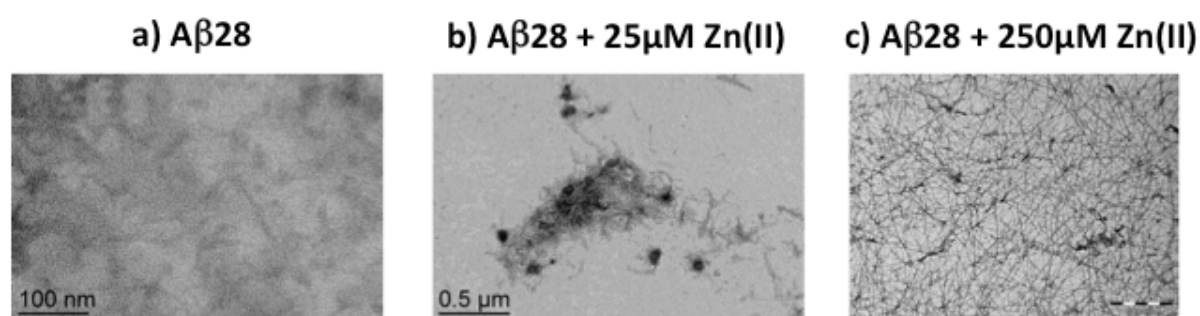


Figure IV-10: Images TEM obtenues après incubation du Zn(II) pendant 24h. Sans Zn(II) (a), il n'y a pas de fibres contrairement à l'image obtenue en présence de 25 μM de Zn(II) (b) ou 250μM de Zn(II) (c). Conditions expérimentales : [A β 28]= 500μM, [Tampon Phosphate]=10mM pH 7.4 , [ThT]=10μM et [Zn(II)]=25 ou 250μM, T=25°C

Les images obtenues par TEM semblent indiquer que la quantité de fibres formées semblent dépendante de la quantité de Zn(II). En effet, la quantité de fibres est plus importante en présence de 250μM de Zn(II) (Fig. IV-10, c) comparativement à la quantité de fibres en présence de 25μM de Zn(II) (Fig. IV-10, b).

Les données obtenues par spectroscopie de fluorescence et TEM indiquent que le Zn(II) permet à la fois de déclencher et de contrôler la cinétique d'agrégation du peptide

A β 28. Cette agrégation conduisant à la formation de fibres amyloïdes. Ceci n'était pas anticipé car l'impact du Zn(II) sur les peptides A β 40/42 conduit très souvent des agrégats amorphes [31]. Il a été proposé que l'effet du Zn(II) dépend de la propension des peptides à agréger. Pour des systèmes ou des conditions avec une forte tendance à l'agrégation, le Zn(II) favorise plutôt la formation d'agrégats amorphes (qui peuvent se transformer en fibres amyloïdes avec le temps) [16,25,32,33]. Par contre pour des systèmes ou conditions avec une faible tendance à l'agrégation, le Zn(II) peut favoriser la formation des fibres amyloïdes [5]. Ceci est en accord avec les résultats trouvés ici, sachant que le peptide A β 28 n'agrège pas sans ajout de Zn(II) (pendant au moins 100h)

De façon à pouvoir caractériser les différents états d'agrégation du peptide A β 28 par RMN ^1H , nous avons choisi de travailler en présence de 500 μM de peptide, 25 μM de Zn(II) et de 10 μM de ThT dans 10 mM de tampon phosphate pH 7.4. En effet, dans ces conditions le $t_{1/2}$ est de 21h (cf Tableau IV-1, p.129) ce qui permet d'avoir suffisamment de temps pour enregistrer des expériences RMN complémentaires dans le but d'avoir le plus d'informations possibles sur les différentes étapes de l'agrégation.

IV-B-2 Agrégation du peptide A β 28 suivie par spectroscopie RMN ^1H

Au cours de l'agrégation du peptide, nous nous attendons à observer plusieurs changements au niveau des spectres RMN, indiquant à la fois un changement de structure et de poids moléculaire du peptide, qui sont : en 1D, une perte de signal du peptide monomérique et/ou un élargissement des pics potentiellement couplés à l'apparition de nouveaux signaux ce qui se traduira sur la carte NOESY (2D) par la disparition et/ou l'apparition de nouvelles taches de corrélations. Ainsi, des spectres 1D et 2D (durée d'accumulation = 17h) ont été enregistrés en alternance sur un même spectromètre RMN (600MHz). Nous avons vu dans le paragraphe IV-B que la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 est très influencée par les conditions expérimentales. Afin d'évaluer l'effet de l'agrégation sur les spectres RMN, les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment c'est-à-dire 500 μM en peptide A β 28, 25 μM en Zn(II), 10 μM en ThT dans 10 mM de tampon phosphate pH 7.4 et T=25°C. De cette façon, les données obtenues par RMN

et fluorescence devraient être directement comparables. Lors des expériences précédentes, nous avons montré que le Zn(II) est un déclencheur et promoteur de l'agrégation du peptide A β 28 en fibres amyloïdes. Dans cette partie du chapitre, l'agrégation est déclenchée par l'ajout de Zn(II) ce qui correspondra au t=0.

IV-B-2-a En version 1D

Les signaux du peptide, en présence de Zn(II) (25 μ M soit 0,05 éq/A β 28), sont intégrés entre 0 et 50h (temps nécessaire pour atteindre le plateau en fluorescence, cf Tableau IV-1, p. 129). La superposition des spectres RMN 1D du peptide au cours du temps (Fig.IV-11) n'indique aucun changement c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'apparition de nouveaux signaux. Cependant, une perte d'intensité de 15% du peptide monomérique est observée sur l'ensemble du spectre RMN sans observer d'élargissement des signaux.

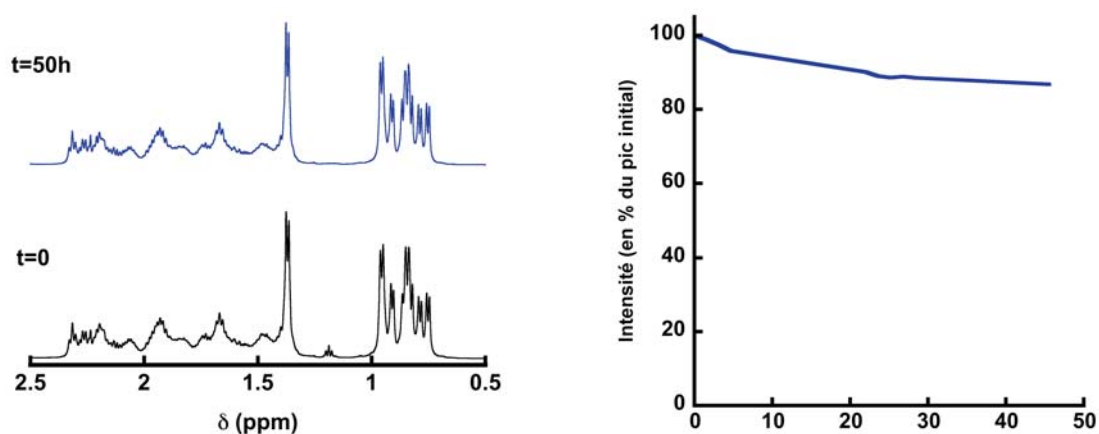


Figure IV-11: Spectre RMN de la zone aliphatique du peptide A β 28 en présence de 0.05 éq. de Zn(II) à t=0 (en noir) et t=50h en bleu (à gauche). Représentation de l'intégration des -CH₃ de l'Ala21 au cours du temps. Conditions expérimentales : [A β 28]=500 μ M, [Tampon Phosphate]=10mM, pH 7.4, [ThT]=10 μ M et [Zn(II)]=25 μ M, T=25°C

L'agrégation du peptide A β est un processus dynamique dans lequel les espèces monomériques, oligomériques et fibrillaires sont en équilibre. Cet équilibre va se traduire sur le spectre RMN ¹H par un élargissement des pics du peptide lié à la proportion d'oligomères (taille > 10 monomères). Ce qui n'est pas le cas ici. Puis au fur et à mesure que la taille des objets supramoléculaires augmente (oligomères de masse moléculaire élevée, proto-fibrilles et

fibres) l'élargissement des signaux est tel qu'une perte de signal est observée (temps de corrélation plus long) ^[34].

Par ailleurs au bout de 50h, aucun précipité n'est observé visuellement au niveau de l'échantillon indiquant que les espèces ont une taille suffisamment importante pour ne plus être détectées par RMN liquide sont faiblement présentes ou qu'elles ont trop petites pour être observées à l'œil nu. Ces résultats sont inattendus. En effet, l'intensité de fluorescence de la ThT atteint le plateau au bout d'environ 50h (cf Fig.IV-9, p. 128) ce qui indique que le processus de formation des fibres est terminé. Or par RMN, il semblerait que l'état d'agrégation du peptide (environ 15%) à t=50h correspond majoritairement à la phase de nucléation du processus d'agrégation.

La perte de signal de 15% (soit 75 μ M) du peptide peut correspondre à la formation de fibres amyloïdes. Il est envisageable que la totalité de la ThT se soit insérée dans les 15% de peptide monomérique qui ont disparu en RMN sous forme de fibres. Si tel était le cas, l'augmentation de fluorescence ThT et la perte de signaux ¹H en RMN suivraient la même cinétique. Une autre possibilité est que l'agrégation soit beaucoup plus lente en RMN. C'est-à-dire que la perte de signal de 15% en RMN ne correspondrait pas seulement à la formation des fibres amyloïdes mais aussi à d'autres espèces (oligomère ou autre).

Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution du peptide, dans le même échantillon, au-delà des 50h d'incubation en présence des 25 μ M de Zn(II) à 25°C (Fig. IV-12). Les spectres ont été enregistrés jusqu'à environ 5,5 jours après l'addition de Zn(II) pour déclencher l'agrégation.

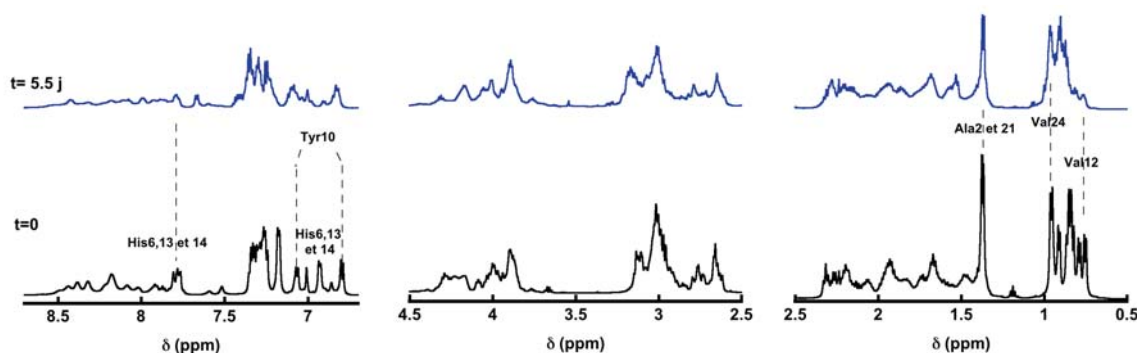


Figure IV-12: Spectre RMN du peptide A β 28 en présence de 25 μ M de Zn(II) à t=0 (noir) et t=5,5 jours (bleu). Conditions expérimentales : [A β 28]=500 μ M, [Tampon Phosphate]=10mM, pH 7.4, [ThT]=10 μ M et [Zn(II)]=25 μ M, T=25°C

Au bout de 5,5 jours, il y a non seulement une perte de signal sur l'ensemble du spectre mais surtout une perte quasi totale de signaux comme la Val12 et les His13 et 14. Il y a également des élargissements accompagnés du recouvrement de certains signaux. Les signaux du peptide monomérique encore identifiables, comme l'Alanine 21 (courbe bleue), ont été intégrés au cours du temps ainsi que le signal de la Val12 (courbe rouge) (Fig. IV-13). L'allure de la courbe bleue (Ala21) indique une cassure à $t \sim 80$ h qui est visible pour les signaux des acides aminés du peptide monomérique encore détecté. Cette cassure est retrouvée à $t=50$ h pour la Val12 (courbe rouge). Concernant le perte de signal sélective (Val12, His13 et 14), il n'y a pas, à l'heure actuelle, d'explication.

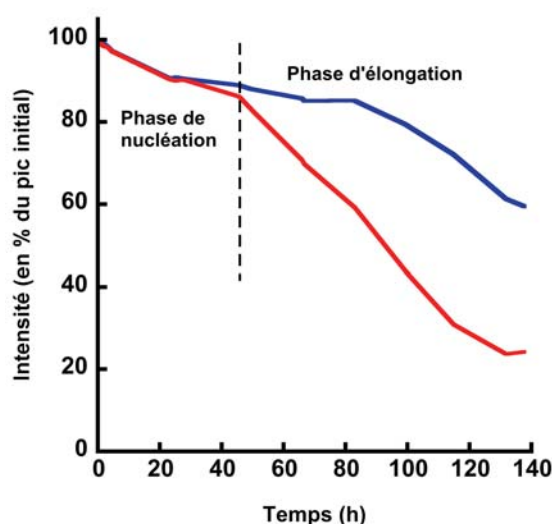


Figure IV-13: Intégration du -CH₃ de l'Alanine 21 (en bleu) et -CH₃ de la Valine 12 (en rouge) au cours du temps.

Conditions expérimentales : [A β 28]=500 μ M, [Tampon Phosphate]=10mM, pH 7.4, [ThT]=10 μ M et [Zn(II)]=25 μ M, T=25°C

Par ailleurs, l'échantillon présente un précipité au niveau de l'interface air-liquide qui reste insoluble après passage à pH~12 ou sonication pendant 10 minutes. Ce précipité est attribué à la formation de fibres. Plusieurs études ont montré que l'interface air-liquide joue un rôle important dans l'agrégation du peptide A β en fibres amyloïdes. En effet, les espèces fibrillaires adsorbent fortement à l'interface air-liquide entraînant ainsi un enrichissement en fibres amyloïdes au niveau de cet interface. Ce phénomène a également été observé par spectroscopie de fluorescence (cf paragraphe IV-A-7, p. 124) où l'interface air-liquide est un facteur influant sur la vitesse d'agrégation.

D'après les données obtenues en RMN 1D, deux phases se distinguent. Une première phase, décrite jusqu'à présent, entre 0 et 50h dans laquelle l'échantillon a un comportement homogène : perte de 15% du signal (75 μ M) et pas de signe de formation d'oligomères. La seconde phase, au-delà de 50h, est plus complexe certainement dû à la présence de plusieurs espèces. En effet, une perte rapide des signaux des His et de la Val12 est observée ainsi qu'une perte plus lente des signaux de l'Ala21 et plus généralement de la partie C-Terminale du peptide. Les changements observés aussi bien sur l'allure des spectres que de l'échantillon en lui-même semblent dus à la formation de fibres : ces dernières sont insolubles et ne sont plus détectées par RMN liquide.

De plus, la figure IV-13 ne montre pas de plateau indiquant la fin de l'agrégation du peptide au bout de 6 jours. Ceci voudrait dire que les cinétiques de formation des fibres amyloïdes suivies par spectroscopie de fluorescence de la ThT et RMN sont complémentaires. En effet, la spectroscopie de fluorescence permet de suivre l'évolution de la ThT et la spectroscopie RMN l'évolution du peptide au cours de l'agrégation. Entre 0 et 50h, l'augmentation de fluorescence de la ThT indique la formation de fibres qui correspondrait à la perte de signal de 15% observée par RMN. A partir de 50h, cela devient plus compliqué : l'intensité de fluorescence n'évolue plus (cf Fig. IV-9, p. 128) et des différences de comportements sont observées par RMN (cf Fig. IV-13, p. 134)

De par l'hétérogénéité de l'échantillon, il est difficile d'analyser les spectres 1D qui ne sont pas assez résolus. Pour avoir plus d'information sur les événements (formation des oligomères, structurés ou pas), des spectres 2D NOESY ont été enregistrés sur le même échantillon.

IV-B-2-b Analyse des cartes NOESY

L'expérience NOESY permet un transfert d'aimantation entre deux noyaux distants de 5Å (au maximum). Cette propriété fait de la NOESY une expérience adaptée pour évaluer les changements de structures qui ont lieu au cours de l'agrégation du peptide A β . Par ailleurs, nous avons vu dans le paragraphe II-B-2 (p. 82), que le signe et l'intensité des taches de corrélations NOE sont sensibles au temps de corrélation τ_c des protons considérés et donc au poids moléculaire. Le peptide en formant des dimères, trimères, etc augmente sa masse

molaire, il est alors important de s'intéresser à l'évolution de l'intensité des taches NOE au cours du temps.

Avant d'analyser plus précisément l'intensité des corrélations NOEs, nous avons recherché sur les spectres 2D d'éventuels indicateurs d'une structuration du peptide amyloïde au cours de la cinétique d'agrégation. Le *chemical shift index* (CSI) est un procédé qui permet d'établir la structure secondaire des protéines basée sur les différences de déplacement chimique par rapport aux déplacements chimiques d'une protéine non-structurée [35]. Cette méthode peut être appliquée, entre autre, aux protons H α d'une protéine. Les règles sont simples : une valeur de +1 est attribuée lorsque le déplacement chimique est plus grand que la valeur spécifique CSI, une valeur de -1 pour un déplacement chimique plus petit et 0 si le déplacement chimique se situe dans la gamme de valeur attendue (± 0.7 ppm). L'analyse des CSI peut permettre de déterminer la topologie des structures secondaires de la protéine. Une hélice α est définie par la présence d'au moins quatre valeurs -1 et le feuillet β est caractérisé par la présence de trois valeurs +1. Dans tous les autres cas, la protéine ne sera pas structurée. Au cours de l'agrégation, le peptide A β passe d'un état non-structuré (random coil = pelote aléatoire) à une structure en feuillet β . Cette structuration peut donc être visible par mesure des CSI. A $t=0$, l'analyse des CSI ne montre pas de structure particulière, les déplacements chimiques du peptide sont dans la gamme de valeurs attendues (CSI=0 sur l'ensemble du peptide), le peptide n'est pas structuré. Pendant l'agrégation du peptide, les CSI ne sont pas modifiés et nous n'avons pas observé l'apparition de NOEs caractéristiques de structures secondaires en particulier de feuillet β , ce qui indiqueraient que le peptide forme des oligomères non-structurés.

Sur le même échantillon que précédemment, des expériences NOESY ont été enregistrées sur ~ 6 jours (en alternance avec les spectres 1D) et les taches de corrélations ont été intégrées au cours du temps (Fig.IV-14).

L'absence de nouveaux signaux en version 1D, entre 0 et 50h, est retrouvée sur la carte 2D NOESY : pas de nouvelles taches de corrélations signe d'un changement structural stable et significatif tel que la transition vers une forme repliée comme le feuillet- β . La valeur des intégrales relatives de taches de corrélations par rapport à l'intégrale du TSP

(étalon interne) sont tracées au cours du temps. L'allure des courbes obtenues nous indique trois comportements différents :

- 1) dans un premier temps une augmentation puis une diminution de l'intensité (courbe violette).
- 2) l'intensité décroît dès le départ (courbe bleue) à des vitesses différentes
- 3) pas de changement de l'intensité au début de la cinétique puis une perte d'intensité (courbe orangée).

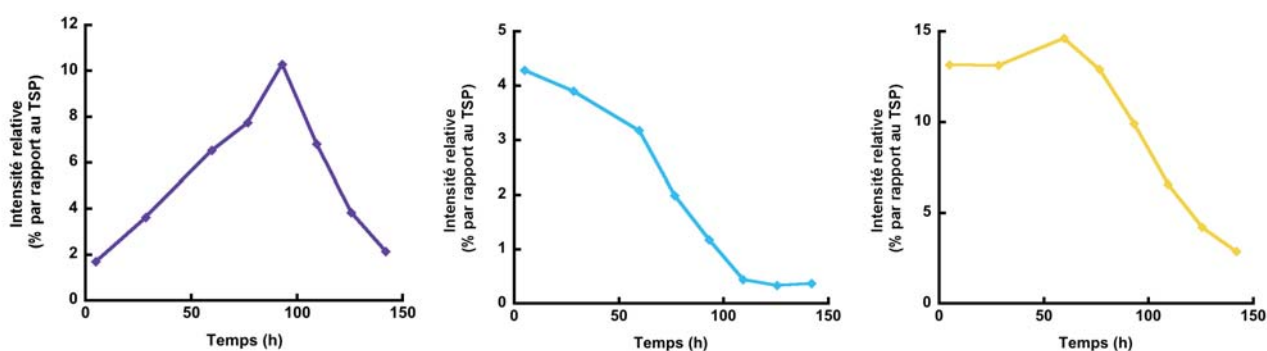


Figure IV-14 Intégration des taches de corrélations NOESY au cours du temps relativement à l'aire du pic du TSP. La courbe violette représente l'évolution de la corrélation H δ /H β , la courbe bleue la corrélation H α /H β et la courbe orangée la corrélation HN/H α de la Phénylalanine 20. Conditions expérimentales : [A β 28]=500 μ M, [Tampon Phosphate]=10mM, pH 7.4, [ThT]=10 μ M et [Zn(II)]=25 μ M, T=25°C

Il est important de noter que ces comportements ne sont pas acide aminé dépendant mais corrélation dépendante. En effet, l'allure de la courbe violette est retrouvée pour les corrélations impliquant des protons en bout de chaîne latérale ou les protons aromatiques comme par exemple les corrélations de type H α /H γ ou H β /H δ . La variation d'intensité des corrélations de type H α /H β est représentée par la courbe bleue tandis que la courbe orangée traduit les changements d'intensité des corrélations de type H $_N$ -H α . Une cartographie du peptide a ainsi pu être établie (Fig. IV-15) reflétant le comportement de chacun des protons du peptide.

Le signe et l'intensité des taches NOE sont fonction de τ_c (cf Fig.II-8, p. 85). Le peptide A β 28 possède un PM~3300 g/mol. Les tâches NOE seront donc de signe négatif ce qui a été confirmé par l'expérience. L'augmentation d'intensité des tâches NOE peut être interprétée comme une augmentation de poids moléculaire. En effet, plus le poids moléculaire

est élevé et plus le temps de corrélation sera long ce qui va se traduire par une intensité du pic NOE plus importante. De plus, le temps de corrélation reflète la dynamique en solution de la molécule. Durant l'agrégation, les corrélations de type H_N-H α ne subissent pas de changement d'intensité car il s'agit des protons du squelette peptidique, ils sont moins dynamiques que les protons des chaînes latérales (courbe orangée). De la même façon, les protons en bout de chaîne latérales sont les plus dynamiques (courbes violette), l'agrégation conduit le peptide à se structurer, ces protons seront alors moins sujets à la dynamique et les corrélations seront plus fortes. Concernant les protons de type H β (courbe bleue), leur diminution d'intensité dès le début de l'agrégation indique qu'ils ont une dynamique propre différente.

La caractérisation des oligomères formés au cours du processus d'agrégation du peptide A β a fait l'objet de nombreuses études^[36-41]. Ces études ont rapporté que les peptides A β 40 et A β 42 forment des oligomères constitués de différentes tailles. Il est proposé entre autre que ces oligomères soient constitués de 2, 4, 6, 12 peptides^[41,42]. Par ailleurs, ces oligomères possèderaient une structure similaire aux fibres c'est-à-dire des feuillets β . Cependant, il n'y a pas de consensus sur l'orientation de ces feuillets : parallèle ou antiparallèle. De plus, les feuillets β peuvent se former entre deux peptides (inter-peptide) ou au sein d'un même peptide (intra-peptide). La caractérisation des espèces oligomériques non-fibrillaires est difficile à cause de leur nature hétérogène (plusieurs espèces en équilibre)^[36]. Des travaux ont apporté quelques informations sur les espèces oligomériques mais les conditions expérimentales utilisées (solvant organique, détergent,...)^[36,39] rendent difficile la comparaison avec les oligomères obtenus en leur absence. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'agrégation est un processus qui dépend énormément des conditions expérimentales. De plus, la vitesse d'agrégation ainsi que la présence de détergents ou TFE vont avoir une influence sur la structure secondaire du peptide (hélice α , feuillets- β parallèles ou anti-parallèles)^[42-44].

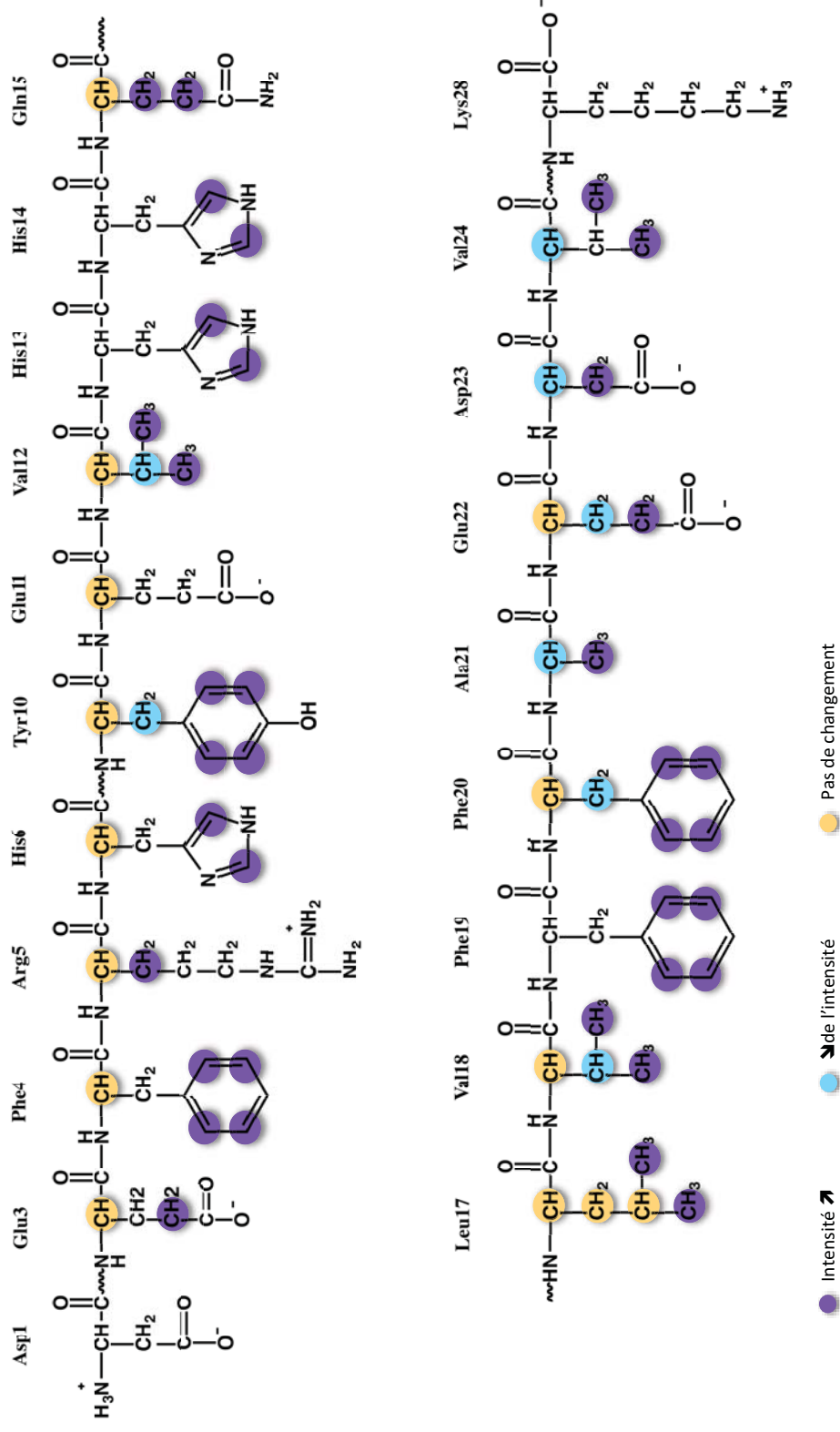


Figure IV-15: Cartographie du peptide Aβ28 reflétant les changements d'intensité des protons des différents acides aminés.

Seule une étude rapporte la caractérisation structurale d'oligomères solubles du peptide A β [40]. Les oligomères ont pu être analysés par RMN et une structure a été proposée (Fig. IV-16) basée sur l'analyse des NOE en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium).

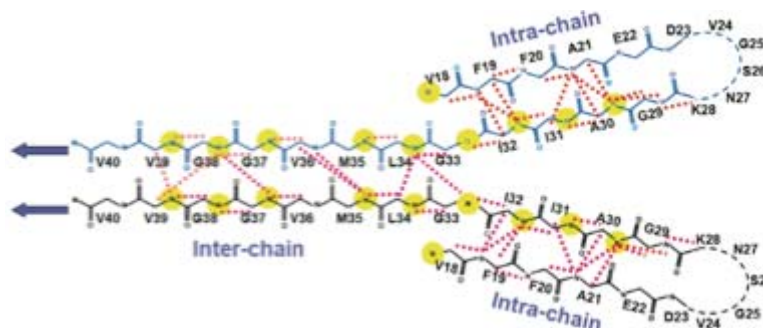


Figure IV-16: Structure proposée des oligomères par Yu *et al* (réf. [40])

Dans ce modèle, les résidus 18 à 23 forment un côté du feuillet β , antiparallèle, reliés aux résidus 28 à 33 du même peptide par une forme en épingle à cheveux. Les résidus 34 à 40 forment un feuillet β parallèle entre deux peptides. Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas de déterminer la taille ni la structure des oligomères formés par le peptide A β 28. L'analyse de l'intensité des taches NOE a montré des changements de dynamique au niveau des acides aminés au cours de l'agrégation reflétant la formation d'oligomères entre 0 et 80h. A partir de $t=50h$, la diminution d'intensité de l'ensemble des taches NOE traduit la formation de fibres. Les peptides A β 40 et A β 42 forment des fibres amyloïdes mais n'agrègent pas de la même façon, c'est-à-dire qu'ils ne vont pas former le même type d'oligomères [45]. Lors de nos études, nous avons travaillé avec le peptide A β 28 qui conduit à des cinétiques d'agrégation plus reproductibles et forment le même type de fibres que les peptides A β 40 et A β 42. Cependant, il est possible que le peptide A β 28 ne forme pas les mêmes oligomères que les peptides A β 40 et A β 42.

IV-B-3 Agrégation du peptide A β 28 caractérisée par

RMN : conclusion

En RMN, l'agrégation du peptide A β 28 est caractérisée par une consommation du peptide monomérique (en 1D) sans signe de la formation de nouvelles espèces. En ^1H -RMN et NOESY on peut distinguer deux phases, une qui se déroule entre 0 – 50h, et une seconde à partir de $t = 50\text{h}$. La deuxième phase semble correspondre à la formation d'agrégats larges (l'intensité des résonances ^1H et des taches de corrélation NOE diminuent de façon générale et on observe la formation d'agrégats visibles à l'œil nu). Il semble raisonnable d'attribuer cette phase à la formation de fibres amyloïdes. Pendant la première phase l'évolution du peptide se traduit par des changements d'intensité des tâches de corrélation NOE qui ne sont pas acides aminé dépendants mais corrélation dépendants : au sein d'un même acide aminé, les différents protons ont un comportement différent. Ces changements d'intensité reflètent les modifications de la dynamique du peptide (τ_c) au cours de la première phase l'agrégation et il est alors possible que cette phase corresponde à la formation d'oligomère.

Un des problèmes est que dans nos conditions (500 μM A β 28, 25 μM Zn et 10 μM de ThT) la concentration de ThT est trop faible pour être détectée, par spectroscopie RMN. Donc pour mieux corréler les spectroscopies RMN et de fluorescence nous avons étudié l'agrégation en présence de quantité plus importante de ThT afin de pouvoir la détecter par RMN. La concentration en Zn(II) a également été modifiée (250 μM vs 25 μM) afin d'augmenter la quantité de fibres formées et la cinétique d'agrégation. De cette façon, il sera possible de suivre à la fois l'évolution de la ThT et du peptide et ainsi essayer de comprendre les différences observées entre la RMN et la spectroscopie de fluorescence. De plus, ces expériences nous permettront de confirmer ou non l'inertie supposée de la ThT sur la cinétique d'agrégation.

IV-C Effet de la ThT sur l'agrégation d'A β 28

La fluorescence de la ThT est la technique spectroscopique la plus utilisée pour étudier l'agrégation du peptide A β . Cependant, le mode d'interaction de ThT avec les fibres reste mal connu. Il est plus largement admis que démontré que la ThT n'interfère pas dans la cinétique d'agrégation du peptide. Les résultats obtenus précédemment (cf § IV-B) nous ont amenés à étudier l'agrégation d'A β 28 en présence de concentration de ThT plus importante afin de la détecter par RMN. Lors de ces études, nous nous sommes intéressés à l'effet de la ThT sur la cinétique d'agrégation : est-elle réellement inerte sur l'agrégation du peptide A β 28. Nous avons donc réalisé une étude de l'effet de la ThT sur la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 en présence de Zn(II) (250 μ M soit 0.5 éq. par rapport au peptide) qui induit la formation de fibres (cf Fig. IV-9, p.128).

IV-C-1 Etude par spectroscopie de fluorescence

La cinétique d'agrégation a été étudiée en présence de quantité croissante de ThT (Fig. IV-17). La fluorescence de la ThT, en présence de fibres, est modifiée par des longueurs d'excitation et d'émission différentes associées à une augmentation importante de son rendement quantique. Une étude de l'influence de la ThT sur la cinétique d'agrégation du peptide par fluorescence est difficile, notamment à cause de la concentration en ThT. En effet, la gamme de concentration utilisable est restreinte : des concentrations trop basses ne permettent pas la détection et des concentrations trop élevées induisent des problèmes d'extinction de fluorescence (quenching) et principalement d'inner filter effect (cf § II-A-2-b, p. 76). De plus, le nombre de site de fixation de ThT par peptide A β 28 sous forme de fibres amyloïdes n'est pas exactement connu.

Comme indiqué sur la figure IV-17, pour une concentration de 20 μ M (bleu clair) en ThT, l'intensité n'est pas deux fois supérieure à celle obtenue avec 10 μ M (bleu foncé). Ces données indiquent que la fluorescence de la ThT est déjà sous-estimée à partir d'une concentration de 20 μ M en ThT.

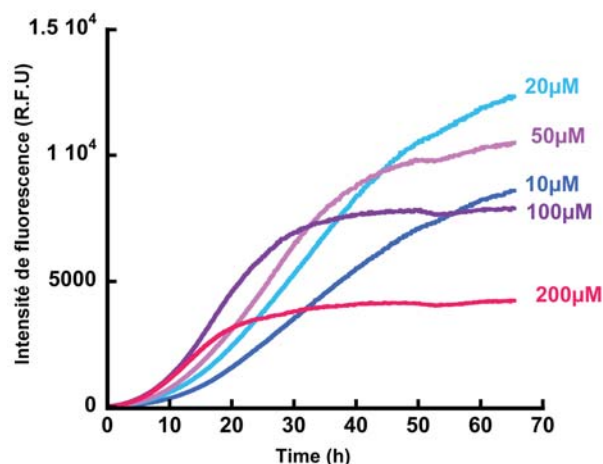


Figure IV-17 : Fluorescence de quantité croissante de ThT au cours du temps du peptide A β 28 Conditions expérimentales : [A β 28]=500µM, [Tampon Phosphate]=10mM, pH 7.4, [ThT]=10 à 200 µM et [Zn(II)]=250µM, T=25°C

Cependant, il semblerait que la ThT catalyse la réaction d'agrégation induite par le Zn(II). Plus la quantité de ThT est importante et plus l'agrégation est rapide (Tableau IV-2) comme le montre la mesure du $t_{1/2}$ et du Δ .

Concentration en ThT (µM)	10	20	50	100	200
Intensité au plateau	9000	12000	10000	8000	4000
t _{1/2} (h)	35	32	26	18	14
Δ (h)	44	38	30	25	20

Tableau IV-2 : Valeurs des $t_{1/2}$ (h), Δ (h) et intensité de fluorescence de la ThT au plateau en fonction de la concentration en ThT.

Ces données semblent être en accord avec une étude récente ^[16]. Ainsi, D'Amico a mesuré l'effet de la ThT sur la cinétique d'agrégation du peptide A β 40 à la fois par fluorescence et par mesure de diffusion de Rayleigh (Rayleigh scattering). Il a ainsi démontré que la ThT est un déclencheur et un promoteur de l'agrégation. Les données obtenues par diffusion de Rayleigh indiquent une formation d'espèces ayant des tailles plus importantes que le monomère. Cependant, ces données ne démontrent pas la formation de fibres

amyloïdes, les objets formés peuvent également correspondre à des agrégats amorphes. De plus, dans son étude par spectroscopie de fluorescence de la ThT, les cinétiques d'agrégation n'ont pas l'allure de la sigmoïde attendue. Il n'a pas non plus tenu compte des interférences en spectroscopie de fluorescence dues à l'utilisation de fortes concentrations de ThT.

IV-C-2 Etude par spectroscopie RMN ^1H

Afin de confirmer et d'avoir plus d'information concernant l'influence de la ThT sur la cinétique d'agrégation, nous avons étudié l'évolution du peptide (Fig.IV-18, panneau de gauche) et de la ThT (Fig. IV-18, panneau de droite) dans des conditions d'agrégation par RMN ^1H c'est-à-dire en présence de Zn(II). L'utilisation de la RMN va permettre de s'affranchir des problèmes liés à l'utilisation de quantité importante de ThT en spectroscopie de fluorescence.

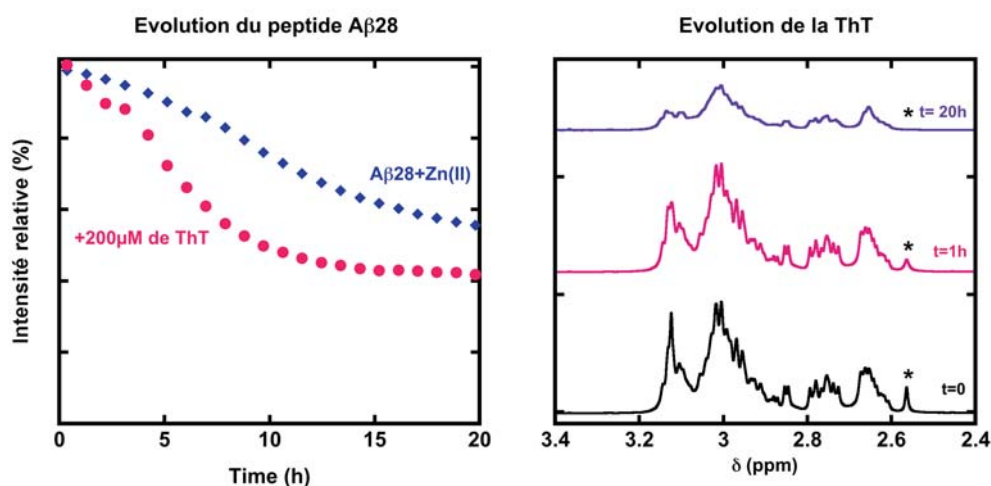


Figure IV-18: Evolution au cours du temps du $-\text{CH}_3$ de la Valine 24 du peptide A β 28 (à gauche) en présence de 0.5 éq. de Zn(II) sans ThT (bleu) et en présence 200 μM (rose) de ThT. Le panneau de droite montre l'élargissement du signal à 2.56 ppm de la ThT (astérisque) à t=0 (noir), t=1h (rose) et t=20h (violet). Conditions expérimentales : [A β 28]=500 μM , [Tampon Phosphate]=10mM, pH 7.4, [ThT]=0, 50 et 200 μM et [Zn(II)]=250 μM , T=25°C.

La figure IV-18, panneau de gauche, indique que la ThT catalyse la réaction d'agrégation du peptide A β 28 induite par le Zn(II). En présence de 250 μM de Zn(II) (soit 0.5 éq/peptide), une consommation de l'ordre de 60% du peptide soit 300 μM est observée à 15h. A t=10h, il y a deux fois plus de peptide qui a réagit avec 200 μM de ThT (ronds roses) comparativement à la cinétique sans ThT (losanges bleus).

Le panneau de droite (Fig. IV-18) représente les spectres RMN du peptide A β 28 en présence de ThT au cours du temps. Ces données montrent un élargissement des signaux de la ThT au cours du temps. Au bout de 20h, l'élargissement est tel que le signal n'est plus détecté. Cet élargissement au cours du temps rend l'intégration du signal difficile et donc la quantification de la ThT insérée dans les fibres impossible.

Afin de savoir s'il y avait bien eu consommation de la ThT et en quelle proportion, nous avons donc réalisé une cinétique d'agrégation suivie par spectroscopie UV-Visible. La ThT seule absorbe à 412 nm et à 450 nm en présence de fibres (cf Fig. II-3, **D**). Lors de cette expérience, nous avons utilisé les conditions expérimentales suivantes : [A β 28]= 500 μ M, [Zn(II)]= 250 μ M, [ThT]= 200 μ M dans 10 mM de tampon phosphate pH 7,4 à 25°C.

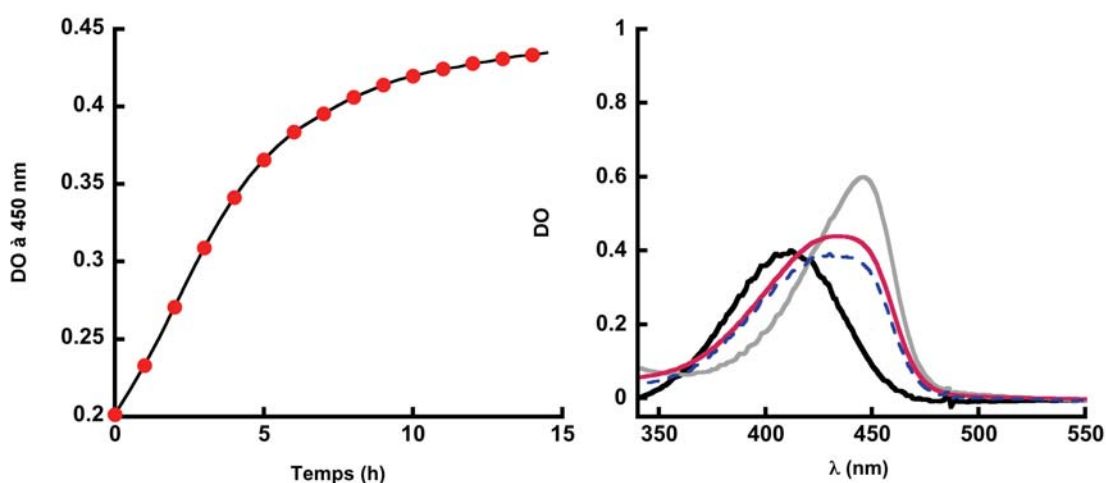


Figure IV-19 : Panneau de gauche, suivi de la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 en présence de Zn(II) et de ThT par spectrophotométrie UV-Visible. Panneau de droite : déconvolution du spectre d'absorbance de la ThT à t=15h (courbe rouge) à partir des spectres d'absorbance de la ThT libre (courbe noire) et ThT liée (courbe grise) à 200 μ M. Le spectre simulé est représenté par la courbe pointillée bleue. Conditions expérimentales : [A β 28]=500 μ M, [Tampon Phosphate]=10mM, pH 7.4, [ThT]= 200 μ M et [Zn(II)]=250 μ M, T=25°C, l=1mm.

La figure IV-19, panneau de gauche, montre l'augmentation de l'absorbance à 450 nm au cours de l'agrégation indiquant que la ThT s'intercale dans les fibres formées. Par combinaison linéaire entre le spectre de la ThT libre (courbe noire) et de la ThT liée (courbe grise), il a été possible de déconvoluer le spectres UV-Visible obtenu à t=15h après le début de l'agrégation (courbe rouge, la courbe pointillée bleue représente le spectre simulé) et ainsi évaluer la proportion de ThT intercalée dans les fibres soit 50%.

IV-C-3 Effet de la ThT sur la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 : conclusion

L'effet de la ThT sur la cinétique d'agrégation est très peu étudié. Les résultats que nous avons obtenus ici indiquent que la ThT n'est pas inerte vis-à-vis de l'agrégation en accélérant les phases de nucléation et d'élongation (Fig. IV-17).

Ceci complète les données obtenues par D'Amico *et al.* ^[16] qui ont montré que la ThT accélère la phase d'élongation du peptide A β 40.

Cette hypothèse reste à confirmer en étudiant la cinétique d'agrégation avec différentes concentrations en ThT par d'autres techniques spectroscopiques comme l'absorbance ou le dichroïsme circulaire ^[46] en parallèle de la fluorescence et de la RMN et si possible sur un même échantillon (pour éviter notamment les effets de bord).

IV-D Conclusion : RMN vs fluorescence dans l'agrégation du peptide A β 28 en présence de ThT

Il est maintenant question de savoir s'il est possible de réconcilier les différentes données obtenues par spectroscopies RMN, UV-Visible et de fluorescence de la ThT. Pour la suite, il est nécessaire de considérer la concentration en ThT réelle qui correspond à 70% de la concentration en ThT théorique calculée d'après la masse molaire (cf Annexe II, p. A-34) et utilisée jusqu'à présent dans le manuscrit.

Nous rappelons d'abord que nous nous sommes placés dans deux situations extrêmes, à savoir, dans le premier cas, $[\text{ThT}]_0 = 140 \mu\text{M}$ et $[\text{Zn(II)}]_0 = 250 \mu\text{M}$ et dans le second $[\text{ThT}]_0 = 7 \mu\text{M}$ et $[\text{Zn(II)}]_0 = 25 \mu\text{M}$, avec une concentration en $[\text{A}\beta 28] = 500 \mu\text{M}$. Il est important de noter ici que la concentration en peptide influe directement sur la quantité de fibres formées. En effet, pour une même quantité de Zn(II) et de ThT ($[\text{Zn(II)}] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{ThT}] = 7 \mu\text{M}$), la formation de fibres, observée par spectroscopie de fluorescence (Fig. IV-20) est beaucoup plus faible pour $[\text{A}\beta 28] = 100 \mu\text{M}$ que $[\text{A}\beta 28] = 500 \mu\text{M}$. Plus précisément, une fluorescence environ 10 fois plus importante est obtenue dans le second cas. C'est pourquoi, nous ne comparons ici que des données obtenues pour une même concentration en A β 28, à savoir $[\text{A}\beta 28] = 500 \mu\text{M}$

Par ailleurs, il faut également noter que la concentration en Zn(II) donnée correspond à la concentration en Zn(II) introduite dans le milieu, ce qui ne correspond pas forcément à la concentration en Zn(II) réellement disponible pour la coordination au peptide. En effet, comme démontré par la figure IV-5 (p. 122), une concentration croissante en tampon phosphate induit une diminution de la quantité de fibres observées par fluorescence à tout autre paramètre fixé. Nous nous sommes donc placés à la concentration la plus faible possible pour maintenir un effet tampon (10 mM). Néanmoins, cela ne garanti pas qu'il n'y ait pas une certaine proportion de Zn(II) coordonnée au tampon même à cette faible concentration.

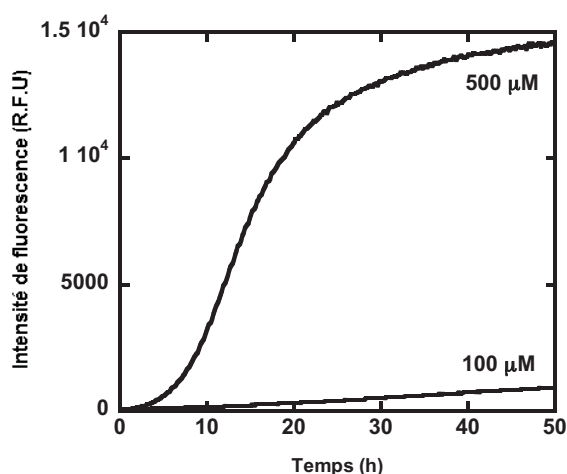


Figure IV-20: Comparaison des cinétiques d'agrégation en présence de 100 et 500 μM de peptide Aβ28 une même quantité de Zn(II), soit 50 μM, et de ThT, soit 7 μM dans 10 mM de tampon phosphate pH 7,4, T=25°C.

Revenons à nos deux conditions expérimentales, forte et faible concentrations conjointement de ThT et de Zn(II). Le premier cas, $[\text{ThT}]_0 = 140 \mu\text{M}$ et $[\text{Zn(II)}]_0 = 250 \mu\text{M}$, est le plus simple à décrire car les concentrations en ThT et en peptides, sous forme fibrillaire, sont suffisamment importantes pour pouvoir supposer que la réaction entre la ThT et les fibres est totale (Fig. IV-22). Dans ce cas, nous avons plusieurs informations:

- La disparition des signaux ^1H du peptide correspond à une quantité de peptide d'environ $300 \mu\text{M}$.
- La disparition des signaux ^1H de la ThT correspond à une quantité de ThT d'environ $70 \mu\text{M}$. Ceci est déterminé par des spectres UV-Visible où l'incorporation de la ThT dans les fibres correspond, après déconvolution, à environ $70 \mu\text{M}$ de ThT insérée ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, $\epsilon = 51000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ [47]) et $70 \mu\text{M}$ de ThT libre ($\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$, $\epsilon = 33000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) (cf Fig. IV-19, panneau de droite).

Nous pouvons donc déduire qu'en présence de $250 \mu\text{M}$ de Zn et $500 \mu\text{M}$ de peptide Aβ28 monomérique, on forme environ $300 \mu\text{M}$ de peptide sous forme de fibres (Aβ28_{fibrilles}). Dans ces $300 \mu\text{M}$ de Aβ28_{fibrilles}, il est possible d'insérer environ $70 \mu\text{M}$ de ThT. Il faut donc environ 4 peptides pour former un site de liaison de la ThT. Cette valeur est conforme aux données proposées dans la littérature : pour 1 site de liaison de la ThT il faut 5 peptides [48,49].

Par ailleurs, lors de cette première étude, un effet cinétique de la ThT sur l'agrégation a été observé par spectroscopie RMN et de fluorescence. En effet, en présence de 140 μM de ThT la disparition des signaux ^1H du peptide est beaucoup plus rapide (Fig. IV-18, $t_{1/2} = 6\text{h}$ versus 12h, p. 144). Par contre, on note que la quantité de peptide dont les signaux ont disparu tend vers une même valeur (approximativement. 300 μM). La ThT ne semble donc pas influencer la quantité de fibres formées.

Par fluorescence (Fig. IV-17, p. 143), la même tendance est observée avec une diminution du temps de nucléation ($t_{1/2}$) et d'élongation (Δ). Il faut noter que, bien que les données ne soient pas directement quantifiables, du fait de la présence de l'inner filter effect (cf. § II-A-2-b, p. 76), la tendance observée est qualitativement correcte. Afin d'illustrer ce propos, des calculs ont été effectués avec les données de la figure IV-17 (p. 143) pour les courbes à 7 μM (soit la concentration théorique de 10 μM) et 140 μM (soit la concentration théorique de 200 μM) en ThT. Dans un premier temps, les courbes expérimentales sont reproduites avec les paramètres suivants : $t_{1/2} = 33\text{ h}$ et $k = 0.095\text{ h}^{-1}$ (soit $\Delta = 46\text{ h}$) pour $[\text{ThT}] = 7\text{ }\mu\text{M}$ et $t_{1/2} = 14\text{ h}$ et $k = 0.25\text{ h}^{-1}$ (soit $\Delta = 18\text{ h}$) pour $[\text{ThT}] = 140\text{ }\mu\text{M}$ (Fig. IV-22, panneau de gauche). Dans un second temps, pour tenir compte l'inner-filter effect, la courbe théorique attendue pour $[\text{ThT}] = 140\text{ }\mu\text{M}$ est calculée en corrigeant l'inner filter effect.

Pour cela, sachant qu'à 140 μM de ThT, on a inséré 70 μM de ThT dans les fibres, et supposant que l'inner filter effect est négligeable à $[\text{ThT}] = 7\text{ }\mu\text{M}$, une intensité de fluorescence au plateau 10 fois plus grande à 140 μM qu'à 7 μM en ThT est attendue. C'est ce qui est tracé sur la figure IV-21, panneau de droite. Dans ce cas, les paramètres permettant de reproduire la courbe théorique sont: $t_{1/2} = 20,5\text{ h}$ et $k = 0.3\text{ h}^{-1}$ (soit $\Delta = 15\text{ h}$) pour $[\text{ThT}] = 140\text{ }\mu\text{M}$.

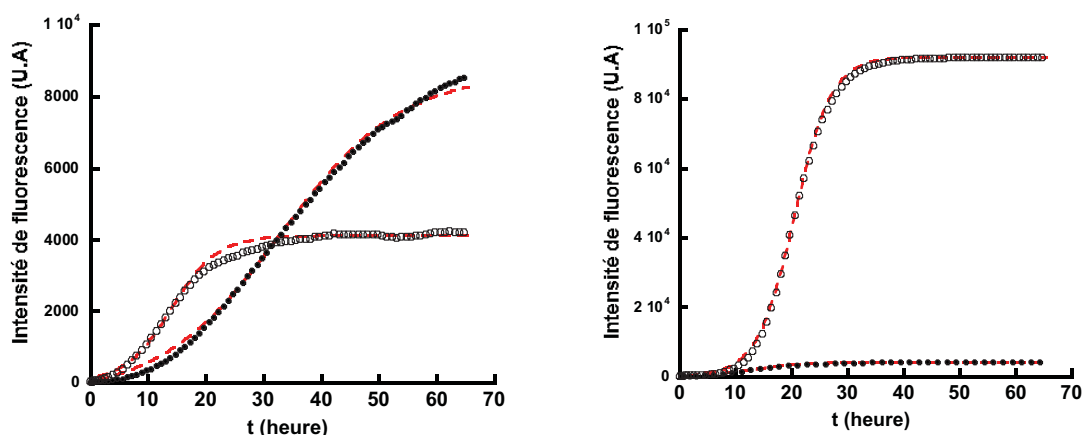


Figure IV-21 : Gauche: reproduction des données de fluorescence de la ThT, pour $[\text{A}\beta 28] = 500\mu\text{M}$, $[\text{Zn}] = 250\text{ }\mu\text{M}$ (points expérimentaux: ronds noirs, $[\text{ThT}] = 7\text{ }\mu\text{M}$, ronds pleins ou 140 μM , ronds vides; courbes théoriques : lignes pointillées rouge).

Droite: reproduction des données de fluorescence de la ThT, pour $[\text{A}\beta 28] = 500\text{ }\mu\text{M}$, $[\text{Zn}] = 250\text{ }\mu\text{M}$, $[\text{ThT}] = 140\text{ }\mu\text{M}$ (points expérimentaux: ronds noirs pleins, points théoriques en corrigeant l'inner filter effect: ronds vides; courbes théoriques : lignes pointillées rouge).

Néanmoins, les $t_{1/2}$ déterminés par spectroscopie RMN (~5h d'après la figure IV-18, p. 144) et de fluorescence (~14h d'après le tableau IV-2, p. 143) sont différents, ce qui est probablement dû aux conditions expérimentales qui sont différentes (tube RMN versus puit de la plaque utilisée lors des expériences par fluorescence).

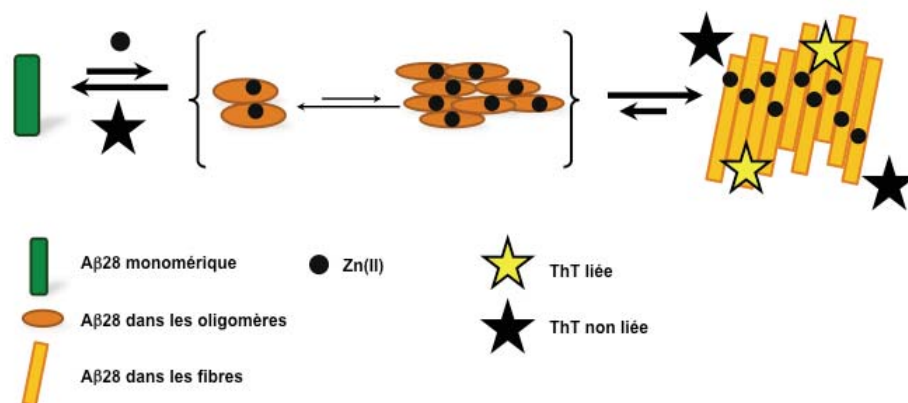


Figure IV-22: Schéma illustrant le mécanisme d'agrégation en présence de 250 μ M de Zn(II) et 140 μ M de ThT.

Nous venons donc de voir que lorsque la concentration en Zn est importante, la formation de fibres (holo-fibres) l'est également. Que se passe-t-il lorsque l'on diminue la concentration en Zn et de ThT?

Dans les conditions utilisées ici ($[ThT]_0 = 7 \mu M$, $[Zn(II)]_0 = 25 \mu M$ et $[A\beta 28] = 500 \mu M$), il est attendu que le Zn catalyse la formation de fibres d'apo-A β 28 (apo-fibres), c'est-à-dire qu'une faible stoechiométrie de Zn serait capable d'induire l'agrégation d'un grand nombre d'apo-peptide, ce qui a déjà été observé pour le peptide A β 11-28 [7]. Dans notre étude, les informations à notre disposition conduisent à proposer un autre mécanisme (Fig. IV-23) où le Zn(II) ne joue pas le rôle de catalyseur, mais est juste capable d'induire l'agrégation d'un peptide par ion Zn(II) ajouté :

(i) La disparition des signaux 1H du peptide correspond à une très faible quantité de peptide (maximum 75 μ M) (Fig. IV-11, 132).

(ii) La concentration de fibres formées est d'environ 30 μ M (établie à partir du ratio ThT :peptide de 0,25 déterminé dans le cas d'une forte concentration en ThT et en Zn(II)) ce qui correspond à la concentration de Zn(II) introduite (Fig. IV-9, panneau de droite, p. 128). Une première conclusion est donc que, dans nos conditions, la formation d'holo-fibres se fait

dans une stoechiométrie d'environ 1:1 (Zn(II):A β 28) et ne déclenche pas la formation d'apo-fibres. Ceci est appuyé par microscopie TEM où la quantité de fibres dépend de la concentration en Zn(II) introduite (Fig. IV-10, p. 130). Par spectroscopie de fluorescence le $t_{1/2}$ de la formation d'holo-fibres est évalué à 24h (Fig. IV-9, p. 128). Aux concentrations de ThT et de fibres formées, la ThT n'est pas limitante, et l'inner-filter effect négligeable, la valeur du $t_{1/2}$ déterminée par fluorescence est donc correcte. Cette voie est représentée sur la partie basse de la figure IV-23. Dans ce cas, il faut remarquer que toute la ThT introduite n'est pas insérée dans les fibres (Fig. IV-9, p.128), ce qui signifie que les concentrations en ThT et fibres sont dans l'ordre de grandeur de la constante de dissociation (donc cette constante peut être estimée autour de $\sim 10 \mu\text{M}$).

(iii) Par spectroscopie RMN 2D on observe une modification de l'intensité des taches NOEs du peptide au cours des 50 premières heures, puis la disparition de ces taches. Une interprétation possible est la formation de petits oligomères ($t < 50\text{h}$) puis la formation de fibres non détectables. Une possibilité qui est représenté sur la partie haute de la figure IV-23, est que les petits oligomères viennent allonger les fibres déjà formées grâce au Zn(II) (holo-fibres) (voie 1, Fig. IV-23) ou agrège d'une façon indépendante (formation d'apo-fibres séparées des holo-fibres, voie 2, Fig. IV-23).

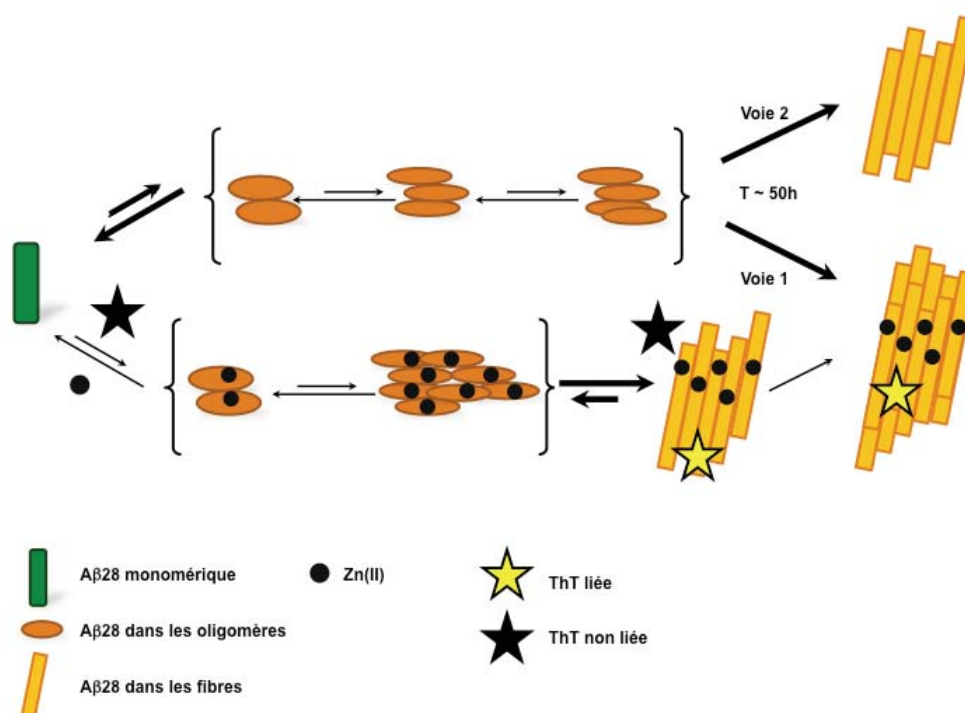


Figure IV-23: Schéma illustrant les différents mécanismes d'agrégation qui ont lieu en présence de $25\mu\text{M}$ de Zn(II) et $7 \mu\text{M}$ de ThT.

Quelles sont les informations obtenues lors ces études ?

- (i) A une concentration initiale en peptide A β 28 monomérique de 500 μ M, il est observé pour deux concentrations très différentes en Zn(II), à savoir 25 μ M ou 250 μ M, la formation d'une quantité stœchiométrique de fibres par rapport au Zn(II).
- (ii) La liaison de la ThT nécessite environ 4 peptides, soit un nombre de site de 0,25, en accord avec ce qui est observé pour d'autres peptides A β ^[48,49].
- (iii) La concentration en ThT influence la cinétique d'agrégation, avec une accélération des phases de nucléation et d'élongation. L'obtention de paramètres cinétiques nécessitera une étude en RMN en fonction de la concentration en ThT et l'analyse des données de fluorescence en tenant compte de l'inner-filter effect.

Quels sont les enseignements à tirer de ces études ?

Le premier et le plus important enseignement qui ressort de ces différentes études est la complexité à obtenir des indications quantitatives sur les cinétiques d'agrégation par spectroscopie de fluorescence de la ThT. Ces difficultés sont intrinsèquement liées à la technique elle-même. En effet, pour pouvoir relier l'intensité de fluorescence à la quantité de fibres formées, il faut:

- (i) que la quantité de ThT introduite ne soit pas limitante. Pour cela, il y a deux possibilités. Soit, on se trouve dans des gammes de concentrations qui conduisent à une réaction équilibrée entre la ThT et les fibres (ici, conditions $[ThT]_0 = 7 \mu M$, $[Zn(II)]_0 = 25 \mu M$, $[A\beta 28] = 500 \mu M$), soit on se trouve dans le cas où la réaction est totale (ici, conditions $[ThT]_0 = 140 \mu M$, $[Zn(II)]_0 = 250 \mu M$, $[A\beta 28] = 500 \mu M$) et il faut alors se placer en léger excès de ThT par rapport à la concentration en sites. Dans ce dernier cas, la concentration en ThT nécessaire conduit alors à un fort inner-filter effect, dont il faut tenir compte.
- (ii) Une conséquence directe de (i) est qu'il faut connaître le nombre de site de liaison de la ThT au peptide et la constante de dissociation, paramètres qui sont en général ceux que l'on cherche à déterminer..... Ceci est particulièrement illustré par l'interprétation de la figure IV-3 qui est de nouveau représentée ici pour plus de clarté.

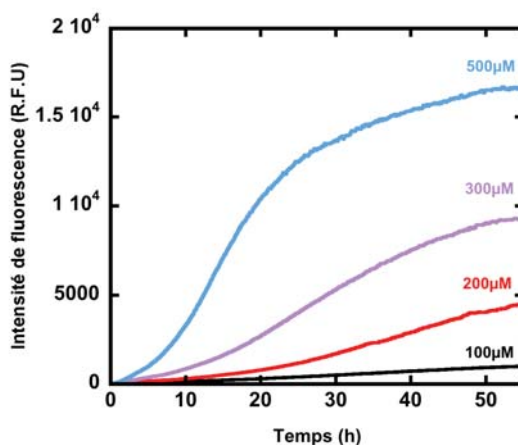


Figure IV-3: Fluorescence de la ThT en fonction de la concentration en peptide A β 28. Conditions expérimentales: [A β 28]=100 à 500 μ M, [Zn(II)]=0.5 μ eq/peptide, [ThT]=10 μ M dans 10mM de tampon Phosphate pH 7.4, T=25°C

En tenant compte des différentes informations obtenues lors de nos études à savoir :

- l'intercalation d'une ThT pour 4 peptides (en condition non limitante de ThT)
- un Kd de l'ordre de 10 μ M
- une quantité stoechiométrique de fibres formées par rapport au Zn(II) introduit (à 500 μ M de peptide),

des intensités de fluorescence au plateau similaires (à 100 μ M de peptide et 50 μ M de Zn(II), la formation de 50 μ M de fibres permettrait d'incorporer les 7 μ M de ThT) sont attendues, ce qui n'est pas le cas.

Le paramètre principal permettant d'expliquer l'allure de ces courbes est le changement de concentration en peptide qui a plusieurs conséquences :

- 1) Une conséquence directe est que la quantité de fibres ne dépend pas linéairement de la quantité de peptide initiale^[50].
- 2) Le ratio peptide/tampon évolue également avec la concentration en peptide puisque la concentration en tampon est constante. Donc la proportion en Zn(II) liée au peptide (qui dépend directement de ce ratio) est modifiée en fonction de la concentration en peptide, avec une proportion plus faible aux basses concentrations. Il est difficile de quantifier la proportion en Zn(II) lié au peptide car la constante d'affinité du phosphate pour le Zn(II) est mal connue.

- 3) Les effets de ces deux paramètres, concentration en peptide et proportion de Zn(II) liée au peptide, s'ajoutent et contribuent à diminuer de façon significative la formation des fibres. On ne peut donc pas extrapoler linéairement les résultats obtenus à 500 μ M de peptide et 250 μ M de Zn(II), à 100 μ M en peptide et 50 μ M de Zn(II) introduit et déduire que l'on forme 50 μ M de fibres dans ces dernières conditions (par exemple mais également valable pour les autres conditions). La quantité de fibres formées est probablement très en deçà de cette valeur (50 μ M), ce qui explique pourquoi l'intensité de fluorescence est plus faible qu'initialement attendue. De plus, la quantité de fibres formées réellement étant faible, la réaction avec la ThT devient équilibrée et l'hypothèse d'insertion de 1 ThT pour 4 peptides devient caduque.

Le second enseignement est donc que pour pouvoir obtenir une description correcte du mécanisme d'agrégation, le recours à d'autres techniques spectroscopiques est indispensable, ce qui inclut la spectroscopie UV-Visible, par laquelle il est possible d'évaluer la quantité de ThT liée et la quantité de ThT libre, et la spectroscopie RMN par laquelle on peut évaluer la quantité de monomère (ou très petit oligomères) et ainsi déduire la quantité de fibres formées (en supposant que tout se transforme en fibres et pas en autre type d'agrégats).

On pourrait alors se demander pourquoi l'usage de la fluorescence de la ThT est si répandu. Cela repose en très grande partie sur sa facilité d'utilisation ainsi que sur la possibilité d'étudier de façon simultanée un grand nombre de conditions sur des fluorimètres lecteur de plaques. Donc l'obtention d'un grand nombre de données est aisée, leur interprétation étant, quant à elle, extrêmement complexe.

Bibliographie :

- [1] C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12817–12826.
- [2] X. Huang, C. S. Atwood, R. D. Moir, M. A. Hartshorn, J. P. Vonsattel, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26464–26470.
- [3] V. Pradines, A. J. Stroia, P. Faller, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1189–1194.
- [4] N. Rezaei-Ghaleh, K. Giller, S. Becker, M. Zweckstetter, *Biophys. J* **2011**, *101*, 1202–1211.
- [5] P. Faller, C. Hureau, O. Berthoumieu, *Inorg. Chem.* **2013**, DOI 10.1021/ic4003059.
- [6] B. Alies, P.-L. Solari, C. Hureau, P. Faller, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 701–708.
- [7] B. Alies, G. LaPenna, S. Sayen, E. Guillon, C. Hureau, P. Faller, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 7897–7902.
- [8] B. Alies, V. Pradines, I. Llorens-Alliot, S. Sayen, E. Guillon, C. Hureau, P. Faller, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 333–340.
- [9] H. Levine III, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.
- [10] P. Friedhoff, A. Schneider, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **1998**, *37*, 10223–10230.
- [11] E. S. Voropai, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevskii, A. A. Maskevich, V. I. Stepuro, O. I. Povarova, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, A. L. Fink, V. N. Uverskii, *J. Appl. Spectros.* **2003**, *70*, 868–874.
- [12] M. G. Zagorski, C. J. Barrow, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5621–5631.
- [13] S.-A. Poulsen, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 142–152.
- [14] E. Mikros, D. Benaki, E. Humpfer, M. Spraul, S. Loukas, C. I. Stassinopoulou, M. Pelecanou, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2001**, *113*, 3715–3717.
- [15] H. A. Scheidt, I. Morgado, S. Rothmund, D. Huster, M. Fändrich, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2011**, *50*, 2837–2840.
- [16] M. D’Amico, M. G. Di Carlo, M. Groenning, V. Militello, V. Vetri, M. Leone, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1596–1601.
- [17] E. Hellstrand, B. Boland, D. M. Walsh, S. Linse, *ACS Chem. Neurosci.* **2009**, *1*, 13–18.
- [18] A. Peim, P. Hortschansky, T. Christopeit, V. Schroeckh, W. Richter, M. Fändrich, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1801–1805.
- [19] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh, *Biochemistry* **1966**, *5*, 467–477.
- [20] P. Faller, C. Hureau, *Dalton Trans.* **2009**, 1080–1094.
- [21] A. G. Aslamkhan, A. Aslamkhan, G. A. Ahearn, *J. Exp. Zool.* **2002**, *292*, 507–522.
- [22] Y. Kusumoto, A. Lomakin, D. B. Teplow, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 12277.
- [23] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 149–163.
- [24] D. J. Selkoe, *Trends Neurosci.* **1993**, *16*, 403–409.
- [25] K. J. Marciniowski, H. Shao, E. L. Clancy, M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11082–11091.
- [26] L. Jean, C. F. Lee, D. J. Vaux, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 1154–1162.
- [27] D. Jiang, K. L. Dinh, T. C. Ruthenburg, Y. Zhang, L. Su, D. P. Land, F. Zhou, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3160–3168.

- [28] M. Ouberai, P. Dumy, S. Chierici, J. Garcia, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2123–2132.
- [29] C. S. Atwood, X. Huang, R. D. Moir, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Met. Ions Biol. Syst.* **1999**, *36*, 309–364.
- [30] A. Morimoto, K. Irie, K. Murakami, Y. Masuda, H. Ohigashi, M. Nagao, H. Fukuda, T. Shimizu, T. Shirasawa, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52781–52788.
- [31] C. Ha, J. Ryu, C. B. Park, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6118–6125.
- [32] J. Talafous, K. J. Marcinowski, G. Klopman, M. G. Zagorski, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7788–7796.
- [33] H. Shao, S. Jao, K. Ma, M. G. Zagorski, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 755–773.
- [34] N. L. Fawzi, J. Ying, D. A. Torchia, G. M. Clore, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9948–9951.
- [35] D. S. Wishart, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171–180.
- [36] S. W. Pimplikar, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 1261–1268.
- [37] L. C. Serpell, J. M. Smith, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 225–231.
- [38] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16742–16747.
- [39] D. B. Teplow, N. D. Lazo, G. Bitan, S. Bernstein, T. Wytttenbach, M. T. Bowers, A. Baumketner, J.-E. Shea, B. Urbanc, L. Cruz, J. Borreguero, H. E. Stanley, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 635–645.
- [40] L. Yu, R. Edalji, J. E. Harlan, T. F. Holzman, A. P. Lopez, B. Labkovsky, H. Hillen, S. Barghorn, U. Ebert, P. L. Richardson, L. Miesbauer, L. Solomon, D. Bartley, K. Walter, R. W. Johnson, P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, *Biochemistry* **2009**, *48*, 1870–1877.
- [41] S. L. Bernstein, N. F. Dupuis, N. D. Lazo, T. Wytttenbach, M. M. Condrón, G. Bitan, D. B. Teplow, J.-E. Shea, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson, M. T. Bowers, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 326–331.
- [42] B. Strodel, J. W. L. Lee, C. S. Whittleston, D. J. Wales, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13300–13312.
- [43] P. K. Mandal, J. W. Pettegrew, *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 2267–2272.
- [44] M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. Van Nostrand, S. O. Smith, *Nature* **2010**, *17*, 561–567.
- [45] G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, D. B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 330.
- [46] W. Dzwolak, M. Pecul, *FEBS Letters* **2005**, *579*, 6601–6603.
- [47] A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 2538–2544.
- [48] M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, A. M. Donald, *J. Struct. Biol.* **2005**, *149*, 30–37.
- [49] A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 11519–11524.
- [50] A. Lomakin, D. B. Teplow, D. A. Kirschner, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 7942–7947.

Chapitre V : Vers des complexes de
Ru(II) actifs contre la
Maladie d'Alzheimer

Chapitre V. Vers des complexes de Ru(II) actifs contre la maladie d'Alzheimer.

Introduction :

Des études menées sur le peptide A β ont montré que la partie N-terminale, riche en résidus histidines, est capable de coordonner les ions métalliques tels que le cuivre, le zinc et le fer (au degré d'oxydation +II) dans les conditions physiologiques. La coordination des ces ions métalliques implique principalement par les noyaux imidazoles des résidus histidines (His 6, 13 et 14) ainsi que l'aspartate 1 (via l'amine N-terminale) et va fortement influencer l'agrégation et la toxicité du peptide A β ^[1].

Une stratégie thérapeutique possible consiste à concevoir une molécule capable d'empêcher la coordination des ces ions métalliques en occupant spécifiquement les sites de liaison du cuivre et/ou du zinc au peptide A β . Une des approches possible est l'utilisation de chélateurs du Cu(II) et/ou du Zn(II). Une seconde approche met en jeu des complexes métalliques qui peuvent être utilisés comme des agents potentiellement capables de modifier et/ou empêcher la coordination du Cu(II) et du Zn(II). En effet, le Zn(II) favorise l'agrégation du peptide A β , le remplacer ou modifier sa coordination au peptide pourrait se traduire par une inhibition ou un ralentissement de la cinétique d'agrégation. De la même façon, substituer le Cu(II) pourrait avoir un effet à la fois sur la production de ROS (catalysée par le Cu(II)) qui sont des espèces létales pour les neurones et sur l'agrégation. Contrairement au Zn(II), le Cu(II) ne déclenche pas et ne promeut pas l'agrégation du A β 28, nous n'avons donc pas étudié l'effet des complexes de Ru(II) en présence de Cu(II).

Dans ce contexte, Barnham ^[2] a développé une série de complexes à base de Pt(II) de type L-Pt(Cl)₂ dans lesquels L est un ligand de type phénantroline (complexes 1, 3 et 6 Fig. V-1). Des études *in vitro* ont suggéré que ces complexes (i) se lient aux résidus histidines du peptide A β via la perte des ligands chlorures empêchant ainsi la fixation du Cu(II) et du Zn(II). (ii) Par conséquent, les complexes inhibent l'agrégation du peptide A β 42 évaluée par spectroscopie de fluorescence de la ThT, (iii) inhibent la production de H₂O₂ générée par le Cu(II) et mesurée par dosage fluorimétrique. Les études sur lignées cellulaires ont montré que

ces complexes inhibent la neurotoxicité induite par le peptide A β et les expériences menées sur des coupes d'hippocampe de souris indiquent une restauration de la potentialisation à long terme c'est-à-dire la plasticité synaptique qui est importante dans les processus d'apprentissage et de la mémoire. Lors de ces études, la réactivité du cisplatine a également été évaluée. Contrairement aux complexes L-PtCl₂, le cisplatine, *cis*-Pt(II)(NH₃)₂Cl₂, n'a montré aucun effet sur l'agrégation ou la toxicité du peptide A β . Ceci indique que le ligand de type phénantroline confère une certaine spécificité aux complexes L-Pt(II)Cl₂ pour le peptide A β . A partir de ces résultats, le mode de coordination des complexes a été proposé [3]. Les complexes de Pt(II)(Phen)Cl₂ se lient au peptide A β 16 via une interaction non-covalente issue du stacking π - π entre le ligand de type phénantroline et les résidus aromatiques du peptide. De plus, les complexes forment un adduit avec le peptide via une liaison de coordination avec les noyaux imidazoles des résidus histidines. Pour différentes raisons, incluant une faible biodisponibilité, l'étude de ces complexes *in vivo* n'a pas été poursuivie

A partir de cette première étude, preuve que le concept d'utiliser des complexes métalliques fonctionne, d'autres complexes de Pt(II) ont été synthétisés (complexe 4, Fig. V-1) [4] et leur capacité à empêcher et/ou modifier la coordination des ions métalliques a été évaluée. Ainsi le complexe cyclométallé Pt(ϕ -MePy)(DMSO)Cl (complexe 2, Fig. V-1) [5] a été synthétisé dans l'équipe. Comparativement aux complexes développés par Barnham, le complexe Pt(ϕ -MePy)(DMSO)Cl possède une liaison métal-carbone. La capacité de ce complexe à se lier au peptide A β a été évaluée par spectroscopie RMN (¹H) et spectrométrie de masse (en mode ESI) [5,6]. Les résultats obtenus ont montré que ce complexe se lie spécifiquement aux résidus Glu11 et His13 du peptide A β après libération des ligands labiles DMSO et chlorure.

Une étude RPE de la coordination du Cu(II) au peptide A β en présence du complexe cyclométallé a montré que ce dernier est capable de modifier la coordination du Cu(II). Néanmoins, cette modification n'est pas suffisante pour empêcher la production de ROS. Les résidus Glu11 et His13 semblent directement impliqués dans la sphère de coordination du Pt(II) et liés à sa capacité à inhiber l'agrégation de peptide A β induite par le Zn(II) (cf paragraphe I-D-2-b, p. 56). En effet, ce complexe cyclométallé est capable d'inhiber l'agrégation du peptide A β induite par le Zn(II). L'effet du complexe Pt(ϕ -MePy)(DMSO)Cl sur la coordination du Cu(II) et du Zn(II) au peptide A β 28, et par la suite sur l'agrégation du peptide et la production de ROS a fait l'objet d'une communication (cf Annexe I-D, p. A-31).

Dernièrement, des complexes à base de ruthénium (Ru(II)) ont été proposés comme alternative à l'utilisation de complexes de Pt(II) (complexe 5 et 7, Fig. V-1). Comme le platine, le ruthénium est considéré inerte cinétiquement. Une façon d'estimer la vitesse d'échange des ligands est de comparer la vitesse d'échange de l'eau liée aux ions métalliques. En effet, des différences de vitesse supérieures à 10 ordres de grandeur peuvent être observées. Des échanges rapides, i.e d'environ 10^{-6} s sont observées pour le Cu(II) et le Zn(II) alors que pour le Pt(II) et le Ru(II) cet échange est de l'ordre de 10^{-3} s voire plus long dans le cas du Pt(IV) [7]. En d'autres termes, au niveau biologique, les vitesses d'échange des ligands du Cu(II) et du Zn(II) peuvent être rapides alors que celles du Pt(II) et du Ru(II) sont souvent comparables aux vitesses des processus biologiques. De plus, les complexes de ruthénium possèdent une forte affinité pour les noyaux imidazoles [8] et sont considérés comme étant moins cytotoxiques comparativement aux complexes de platine. En accord avec ce principe, Valensin [9] a décrit l'utilisation du complexe *fac*-Ru(CO)₃Cl₂(thiazole) (complexe 5, Fig. V-1) qui est capable de se lier spécifiquement aux histidines du peptide Aβ28 après libération des ligands thiazole et chlorures (cf § I-D-3-b, p. 63). La formation de l'adduit Ru(CO)₃²⁺-Aβ est alors supposé interférer dans la coordination des ions métalliques, Cu(II) et Zn(II), mais ceci n'est pas encore établi à ce jour.

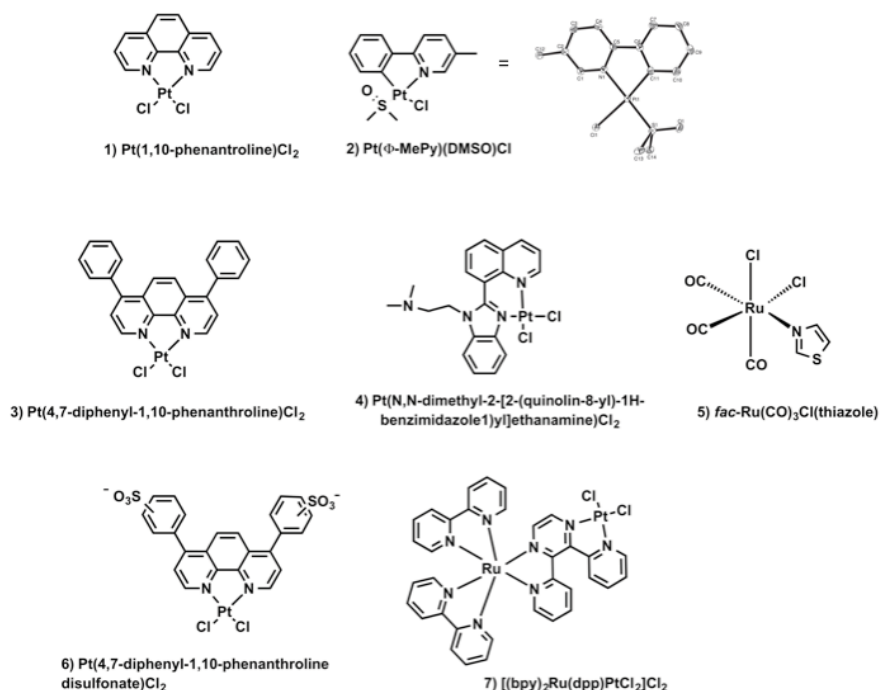


Figure V-1: Représentation des différents complexes de Pt(II) et de Ru(II) utilisés comme agents thérapeutiques dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

En s'inspirant de ces travaux, nous avons choisi d'utiliser des complexes de type $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{L})$ avec $\text{L} =$ glycine, éthylène diamine, 8-hydroxyquinoline et ses dérivés. L'utilisation de ces complexes permettrait (i) d'évaluer une modification de la coordination des ions $\text{Cu}(\text{II})$ et $\text{Zn}(\text{II})$ après réaction avec le peptide, (ii) éventuellement de libérer des chélateurs potentiels des ions $\text{Cu}(\text{II})$ et $\text{Zn}(\text{II})$ après coordination du motif $\text{Ru}(\text{CO})_3^{2+}$ au peptide (si la coordination du complexe au peptide induit le départ du ligand). Ceci éviterait la coordination des ions $\text{Cu}(\text{II})$ et $\text{Zn}(\text{II})$ sur un autre site du peptide (Fig. V-2). En effet, ces ligands (glycine, éthylène diamine, 8-hydroxyquinoline et ses dérivés) sont des chélateurs connus du $\text{Cu}(\text{II})$ et du $\text{Zn}(\text{II})$ ^[10-12] dont les constantes d'affinités sont répertoriées dans le tableau V-1.

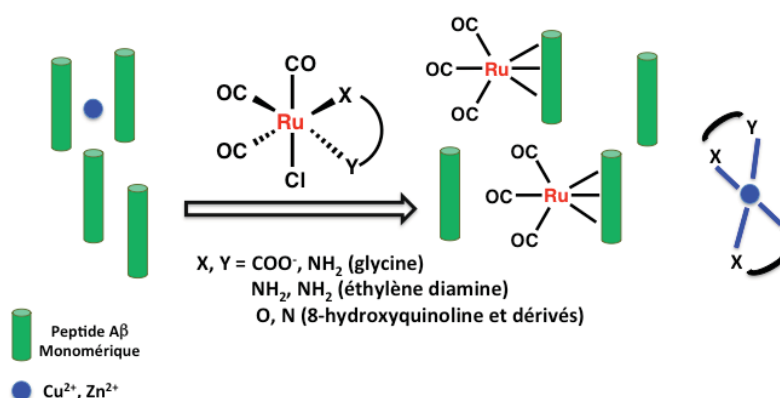


Figure V-2: Stratégie envisagée avec l'utilisation de complexes de $\text{Ru}(\text{II})$ couplés à un ligand chélateur d'ions métalliques

Après la présentation de la synthèse de ces complexes, ce chapitre décrit les résultats obtenus concernant leur réactivité ainsi que celle du complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (CORM-2) vis-à-vis de la coordination au peptide Aβ, leurs capacités à empêcher l'agrégation induite par le $\text{Zn}(\text{II})$ et à inhiber la production des ROS catalysée par le $\text{Cu}(\text{II})$.

Tableau V-1: Constante d'affinité (M^{-2}) du peptide Aβ et des ligands de type glycine, éthylène diamine et hydroxyquinoline pour les ions métalliques $\text{Cu}(\text{II})$ et $\text{Zn}(\text{II})$. (*) valeurs issues de la base de données NIST.

	Peptide Aβ ^[13,14]	Glycine ^(*)	Hydroxyquinoline (ML_2) ^[15,16]			Éthylène diamine ^(*)
			Clioquinol	8-hydroxyquinoline	Acide 5-sulfonic-8-hydroxyquinoline	
Cu(II)	10^{-10}	10^{-8}	10^{-10}	10^{-14}	10^{-10}	10^{-11}
Zn(II)	10^{-6}	10^{-4}	10^{-8}	10^{-10}	10^{-7}	10^{-6}

V-A Synthèse et caractérisation des complexes de Ru(II)

Remarques liminaires : tous les complexes de Ru synthétisés et étudiés en présence de peptide A β sont au degré d'oxydation +II. Par ailleurs, le Ru étant photosensible, toutes les synthèses ont été réalisées à l'abri de la lumière et sous argon.

V-A-1 Choix des ligands

Les ligands présentés ci-dessous sont des ligands bidentes c'est-à-dire qu'ils possèdent deux atomes capables de se lier au centre métallique.

V-A-1-a Glycine

Le complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) ou CORM-3 (Fig.V-3) est un complexe connu dans la littérature comme molécule capable de libérer du CO dans les systèmes biologiques (CORM pour CO Releasing Molecules) [17-19]. Le mécanisme de cette libération n'est pas exactement connu mais il est proposé que le CO est libéré via la substitution des ligands chlorure et glycinate par des ligands attracteurs d'électrons comme les thiols. En effet, *in vitro* il a été montré cette perte de CO n'est possible qu'en présence de réducteurs comme le glutathion ou la cystéine [20]. Par ailleurs, ce complexe présente l'avantage d'être hydrosoluble ce qui va faciliter les études en présence de peptide A β .

La capacité, supposée, du CORM-3 à se lier aux noyaux imidazoles (cf p. 64) qui sont les cibles que nous cherchons à atteindre, ainsi que sa solubilité dans l'eau en font donc un bon candidat en tant que potentiel agent thérapeutique.

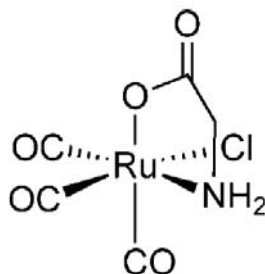


Figure V-3: Représentation du Ru(CO)₃Cl(glycinate) ou CORM-3.

V-A-1-b 8-hydroxyquinoléine et ses dérivés

Nous avons également choisi de synthétiser des complexes possédant comme ligand (Fig. V-4) : le clioquinol (CQ) ou 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoléine, la 8-hydroxyquinoléine (HQ) (cf § I-D-3-a-ii, p. 59). Ces complexes n'étant pas hydrosolubles, un troisième complexe avec le ligand l'acide 8-hydroxyquinoléine-5-sulfonique (HQ.SO₃H) est également synthétisé permettant d'obtenir un complexe hydrosoluble.

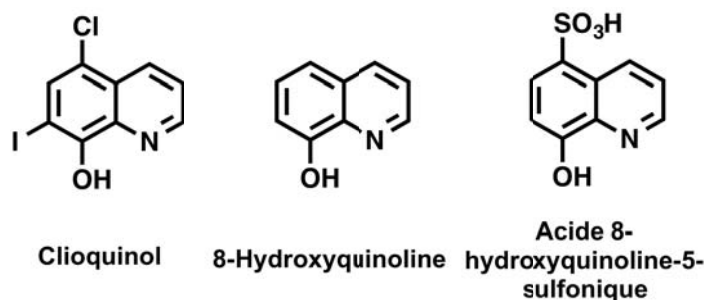


Figure V-4: Représentation des ligands de type hydroxyquinoléine utilisé : le clioquinol, la 8-hydroxyquinoléine et l'acide 8-hydroxyquinoléine-5-sulfonique.

V-A-1-c Ethylène diamine

L'utilisation de complexes de Ru(II) vectorisés par une molécule d'adressage spécifique au peptide A β est une approche envisageable. La ThT est plus spécifique pour les espèces fibrillaires du peptide A β (cf. Chapitre I, partie B, p. 28). Des modifications structurales qui lui sont apportées permettent d'obtenir des molécules, comme le PIB (Pittsburgh compound B), qui sont plus affines pour les espèces oligomériques ^[21-23]. Les dérivés de la ThT sont donc des candidats viables pour vectoriser le complexe de Ru(II) au peptide A β .

Nous avons utilisé comme ligand l'éthylène diamine (en) qui peut se lier au Ru(II) via ses deux groupements amines (cf § V-A-2-b, p. 165). De plus, ses groupements -CH₂ peuvent être fonctionnalisés par des dérivés de la ThT par la réaction de Mitsunobu, par exemple, après protection des fonctions amines (de l'éthylène diamine et du dérivé de la ThT) et via une fonction hydroxyle. Une étape de déprotection permettra d'obtenir le ligand désiré (Fig. V-5). La synthèse de ce type de ligand a fait l'objet du stage post-doctoral de Sabrina Noël.

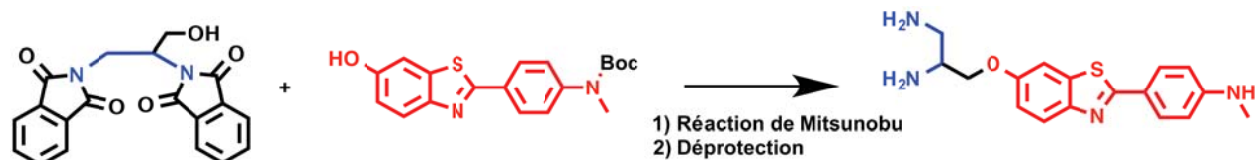


Figure V-5: Exemple de fonctionnalisation de l'éthylenediamine (en bleu) par un dérivé de la ThT (en rouge) via la réaction de Mitsunobu.

Dans un premier temps, le complexe avec l'éthylène diamine a été synthétisé (Fig. V-6) et étudié en présence de peptide. Le complexe formé est un complexe chargé soluble dans l'eau.

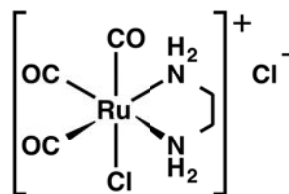


Figure V-6: Représentation du complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{Cl}^-$

Tous les complexes synthétisés et étudiés en présence du peptide A β sont des complexes de type $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{L})$ avec L ligand bidente de nature anionique ou neutre.

V-A-2 Synthèse et caractérisation des complexes de Ru(II)

V-A-2-a Synthèse des complexes

Les complexes ont été obtenus selon la même voie de synthèse (Fig. V-7, A) à partir du dimère $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ en solution dans le MeOH après addition d'un équivalent de ligand par centre métallique. Dans le cas de la synthèse en présence de glycine ou des hydroxyquinolines, les fonctions acide carboxylique, phénol et acide sulfonique ont été au préalable déprotonées par l'ajout de NaOEt. La synthèse de chacun de ces complexes est détaillée en Annexe III (p. A-43 à A-46). Nous avons ainsi obtenu cinq complexes représentés sur la Fig. V-7, B.

La synthèse du $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ conduit à la formation d'un produit secondaire le complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_2(\text{CO}_2\text{H})\text{Cl}(\text{glycinate})]^-$. Plusieurs conditions expérimentales ont été essayées afin d'améliorer la pureté du produit (cf Annexe III, p. A-39). Cependant, aucun de ces essais n'a permis d'obtenir le produit désiré de façon exclusive (d'après les données RMN). Dans la suite du chapitre, les études en présence du peptide ont été réalisées avec le complexe le plus pur possible (<10% d'impureté) qui a été obtenu selon la voie de synthèse décrite précédemment (Fig. V-7, A).

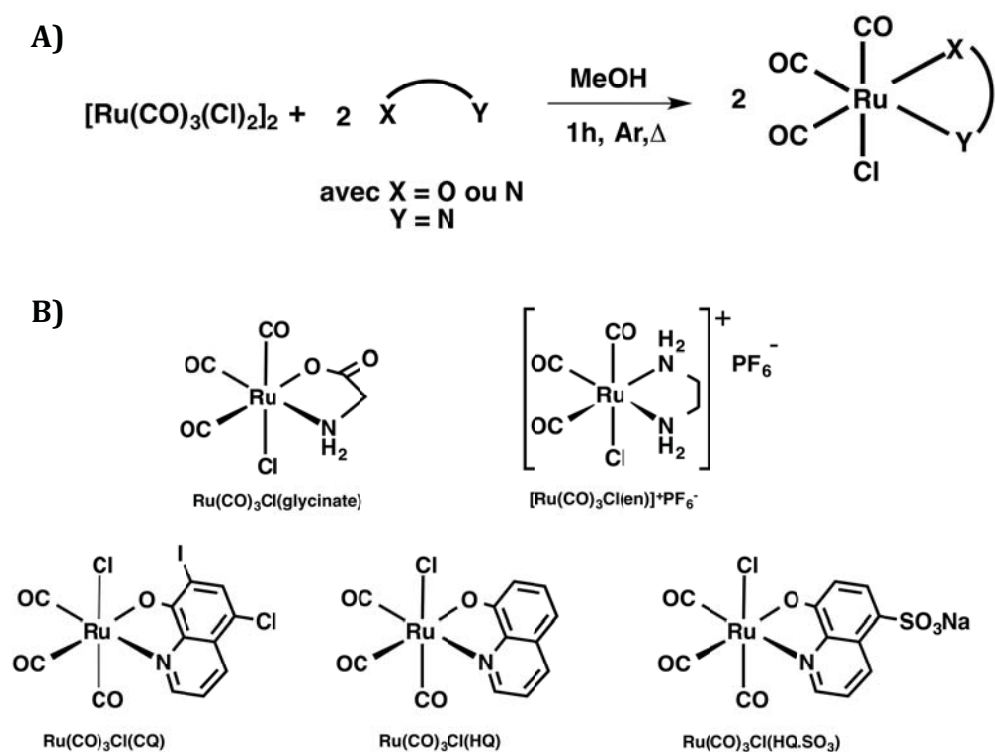


Figure V-7: A) Voie de synthèse générale des complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{L})$. B) Représentation schématique des différents complexes obtenus selon la voie de synthèse décrite en A).

V-A-2-b Structures cristallographiques

Des cristaux des complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ ont été obtenus par diffusion lente de pentane dans des solutions de complexes dans le méthanol. Les structures cristallographiques de ces complexes sont présentées sur la Figure V-8. Les complexes sont de géométrie octaédrique où l'ion Ru(II) est hexacoordonné par 3 atomes de carbone des trois ligands carbonyles ainsi que par 1 ion chlorure, 1 atome d'oxygène et un atome d'azote du ligand pour compléter sa sphère de coordination (Fig. V-8, à gauche et au milieu). Ces complexes sont de géométrie *fac*, c'est-à-dire que les trois ligands carbonyles occupent une face de l'octaèdre. Par ailleurs, les distances Ru-ligands (reportées dans le tableau V-1), sont très proches de celles du CORM-3 (Fig. V-8, à droite) [25].

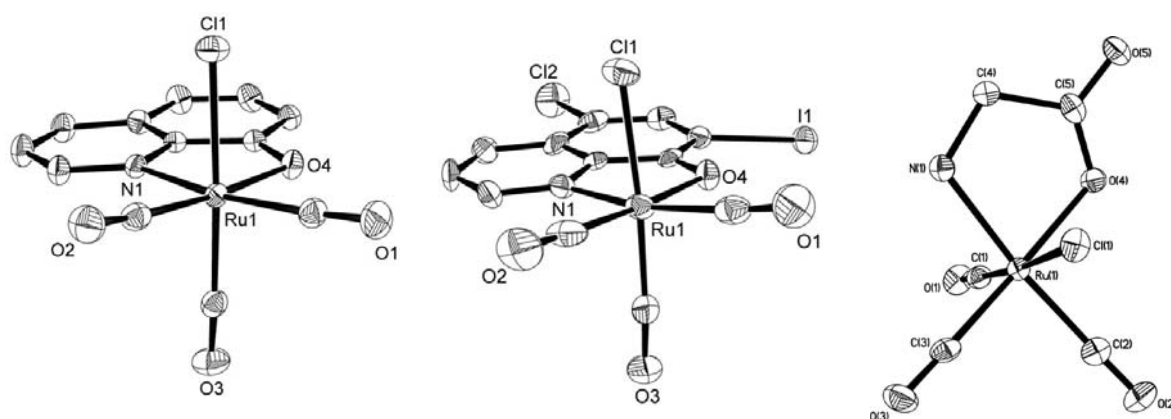


Figure V-8: Structures cristallographiques des complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ (à gauche) et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ (au milieu). La structure cristallographique du CORM-3 (à droite) est issue de la référence [25].

Les valeurs des principales distances et des angles sont reportées pour les deux complexes dans le Tableau V-2. Les distances sont similaires à celles décrites dans la littérature pour des complexes de type *fac* avec des ligands carbonyles [25,26].

	<i>fac</i> -Ru(CO) ₃ Cl(CQ) (Å)	<i>fac</i> -Ru(CO) ₃ Cl(HQ) (Å)	CORM-3 (Å)
Ru(1)-N(1)	2.092(5)	2.1009(11)	2.117(3)
Ru(1)-O(4)	2.063(4)	2.0587(9)	2.069(2)
Ru(1)-Cl(1)	2.3998(15)	2.4103(4)	2.4083(8)
Ru(1)-C(1)	1.929(7)	1.9185(14)	1.903(3)
Ru(1)-C(2)	1.923(7)	1.9233(13)	1.943(3)
Ru(1)-C(3)	1.900(7)	1.9231(13)	1.903(3)
C(1)-O(1)	1.131(7)	1.1243(17)	1.135(4)
C(2)-O(2)	1.131(8)	1.1283(16)	1.118(4)
C(3)-O(3)	1.133(7)	1.1190(17)	1.127(4)
	(°)	(°)	(°)
C(1)-Ru(1)-C(3)	95.8(3)	95.18(6)	90.56(14)
C(3)-Ru(1)-C(2)	91.6(3)	94.96(5)	94.76(14)
C(1)-Ru(1)-N(1)	167.2(2)	169.56(5)	173.89(12)
C(2)-Ru(1)-N(1)	98.6(2)	99.18(5)	94.87(12)
O(4)-Ru(1)-N(1)	80.11(17)	80.41(4)	81.33(9)
C(1)-Ru(1)-Cl(1)	88.39(18)	89.03(4)	92.78(10)
C(2)-Ru(1)-Cl(1)	86.15(19)	86.33(4)	87.29(10)
N(1)-Ru(1)-Cl(1)	85.91(13)	87.62(3)	84.69(7)

Tableau V-2: Principales distances (Å) et angles (°) pour les complexes Ru(CO)₃Cl(CQ), Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(glycinate) ou CORM-3 ^[25].

L'échange des contre-ions chlorures du complexe [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺Cl⁻ par des ions hexafluorophosphate (PF₆⁻), nous a permis d'obtenir des cristaux dans le méthanol du complexe [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ (Fig. V-9). La structure nous indique que le complexe est de géométrie octaédrique où l'ion Ru(II) central est hexacoordonné par 3 atomes de carbone issus des trois ligands carbonyles ainsi que par 1 ion chlorure et 2 atomes d'azote issus du ligand éthylène diamine. Comme pour les complexes précédents, le complexe est de géométrie *fac*.

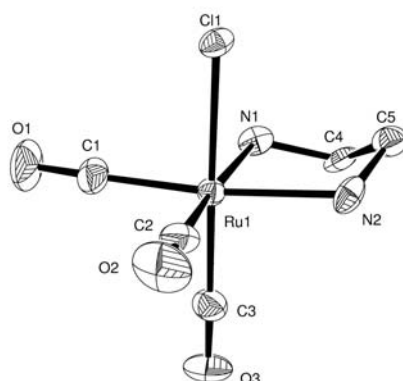


Figure V-9: Structure cristallographique du complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$.

Par ailleurs, les distances Ru-ligands, sont proches de celles du $\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2(\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'\text{-tetra-méthyléthylène diamine})$ ^[27] (reportées dans le tableau V-3). Cependant, le complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ possèdent des longueurs de liaisons plus proches de la géométrie octaédrique comparativement au complexe $\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2(\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'\text{-tetra-méthyléthylène diamine})$ qui possède une géométrie octaédrique déformée .

	<i>fac</i> - $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ (Å)	$\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2(\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'\text{-tetra-méthyléthylène diamine})$ (Å)
Ru(1)-N(1)	2.118(9)	2.220(2)
Ru(1)-N(2)	2.139(9)	2.211(2)
Ru(1)-Cl(1)	2.403(3)	2.413(2)
Ru(1)-C(1)	1.938(12)	1.872(3)
Ru(1)-C(2)	1.938(13)	1.872(2)
Ru(1)-C(3)	1.929(12)	Ru(1)-Cl(2) 2.408(2)
C(1)-O(1)	1.123(14)	1.133(3)
C(2)-O(2)	1.120(14)	1.134(3)
C(3)-O(3)	1.106(14)	
	(°)	(°)
C(1)-Ru(1)-C(2)	92.7(5)	91.90(11)
C(1)-Ru(1)-N(1)	93.7(5)	92.33(10)
C(2)-Ru(1)-N(1)	172.5(5)	175.71(8)
C(1)-Ru(1)-N(2)	172.5(5)	174.94(8)
C(2)-Ru(1)-N(2)	93.5(4)	93.04(10)
N(1)-Ru(1)-N(2)	79.8(4)	82.75(9)
C(1)-Ru(1)-Cl(1)	90.2(4)	88.66(9)
C(2)-Ru(1)-Cl(1)	89.9(4)	88.29(9)
N(1)-Ru(1)-Cl(1)	86.2(3)	92.53(8)
N(2)-Ru(1)-Cl(1)	85.5(3)	90.38(8)

Tableau V-3: Principales distances (Å) et angles (°) pour les complexes $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ et $\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2(\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'\text{-tetra-méthyléthylène diamine})$

V-A-2-c Spectroscopies UV-Visible et fluorescence

Les complexes ont été caractérisés par UV-Visible et spectroscopie de fluorescence, les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau V-4.

Complexe (solvant)	Ru(CO) ₃ Cl(glycinate) (eau)	Ru(CO) ₃ Cl(CQ) (DMSO)	Ru(CO) ₃ Cl(HQ) (DMSO)	Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃)	[Ru(CO) ₃ Cl(en)] ⁺ PF ₆ ⁻ (eau)
UV-Visible					
λ_{max} (nm)	270 (épaulement)	427	412	385 (eau) 415 (DMSO)	235 (Epaulement) 280 (Epaulement)
ε (M⁻¹.cm⁻¹)	210	5100	7600	5400 (eau) 4300 (DMSO)	3800 à 235 nm 1950 à 280 nm
Fluorescence					
λ_{excitation} max (nm)		427	412	385 (eau) 415(DMSO)	
λ_{émission} max (nm)		535	498	590 (eau) 510 (DMSO)	

Tableau V-4: Caractérisation par spectroscopie UV-Visible et de fluorescence des complexes de Ru(II) synthétisés.

La propriété anti-agrégation de ces complexes et leur capacité à modifier la coordination du Cu(II) ainsi que du complexe [Ru(CO)₃Cl₂]₂ (ou CORM-2) au peptide Aβ₂₈ ont d'abord été évaluées avant de s'intéresser de plus près à leur interaction avec le peptide. Le complexe [Ru(CO)₃Cl₂]₂ (ou CORM-2) a aussi été évalué. Lors des différentes études présentées dans la suite de ce chapitre, la quantité de CORM-2 additionnée est deux fois moins importante de façon à conserver le ratio un Ru(II) pour un peptide Aβ.

V-B Effet des complexes de Ru(II) sur l'agrégation

V-B-1 Conditions expérimentales

V-B-1-a Choix du fluorophore

L'effet des complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{Cl}^-$ et $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ sur l'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{28}$ induite par le $\text{Zn}(\text{II})$ a été évaluée par spectroscopie de fluorescence de la ThT. Les complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$, $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ absorbent dans la zone d'excitation de la ThT ($\lambda_{\text{excitation}} = 440 \text{ nm}$). Les complexes peuvent alors empêcher la détection de la fluorescence de la ThT (*inner filter effect*, (cf § II-A-2-b, p. 76). L'absence de fluorescence ne traduit alors pas l'absence d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{28}$. L'effet de ces complexes sur l'agrégation a donc été mesuré par spectroscopie de fluorescence du Nile Red ($\lambda_{\text{excitation}} = 520 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 580 \text{ nm}$) qui peut également être utilisé pour la détection des fibres amyloïdes ^[28]. En effet, dans ce cas il n'y a pas de recouvrement des longueurs d'onde (Nile Red et complexe de Ru(II)). La figure indique une augmentation de fluorescence du Nile Red avec une allure similaire à celle observée dans le cas de la ThT (Fig. V-10).

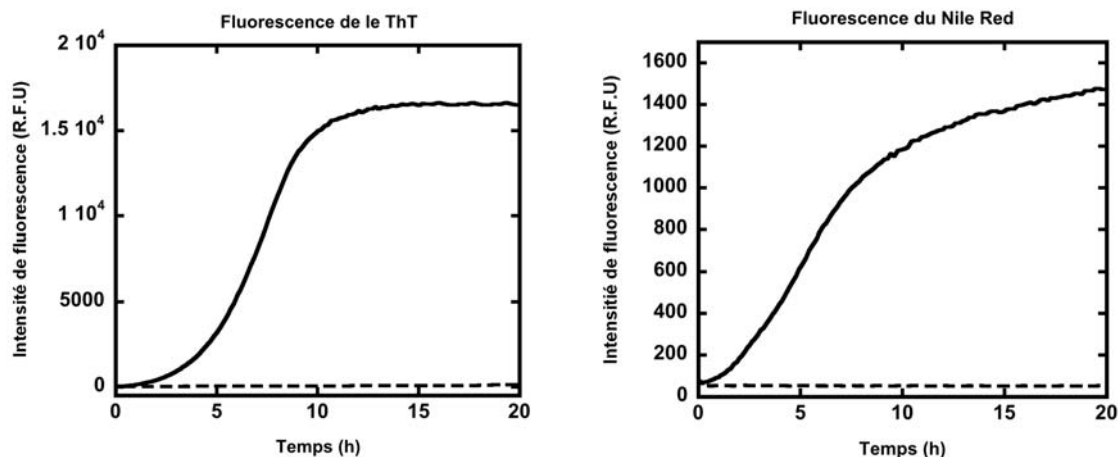


Figure V-10: Fluorescence de la ThT (à gauche) et du Nile Red (à droite) en fonction du temps du peptide $\text{A}\beta_{28}$ en absence (ligne pointillée) et en présence de $\text{Zn}(\text{II})$ (ligne pleine). Conditions expérimentales: $[\text{A}\beta_{28}] = 500 \mu\text{M}$, $[\text{Zn}(\text{II})] = 250 \mu\text{M}$, $[\text{Fluorophore}] = 10 \mu\text{M}$ dans 10mM de tampon phosphate, pH 7,4, $T = 25^\circ\text{C}$

L'effet des complexes de type $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{XQ})$ sur la cinétique d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{28}$ induite par le $\text{Zn}(\text{II})$ sera donc évalué par spectroscopie de fluorescence du Nile Red.

V-B-1-b Effet du DMSO

Dans le chapitre IV, nous avons vu que l'agrégation du peptide $\text{A}\beta$ est très sensible à l'environnement. Les complexes de $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$, $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ n'étant pas solubles dans l'eau, une solution stock de ces composés a été préparée dans le DMSO. L'effet du DMSO sur la cinétique d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{28}$ a donc été mesuré par spectroscopie de fluorescence de la ThT (Fig. V-11).

Par spectroscopie de fluorescence de la ThT, le $t_{1/2}$ est de 4h (courbe **(b)**) et de 6h (courbe **(c)**), en absence et en présence de DMSO respectivement. De même, en absence ou en présence de DMSO, la valeur du paramètre Δ est de 8 et 10h respectivement. Il semble donc que le DMSO impacte la cinétique d'agrégation. En présence de DMSO, le peptide agrège plus lentement qu'en son absence ^[29] (modification des phases de nucléation et d'élongation). Il est donc nécessaire d'enregistrer une cinétique d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{28}$ en présence de quantité équivalente de DMSO (v/v) de façon à pouvoir évaluer le réel impact des complexes synthétisés sur la formation de fibres amyloïdes. La question de l'effet du DMSO sur la cinétique d'agrégation ne sera pas plus discutée dans ce manuscrit.

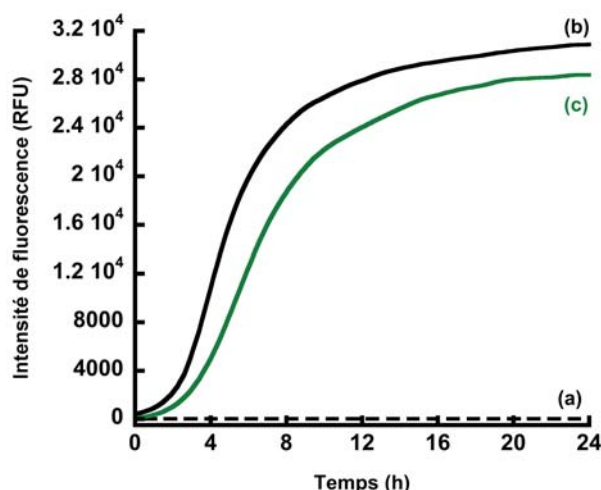


Figure V-11: Fluorescence de la ThT en fonction du temps du complexe $\text{A}\beta_{28}\text{-Zn}$ en absence (courbe **(b)**) et en présence (courbe **(c)**) de DMSO. La courbe **(a)** représente la fluorescence de la ThT pour le peptide $\text{A}\beta_{28}$ seul. Conditions expérimentales : $[\text{A}\beta_{28}] = 500\mu\text{M}$, $[\text{Zn}(\text{II})] = 250\mu\text{M}$, $[\text{ThT}] = 10\mu\text{M}$, 5% de DMSO (v/v) dans 10mM de tampon phosphate, pH 7,4, $T = 25^\circ\text{C}$.

V-B-2 Effet des complexes Ru(CO)₃Cl(L) sur la cinétique d'agrégation du peptide Aβ28

Le Ru(II) étant considéré inerte d'un point de vue cinétique, les complexes sont incubés en présence du peptide pendant 12h à température ambiante et sous agitation « modérée » avant le déclenchement de l'agrégation par l'ajout de Zn(II) (cf § IV-B-1, p. 128). Par ailleurs, le complexe Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) est solubilisé à la fois dans l'eau et dans le DMSO (Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)_{DMSO}, dans les mêmes conditions que les complexes Ru(CO)₃Cl(CQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ) de façon à pouvoir comparer les trois complexes de Ru(II) de type Ru(CO)₃Cl(XQ)). Par ailleurs, nous avons vérifié que les complexes de Ru(II) en présence du peptide, sans Zn(II), n'induisent pas l'agrégation.

V-B-2-a Par spectroscopie de fluorescence : résultats

La figure IV-12 est donc divisée en quatre parties. Les panneaux **A** et **B** représentent les cinétiques d'agrégation du peptide Aβ28 suivie par fluorescence de la ThT et du Nile red en présence des complexes solubilisés dans l'eau (Ru(CO)₃Cl(Glycinate), [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻, Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)) respectivement. De même, les panneaux **C** et **D** représentent les cinétiques d'agrégation du peptide Aβ28 par fluorescence de la ThT et Nile Red des complexes solubilisés dans le DMSO ([Ru(CO)₃Cl₂]₂, Ru(CO)₃Cl(CQ), Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)_{DMSO}) respectivement.

La figure IV-12 montre qu'en absence de Zn(II) il n'y a pas d'augmentation de la fluorescence de la ThT ou du Nile Red signe de la formation d'espèces fibrillaires. L'addition de 0.5 équivalent de Zn(II), en absence ou en présence de DMSO (courbes **(a)** et **(a')** respectivement), conduit à la formation de fibres amyloïdes qui se manifeste par l'augmentation d'intensité de fluorescence de la ThT et du Nile Red. Le panneau **A** indique clairement que le complexe [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ n'a aucun effet sur l'agrégation du peptide Aβ28 (courbe **(c)**). Cette absence d'effet est le signe que le complexe n'est pas capable d'empêcher la coordination du Zn(II), responsable de l'agrégation. Ce même effet est retrouvé avec le complexe Ru(CO)₃Cl(CQ) (courbe **(f)**, panneau **D**). De plus, le complexe Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) solubilisé dans l'eau (panneau **B**, courbe **(d)**) ne semble pas voir d'effet

sur l'agrégation du peptide. Ce manque de réactivité est surprenant, il était attendu une meilleure réactivité dans l'hypothèse où le ligand serait libéré.

A contrario, le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ ralentit fortement la formation de fibres ($t_{1/2}= 8\text{h}$ contre 4h sans le complexe) et sa présence semble également avoir un effet sur la quantité de fibres formées puisque l'intensité de fluorescence est 4 fois moins importante qu'en son absence (panneau A, courbe (b)).

Les complexes $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (panneau C, courbe (e)), $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ (panneau D, courbe (g)) et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$ (panneau D, courbe (h)) inhibent l'augmentation d'intensité de fluorescence de la ThT ou du Nile Red ce qui se traduit par une inhibition de l'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{28}$.

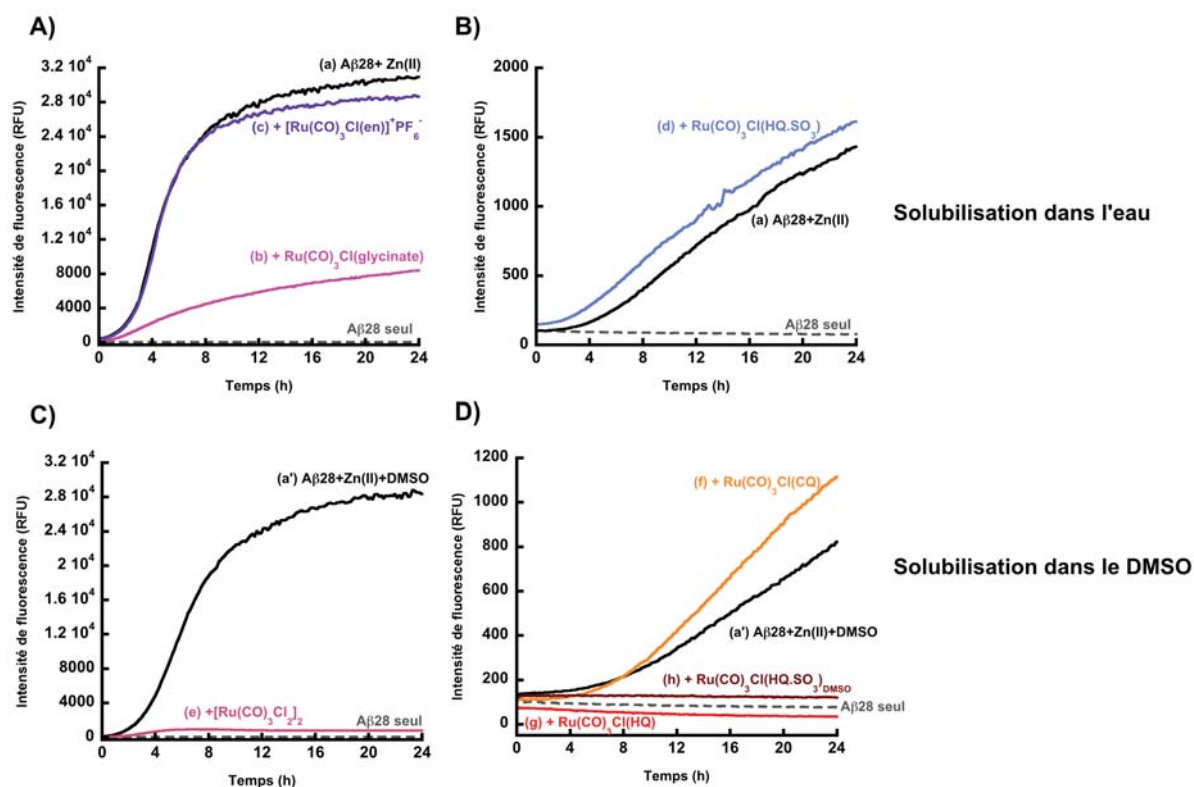


Figure V-12: Fluorescence de la ThT (panneau A et C) et du Nile Red (panneau B et D) en fonction du temps du peptide $\text{A}\beta_{28}$ (courbe pointillée), $\text{A}\beta_{28}\text{-Zn}$ (a), $\text{A}\beta_{28}\text{-Zn}$ en présence de DMSO (a'), de $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ (b), $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ (c), $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ (d), $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (e), $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ (f), $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ (g) et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$ (h). Conditions expérimentales : $[\text{A}\beta_{28}] = 500\mu\text{M}$, $[\text{Zn}(\text{II})] = 250\mu\text{M}$, $[\text{Fluorophore}] = 10\mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{II})] = 500\mu\text{M}$, 5% DMSO (v/v) dans 10 mM de tampon phosphate pH 7,4, $T=25^\circ\text{C}$.

V-B-2-b Discussion

Composés	Solvant	Résultats		
		t _{1/2} (h)	Δ (h)	Intensité de fluorescence au plateau (R.F.U)
Ru(CO) ₃ Cl(glycinate)	eau	8	15	8000
[Ru(CO) ₃ Cl(en)] ⁺ PF ₆ ⁻	eau	4	7	2800
Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃)	eau	> 12	> 20	> 1500
[Ru(CO) ₃ Cl ₂] ₂	DMSO	nd	nd	0
Ru(CO) ₃ Cl(CQ)	DMSO	> 12	> 16	> 1200
Ru(CO) ₃ Cl(HQ)	DMSO	nd	nd	0
Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃)	DMSO	nd	nd	0

Tableau V-5: Effet des complexes de Ru(II) sur la cinétique d'agrégation du peptide Aβ28 induite par le Zn(II) (nd pour non déterminé).

D'après le tableau V-5, les complexes ([Ru(CO)₃Cl₂], Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)) dans le DMSO sont capables d'inhiber l'agrégation du peptide induite par le Zn(II) ce qui indiquerait que ces complexes occupent les principaux sites de coordination du Zn(II), *i.e* les histidines, induisant soit une décooordination du Zn(II) soit une modification du site de coordination du Zn(II).

Concernant le complexe Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃), la différence de réactivité du complexe solubilisé dans l'eau ou le DMSO est inattendue. La solubilisation du complexe Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) dans le DMSO conduirait à la formation d'une espèce plus réactive capable de modifier la coordination du Zn(II) et par la suite l'agrégation du peptide.

Nous avons pu établir que certains des complexes de Ru(II) synthétisés ont un effet sur la cinétique d'agrégation du peptide Aβ28. Ces complexes semblent donc capables de modifier la coordination du Zn(II) au peptide Aβ28. Mais qu'en est-il de la coordination du Cu(II) ?

V-C Effet des complexes de Ru(II) sur la coordination du Cu(II) au peptide A β 28.

V-C-1 Rappel sur la coordination du Cu(II) au peptide A β

Dans le chapitre I, nous avons vu que la coordination du Cu(II) est dépendante du pH. A pH physiologique, les deux espèces (I et II) coexistent, avec l'espèce I qui est majoritairement présente par rapport à l'espèce II (Fig. V-13, (A)). Ces deux espèces présentent des signatures spectroscopiques différentes, notamment visibles par spectroscopie RPE (Résonance Paramagnétique Electronique), reflétant un environnement chimique différent (Fig. V-13, (B))^[30]. La composante I est un complexe pyramidal à base carrée qui fait intervenir dans le plan équatorial une amine (Asp1), deux imidazoles (His6 et His13/His14) et la fonction carbonyle d'une liaison peptidique. En ce qui concerne la position apicale, le site de coordination est toujours débattu mais il est proposé l'implication d'une fonction carboxylate (Asp1, Glu3, Asp7 ou Glu11)^[31] ou d'une molécule d'eau^[32].

La composante II possède un environnement différent de la composante I : le plan équatorial est constitué d'une amine (Asp1), un imidazole (His6 ou His13 ou His14), une fonction amide déprotonée (Asp1-Ala2) et un groupement carbonyle (Ala2-Glu3). La fonction carboxylate de l'Asp1 est proposée pour la position apicale.

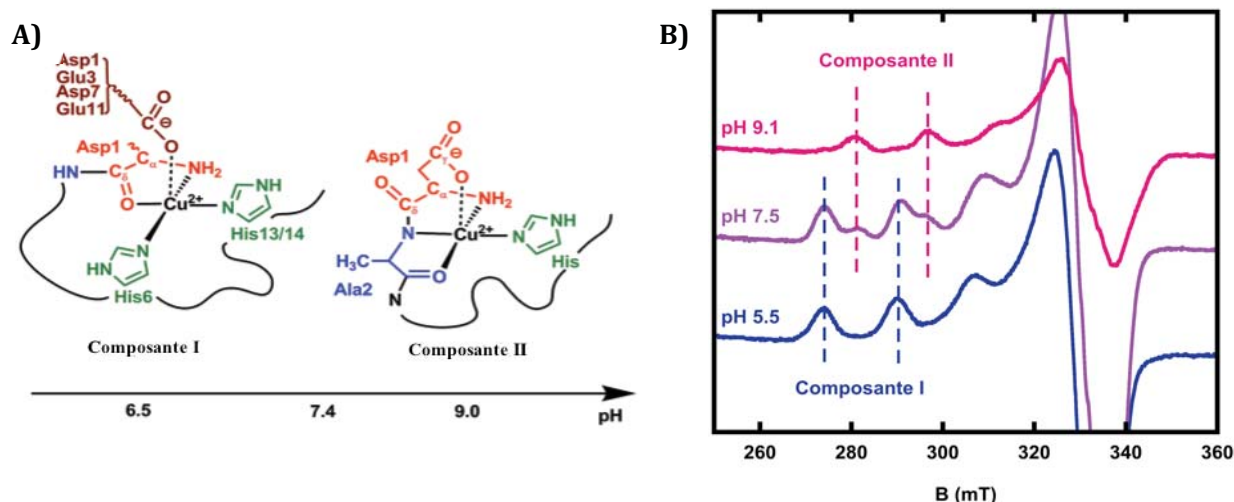


Figure V-13: Représentation des composantes I et II du complexe A β -Cu(II) (A) et de leurs signatures RPE (B).

V-C-2 Effet des complexes de Ru(II) sur la coordination du Cu(II) au peptide A β 28

L'effet des complexes de Ru(II) sur la coordination du Cu(II) au peptide A β 28 a donc été évalué par RPE. Le Ru(II) étant cinétiquement inerte les complexes sont incubés, à température ambiante, sous agitation « modérée » avec le peptide pendant 12h avant l'ajout du Cu(II). Par ailleurs, le Ru(II) est diamagnétique et ne peut donc être détecté par RPE. Seuls les changements au niveau de la sphère de coordination du Cu(II) sont visibles.

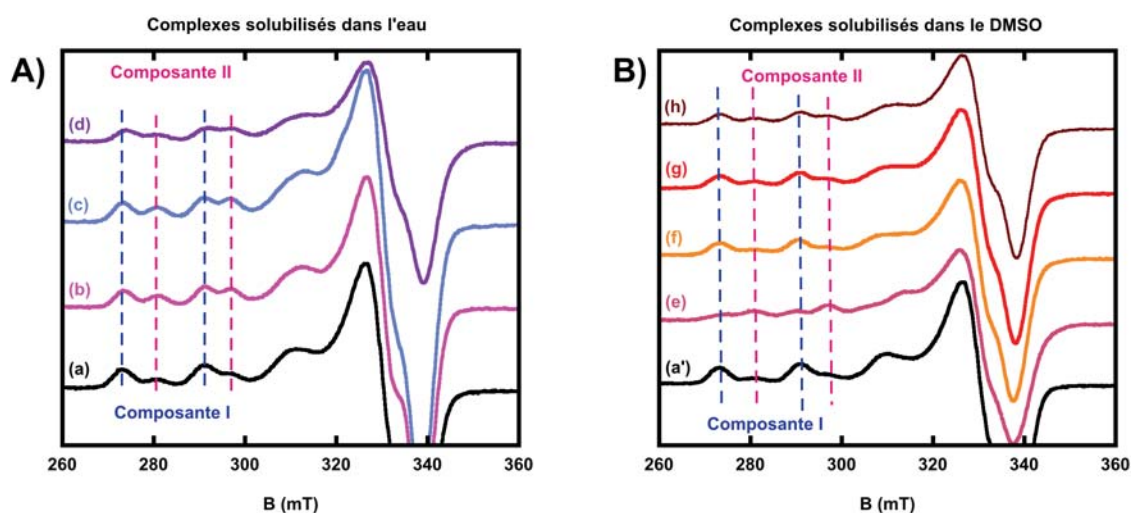


Figure V-14: Signature RPE du complexe A β 28-Cu(II) (a) en présence de DMSO (a'), du Ru(CO)₃Cl(glycinate) (b), Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) (c), du [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ (d), [Ru(CO)₃Cl₂]₂ (e), Ru(CO)₃Cl(CQ) (f), Ru(CO)₃Cl(HQ) (g), Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)_{DMSO} (h). Conditions expérimentales : [A β 28]= 1mM, [Cu(II)]= 1mM, [Ru(II)]= 1mM dans 10mM de tampon Hepes, pH 7,4, 5%DMSO (v/v) et 10% de glycérol (v/v), T= 115K.

La figure V-14, (A) montre les résultats obtenus concernant l'effet des complexes Ru(CO)₃Cl(glycinate), Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) et [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ solubilisé dans l'eau et l'effet des complexes solubilisés dans le DMSO soit [Ru(CO)₃Cl₂]₂, Ru(CO)₃Cl(CQ), Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)_{DMSO} est représenté sur la figure V-14, (B). De la même façon que lors des expériences d'agrégation, la signature spectroscopique du complexe A β 28-Cu(II) est enregistrée en présence de DMSO (courbe a'), panneau B comme contrôle dans les mêmes conditions). Les complexes Ru(CO)₃Cl(glycinate), Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) et [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ (courbes b, c et d, panneau A) modifient la signature RPE de l'espèce A β -Cu(II) avec des proportions différentes (cf Tableau V-6).

<i>Eau</i>	Aβ28	Ru(CO) ₃ Cl(glycinate)	[Ru(CO) ₃ Cl(en)] ⁺ PF ₆ ⁻	Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃)	
Composante I	70	50	50	50	
Composante II	30	50	50	50	
<i>DMSO</i>	Aβ28	[Ru(CO) ₃ Cl ₂] ₂	Ru(CO) ₃ Cl(CQ)	Ru(CO) ₃ Cl(HQ)	Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃)
Composante I	70	25	70	70	70
Composante II	30	75	30	30	30

Tableau V-6: Effet des complexes de Ru(II) sur la coordination du Cu(II).

En effet, la présence de ces complexes entraînent une modification du ratio composante **I**/composante **II** en faveur de la composante **II**. La différence entre la composante **I** et **II** est principalement située au niveau de la coordination des histidines : la composante **I** implique la coordination de deux histidines (His6 et His13 ou His14) tandis que la composante **II** implique un seul résidu histidine (cf Fig. V-13, panneau **A**). Une augmentation de la proportion de la composante **II** indique alors un changement de la coordination du Cu(II) au niveau des résidus histidines et en particulier les complexes Ru(CO)₃Cl(glycinate) et [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ se lient au peptide Aβ via (i) deux noyaux imidazoles ne laissant qu'un seul résidus histidine pour la coordination du Cu(II), (ii) ou un résidu histidine. Dans ce dernier cas, une situation très similaire à celle obtenue avec les mutants possédant une mutation au niveau des histidines est retrouvée (cf Fig. V-15). En effet, le pKa de transition entre la composante **I** et **II** de ces mutants (pKa 7,3 ou 7,5) est diminuée par rapport au peptide natif (pKa 7,8) ^[33].

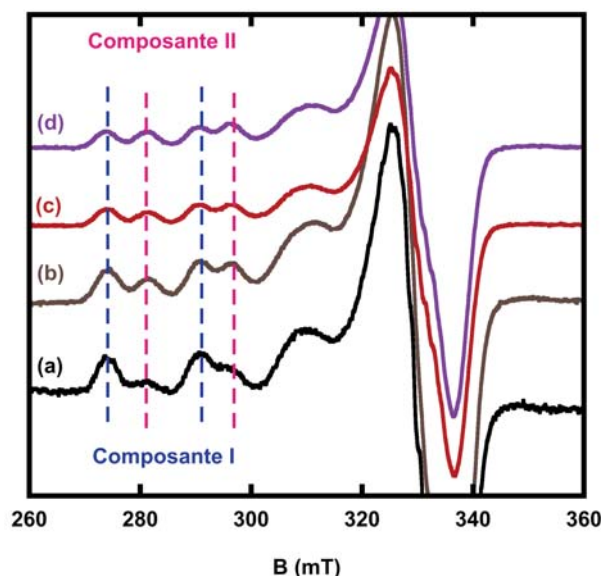


Figure V-15: Effet des mutations au niveau des résidus histidines sur la coordination du Cu(II) au peptide A β à pH 7,4.

Le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ montre un effet différent dans l'eau et le DMSO. En effet, il modifie les proportions des composantes **I** et **II** dans l'eau mais pas dans le DMSO (cf Tableau V-6, p. 176) et donc aurait une influence sur la coordination du Cu(II) dans les deux solvants. Cet effet diffère de ce qui a pu être observé précédemment dans le cas de l'agrégation du peptide A β 28 déclenchée par le Zn(II), le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$ était plus actif que le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ (cf § V-B-2, p. 171). Il est alors nécessaire d'étudier l'interaction $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ -A β 28 par d'autres techniques spectroscopiques. Le résultat de ces études est présenté dans le paragraphe V-D.

Dans le DMSO, les complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ ne modifient pas la signature RPE du complexe A β -Cu(II) (panneau **B**, courbe **f** et **g**) contrairement au complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (courbe **e**). La présence de ce dernier favorise fortement la formation de la composante **II**, la composante **I** étant très peu présente. De la même façon que les complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$, le dimère de Ru(II) semble se lier au peptide via au moins un des résidus histidines. De plus, la faible présence de la composante **I** indique une réactivité plus importante du complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ par rapport aux autres complexes étudiés vis-à-vis de la coordination du Cu(II) au peptide A β .

V-C-3 Effet des complexes de Ru(II) sur l'agrégation induite par le Zn(II) et la coordination du Cu(II) au peptide A β 28 : bilan

Le but recherché dans l'utilisation de complexes de Ru(II), dans le cadre de la MA, est leur possible capacité à modifier la coordination des ions métalliques (Cu(II) et Zn(II)) et les effets délétères associés (production de ROS catalysée par le Cu(II) et agrégation induite par le Cu(II) et le Zn(II)). Pour répondre à cette question, l'effet des complexes de Ru(II) sur la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 induite par le Zn(II) a été mesuré par spectroscopie de fluorescence. Il est important de noter que cette expérience nous renseigne sur la coordination du Zn(II) de façon indirecte. Evaluer directement l'effet des complexes de Ru(II) synthétisés sur la coordination du Zn(II) nécessite l'utilisation de la spectroscopie RMN et/ou des expériences d'absorption des rayons X comme le XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). Ces deux techniques sont principalement utilisées pour sonder l'environnement du Zn(II). Le Zn(II) possède une couche de valence pleine (d^{10}) et il est donc silencieux pour une majorité de techniques spectroscopiques. La plupart des complexes de Ru(II) étudiés ont montré un effet (inhibition ou un ralentissement) sur la cinétique d'agrégation du peptide A β 28 (cf. Tableau V-5, p. 173). Ceci peut traduire une modification de la coordination du Zn(II) au peptide A β 28. Seuls les complexes $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ semblent inactifs vis-à-vis de l'agrégation du peptide.

Contrairement à l'expérience de fluorescence qui renseigne de façon indirecte sur la coordination du Zn(II), les modifications de la coordination du Cu(II) au peptide causées par la présence des complexes de Ru(II) sont directement visibles par spectroscopie RPE du Cu(II). Ainsi, certains des complexes de Ru(II) ($\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$, $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$) ont peu voire pas d'effet sur la coordination du Cu(II) au peptide A β . Les autres complexes modifient la coordination du Cu(II) en favorisant la proportion de la composante **II** par rapport à la composante **I** à pH 7,4. Ce qui indique que ces complexes se lient au moins par un des résidus histidines du peptide.

Seuls les complexes $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ semblent capables de modifier la coordination du Zn(II) et du Cu(II) en se liant vraisemblablement au peptide via au moins un résidu histidine.

Afin de mieux comprendre l'effet des complexes de Ru(II) sur la coordination du Cu(II) et du Zn(II), nous avons étudié l'interaction des complexes de Ru(II) avec le peptide A β 28 a alors été étudiée par spectroscopie RMN ^1H et spectrométrie masse.

V-D Coordination des complexes au peptide A β

La première partie de ce paragraphe concerne l'interaction entre les complexes Ru(CO) $_3$ Cl(Glycinate), Ru(CO) $_3$ Cl(HQ.SO $_3$), [Ru(CO) $_3$ Cl(en)] $^+\text{PF}_6^-$ et le peptide A β 28 étudiée par spectroscopie RMN ^1H et spectrométrie de masse (dans l'eau). De même la seconde partie présente les résultats des études RMN et de masse obtenus concernant l'interaction des complexes Ru(CO) $_3$ Cl(HQ), Ru(CO) $_3$ Cl(CQ) et Ru(CO) $_3$ Cl(HQ.SO $_3$) $_{\text{DMSO}}$ avec le peptide A β 28 (en présence de DMSO). Dans chacune des études présentées, la réactivité du complexe [Ru(CO) $_3$ Cl $_2$] $_2$ vis-à-vis du peptide A β 28 est également évaluée.

Dans les expériences présentées, les échantillons sont préparés de la même façon pour les deux techniques à savoir incubation du peptide en présence du complexe pendant 12h, sous agitation vigoureuse à 37°C de façon à favoriser l'interaction peptide-complexe et le départ des ligands glycinate, éthylène diamine et hydroxyquinolate pour avoir un effet thérapeutique supplémentaire par la coordination des ions Cu(II) et Zn(II) .

V-D-1 Etude par RMN ^1H et spectrométrie de masse de l'interaction des complexes hydrosolubles avec le peptide A β 28

V-D-1-a Etude par spectroscopie RMN ^1H

Cette étude est réalisée dans les mêmes conditions de concentration, tampon, pH et température que les expériences de fluorescence. Le Ru(II) est de configuration électronique d^6 et il est diamagnétique ce qui permet son étude par spectroscopie RMN. Un déblindage des signaux des acides aminés directement impliqués dans sa sphère de coordination est attendu du fait de l'appauvrissement électronique lors de la liaison au métal.

L'ajout des différents complexes hydrosolubles sur le peptide Aβ28 ne semble pas avoir d'effet sur le spectre RMN. Cependant, nous pouvons observer sur la figure V-16, panneau A que le complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) libère de la glycine en solution (spectres **d** et **e**). Cette libération de glycine est plus importante en présence de peptide Aβ28 (spectres **c** et **e**). De la même façon, le complexe [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ (Fig. V-16, panneau B) ne libère pas son ligand éthylène diamine (spectres **d** et **e**) en solution dans l'eau mais seulement en présence de peptide (spectres **c** et **e**). Contrairement à ces derniers, le complexe Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) (Fig. V-16, panneau C) ne libère pas son ligand en présence de peptide mais son ajout sur le peptide Aβ28 (spectres **a** et **c**) provoque un élargissement des signaux sur l'ensemble du spectre (cf Fig. V-21, p. 188).

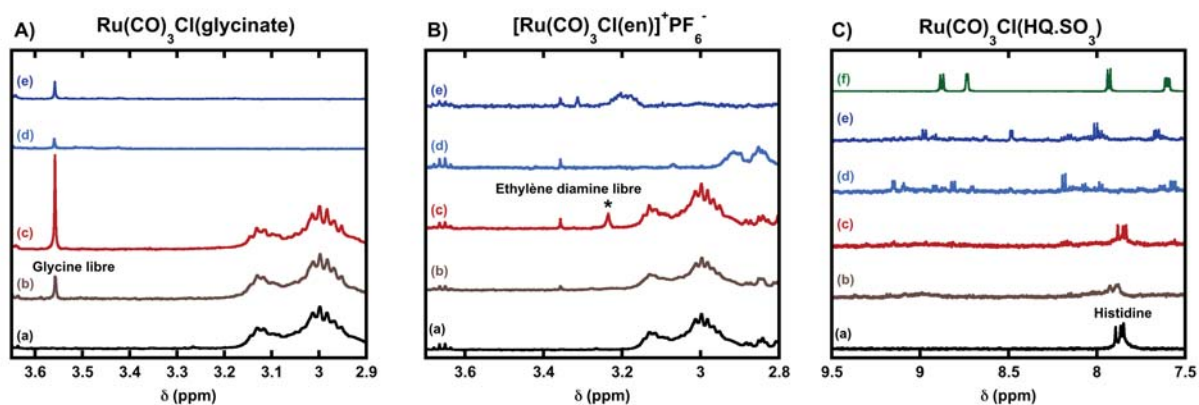


Figure V-16: Effet des complexes de Ru(II) solubilisés dans l'eau sur le spectre RMN ¹H du peptide Aβ28. Le panneau A) correspond à l'effet du complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate), B) [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ et C) Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) avec (a) peptide Aβ28 seul, (b) en présence du complexe à t=0, (c) en présence du complexe après 24h d'incubation à 37°C, (d) le complexe seul à t=0 et (e) après 24h d'incubation à 37°C, (f) le ligand seul. Conditions expérimentales : [Aβ28]= 500 μM, [Ru(II)]= 500μM dans 10mM de tampon phosphate, pH 7,4, T=25°C.

Il semble alors surprenant de voir si peu d'effet de l'ajout des complexes de Ru(II) sur le peptide sur les spectres RMN sachant que le départ des ligands glycinate et éthylène diamine libèrent deux positions disponibles pour la coordination du Ru(II) au peptide. Par ailleurs, l'élargissement des signaux du peptide suite à l'addition du complexe Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) suggère la formation d'un adduit peptide-Ru(II). Une étude préliminaire avec le peptide Aβ16 en présence du Ru(CO)₃Cl(glycinate) a été réalisée afin d'essayer d'avoir plus d'informations concernant l'interaction peptide-Ru(II) (Fig. V-17).

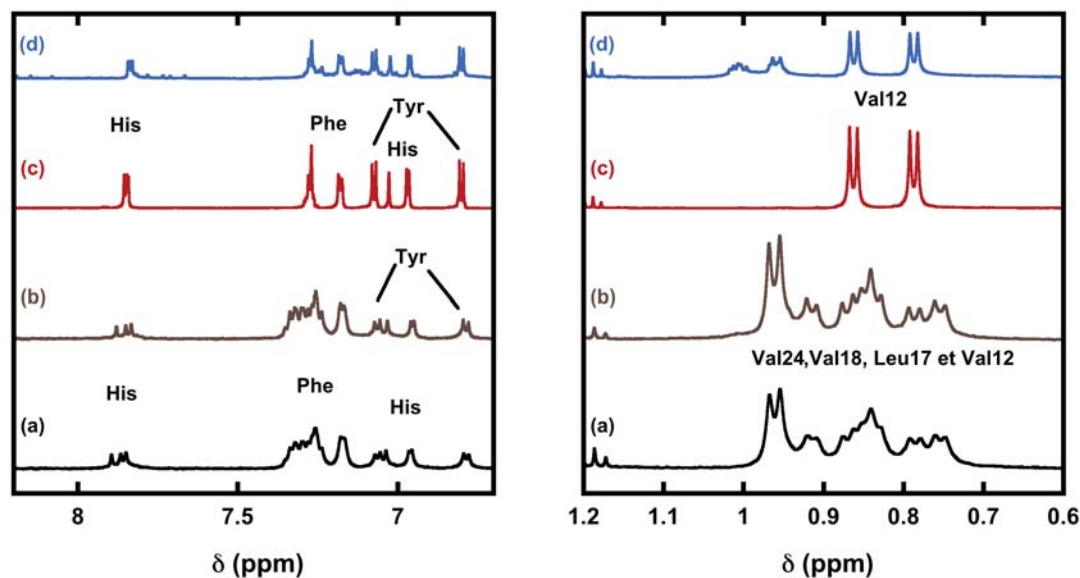


Figure V-17: Effet du complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ sur les peptides A β 16 et A β 28 au niveau de la zone des Valines (panneau de droite) et des aromatiques (panneau de gauche). Le spectre (a) et (c) représente le peptide A β 28 et A β 16 seul respectivement et (b) et (d) en présence du complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$. Conditions expérimentales : $[\text{A}\beta] = 500 \mu\text{M}$, $[\text{Ru}(\text{II})] = 500 \mu\text{M}$ dans 10mM de tampon phosphate, pH 7,4, $T = 25^\circ\text{C}$.

L'ajout du complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ sur le peptide A β 16 provoque une perte de signal sur l'ensemble des signaux du peptide (cf diagramme V-18 sur lequel est indiqué, en fonction des acides aminés, le rapport entre l'aire des signaux du peptide complexé avec l'aire du peptide seul) avec un effet plus ou moins marqué selon les résidus et plus particulièrement au niveau des histidines. De plus, un dédoublement des signaux de la Val12 (Fig. V-18, panneau de droite) est observé. La valine étant voisin de l'histidine 13, ces données suggèrent que le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ se coordine au peptide via les résidus histidines.

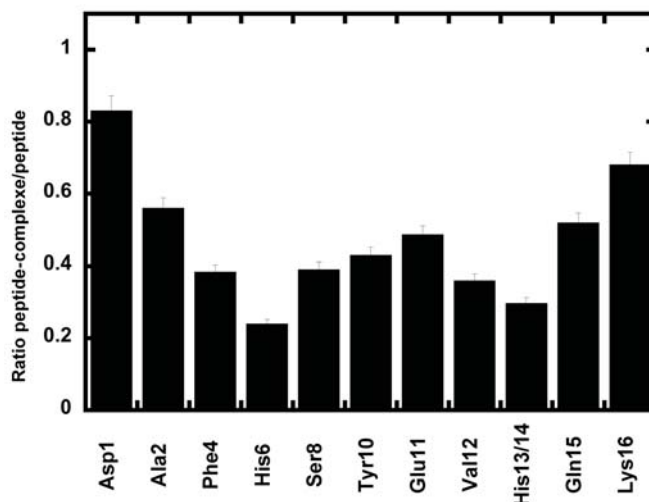


Figure V-18: Effet du complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) sur les signaux du peptide A β 16. L'axe des ordonnées représente le rapport entre l'aire des signaux du peptide A β 16 en présence de complexe avec l'aire des signaux du peptide seul.

A l'heure actuelle, il n'y a pas d'explication évidente quant aux différences, entre le peptide A β 16 et A β 28, observées suite à l'ajout des complexes de Ru(II).

V-D-1-a Etude par spectrométrie de masse : HPLC/MS

La spectrométrie de masse couplée LC va nous permettre d'identifier les adduits Ru(II)-peptide et également déterminer le taux de coordination du Ru(II) au peptide. Le peptide libre et le peptide lié au complexe de Ru(II) sont séparés sur colonne HPLC avant l'analyse par ESI-MS qui permet de déterminer les différents états de protonation du peptide libre et complexé au Ru(II). Les changements de masse observés entre le peptide libre et le peptide complexé mènent la nature de l'adduit peptide-Ru(II) comme dans le cas de l'interaction A β 28 (Fig. V-19, panneau de gauche) avec le complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) (Fig. V-19, panneau de droite). Le spectre de masse (Fig. V-19, panneau de droite) du peptide complexé au Ru(II) indique une augmentation de masse de 157 uma ce qui correspond à la formation de l'espèce [Ru(CO)₂]²⁺ suite à la perte des ligands glycinate et chlorure ainsi qu'un ligand carbonyle.

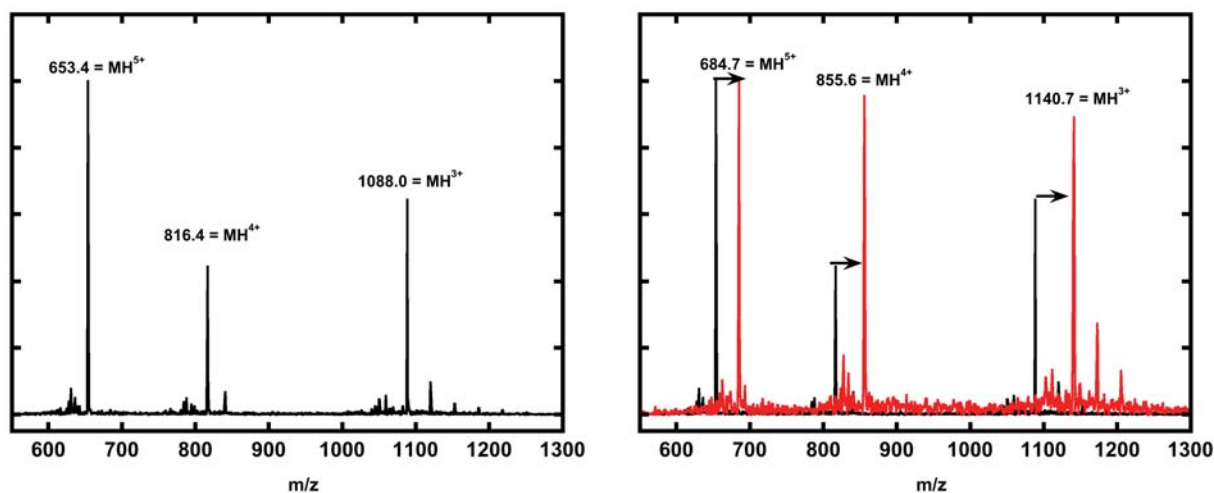


Figure V-19: Spectre de masse du peptide A β 28 seul (panneau de gauche) et en présence du complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) (panneau de droite) après séparation sur colonne HPLC. Conditions expérimentales : [A β 28]= 50 μ M, [Ru(II)]= 50 μ M dans 0,8 mM de tampon (NH₄)₃PO₄, pH 7,4, T=25°C.

Le taux de complexation correspond à l'aire du pic du peptide non complexé avec l'aire du pic du peptide témoin enregistré dans exactement les mêmes conditions soit $[1 - A_{A\beta cplx}/A_{A\beta control}]$ ($A_{A\beta cplx}$ est l'aire résiduel du peptide A β 28 non complexé au Ru(II) et $A_{A\beta control}$ l'aire du peptide A β 28 seul). Les résultats sont résumés dans le tableau V-7.

Une étude similaire a été réalisée avec un complexe cyclométallé de Pt(II) et a permis d'identifier les sites de coordination au peptide A β 28 ^[6]. Par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS), il a en effet été possible d'identifier le Glu11 et l'His13 comme sites principaux de liaison aux complexes de Pt(II).

Complexe de Ru(II) (Δm attendu)	t_r (min)	m/z (charge) Théorique ^a	m_{exp} ^b (uma)	Δm_{exp} ^c (uma)	Adduit formé	Taux de complexation (%) ^d
Aβ28 seul	12.3	1631.4 ²⁺ 1088.0 ³⁺ 816.4 ⁴⁺ 653.4 ⁵⁺	3263 ± 2	-	-	-
Ru(CO) ₃ Cl(glycinate) (157)	13.53	1710.1 ²⁺ 1140.7 ³⁺ 855.6 ⁴⁺ 684.7 ⁵⁺	3419 ± 4	156	Aβ-Ru(CO)₂	65 ± 10
[Ru(CO) ₃ Cl(en)] ⁺ PF ₆ ⁻ (157)	13.7	1710.9 ²⁺ 1140.7 ³⁺ 855.5 ⁴⁺ 684.8 ⁵⁺	3418 ± 7	155	Aβ-Ru(CO)₂	30 ± 10
Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃) (380.9 et 388.9)	13.03, 13.80	1215.4 ³⁺ 911.9 ⁴⁺ 729.5 ⁵⁺	3641 ± 11	379	Aβ- Ru(HQ.SO₃)(CO)₂ 63%	48 ± 10
	12.71	1221.0 ³⁺ 915.4 ⁴⁺ 732.8 ⁵⁺	3657 ± 25	395	Aβ- Ru(HQ.SO₃)(CO)Cl 27%	

^a Ratio masse/charge expérimental des ions multichargés du peptide Aβ28 et du complexe Aβ28/Ru

^b Masse expérimentale calculée à partir des incertitude données avec un intervalle de confiance de 95%

^c Le changement de masse est calculé à partir de la masse moyenne du Ru(II)

^d Taux de complexation calculé à partir de la formule explicitée ci-dessus.

Tableau V-7: Tableau récapitulatif des adduits Aβ-Ru(II) formés ainsi que des taux de complexation au peptide.

D'après le tableau, nous pouvons noter que les complexes Ru(CO)₃Cl(glycinate) et [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ perdent leurs ligands glycinate, éthylène diamine ainsi que le chlorure et un carbonyle. Ceci signifie que ces complexes vont avoir 4 positions libres disponibles pour la coordination au peptide.

Les taux de complexation au peptide Aβ28 de l'ordre de 60% pour le complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) et de 30% pour le complexe [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻ sont en accord avec les données RMN (Fig. V-16, p. 180). En effet, nous avons vu dans le paragraphe précédent que ce complexe se liait au peptide dans des proportions moins importante que le Ru(CO)₃Cl(glycinate) de par une libération moins importante du ligand éthylène diamine en présence du peptide comparativement au ligand glycinate (cf Fig. V-16, p. 180).

En ce qui concerne le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ et contrairement aux complexes cités précédemment, il n'y a pas de relargage du ligand en présence du peptide. Deux sites de fixation aux peptides sont obtenus soit par perte d'un carbonyle et d'un chlorure (adduit majoritaire) ou par perte de deux carbonyles (adduit minoritaire). Ces deux adduits complexent 50% du peptide. Ces données sont en accord avec les données RMN (cf. Fig. V-16, p. 180). En effet, les spectres RMN ont montré qu'il n'y avait pas de libération du ligand en présence de peptide. Cependant, un taux de coordination de 50% suggérerait un effet plus important sur les spectres RMN.

Les données obtenues par spectroscopie RMN ^1H et spectrométrie de masse ont montré que les complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ et $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ libèrent leur ligand en présence du peptide ce qui n'est pas le cas du complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$. De plus, les données obtenues avec le peptide Aβ16 suggèrent la coordination du complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ via les résidus histidines du peptide ce qui explique l'effet de ce dernier sur l'agrégation du peptide induite par le Zn(II) (cf Fig. V-12, p. 172) et la modification de la coordination du Cu(II) (cf Fig. V-14, p. 175). Le taux de coordination de 30% du complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ semble suffisant pour modifier la coordination du Cu(II) au peptide Aβ28 (cf Fig. V-14, p. 175) mais trop faible pour avoir un effet sur l'agrégation induite par le Zn(II) (cf Fig. V-12, p. 175). En, effet, il reste alors 70% de peptide disponible pour 50% de Zn(II). L'ensemble des données obtenues par spectroscopie de fluorescence, RPE, RMN ^1H et spectrométrie de masse concernant les complexes de Ru(II) solubilisés dans l'eau sont résumées dans le tableau V-7. Ces données préliminaires sont encourageantes mais il est nécessaire d'étudier l'interaction entre les complexes de Ru(II) et le peptide Aβ16 par spectroscopie RMN et ESI-MS.

Complexes	Taux de complexation (%)	Coordination au peptide	Effet sur l'agrégation (+ ou -)	Coordination du Cu(II) (% composante I/II)
Ru(CO) ₃ Cl(glycinate)	60	Libération glycinate	+	50/50
[Ru(CO) ₃ Cl(en)] ⁺ PF ₆ ⁻	30	Libération éthylène diamine	-	50/50
Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃)	48	Elargissement	-	70/30

Tableau V-8: Tableau récapitulatif de l'effet des complexes de Ru(II) solubilisés dans l'eau sur le peptide A β 28 ainsi que sur l'agrégation induite par le Zn(II) et sur la coordination du Cu(II) au peptide.

V-D-2 Etude par RMN ¹H et masse des complexes solubilisés dans le DMSO avec le peptide A β 28

Dans cette seconde partie, les résultats concernant l'interaction des complexes Ru(CO)₃Cl(CQ), Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)_{DMSO} avec le peptide A β 28 étudiée par spectroscopie RMN ¹H et spectrométrie de masse vont être présentés.

V-D-2-a Etude par RMN ¹H

Seule la partie aromatique des spectres est représentée ici, les complexes Ru(CO)₃Cl(CQ), Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) possédant des ligands aromatiques, si ces derniers sont libérés en présence du peptide, ils seront directement visibles dans cette zone (Fig.V-20). A titre de comparaison, le spectre du peptide en présence du [Ru(CO)₃Cl₂]₂ (courbe **(b)**) est également représenté.

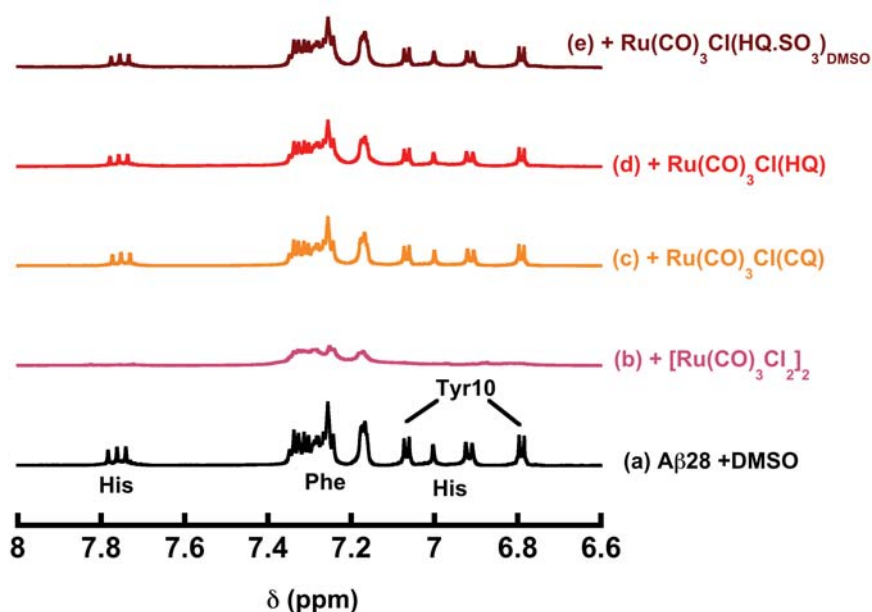


Figure V-20: Zone aromatique du peptide Aβ28 en présence de DMSO (a), du complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (b), $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ (c), $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ (d) et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$ (e). Conditions expérimentales : $[\text{A}\beta]=500\mu\text{M}$, $[\text{Ru}(\text{II})]=500\mu\text{M}$ dans 10mM de Tampon phosphate pH 7,4.

Il n'y a aucun signe de l'ajout du complexe sur le peptide si ce n'est un élargissement (assez faible) des signaux sur l'ensemble du spectre sans perte de signal comme montré sur la zone des valines du peptide Aβ28 (cf Fig. V-21) suite à l'ajout du complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$. Par contre cet effet est sélectif sur le peptide, les signaux de l'éthanol et du TSP ne sont pas affectés (cf Fig. V-21, encadré). Par ailleurs, contrairement au complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$, l'effet des complexes sur le peptide Aβ28 n'est pas sélectif des résidus (les histidines ne semblent pas plus affectées par rapport au reste du peptide).

La figure V-20 indique que les complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$ (spectre (c)), $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ (spectre (d)) et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$ (spectre (e)) ne perdent pas leur ligand en présence de peptide.

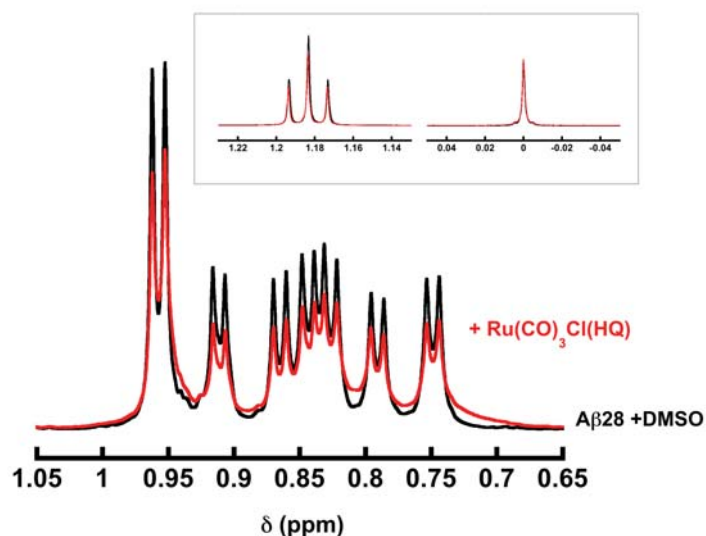


Figure V-21: Représentation de l'élargissement des signaux dans la zone aliphatique du peptide A β 28 (noir) suite à l'ajout du complexe Ru(CO)₃Cl(HQ) (rouge). Les signaux de l'étalon interne (TSP) ainsi que de l'éthanol sont représentés dans l'encadré. Conditions expérimentales : [A β]=500 μ M, [Ru(II)]=500 μ M dans 10mM de Tampon phosphate pH 7,4.

Ces résultats sont inattendus. En effet, ces complexes ont un effet sur l'agrégation du peptide A β 28 (sauf le complexe Ru(CO)₃Cl(CQ)) ce qui pourrait induire une modification de la coordination du Zn(II). Cependant ces complexes ne modifient pas la coordination du Cu(II). Il est alors possible que l'interaction entre les complexes de type hydroxyquinoléine (solubilisés dans le DMSO) et le peptide A β 28 soit faible et donc qu'il n'y ait pas de liaisons de coordination entre le Ru(II) et le peptide.

Dans le but de mieux comprendre le mode de coordination de ces complexes au peptide A β 28 des expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées.

V-D-2-b Etude par spectrométrie de masse : HPLC/MS

Le tableau V-9 présente les résultats obtenus concernant l'interaction des complexes [Ru(CO)₃Cl₂]₂, Ru(CO)₃Cl(CQ), Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃)_{DMSO} avec le peptide A β 28 étudiée par HPLC-MS.

Complexes de Ru(II) (Δm attendu)	t_r (min)	m/z (charge) Théorique	m_{exp}^a	Δm_{exp}^b	Adduits formés ^c (% de présence)	Taux de complexation ^d
A β 28 seul	12.9	1631.5 ²⁺ 1088.6 ³⁺ 816.3 ⁴⁺ 653.3 ⁵⁺	3262 ± 4	-	-	-
Ru(CO) ₃ Cl(CQ) (539.8 et 433.8)	13.21	1267.5 ³⁺ 951.2 ⁴⁺ 761.1 ⁵⁺	3802 ± 10	540	Aβ-Ru(CQ)(DMSO)(CO)₂ 58%	47 \pm 10
	13.7	1232.2 ³⁺ 924.6 ⁴⁺ 739.7 ⁵⁺	3693 ± 10	431	Aβ-Ru(CQ)(CO) 42%	
Ru(CO) ₃ Cl(HQ) (379.9 et 301.9)	13.13	1213.8 ³⁺ 910.5 ⁴⁺ 728.6 ⁵⁺	3637 ± 2	375	Aβ-Ru(HQ)(DMSO)(CO)₂ 62%	47 \pm 10
	13.50	1188.1 ³⁺ 891.5 ⁴⁺ 713.2 ⁵⁺	3561 ± 11	299	Aβ-Ru(HQ)(CO)₂ 38%	
Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃), DMSO (380.9 et 458.9)	13.04	1241.1 ³⁺ 930.8 ⁴⁺ 744.8 ⁵⁺	3716 ± 4	454	Aβ- Ru(HQ.SO₃)(DMSO)(CO)₂ 65%	63 \pm 10
	13.23	1215.1 ³⁺ 911.1 ⁴⁺ 729.1 ⁵⁺	3637 ± 10	379	Aβ-Ru(HQ.SO₃)(CO)₂ 35%	
CORM-2	12.97	1140.4 ³⁺ , 855.3 ⁴⁺ , 684.3 ⁵⁺	3414 ± 1	152	Complexe 1	81 \pm 10
	12.85	1165.7 ³⁺ , 874.2 ⁴⁺ , 700.0 ⁵⁺	3496 ± 26	234	Complexe 2	

^a Ratio masse/charge expérimental des ions multichargés du peptide A β 28 et du complexe A β 28/Ru

^b Masse expérimentale calculée à partir des ; incertitude données avec un intervalle de confiance de 95%

^c Le changement de masse est calculé à partir de la masse moyenne du Ru(II)

^d Taux de complexation calculé à partir de la formule explicitée ci-dessus.

Tableau V-9: Masses expérimentales des complexes Ru(II)-A β 28 et leur taux de complexation au peptide.

Ces résultats nous donnent plusieurs informations. Pour commencer, nous pouvons noter que le complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ réagit très fortement avec le peptide (taux de complexation de ~ 80%). Cependant, la nature exacte des espèces formées avec le peptide n'a pu être déterminée à cause du grand nombre de coordinations possibles d'où la notation complexe 1 et complexe 2.

De plus, les complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$, $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$ possèdent un taux de coordination au peptide de l'ordre de 50% et ils gardent leur ligand en accord avec ce qui a été observé par RMN. Par ailleurs, le DMSO n'est pas un solvant innocent puisqu'il se coordine au Ru(II) pouvant ainsi en modifier la réactivité. Deux adduits sont détectés $\text{A}\beta\text{-Ru}(\text{CO})_2(\text{DMSO})(\text{XQ})$, le complexe ne possède qu'un site de liaison au peptide et l'adduit $\text{A}\beta\text{-Ru}(\text{CO})_2(\text{XQ})$, le complexe possède alors deux sites de coordination au peptide. Dans le cas du complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$, un adduit de type $\text{A}\beta\text{-Ru}(\text{CO})(\text{CQ})$ est détecté ce qui offre 3 sites de liaison au peptide. De plus, le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)_{\text{DMSO}}$ réagit plus fortement avec le peptide (~ 60% de taux de complexation) que dans le cas où il est solubilisé dans l'eau (taux de complexation 48% , cf Tableau V-9). Comme pour le complexe solubilisé dans l'eau, un taux de complexation de l'ordre de 60% laisserait entendre un effet plus important sur les spectres RMN.

Les changements de masse observés entre le peptide seul et le peptide complexé au Ru(II) permettent d'identifier les adduits formés mais pas le mode de coordination des complexes de Ru(II) au peptide. Un même adduit pouvant avoir différents modes de coordination. Or ces modes de coordination n'auront pas les mêmes déplacements chimiques en RMN. Ces données nous indiquent que les complexes possédant un ligand de type hydroxyquinolate se lient au peptide après libération d'un ligand carbonyle et du ligand chlorure (partiellement remplacé par le DMSO).

Contrairement aux complexes $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ qui en se liant au peptide via les résidus histidines modifient ainsi la coordination des ions métalliques, les complexes $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{CQ})$, $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ})$ et $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ possèdent les mêmes effets (cf Tableau V-10) mais pas pour les mêmes raisons puisqu'ils ne semblent pas se lier pas de façon préférentielle au peptide ce qui rend l'identification des sites de coordination impossible. Une hypothèse serait alors que ces effets sont certainement dus à la présence de ligand aromatique qui n'est pas libéré en présence du peptide et qui va pouvoir interagir avec les résidus aromatiques du peptide (His, Tyr et Phe) par des interactions de type π -stacking.

Un moyen de confirmer cette hypothèse est de réaliser les études en agrégation et par RPE en présence du ligand seul. Ceci n'est pas possible étant donné que ces ligands sont des chélateurs des ions métalliques, il y aura alors coordination du Zn(II) et du Cu(II). De plus, la présence de ces complexes peut gêner la coordination des ions métalliques par encombrement stérique.

Complexes	Taux de complexation (%)	Coordination au peptide	Effet sur l'agrégation (+ ou -)	Coordination du Cu(II) (% composante I/II)
[Ru(CO) ₃ Cl ₂] ₂	81	Par les Histidines	+	20/80
Ru(CO) ₃ Cl(CQ)	47	Elargissement	-	70/30
Ru(CO) ₃ Cl(HQ)	47	Elargissement	+	70/30
Ru(CO) ₃ Cl(HQ.SO ₃) _{DMSO}	47	Elargissement	+	70/30

Tableau V-10: Tableau récapitulatif de l'effet des complexes de Ru(II) solubilisés dans le DMSO sur le peptide A β 28 ainsi que sur l'agrégation induite par le Zn(II) et sur la coordination du Cu(II) au peptide

V-E Bilan

A partir des données obtenues par les différentes techniques spectroscopiques (Tableau V-11), nous pouvons proposer deux mécanismes différents d'interaction des complexes de Ru(II) avec le peptide : le mécanisme 1 implique la perte du ligand et le mécanisme 2 sans perte du ligand.

	Mécanisme 1	Mécanisme 2
Nombre de sites disponibles (ESI-MS)	n=4	n= 1 ou 2
Coordination au peptide (RMN ¹H)	Effet résidu spécifique Complexe Ru(II)-Aβ rigide se manifestant par un échange lent et l'apparition de nouveaux signaux	Effet peptide spécifique Liaison du Ru(II) à différents endroits et/ou modification de la dynamique du peptide en échange rapide avec un élargissement des signaux du peptide.
Effet sur l'agrégation (coordination du Zn(II))	Modification de la coordination du Zn(II) avec un effet important sur l'agrégation	Effet modéré sur l'agrégation Interaction faible avec modification de l'enroulement du peptide
Coordination du Cu(II)	Modification coordination du Cu(II) Liaison du Ru(II) via au moins deux histidines	Pas de modification de la coordination du Cu(II) Liaison du Ru(II) via une histidine.

Tableau V-11: Tableau résumant les mécanismes 1 et 2 selon que le complexe libère son ligand en présence du peptide.

Le premier mécanisme (Fig. V-22) implique la perte du ligand glycinate ou éthylène diamine. La libération du ligand couplée à la perte du ligand chlorure (et carbonyle) conduit à la formation de l'espèce $[\text{Ru}(\text{CO})_3]^{2+}$ qui va pouvoir se lier au peptide via trois (ou quatre) positions libres aux résidus histidines (en accord avec les données ESI-MS et RMN ¹H). Le

complexe $A\beta$ -Ru(CO)₃ est figé dans une seule configuration. La liaison de cette espèce va se traduire par une modification de la coordination du Cu(II) (résultats de RPE) et un effet important sur l'agrégation indiquant une modification de la coordination du Zn(II) (résultats de fluorescence).

Dans le second mécanisme, il n'y a pas de libération des ligands de type hydroxyquinoléine ce qui ne laisse qu'une à deux positions disponibles pour la liaison au peptide via la perte du ligand chlorure et/ou carbonyle (données obtenues par ESI-MS). De plus, il ne semble pas y avoir de sites de coordination privilégiés comme dans le cas du mécanisme 1. Ceci se traduit par la présence de différentes configurations c'est-à-dire que le complexe de Ru(II) peut se coordonner au peptide à différents endroits de la séquence. De plus, dans les complexes de type $A\beta$ -Ru(XQ)(CO)₃, le peptide n'est pas figé. Il va y avoir un échange rapide qui va se traduire par un élargissement des signaux du peptide détectés par spectroscopie RMN 1H. L'interaction entre le complexe de Ru(II) et le peptide est faible ce qui entraîne un effet modéré sur l'agrégation induite par le Zn(II). Cette interaction n'est pas suffisante pour modifier la coordination du Cu(II). Il est alors probable que le complexe se lie au peptide via un seul résidu histidine.

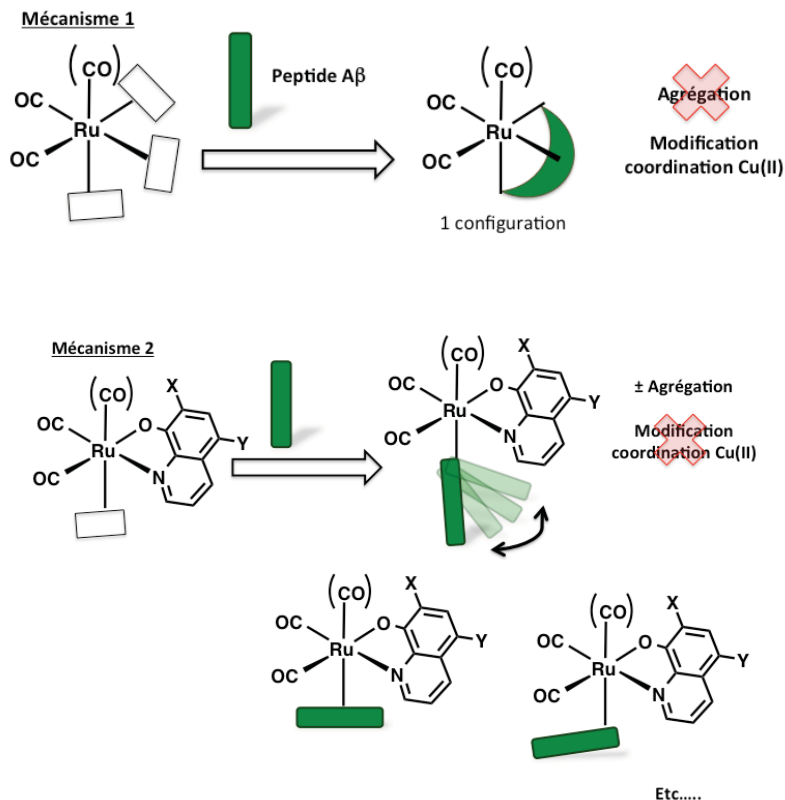


Figure V-22: Illustration des mécanisme 1 (en haut) et 2 (en bas) selon la libération du ligand en présence du peptide.

Conclusion et perspectives

Notre objectif était de synthétiser des complexes de Ru(II) capables de se lier spécifiquement aux ligands des ions Cu(II) et Zn(II) du peptide A β 28 (histidines et amine terminale) afin d'empêcher la coordination de ces ions métalliques qui jouent un rôle important dans les processus d'agrégation et de toxicité du peptide A β . Dans ce contexte, nous avons synthétisé cinq complexes : Ru(CO)₃Cl(glycinate), Ru(CO)₃Cl(CQ), Ru(CO)₃Cl(HQ), Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) et [Ru(CO)₃Cl(en)]⁺PF₆⁻. L'obtention de ces complexes est relativement aisée sauf pour le complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) qui n'a pu être isolé de façon exclusive.

La capacité de ces complexes ainsi que du [Ru(CO)₃Cl₂]₂ à empêcher l'agrégation du peptide A β 28 induite par le Zn(II) et à modifier la coordination du Cu(II) au peptide A β 28 ont été évaluées. Le complexe [Ru(CO)₃Cl₂]₂ a montré une réactivité suffisante pour inhiber l'agrégation du peptide A β 28 et modifier la coordination du Cu(II). Cependant, il est nécessaire d'apporter des modifications structurales afin de le vectoriser. En effet, ce complexe n'est entouré que de CO et Cl ce qui ne lui confère pas une spécificité pour le peptide A β . Il est fort possible que ce complexe réagisse avec n'importe quelle molécule biologique.

Les complexes Ru(CO)₃Cl(glycinate), Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) (solubilisé dans l'eau ou le DMSO) ont montré les mêmes effets mais dans des proportions moindres. La coordination de ces complexes au peptide A β 28 a ensuite été étudiée par spectroscopie RMN ¹H et spectrométrie de masse. Nous avons ainsi pu établir que le complexe Ru(CO)₃Cl(glycinate) modifie la coordination du Cu(II) et induit un ralentissement de l'agrégation induite par le Zn(II) ce qui suggère une coordination du complexe via au moins l'un des résidus histidines. Les complexes Ru(CO)₃Cl(HQ) et Ru(CO)₃Cl(HQ.SO₃) présentent les mêmes effets mais ceux-ci semblent plutôt dus à la présence d'un ligand aromatique. Il est possible de classer les complexes de Ru(II) selon leur réactivité allant du mécanisme 1 à 2 (cf Fig. V-23).

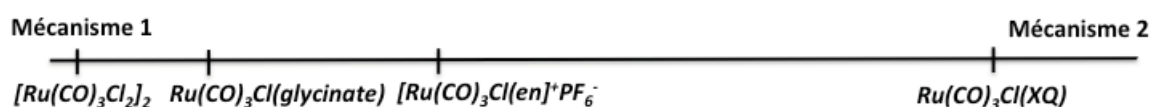


Figure V-23: Classification des complexes de Ru(II) en fonction qu'ils suivent le mécanisme 1 ou 2.

Ces résultats sont encourageants dans le cadre d'une utilisation de complexe à base de Ru(II) comme agent actif contre la MA mais il reste encore certains points à améliorer et vérifier.

Dans l'introduction, nous avons vu que le Cu(II) joue un rôle important dans la maladie d'Alzheimer en favorisant l'agrégation du peptide et en catalysant la production de ROS. Il sera donc intéressant d'évaluer l'effet des complexes de Ru(II) sur la production de ROS ainsi que sur l'agrégation du peptide A β 28 en présence de Cu(II). De plus, la réaction des complexes de Ru(II) avec le peptide n'est pas totale ce qui laisse une certaine quantité de peptide disponible pour le Zn(II) et le Cu(II). Il semble cependant nécessaire de réaliser de nouvelles études en présence de quantité plus importante de complexes.

Par ailleurs, le manque de réactivité observé de certains complexes peut s'expliquer par une forte stabilité dans le milieu réactionnel. Une alternative consisterait à modifier le ligand par exemple en utilisant des ligands monodente comme le NH₃ ou modifier le ligand bidenté en utilisant par exemple de la β -alanine ou la propane diamine. Ces ligands vont former un cycle à 6 avec le centre métallique qui sera moins stable et potentiellement plus réactif que les cycles à 5 formés par la glycine ou l'éthylène diamine. Des essais ont déjà été menés dans ce sens mais l'obtention de ce type de complexe est compliquée. En effet, le ligand étant déjà labile pendant la synthèse, il est donc difficile d'obtenir un complexe pur. Nous devons alors faire face à un dilemme entre obtention d'un complexe pur et réactivité.

Nous avons travaillé avec des complexes de type Ru(CO)₃Cl(L) dans lesquels L est un ligand bidenté. Les ligands carbonyles ne sont pas labiles. Une seconde alternative pour améliorer la réactivité des complexes de Ru(II) est d'utiliser des complexes possédant des ligands plus labile comme l'acétonitrile ou le DMSO. En effet, les complexes de type Ru(DMSO)₂Cl₂(L) sont utilisés dans la littérature comme agent anti-cancéreux. L'une des explications quant à leur réactivité est qu'en solution, ils sont capables de perdre une molécule de DMSO et de Cl.

L'approche *prodrug* pourrait également être envisagée comme dans le cas du NAMI-A. L'utilisation d'un complexe de Ru(III) qui serait inactif mais qui une fois en présence du peptide modifie son état d'oxydation et serait alors capable de se lier au peptide et par la suite empêcher la coordination des ions métalliques. Il pourrait également être intéressant de modifier le centre métallique en utilisant l'osmium qui possède des propriétés similaires au Ru(II).

Bibliographie

- [1] C. Hureau, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2164–2174.
- [2] K. J. Barnham, V. B. Kenche, G. D. Ciccotosto, D. P. Smith, D. J. Tew, X. Liu, K. Perez, G. A. Cranston, T. J. Johanssen, I. Volitakis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 6813.
- [3] G. Ma, F. Huang, X. Pu, L. Jia, T. Jiang, L. Li, Y. Liu, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 11657–11666.
- [4] V. B. Kenche, L. W. Hung, K. Perez, I. Volitakes, G. Ciccotosto, J. Kwok, N. Critch, N. Sherratt, M. Cortes, V. Lal, C. L. Masters, K. Murakami, R. Cappai, P. A. Adlard, K. J. Barnham, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2013**, *52*, 3374–3378.
- [5] I. Sasaki, C. Bijani, S. Ladeira, V. Bourdon, P. Faller, C. Hureau, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6404.
- [6] F. Collin, I. Sasaki, H. Eury, P. Faller, C. Hureau, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2130.
- [7] J. Reedijk, *Plat. Met. Rev.* **2008**, *52*, 2-11.
- [8] R. J. Sundberg, R. B. Martin, *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 471–517.
- [9] D. Valensin, P. Anzini, E. Gaggelli, N. Gaggelli, G. Tamasi, R. Cini, C. Gabbiani, E. Michelucci, L. Messori, H. Kozłowski, C. Gabbiani, L. Messori, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 4720–4722.
- [10] C. Rodríguez-Rodríguez, M. Telpoukhovskaia, C. Orvig, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2308–2332.
- [11] M. Di Vaira, C. Bazzicalupi, P. Orioli, L. Messori, B. Bruni, P. Zatta, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 3795–3797.
- [12] A. M. Mancino, S. S. Hindo, A. Kochi, M. H. Lim, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 9596–9598.
- [13] B. Alies, E. Renaglia, M. Rózga, W. Bal, P. Faller, C. Hureau, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1501–1508.
- [14] V. Tōugu, P. Palumaa, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2219–2224.
- [15] E. Ferrada, V. Arancibia, B. Loeb, E. Norambuena, C. Olea-Azar, J. P. Huidobro-Toro, *Neurotoxicol.* **2007**, *28*, 445–449.
- [16] C. F. Richard, R. L. Gustafson, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1033–1040.
- [17] R. Motterlini, *Circulation Research* **2002**, *90*, 17e–24.
- [18] R. Alberto, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 1651–1660.
- [19] J. E. Clark, *Circulation Research* **2003**, *93*, 2e–8.
- [20] U. Hasegawa, A. J. van der Vlies, E. Simeoni, C. Wandrey, J. A. Hubbell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18273–18280.
- [21] S. Noël, S. Cadet, E. Gras, C. Hureau, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, DOI 10.1039/c3cs60086f.
- [22] W. E. Klunk, Y. Wang, G. F. Huang, M. L. Debnath, D. P. Holt, C. A. Mathis, *Life Sci.* **2001**, *69*, 1471–1484.
- [23] C. Rodríguez-Rodríguez, N. Sánchez de Groot, A. Rimola, A. Álvarez-Larena, V. Lloveras, J. Vidal-Gancedo, S. Ventura, J. Vendrell, M. Sodupe, P. González-Duarte, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1436–1451.
- [24] A. F. M. Noisier, C. S. Harris, M. A. Brimble, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7744–7746.
- [25] T. R. Johnson, B. E. Mann, I. P. Teasdale, H. Adams, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 1500–1508.
- [26] R. Cini, S. Defazio, G. Tamasi, M. Casolaro, L. Messori, A. Casini, M. Morpurgo, M. Hursthouse, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 79–92.
- [27] A. O. Baghlaif, M. Ishaq, S. S. Al-Juaid, A. M. Asiri, M. N. Arshad, *Acta Cryst.* **2011**, 1–10.
- [28] R. Mishra, D. Sjölander, P. Hammarström, *Mol. Bio. Syst.* **2011**, *7*, 1232.
- [29] C. L. Shen, R. M. Murphy, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 640–651.
- [30] C. Hureau, P. Dorlet, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2175–2187.
- [31] P. Dorlet, S. Gambarelli, P. Faller, C. Hureau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 9273–9276.
- [32] D. Kim, N. H. Kim, S. H. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2012**, *52*, 1139–1142.
- [33] B. Alies, H. Eury, C. Bijani, L. Rechinat, P. Faller, C. Hureau, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 11192–11201.

Conclusion

Conclusion Générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit concernent deux aspects différents de la maladie d'Alzheimer : un aspect mécanistique et un aspect thérapeutique.

L'auto-assemblage des peptides monomériques en agrégats de type amyloïde (nommée agrégation dans ce manuscrit) semble une étape clef dans différentes maladies, y compris la maladie d'Alzheimer. Dans ce dernier cas, le peptide amyloïde- β ($A\beta$) est impliqué. C'est pourquoi un grand nombre de recherches pour mieux comprendre l'agrégation du peptide $A\beta$ sont effectuées. En particulier, moduler l'agrégation du peptide $A\beta$ apparaît comme une voie thérapeutique possible. Les études présentées dans ce manuscrit s'inscrivent dans ce contexte et cette stratégie thérapeutique.

Un aspect central des études présentées ici concerne l'interaction de la Thioflavine T (ThT) avec le peptide $A\beta$. L'intérêt est double. Premièrement, il s'agit de mieux comprendre l'interaction de ce fluorophore, très largement utilisé pour détecter la présence des fibres amyloïdes. Secondement, puisque cette petite molécule organique semble être spécifique des fibres amyloïdes, elle possède un intérêt thérapeutique potentiel pour la détection ou l'inhibition de l'agrégation.

Dans le chapitre II, la ThT, fluorophore le plus utilisé pour étudier la cinétique d'agrégation du peptide $A\beta$ du fait de ses propriétés spectroscopiques particulières en présence de fibres amyloïdes est étudié en présence de peptides monomériques. Nous avons montré que la ThT n'interagit pas seulement avec les espèces fibrillaires mais également avec les formes monomériques du peptide $A\beta$, contrairement à ce qui est communément admis. Cette étude a permis d'identifier, par une expérience NOESY et pour la première fois de façon expérimentale la zone du peptide avec laquelle la ThT interagit (L17-F20). Ces données permettent de mieux comprendre l'interaction ThT- $A\beta$ et permettent d'envisager la synthèse de molécules dérivées de la ThT qui pourront servir de sondes spécifiques dans la détection des stades précoces de la maladie. Ceci est aussi d'intérêt pour le développement de molécules capables de cibler spécifiquement le monomère. En effet, cibler le monomère de façon à inhiber l'agrégation semble une approche prometteuse (et peu investiguée).

Une autre conséquence liée au résultat précédent, à savoir que la ThT interagit avec le peptide $A\beta_{28}$ monomérique, est que la présence de ThT pourrait avoir des conséquences sur la cinétique d'agrégation du peptide. Et en effet, nous avons montré dans le chapitre III que la ThT n'est pas inerte sur la cinétique d'agrégation du peptide $A\beta$. La présence de quantité

importante de ThT favorise l'agrégation du peptide A β induite ou non par le Zn(II). Par ailleurs, l'interaction de la ThT avec le peptide monomérique décrite dans le chapitre II, est appuyée par des données RMN qui indiquent que la ThT interagit avec le peptide avant la formation des fibres. En effet, lors du suivi cinétique par RMN ^1H de l'interaction du peptide et de la ThT dans des conditions d'agrégation, la ThT est consommée plus rapidement que le peptide. Ces résultats devraient être pris en compte dans les expériences d'agrégation de peptides A β effectuées en présence de ThT (au moins à forte concentration), et probablement pour le suivi de l'agrégation d'autres peptides/protéines amyloïdogéniques par fluorescence de la ThT.

Parmi les différents facteurs (température, pH, etc) influençant l'agrégation du peptide A β , la présence de Zn(II) est un paramètre très important. Dans le chapitre III, nous avons montré que le Zn(II) est capable de déclencher et de promouvoir l'agrégation du peptide. Les différentes données obtenues par spectroscopie de fluorescence de la ThT ont démontré qu'il est possible de contrôler la cinétique d'agrégation en maîtrisant la quantité de Zn(II) ajoutée dans l'échantillon. A partir de cette observation, l'étude de l'agrégation en présence de Zn(II) a été réalisée par RMN ^1H dans le but de caractériser les espèces oligomériques intermédiaires de l'agrégation. Lors de cette étude, la formation des oligomères n'est pas directement visible sur les spectres 1D mais se traduit par un changement d'intensité des taches de corrélation NOE (2D). Ce changement d'intensité reflète des modifications de dynamique qui ont lieu au sein du peptide.

Lors de ces études, il a également été observé qu'une très faible quantité de Zn(II) (5% par rapport au peptide) induisait l'agrégation du peptide selon deux voies, chacune d'entre elles étant observable soit par RMN ou soit par spectroscopie de fluorescence de la ThT. Par fluorescence de la ThT, il est possible de suivre la formation des agrégats obtenus rapidement (< 24 heures) et induit par la présence de Zn(II). La quantité de holo-fibres déterminée en conditions non limitante de ThT correspond à la quantité de Zn(II) ajoutée. Par ailleurs, il est possible d'évaluer qu'une ThT interagit avec environ 4 peptides. Par RMN, la formation d'apo-oligomères suivie de la formation plus lente (>4 jours) d'espèces fibrillaires non-déTECTABLES (car de masse moléculaire trop importante) est observée. Plus précisément, ce qui est détecté par RMN ^1H , c'est-à-dire les changements d'intensité des taches de corrélations NOE, correspond à l'agrégation du peptide A β 28 sans Zn(II) qui se fait plus lentement qu'en présence de Zn(II). Lors des différentes études menées par spectroscopie de fluorescence et RMN ^1H , un paramètre important est manquant : le nombre des fibres formées. En effet,

réussir à déterminer quelle quantité de peptide A β est agrégée, sous forme fibrillaire ou amorphe, permettrait de mesurer de façon précise l'influence des conditions expérimentales ainsi que celles du Zn(II) et de la ThT sur l'agrégation du peptide. Pour mieux comprendre le mécanisme proposé ici, à savoir l'agrégation du peptide selon deux voies parallèles, ainsi que pour des mesures quantitatives de la formation de fibres, des expériences supplémentaires sont nécessaires (absorbance de la ThT, suivi RMN avec variation de concentration en Zn(II) etc.).

Comme discuté plus haut, la ThT est une petite molécule qui interagit relativement fortement ($K_d \sim 1 \mu M$) et de façon spécifique avec les fibres amyloïdes, et avec une affinité moins forte (mM) (et une spécificité non déterminée) avec les monomères. Pour cibler les peptides A β monomériques afin d'en inhiber l'agrégation, il faut une affinité plus forte. C'est pour cette raison que dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse et la réactivité de complexes de Ru(II) vis-à-vis du peptide A β . En effet, le Ru(II) peut faire des liaisons de coordination, plus fortes que des liaisons de type hydrogène ou π -stacking, mais moins fortes que les liaisons covalentes. En plus, tout comme le Pt(II), le Ru(II) est cinétiquement inerte ce qui lui confère un temps de résidence sur sa cible suffisamment long pour une action thérapeutique. Les complexes de Ru(II) synthétisés possèdent un ligand bidenté L et sont de formule générale $Ru(CO)_3Cl(L)^{0/+}$ et ont été obtenus plus ou moins facilement. Une fois en présence du peptide, il était attendu que le ligand soit libéré permettant la coordination du Ru(II) au peptide via les sites vacants. Les complexes ont montré des capacités anti-agrégation variables. Par ailleurs, cette propriété n'est pas toujours liée à la libération du ligand bidenté en solution, mais se fait selon différents mécanismes, incluant des interactions de type π -stacking entre ligand et les résidus aromatiques du peptide. Assez logiquement, les complexes les plus réactifs tels que le $Ru(CO)_3Cl(\text{glycinate})$ sont également les plus difficiles à synthétiser et à isoler. Concevoir un complexe facilement isolable et réactif en présence de peptide représente donc un défi. Les résultats préliminaires présentés ici ont montré que l'utilisation de complexes à base de Ru(II) offre une nouvelle possibilité thérapeutique dans la recherche de molécules actives contre l'agrégation du peptide A β liée au développement de la maladie d'Alzheimer. Ces complexes pourront être vectorisés par une molécule spécifique au peptide A β comme la ThT ou un de ses dérivés. Cette molécule pourra être directement liée au centre Ru(II) ou via un espaceur. On pourrait ainsi espérer combiner les avantages des complexes de Ru(II) (forte affinité et inertie cinétique) avec ceux des dérivés de ThT (spécificité vis-à-vis des peptides A β), dans une

unique molécule bi-fonctionnelle et ainsi mieux inhiber l'agrégation du peptide A β en milieu biologique.

Ce travail de thèse a apporté différents éléments de réponse quant au mécanisme de l'agrégation du peptide A β lié à la maladie d'Alzheimer. Ces nouvelles données permettent d'envisager des voies thérapeutiques innovantes et peu explorées jusqu'alors, qui, espérons-le, seront efficaces face à la maladie.

Annexe I : Article

Annexe I

Articles

J'ai effectué mon stage de Master 2 au sein de l'équipe chimie biologique au Laboratoire de Chimie de Coordination. La plupart des études commencées pendant ce stage ont été finalisées au début de ma thèse. De plus, en parallèle des études physico-chimiques menées sur les complexes de Ru(II), j'ai également participé à des études similaires réalisées avec des complexes de Pt(II). Les résultats de ces études ont fait l'objet de publications qui sont présentées ici.

Article 1 : Copper(II) coordination to amyloid β : murine versus human peptide

La partie principale de mes travaux de M2R a consisté en l'étude de la coordination du cuivre par les peptides amyloïdes humain et murin (rat, souris etc.) en relation avec la maladie d'Alzheimer. En effet, des études menées le rat et la souris ont montré qu'ils ne développaient pas la maladie d'Alzheimer. De plus, les peptides humain et murin diffèrent par trois mutations : R5G, Y10F et H13R (de l'humain vers le murin). L'étape de coordination du Cu^{2+} au peptide $\text{A}\beta$ est une des premières étapes de la cascade amyloïde. Il semble donc intéressant d'étudier la coordination du Cu^{2+} au peptide $\text{A}\beta$ murin (m $\text{A}\beta$) afin de mettre en évidence une différence dans la coordination de l'ion cuivrique pour les peptides $\text{A}\beta$ humain (h $\text{A}\beta$) et murin (m $\text{A}\beta$), et ce par différentes techniques spectroscopiques. Dans ce projet, j'ai étudié la coordination du Cu^{2+} aux peptides h $\text{A}\beta$, m $\text{A}\beta$, h $\text{A}\beta$ -R5G, h $\text{A}\beta$ -Y10, h $\text{A}\beta$ -H13R et h $\text{A}\beta$ -R5G-H13R en fonction du pH par différentes techniques spectroscopiques : UV-Visible, Dichroïsme Circulaire (DC), Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) (cf Annexe I-A).

Article 2 : X-ray and solution structures of Cu(II)GHK and Cu(II)DAHK complexes : influence on their redox properties

GHK est un peptide présent naturellement dans le sang, la salive et les urines. Il possède des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires. La séquence peptidique DAHK correspond à la partie N-terminale de la HSA (Human Serum Albumine), protéine la plus abondante dans le plasma sanguin et impliquée dans de nombreuses fonctions physiques (transport d'hormones, d'acides gras,...). DAHK, également présent dans d'autres protéines, possède le motif

ATCUN (Amino-Terminal Cu and Ni binding motive), dans lequel les ions Cu^{2+} et Ni^{2+} sont coordonnés par la fonction amine N-terminale, la chaîne latérale de l'Histidine en position 3 et les deux fonctions amides déprotonées présentes entre ces deux ligands. Il empêche la formation d'espèces oxygénées réactives induites par le cuivre qui sont toxiques voire létales pour les cellules. Ces deux peptides possèdent une forte affinité pour le Cu^{2+} . La caractérisation spectroscopique des complexes DAHK- Cu^{2+} et GHK- Cu^{2+} -L a apporté de nouveaux éléments quant à l'aspect structural de ces complexes en solution et leur impact biologique. Ces données peuvent servir de modèle dans le cadre de l'étude d'interactions Cu(II)-peptide plus compliquées, comme avec le peptide A β , pour lesquelles il n'existe pas de structure cristallographique. Lors de cette étude, j'ai étudié la coordination du Cu^{2+} aux peptides GHK et DAHK par UV-Visible, DC et RPE. J'ai également étudié l'effet de ces deux peptides sur la production de ROS catalysée par le Cu^{2+} par spectroscopie de fluorescence (cf Annexe I-B).

Article 3 : pH-dependant Cu(II) coordination to amyloid β peptide : impact of sequence alterations, including the H6R and D7N familial mutations

La coordination du Cu^{2+} au peptide A β est dépendante du pH. A pH physiologique, deux espèces coexistent appelée composante I et II. Il existe deux hypothèses concernant le mode de coordination de la composante II. Afin de discriminer l'un ou l'autre de ces modèles, une étude de la coordination du Cu^{2+} en fonction du pH sur une série de 10 peptides mutés a été réalisée. Par ailleurs, les mutations H6R et D7N sont présentes dans le cas d'apparition précoce de la maladie. Des études menées sur les peptides A β 40 et A β 42 possédant les mutations H6R ou D7N ont montré que ces deux mutations altèrent l'agrégation du peptide. De plus, il a été rapporté que les espèces oligomériques formées par ces peptides mutés sont plus toxiques que celles formés par le peptide natif. La présence de Cu^{2+} n'a pas été prise en compte lors de ces études alors qu'il pourrait influencer le processus d'agrégation. Par ailleurs, l'His6 intervient directement dans la coordination du Cu^{2+} et l'Asp7 est un ligand supposé dans la coordination du Cu^{2+} dans le cas du peptide natif. Il paraît donc important de déterminer comment ces mutations vont affecter la coordination du Cu^{2+} à ces formes familiales rares de la maladie. Dans ce projet, j'ai réalisé l'étude de la coordination du Cu^{2+} aux différents peptides mutés en fonction du pH par RPE et DC. (cf Annexe I-C).

Article 4 : Pt(II) compounds interplay with Cu(II) and Zn(II) coordination to the amyloid β peptide has metal specific consequences on deleterious processes associated to Alzheimer's disease.

L'équipe de Barnham a récemment décrit l'utilisation de complexes de Pt(II) comme molécules actives contre la maladie d'Alzheimer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, vol. 105, pp 6813-6818). Depuis cette première étude, la capacité de différents complexes de Pt(II) à se lier au peptide A β a été évaluée. Cette publication décrit l'effet de cinq complexes de Pt(II) dont le complexe cyclométallé de Pt(II) Pt(ϕ -MePy)(DMSO)Cl sur l'agrégation du peptide A β induite par le Zn(II) ainsi que sur la production de ROS catalysées par le Cu(II). Lors de cette étude, j'ai étudié l'effet des complexes de Pt(II) sur l'agrégation du peptide A β 28 induite par le Zn(II) par spectroscopie de fluorescence et microscopie électronique à transmission. (cf. Annexe I-D).



Article I-A

Copper(II) Coordination to Amyloid β : Murine versus Human Peptide**

Hélène Eury, Christian Bijani, Peter Faller, and Christelle Hureau*

In Alzheimer's disease (AD), the amyloid β (A β) peptide seems to play a causative role. A β is the major constituent of amyloid plaques, a hallmark of AD. According to the amyloid cascade hypothesis, in AD, the aggregation of A β leads to the formation of toxic species, which induce neuronal cell death. It has been proposed that reactive oxygen species (ROS) are produced, and that these species mediate cell toxicity.^[1,2] Although still under debate,^[3] a large body of evidence suggests that metallic ions (copper, zinc, and iron) play a role in the etiology of AD.^[3–6] For example, amyloid plaques extracted from human brains contain high amounts of Cu^{II} and Zn^{II} ions^[7] bound to the A β peptide.^[8,9] Chelators were able to partially solubilize the plaques,^[8] and studies on neuronal cell culture and transgenic mice supported the involvement of ions in A β metabolism.^[10,11] Copper(II) can be released in the synaptic cleft and can reach concentrations up to 15 μ M.^[5] This value is in line with the possibility of Cu^{II} binding to A β in vivo, since a dissociation constant in the picomolar range has been determined for the Cu^{II}–A β species.^[12] Furthermore, in vitro aggregation of the A β peptide can be modulated by Cu and Zn ions,^[12–14] and because of its redox nature, Cu may play a role in ROS production.^[15] These observations and hypotheses explain the intensive research on the modulation of metal-ion homeostasis as a therapeutic approach.^[3,16]

A better understanding of the AD mechanisms requires investigations on mouse and rat animal models.^[17,18] However, these animals, whose peptide differs from the human A β peptide by three point mutations, do not show amyloid deposition.^[17,18] Consequently, studies are performed on transgenic mice or rats that produce the human A β (hA β) peptide in addition to their own peptide (mA β). Cu^{II} coordination to murine and human peptides has been

proposed to differ.^[19–21] Thus, in the present study, to explain the distinct Cu^{II} coordination to hA β and mA β , we used complementary spectroscopic techniques to determine the crucial mutation(s). We also propose Cu^{II}–mA β structural models. Finally, we discuss possible consequences of such differences in Cu^{II} coordination with respect to the use of mice or rats as AD animal models.

We examined the coordination of Cu^{II} to six peptides: hA β (DAEFRHDSGYEVHHQK; see Scheme S1 in the Supporting Information), Y10F-hA β , H13R-hA β , R5G-hA β , mA β (DAEFGHDSGFVRRHQK; see Scheme S2 in the Supporting Information), and F10Y-mA β (or R5G-H13R-hA β). These shorter 16-residue peptides were used as valuable models of Cu^{II} binding to the full-length peptides.^[22–24] Indeed, no differences in spectroscopic signature,^[22] binding affinity,^[24] or ROS production^[23] have been observed between the truncated and full-length hA β peptides. Two peptide families can be distinguished from the spectroscopic signatures of their Cu^{II} complexes (see Figures S1–S5 and Table S1 in the Supporting Information): hA β , Y10F-hA β , and H13R-hA β (humanlike family), and mA β , F10Y-mA β , and R5G-hA β (murine-like family). Thus, the key mutation between the hA β and mA β peptides with regard to Cu^{II} binding is the R5G mutation. For both families, two Cu^{II} complexes that differ in the protonation state of the peptide are present near the physiological pH value, namely, components **I** and **II**. Figure 1 shows the differences between the CD and EPR spectroscopic signatures of Cu^{II}–hA β and Cu^{II}–mA β solutions at pH 6.7 and 5.4, at which **I** is predominant, and at pH 8.7 and 7.6, at which **II** is predominant. The pK_a(**I/II**) values are close to pH 7.7 for Cu^{II} complexes of the humanlike peptides and close to pH 6.2 for the murine-like family (see Figures S3 and S5 and Table S1 in the Supporting Information).

We previously described copper(II)-induced modification of the peptide NMR spectroscopic signature to determine the Cu^{II}-binding sites of hA β .^[25] The results obtained were in line with most previous studies^[12,19,22,26,27] and showed that the equatorial binding site of component **I** is formed by the NH₂ group of Asp1, two of the three imidazole rings of His6, His13, and His14, and a CO function. At higher pH values, deprotonation of the Asp1–Ala2 peptide bond leads to the replacement of one imidazole ring with the Asp1–Ala2 deprotonated amide (amidyl) ligand.

In this study, we used NMR spectroscopy to gain more insight into Cu^{II} coordination to the mA β peptide. We recorded ¹H, ¹³C, and 2D NMR spectra of mA β peptide at pH 5.4 and 7.6 with or without a substoichiometric amount of Cu^{II} ions (see Figures S6–S14 in the Supporting Information). At pH 5.4 and in the presence of Cu^{II}, the side chains of Asp,

[*] H. Eury, Dr. C. Bijani, Prof. Dr. P. Faller, Dr. C. Hureau CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination) 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse (France) and Université de Toulouse, UPS, INPT, LCC 31077 Toulouse (France) Fax: (+33) 5-6155-3003 E-mail: christelle.hureau@lcc-toulouse.fr

[**] This research was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche, Programme Blanc NT09-488591, "NEUROMETALS" (P.F. and C.H.). C.H. acknowledges Dr. I. Sasaki, Dr. P. Dorlet, and Dr. L. Sabater for valuable comments on the manuscript, L. Rechinat for EPR measurements, and Y. Coppel and C. L. Serpentine for their help with NMR and CD experiments, respectively.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201005838>.

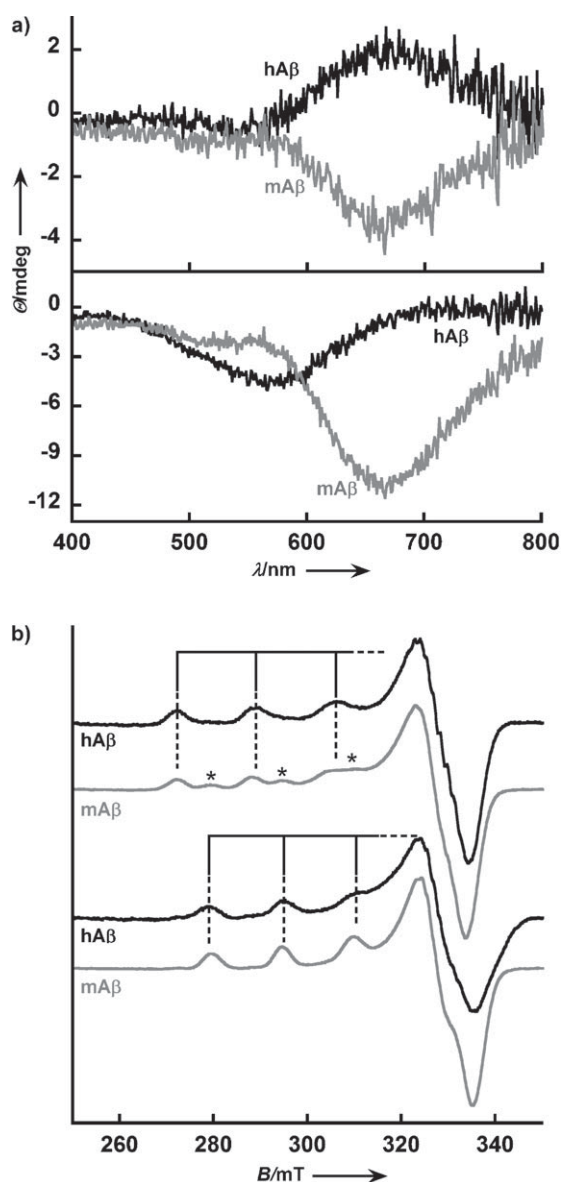


Figure 1. a) CD and b) EPR spectra of Cu^{II} -hA β (black lines) and Cu^{II} -mA β complexes (gray lines) at pH 6.5 and 5.4, respectively (top) and at pH 8.7 and 7.6, respectively (bottom). a) $T = 20^\circ\text{C}$, $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta] = 0.45 \text{ mM}$; b) $\nu = 9.5 \text{ GHz}$, modulation amplitude: 0.45 mT , $T = 110 \text{ K}$, $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta] = 0.9 \text{ mM}$. * indicates residual component II.

Glu, and His residues were strongly affected; the signals for the CO and C_α carbon atoms of Asp1, Asp7, His6, and His14 were also broadened, but to a lesser extent. When the pH value was increased to 7.6, the main changes occurred in the CO region, in which only the CO group of Asp1 was strongly affected, and in the C_α region, in which the α positions of Asp1, His6, and to a lesser extent His14, were affected. The CD data provide evidence that an amide bond is deprotonated near pH 6.1, and the NMR spectroscopic data indicate that deprotonation occurs in close vicinity to His6. We propose deprotonation of the Gly5–His6 rather than the His6–Asp7 peptide bond, mainly because 1) a six-membered metallacycle is more favorable than a seven-membered metallacycle and 2) Cu^{II} coordination to the shorter peptide

models A β 6 (DAEFGH) and A β 9 (DAEFGHDSG) is similar.^[20] This result is consistent with the fact that the R5G mutation is the key mutation between hA β and mA β .

The crucial information deduced from the NMR spectroscopic data is that the Gly5–His6 amide bond is deprotonated during the transition between **I** and **II**: a main mechanistic difference to the deprotonation of the Asp1–Ala2 bond observed in the Cu^{II} -hA β complex.^[25] This difference is even more evident from the ^{13}C NMR spectra in Figure 2, in which

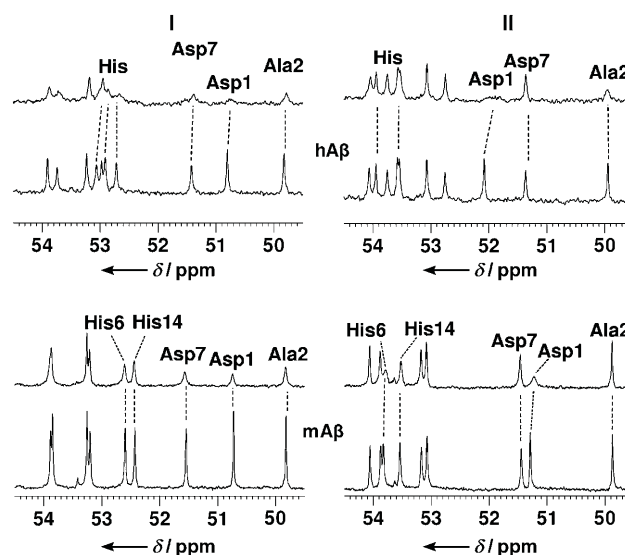


Figure 2. C_α regions of the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of hA β peptide (10 mM) in D_2O (bottom) and in the presence of Cu^{II} (top) at pH 6.6 (left) and 8.7 (right), and mA β peptide (10 mM) in D_2O (bottom) and in the presence of Cu^{II} (top) at pH 5.4 (left) and 7.6 (right); $T = 25^\circ\text{C}$, $\nu = 125.8 \text{ MHz}$; 0.1 equivalent of Cu^{II} was used, except with mA β at pH 5.4 where 0.02 equivalent of Cu^{II} was used. The shifting of some peaks is due to a slight change in the pH value as a result of the addition of Cu^{II} .

the effect of Cu^{II} on the C_α regions of hA β and mA β peptides are shown for **I** and **II**. For **I**, there is no significant difference between hA β and mA β in the broadening of the signals for the His, Asp, and Ala2 residues upon Cu^{II} binding. In contrast, in the case of **II**, several ^{13}C nuclei behave differently: the signal for the C_α atom of Ala2 of hA β but not mA β is broadened, whereas broadening of the signal for the C_α atom of His6 was observed only for mA β . Divergences between hA β and mA β with respect to copper(II)-induced NMR line broadening are illustrated in Figure 3 (see also Schemes S4 and S5 in the Supporting Information). Besides the differences described above, we observed broadening of all signals for carboxylate ^{13}C nuclei in the case of mA β (for **I** and **II**), whereas in hA β , only that of Asp1 was affected by switching to **II**. This result is in line with the formation, in the case of Cu^{II} -hA β , of a tridentate pincer (NH_2 (Asp1), N^- (Asp1–Ala2), COO^- (Asp1)), which is not present after deprotonation of the Gly5–His6 peptide bond in the Cu^{II} -mA β species. Finally, for **II**, the carbonyl function affected in the case of hA β is predominantly that of the Ala2–Glu3 peptide bond, that is, the carbonyl group adjacent to the Asp1–Ala2 amidyl

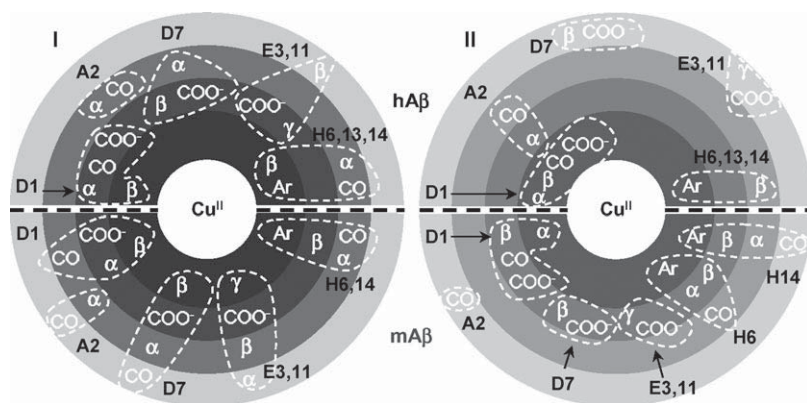


Figure 3. Schematic representation of the C and H atoms most affected by the binding of Cu^{II} to hA β (top) and mA β peptides (bottom) for I (left) and II (right). The intensity of the rings increases according to the extent of broadening of the NMR signals in the presence of Cu^{II} .

function, whereas the Asp1–Ala2 carbonyl function (thus, not that adjacent to the Gly5–His6 amidyl function) is most affected in mA β .

A plausible explanation for the deprotonation of the Asp1–Ala2 peptide bond in the Cu^{II} –hA β complex (at pH values close to 7.7) and deprotonation of the Gly5–His6 peptide bond in the Cu^{II} –mA β complex (at pH values close to 6.2) is the increased pK_{a} value of the Arg5–His6 peptide bond relative to that of Gly5–His6. This increased pK_{a} value precludes deprotonation of the peptide bond in the case of the hA β peptide and induces deprotonation near another anchoring site, that is, the N terminus. The increase in the pK_{a} value induced by the bulky Arg residues may be due to an ineffective orientation of the NH amide with respect to the Cu^{II} ion as a result of steric constraints.

The two binding sites of Cu^{II} bound to mA β in best agreement with the data obtained in this study are depicted in Figure 4 (see also Scheme S6 in the Supporting Information). They were deduced by comparison with reported results for Cu^{II} –hA β . For **I**, we propose the involvement of one COO^- group in an equatorial position (instead of a second His residue, as in the case of hA β) in a 2N1O binding site, rather than a 3N1O binding site (hA β), in line with the differences observed in the EPR parameters (see Table S1 in the Supporting Information).^[29] Thus, the second His residue lies in an apical position. For **II**, the main difference with respect to the Cu^{II} –hA β binding site is the additional presence of the His14 side chain in an apical position. This structure is in line with the very similar EPR parameters observed for the Cu^{II} complexes of both

peptides and with the broadening of the His14 signal detected by NMR spectroscopy in the presence of Cu^{II} ions. The presence of the CO group of Asp1–Ala2 in the equatorial position is proposed on the basis of geometric constraints (five-membered metallacycle with the NH_2 group), which favor the equatorial over the apical position. These models are mostly in line with results reported by Kowalik-Jankowska et al. in their pioneering studies,^[19,20] although we propose the involvement of an equatorial carbonyl group (instead of a carboxylate) in **II**. Furthermore, the NMR spectroscopic data obtained in this study enable the type of binding functions to be attributed to a specific residue. Such data is key to a good description of Cu^{II} coordination to the peptide and a better understanding of the biological implications of this coordination. Gaggelli

et al. did not propose coordination of the amidyl function on the basis of their NMR spectroscopic data obtained at pH 7.5 in a micellar solution.^[21] The most plausible reason for this discrepancy with our results is that, as we previously detailed,^[25] broadening of the side-chain signals as a result of Cu^{II} binding is more important than the broadening of backbone signals.

The comparison of Cu^{II} coordination to mA β and hA β near physiological pH values uncovered three major features:

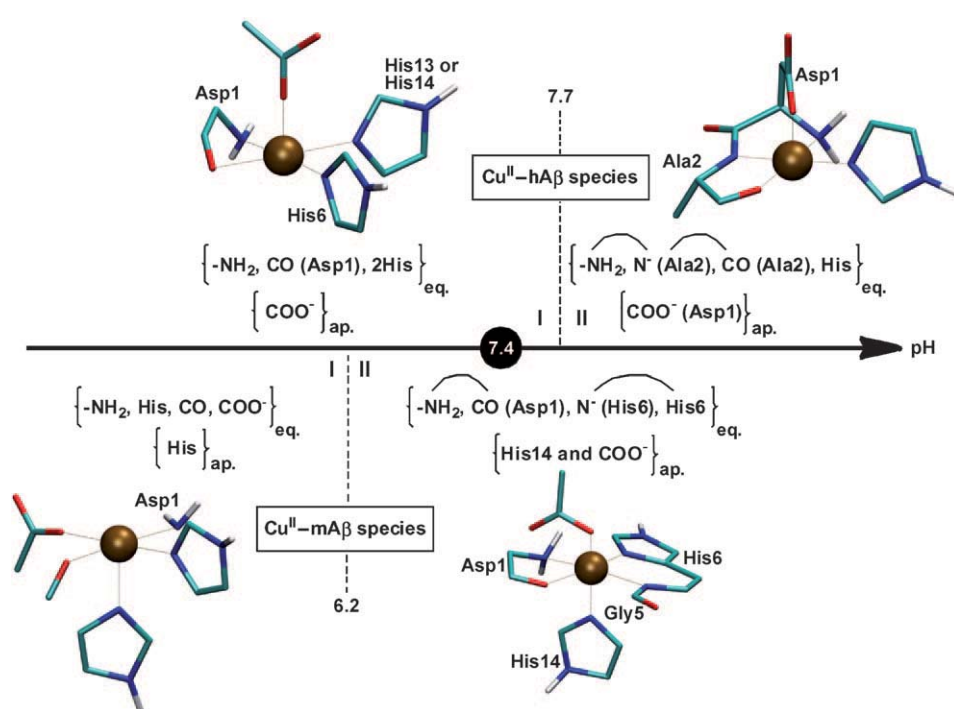


Figure 4. Proposed pH-dependent Cu^{II} coordination to hA β and mA β peptides. Curved lines stand for metallacycles formed upon Cu^{II} binding. As previously observed for hA β , the exchange of chemically equivalent ligands at a given coordination position also occurs in the case of mA β . Hence, when the residue is not specified, several residues (in equilibrium) fulfill the binding function. The structures of the Cu^{II} –A β complexes were drawn with the VMD software.^[28] For the sake of clarity, only hydrogen atoms bound to nitrogen atoms are represented; eq. = equatorial, ap. = apical.

1) dynamic equilibria between equivalent binding functions for one coordination position were detected for both Cu^{II} -hA β and Cu^{II} -mA β complexes, even if, in the case of **II**, the Cu^{II} ion is more constrained in hA β (in the N-terminal part) than in the mA β peptide, in which all carboxylate functions are still involved in Cu^{II} binding; 2) the proportions of **I** and **II** differ strongly, whereby **I** is predominant in the case of hA β , and almost only **II** is present for mA β ; 3) species **II** of hA β and mA β mainly differ in terms of the formation of the metallacycle either between the NH_2 group and the amidyl N^- atom (Asp1-Ala2; hA β) or between the imidazole ring of His6 and the amidyl N^- atom (Gly5-His6; mA β).

The first direct consequence of these differences concerns the formation of the deleterious N-terminally truncated pyroglutamate forms (p3E-hA β).^[30] Cu^{II} ions bound to both Asp1 and Ala2 in the hA β peptide might enhance the formation of p3E-hA β by assisting with the hydrolysis of the Ala2-Glu3 bond.^[25,27] Such an effect cannot apply in the case of the mA β peptide.

A second consequence is that the affinity of Cu^{II} for mA β and hA β and the redox response of Cu^{II} -mA β and Cu^{II} -hA β complexes should differ significantly. To evaluate the amplitude of such variations, we performed a competition experiment by CD. We found that Cu^{II} is bound about three times more strongly by mA β than by hA β under relevant biological conditions (Figure 5). Moreover, in a preliminary assessment of the redox properties of the two complexes, we measured the time necessary to reduce Cu^{II} to Cu^{I} : the first step of any mechanism for the production of ROS.^[15] We found that Cu^{II} bound to mA β was reduced two to three times more slowly than Cu^{II} bound to hA β (Figure 5). These two observations suggest that the situation is very different when both peptides are present (in transgenic mice and rats) to that when only hA β is present (in human AD patients): 1) The Cu^{2+} ion is preferentially coordinated to mA β ; as a consequence, it is expected that less copper is present in amyloid plaques composed of hA β .^[31] This hypothesis fully agrees with reports that amyloid plaques in transgenic mice contain less copper than those of human patients.^[32] 2) Since even trace amounts of Cu^{2+} binding to hA β influence the aggregation behavior of the peptide,^[33] the partial withdrawal of Cu^{2+} by the mA β peptide may modulate the aggregation of hA β significantly. This hypothesis is in accord with results indicating that the morphology of amyloid plaques is modified in transgenic mice,^[31] and that different phenotypes of plaques are obtained in transgenic mice when injected with brain extracts from either AD patients or AD transgenic mice.^[34] 3) ROS production will be reduced in transgenic mice relative to that in humans.

Hence, we can conjecture that the interaction of Cu^{II} ions with hA β is altered in murine models as a result of the concomitant presence of the mA β peptide. Although many factors other than copper binding to A β are important in AD, this interference might be worth considering in studies with AD murine models, in particular when addressing metal-ion homeostasis.^[35]

Received: September 17, 2010
Published online: ■■■■■, 2010

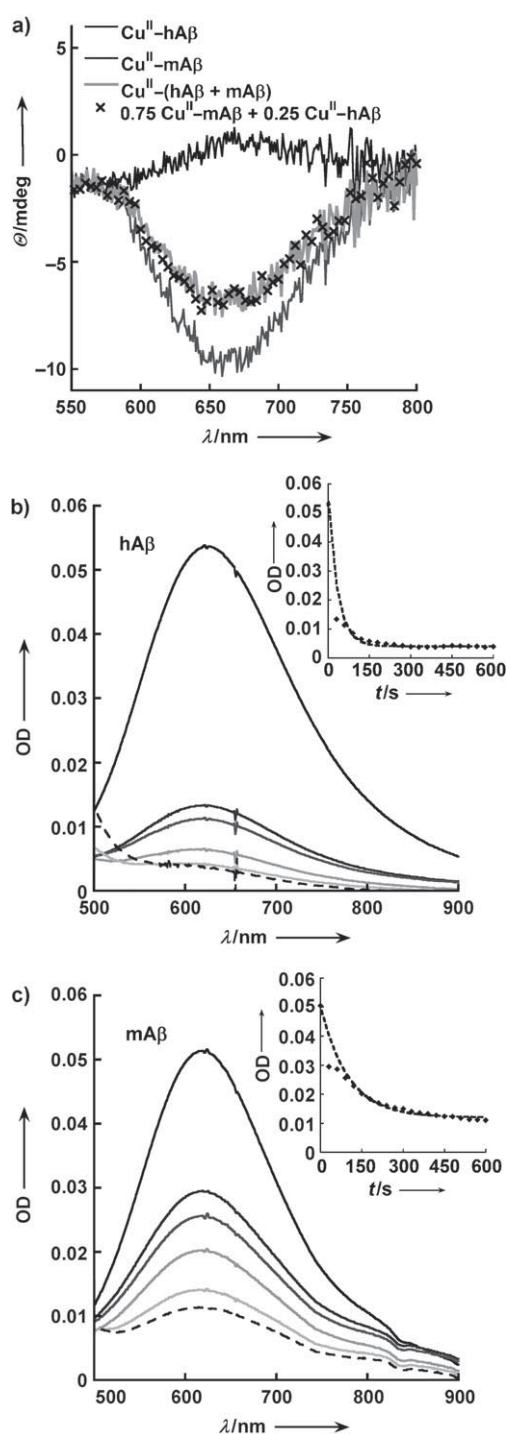


Figure 5. a) CD signatures of Cu^{II} -hA β (black), Cu^{II} -mA β (dark gray), and Cu^{II} in the presence of an equimolar mixture of both peptides (light gray); $[\text{Cu}^{\text{II}}] = 0.45 \text{ mM}$, $[\text{peptide}] = 0.5 \text{ mM}$, $l = 1 \text{ cm}$, $T = 20^\circ\text{C}$, 20 mM phosphate, pH 7.4; x is the calculation of the light-gray spectrum as a linear combination of the two CD signatures of the Cu^{II} -hA β and Cu^{II} -mA β complexes in a 3:1 ratio. b,c) UV/Vis spectra recorded at $t = 0, 0.5, 1, 2, 5,$ and 10 min after the addition of ascorbate (1.5 equiv) to the complexes Cu^{II} -hA β (b; 1 mM) and Cu^{II} -mA β (c; 1 mM) in 50 mM phosphate at pH 7.4. Insets show the decrease in optical density as a function of time, and the corresponding fit using exponential decay with $\tau = 34$ (hA β) and 100 s (mA β). OD = optical density.

Keywords: amyloid β peptides · coordination modes · copper · NMR spectroscopy · peptides

- [1] C. Behl, J. B. Davis, R. Lesley, D. Schubert, *Cell* **1994**, *77*, 817.
- [2] K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 205.
- [3] H. Kessler, F. G. Pajonk, D. Bach, T. Schneider-Axmann, P. Falkai, W. Herrmann, G. Multhaup, J. Wiltfang, S. Schäfer, O. Wirths, T. A. Bayer, *J. Neural Transm.* **2008**, *115*, 1651.
- [4] P. S. Donnelly, Z. Xiao, A. G. Wedd, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 128.
- [5] Y. H. Hung, A. I. Bush, R. A. Cherny, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 61.
- [6] F. Molina-Holgado, R. C. Hider, A. Gaeta, R. Williams, P. Francis, *Biometals* **2007**, *20*, 639.
- [7] M. A. Lovell, J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell, W. R. Markesbery, *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158*, 47.
- [8] R. A. Cherny, J. T. Legg, C. A. McLean, D. P. Fairlie, X. Huang, C. S. Atwood, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23223.
- [9] J. Dong, C. S. Atwood, V. E. Anderson, S. L. Siedlak, M. A. Smith, G. Perry, P. R. Carey, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2768.
- [10] T. Borchardt, J. Camakaris, R. Cappai, C. L. Masters, K. Beyreuther, G. Multhaup, *Biochem. J.* **1999**, *344*, 461.
- [11] P. A. Adlard, A. I. Bush, *J. Alzheimer's Dis.* **2006**, *10*, 145.
- [12] P. Faller, C. Hureau, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2009**, 1080.
- [13] R. Cappai, K. J. Barnham, *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 526.
- [14] R. Roychoudhuri, M. Yang, M. M. Hoshi, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4749.
- [15] C. Hureau, P. Faller, *Biochimie* **2009**, *91*, 1212.
- [16] A. I. Bush, R. E. Tanzi, *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 421.
- [17] C. Duyckaerts, M.-C. Potier, B. Delatour, *Acta Neuropathol.* **2008**, *115*, 5.
- [18] O. Philipson, A. Lord, A. Gumucio, P. O'Callaghan, P. Lannfelt, L. N. Nilsson, *FEBS Lett.* **2010**, *277*, 1389.
- [19] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*, 270.
- [20] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *86*, 535.
- [21] E. Gaggelli, Z. Grzonka, H. Kozłowski, C. Migliorini, E. Molteni, D. Valensin, G. Valensin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2008**, 341.
- [22] J. W. Karr, L. J. Kaupp, V. A. Szalai, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13534.
- [23] R. C. Nadal, S. E. Rigby, J. H. Viles, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11653.
- [24] C. J. Sarell, C. D. Syme, S. E. Rigby, J. H. Viles, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4388.
- [25] C. Hureau, Y. Coppel, P. Dorlet, P. L. Solari, S. Sayen, E. Guillon, L. Sabater, P. Faller, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9686; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9522.
- [26] P. Dorlet, S. Gambarelli, P. Faller, C. Hureau, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9437; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9273.
- [27] S. C. Drew, C. L. Masters, K. J. Barnham, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8760.
- [28] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- [29] J. Peisach, W. E. Blumberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691.
- [30] O. Wirths, T. Bethge, A. Marcello, A. Harmeyer, S. Jawhar, P. J. Lucassen, G. Multhaup, D. L. Brody, T. Esparza, M. Ingelsson, H. Kalimo, L. Lannfelt, T. A. Bayer, *J. Neural Transm.* **2010**, *117*, 85, and references therein.
- [31] A. Güntert, H. Döbeli, B. Bohrmann, *Neuroscience* **2006**, *143*, 461.
- [32] A. Leskovjan, C. A. Lanzirrotti, L. M. Miller, *NeuroImage* **2009**, *47*, 1215.
- [33] M. Innocenti, E. Salvietti, M. Guidotti, A. Casini, S. Bellandi, M. L. Foresti, C. Gabbiani, A. Pozzi, P. Zatta, L. Messori, *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *19*, 1323.
- [34] M. Meyer-Luehmann, J. Coomaraswamy, T. Bolmont, S. Kaeser, C. Schaefer, E. Kilger, A. Neuenschwander, D. Abramowski, P. Frey, A. L. Jaton, J. M. Vigouret, P. Paganetti, D. M. Walsh, P. M. Mathews, J. Ghiso, M. Staufenbiel, L. C. Walker, M. Jucker, *Science* **2006**, *313*, 1781.
- [35] Note added in proof: During the processing of this manuscript, an article was published supporting the present findings that the R5G mutation is responsible for the difference in Cu^{II} binding between human and murine A β peptides: : L. Hong, T. M. Carducci, W. D. Bush, C. G. Dudzik, G. L. Millhauser, J. D. Simon, *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 11261–11271.

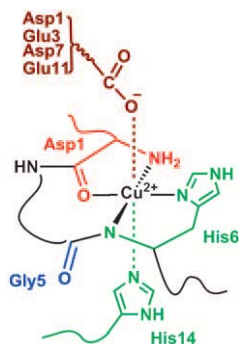
Communications

Disease Mechanisms

H. Eury, C. Bijani, P. Faller,

C. Hureau*      

Copper(II) Coordination to Amyloid β :
Murine versus Human Peptide



Be wary of mice: At physiological pH values, Cu^{II} binding to the human and murine amyloid β peptides differs significantly. The key mutation R5G in the murine Cu^{II} species results in coordination of the amidyl nitrogen atom of the Gly5–His6 bond (see scheme). The higher binding affinity observed for the murine peptide limits the relevance of transgenic mice (in which both peptides coexist) as models for Alzheimer's disease.



Article I-B

X-Ray and Solution Structures of Cu^{II}GHK and Cu^{II}DAHK Complexes: Influence on Their Redox Properties**

Christelle Hureau,^{*,[b]} Hélène Eury,^[b] Régis Guillot,^[c] Christian Bijani,^[b] Stéphanie Sayen,^[d] Pier-Lorenzo Solari,^[e] Emmanuel Guillon,^[d] Peter Faller,^[b] and Pierre Dorlet^{*,[a]}

Abstract: The Gly-His-Lys (GHK) peptide and the Asp-Ala-His-Lys (DAHK) sequences are naturally occurring high-affinity copper(II) chelators found in the blood plasma and are hence of biological interest. A structural study of the copper complexes of these peptides was conducted in the solid state and in solution by determining their X-ray structures, and by using a large range of spectroscopies, including EPR and HYSCORE (hyperfine sub-level correlation), X-ray absorption and ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The results indicate that the structures of [Cu^{II}(DAHK)] in the solid state and in solution are similar and confirm the equatorial coordination sphere of NH₂, two amidyl N and one imidazole N. Additionally, a water molecule is

bound apically to Cu^{II} as revealed by the X-ray structure. As reported previously in the literature, [Cu^{II}(GHK)], which exhibits a dimeric structure in the solid state, forms a monomeric complex in solution with three nitrogen ligands: NH₂, amidyl and imidazole. The fourth equatorial site is occupied by a labile oxygen atom from a carboxylate ligand in the solid state. We probe that fourth position and study ternary complexes of [Cu^{II}(GHK)] with glycine or histidine. The Cu^{II} exchange reaction between different DAHK peptides is very slow, in contrast to [Cu^{II}-

(GHK)], in which the fast exchange was attributed to the presence of a [Cu^{II}(GHK)₂] complex. The redox properties of [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] were investigated by cyclic voltammetry and by measuring the ascorbate oxidation in the presence of molecular oxygen. The measurements indicate that both Cu^{II} complexes are inert under moderate redox potentials. In contrast to [Cu^{II}(DAHK)], [Cu^{II}(GHK)] could be reduced to Cu^I around -0.62 V (versus AgCl/Ag) with subsequent release of the Cu ion. These complete analyses of structure and redox activity of those complexes gave new insights with biological impact and can serve as models for other more complicated Cu^{II}-peptide interactions.

Keywords: bioinorganic chemistry • copper • ligand interactions • peptides • structural characterisation

Introduction

Copper is an essential trace element involved in the activities of many enzymes and proteins but can become toxic if its homeostasis is not tightly controlled. Pathologies related to copper include Menkes and Wilson diseases and neurode-

generative disorders such as Alzheimer's or Prion diseases. In the latter, the redox activity of copper seems to play a crucial role.^[1] The Gly-His-Lys (GHK) peptide and the Asp-Ala-His-Lys (DAHK) sequence are naturally occurring high-affinity copper chelators found in the blood plasma.^[2] GHK was isolated by Pickart et al.^[3] and first described as a

[a] Dr. P. Dorlet

Laboratoire du Stress Oxydant et Détoxication
CNRS, URA 2096, 91191 Gif-sur-Yvette (France)
and
CEA, iBiTec-S, SB²SM, 91191 Gif-sur-Yvette (France)
Fax: (+33) 1-69-08-87-17
E-mail: pierre.dorlet@cea.fr

[b] Dr. C. Hureau, H. Eury, Dr. C. Bijani, Prof. P. Faller
CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination)
205, route de Narbonne, 31077 Toulouse (France)

and
Université de Toulouse; UPS, INPT
LCC, 31077 Toulouse (France)
Fax: (+33) 5-61-55-30-03
E-mail: hureau@lcc-toulouse.fr

[c] Dr. R. Guillot

CNRS, ICMO—UMR 8182, Bât. 420
Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex (France)


[d] Dr. S. Sayen, Prof. E. Guillon

Groupe de Chimie de Coordination, CNRS
ICMR—UMR 6229
Université de Reims Champagne-Ardenne
51687 Reims Cedex 2 (France)

[e] Dr. P.-L. Solari

Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin
91192 Gif-Sur-Yvette Cedex (France)

[**] GHK and DAHK refers to the peptide chains Gly-His-Lys and Asp-Ala-His-Lys, respectively.

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201100751>.

liver cell growth factor. Further studies showed that GHK possesses a wide range of biological activities, including acceleration of wound healing^[4] and tissue remodelling.^[5] When complexed to this peptide, Cu^{II} is bound by the –NH₂, the N^π of the histidine residues and one amidyl group from the backbone. The equatorial coordination plane is completed in solution by a labile ligand, thus allowing formation of ternary species with exogenous amino acid residues in a biological medium.^[6] DAHK is the N-terminal fragment of the human serum albumin (HSA). HSA is the most abundant blood serum protein involved in Cu^{II} transport^[7] and also a major component of cerebrospinal fluid. Among the two Cu^{II} binding sites present in HSA, the N-terminal motif possesses the higher affinity.^[8] Cu^{II} is bound to the –NH₂, the N^π of the histidine residues and two amidyl groups from the peptide backbone, thus being archetypal of the so-called ATCUN binding motif (H₂N–XXH beginning sequence in a peptide/protein) also found in other proteins, that is, neuromedins C and K, human sperm protamine P2a and histatins.^[2a] DAHK has also recently been shown to restore cell survival of cells exposed to Cu and Cu-Aβ (Aβ is the amyloid-β peptide involved in Alzheimer's disease) and this effect has been attributed to redox silencing of Cu when bound to DAHK.

As a consequence, Cu^{II} binding to these two peptides is of paramount importance. In addition, the present study was also motivated by the need to obtain a set of reference spectroscopic signatures coupled to redox behaviour to model in detail Cu^{II} sites with 3N+1O or 4N equatorial binding modes in other peptides and proteins. In this paper, we give new insights into the Cu^{II} coordination to the DAHK and GHK peptides and discuss the results in comparison with studies previously performed on these species. The X-ray structures of both complexes are described and their solution structures are characterised by advanced spectroscopic methods. The redox properties are then analysed and detailed in relation to the structural observations.

Results and Discussion

X-ray structures: The crystal structures of the [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] complexes were determined by single-crystal X-ray diffraction. Table 1 and Table 2 summarise crystal data and selected bond lengths and angles. In both cases, the Cu^{II} ion is penta-coordinated in a distorted square-planar pyramid environment with an oxygen in the apical position.

In the case of [Cu^{II}(GHK)] (see Figure 1), the structure is essentially identical to that previously reported by Perkins and co-workers,^[9] and close to that of [Cu^{II}(GH)].^[10] The binding mode in the equatorial plane is 3N+1O: the Cu^{II} ion is ligated by the glycine amino nitrogen, the deprotonated amide nitrogen of the glycine-histidine peptide bond, the N^π nitrogen of the imidazole side chain of the histidine and the lysine carboxylate of a neighbouring complex. The apical oxygen is provided also by the lysine carboxylate of

Table 1. Crystal data and structure refinement for [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)].

	[Cu ^{II} (DAHK)]	[Cu ^{II} (GHK)]
formula	C ₁₉ H ₃₀ CuN ₇ O ₇ ·7H ₂ O·Cl	C ₁₄ H ₂₃ CuN ₆ O ₄ ·9.25H ₂ O
<i>M_r</i> [g mol ⁻¹]	693.61	550.92
<i>T</i> [K]	100(1)	100(1)
<i>λ</i> [Å]	0.71073	0.71073
crystal size [mm ³]	0.18 × 0.06 × 0.01	0.32 × 0.27 × 0.21
crystal colour	purple	blue
crystal system	trigonal	tetragonal
space group	<i>P</i> 3 ₂	<i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2
unit cell dimensions	0.18 × 0.06 × 0.01	0.32 × 0.27 × 0.21
<i>a</i> [Å]	14.4934(3)	14.4793(2)
<i>b</i> [Å]	14.4934(3)	14.4793(2)
<i>c</i> [Å]	12.1728(5)	26.3306(7)
<i>α</i> [°]	90	90
<i>β</i> [°]	90	90
<i>γ</i> [°]	120	90
<i>V</i> [Å ³]	2214.43(11)	5520.21(18)
<i>Z</i>	3	8
<i>ρ</i> _{calcd} [Mg m ⁻³]	1.560	1.326
absorption coefficient [mm ⁻¹]	0.907	0.856
<i>F</i> (000)	1095	2272
reflms collected	8978	115905
indep reflms (<i>R</i> _{int})	5001 (0.0631)	8484 (0.0391)
obsd reflms (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	7423	7094
final <i>R</i> indices (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	<i>R</i> 1 = 0.0457, <i>wR</i> 2 = 0.1017	<i>R</i> 1 = 0.0666, <i>wR</i> 2 = 0.1899
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> 1 = 0.0645, <i>wR</i> 2 = 0.1110	<i>R</i> 1 = 0.0854, <i>wR</i> 2 = 0.2267
Flack parameter	0.005(10)	0.022(19)
<i>S</i>	1.069	1.060
(Δ/ <i>σ</i>) _{max}	0.000	0.009
(Δ <i>ρ</i>) _{max/min} [e Å ⁻³]	0.981/–0.728	0.780/–0.137

Table 2. Selected bond lengths [Å] and angles [°].

[Cu ^{II} (DAHK)] (100 K)		[Cu ^{II} (GHK)] (100 K)	
Cu–N(1)	2.029(3)	Cu–N(1)	1.957(4)
Cu–N(2)	1.906(3)	Cu–N(2)	1.945(3)
Cu–N(3)	1.967(2)	Cu–N(3)	2.003(3)
Cu–N(4)	1.969(3)	Cu–O(3) ^[a]	1.967(2)
Cu–O(8)	2.565(3)	Cu–O(3) ^[b]	2.513(3)
N(1)–Cu–N(2)	83.70(11)	N(1)–Cu–N(2)	93.58(15)
N(1)–Cu–N(3)	166.74(10)	N(1)–Cu–N(3)	172.79(16)
N(1)–Cu–N(4)	98.81(11)	N(1)–Cu–O(3) ^[a]	90.40(15)
N(1)–Cu–O(8)	90.28(11)	N(1)–Cu–O(3) ^[b]	98.50(14)
N(2)–Cu–N(3)	83.11(11)	N(2)–Cu–N(3)	83.53(12)
N(2)–Cu–N(4)	173.55(10)	N(2)–Cu–O(3) ^[a]	175.82(12)
N(2)–Cu–O(8)	89.98(11)	N(2)–Cu–O(3) ^[b]	99.34(12)
N(3)–Cu–N(4)	94.45(11)	N(3)–Cu–O(3) ^[a]	92.67(12)
N(3)–Cu–O(8)	88.34(11)	N(3)–Cu–O(3) ^[b]	88.51(15)
N(4)–Cu–O(8)	95.89(11)	O(3) ^[a] –Cu–O(3) ^[b]	78.75(16)

[a] Symmetry code: $\frac{1}{2}-x, y, \frac{1}{2}-z$. [b] Symmetry code: $\frac{1}{2}-y, \frac{1}{2}+x, \frac{1}{4}+z$.

another neighbouring complex. This is in contrast with the structure of [Cu^{II}(GH)]^[10] for which the apical oxygen is a water molecule. Two [Cu^{II}(GHK)] monomeric units are thus arranged in a dimeric diamond-core type structure in which the two Cu^{II} centres are spaced by 3.458 Å and the two bridging oxygen atoms by 2.874 Å. A total of 16 sites for a

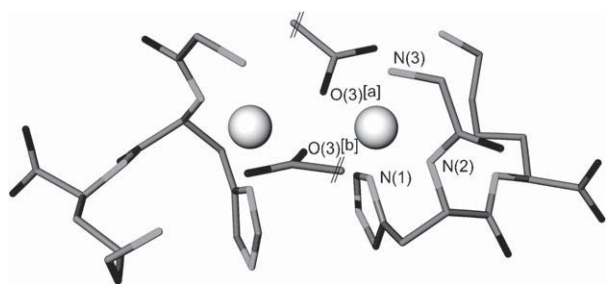


Figure 1. X-ray structure of the [Cu^{II}(GHK)] complex. Each Cu^{II} ion is penta-coordinated. Considering the ion on the right, the equatorial positions are occupied by atoms N(1) to N(3) and O(3)^[a], whereas the apical position is occupied by O(3)^[b]. These last two oxygen atoms are shared with the other Cu^{II} ion for which their position is interchanged (O(3)^[a] being in the apical position, whereas O(3)^[b] is in the equatorial position for the ion on the left).

water molecule were present in the unit cell of our structure of [Cu^{II}(GHK)] with an occupancy of 9.25 compared with 14 sites for the structure of Perkins et al. with an occupancy of 9.2.

The complex [Cu^{II}(DAHK)] corresponds to the high-affinity binding site of human serum albumin and its crystal structure is reported here for the first time (see Figure 2).

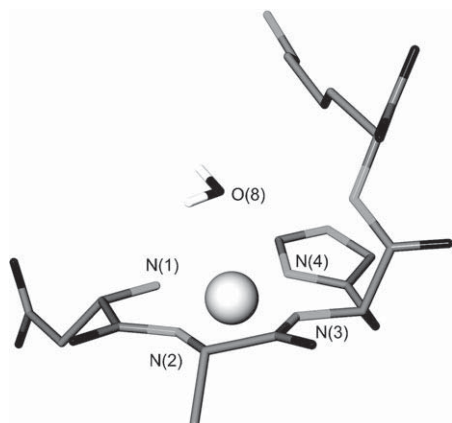


Figure 2. X-ray structure of the [Cu^{II}(DAHK)] complex. The Cu^{II} ion is penta-coordinated with four nitrogen ligands in equatorial positions (N(1) to N(4)) and one water molecule in the apical position (O(8)).

The Cu^{II} ion is bound by 4 nitrogen ligands in the equatorial plane: the aspartate amino group, two deprotonated amide functions from the first two peptide bonds and the N^π nitrogen of the imidazole side chain of the histidine residue. The apical oxygen along the Jahn–Teller distortion axis is provided by a water molecule in hydrogen-bond interactions with other solvent molecules in the unit cell. By contrast with the structure of [Cu^{II}(GHK)], all protons could be resolved and refined in this structure. The peptide is in its fully protonated form and one chloride counterion per complex is present. In addition, the crystal structure of this complex is monomeric rather than the dinuclear motif observed for [Cu^{II}-(GHK)]. A total of 7 water molecules are present in the

unit cell. The main difference with the X-ray structure of Cu^{II} bound to GGH–NH₂, the simplest peptide to form an ATCUN motif, is the presence of an apical water only in one out of two complexes in the [Cu^{II}(GGH–NH₂)] structure.^[11] Contrary to what has been conjectured previously,^[11,12] the carboxyl oxygen from Asp1 does not occupy the apical position in the [Cu^{II}(DAHK)] complex.

Electronic and ESI-MS data: In solution and at room temperature, the characteristic blue and purple colours for [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] are retained (see Figure S1 in the Supporting Information for UV/Vis and circular dichroism data). The ESI-MS spectra (positive detection mode) of [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] are shown in Figure 3 and Figure S2 in the Supporting Information. Peaks

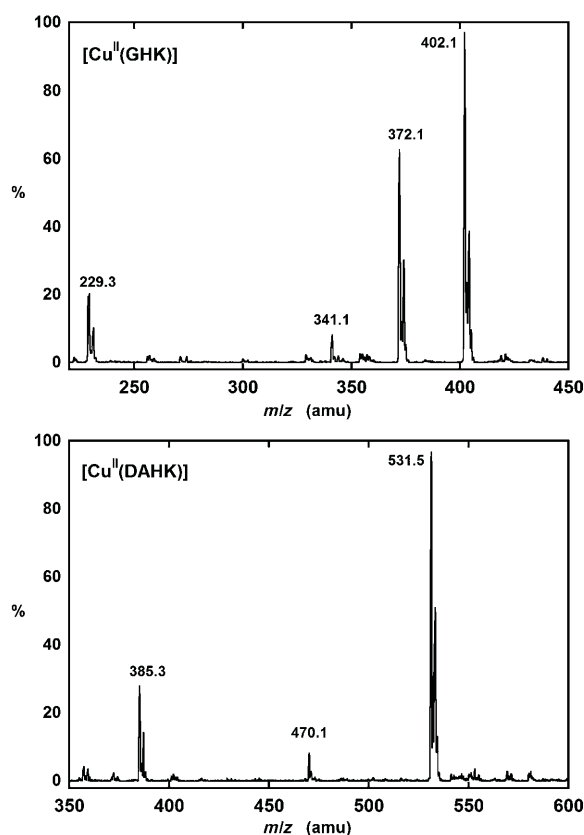


Figure 3. ESI-MS spectra of [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] complexes in the positive detection mode. [Cu^{II}(peptide)] = 200 μM, pH 7.6 (adjusted with NH₃).

of Cu^{II}-containing species are recognizable by their isotopic pattern (⁶³Cu = 65%, ⁶⁵Cu = 35%). The main peak at *m/z* 531.5 in the [Cu^{II}(DAHK)] spectrum (100% of relative intensity) corresponds to the two-proton adduct of the once negatively charged [Cu^{II}(DAHK)] species. This was confirmed by the detection of a peak at *m/z* 529.5 in the negative detection mode (data not shown). Another peak detected at *m/z* 385.3 (30% of relative intensity) is attributed to the [Cu^{II}(DAH)] species issued from the fragmentation of

the parent peak at m/z 531.5. Departure of the Lys residues from the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ complex is in line with a Cu^{II} binding site in which only the first three residues are involved. The main peak detected in the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ spectrum corresponds to the monocationic $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ species. A peak at m/z 803.5 that corresponds to the $[\text{Cu}_2(\text{GHK})_2]$ species (Figure S2) is observed but with a very low relative intensity (less than 5%), thereby suggesting that the binuclear unit observed in the solid state is mainly disrupted in solution. Fragmentation peaks observed at m/z 372.1 (65% of relative intensity) and 229.3 (22% of relative intensity) are attributed to the departure of the $[\text{NH}_2\text{-CH}_2]$ N-terminal motif and the additional removal of the Lys residues from the parent species and were confirmed by MS/MS experiments. Contrary to what was observed in the case of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$, the main fragmentation peak observed corresponds to the removal of the $[\text{NH}_2\text{-CH}_2]$ N-terminal motif suggesting that the principal Cu^{II} anchor site is the His residue. Only in a second time, the Lys residue is lost. The very low intensity of the peaks observed at m/z 470.1 ($[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ spectrum) and at m/z 341.1 ($[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ spectrum), which correspond to the DAHK and GHK ligands, respectively, agrees with a Cu^{II} ion strongly bound by both peptides.

X-ray absorption spectroscopy (XAS): To gain further insight into Cu^{II} coordination in solution, X-ray absorption spectra were analysed in the near-edge structure (XANES) and in the extended region (EXAFS). EXAFS data (Figure S3 in the Supporting Information) are best fitted with five N/O neighbours ($[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$) and with either five or six N/O neighbours ($[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$), four of them being significantly closer (Table 3). In the case of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$, it is difficult to determine precisely whether one or two axial oxygen atoms are involved in the copper coordination in solution, given both fits were very similar as shown by the very close value of the goodness-of-fit (0.44 and 0.53% for (4+2) and (4+1) neighbours, respectively).

The EXAFS data are thus consistent with the X-ray structures. Qualitative XANES analysis agrees with geometrical data determined by EXAFS. The $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ XANES data (Figure 4) show the presence of the pre-edge P peak at 8979.7 eV, assigned to the $1s \rightarrow 3d$ transi-

Table 3. First coordination shell structural data obtained from R space fits of EXAFS spectra: N is the number of neighbours, R is the absorber-neighbour distance, σ is the Debye-Waller factor; uncertainties are estimated in coordination numbers to $\pm 10\%$, in R to $\pm 0.02 \text{ \AA}$, and to $\pm 0.001 \text{ \AA}^2$ in σ^2 . For $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$, results of fits with 4+2 neighbours and 4+1 neighbours as starting parameters are given.

	Scattered/Backscattered	N	R [\AA]	σ^2 [\AA^2]	R factor [%] ^[a]
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$	Cu-N/O	4.49	1.97	0.0057	0.12
	Cu-O	0.79	2.61	0.01 ^[b]	
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ (4+2)	Cu-N/O	4.49	1.95	0.0046	0.44
	Cu-O	1.52	2.50	0.01 ^[b]	
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ (4+1)	Cu-N/O	4.42	1.95	0.0045	0.53
	Cu-O	1.49	2.49	0.01 ^[b]	

[a] R factor represents the overall goodness-of-fit. [b] Fixed parameter.

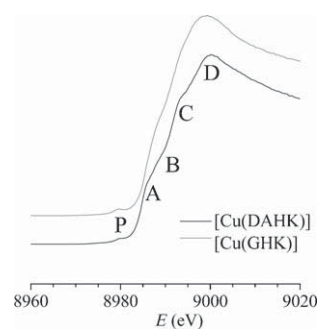


Figure 4. The XANES regions of the normalized absorption amplitude versus energy for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ complexes at pH 7.4. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})] = 50 \text{ mM}$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})] = 50 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$.

tion characteristic of the Cu^{II} valence state. The lower intensity of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ pre-edge feature indicates that the Cu^{II} centre is in a more centro-symmetric environment than in $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$.^[13] The XANES signatures differ between the two Cu^{II} species, as indicated by more intense B and D peaks and less-pronounced A and C peaks for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ than $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$. In related systems, these peaks have been proposed to be sensitive to second- and third-shell perturbations.^[14] More precisely, an increase of the B peak and a decrease of the C peak were related to a more important contribution of external shells. In the present case, the more intense B peak (or less intense C peak) for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ relative to $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ is likely related to the possibility of having an exchangeable fourth equatorial ligand in the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ species, also consistent with a greater Debye-Waller factor. These results show that the square pyramidal structure observed in the solid state for the two complexes is retained in solution.

EPR spectroscopy: EPR spectra (9 GHz) were recorded for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ complexes in solution and are shown in Figure 5. Characteristic parameters are listed in Table 4. Both complexes display a classical mononuclear square-planar-type EPR spectrum with some resolved super-hyperfine interaction in the g_{\perp} region, as previously reported.^[15] The g_{\parallel} and A_{\parallel} values measured on the spectra are consistent with the $3\text{N}+1\text{O}$ and 4N binding mode, respectively.^[16] These binding modes are thus retained from the solid state to solution. In the case of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$, however, the dinuclear structure observed in the crystal state is not present in solution.^[15a] Therefore it is likely that the equatorial oxygen ligand, provided by the C-terminus carboxylate

Table 4. EPR parameters obtained from the spectra of the different complexes in Figure 5.

	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel} (^{63}Cu) [MHz]
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$	2.19	2.04	596
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$	2.23	2.05	560
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})_2]$	2.22	2.05	595
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{G}]$	2.22	2.05	568
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{H}]$	2.21	2.05	590

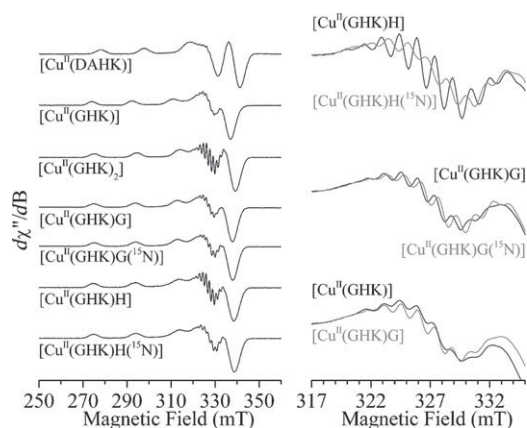


Figure 5. cw EPR spectra recorded for different Cu complexes. The right panel is an enlargement of the g_{\perp} region for some spectra to compare their superhyperfine patterns. Experimental conditions: microwave frequency 9.42 GHz, microwave power 0.13 mW, modulation amplitude 0.5 mT, modulation frequency 100 kHz, time constant 164 ms, $T=50$ K. Samples prepared in HEPES buffer 100 mM, pH 7.4.

of a neighbouring molecule in the crystal, is replaced by a solvent molecule in solution, as previously proposed,^[15a] or by an acetate anion present from the peptide batch, sold as an acetate salt. This is in line with the XANES results, which propose an exchangeable equatorial ligand. This labile position has been investigated by addition of either glycine or histidine to the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ solution.

The EPR spectrum obtained for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{G}]$ differs slightly from that of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$, particularly in the g_{\parallel} region. The superhyperfine structure on the g_{\perp} region is also affected. To better probe the coordination mode of the additional glycine amino acid, we have used different isotopically labelled glycine (^{15}N on the amine group or ^{13}C either on the carboxylate group or on the C_{α}). The superhyperfine structure observed for the ^{15}N -labelled glycine differs sufficiently from that of the unlabelled sample to support binding through the amine function. The weak ^{13}C couplings were probed with pulse EPR. Figure 6 shows the 6-pulse hyperfine sub-level correlation (HYSCORE) contour plots obtained for both carboxylate and C_{α} -labelled samples. This technique is best adapted in this type of multinuclear coupled systems and was chosen in particular to avoid intensity suppression effects.^[17] Ridges centred at the ^{13}C Larmor frequency were detected in both samples. The signal was more intense and the coupling stronger for the C_{α} -labelled sample relative to the carboxylate-labelled sample, thereby supporting the fact that the additional glycine binds predominantly by its amine function in equatorial position (we note that based on these data we cannot fully exclude that a fraction of the additional glycine binds through its carboxylate function). This binding mode is in agreement with the observations made on the continuous-wave (cw) EPR spectra.

In the case of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{H}]$ complex, a drastic change was observed in the superhyperfine coupling pattern. The seven superhyperfine lines, consistent with a $3\text{N}+1\text{O}$ binding mode for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$, were replaced by a nine-line

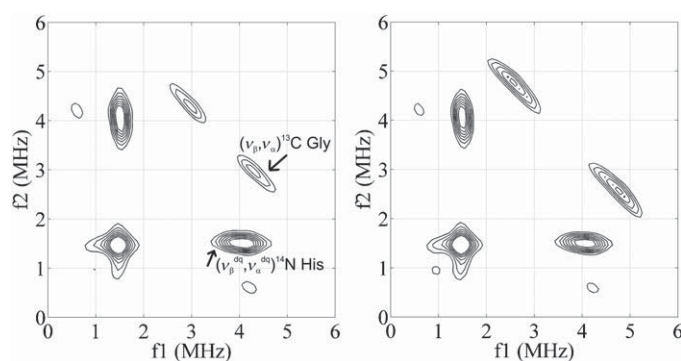


Figure 6. Six-pulse HYSCORE contour plot recorded for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{G}-(^{13}\text{COO})]$ (left panel) and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{G}(^{13}\text{C}_{\alpha})]$ (right panel). The labels for the cross-peaks are indicated on the left panel. Experimental conditions: microwave frequency 9.71 GHz, $B=337$ mT, $\tau_1=104$ ns, $\tau_2=136$ ns, $T=4.2$ K. Samples prepared in HEPES buffer 100 mM, pH 7.4.

pattern consistent with a 4N binding mode for $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{H}]$. This latter pattern is affected when histidine labelled with ^{15}N only on the imidazole ring is used to prepare the complex, thereby indicating that the additional histidine binds to the Cu ion through the imidazole ring rather than its N terminus. This is confirmed by HYSCORE measurements performed on the labelled sample for which a characteristic ^{15}N cross-peak was detected (see Figure S4 in the Supporting Information).

In the case of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})_2]$ complex, a change similar to that observed for the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})\text{H}]$ complex was detected in the superhyperfine coupling pattern as well as in the g_{\parallel} and A_{\parallel} parameters. This indicates that the second GHK ligand should bind the Cu^{II} centre through its imidazole ring.

NMR spectroscopy: In conjunction with other spectroscopic techniques, NMR spectroscopy can yield information about both Cu^{II} coordination to peptides and the dynamic/mechanism of Cu^{II} exchange between peptides. Due to its paramagnetism, Cu^{II} induces the broadening of the binding groups in its close vicinity.^[18] The impact of Cu^{II} on the spectrum will vary considerably depending on the Cu^{II} exchange rate (between holo and apo forms) relative to the timescale of the NMR spectroscopic experiment performed. The two examples studied here are representative of extreme cases: the Cu^{II} exchange is very slow when bound to DAHK and fast when bound to GHK. ^{13}C spectra of the GHK and DAHK peptides in presence of 0.1 and 0.5 equiv of Cu^{II}, respectively, are shown in Figure 7 and Figure 8. The corresponding ^1H spectra are shown in the Supporting Information. Based on these data, a mapping of the residues most affected is proposed in Scheme 1.

In the case of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ complex, the C- and N-terminal and the side chain of His and Asp are affected, whereas in the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ complex, despite being recorded in the presence of a fivefold lesser Cu^{II} content, almost all residues are strongly broadened with the exception of the Lys side chain. This suggests that in the case of DAHK,

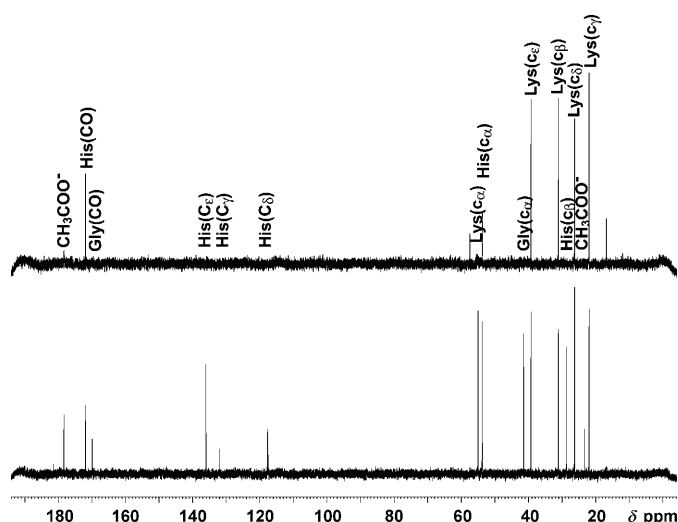


Figure 7. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of 10 mM GHK peptide in D_2O in the absence (bottom spectrum) or in the presence of 0.1 equiv Cu^{II} (top spectrum) at pH 7.2. Note that the shift of some peaks is due to a slight modification of the pH value after Cu^{II} addition. $T = 298\text{ K}$, $\nu = 125.8\text{ MHz}$.

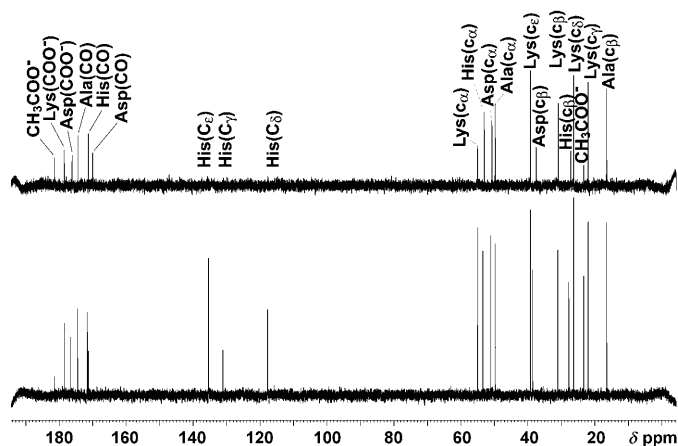
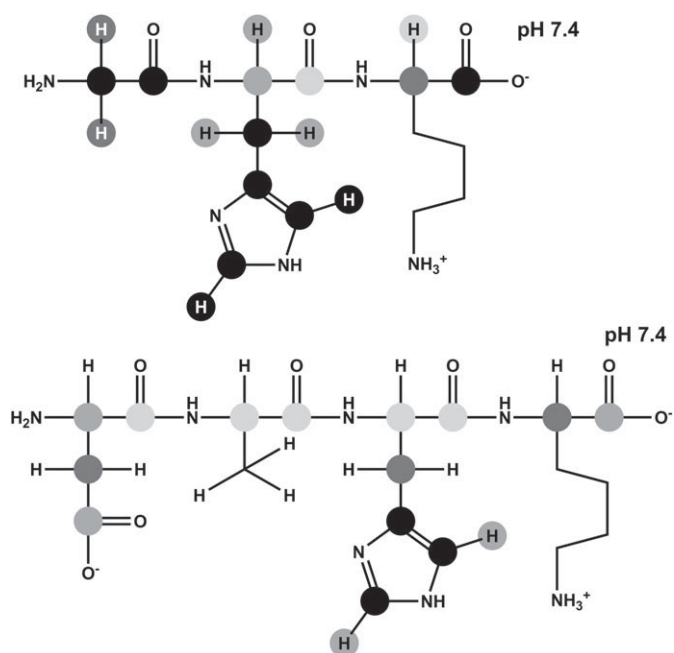


Figure 8. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of 10 mM DAHK peptide in D_2O in the absence (bottom spectrum) or in the presence of 0.5 equiv Cu^{II} (top spectrum) at pH 7.2. Note that the shift of some peaks is due to slight modification of the pH value after Cu^{II} addition. $T = 298\text{ K}$, $\nu = 125.8\text{ MHz}$.

the Cu^{II} exchange is very slow and that the peaks observed belong to the apo form of the peptide, with those of the Cu^{II} complex being fully broadened and thus difficult to detect, which is in line with what was proposed on longer HSA N-terminal fragments.^[19] This hypothesis is confirmed by quantification of the ^1H NMR spectroscopic signal, which shows that in presence of 0.5 equiv of Cu^{II} , the intensity of the signal recorded is about half that of the apo peptide (Figure S6 in the Supporting Information). Knowing that the Cu^{II} binding affinities for both peptides are close,^[2b,20] this result was unanticipated. Actually, the reason for such a discrepancy may be connected to the fact that, in a substoichiometric Cu^{II} ratio, GHK can form $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})_2]$ species (see



Scheme 1. Schematic representation of the C and H atoms for which the NMR spectroscopic signal is broadened upon addition of Cu^{II} to GHK (top) and DAHK (bottom) at pH 7.2. Black = highly broadened, dark grey = broadened, grey = moderately broadened, light grey = slightly broadened.

Figure S7 in the Supporting Information and ref. [2b]), with the second GHK occupying the fourth equatorial position through the imidazole ring of the His side chain (see the EPR spectrum in Figure 5 and ref. [21]). Formation of such a ternary complex will help Cu exchange from one peptide to another. As previously described,^[14e] Cu^{II} broadening of peptide residues can also originate from involvement in Cu transfer (even if the Cu transfer is very slow, as in the case of DAHK). This is one possible reason why Asp and His lateral chains and the C- and N-terminal of DAHK are the residues mostly affected. The second possibility is that these four functions (from the apo peptide) may be involved in chemical exchange for Cu^{II} apical binding (in the holo peptide). Related to that, the carboxylate groups from Asp1 or C-terminal are equivalently broadened, which strongly suggests that these functions are involved in Cu transfer but not in direct Cu binding in solution. Hence, this data is in disagreement with the previously proposed coordination of Asp1 carboxylate function in the Cu^{II} apical position.^[12]

Electrochemistry: Cyclic voltammetry (CV) traces of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GHK})]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ complexes are shown in Figure 9. The main difference with previous data published in the literature is the nature of the working electrode.^[22] In the present study, we used vitreous carbon electrode, which has been shown to be a well-suited surface for the study of Cu^{II} -peptide complexes.^[23]

The CV trace of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAHK})]$ complex shows no cathodic process and a reversible anodic process at $E^{1/2} =$

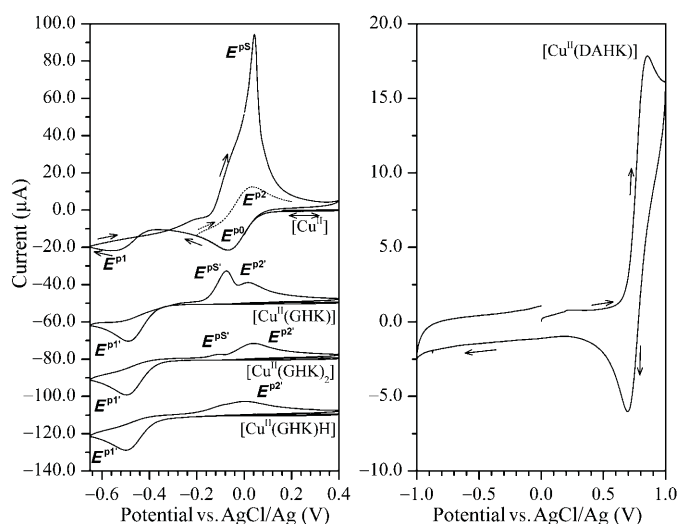
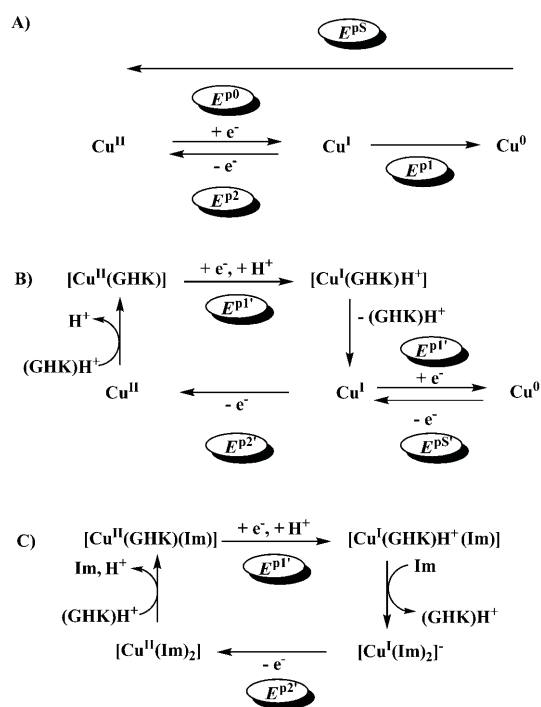


Figure 9. Cyclic voltammogram recorded for [Cu^{II}], [Cu^{II}(GHK)], [Cu^{II}(GHK)₂], [Cu^{II}(GHK)H] (left panel) and for [Cu^{II}(DAHK)] (right panel). Experimental conditions: scan rate 100 mV s⁻¹, T = 298 K, 0.1 M 50 mM, Tris buffer pH 7.4, 0.1 M NaClO₄, [Cu^{II}(DAHK)] = 2 mM; [Cu^{II}(GHK)] = 1.6 mM.

0.77 V versus AgCl/Ag ($\Delta E^p = 130$ mV) that corresponds to the reversible oxidation of the [Cu^{II}(DAHK)] complex into [Cu^{III}(DAHK)]⁺, which is in line with what was previously observed for related complexes.^[24] More precisely, the $E^{1/2}$ oxidation process abides by the following trend with respect to the equatorial binding plane: {NH₂, 3N⁻}^[24a] (0.41 V versus AgCl/Ag) < {Im(His), 3N⁻}^[24b] (0.66 V versus AgCl/Ag) < {NH₂, Im(His), 2N⁻} (0.77 V versus AgCl/Ag).

The CV trace of the [Cu^{II}(GHK)] complex shows no anodic process and an irreversible cathodic process at $E^{p1} = -0.49$ V versus AgCl/Ag that corresponds to the reduction of the [Cu^{II}(GHK)] complex. This is in drastic contrast to the CV trace obtained for Cu^{II} with no peptide in the same buffer, which shows a reduction of Cu^{II} to Cu^I at $E^{p0} = -0.07$ V versus AgCl/Ag followed by reduction of Cu^I to Cu⁰ at $E^{p1} = -0.54$ V versus AgCl/Ag (redox processes are summarised in Scheme 2A). On the reverse scan for [Cu^{II}(GHK)], a first anodic peak is detected at $E^{ps} = -0.07$ V versus AgCl/Ag. Its shape and position are characteristic of the oxidation–solubilisation process of adsorbed Cu⁰ that lead to Cu^I. A second anodic peak is detected at $E^{p2} = 0.02$ V versus AgCl/Ag and corresponds to oxidation of Cu^I to Cu^{II}. This indicates that reduction of [Cu^{II}(GHK)] is followed by decoordination of the peptide ligand. Due to the difference in Lewis acidity of Cu^I and Cu^{II}, protonation of the amidyl function of the Gly–His peptide bond involved in the Cu^{II} binding is likely concomitant with the reduction process. At the [Cu^{II}(GHK)] reduction potential (-0.54 V versus AgCl/Ag), unbound Cu^I is reduced to Cu⁰^[25] and adsorbed onto the electrode. When scanning back towards cathodic potential, the reduction of unbound Cu^{II} to Cu^I (expected near $E^{p0} = -0.07$ V versus AgCl/Ag) is not observed, thus indicating that formation of the [Cu^{II}(GHK)] complex is faster than 1 s. The different redox processes de-



Scheme 2. Electrochemical processes associated with the reduction of A) [Cu^{II}], B) of the [Cu^{II}(GHK)] complex and C) of the [Cu^{II}(GHK)] complex in presence of an imidazole (Im) donor species. Potentials refer to Figure 9.

tected in the CV trace of the [Cu^{II}(GHK)] complex are summarised in Scheme 2B.

In the presence of an excess amount of GHK or His, the cathodic peak is not modified significantly, which means that the nature (N or O) of the fourth ligand has little impact on the reduction process. On the contrary, the desorption peak (p2 in Figure 9) is greatly reduced and the oxidation peak of Cu^I to Cu^{II} (E^{p2}) is slightly shifted. This is in line with the coordination of Cu^I by the imidazole (Im) from the side chain of GHK or His. We propose that in the presence of an excess amount of GHK or His, the Cu^I release after reduction of the [Cu^{II}(GHK)] species is coordinated by the excess ligand, thus leading to the formation of a new Cu^I complex. This new Cu^I complex is oxidised at $E^{p2} = 0.04$ V versus AgCl/Ag (in the case of an excess amount of GHK) and $E^{p2} = -0.01$ V versus AgCl/Ag (in the case of an excess amount of His). In this latter case, we propose that the motif Im–Cu^I–Im, which is quite usual in Cu^I coordination,^[26a,b] is formed (illustrated in Scheme 2C). In the former case, the GHK ligand may remain bound by both the terminal –NH₂ and the His.

Note that we also performed the same series of experiments in phosphate buffer (see Figure S8 and Scheme S2 in the Supporting Information). In the latter case, it is not possible to record the CV trace of unbound Cu^{II} because of its rapid precipitation in phosphate buffer. However, in the presence of GHK or DAHK peptide, the results obtained in phosphate buffer were fully consistent with those obtained

in tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer except for small modifications in peak potentials. This suggests that, even if the tris buffer interferes with Cu^{II} binding to DAHK and GHK peptides, this doesn't impact significantly the electrochemical signatures.

Reactive oxygen species (ROS) production: The cyclic voltammetry data of the [Cu^{II}(GHK)] complex provide evidence of an irreversible reduction peak at -0.62 V versus AgCl/Ag, whereas those of the [Cu^{II}(DAHK)] show a unique reversible oxidation process at 0.72 V versus AgCl/Ag (but no reduction process); hence these data suggest the impossibility for both complexes to be directly reduced by ascorbate (Asc). This is why catalytic oxidation of Asc under aerobic conditions by both complexes was compared to oxidation by unbound Cu^{II}. Consumption of Asc was monitored by the decrease of its absorption band at 265 nm. Drastic deceleration of Asc consumption was observed in the presence of both peptides (Figure S9 in the Supporting Information), which is in line with a redox silencing of Cu^{II} when bound to the peptides and with the redox potential values of the [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] complexes and that of Asc (≈ 0.1 V versus AgCl/Ag).

Previous results showed a propensity of the [Cu^{II}(GHK)] complex to catalyze the HO[•] formation using Asc as reductant.^[22b] As HO[•] production from dioxygen requires the redox cycling of the copper complex (Scheme S3 in the Supporting Information), and as our data show that Asc is unable to reduce [Cu^{II}(GHK)], these results were re-evaluated. Fluorescence measurements were performed by using coumarin-3-carboxylic acid. We found very weak HO[•] production (in the range of residual HO[•] production in the absence of added Cu^{II} ion) for both [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] complexes relative to the HO[•] production in similar concentrations of unbound Cu^{II} (Figure S10 in the Supporting Information). Similar results were obtained with EPR using the α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-tert-butyl nitron (POBN) spin trap (data not shown). Error in the previous results^[22b] with regards to the [Cu^{II}(GHK)] complex is attributed either to 1) a miscalculation of the GHK concentration (see the Experimental Section), thus leading to unbound Cu^{II} in solution or 2) an inversion with data of the [Cu^{II}(Gly)₂] species, which was found to produce no HO[•],^[22b] a result further questioned.^[27]

Conclusion

In the present work we gained new insight into the structural aspects of [Cu^{II}(GHK)] and [Cu^{II}(DAHK)] and reported data on their redox behaviour. The use of several spectroscopic techniques together with the determination of the crystal structure gave a complete set of information, which will be important as reference in the analysis of other, more complicated Cu^{II}-peptide interactions with peptides such as amyloid- β or α -synuclein sequences, for example, for which no crystal structure is available. Moreover, the analysis shed

new light on Cu^{II} exchange dynamics and redox behaviour in particular. This is important in the biological context. DAHK is the high-affinity Cu^{II} binding site of human serum albumin; this region is 5% occupied with Cu^{II}. This is the first time this copper-loaded sequence has been crystallised. It has been suggested that albumin is involved in Cu^{II} transport in the blood towards other targets. The slow exchange rate of Cu^{II} in DAHK indicates that albumin is not a fast Cu^{II} supplier. The observation of an axial water molecule indicates that also other ligands can bind on this labile position, which might be the reason why Cu^{II} is not completely inert and can be exchanged, albeit very slowly. Thus differences in the coordination of the apical position might explain differences seen between the reactivity of [Cu^{II}(DAHK)] and Cu-albumin.^[8,28] Although the affinity of GHK for Cu^{II} is on the same order of magnitude as that of DAHK,^[21] it exchanges much faster and hence could serve as a fast Cu^{II} supplier. The structural reason for that is that the fourth equatorial binding site on Cu^{II} is available to bind a transfer partner. Another way to transfer Cu^{II} from DAHK and GHK is by reducing Cu^{II} to Cu^I, which might occur in the reducing intracellular environment. The CV results indicate that Cu^{II} in DAHK is stable and not reduced to Cu^I. By contrast, it is possible in the case of GHK with a concomitant release of Cu^I. Thus Cu^{II} in GHK could be released and transferred to other targets by reduction (with reductants stronger than Asc), as it could be expected intracellularly.

Experimental Section

Chemicals: All solutions were prepared with Milli-Q (18 M Ω) water. GHK peptide was bought from Bachem (Switzerland); DAHK peptide was bought from Bachem (Switzerland) or GeneCust (Dudelange, Luxembourg). pH was controlled using a 744 pH meter equipped with a biotrode electrode (Metrohm SA, Switzerland). Stock solutions of peptides were prepared by dissolving the peptides in D₂O (≈ 50 mg in 1 mL) and concentrations were determined by titration followed by UV/Vis absorption spectroscopy (using an Agilent 8453 spectrometer at 25°C in 1 cm path-length quartz cuvette). In a typical experiment, the stock solution was diluted tenfold and amounts of a Cu^{II} solution of known concentration were added until no increase in the d-d band of the Cu^{II}-peptide complex and turbidimetry due to unbound Cu^{II} precipitation in the buffer were observed. Measurements were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). This experimental determination led to concentration values that are 10–20% off compared to those obtained using the molecular mass of the peptide and its counterions, thereby suggesting that counterion salts co-precipitate during peptide synthesis. Stock solutions were stored at -20°C. Unless specified, the Cu^{II} ion source was hydrated Cu(SO₄). For EPR measurements, a 0.1 M stock solution of ⁶³Cu(NO₃)₂ obtained by nitric acid treatment of isotopically pure ⁶³Cu (Eurisotop, Saclay, France) was used and 10% glycerol was added to the samples. [Cu(GHK)₂], [Cu(GHK)H] and [Cu(GHK)G] were prepared by adding GHK (1 equiv), His (1 equiv) and Gly (10 equiv) to the [Cu(GHK)] complex, respectively.

For ascorbate, a stock solution (20 mM) of ascorbate was prepared in milli-Q water at room temperature just before beginning the experiment and was used immediately. Because ascorbate degrades very quickly, a new solution was prepared for each experiment.

A stock solution (1 mM) of desferrioxamine (DFO, Sigma) was prepared by dissolving the appropriate mass in milli-Q water.

A stock solution of coumarin-3-carboxylic acid (5 mM) was prepared in phosphate (20 mM), NaCl (100 mM) buffer at pH 9 at room temperature. The stock solution was stored at -20°C .

¹⁵N-labelled glycine, ¹³C-(COO⁻)-labelled glycine and ¹⁵N(Im)-labelled histidine were purchased from Eurisotop (Saclay, France).

X-ray diffraction: Crystals suitable for X-ray diffraction were obtained by slow ethanol diffusion and evaporation of a 0.2 M solution in milli-Q water of the corresponding complex. Data were collected using a Kappa X8 APPEX II Bruker diffractometer with graphite-monochromated Mo_{K α} radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The temperature of the crystal was maintained at the selected value (100 K) by using a 700 series Cryostream cooling device within an accuracy of $\pm 1 \text{ K}$. Intensity data were corrected for Lorentz polarisation and absorption factors. The structures were solved by direct methods using SHELXS-97^[29] and refined against F^2 by full-matrix least-squares techniques using SHELXL-97^[30] with anisotropic displacement parameters for all non-hydrogen atoms.

Treatment of H: H atoms of the ligand were added from the difference Fourier map and refined by the riding model. For the [Cu^{II}(DAHK)] complex only, the H atoms of the water molecules were subsequently included in the refinement in geometrically idealized positions, with C–H = 0.96(3) \AA and H–H = 1.52(3) \AA , and refined using the riding model with isotropic displacement parameters of $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.4 U_{\text{eq}}$ (parent atom). For [Cu^{II}(GHK)], the lateral chain of lysine is disordered over two sites with occupancies of 0.5:0.5. Occupancy parameters for the 16 water oxygen atoms were refined. The net occupancy of the ordered water is 9.25. All calculations were performed by using the Crystal Structure crystallographic software package WINGX.^[31] The absolute configuration was determined by refining the Flack parameter^[32] using a large number of Friedel pairs.

CCDC-809108 ([Cu^{II}(GHK)]) and 809109 ([Cu^{II}(DAHK)]) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

ESI-MS measurements: ESI mass spectra were recorded using an API 365 MS mass spectrometer at a flow rate of $5 \mu\text{L min}^{-1}$.

XAS measurements: Cu K-edge XAS spectra were recorded using the SAMBA bending magnet beamline at Synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France). The main optical elements consisted of a double crystal Si(111) dynamical focusing monochromator between two palladium-coated mirrors, one collimating the beam in the vertical direction and one focusing it on the sample. X-ray harmonic rejection was obtained by setting the energy cutoff to change the incidence of the mirrors. The measurements were performed on solution samples at room temperature in the fluorescence mode using a single-element Silicon Drift Detector (SDD). The energy was calibrated by the simultaneous measurement of a Cu foil spectrum in transmission (first inflection point set at 8980.3 eV). Possible X-ray photo-reduction of the [Cu^{II}(peptide)] samples was monitored by checking, on consecutive scans, the appearance of the XANES feature at 8984 eV, which is typical of Cu^I formation. After 5 scans, which lasted around 10 min each, the feature was still small, thus indicating a poor reduction effect. Two series of around 10 to 20 scans were recorded. For the EXAFS analysis, the photo-reduction of scans that can be neglected was averaged. For the XANES study, only the two first scans of each series were added. Points were measured every 0.25 eV in the XANES region and steps were gradually increased from 0.5 eV (at $E = 9000 \text{ eV}$) to 5 eV (at $E = 9600 \text{ eV}$) in the EXAFS region.

EPR spectroscopy: EPR spectra (9.4 GHz) were recorded using a Bruker ELEXSYS 500 spectrometer equipped with a continuous-flow He cryostat (Oxford). The field modulation frequency was 100 kHz. Pulsed EPR experiments were recorded using a Bruker ELEXSYS 580 spectrometer at liquid helium temperatures. Pulsed EPR data were processed by using routines locally written with Matlab (R2008b, The Mathworks, Inc.).

NMR spectroscopy: 1D ¹H and ¹³C experiments and 2D experiments were recorded using a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance inverse Z-gradient probe (TBI ¹H, ³¹P, BB). All

chemical shifts are relative to tetramethylsilane. 1D NMR and 2D NMR spectra were collected at 298 K in pure D₂O.

Cyclic voltammetry (CV): CV measurements were recorded under argon using a 620C electrochemical analyzer (CH Instruments, Inc). The working electrode was a glassy carbon disk and a Pt wire was used as counter-electrode. The reference electrode was an AgCl/Ag electrode (0.223 V versus NHE) isolated in a fritted bridge. Immediately before the measurement of each voltammogram, the working electrode was carefully polished with alumina suspensions (1, 0.3 and 0.05 μm , successively), sonicated in an ethanol bath and then washed carefully with ethanol. The electrochemical cell medium used was milli-Q water with 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4) added as supporting electrolyte.

Measurements of HO^{\cdot} production: These were performed in phosphate (20 mM), NaCl (100 mM) buffer at pH 7.4. The reaction was started by the addition of ascorbate (500 μM). In all these experiments, DFO (at a final concentration of 1 or 2 μM depending on buffer concentration) was added to avoid non-specific OH^{\cdot} production by metallic ion impurities from the buffer.

Coumarin-3-carboxylic acid (3-CCA) (Sigma) was used to detect HO^{\cdot}.^[22b] HO^{\cdot} reacts with 3-CCA to form 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid (7-OH-CCA), which is fluorescent at 452 nm upon excitation at 395 nm. The intensity of the fluorescence signal is proportional to the number of 7-OH-CCA molecules formed, which in turn is proportional to the HO^{\cdot} radicals generated. [CCA] = 500 μM .

Ascorbate consumption was monitored by UV/Vis spectroscopy. The intensity of the Asc absorption band at $\lambda = 265 \text{ nm}$ ($\epsilon = 14500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was monitored as a function of time, in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) that contained 100 μM of Asc, 2 μM of DFO, 5 μM of Cu^{II} and after addition of 6 μM of GHK or DAHK peptide.

Acknowledgements

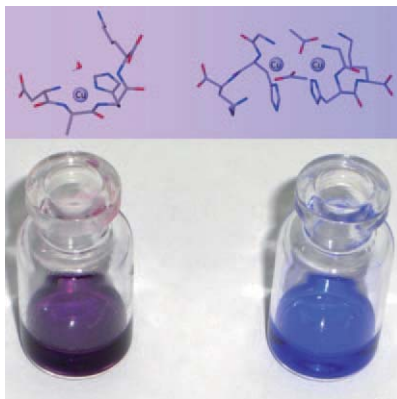
This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche, Programme Blanc NT09-488591, "NEUROMETALS" (P.F., C.H. and P.D.) and 05-JCJC-0010-01, "NEUROARPE" (P.D.). We thank the staff of the SAMBA beamline at SOLEIL and more particularly Dr. Emiliano Fonda for help in performing the XAS experiments (SOLEIL Project 20080324). Dr. Yannick Coppel and Valérie Bourdon are acknowledged for their help in NMR spectroscopic experiments and analysis and in ESI-MS experiments, respectively. We thank Fanny Leroux for earlier results obtained on [Cu^{II}(GHK)], Bertrand Badei for the ascorbate consumption experiments and Bruno Alies for his participation in the NMR spectroscopic experiments.

- [1] a) H. Kozłowski, A. Janicka-Kłos, J. Brasun, E. Gaggelli, D. Valensin, G. Valensin, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2665–2685; b) E. Gaggelli, H. Kozłowski, D. Valensin, G. Valensin, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1995–2044.
- [2] a) C. Harford, B. Sarkar, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 123–130; b) C. Conato, R. Gavioli, R. Guerrini, H. Kozłowski, P. Mlynarz, C. Pasti, F. Pulidori, M. Remelli, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2001**, 1526, 199–210; c) M. Rózga, M. Sokolowska, A. M. Protas, W. Bal, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12, 913–918.
- [3] L. Pickart, M. M. Thaler, *Nature* **1973**, 243, 85–87.
- [4] A. Siméon, F. Monier, H. Emonard, Y. Wegrowski, G. Bellon, J. C. Monboisse, P. Gillery, W. Hornebeck, F.-X. Maquart, *Curr. Top. Pathol.* **1999**, 93, 95–101.
- [5] L. Pickart, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, 19, 969–988.
- [6] P. M. May, J. Whittaker, D. R. Williams, *Inorg. Chim. Acta* **1983**, 80, L5–L7.
- [7] D. C. Carter, J. X. Ho, *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45, 153–203.
- [8] W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* **1998**, 70, 33–39.
- [9] C. M. Perkins, N. J. Rose, B. Weinstein, R. E. Stenkamp, L. H. Jensen, L. Pickart, *Inorg. Chim. Acta* **1984**, 82, 93–99.

- [10] J. F. Blount, K. A. Fraser, J. T. Freeman, J. T. Szymanski, C.-H. Wang, *Acta Crystallogr.* **1967**, *22*, 396–405.
- [11] N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 1309–1316.
- [12] J. P. Laussac, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7563–7568.
- [13] M. Sano, S. Komorita, H. Yamatera, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 459–463.
- [14] a) V. A. Streltsov, S. J. Titmuss, V. C. Epa, K. J. Barnham, C. L. Masters, J. N. Varghese, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3447–3456; b) R. W. Strange, L. Alagna, P. Durham, S. S. Hasnain, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4265–4268; c) P. Frank, M. Benfatto, B. Hedman, K. O. Hodgson, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 4126–4139; d) E. Borghi, P. L. Solari, *J. Synchrotron Radiat.* **2005**, *12*, 102–110; e) C. Hureau, Y. Coppel, P. Dorlet, P. L. Solari, S. Sayen, E. Guillon, L. Sabater, P. Faller, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9686–9689; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9522–9525.
- [15] a) J. H. Freedman, L. Pickart, B. Weinstein, W. B. Mims, J. Peisach, *Biochemistry* **1982**, *21*, 4540–4544; b) G. Rakhit, B. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.* **1981**, *15*, 233–241.
- [16] J. Peisach, W. E. Blumberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708.
- [17] a) S. Stoll, C. Calle, G. Mitrikas, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2005**, *177*, 93–101; b) B. Kasumaj, S. Stoll, *J. Magn. Reson.* **2008**, *190*, 233–247; c) P. Dorlet, S. Gambarelli, P. Faller, C. Hureau, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9437–9440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9273–9276.
- [18] I. Bertini, C. Luchinat, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 77–110.
- [19] J. P. Laussac, B. Sarkar, *Biochemistry* **1984**, *23*, 2832–2838.
- [20] M. Sokolowska, A. Krezel, M. Dyba, Z. Szewczuk, W. Bal, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 1323–1331.
- [21] A. Trapaidze, C. Hureau, W. Bal, M. Winterhalter, P. Faller, unpublished results.
- [22] a) K. Takehara, Y. Ide, *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *183*, 195–202; b) L. Guilloreau, S. Combalbert, A. Sournia-Saquet, H. Marzaguil, P. Faller, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1317–1325.
- [23] V. Baland, C. Hureau, J.-M. Savéant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3367–3372.
- [24] a) D. W. Margerum, K. L. Chellappa, F. P. Bossu, G. L. Burce, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6874–6876; b) C. Hureau, L. Charlet, P. Dorlet, F. Gonnet, L. Spadini, E. Anxolabéhère-Mallart, J.-J. Girerd, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 735–744.
- [25] M. Brzyska, K. Trzesniewska, A. Wiecekowska, A. Szczepankiewicz, D. Elbaum, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1–12.
- [26] a) S. Furlan, C. Hureau, P. Faller, G. La Penna, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15119–15133; b) C. Hureau, V. Baland, Y. Coppel, P. L. Solari, E. Fonda, P. Faller, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 995–1000.
- [27] R. C. Nadal, S. E. Rigby, J. H. Viles, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11653–11664.
- [28] L. Perrone, E. Mothes, M. Vignes, A. Mockel, C. Figueroa, M. C. Miquel, M. L. Maddelein, P. Faller, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 110–118.
- [29] SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution, G. M. Sheldrick, University of Göttingen, Göttingen (Germany), **1997**.
- [30] SHELXL-97, Program for the refinement of crystal structures from diffraction data, G. M. Sheldrick, University of Göttingen, Göttingen (Germany), **1997**.
- [31] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837–838.
- [32] H. D. Flack, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1983**, *39*, 876–881.

Received: March 11, 2011
Published online: ■ ■ ■, 0000

Deep purple into the blue: The complexes [Cu^{II}(GHK)] (GHK = Gly-His-Lys), found in the blood plasma, and [Cu^{II}(DAHK)] (DAHK = Asp-Ala-His-Lys; see graphic), the binding sequence of copper in human serum albumin, have been characterised structurally in the solid state and by a range of spectroscopies in solution. Results of the redox properties show a pronounced silencing of copper activity with respect to oxidative stress.

**Bioinorganic Chemistry**

C. Hureau, H. Eury, R. Guillot,
C. Bijani, S. Sayen, P.-L. Solari,
E. Guillon, P. Faller,
P. Dorlet**



**X-Ray and Solution Structures of
Cu^{II}GHK and Cu^{II}DAHK Complexes:
Influence on Their Redox Properties**





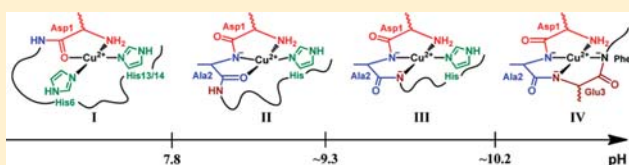
Article I-C

pH-Dependent Cu(II) Coordination to Amyloid- β Peptide: Impact of Sequence Alterations, Including the H6R and D7N Familial Mutations.Bruno Aliès,[†] Hélène Eury,[†] Christian Bijani, Lionel Rechinat, Peter Faller, and Christelle Hureau*

CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205, route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France, and Université de Toulouse, UPS, INPT, LCC, F-31077 Toulouse, France

Supporting Information

ABSTRACT: Copper ions have been proposed to intervene in deleterious processes linked to the development of Alzheimer's disease (AD). As a direct consequence, delineating how Cu(II) can be bound to amyloid- β ($A\beta$) peptide, the amyloidogenic peptide encountered in AD, is of paramount importance. Two different forms of $[Cu^{II}(A\beta)]$ complexes are present near physiological pH, usually noted components I and II, the nature of which is still widely debated in the literature, especially for II. In the present report, the phenomenological pH-dependent study of Cu(II) coordination to $A\beta$ and to ten mutants by EPR, CD, and NMR techniques is described. Although only indirect insights can be obtained from the study of Cu(II) binding to mutated peptides, they reveal very useful for better defining Cu(II) coordination sites in the native $A\beta$ peptide. Four components were identified between pH 6 and 12, namely, components I, II, III and IV, in which the predominant Cu(II) equatorial sites are $\{-NH_2, CO(Asp1-Ala2), N_{im}(His6), N_{im}(His13 \text{ or } His14)\}$, $\{-NH_2, N^-(Asp1-Ala2), CO(Ala2-Glu3), N_{im}\}$, $\{-NH_2, N^-(Asp1-Ala2), N^-(Ala2-Glu3), N_{im}\}$ and $\{-NH_2, N^-(Asp1-Ala2), N^-(Ala2-Glu3), N^-(Glu3-Phe4)\}$, respectively, in line with classical pH-induced deprotonation of the peptide backbone encountered in Cu(II) peptidic complexes formation. The structure proposed for component II is discussed with respect to another coordination model reported in the literature, that is, $\{CO(Ala2-Glu3), 3 N_{im}\}$. Cu(II) binding to the H6R- $A\beta$ and D7N- $A\beta$ peptides, where the familial H6R and D7N mutations have been linked to early onset of AD, has also been investigated. In case of the H6R mutation, some different structural features (compared to those encountered in the native $[Cu^{II}(A\beta)]$ species) have been evidenced and are anticipated to be important for the aggregating properties of the H6R- $A\beta$ peptide in presence of Cu(II).



INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly population with an estimated prevalence of 30 million people worldwide, a number that is expected to quadruple in 40 years.¹ AD is a complex multifactorial neurodegenerative disease in which many genetic and environmental factors are involved. The underlying mechanisms of AD are not clear, but there is evidence and a relatively wide agreement that the so-called amyloid cascade is a key and early event in the development of AD. This hypothesis proposes an increased extracellular accumulation of a peptide, called amyloid- β ($A\beta$), which leads to its aggregation, first into oligomers, then into protofibrils and last into amyloid plaques, a hallmark of AD. This hypothesis suggests that the mismetabolisms of $A\beta$ and of its precursor protein are initiating events in AD pathogenesis. Formation of $A\beta$ aggregates would further instigate pathological events, including formation of intracellular neurofibrillary tangles (another hallmark of AD), disruption of synaptic connections, ultimately leading to neuronal cells death and dementia.¹⁻⁶ $A\beta$ is typically a 39-43 residue polypeptide and consists of a hydrophilic N-terminal domain (1-28) and a C-terminal hydrophobic domain (29-39/43). In vivo, the most prevalent forms of $A\beta$ consist of 40 ($A\beta$ 40) and 42 amino acids ($A\beta$ 42). The longer form $A\beta$ 42 is more prone to aggregation and more toxic to

neurons than $A\beta$ 40, in agreement with the amyloid cascade hypothesis. Metal ions (Cu, Fe, Zn) have been proposed to play a key role in the development of AD. In vivo, in cello, and in vitro experiments strongly suggest that metal ions and in particular Cu ions are involved in AD. Cu ions can bind to $A\beta$ and modulate its aggregation. Furthermore $[Cu(A\beta)]$ oligomeric forms can catalyze the production of ROS (reactive oxygen species) in presence of physiological reducing agents (e.g., ascorbate), which finally leads to neuronal cells death (for reviews, see refs 7-14).

Copper coordination to the $A\beta$ peptides has been proposed as an important event in the amyloid cascade and deciphering the Cu environment when bound to $A\beta$ peptides is still a burning and controversial topic. At physiological pH, two equatorial binding modes coexist. The one predominant at lower pH is constituted of two equivalent sets of ligands (noted Ia and Ib), where the terminal $-NH_2$ (from Asp1), the CO from the Asp1-Ala2 peptide bond, a N from imidazole ring of His6 and from His13 (component Ia) or from His14 (component Ib) are involved.¹⁵⁻¹⁹ The two components have been proposed to be in equilibrium in 1:1 ratio,^{15,17} and thus in the following the mixture of Ia and Ib will be noted component I. However, a recent study reported

Received: August 10, 2011

Published: October 06, 2011

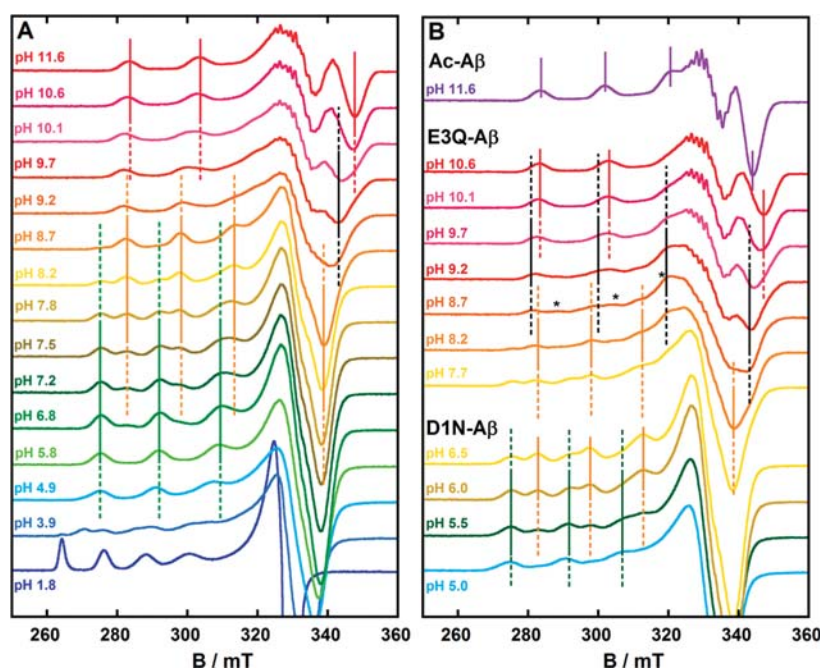


Figure 1. EPR spectra of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ complexes as a function of pH. Panel A: Peptide = $A\beta 16$. Panel B: Peptide = $D1N-A\beta$, $E3Q-A\beta$, or $Ac-A\beta$. Component I is designated by green lines, component II by orange lines, component III by black lines and components IV and IV' by red and purple lines, respectively. Plain lines indicate pH values where a component is predominant in solution and dotted lines pH range where a component is present in solution but not predominant. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})] = 1 \text{ mM}$ in D_2O . $\nu = 9.5 \text{ GHz}$, amplitude modulation = 0.5 mT , microwave power = 20 mW . $T = 110 \text{ K}$. * indicates the presence of a minor species, which is not detected in the EPR spectra of other $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ species, with $g_{\parallel} = 2.17(8)$ and $A_{\parallel} = 160 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ EPR parameters (see Supporting Information for identification of this species).

that a third component, where the two His involved in Cu(II) coordination are the His13 and His14, is also present, this third component (noted Ic) being more prone to formation of unstructured aggregates than Ia and Ib.²⁰ Regarding the second component (II), predominant at higher pH, there are two divergent hypotheses.¹⁹ Mainly on the basis of S-band EPR and HYSOCORE data on ^{13}C and ^{15}N isotopically labeled peptides, it was proposed that component II is made of the CO group from the Ala2–Glu3 peptide bond and the imidazole rings of the three His.¹⁸ In the second proposition, also deduced from HYSOCORE data on ^{13}C and ^{15}N isotopically labeled peptides¹⁵ but from NMR data as well,¹⁶ the $-\text{NH}_2$ terminal, the amidyl function N^- from the Asp1–Ala2 peptide bond, the CO from the Ala2–Glu3 peptide bond, and one among the three imidazole rings of His are the functions predominantly involved in equatorial Cu(II) binding. Regarding the apical positions, the debate is still open but involvement of carboxylate groups has been proposed in the literature.^{15,16,18}

Here, we report a EPR, CD, and NMR study of Cu(II) binding to the $A\beta$ peptide and to ten mutants that allow discrimination between the two proposed Cu(II) binding models in II (see above). Moreover, we describe the pH dependent Cu(II) binding to this series of peptides from pH 4 to 12. While such a pH range is not biologically pertinent, study performed outside the physiological range do help disentangling Cu(II) coordination features around physiological pH. Indeed, the Cu(II) peptidic species are generally obtained from each other by successive deprotonation (protonation) of the peptide when the pH is increased (decreased).^{21,22} Moreover, such a wide study is of interest from a chemical point of view since it provides general rules for Cu(II) coordination to peptides. We thus characterized two new components (noted III and IV) at pH higher than 8.

In this study, the impact on Cu(II) binding properties of the two English (H6R) and Tottori–Japanese (D7N) mutations linked to early onset familial AD were also investigated. In vitro studies of $A\beta 40$ and $A\beta 42$ peptides incorporating either the H6R or the D7N mutations have evidenced that the two mutations alter $A\beta$ assembly at its earliest stages, as well as monomer folding and oligomerization process. Moreover, it was shown that the oligomers of the mutated peptides are more toxic to cultured neuronal cells than the wild type oligomers.^{23,24} Trace Cu(II) have not been taken into account in these studies but might influence the aggregation process. Moreover, His6 intervenes in Cu(II) binding and Asp7 is a putative Cu ligand in the wild-type peptide. These are the reasons why it is worth determining how the H6R and the D7N mutations can modify Cu(II) coordination in these rare familial forms of AD. Although beyond the scope of the present phenomenological study, it would be very important to relate the impact of these mutations on the biological properties of the peptides with the difference in the Cu(II) coordination described here.

RESULTS

1. EPR pH-Dependent Study of Cu(II) Binding to $A\beta 16$ Peptides and Mutants. The shorter $A\beta 16$ peptide is used in the present study. Number of previous works have unambiguously shown that it represents the minimum $A\beta$ sequence involved in Cu(II) binding.^{25–27} The pH-dependent EPR signature of Cu(II) binding to the $A\beta 16$ peptide is shown in Figure 1 together with spectra of Cu(II) species obtained with the $D1N-A\beta$ and $E3Q-A\beta$ mutants and the N-terminally acetylated ($Ac-A\beta$) peptide at selected pH values. The EPR signatures of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(A\beta)]$

Table 1. EPR Parameters of Components I–IV and I'–IV' and of Other [Cu^{II}(peptide)] Complexes for Comparison

peptide	I		II		III		IV		pK _a (I/II) ^b	pK _a (II/III) ^b	pK _a (III/IV) ^b
	g ^a	A ^a	g ^a	A ^a	g ^a	A ^a	g ^a	A ^a			
human	2.26(2)	184	2.22(6)	161	2.19(1)	194	2.17(3)	203	7.8	9.3	10.2
D1N-Aβ	2.26(3)	180	2.23(0)	160	2.19(1)	194	2.17(4)	201	6.0	9.0	10.3
D7N-Aβ	2.26(2)	184	2.22(7)	160	2.18(8)	194	2.17(4)	197	7.7	9.1	10.6
E3Q-Aβ	2.26(3)	183	2.22(4)	161	2.19(0)	194	2.17(3)	201	7.6	8.5	9.7
E11Q-Aβ	2.26(5)	184	2.22(5)	161	2.18(7)	194	2.17(0)	202	7.5	9.3	10.1
H6A-Aβ	2.26(8)	185	2.22(8)	164			2.17(2)	202	7.3		9.6
H6R-Aβ	2.26(6)	180	2.22(7)	162			2.17(1)	205	7.2		9.7
H13A-Aβ	2.26(3)	180	2.23(0)	162			2.17(5)	202	7.5	9.5	10.2
H14A-Aβ	2.26(9)	182	2.22(7)	163			2.17(5)	202	7.5	9.6	10.4
DAHK ²⁸					2.19	199					
GGGGH ²⁹			2.23(0)	156	2.19(9)	200	2.17(1)	206			
GGGGG ²⁹							2.17(1)	206			
	I'		II'		III'		IV'				
Ac-Aβ	2.32(0)	168	2.27(3)	187	2.23(0)	171	2.19(1)	190	5.2	7.5	8.7
GGGTH ³⁰							2.20	200			

^a Parallel spin Hamiltonian parameters were obtained directly from the experimental spectra and were calculated from the second and the third hyperfine lines in order to remove second-order effects. A_{||} parameters are given in 10⁻⁴ cm⁻¹. ^b pK_a values are roughly estimated from EPR spectra, and with the exception of pK_a(I/II) that can be estimated accurately, the two others pK_a values are given with an uncertainty of ±0.3 pH unit.

complexes are complicated and generally correspond to the superimposition of several components simultaneously present in solution at a given pH. This is particularly obvious at low pH (near pH 4), at physiological pH where two species coexist (the well-described components I and II, indicated by green and orange colors in Figure 1, respectively) and at pH near 10. In this latter case, two among the three coexisting components can be well identified: the first one is predominant at pH 8.7 (component II) and the other one is predominant above pH 10.6 (that will be noted component IV, in red in Figure 1). The third component (noted III, in black in Figure 1) is present only as a minor component and is thus difficult to identify. The EPR parameters determined for these four components (I–IV) are given in Table 1. Regarding the other [Cu^{II}(peptide)] complexes (peptide = Ac-Aβ, D1N-Aβ, E3Q-Aβ, D7N-Aβ, H6A-Aβ, H6R-Aβ, E11Q-Aβ, H13A-Aβ, and H14A-Aβ) studied here (see Figures S1–S3 in the Supporting Information), none of them with the exception of the [Cu^{II}(Ac-Aβ)] has significantly different EPR parameters compared to those of [Cu^{II}(Aβ16)] species (Table 1 and see below for details). Hence, components relative to [Cu^{II}(Ac-Aβ)] will be noted I'–IV'. Nevertheless, pK_a values corresponding to transition between the various components depend on the nature of the peptide involved in Cu(II) binding (Table 1). Note that the pK_a values are defined as the pH values where the EPR signatures of two components contribute equally to the EPR intensity and thus have been estimated by considering that only two components are simultaneously present in solution.

a. Components I and II. Regarding component I, there is now a consensus that the Cu(II) ion lies in an equatorial binding site made of the terminal amine –NH₂ group, the imidazole ring of His6, the one of His13 or His14 (in equilibrium) and a carbonyl function,^{15–19} the apical position being likely occupied by a carboxylate group.^{15,16,18} Species II, in which the Cu(II) coordination remains to be elucidated is characterized by EPR parameters that differ from those of component I by a concomitant decrease

in the g_{||} and A_{||} and are classical for 3N1O or 4N binding site³¹ (Table 1). The pK_a of the I/II transition is approximately 7.8, in line with previous studies.^{32,33} In Figure 1, panel B, the EPR pH dependent signatures of Cu(II) bound to the D1N-Aβ mutant is reminded. While the EPR parameters of components I from [Cu^{II}(Aβ16)] and [Cu^{II}(D1N-Aβ)] complexes are very similar, the pK_a(I/II) value is approximately 6.0 in case of the [Cu^{II}(D1N-Aβ)] complexes, thus significantly lower than that of the [Cu^{II}(Aβ16)] complexes. The D1N mutant was previously studied by the group of Szalai³³ and the decrease in the pK_a(I/II) was attributed to the breakage of a H-bond network (due to the replacement of the Asp1 anionic carboxylate by a neutral group), which would facilitate the deprotonation of a peptide function during the process leading to component II. However, in this pioneer work the peptide function undergoing the deprotonation was not identified.

Regarding the other Cu(II) complexes studied here, none of them with the exception of the [Cu^{II}(Ac-Aβ)] has significantly different EPR parameters compared to [Cu^{II}(Aβ16)]. This strongly suggests that none of the mutated residues is essential for creating the Cu(II) equatorial binding sites and that it can be replaced by an identical residue but located at another position in the peptide sequence. Differences between pK_a(I/II) values are observed and the most important ones are detected for the [Cu^{II}(H6A-Aβ)] and [Cu^{II}(H6R-Aβ)] complexes, pK_a(I/II) values being approximately 0.5 pH unit below that of [Cu^{II}(Aβ16)]. This suggests that even if His6 has been proposed to be always equatorially bound to the Cu(II) center in species I,^{15,17} it can be replaced by either the His13 or His14 thus leading to the equatorial coordination of the His13-His14 diad. In such a coordination environment, geometric constraints accounting for formation of component II at a lower pH than in the native [Cu^{II}(Aβ16)] species may be anticipated. On the contrary, the H13A or H14A mutations have only a slight impact on the pK_a(I/II) values (Table 1), in line with the equilibrium between

these two His residues for one equatorial binding position previously proposed.^{15,17}

b. Component III. Component III is hardly distinguishable in the pH dependent EPR traces of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$, being only discernible by the fourth hyperfine feature (black line at $B = 343$ mT in Figure 1, panel A). Indeed, the three other hyperfine lines are mixed with those of components II and IV and cannot be well isolated. The reason for such a mixture between components II, III, and IV is likely close $\text{p}K_{\text{a}}(\text{II,III})$ and $\text{p}K_{\text{a}}(\text{III,IV})$ values. To better characterize component III, the E3Q mutant is helpful. Indeed, in the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{E3Q-A}\beta)]$ mutant, component III is more easily detected, $\text{p}K_{\text{a}}(\text{II/III})$ and $\text{p}K_{\text{a}}(\text{III/IV})$ values being sufficiently different (estimated to 8.5 and 9.7, respectively). Similar to what was proposed for the D1N-A β mutant, we can hypothesize that the Glu3 carboxylate function stabilizes a deprotonable function in its protonated form by H-bond interactions, and that in the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{E3Q-A}\beta)]$ complex, the H-bond network is broken leading to deprotonation of the function at a lower $\text{p}K_{\text{a}}(\text{II/III})$ value. It is worth noting that mutation of the two other carboxylate functions (leading to D7N and E11Q mutants) do not affect neither the EPR signatures of the corresponding Cu(II) complexes nor their pH dependence compared to $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$. Parameters of component III are close to those observed when the Cu(II) is bound to the ATCUN motif (encountered in peptide with N-terminal XXH- sequence). In such species, the Cu(II) is bound via the $-\text{NH}_2$ terminal, the His and the two amidyl functions in between these two residues. For instance, such equatorial Cu(II) coordination is encountered in the N-terminal binding site of the serum albumin having the DAHK sequence.²⁸ Nevertheless, some minor differences are observed that can be attributed to the formation of three adjacent metallacycles in the ATCUN case, a structural feature that cannot be observed in the present case due to the position of the His compared to the $-\text{NH}_2$ group, the closest His residue being far from the terminal amine by 5 amino-acids. Such ATCUN type coordination in component III will be further confirmed by NMR studies (see below).

It is also worth noticing that component III cannot be detected in the EPR pH-dependent spectra of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6A-A}\beta)]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R-A}\beta)]$ complexes. This suggests that His6 is more involved than His13 or His14 in Cu(II) binding in component III.

c. Component IV. The g_{\parallel} and A_{\parallel} parameters of component IV of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ complexes, with the exception of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$ are characteristic of a 4N equatorial binding mode,³¹ where the Cu(II) ion is bound via the terminal $-\text{NH}_2$ and three amidyl functions. Indeed, very similar EPR parameters have been reported for the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GGGG})]$ complex, where the $-\text{NH}_2$ is the sole Cu(II) anchoring function and thus where the Cu(II) equatorial site is completed by amidyl groups from adjacent peptide bonds.²⁹ Such Cu(II) coordination is often encountered in peptidic fragments where other potential ligands are replaced by amidyl functions adjacent to the $-\text{NH}_2$ anchoring point when the pH is increased. At high pH, the other possibility is to have a nitrogen atom from the imidazole ring of an His residues as the anchoring point and adjacent amidyl functions that entered is the Cu(II) coordination sphere.²² This is encountered when the terminal $-\text{NH}_2$ is not available for Cu(II) binding, for instance when it is acetylated.³⁰ In this case, the EPR parameters are different from those observed here in the component IV but similar to those observed in component IV' corresponding to complex $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$ at high pH (Figure 1, panel B and Table 1). This agrees with the involvement of the N-terminal

amine in equatorial Cu(II) coordination in $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$ at high pH. Note that involvement of the terminal $-\text{NH}_2$ function has already been identified by EPR and ENDOR experiments performed on labeled $[\text{Cu}^{\text{II}}(^{15}\text{N}-(\text{Asp1})-\text{A}\beta\text{16})]$ species.¹⁵ A second consequence is that, Cu(II) center in component IV is likely bound by the terminal $-\text{NH}_2$ and the three adjacent amidyl functions while in component IV' by one of the three His and three adjacent amidyl functions, the His residue(s) involved remaining to be identified.

d. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$ Species. Acetylation of the terminal amine lead to a series of new type of components that can be obtained from component IV' by successive protonation of the amidyl functions, leading to a $\{-\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-, \text{X}\}$ equatorial binding site in III' and $\{-\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{X}, \text{Y}\}$ in II' and $\{-\text{N}_{\text{im}}, \text{X}, \text{Y}, \text{Z}\}$ in I', where X, Y, and Z can be either His or CO ligands. Further identification of the exact nature of components I'–IV' is beyond the scope of the present paper and is not physiologically relevant for the understanding of Cu(II) coordination to A β . Nevertheless, an important point to note is that EPR parameters of components II' and III' are very close to those of components I and II, respectively and that $\text{p}K_{\text{a}}(\text{II}'/\text{III}')$ is also very close to $\text{p}K_{\text{a}}(\text{I/II})$ (Table 1). As a consequence, the pH dependent EPR spectra of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$ complexes will be by chance very similar near physiological pH. This may have led to misinterpretation of comparative EPR data of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$ when recorded only near physiological pH and to the erroneous conclusion that $-\text{NH}_2$ is involved in Cu(II) apical position in component I.³⁴

2. CD pH-Dependent Study of Cu(II) Binding to A β 16 Peptides and Mutants. EPR is a powerful technique to determine the Cu(II) binding site but reveals information concerning only the equatorial plane. As a consequence, CD can be used to monitor structural modifications that occur outside from the first coordination shell and in apical position. pH-dependent CD spectra of four chosen examples of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ complexes that are representative of the four types of CD signatures obtained in the present study, are shown in Figure 2 ($[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6A-A}\beta)]$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{E3Q-A}\beta)]$).

a. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$ Type Family. pH dependent CD signatures of this family is shown in Figure 2, panel A. Weak d–d transitions are observed at $\lambda = 670$ and 590 nm, which increase in intensity upon increasing pH, reaching a maximum at a pH ~ 7.5 . A new d–d band at $\lambda = 510$ nm is observed when the pH is raised above 7.5. In the UV domain, the intensity of the $\lambda = 315$ and 285 nm bands increase from pH approximately 7 and 3, respectively. The former band has been attributed to amide to Cu(II) charge transfer transition (LMCT) while the latter to amine to Cu(II) LMCT. The band detected at $\lambda = 265$ nm, which has tentatively been attributed to imidazole to Cu(II) LMCT,²¹ increases in intensity from pH approximately 8.5. pH dependent behavior of these features indicates that (i) $-\text{NH}_2$ is bound to Cu(II) from pH 3 and remains bound to Cu(II) at any higher pH, (ii) amidyl groups start to bind Cu(II) at pH approximately 7, and (iii) binding of amidyl functions to Cu(II) enhances the molar extinction coefficient of the His to Cu(II) LMCT and of the d–d transitions detected at 265 and 590 nm, respectively. The $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H13A-A}\beta)]$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H14A-A}\beta)]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{E11Q-A}\beta)]$ complexes belong to this family (Supporting Information Figures S5 and S6) and thus behave very similarly to the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta\text{16})]$, suggesting that (i) both His13 and His14 are not simultaneously involved in Cu(II) binding in the whole pH range and that

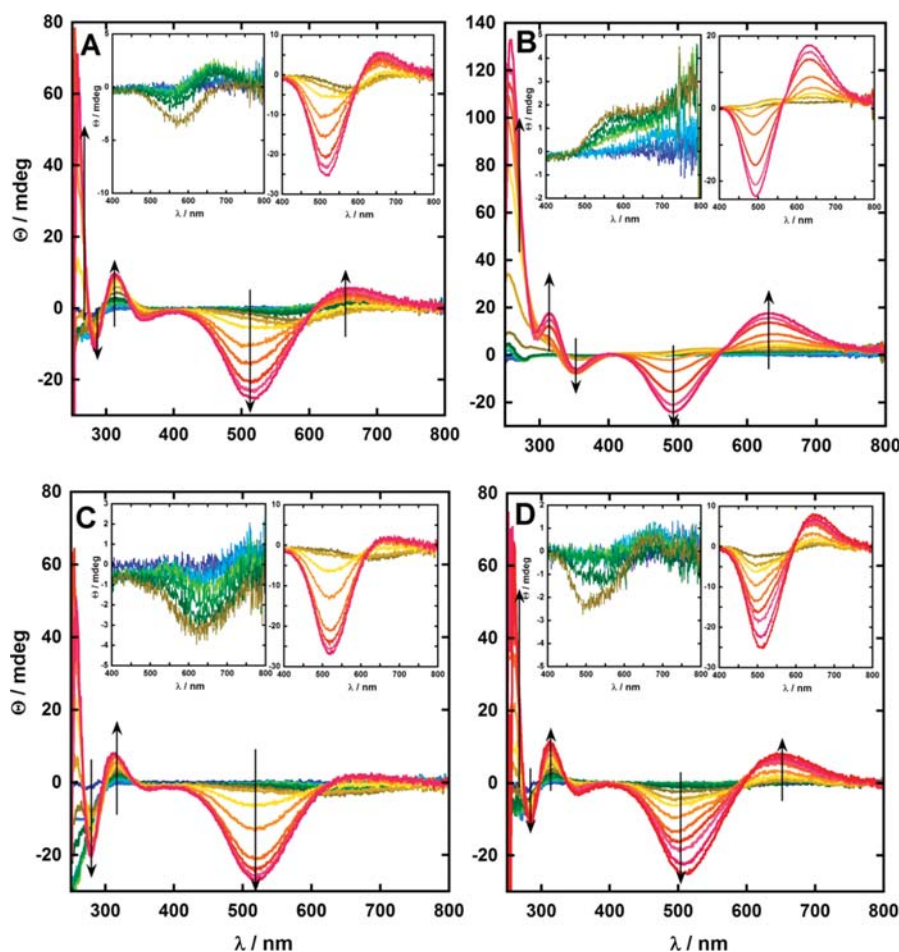


Figure 2. Effect of pH on the CD spectra of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ complexes, from pH approximately 3 (blue line) to pH approximately 12 (red line). Panel A: $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$. Panel B: $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$. Panel C: $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6A-A}\beta)]$. Panel D: $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{E3Q-A}\beta 16)]$. Left insets: pH from approximately 3 to approximately 7.5. Right insets: pH from approximately 7.5 to approximately 12. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})] = 0.5 \text{ mM}$, $l = 1 \text{ cm}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Arrows indicate the formation of relevant bands with pH increase. For exact pH values see Supporting Information, Figures S4–S6.

(ii) carboxylate group from Glu11 is not an essential element of Cu(II) binding sites.

b. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$. pH-dependent CD signature of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ac-A}\beta)]$ is unique compared to all the other $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ complexes studied here (Figure 2, panel B). The continuous increase of bands at $\lambda = 630, 490, 360, 315,$ and 265 nm is observed when the pH is increased. Two main differences with the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$ data are the absence of the $\lambda = 285 \text{ nm}$ band characteristic of $-\text{NH}_2$ to Cu(II) LMCT, in line with acetylation of N-terminal amine and a significantly higher intensity of the $\lambda = 265 \text{ nm}$ band, especially at high pH, compared to all the others $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ complexes, in agreement with the formation of binding sites centered on His anchoring residue, as previously proposed on the basis of the EPR data analysis.

c. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6A-A}\beta)]/[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R-A}\beta)]$ Type Family. These mutations lead to three main differences in the pH-dependent CD signatures of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{peptide})]$ complexes (Figure 2, panel C and Supporting Information Figure S5), which are (i) a negative d–d band at $\lambda = 630 \text{ nm}$ from pH 3 to approximately 7.5; (ii) a more pronounced $\lambda = 285 \text{ nm}$ band, and (iii) a $\lambda = 265 \text{ nm}$ band, the growth of which begins in the negative part of the CD spectra from pH 3 to approximately 7.5 and the intensity of which remains weaker than in the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$ type family complexes

at higher pH. These modifications may be attributed to the simultaneous involvement of His13 and His14 in Cu(II) binding, a feature that is not detected in the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$ type family (see above), thus leading to an important reshuffling of the peptide conformation. Sign change in the $\lambda = 265 \text{ nm}$ band at $\text{pH} \sim 7.5$ may also be interpreted as transition between the His13–His14 diad involved in Cu(II) coordination to only one His bound to Cu(II). These CD data are consistent with the EPR data, since it confirms that both His13 and His14 can be simultaneously bound to Cu(II). However, if the EPR traces of both $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6A-A}\beta)]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R-A}\beta)]$ complexes are very close to that of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$, their CD signatures differ significantly, in line with modifications occurring outer from the first coordination shell.

d. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{E3Q-A}\beta)]$ Type Family. The pH dependent CD spectra of Cu(II) complexes obtained with the triple E3QD7NE11Q mutants and the D1N, E3Q, and D7N mutants (Figure 2, panel D and Supporting Information Figures S4 and S6) are slightly different from that of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$ type family by having weaker d–d band intensities up to pH 7.5 (especially in the E3Q and E3QD7NE11Q cases) and then a stronger intensity at $\lambda = 650 \text{ nm}$ at higher pH, except for the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{D1N})]$ complex that exhibits a weaker intensity. This may reflect involvement of the Glu3 and Asp7 residues in apical Cu(II) binding or an outer first

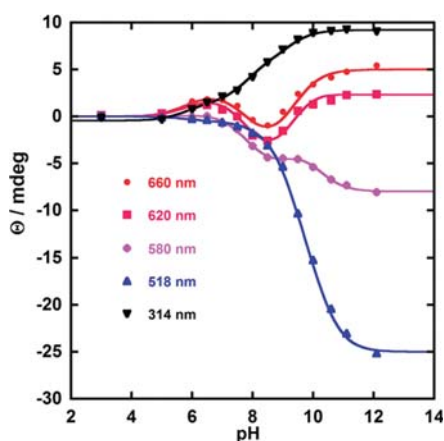


Figure 3. pH-dependent CD absorbance of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$ complex at $\lambda = 660$ (red plain circles), 620 (pink plain squares), 580 nm (purple plain diamonds), 518 nm (blue plain triangles), and 314 nm (black plain triangles). Solid lines are the fits of the curves with $\text{pK}_a = 5.8, 7.9, 9.3,$ and 10.3 . $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)] = 0.5 \text{ mM}$, $l = 1 \text{ cm}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

sphere contribution of the Glu3 and Asp7 residues, for instance by creating salt bridge with the Arg5 residue. Furthermore, the CD data obtained here are in line with contribution of the Asp1 residue in Cu(II) apical position even if the different pH-dependent CD signature of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{D1N-A}\beta)]$ complex is mainly due to the low $\text{pK}_a(\text{I/II})$ value.

e. pK_a Determination. Using EPR data it was possible to evaluate the pK_a between various components. As exemplified in Figure 3 in the case of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$ complex, this could also be achieved by simulation of the CD data. Simulations of the pH-dependent absorbance curves at several selected wavelengths with a unique set of pK_a values were performed and $\text{pK}_a(\text{I/II}) = 7.9$, $\text{pK}_a(\text{II/III}) = 9.3$, and $\text{pK}_a(\text{III/IV}) = 10.3$ values were found. These results were fully consistent with EPR data suggesting that no significant pH drift occurs upon freezing the EPR samples. In the course of simulation, it appears that more than 3 pK_a values were necessary to correctly fit the curves. More precisely, below pH 6, the intensities of the $\lambda = 620$ and 660 nm undergo significant increase. The pK_a value corresponding to transition between component I and this newly detected component (noted 0) is estimated to be 5.8. Regarding the EPR data, it appears that the EPR signature of component 0 is indiscernible to that of component I. Hence, a possible explanation is that this pK_a corresponds to the deprotonation of the third Cu(II) unbound His leading to modification of peptide arrangement but not to direct change in the equatorial Cu(II) coordination.

3. NMR Studies of Cu(II) Binding to Aβ in Component III and to H6R-Aβ Mutant in Components I and II. In an attempt to better characterize the new components III and IV, we used NMR spectroscopy that was previously revealed to be a powerful technique to better disentangle Cu(II) binding to Aβ peptides^{16,32} and to others peptides or proteins.^{35,36} Indeed the paramagnetism of the Cu(II) ion induces broadening of NMR features that depends on the proximity of the Cu(II) ion. Hence, it is possible to map which residues are affected by the presence of Cu(II) and thus involved in its coordination.¹³ ^{13}C NMR spectra of the apo-Aβ and holo-Aβ (0.3 equiv of Cu(II)) recorded at pH 9.8 (where component III is predominant) are compared to those of the apo-Aβ and holo-Aβ (0.1 equiv of Cu(II)) at pH 8.7 (Figure 4). Cu(II)-induced broadening of the ^{13}C peaks are weaker at pH 9.8

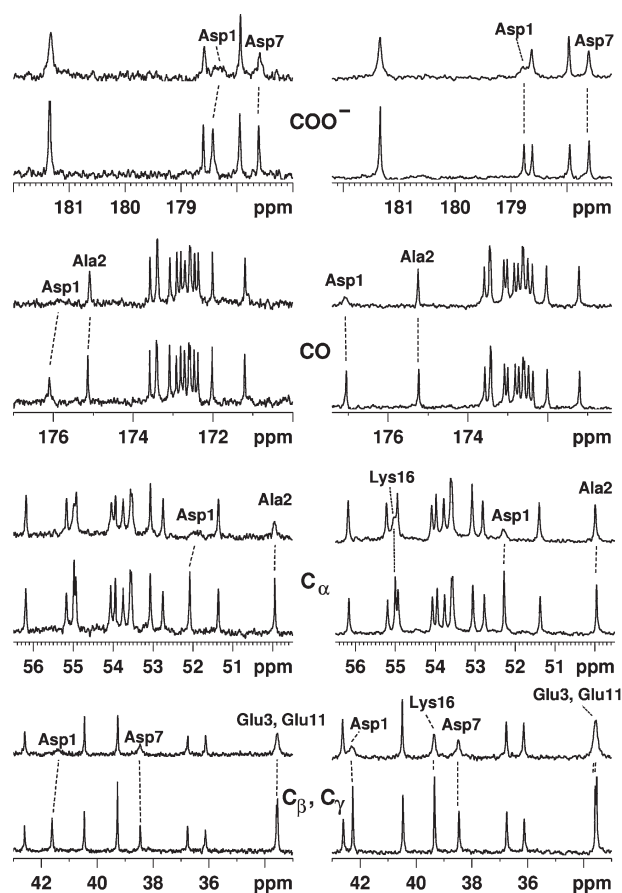


Figure 4. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of 10 mM Aβ peptide in D_2O (bottom spectra) and in presence of 0.1 equiv of Cu(II) (top spectra) at pH 8.7 (left) and of 0.3 equiv of Cu(II) (top spectra) at pH 9.8 (right). $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\nu = 125.8 \text{ MHz}$. Shift of some peaks is due to slight modification in the pH value induced by Cu(II) addition.

although the Cu(II) stoichiometry is 3-fold higher. Moreover, no new ^{13}C signals, with the exception of the C_α and C_β of Lys16, are affected by the Cu(II) addition at pH 9.8 compared to pH 8.7. This behavior is attributed to the formation of a “ATCUN” type Cu(II) binding motif $\{-\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$ in component III. Indeed, it was previously evidenced that in such a coordination site, Cu(II) exchange between peptides is too slow to affect all the peptides present in solution. On the contrary, Cu(II) stays bound to a portion of peptide and then lead to the total disappearance of its NMR signals.²⁸ Thus in the present case, Cu(II) effect on Aβ NMR peaks corresponding to component III is not observable. The broadening effect observed is due to the presence of a small portion of component II (in pH-dependent equilibrium with component III). As a direct consequence, NMR revealed inappropriate for the study of components III and IV.

The H6R mutation is a familial mutation that was associated with early onset of AD. Moreover, significant modifications of the pH-dependent CD signature of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R-A}\beta)]$ complexes were observed compared to that of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{A}\beta 16)]$. These are the reason why components I and II of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R-A}\beta)]$ complexes were also studied by ^{13}C NMR. In general, Cu(II) effect on the ^{13}C NMR spectra of the H6R mutant and on the Aβ16 peptide¹⁶ are similar (Supporting Information Figure S7). More precisely, binding of both His13 and His14 in component I (see

CD part) may induce the binding of the CO function in between the two His residues, as proposed by calculations.³⁷ However, such a binding do not change the impact of Cu(II) to the ¹³C NMR spectra of H6R-*Aβ* compared to *Aβ*16. Indeed, coordination of CO function from His residues was previously detected in the *Aβ*16 case and attributed to equilibrium in solution between $\{-\text{NH}_2, \text{CO}(\text{Asp1}), 2\text{N}_{\text{im}}\}$ and $\{-\text{NH}_2, \text{CO}(\text{His}), 2\text{N}_{\text{im}}\}$.¹⁶ The main differences observed on the CO and C_α regions at pH 8.6, where component II is predominant, are shown in Figure 5. Both the CO functions and C_α atoms from His13 and His 14 residues are more broadened in the case of the H6R mutant. However, broadening of the CO and C_α ¹³C atoms from the Ala2 residue, previously attributed to coordination of the amidyl function from the Asp1–Ala2 peptide bond, is still observed. Thus, this suggests that the deprotonation of the Asp1–Ala2 peptide bond also occurs in the H6R mutant but in this latter case, it does not induce the binding of the adjacent CO function (from Ala2 to Glu3). Indeed, CO functions from His residues may principally be involved in Cu(II) binding.

DISCUSSION

1. Coordination Sites of Cu(II) in Components I–IV. The proposed equatorial Cu(II) binding sites in components I–IV are shown in Scheme 1. Component I has been proposed by several groups.^{15–19} In this species, the Cu(II) center is bound via the

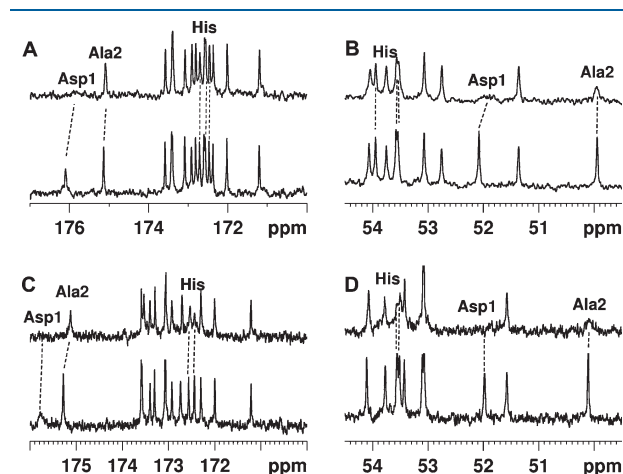


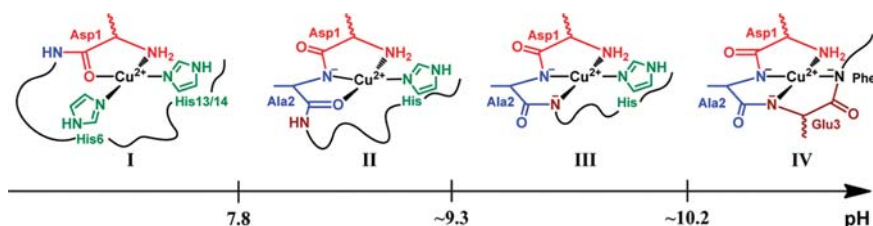
Figure 5. ¹³C{¹H} NMR spectral regions of 10 mM *Aβ*16 peptide in D₂O (bottom spectra) and in presence of 0.1 equiv of Cu(II) (top spectra) at pH 8.7 (panels A and B) and of 5 mM H6R-*Aβ* peptide in D₂O (bottom spectra) and in presence of 0.05 equiv. of Cu(II) (top spectra) at pH 8.6 (panels C and D) *T* = 25 °C, *ν* = 125.8 MHz. Shift of some peaks is due to slight modification in the pH value induced by Cu(II) addition.

terminal amine, two His residues and a CO function mainly originating from the Asp1–Ala2 peptide bond.

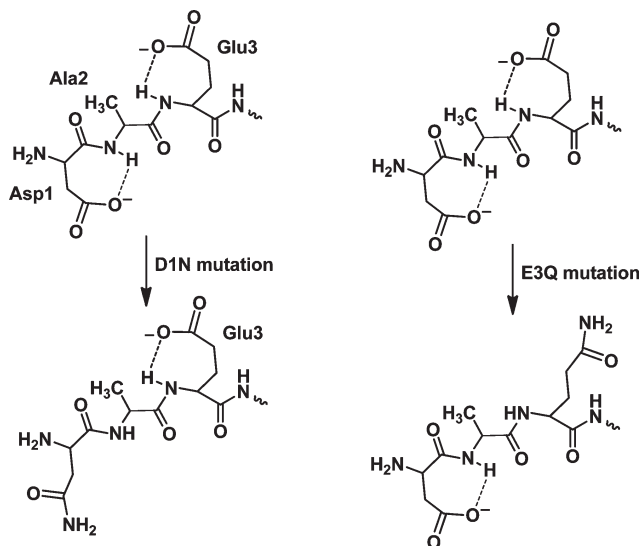
While consensus has been recently reached on Cu(II) coordination sphere in component I, this is not the case for component II. Indeed two models have principally appeared in the last years. In the first one, Cu(II) is bound via the carbonyl function from Ala2–Glu3 and the imidazole rings of the three His (model noted 1)^{17,18} and in the second one, Cu(II) is bound via the terminal amine, the adjacent amide function from Asp1–Ala2, one out of the three His and the CO function from Ala2–Glu3 (model noted 2).^{15,16} In the present study, new key insights have been obtained regarding the Cu(II) binding sphere in component II. First, an interesting feature is that Cu(II) complexes of the three H6A, H13A, and H14A mutants have EPR parameters identical to those of [Cu^{II}(*Aβ*16)], indicating that the simultaneous equatorial coordination of the three His to the Cu(II) center is unlikely. Otherwise, this would imply that in complexes obtained with the His mutants, the His residues is replaced by a ligand that would influence the Cu(II) electronic properties in a very similar way, a possibility that we cannot however fully ruled out. Second, component III is identified as $\{-\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$ (see below) and thus it is difficult to rationalize why the terminal -NH₂ amine bound to Cu(II) in components I and III, will be unbound in the intermediate component II. Third, transition from components I–II (and to III and IV) is pH driven and thus should be concomitant to deprotonation of peptide function. In case of model 1, all the residues that can undergo deprotonation (i.e., the three His residues) are already deprotonated at pH below the p*K*_a(I/II) value and hence this model fails to explain the effect of pH in transition from I to II. Fourthly, contrarily to model 2, model 1 does not explain the variation in the p*K*_a(I/II) and p*K*_a(II/III) observed in [Cu^{II}(D1N-*Aβ*)] and [Cu^{II}(E3Q-*Aβ*)] complexes, respectively (see below). Fifthly, intervention of CO from Ala2–Glu3 preferentially to that of another peptide bond remains unexplained in model 1 whereas the deprotonation of the adjacent Asp1–Ala2 amide bond in model 2 justifies the intervention of the Ala2–Glu3 CO function in Cu(II) binding. Lastly, the EPR parameters of the very simple [Cu^{II}(GGGGH)] complex (see Table 1), containing only one His residues in its sequence, are virtually identical to those found here for components II–IV, indicating that only one His can be bound to Cu(II) in components II and III.²⁹

Regarding component III, EPR parameters, as well as NMR data support an “ATCUN” type Cu(II) site $\{-\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$. A $\{-\text{NH}_2, 3\text{N}^-\}$ Cu(II) equatorial site is proposed for component IV based on the EPR parameters and the difference with EPR signature of [Cu^{II}(Ac-*Aβ*)]. These propositions are in line with those previously reported by Kowalik et al. in their pioneer work,²¹ except for component IV that was identified as $\{-\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-\}$. Moreover, in the present study attribution of each equatorial binding atoms has been proposed, that is, I = $\{-\text{NH}_2, \text{CO}$

Scheme 1. Proposed Equatorial Cu(II) Binding Sites of [Cu^{II}(*Aβ*)] as a Function of pH



Scheme 2. D1N Mutation Decreases the $pK_a(\text{I/II})$ Value by Precluding the $\text{COO}^- \cdots \text{H}-\text{N}$ (Asp1–Ala2) Interaction (7-Membered Metallacycle) while the E3Q Mutation Decreases the $pK_a(\text{II/III})$ Value by Precluding the $\text{COO}^- \cdots \text{H}-\text{N}$ (Ala2–Glu3) Interaction (7-Membered Metallacycle)



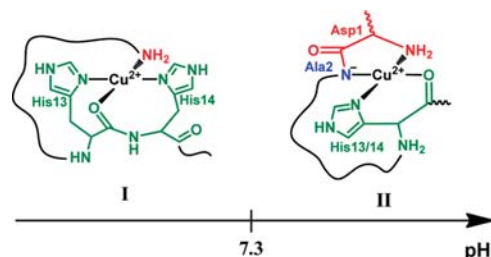
(Asp1–Ala2), N_{im} (His6), N_{im} (His13 or His14)}, **II** = $\{-\text{NH}_2, \text{N}^- (\text{Asp1}-\text{Ala2}), \text{CO} (\text{Ala2}-\text{Glu3}), N_{\text{im}}\}$, **III** = $\{-\text{NH}_2, \text{N}^- (\text{Asp1}-\text{Ala2}), \text{N}^- (\text{Ala2}-\text{Glu3}), N_{\text{im}}\}$, and **IV** = $\{-\text{NH}_2, \text{N}^- (\text{Asp1}-\text{Ala2}), \text{N}^- (\text{Ala2}-\text{Glu3}), \text{N}^- (\text{Glu3}-\text{Phe4})\}$

Regarding involvement of carboxylate groups in Cu(II) apical position, the CD data obtained are in line with previous propositions that suggest a preferential role of the Asp1 residue.^{15,16,18} Implication of the Glu3, Asp7, and Glu11 carboxylate groups in equilibrium with the one of Asp1 was also suggested for component **I**.¹⁶ The CD data obtained here agree with this possibility except for the Glu11 residue, for the involvement of which no evidence was found.

D1N and E3Q mutations induced change in pK_a values between **I/II** and **II/III**, respectively (Table 1). More precisely, D1N mutation decrease the $pK_a(\text{I/II})$ value by more than one pH unit and the E3Q mutation decrease the $pK_a(\text{II/III})$ by more than 0.5 pH unit (Table 1). As previously pointed out,³³ this may be related to the breakage of H-bond network when carboxylate functions are modified to amide and subsequent easier deprotonation of peptide functions, here identified as the Asp1–Ala2 and Ala2–Glu3 peptide bonds, respectively. This is illustrated in Scheme 2, where the interventions of Asp1 and Glu3 are exemplified on the basis of model 2 for component **II**.

2. Coordination of Cu(II) to the H6R and D7N Familial Mutants. Among the various mutants studied here, Cu(II) coordination to the two H6R and D7N familial mutants linked to early onset of AD were investigated. While, regarding to Cu(II) coordination, the D7N mutation have no significant impact, the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R}-A\beta)]$ complexes show differences with $[\text{Cu}^{\text{II}}(A\beta16)]$. More precisely, the $pK_a(\text{I/II})$ is significantly lower (about 0.5 pH unit) in the former case than in the latter, implying that at physiological pH the two components **I** and **II** will be differently distributed. More importantly, Cu(II) is differently bound in both components **I** and **II** of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R}-A\beta)]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(A\beta)]$. Proposed Cu(II) equatorial binding sites of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R}-A\beta)]$ complexes are shown in Scheme 3. The most striking difference

Scheme 3. Proposed Equatorial Cu(II) Binding Sites of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R}-A\beta)]$ as a Function of pH



with $[\text{Cu}^{\text{II}}(A\beta16)]$ is due to the concomitant involvement of His13 and His14 in Cu(II) binding in **I**, leading to outer first coordination shell effects observed by CD. Such equatorial binding of the His13–His14 diad (as minor form) in $[\text{Cu}^{\text{II}}(A\beta16)]$ species compared to coordination of the His6 plus His13 or His14 (as major form) has been recently proposed to be linked to formation of amorphous aggregates.²⁰ In the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R}-A\beta)]$ species, only the His13–His14 diad does intervene in Cu(II) equatorial binding in component **I**, and thus, the H6R mutation may be anticipated to be responsible of formation of only amorphous aggregates. In component **II**, intervention of CO from His13–His14 and His14–Gln15 peptide bonds in Cu(II) equatorial binding may also explained why component **III** is not detected in $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R}-A\beta)]$ complexes. Indeed, decoordination of the CO and the adjacent imidazole ring from His13 or His14 (forming a 6-membered metallacycle) residues may be concomitant, thus leading directly to a component **IV** (identical to the one obtained in case of the $[\text{Cu}^{\text{II}}(A\beta)]$ species) from component **II**. Lastly, the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6R}-A\beta)]$ and $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H6A}-A\beta)]$ complexes have the same spectroscopical signatures implying that nature of the replacing residue in the H6 mutant is not a key factor.

CONCLUDING REMARKS

In the present paper, we reported the pH-dependent study of Cu(II) coordination to the $A\beta$ peptide and to a series of mutants. While results obtained here are in perfect agreement with the Cu(II) equatorial binding site previously proposed in the literature for component **I** $\{-\text{NH}_2, \text{CO} (\text{Asp1}-\text{Ala2}), 2 N_{\text{im}}\}$, they also strongly supports a $\{-\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{CO} (\text{Ala2}-\text{Glu3}), N_{\text{im}}\}$ site in component **II**. Cu(II) complexes outside the physiological pH range have also been studied for expanding the number of spectroscopic references of Cu(II) peptidic species. Among the various mutants studied, the two familial H6R and D7N mutants were investigated and while the D7N mutation does not impact significantly Cu(II) coordination to $A\beta$, the H6R one leads to modification in Cu(II) binding that may also influence the peptide aggregating properties. During the course of these studies, the EPR and CD revealed to be complementary spectroscopies. Indeed, while EPR is a powerful technique to determine the Cu(II) equatorial environment, CD was very useful in disentangling effects outside the first coordination shell and for instance lead to the detection of a new species near pH 5.5.

EXPERIMENTAL SECTION

1. Sample Preparation. Studies were performed in H_2O or in D_2O . However, for clarity and consistency, we decided to use the notation pH even when the measurements were made in D_2O . pD was

measured using a classical glass electrode according to $pD = pH_{\text{reading}} + 0.4$, and the pD value was adjusted according to ref 38 to be in ionization conditions equivalent to those in H₂O.

A β 16 peptide (sequence DAEFRHDSGYEVHHQK and referred to as A β in the following), Ac-A β peptide corresponding to the N-terminally acetylated A β peptide, the D1N-A β (sequence NAEFRHDSGYEVHHQK), E3Q-A β (sequence DAQFRHDSGYEVHHQK), H6R-A β (sequence DAEFRHDSGYEVHHQK), H6A-A β (sequence DAEFRHDSGYEVHHQK), D7N-A β (sequence DAEFRHNSGYEVHHQK), E11Q-A β (sequence DAEFRHDSGYEVHHQK), H13A-A β (sequence DAEFRHDSGYEVVAHQK), H14A-A β (sequence DAEFRHDSGYEVHAHQK), and the triple E3QD7NE11Q-A β C-terminally protected A β peptide (sequence DAQFRHNSGYEVHHQK-NH₂) were bought from GeneCust (Dudelange, Luxembourg) with purity grade >98%.

Stock solutions of peptide were prepared by dissolving the powder in Milli-Q water or in D₂O (resulting pH \sim 2). Peptide concentration was then determined by UV-visible absorption of Tyr10 considered as free tyrosine ($\epsilon_{276} - \epsilon_{296}$) = 1410 M⁻¹cm⁻¹) and the solution was diluted down to the appropriate concentration in peptide.

pH was adjusted using NaOH/HCl (H₂O) or NaOD/DCl (D₂O). All pH values are given with a \pm 0.2 pH unit error.

a. Circular Dichroism (CD) Samples. Stock solution of peptide was diluted down to 0.5 mM in pure Milli-Q water; 0.9 equiv of Cu^{II} was added from 0.1 M Cu(SO₄) stock solution.

b. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Samples. Stock solution of peptide was diluted down to 1.0 mM in D₂O; 0.9 equivalent of ⁶³Cu^{II} was added from 0.1 M ⁶³Cu(NO₃)₂ stock solution. Samples were frozen in quartz tube, with addition of 10% glycerol as a cryoprotectant.

c. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Samples. Stock solution of H6R-A β peptide was diluted to about 5 mM in D₂O. Substoichiometric quantity (\sim 0.05 equiv) of Cu^{II} from Cu(SO₄) in D₂O was added. Cu^{II} to H6R-A β ratio was reduced to a minimum in the free peptide solution by working at 10 mM peptide concentration without buffer that is the primary source of paramagnetic contamination. Indeed a too high Cu^{II} to A β ratio would induce an uncontrolled broadening of NMR signals, a problem that may contribute to the loss of signals in the apo-peptide solution in previous studies.^{39,40} Substoichiometric Cu^{II} ratio (0.05 equiv of Cu^{II} per A β peptide) was used. Indeed, this ratio is large enough to induce selective broadening of specific residues of all the peptides present in solution (because of fast exchange of Cu^{II} between peptides).

2. Spectroscopic Measurements. *a. Circular Dichroism (CD).* CD spectra were recorded on a JASCO circular dichroism spectrometer at 20 °C. Data were collected with a 1 nm sampling interval and 2 scans were averaged and a baseline spectrum was subtracted for each spectrum.

b. Electron Paramagnetic Resonance (EPR). EPR data were recorded using an Elexsys E 500 Bruker spectrometer, operating at a microwave frequency of approximately 9.5 GHz. All spectra were recorded using a microwave power of 20 mW across a sweep width of 150 mT (centered at 310 mT) with a modulation amplitude of 0.5 mT. Experiments were carried out at 110 K using a liquid nitrogen cryostat.

c. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). 1D ¹H and ¹³C experiments and 2D experiments were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm triple resonance inverse Z-gradient probe (TBI ¹H, ³¹P, BB) and a Bruker Avance 600 spectrometer equipped with a 5 mm triple resonance inverse (TCI ¹H, ¹³C, ¹⁵N) Z-gradient cryoprobe, respectively. All chemical shifts are relative to tetramethylsilane. 1D-NMR and 2D-NMR spectra were collected at 298 and 288 K in pure D₂O, respectively. Accumulation lasts c.a. Sixteen hours for the ¹³C{¹H} NMR experiments and 24 h for the 2D ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC, and ¹H-¹³C HMBIC experiments.

All the ¹H and ¹³C signals were assigned on the basis of chemical shifts, spin-spin coupling constants, splitting patterns and signal intensities, and by using ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC, and ¹H-¹³C HMBIC experiments.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. pH-dependent EPR and CD spectra of [Cu^{II}(peptide)] complexes, ¹³C NMR spectra of H6R-A β , and assignments of the ¹H and ¹³C signals of the H6R-A β peptide. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: christelle.hureau@lcc-toulouse.fr. Phone: (+33) 5 61 33 31 62. Fax: (+33) 5 61 55 30 03.

Author Contributions

[†]These authors contributed equally to this work.

■ ACKNOWLEDGMENT

Authors thank the ANR (Agence Nationale de la Recherche), ANR Grant Neurometals NT09-488591. We thank Dr. L. Frémond for earlier results obtained on Cu(II) binding to H13A-A β and H14A-A β , Drs. L. Sabater, G. La Penna and P. Dorlet for fruitful discussions. Charles-Louis Serpentine is acknowledged for its participation in recording the CD data.

■ REFERENCES

- Holtzman, D. M.; Morris, J. C.; Goate, A. M. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 77sr1.
- Castellani, R. J.; Smith, M. A. *J. Pathol.* **2011**, *224*, 147–152.
- Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *298*, 789–791.
- Maccioni, R. B.; Muñoz, J. P.; Barbeito, L. *Arch. Med. Res.* **2001**, *32*, 367–381.
- Simón, A. M.; Frechilla, D.; del Rio, J. *Rev. Neurol.* **2010**, *50*, 667–675.
- Cappai, R.; Barnham, K. J. *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 526–532.
- Adlard, P. A.; Bush, A. I. *J. Alzheimer Dis.* **2006**, *10*, 145–163.
- Bush, A. I. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 207–214.
- Cuajungco, M. P.; Faget, K. Y. *Brain Res. Rev.* **2003**, *41*, 44–56.
- Faller, P.; Hureau, C. *Dalton Trans.* **2009**, 1080–1094.
- Hureau, C.; Faller, P. *Biochimie* **2009**, *91*, 1212–1217.
- Kozłowski, H.; Janicka-Klos, A.; Brasun, J.; Gaggelli, E.; Valensin, D.; Valensin, G. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2665–2685.
- Molina-Holgado, F.; Hider, R. C.; Gaeta, A.; Williams, R.; Francis, P. *Biomaterials* **2007**, *20*, 639–654.
- Smith, D. G.; Cappai, R.; Barnham, K. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1976–1990.
- Dorlet, P.; Gambarelli, S.; Faller, P.; Hureau, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9273–9276.
- Hureau, C.; Coppel, Y.; Dorlet, P.; Solari, P. L.; Sayen, S.; Guillon, E.; Sabater, L.; Faller, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9522–9525.
- Drew, S. C.; Noble, C. J.; Masters, C. L.; Hanson, G. R.; Barnham, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1195–1207.
- Drew, S. C.; Masters, C. L.; Barnham, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8760–8761.
- Drew, S. C.; Barnham, K. J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, DOI: 10.1021/ar200014u.
- Shin, B.-k.; Saxena, S. J. *Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 9590–9602.
- Kowalik-Jankowska, T.; Ruta, M.; Wisniewska, K.; Lankiewicz, L. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*, 270–282.
- Kozłowski, H.; Bal, W.; Dyba, M.; Kowalik-Jankowska, T. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 319–346.
- Ono, K.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23186–23197.

- (24) Hori, Y.; Hashimoto, T.; Wakutani, Y.; Urakami, K.; Nakashima, K.; Condron, M. M.; Tsubuki, S.; Saido, T. C.; Teplow, D. B.; Iwatsubo, T. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4916–4923.
- (25) Karr, J. W.; Kaupp, L. J.; Szalai, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13534–13538.
- (26) Minicozzi, V.; Stellato, F.; Comai, M.; Dalla Serra, M.; Potrich, C.; Meyer-Klaucke, W.; Morante, S. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10784–10792.
- (27) Syme, C. D.; Nadal, R. C.; Rigby, S. E.; Viles, J. H. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18169–18177.
- (28) Hureau, C.; Eury, H.; Guillot, R.; Bijani, C.; Sayen, S.; Solari, P. L.; Guillon, E.; Faller, P.; Dorlet, P. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 10151–10160.
- (29) Várnagy, K.; Szabó, J.; Sóvágó, I.; Malandrinos, G.; Nick, H.; Sanna, D.; Micera, G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 467–472.
- (30) Hureau, C.; Charlet, L.; Dorlet, P.; Gonnet, F.; Spadini, L.; Anxolabéhère-Mallart, E.; Girerd, J.-J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 735–744.
- (31) Peisach, J.; Blumberg, W. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708.
- (32) Eury, H.; Bijani, C.; Faller, P.; Hureau, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 901–905.
- (33) Karr, J. W.; Szalai, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3796–3797.
- (34) Sarell, C. J.; Syme, C. D.; Rigby, S. E.; Viles, J. H. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4388–4402.
- (35) Rasia, R. M.; Bertocini, C. W.; Marsh, D.; Hoyer, W.; Cherny, D.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 4294–4299.
- (36) Gaggelli, E.; Bernardi, F.; Molteni, E.; Pogni, R.; Valensin, D.; Valensin, G.; Remelli, M.; Luczkowski, M.; Kozłowski, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 996–1006.
- (37) Raffa, D. F.; Gómez-Balderas, R.; Brunelle, F.; Rickard, G. A.; Rauk, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 887–903.
- (38) Delgado, R.; Da Silva, J. J. R. F.; Amorim, M. T. S.; Cabral, M. F.; Chaves, S.; Costa, J. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *245*, 271–282.
- (39) Danielsson, J.; Pierattelli, R.; Banci, L.; Graslund, A. *FEBS J.* **2007**, *274*, 46–59.
- (40) Hou, L.; Zagorski, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9260–9261.

Article I-D

Pt(II) compounds interplay with Cu(II) and Zn(II) coordination to the amyloid- β peptide has metal specific consequences on deleterious processes associated to Alzheimer's disease†

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2130

Received 27th November 2012,
Accepted 23rd January 2013

DOI: 10.1039/c3cc38537j

www.rsc.org/chemcomm

Fabrice Collin,^{*a} Isabelle Sasaki,^b Hélène Eury,^b Peter Faller^b and Christelle Hureau^{*b}

Five Pt(II) complexes were tested for their ability to interfere in Cu(II) or Zn(II) coordination to the A β peptide. Two of them induce modifications of the Cu(II) sphere but not the associated Cu(A β) ROS production. In contrast, they do completely preclude Zn induced A β aggregation.

Cu and Zn ions have been proposed to be linked to Alzheimer disease (AD) *via* their involvement in the amyloid cascade process. AD is characterized by brain deposits, the amyloid plaques, considered as the final step of the amyloid cascade involving aggregation of the amyloid- β (A β) peptide. Indeed, within these plaques, the A β peptide is aggregated, whereas it is present in monomeric soluble form in healthy brains. Co-localized with these plaques is found an abnormally high level of both Cu and Zn ions, bound to the A β peptide (reviewed in ref. 1 and 2). Both Cu and Zn ions have been reported to modify the A β aggregation process;^{3,4} and Cu, due to its redox ability, was anticipated to play a key role in the production of Reactive Oxygen Species (ROS), a deleterious event also associated to the aetiology of AD.^{5,6}

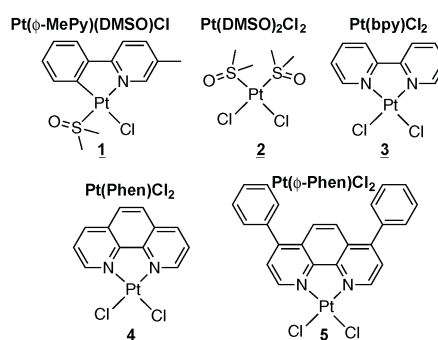
A subset of glutamatergic neurons sequester Zn in their presynaptic vesicles. Upon excitation, this synaptic Zn is released into the synaptic cleft and acts as a modulator of neuro-transmission.⁷ Amyloid plaques formation occurs preferentially around these Zn-rich neurons and it has been shown that this Zn-pool promotes A β aggregation *in vivo*.⁸ *In vitro*, it is also well established that Zn can induce A β aggregation.^{3,4,9}

Recently, platinoid complexes have been studied for their ability to interact with the A β peptide^{10–12} and reviewed in ref. 13. At the origin of such interest was the pioneering study by Barnham and coworkers, which has reported beneficial properties against A β -mediated toxicity of phenanthroline-based

Pt(II) complexes in mouse hippocampal slices.¹⁴ In this context, we have recently reported the synthesis of a new Pt(II) cyclo-metallated complex (**1**) that binds very efficiently to A β at physiological pH.¹⁵

Within this background, we investigated in the present study the impact of five Pt(II) compounds (**1–5**, see Scheme 1) in Zn-induced A β aggregation and Cu induced ROS production. The C-terminal A β 28 peptide (sequence DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK) was used instead of the full-length A β 40 peptide for two main reasons: (i) the first 16 amino-acid residues encompass metal ion binding sites,¹ thus representing a valuable model of metal coordination to the full-length peptide and the central hydrophobic core responsible for A β aggregation lies between the 17–21 residues; (ii) in contrast to A β 40, for which the aggregation in the presence of Zn is very rapid,¹⁶ Zn induced A β 28 aggregation shows the sigmoid curve characteristic of fibril formation and is thus more straightforward to study.

No significant modification of the Cu(A β 28) ROS production (followed by an ascorbate consumption assay (Fig. S1 and S2, ESI†)) was induced by the five tested Pt compounds. This result was not anticipated for complexes **1** and **2**, which induce an important reshuffling of the Cu(II) coordination sphere in A β 28 in line with modification of the Cu(A β 28) EPR signature (Fig. S3, ESI†). The latter effect was detailed for **1** in our previous



Scheme 1 Pt(II) compounds studied.

^a PHARMA-DEV, UMR 152 IRD-UPS, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31400 Toulouse, France. E-mail: fabrice.collin@univ-tlse3.fr

^b CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205, route de Narbonne et Université de Toulouse, UPS, INPT, LCC, F-31077 Toulouse, France.

E-mail: christelle.hureau@lcc-toulouse.fr; Tel: +33 5 61 33 31 62

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental section, EPR, NMR, TEM and MS data. See DOI: 10.1039/c3cc38537j

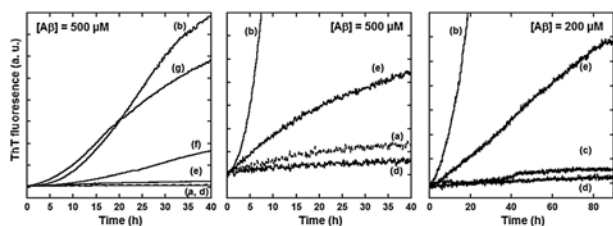


Fig. 1 ThT fluorescence as a function of time§ of (a) apo-A β 28, Zn_{0.5}(A β 28) (b) and Zn_{0.5}(A β 28) in the presence of **1**, (c), **2** (d), **3** (e), **4** (f) and **5** (g). Left and centre panels: [A β 28] = 500 μ M; [Zn] = 250 μ M; [Pt-complexes] = 550 μ M, 5% DMSO (v/v). Right panel: [A β 28] = 200 μ M; [Zn] = 100 μ M [Pt-complexes] = 220 μ M, 2% DMSO (v/v). Phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) [ThT] = 10 μ M. Complex **1** is not sufficiently soluble at 500 μ M in the presence of A β 28 to be studied by fluorescence. Hence the measurements were also performed at 200 μ M.

study,¹⁵ and is detected here for **1** and **2**, and for **3** but to a lesser extent. This has two consequences: (i) change in the Cu(II) coordination sphere is not directly linked to Cu(A β) ability to produce ROS; (ii) complexes **3–5** do not (seem to) interact sufficiently with A β 28 to interfere with Cu(II) coordination to A β 28.

Then, impact of complexes **1** to **5** was tested on the Zn-induced aggregation of A β 28 (Fig. 1 and Fig. S4, ESI[†]).[‡] Indeed, in the absence of Zn, A β 28 did not form fibrillar aggregates as evidenced by the classical Thioflavin-T (ThT) fluorescence experiment³ (Fig. 1(a)). In contrast, addition of 0.5 equivalents of Zn induces the typical sigmoid curve in ThT fluorescence observed for amyloid formation (Fig. 1(b)). The five Pt complexes diminished the fibril formation, but to a different extent. Most potent were **1** and **2** (Fig. 1(c and d)), as weak and no amyloid formation were observed, respectively. For **3–5**, the impact was less pronounced, with **3** being more efficient than **4** and **5** (Fig. 1(e–g)). These results were confirmed by transmission electron microscopy (TEM, Fig. S5, ESI[†]). Indeed, different degrees of fibril formation were observed, with Zn_{0.5}(A β 28) showing the larger amount of fibrils, while upon addition of **1** and **2** only a very few amyloid fibrils were observed.

Complexes **1–5** were further investigated by NMR for their propensity to bind to A β 28. NMR data (Fig. S6 and S7, ESI[†]) indicate that **1** and **2** react more than **3**, while no interaction is detected for **4** and **5**. This was confirmed by HPLC/MS. In contrast to previous study,¹¹ where the HPLC/MS experiments were performed in a DMSO–water mixture, the conditions used here are close to the physiological ones (ammonium phosphate buffer, pH 7.3). Most of Pt(A β 28) complexes were detected as doubly, triply, quadruply and quintuply charged ions (Table 1 and Table S1, ESI[†] and Fig. 2 and Fig. S8, ESI[†]), allowing calculation of their experimental masses for comparison with the theoretical ones. Mono-platinated adducts were detected as major products of A β complexation with **3** to **5**, in agreement with previous work.¹⁵ Doubly-platinated adducts were found to account for less than 10% of the mono-platinated ones. Relative complexation yields, respectively, lie between 34 and 54%, which is relatively low. Remaining free Pt complexes were detected as native and monohydrated complexes at m/z 403.5 (Pt(bpy)H₂OCl); m/z 445 and 427.5 (**4** and Pt(phen)H₂OCl), m/z 597 and 579.5 (**5** and Pt(ϕ -phen)H₂OCl).

Table 1 Experimental mass of detected Pt(A β 28) complexes, calculated from the multiply charged parent ions of A β 28 and Pt(A β 28) complexes, along with the corresponding mass shift and complexation yield

Detected complex	m_{exp}^a (amu)	Δm_{exp} (amu) (expected Δm^b)	Complexation yield ^c
A β 28 control	3265.5 \pm 2	—	—
Pt(ϕ -MePy)(A β 28)	3624.9 \pm 1	362.4 (362.5)	90%
PtCl ₂ (A β 28)	3538.9 \pm 21	276.4 (265–269)	93%
[Pt(Cl ₂) ₂](A β 28)	3804.3 \pm 6	541.8 (530–538)	—
Pt(bpy)(A β 28)	3611.1 \pm 1	348.6 (350.0)	54%
Pt(phen)(A β 28)	3634.8 \pm 2	372.3 (374.0)	35%
Pt(ϕ -phen)(A β 28)	3788.0 \pm 7	525.5 (526.0)	34%

^a Experimental mass calculated from multicharged ions (Fig. S8, ESI); uncertainties given at the 95% confidence level. ^b Expected mass shift calculated with ¹⁹⁵Pt, ³⁵Cl and ³⁷Cl. ^c Complexation is $[1 - A_{\text{A}\beta\text{cplx}}/A_{\text{A}\beta\text{control}}]$, where $A_{\text{A}\beta\text{cplx}}$ is the peak area of remaining non-complexed A β 28 and $A_{\text{A}\beta\text{control}}$ is the peak area of control A β 28; peak areas are determined from trace chromatograms of Fig. S9 (ESI).

The highest A β 28 complexation was obtained for complexes **1** and **2**, with respective yields of 90 and 93%. As recently suggested by Sasaki *et al.*,¹⁵ the departure of the labile chloride and DMSO ligands from **1** occurs prior to binding to the A β 28 peptide. Thus, only the Pt(ϕ -MePy)(A β 28) complex is detected, which means that two residues from A β 28 are involved in the coordination. Complex **2** reacts strongly with the A β 28, but the selectivity for specific residues seems to be poor. Indeed it can react twice with the peptide. Thus, its coordination sphere when bound to A β 28 was not investigated.

To better decipher how complex **1** binds to A β 28, its coordination with A β 28 was further investigated by HPLC coupled to tandem mass spectrometry (HPLC/MS-MS). Despite the relatively high molecular mass of A β 28, no enzymatic digestion was performed prior to MS fragmentation (top-down approach). The fragmentation of the triply-charged parent ion at m/z 1208.8 (Fig. 2) leads to a set of mono-, doubly- and triply-charged b and y ions (Fig. S10 and S11, Scheme S2, ESI[†]) that covered almost the whole sequence of A β 28. Comparison of Pt-free (b/y) and platinated (b⁺/y⁺) ions helps to identify His13 and Glu11 as being involved in the Pt coordination sphere.

Results obtained in the present study are at different levels:

(i) Molecular interaction of Pt compounds with A β 28: On a molecular scale, the data shown here indicate that, at physiological pH, efficient interactions between Pt compounds and A β 28 are observed when labile ligands can be replaced by side-chains of A β 28. This is the case for the DMSO ligands of **2**, which are easily expelled in the presence of A β 28 as shown by HPLC/MS analysis and NMR DOSY experiments (data not shown). In complexes **3–5**, the chloride ligands are less easily removed from the Pt coordination sphere. For **1**, both the labile DMSO and the chloride ligands are replaced by side-chains of Glu11 and His13. While the departure of the DMSO is in line with the observations made on complex **2**, the replacement of the chloride ion is more surprising if we consider the results obtained on complexes **3–5**, in which at least one chloride is conserved in solution. In addition, although the extent of aromaticity in complexes **1** and **3** is similar, their behavior is strikingly different. As previously hypothesized, this might be due to the peculiar nature of the C–Pt bond that induces a

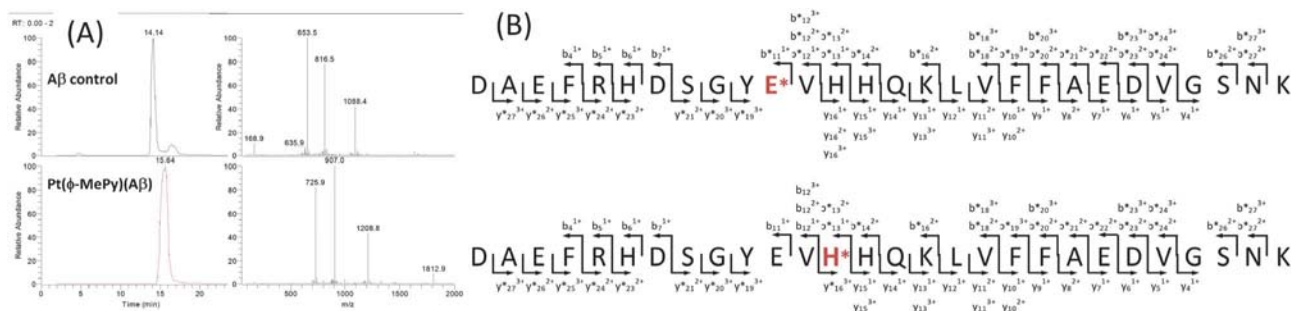
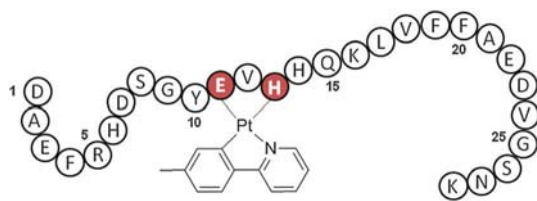


Fig. 2 (A) Trace chromatogram (left) and corresponding mass spectrum (right) of Aβ28 (top, $t_r = 14.14$ min) and the Aβ28/Pt(φ-MePy) complex (bottom, $t_r = 15.64$ min). (B) Fragmentation scheme of the Aβ28–Pt(φ-MePy) complex deduced from top-down tandem mass spectra (see ESI† Fig. S10 and S11) of the triply-charged parent ion at m/z 1208.8, including both mono-, di- and triply-charged ions of Pt-free ($b_n^{1,2,3+}/y_n^{1,2,3+}$) and platinated ($b_n^{1,2,3+}/y_n^{1,2,3+}$) fragments.



Scheme 2 Coordination mode of complex **1** to the Aβ28 peptide.

strong *trans* effect, leading to an easy chloride departure followed by replacement by a side-chain of one of the three His.¹⁵ Here, His13 was identified as the main His involved in Pt binding in **1**. Side-chain Glu11 completes the coordination sphere of the Pt according to Scheme 2.

(ii) Impact on Cu and Zn-associated Aβ toxicity: Interference of Pt with both Cu(II) and Zn coordination to Aβ28 is in line with the yields of Pt compounds coordination to Aβ28 observed by HPLC/MS analysis (*i.e.*, 93%, 90%, 54%, 35% and 34% for **2**, **1**, **3**, **4** and **5**, respectively) and by NMR (Fig. S6 and S7, ESI†). Indeed complexes **1** and **2** efficiently preclude Zn induced Aβ28 aggregation and modify significantly the Cu(Aβ28) EPR signature. Complex **3** has a lesser impact and complexes **4** and **5** have almost no effect on both features. Although a strong effect is detected for complexes **1** and **2** upon reshuffling of the Cu(II) coordination sphere in Aβ28, this modification is not enough to perturb significantly the Cu(Aβ) induced ROS production. In contrast to Cu(II), His13 and Glu11 may be essential residues for Zn binding and induced Aβ28 aggregation (reviewed in ref. 13 and 17). Hence, Pt preferential coordination to those two residues precludes Zn binding in its natural site and clearly affects the associated Aβ28 aggregation.

(iii) Biological relevance: Pt-compound **1** could be interesting as it has a specific effect, in terms of activity, *i.e.* it stops Zn-induced aggregation but not Cu(Aβ) redox reactivity. *A priori*, compound **2** is also very potent to specifically inhibit the Zn associated process but its hydro-solubility hampers its use *in vivo*. For therapeutic approaches, chelators are another strategy often studied for AD.¹⁸ Chelators are often selective but not specific, *i.e.* they can bind to both Zn and Cu but with different affinity according to the Irving Williams series. Here, with Pt complexes, it is possible to address effects (ROS

production or Aβ aggregation) linked to a specific metal ion. Such a strategy relying on specific interference of Pt compounds (with either ROS production or aggregation) is thus a very appealing therapeutic approach.

We thank Sara Ruiz for the measurements of the Ascorbate consumption by Cu(Aβ28) in the presence of Pt compounds and C. Bijani for NMR measurements.

Notes and references

† In the present conditions, Cu(II) does not induce Aβ28 aggregation. Note also that we have checked that Aβ28 aggregation in the presence of Cu(II) or without a metal ion (apo-peptide) is not triggered by the Pt complexes studied here.

§ Note that no effect of the incubation time between the Pt complexes and the Aβ28 prior to the triggering of the aggregation by the addition of Zn was observed.

- 1 C. Hureau, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2164.
- 2 C. Migliorini, E. Porciatti, M. Luczkowski and D. Valensin, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 352.
- 3 J. H. Viles, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2271.
- 4 R. Roychaudhuri, M. Yang, M. M. Hoshi and D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 4749.
- 5 C. Hureau and P. Faller, *Biochimie*, 2009, **91**, 1212.
- 6 S. Chassaing, F. Collin, P. Dorlet, J. Gout, C. Hureau and P. Faller, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2013, Jan 4 [Epub ahead of print].
- 7 C. J. Frederickson, J. Y. Koh and A. I. Bush, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005, **6**, 449.
- 8 J.-Y. Lee, T. B. Cole, R. D. Palmiter, S. W. Suh and J.-Y. Koh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 7705.
- 9 A. I. Bush, W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters and R. E. Tanzi, *Science*, 1994, **265**, 1464.
- 10 A. Kumar, L. Moody, J. F. Olavar, N. A. Lewis, R. L. Khade, A. A. Holder, Y. Zhang and V. Rangachari, *ACS Chem. Neurosci.*, 2010, 691.
- 11 G. Ma, F. Huang, X. Pu, L. Jia, T. Jiang, L. Li and Y. Liu, *Chem.–Eur. J.*, 2011, **17**, 11657.
- 12 D. Valensin, P. Anzini, E. Gaggelli, N. Gaggelli, G. Tamasi, R. Cini, C. Gabbiani, E. Michelucci, L. Messori, H. Kozlowski and G. Valensin, *Inorg. Chem.*, 2010, **49**, 4720.
- 13 D. Valensin, C. Gabbiani and L. Messori, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2357.
- 14 K. J. Barnham, V. B. Kenche, G. D. Ciccosto, D. P. Smith, D. J. Tew, X. Liu, K. Perez, G. A. Cranston, T. J. Johanssen, I. Volitakis, A. I. Bush, C. L. Masters, A. R. White, J. P. Smith, R. A. Cherny and R. Cappai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 6813.
- 15 I. Sasaki, C. Bijani, S. Ladeira, V. Bourdon, P. Faller and C. Hureau, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 6404.
- 16 W. T. Chen, Y. H. Liao, H. M. Yu, I. H. Cheng and Y. R. Chen, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 9646.
- 17 V. Tôugu and P. Palumaa, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2219.
- 18 C. Rodriguez-Rodriguez, M. Telpoukhovskaia and C. Orvig, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2308.

Annexe II :
Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Préparation des échantillons

Peptides: le peptide A β 28 (séquence DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK) est un produit commercial acheté chez GeneCust (Dudelange, Luxembourg) avec une pureté > 98%.

Les solutions stock de peptide sont préparées en solubilisant la poudre dans l'eau milliQ ou le D₂O (pH ~ 2). Les concentrations exactes sont déterminées par spectrophotométrie UV-visible en utilisant l'absorption de la Tyr10 considérée comme une tyrosine libre ($\epsilon_{276-296}$) = 1410 M⁻¹cm⁻¹ à pH~2. La solution stock est ajustée à pH~12 juste avant la préparation de l'échantillon. Puis la solution de peptide est directement diluée pour obtenir la concentration désirée. Toutes les valeurs de pH sont données avec une erreur de ± 0.2 unité pH.

Solution de Zinc: les solutions stocks en Zn(II) sont préparées à partir de ZnSO₄.H₂O (M= 179,47 g/mol, Sigma-Aldrich) à ~0.1 M dans, l'eau milli-Q.

Tampon phosphate (KH₂PO₄): une solution de K₂HPO₄ (M= 136,09 g/mol, Sigma-Aldrich) est préparée à 1 M dans l'eau milli-Q ou le D₂O. Puis la concentration à 10mM est obtenue par dilution de la solution pour la préparation des échantillons.

Tampon phosphate ammonium ((NH₄)₃PO₄): a été préparé par un membre de l'équipe à 10 mM dans l'eau milli-Q.

Tampon HEPES et PIPES: des solutions de tampon HEPES et PIPES à 1 M dans l'eau ont été préparées par un membre de l'équipe. Ces solutions sont directement diluées lors de la préparation de l'échantillon pour obtenir la concentration désirée.

ThioflavinT (ThT): une solution stock de ThT (M=318,8 g/mol, Acros Organics) à 10 mM (en utilisant la masse molaire) dans l'eau milli-Q est préparée puis aliquotée. Les aliquotes sont ensuite placés à -20°C jusqu'à leur utilisation. La concentration de la solution stock est déterminée par spectrophotométrie par UV-Visible en utilisant l'absorption de la ThT ($\epsilon = 33000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) [1]. A partir de ce dosage, la pureté de la ThT a été évaluée soit 70%. La solution stock en ThT est alors à 7 mM en accord avec les données de la littérature [1,2].

Nile Red : une solution stock de Nile Red ($M = 318,38 \text{ g/mol}$, Acros Organics) à 10 mM dans le DMSO est préparée puis aliquotée. Les aliquotes sont ensuite placées au congélateur (-20°C) jusqu'à leur utilisation.

Complexes de Ru(II): une solution stock à 10 mM de chacun des complexes de Ru(II) est préparée, selon leur solubilité, dans l'eau (ou D_2O) et/ou le DMSO (ou DMSO-d^6). Puis les solutions sont aliquotées et conservées à -20°C avant leur utilisation.

TSP (sodium tétraméthylsilylpropionate d^4): une solution à 5 M dans le D_2O a été préparée puis aliquotée et conservée au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

Conditions expérimentales

Spectroscopie de fluorescence

Conditions expérimentales utilisées dans le chapitre III:

La ThT, le peptide $\text{A}\beta 28$ et le Zn(II) sont mélangés dans 10 mM de tampon phosphate à pH 7,4 dans une microplaque contenant 384 puits. Les concentrations finales sont: 500 μM pour le peptide $\text{A}\beta 28$, 10 à 200 μM pour la ThT et 0 ou 250 μM pour le Zn(II) .

Conditions expérimentales utilisées dans le chapitre IV:

La ThT, le peptide $\text{A}\beta 28$ et le Zn(II) sont mélangés dans 10, 50 ou 100 mM de tampon phosphate ou HEPES à pH 7,4 et PIPES à pH 6,5 dans une microplaque contenant 96 ou 384 puits. Les concentrations finales sont: 100 μM à 1 mM pour le peptide $\text{A}\beta 28$, 10 à 200 μM pour la ThT et 0 à 500 μM pour le Zn(II) .

Conditions expérimentales utilisées dans le chapitre V:

La ThT ou le Nile Red, le peptide $\text{A}\beta 28$ et les complexes de Ru(II) sont incubés pendant 24h à 37°C , sous agitation (800 rpm) dans 10 mM de tampon phosphate à pH 7,4 dans une microplaque contenant 384 puits avant l'ajout du Zn(II) . Les concentrations finales sont: 500 μM pour le peptide $\text{A}\beta 28$, 10 μM pour la ThT ou le Nile Red, 500 μM en complexe de Ru(II) et 250 μM pour le Zn(II) .

Spectroscopie RMN:

Conditions expérimentales utilisées dans le chapitre III et IV:

Les solutions de peptide A β 28 sont préparées dans le D₂O et diluées à 500 μ M dans 90/10 H₂O/D₂O ou dans le D₂O pur à pH 7,4, 10 mM de tampon phosphate. La ThT et/ou le Zn(II) sont directement ajoutés dans le tube RMN avec une concentration finale de 0, 10, 50 ou 200 μ M pour la ThT et 0, 25 et 250 μ M pour le Zn(II). Dans le D₂O, le pD est mesuré en utilisant une électrode de verre classique avec $pD = pH_{10} + 0,4$. Les spectres protons 1D et 2D sont enregistrés à 25°C dans le D₂O pur sauf pour les échantillons dédiés à l'attribution du peptide A β 28 qui sont enregistrés dans 90/10 H₂O/D₂O.

L'attribution du peptide A β 28 a été réalisée en utilisant des expériences 2D TOCSY avec un temps de mélange de 80 ms au champ radiofréquence de 10 KHz (DIPSI-2) et deux expériences 2D NOESY avec des temps de mélange de 140 et 400 ms. Ces expériences ont été enregistrées avec 8k x 712 points et avec un délai de 2s 32 scans. Le spectre NOESY en présence de 200 μ M de ThT a été accumulé pendant 1,5 h avec un temps de mélange de 150 et 400 ms, 4k x 128k points et 16 scans.

Les coefficients de diffusion (D) ont été obtenus en utilisant une séquence basée sur un écho de spin stimulé par des gradients bipolaires et une élimination de l'eau par une expérience de type Watergate. Le pseudo spectre 2D a été enregistré avec des gradients de 2 % à 95 % répartis sur 16 points, avec un temps de diffusion (Δ) de 0.2 s, une force de gradients (δ) de 0.9 et 1.6 ms pour la ThT seule et en présence du peptide A β respectivement. Les gradients ont été calibrés à 57.15 G/cm relativement au coefficient de diffusion de l'eau.

Conditions expérimentales utilisées dans le chapitre V:

Les solutions de peptide A β 28 sont préparées dans le D₂O et diluées à 500 μ M dans le D₂O pur à pH 7,4, 10 mM de tampon phosphate. Les complexes de Ru(II) sont directement ajoutés dans le tube RMN avec une concentration finale de 500 μ M juste avant l'enregistrement des spectres ou incubés en présence du peptide pendant 24h sous agitation (800 rpm) à 37°C.

Spectroscopie RPE:

Dans la préparation des échantillons, les conditions sont plus particulières. Les échantillons sont préparés dans D₂O avec du Cuivre 63. Il y a également 10% en glycérol (cryoprotectant) car les tubes sont gelés et conservés dans l'azote liquide. La concentration en peptide, Cu(II) et complexes de Ru(II) est de 1mM dans 20 mM de tampon Hepes à pH 7,4. Le pH est ajusté avec NaOD et D₂SO₄.

Spectrométrie ESI-MS:

Le peptide Aβ₂₈ peptide (500 μM) est incubé avec les complexes de Ru(II) (1.0 éq.) dans 0.8 mM de tampon (NH₄)₃PO₄ ajusté à pH 7,3 à 37°C pendant 24h sous agitation (800 pm). Ces solutions sont diluées à 50μM avec le tampon (0,8 mM, pH 7,3) et gelés jusqu'à leur utilisation. Un volume d'échantillon de 10 μL est injecté sur la colonne HPLC (Phenomenex, Synergi Fusion RP-C18, 250 × 1 mm, 4 μm), à température ambiante. Le gradient d'élution contient 0.1% d'acide formique (phase mobile A) et un mélange acétonitrile/eau (80/20 v/v) en présence de 0.1% d'acide formique (phase mobile B) avec un débit de 50 μL.min⁻¹. Le gradient de la phase mobile est programmé de la façon suivante: 12% de la phase mobile B de 0 à 3 minutes, puis augmentation progressive jusqu'à 100% de la phase B à t=15 min et maintenu pendant 4 min, puis une diminution progressive jusqu'à 12% de la phase mobile B à t=20 min et maintenu pendant 5 min. Le spectromètre de masse est utilisé comme détecteur en mode positif entre 50 et 2000 Da.

Appareillage

Spectrophotométrie UV-Visible:

Les données UV-Visible sont recueillies sur un spectrophotomètre UV-Visible Agilent 8453 avec un thermostat Hewlet Packard à 20°C.

Spectroscopie de fluorescence:

La fluorescence de la ThT et du Nile Red sont mesurées en parallèle au cours du temps avec un fluorimètre FLUOstar Optima (BMG Labtech) (ThT: *excitation, 440 nm; émission, 490 nm; bande passante pour l'excitation et l'émission de 10 nm*, Nile Red *excitation, 544 nm; émission, 640 nm; bande passante pour l'excitation et l'émission de 10 nm*) à T=25°C ou 37°C.

Spectroscopie RPE:

Les données RPE sont enregistrées sur un Elexsys ESP 500 de chez Bruker à une fréquence de l'ordre de 9.5 GHz à 110K dans l'azote liquide.

Spectroscopie RMN:

Les spectres RMN sont enregistrés à 25°C sur un spectromètre Bruker Avance 600 MHz équipé d'une cryosonde (¹H, ¹³C, ¹⁵N). Tous les déplacements chimiques sont donnés par rapport au TSP (étalon interne à 0.00 ppm).

Tous les spectres RMN ont été traités à l'aide du logiciel TopSpin 2.1 (Bruker). L'attribution du peptide Aβ28 a été réalisée en utilisant le logiciel Cara 1.3v8 (www.nmr.ch) et les coefficients de diffusion ont été déterminés à l'aide du module T1/T2 du logiciel Topspin 2.1.

Spectrométrie ESI-MS:

L'analyse HPLC/MS est réalisée sur un spectromètre de masse (LCQ DECA XP Max, ThermoFisher), équipé d'une source en mode électrospray et couplés à un système HPLC (SpectraSystem).

Références :

- [1] M. Groenning, *J Chem Biol* **2010**, 3, 1–18.
- [2] M. D'Amico, M. G. Di Carlo, M. Groenning, V. Militello, V. Vetri, M. Leone, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 3, 1596–1601.

Annexe III :
Synthèses des complexes de
Ru(II)

Synthèse des complexes de Ru(II) :

Le complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ est un produit commercial (Strem) et le polymère $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$ a été obtenu selon le protocole décrit par Anderson ^[1]. Toutes les synthèses sont réalisées sous Ar et protégées de la lumière.

I- Tentatives d'Optimisation de la synthèse du CORM-3

I-A Description de la synthèse originale

La synthèse du CORM-3 ou $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ est décrite pour la première fois par le groupe de Motterlini ^[2]. Les conditions réactionnelles sont les suivantes : le binucléaire $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (ou CORM-2) est mis en présence de deux équivalents de glycine et de méthanolate de sodium (NaOMe) dans le méthanol pendant 18h à température ambiante et sous argon (Figure 1).

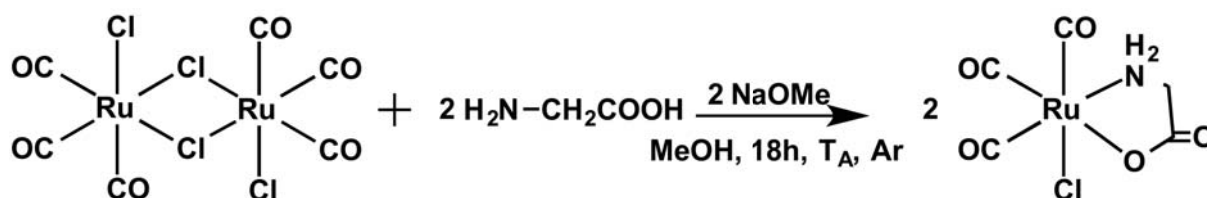


Figure 1: Synthèse du CORM-3 selon Motterlini

Cependant, lors de cette synthèse un produit secondaire apparaît : $[\text{Ru}(\text{CO})_2(\text{CO}_2\text{H})\text{Cl}(\text{glycinate})]$. Cette synthèse a été modifiée par le groupe de Hubbell ^[3]. Le ligand glycinate n'est pas généré *in situ* par l'ajout d'une base sur la glycine. En effet, le glycinate de sodium est disponible commercialement. Cependant, ce produit est vendu avec x molécules d'eau, il est alors difficile de maîtriser la quantité de matière réellement additionnée au complexe de départ.

Différents essais ont été menés afin d'optimiser cette synthèse (cf § I-B) mais ils n'ont apportés aucune amélioration.

I-B Partie Expérimentale

Condition (a) : Chauffage au reflux

Dans un ballon de 250mL, 129 mg de $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (0.25 mmol) sont mis en solution dans 75 mL de méthanol. Puis 39 mg (0.5 mmol) de glycine et 34 mg (0.5 mmol) de NaOEt sont ajoutés. Le mélange est chauffé au reflux pendant 1h. Au bout d'une heure, le mélange est jaune pâle.

Le méthanol est évaporé à sec, une pâte jaune est obtenue. Puis 7 mL de THF sont ajoutés. Un précipité apparaît. Le mélange est filtré sur fibre de verre. Le filtrat est récupéré auquel 150 mL d'hexane sont ajoutés. Un précipité floconneux apparaît. Le précipité est séparé par filtration. Dans le filtrat un précipité blanc se forme. Le filtrat est récupéré et évaporé à sec. 90 mg d'une poudre jaune pâle est récupéré.

RMN ^1H , 400MHz, D_2O (ppm) : δ = 3.47 (s, 2H, glycine libre) ; 3.57 (m, 2H, Glycine liée au Ru)

IR (cm^{-1}) : 2136 (F, Fort), 2045 (F), 1974 (épaulement), 1627-1563 (m, moyen)

Condition (b) : Réduction du volume de réaction

Le même protocole que précédemment est utilisé mais la synthèse se déroule dans 25 mL de méthanol au lieu de 75 mL. Le traitement reste identique au précédent. Une masse $m=$ 50 mg de produit est récupéré.

RMN ^1H , 400MHz, CD_3OD (ppm): 5.45 (s élargi, 1H), 5.83 (s élargi, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.57 (m, 1H) 3.65 (s, 2H)

On déduit que la synthèse du composé $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ selon les conditions précédentes ne permet pas d'obtenir le produit désiré de façon exclusive.

Condition (c) : Utilisation du polymère $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$

La synthèse se fait dans les mêmes conditions que précédemment mais à la place du $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$, le polymère $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$ est utilisé comme produit de départ.

Au bout d'une heure de chauffage, le mélange est évaporé à sec. Lors de l'ajout de THF, il n'y a pas de précipité à apparaître. 50 mL d'hexane sont alors ajoutés mais il n'y a pas formation de précipité. L'ensemble est évaporé à sec. Une poudre de masse $m = 170$ mg est obtenue.

RMN ^1H , 400MHz, CD_3OD (ppm): 5.45 (s élargi, 1H), 5.83 (s élargi, 1H), 4.71 (s élargi, 1H), 4.48 (s élargi, 2H), 3.55-3.66 (m, 2H), 3.69 (m, 2H).

Comme lors des essais précédents, il n'a pas été possible d'isoler le complexe $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ de façon exclusive. En effet, lors de la synthèse du polymère $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$, le complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ est également formé.

I-C Précipitation des ions chlorures par un sel d'argent : Méthode générale

Une autre stratégie a alors été envisagée : faire précipiter les chlorures du $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ par un sel d'argent de type AgX , afin d'obtenir l'espèce intermédiaire $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}]^+\text{X}^-$. La synthèse se fait alors en 2 étapes : une première étape consiste en la précipitation des chlorures du $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ par le sel d'argent et la déprotonation de la glycine par NaOMe en parallèle dans le MeOH. La seconde étape est l'addition de la solution de ligand ainsi déprotoné à la solution de complexe obtenue après élimination du précipité AgCl. Le mélange est chauffé au reflux pendant 1h sous argon (Figure 2).

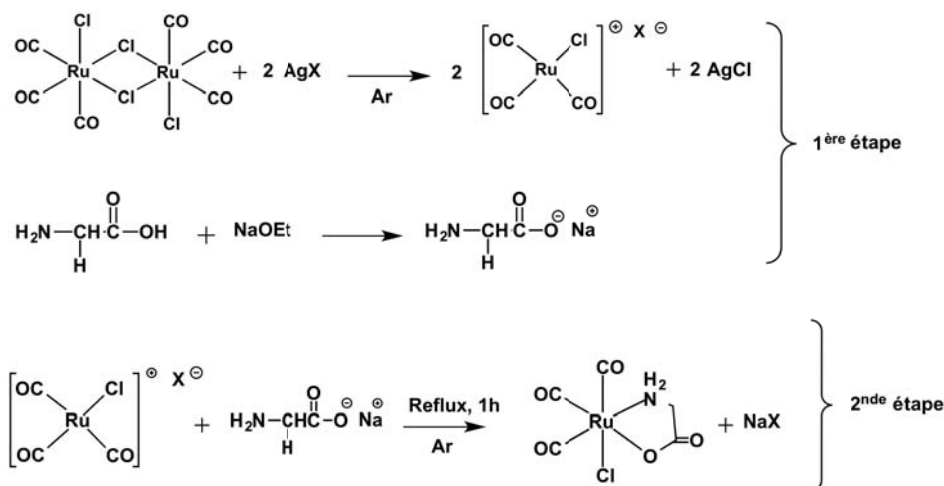


Figure 2: Stratégie de synthèse du CORM-3 par précipitation des ligands chlorures

Dans un ballon de 50 mL, 50 mg de CORM-2 (1 éq.) sont mis en solution dans 5 mL de méthanol. Puis 33 mg (2éq.) d'AgX sont additionnés. Un précipité blanc apparaît instantanément. Le mélange est laissé sous agitation pendant 30 min.

Pendant ce temps, le ligand est préparé : dans un ballon de 10 mL, 15 mg de glycine (2éq.) est placé dans 2 mL de méthanol sous vive agitation. La glycine est insoluble dans le méthanol. Puis 13 mg de NaOEt (2 éq.) sont ajoutés, le ligand glycinate est formé et le mélange devient soluble.

La solution contenant le complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}]^+ \text{X}^-$ est récupérée et centrifugée pendant 5 min à 20°C (15300 rpm, 21460g). Le surnageant est récupéré et le ligand est additionné. Le mélange est chauffé au reflux (70°C) pendant 1h.

Au bout d'une heure, le mélange est refroidi dans un bain de glace, puis concentré jusqu'à l'apparition d'un précipité. Le mélange est centrifugé pendant 5 min à 5°C (15300 rpm, 21460g). Le surnageant est prélevé et de l'éther est ajouté. Un précipité se forme, centrifugation pendant 5 min à 5°C (15300 rpm, 21460g). Le surnageant est jeté, le précipité, en faible quantité, est gardé.

En utilisant différents sels d'argent et soit le méthanol, soit l'acétone comme solvant de la réaction, nous n'avons pas obtenu de CORM-3 de pureté correcte.

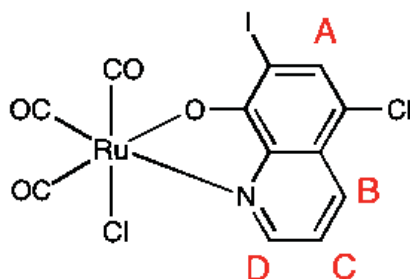
II- Synthèse des complexes avec un ligand hydroxyquinolate

Synthèse de Ru(CO)₃Cl(CQ) avec CQ= clioquinol

59 mg de clioquinol (0.2 mmol) sont mis en solution dans 5 mL de méthanol. Le clioquinol est partiellement dissous dans le méthanol. Puis 13 mg de NaOEt (0.2 mmol) sont ajoutés, le mélange devient soluble et jaune vif.

50 mg de [Ru(CO)₃Cl₂]₂ (0.1 mmol) est solubilisé dans 5mL de MeOH. Puis la solution contenant le clioquinol déprotoné est additionné au complexe en une fois. Le mélange est chauffé au reflux pendant 1h.

Au bout d'une heure, le mélange est refroidi à température ambiante, puis concentré jusqu'à l'apparition d'un précipité. Le précipité est séparé par filtration sous vide. Une poudre jaune brillante de masse m= 53 mg est obtenue soit un rendement de 50%.



RMN ¹H, 400MHz, CD₃CN (ppm) : 8.92 (H_D, d, 1H, J = 5.2 Hz), 8.70 (H_B, d, 1H, J=9.2 Hz), 8.02 (H_A, s, 1H), 7.74 (H_C, m, 1H)

IR ATR (cm⁻¹): 2132 (F), 2051 (F), 1578 (m), 1551 (m), 1486 (m), 1448 (m), 1363 (m), 1110 (m), 810 (m).

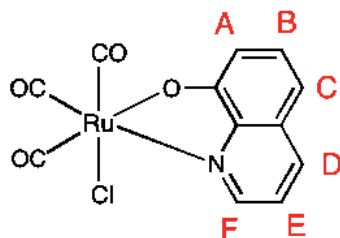
IR KBr (cm⁻¹): 2135 (F), 2064 (F), 1559 (m), 1553 (m), 1488 (m), 1450 (m), 1366 (m), 1113 (m), 811 (m).

m/z (ionisation chimique NH₃): ([Ru(CO)₃Cl(CQ)]NH₄⁺)= 543

[Ru(CO) ₃ Cl(CQ)]	C	H	N
Théorique	27.45	0.77	2.67
Expérimental	27.06	0.34	2.41

Synthèse de Ru(CO)₃Cl(HQ) avec HQ= 8-hydroxyquinoline

Le même mode opératoire est utilisé pour la synthèse de Ru(CO)₃Cl(HQ). Le même rendement est obtenu.



RMN ¹H, 400MHz, CD₃CN (ppm): 8.83 (H_F, d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.46 (H_D, d, 1H, J= 8.0 Hz), 7.57 (H_E, m, 1H), 7.50 (H_B, t, 1H, J= 16.0 Hz, J'= 8.0 Hz), 7.15 (H_A, d, 1H, J= 8.0 Hz), 7.01 (H_C, d, 1H, J = 8.0 Hz).

IR ATR (cm⁻¹): 2129 (F), 2072 (épaulement), 2051 (F), 1576 (m), 1497 (m), 1465 (m), 1373 (m), 1321 (m), 1116 (m), 824 (m).

IR KBr (cm⁻¹): 2132 (F), 2076 (épaulement), 2059 (F), 1577 (m), 1501 (m), 1471 (m), 1375 (m), 1325 (m), 1118 (m), 826 (m).

m/z (ESI mode positif): ([Ru(CO)₃(HQ)]H⁺) = 330

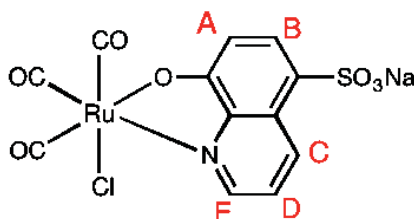
[Ru(CO) ₃ (Cl)(HQ)]	C	H	N
Théorique	39.52	1.66	3.84
Expérimental	39.39	1.13	3.50

Synthèse de $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3)$ avec $\text{HQ}.\text{SO}_3=$ 8-hydroxyquinoline-5-sulfonate de sodium)

180 mg d'acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique (0.8 mmol) sont mis en solution dans 5 mL de méthanol. Puis 108 mg de NaOEt (1.6 mmol) sont ajoutés, le mélange devient soluble et jaune vif.

200 mg de $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (0.4 mmol) est solubilisé dans 5 mL de MeOH. Puis la solution contenant le ligand déprotoné est additionnée au complexe. Le mélange est chauffé au reflux pendant 1h.

Au bout d'une heure, le mélange est refroidi à température ambiante, puis concentré jusqu'à l'apparition d'un précipité. Le précipité est séparé par filtration sous vide. Le filtrat est évaporé à sec puis repris dans 5 mL de MeOH et à nouveau réduction de volume, précipitation et filtration sous vide. Ce processus est répété 2 fois. Une poudre jaune de masse $m=$ 121 mg est obtenue soit un rendement de 45%.



^1H RMN, 400 MHz, CD_3OD (ppm): 9.37 (H_E , d, 1H, $J=8.8$ Hz), 8.97 (H_C , d, 1H, $J=6.0$ Hz), 8.13 (H_A , d, 1H, $J=9.2$ Hz), 7.75 (H_D , m, 1H), 7.00 (H_B , d, 1H, $J=8.8$ Hz).

IR ATR (cm^{-1}): 2138 (F), 2077 (F), 2042 (F), 1578 (f), 1501 (m), 1466 (m), 1368 (f), 1325 (m), 1238 (m), 1182 (m), 1165 (f), 1145 (f), 1064-1044 (m), 814 (f), 709 (f).

IR KBr (cm^{-1}): 2140 (F), 2078 (F), 2055 (F), 1582 (f), 1503 (F), 1465 (m), 1391 (f), 1375 (f), 1326 (m), 1243 (m), 1191 (m), 1165 (f), 1145 (f), 1064-1040 (m), 815 (f).

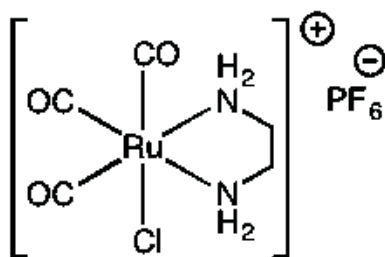
m/z (ESI mode positif): $[\text{Ru}(\text{CO})_2(\text{HQ}.\text{SO}_3)]^+ = 382$

$[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HQ}.\text{SO}_3\text{Na})]$	C	H	N
Théorique	30.88	1.08	3.00
Expérimental	30.10	0.99	2.72

III- Synthèse de $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$ avec en = éthylènediamine ^[4]

200 mg de $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (0.4 mmol) est solubilisé dans 9 mL de MeOH. Puis 325 μL d'éthylènediamine à 2.4M (0.8 mmol) dans le MeOH sont additionnés. Le mélange est chauffé au reflux pendant 1h.

Au bout d'une heure, le mélange est refroidi à température ambiante, puis concentré jusqu'à un volume d'environ 5 mL. Ce mélange est additionné sur une solution de KPF_6 (solution saturée dans le MeOH) permettant l'échange de Cl^- par PF_6^- . Un précipité blanc se forme qui est filtré sous vide. Une poudre blanche de masse $m = 208$ mg est récupérée soit un rendement de 63%.



RMN ¹H, 400 MHz, CD_3OD (ppm): 5.92 (-CH₂, s élargis, 2H), 5.18 (-CH₂, s élargis, 2H), 3.08 (-NH₂, m, 2H), 2.83 (-NH₂, m, 2H).

IR (cm⁻¹): 3269 (F), 3230 (F), 3158 (F), 2148 (F), 2030 (F), 1586 (m), 1466 (f), 1163(f), 1060 (F), 1007 (f), 886 (f).

m/z (ESI mode positif): $[\text{Ru}(\text{CO})_2(\text{en})]^+ = 217$

$[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{ClO}_4^-$	C	H	N
Théorique	15.80	2.12	7.37
Expérimental	16.00	1.65	7.14

Références :

- [1] P. A. Anderson, G. B. Deacon, K. H. Haarmann, F. R. Keene, T. J. Meyer, D. A. Reitsma, B. W. Skelton, G. F. Strouse, N. C. Thomas, *Inorg Chem* **1995**, *34*, 6145–6157.
- [2] T. R. Johnson, B. E. Mann, I. P. Teasdale, H. Adams, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 1500–1508.
- [3] U. Hasegawa, A. J. van der Vlies, E. Simeoni, C. Wandrey, J. A. Hubbell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18273–18280.
- [4] A. O. Baghlaf, M. Ishaq, S. S. Al-Juaid, A. M. Asiri, M. N. Arshad, *Acta Cryst (2011)*. *E67*, 925 [doi:10.1107/S1600536811022227] **2011**, 1–10.

Annexe IV :
Structures cristallographiques

Annexe IV

Structure cristallographique du complexe Ru(CO)₃Cl(CO)

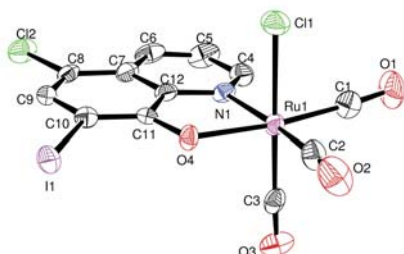


Table 1. Crystal data and structure refinement

Empirical formula	C12 H4 Cl2 I N O4 Ru
Formula weight	525.03
Temperature	180(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	monoclinic, P c
Unit cell dimensions	a = 19.3267(8) Å alpha = 90 deg. b = 6.2060(2) Å beta = 107.928(4) deg. c = 13.4152(5) Å gamma = 90 deg.
Volume	1530.91(10) Å ³
Z, Calculated density	4, 2.278 Mg/m ³
Absorption coefficient	3.401 mm ⁻¹
F(000)	984
Crystal size	0.16 x 0.12 x 0.08 mm
Theta range for data collection	3.04 to 28.27 deg.
Limiting indices	-25 ≤ h ≤ 25, -8 ≤ k ≤ 8, -17 ≤ l ≤ 17
Reflections collected / unique	14254 / 6838 [R(int) = 0.0356]
Completeness to theta = 28.27	96.3 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	6838 / 2 / 379
Goodness-of-fit on F ²	1.019
Final R indices [I > 2sigma(I)]	R1 = 0.0335, wR2 = 0.0638
R indices (all data)	R1 = 0.0405, wR2 = 0.0687
Largest diff. peak and hole	0.514 and -0.647 e.Å ⁻³

Table 2. Bond lengths [Å]

C(1)-O(1)	1.150(8)
C(1)-Ru(1)	1.891(7)
C(2)-O(2)	1.120(7)
C(2)-Ru(1)	1.931(7)
C(3)-O(3)	1.122(7)
C(3)-Ru(1)	1.912(7)
C(4)-N(1)	1.339(7)
C(4)-C(5)	1.426(9)
C(4)-H(4)	0.9500
C(5)-C(6)	1.342(10)
C(5)-H(5)	0.9500
C(6)-C(7)	1.404(9)
C(6)-H(6)	0.9500
C(7)-C(8)	1.415(9)
C(7)-C(12)	1.419(8)
C(8)-C(9)	1.375(8)
C(8)-Cl(2)	1.744(6)
C(9)-C(10)	1.406(8)
C(9)-H(9)	0.9500
C(10)-C(11)	1.374(8)
C(10)-I(1)	2.092(6)
C(11)-O(4)	1.330(6)
C(11)-C(12)	1.435(8)
C(12)-N(1)	1.361(7)
N(1)-Ru(1)	2.082(5)
O(4)-Ru(1)	2.062(4)
Cl(1)-Ru(1)	2.3907(16)
C(13)-O(5)	1.131(8)
C(13)-Ru(2)	1.923(7)
C(14)-O(6)	1.131(7)
C(14)-Ru(2)	1.929(7)
C(15)-O(7)	1.133(7)
C(15)-Ru(2)	1.900(7)
C(16)-N(2)	1.324(7)
C(16)-C(17)	1.392(10)
C(16)-H(16)	0.9500
C(17)-C(18)	1.360(10)
C(17)-H(17)	0.9500
C(18)-C(19)	1.402(8)
C(18)-H(18)	0.9500
C(19)-C(20)	1.414(9)
C(19)-C(24)	1.421(8)
C(20)-C(21)	1.382(8)
C(20)-Cl(4)	1.743(6)
C(21)-C(22)	1.396(8)
C(21)-H(21)	0.9500
C(22)-C(23)	1.380(8)
C(22)-I(2)	2.101(6)
C(23)-O(8)	1.324(7)
C(23)-C(24)	1.417(7)
C(24)-N(2)	1.376(7)
N(2)-Ru(2)	2.092(5)
O(8)-Ru(2)	2.063(4)
Cl(3)-Ru(2)	2.3998(15)

Table 3. Angles [deg].

O(1)-C(1)-Ru(1)	175.9(6)	C(18)-C(17)-C(16)	120.0(5)
O(2)-C(2)-Ru(1)	175.8(6)	C(18)-C(17)-H(17)	120.0
O(3)-C(3)-Ru(1)	177.6(6)	C(16)-C(17)-H(17)	120.0
N(1)-C(4)-C(5)	121.1(6)	C(17)-C(18)-C(19)	119.8(6)
N(1)-C(4)-H(4)	119.5	C(17)-C(18)-H(18)	120.1
C(5)-C(4)-H(4)	119.5	C(19)-C(18)-H(18)	120.1
C(6)-C(5)-C(4)	120.1(6)	C(18)-C(19)-C(20)	126.1(6)
C(6)-C(5)-H(5)	120.0	C(18)-C(19)-C(24)	118.1(6)
C(4)-C(5)-H(5)	120.0	C(20)-C(19)-C(24)	115.8(5)
C(5)-C(6)-C(7)	120.4(6)	C(21)-C(20)-C(19)	122.0(6)
C(5)-C(6)-H(6)	119.8	C(21)-C(20)-Cl(4)	119.1(5)
C(7)-C(6)-H(6)	119.8	C(19)-C(20)-Cl(4)	118.9(5)
C(6)-C(7)-C(8)	125.7(6)	C(20)-C(21)-C(22)	119.4(6)
C(6)-C(7)-C(12)	117.1(6)	C(20)-C(21)-H(21)	120.3
C(8)-C(7)-C(12)	117.1(5)	C(22)-C(21)-H(21)	120.3
C(9)-C(8)-C(7)	121.4(5)	C(23)-C(22)-C(21)	122.7(5)
C(9)-C(8)-Cl(2)	119.5(5)	C(23)-C(22)-I(2)	119.0(4)
C(7)-C(8)-Cl(2)	119.1(5)	C(21)-C(22)-I(2)	118.3(4)
C(8)-C(9)-C(10)	119.9(6)	O(8)-C(23)-C(22)	124.2(5)
C(8)-C(9)-H(9)	120.0	O(8)-C(23)-C(24)	119.2(5)
C(10)-C(9)-H(9)	120.0	C(22)-C(23)-C(24)	116.5(5)
C(11)-C(10)-C(9)	122.3(5)	N(2)-C(24)-C(23)	116.2(5)
C(11)-C(10)-I(1)	119.4(4)	N(2)-C(24)-C(19)	120.3(5)
C(9)-C(10)-I(1)	118.3(4)	C(23)-C(24)-C(19)	123.4(6)
O(4)-C(11)-C(10)	124.1(5)	C(16)-N(2)-C(24)	119.8(6)
O(4)-C(11)-C(12)	118.7(5)	C(16)-N(2)-Ru(2)	128.8(5)
C(10)-C(11)-C(12)	117.2(5)	C(24)-N(2)-Ru(2)	111.4(3)
N(1)-C(12)-C(7)	122.4(5)	C(23)-O(8)-Ru(2)	112.8(3)
N(1)-C(12)-C(11)	115.6(5)	C(15)-Ru(2)-C(13)	91.6(3)
C(7)-C(12)-C(11)	122.0(6)	C(15)-Ru(2)-C(14)	95.8(3)
C(4)-N(1)-C(12)	118.9(5)	C(13)-Ru(2)-C(14)	92.4(3)
C(4)-N(1)-Ru(1)	128.4(4)	C(15)-Ru(2)-O(8)	91.5(2)
C(12)-N(1)-Ru(1)	112.7(3)	C(13)-Ru(2)-O(8)	176.6(2)
C(11)-O(4)-Ru(1)	112.9(3)	C(14)-Ru(2)-O(8)	88.5(2)
C(1)-Ru(1)-C(3)	92.8(3)	C(15)-Ru(2)-N(2)	90.4(2)
C(1)-Ru(1)-C(2)	91.8(3)	C(13)-Ru(2)-N(2)	98.6(2)
C(3)-Ru(1)-C(2)	93.0(3)	C(14)-Ru(2)-N(2)	167.2(2)
C(1)-Ru(1)-O(4)	173.8(2)	O(8)-Ru(2)-N(2)	80.11(17)
C(3)-Ru(1)-O(4)	92.5(2)	C(15)-Ru(2)-Cl(3)	175.35(19)
C(2)-Ru(1)-O(4)	91.0(2)	C(13)-Ru(2)-Cl(3)	86.15(19)
C(1)-Ru(1)-N(1)	96.9(2)	C(14)-Ru(2)-Cl(3)	88.39(18)
C(3)-Ru(1)-N(1)	90.7(2)	O(8)-Ru(2)-Cl(3)	90.64(12)
C(2)-Ru(1)-N(1)	170.4(2)	N(2)-Ru(2)-Cl(3)	85.91(13)
O(4)-Ru(1)-N(1)	79.93(17)		
C(1)-Ru(1)-Cl(1)	85.3(2)		
C(3)-Ru(1)-Cl(1)	176.63(18)		
C(2)-Ru(1)-Cl(1)	89.8(2)		
O(4)-Ru(1)-Cl(1)	89.28(12)		
N(1)-Ru(1)-Cl(1)	86.84(13)		
O(5)-C(13)-Ru(2)	179.0(6)		
O(6)-C(14)-Ru(2)	173.6(6)		
O(7)-C(15)-Ru(2)	176.2(6)		
N(2)-C(16)-C(17)	122.1(7)		
N(2)-C(16)-H(16)	118.9		
C(17)-C(16)-H(16)	118.9		

Structure cristallographique du complexe Ru(CO)₃Cl(HO)

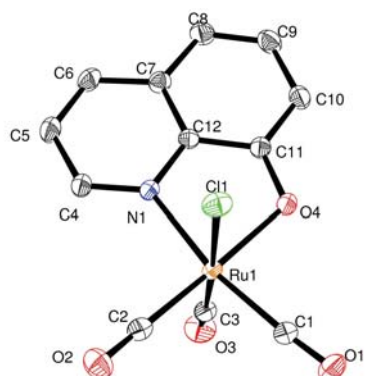


Table 1. Crystal data and structure refinement.

Empirical formula	C ₁₂ H ₆ Cl N O ₄ Ru
Formula weight	364.70
Temperature	180(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	orthorhombic, P b c 21
Unit cell dimensions	a = 8.8922(3) Å alpha = 90 deg. b = 11.6105(4) Å beta = 90 deg. c = 12.0152(4) Å gamma = 90 deg.
Volume	1240.48(7) Å ³
Z, Calculated density	4, 1.953 Mg/m ³
Absorption coefficient	1.486 mm ⁻¹
F(000)	712
Crystal size	? x ? x ? mm
Theta range for data collection	2.89 to 30.51 deg
Limiting indices	-12 ≤ h ≤ 12, -16 ≤ k ≤ 16, -17 ≤ l ≤ 17
Reflections collected / unique	48858 / 3767 [R(int) = 0.0211]
Completeness to theta = 30.51	99.9 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	3767 / 1 / 172
Goodness-of-fit on F ²	1.051
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0125, wR2 = 0.0329
R indices (all data)	R1 = 0.0132, wR2 = 0.0334
Absolute structure parameter	-0.003(17)
Largest diff. peak and hole	0.261 and -0.500 e.Å ⁻³

Table 2. Bond lengths [Å]

C(1)-O(1)	1.1243(17)
C(1)-Ru(1)	1.9185(14)
C(2)-O(2)	1.1283(16)
C(2)-Ru(1)	1.9233(13)
C(3)-O(3)	1.1190(17)
C(3)-Ru(1)	1.9231(13)
C(4)-N(1)	1.3277(15)
C(4)-C(5)	1.4082(19)
C(4)-H(4)	0.9500
C(5)-C(6)	1.367(2)
C(5)-H(5)	0.9500
C(6)-C(7)	1.4154(18)
C(6)-H(6)	0.9500
C(7)-C(12)	1.4158(17)
C(7)-C(8)	1.4175(18)
C(8)-C(9)	1.373(2)
C(8)-H(8)	0.9500
C(9)-C(10)	1.407(2)
C(9)-H(9)	0.9500
C(10)-C(11)	1.3884(16)

Table 3. Angles [deg]

O(1)-C(1)-Ru(1)	175.93(12)	C(4)-N(1)-Ru(1)	129.79(9)
O(2)-C(2)-Ru(1)	174.09(11)	C(12)-N(1)-Ru(1)	110.87(7)
O(3)-C(3)-Ru(1)	174.43(12)	C(11)-O(4)-Ru(1)	112.70(8)
N(1)-C(4)-C(5)	121.78(12)	C(1)-Ru(1)-C(3)	95.18(6)
N(1)-C(4)-H(4)	119.1	C(1)-Ru(1)-C(2)	90.46(5)
C(5)-C(4)-H(4)	119.1	C(3)-Ru(1)-C(2)	94.96(5)
C(6)-C(5)-C(4)	119.89(12)	C(1)-Ru(1)-O(4)	89.64(5)
C(6)-C(5)-H(5)	120.1	C(3)-Ru(1)-O(4)	90.05(5)
C(4)-C(5)-H(5)	120.1	C(2)-Ru(1)-O(4)	174.95(5)
C(5)-C(6)-C(7)	119.95(12)	C(1)-Ru(1)-N(1)	169.56(5)
C(5)-C(6)-H(6)	120.0	C(3)-Ru(1)-N(1)	87.99(5)
C(7)-C(6)-H(6)	120.0	C(2)-Ru(1)-N(1)	99.18(5)
C(6)-C(7)-C(12)	117.06(11)	O(4)-Ru(1)-N(1)	80.41(4)
C(6)-C(7)-C(8)	124.11(12)	C(1)-Ru(1)-Cl(1)	89.03(4)
C(12)-C(7)-C(8)	118.83(11)	C(3)-Ru(1)-Cl(1)	175.57(4)
C(9)-C(8)-C(7)	119.00(12)	C(2)-Ru(1)-Cl(1)	86.33(4)
C(9)-C(8)-H(8)	120.5	O(4)-Ru(1)-Cl(1)	88.62(3)
C(7)-C(8)-H(8)	120.5	N(1)-Ru(1)-Cl(1)	87.62(3)
C(8)-C(9)-C(10)	122.29(12)		
C(8)-C(9)-H(9)	118.9		
C(10)-C(9)-H(9)	118.9		
C(11)-C(10)-C(9)	120.46(12)		
C(11)-C(10)-H(10)	119.8		
C(9)-C(10)-H(10)	119.8		
O(4)-C(11)-C(10)	122.80(11)		
O(4)-C(11)-C(12)	119.36(10)		
C(10)-C(11)-C(12)	117.84(11)		
N(1)-C(12)-C(7)	121.95(10)		
N(1)-C(12)-C(11)	116.48(10)		
C(7)-C(12)-C(11)	121.56(10)		
C(4)-N(1)-C(12)	119.34(11)		

Structure cristallographique du complexe $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{en})]^+\text{PF}_6^-$

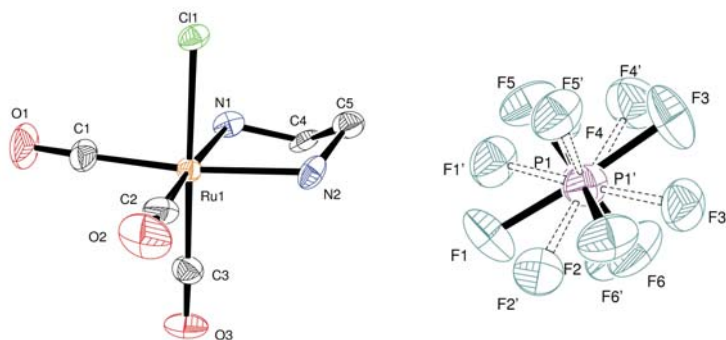


Table 1. Crystal data and structure refinement

Empirical formula	C5 H8 Cl N2 O3 Ru, F6 P
Formula weight	425.62
Temperature	180(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	monoclinic, P 21/n
Unit cell dimensions	a = 7.6796(15) Å alpha = 90 deg. b = 10.757(2) Å beta = 90.01(3) deg. c = 15.300(3) Å gamma = 90 deg.
Volume	1263.9(4) Å ³
Z, Calculated density	4, 2.237 Mg/m ³
Absorption coefficient	1.657 mm ⁻¹
F(000)	824
Crystal size	0.16 x 0.1 x 0.06 mm
Theta range for data collection	3.26 to 26.37 deg.
Limiting indices	-9 ≤ h ≤ 9, -12 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 19
Reflections collected / unique	6032 / 2441 [R(int) = 0.0353]
Completeness to theta = 26.37	94.1 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2441 / 308 / 253
Goodness-of-fit on F ²	1.284
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0720, wR2 = 0.1665
R indices (all data)	R1 = 0.0826, wR2 = 0.1704
Largest diff. peak and hole	0.951 and -1.448 e.Å ⁻³

Table 2. Bond lengths [Å]

C(1)-O(1)	1.123(14)
C(1)-Ru(1)	1.938(12)
C(2)-O(2)	1.120(14)
C(2)-Ru(1)	1.938(13)
C(3)-O(3)	1.106(14)
C(3)-Ru(1)	1.929(12)
N(1)-C(4)	1.454(16)
N(1)-C(4')	1.48(2)
N(1)-Ru(1)	2.118(9)
N(1)-H(1A)	0.9200
N(1)-H(1B)	0.9200
N(2)-C(5')	1.49(2)
N(2)-C(5)	1.527(17)
N(2)-Ru(1)	2.139(9)
N(2)-H(2A)	0.9200
N(2)-H(2B)	0.9200
C(4)-C(5)	1.53(2)
C(4)-H(4A)	0.9900
C(4)-H(4B)	0.9900
C(5)-H(5A)	0.9900
C(5)-H(5B)	0.9900
C(4')-C(5')	1.53(2)
C(4')-H(4C)	0.9900
C(4')-H(4D)	0.9900
C(5')-H(5C)	0.9900
C(5')-H(5D)	0.9900
Cl(1)-Ru(1)	2.403(3)
P(1)-F(1)	1.573(12)
P(1)-F(6)	1.590(12)
P(1)-F(3)	1.590(13)
P(1)-F(2)	1.595(12)
P(1)-F(5)	1.597(11)
P(1)-F(4)	1.612(12)
P(1')-F(1')	1.564(17)
P(1')-F(4')	1.591(17)
P(1')-F(5')	1.594(16)
P(1')-F(6')	1.594(16)
P(1')-F(3')	1.597(17)
P(1')-F(2')	1.600(17)

Table 3. Angles [deg]

O(1)-C(1)-Ru(1)	178.4(14)	C(2)-Ru(1)-N(2)	93.5(4)
O(2)-C(2)-Ru(1)	178.1(12)	N(1)-Ru(1)-N(2)	79.8(4)
O(3)-C(3)-Ru(1)	178.5(12)	C(3)-Ru(1)-Cl(1)	178.7(4)
C(4)-N(1)-C(4')	27.6(15)	C(1)-Ru(1)-Cl(1)	90.2(4)
C(4)-N(1)-Ru(1)	111.7(8)	C(2)-Ru(1)-Cl(1)	89.9(4)
C(4')-N(1)-Ru(1)	109.6(13)	N(1)-Ru(1)-Cl(1)	86.2(3)
C(4)-N(1)-H(1A)	109.3	N(2)-Ru(1)-Cl(1)	85.5(3)
C(4')-N(1)-H(1A)	131.5	F(1)-P(1)-F(6)	93.1(9)
Ru(1)-N(1)-H(1A)	109.3	F(1)-P(1)-F(3)	175.7(10)
C(4)-N(1)-H(1B)	109.3	F(6)-P(1)-F(3)	90.1(9)
C(4')-N(1)-H(1B)	85.1	F(1)-P(1)-F(2)	90.7(8)
Ru(1)-N(1)-H(1B)	109.3	F(6)-P(1)-F(2)	93.3(8)
H(1A)-N(1)-H(1B)	108.0	F(3)-P(1)-F(2)	91.9(9)
C(5')-N(2)-C(5)	31.6(15)	F(1)-P(1)-F(5)	89.7(8)
C(5')-N(2)-Ru(1)	110.2(13)	F(6)-P(1)-F(5)	176.9(10)
C(5)-N(2)-Ru(1)	109.1(8)	F(3)-P(1)-F(5)	87.0(8)
C(5')-N(2)-H(2A)	132.6	F(2)-P(1)-F(5)	88.0(7)
C(5)-N(2)-H(2A)	109.9	F(1)-P(1)-F(4)	89.3(8)
Ru(1)-N(2)-H(2A)	109.9	F(6)-P(1)-F(4)	89.4(8)
C(5')-N(2)-H(2B)	80.5	F(3)-P(1)-F(4)	88.0(8)
C(5)-N(2)-H(2B)	109.9	F(2)-P(1)-F(4)	177.3(8)
Ru(1)-N(2)-H(2B)	109.9	F(5)-P(1)-F(4)	89.2(7)
H(2A)-N(2)-H(2B)	108.3	F(1')-P(1')-F(4')	90.7(14)
N(1)-C(4)-C(5)	106.1(12)	F(1')-P(1')-F(5')	88.8(13)
N(1)-C(4)-H(4A)	110.5	F(4')-P(1')-F(5')	89.1(14)
C(5)-C(4)-H(4A)	110.5	F(1')-P(1')-F(6')	91.4(15)
N(1)-C(4)-H(4B)	110.5	F(4')-P(1')-F(6')	92.7(14)
C(5)-C(4)-H(4B)	110.5	F(5')-P(1')-F(6')	178.2(17)
H(4A)-C(4)-H(4B)	108.7	F(1')-P(1')-F(3')	176.6(16)
N(2)-C(5)-C(4)	107.3(12)	F(4')-P(1')-F(3')	88.2(13)
N(2)-C(5)-H(5A)	110.3	F(5')-P(1')-F(3')	87.9(13)
C(4)-C(5)-H(5A)	110.3	F(6')-P(1')-F(3')	91.9(14)
N(2)-C(5)-H(5B)	110.3	F(1')-P(1')-F(2')	91.9(14)
C(4)-C(5)-H(5B)	110.3	F(4')-P(1')-F(2')	176.8(16)
H(5A)-C(5)-H(5B)	108.5	F(5')-P(1')-F(2')	89.3(14)
N(1)-C(4')-C(5')	110(2)	F(6')-P(1')-F(2')	88.9(14)
N(1)-C(4')-H(4C)	109.8	F(3')-P(1')-F(2')	89.1(14)
C(5')-C(4')-H(4C)	109.8		
N(1)-C(4')-H(4D)	109.8		
C(5')-C(4')-H(4D)	109.8		
H(4C)-C(4')-H(4D)	108.2		
N(2)-C(5')-C(4')	103.0(19)		
N(2)-C(5')-H(5C)	111.2		
C(4')-C(5')-H(5C)	111.2		
N(2)-C(5')-H(5D)	111.2		
C(4')-C(5')-H(5D)	111.2		
H(5C)-C(5')-H(5D)	109.1		
C(3)-Ru(1)-C(1)	90.8(5)		
C(3)-Ru(1)-C(2)	91.0(5)		
C(1)-Ru(1)-C(2)	92.7(5)		
C(3)-Ru(1)-N(1)	92.9(4)		
C(1)-Ru(1)-N(1)	93.7(5)		
C(2)-Ru(1)-N(1)	172.5(5)		
C(3)-Ru(1)-N(2)	93.4(4)		
C(1)-Ru(1)-N(2)	172.5(5)		