

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUE (ED 222)

Institut de chimie de Strasbourg (UMR 7177)

THÈSE présentée par :

Thibaut GALLER

soutenue le : **21 octobre 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/S spécialité : Chimie

**DÉVELOPPEMENT D'ASSEMBLAGES
PEPTIDIQUES CONTRÔLÉS POUR DES
APPLICATIONS CATALYTIQUES ET
ANTI-BACTERIENNES**

THÈSE dirigée par :

M. FALLER Peter

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme IRANZO Olga

Directrice de recherche, Institut des Sciences Moléculaires de
Marseille

M. DELSUC Nicolas

Chargé de recherche, École Normale Supérieur – Département
de chimie, Paris

EXAMINATRICE :

Mme BOULMEDAIS Fouzia

Directrice de recherche, Institut Charles Sadron, Strasbourg

MEMBRES INVITÉS :

Mme SCHALK Isabelle

Directrice de recherche, École Supérieur de Biotechnologie de
Strasbourg

M. LEBRUN Vincent

Chargé de recherche, Université de Strasbourg

Mme SOUR Angélique

Chargée de recherche, Université de Strasbourg

A la mémoire de Odile, Willy et Saphira

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
REMERCIEMENTS.....	10
LISTE DES PUBLICATIONS.....	14
PREAMBULE	16
CHAPITRE 1.....	18
1.1 INTRODUCTION	20
1.1.1 Cuivre	20
1.1.2 Génération de stress oxydant par le cuivre	21
1.1.3 Les métalloenzymes à cuivre	21
1.1.3.1 Les différentes familles de métalloenzymes à cuivre.....	22
Le type I (T1Cu ou « blue copper proteins »).....	22
Le type II (T2Cu).....	22
Le type III (T3Cu).....	22
Les types Cu _A et Cu _B	22
Le type Cu _Z	23
1.1.4 Monoxygénase lytique de polysaccharides (LPMO)	23
1.1.4.1 Site de coordination des LPMO (résidu conservé)	24
1.1.4.2 Réaction catalysée par les LPMO	24
1.1.5 Comparaison catalyseur enzymatique et catalyseur organique	25
1.1.6 Catalyseur métallique artificiel bio-inspiré	25
1.1.6.1 métalloenzymes artificielles.....	26
1.1.6.2 Métalloamyloïde	27
1.1.7 Vers un design minimaliste de mimes de LPMO.....	29
1.1.7.1 Feuilletés	29
1.1.7.2 Nanofibres peptidiques autoassemblées inspirées des structures amyloïdes	30
1.2 HÉTÉROASSEMBLAGE DE PEPTIDES COURTS POUR LA FORMATION DE MIMES DE LPMO.	32
1.2.1 Fonctionnalisation des peptides par les histidines (Figure 11 : en orange et violet).....	32
1.2.2 Synthèse des peptides	32
1.2.3 Formation des fibres	33
1.2.4 Microscopie électronique à transmission	34
1.2.5 ATR-FTIR.....	36
1.2.6 Raman	39
1.2.7 Résonance paramagnétique électronique.....	40
1.2.8 HYSORE	43
1.2.9 Proposition de la répartition des espèces présentes en dessous d'un équivalent de cuivre	44
1.2.10 Tests catalytiques	45
1.3 CONCLUSION	49
2 CHAPITRE 2	50
2.1 INTRODUCTION	52
2.1.1 Métaux en biologie	52
2.1.2 Chimie du fer (Fe ^{III}) et d'un ion modèle diamagnétique : le gallium (Ga ^{III}).....	52
2.1.2.1 Fer	52
2.1.2.2 Gallium	52
2.1.3 Homéostasie et toxicité	53
2.1.3.1 Toxicité du Fer.....	53

2.1.3.2	Importance de l'homéostasie du fer	54
2.1.3.3	Toxicité du gallium	55
2.1.4	Le fer dans le corps humain	55
2.1.4.1	Les hémoprotéines.....	55
2.1.4.2	Les protéines fer-soufre (Fe-S).....	55
2.1.4.3	Les protéines non hémiques et non Fe-S.....	56
2.1.4.4	Les protéines de stockage, du métabolisme et transport du fer	56
2.1.4.4.1	La transferrine.....	56
2.1.4.4.2	La ferritine.....	57
2.1.5	Les bactéries et l'import du Fe ^{III}	57
2.1.5.1	Homéostasie du fer chez les bactéries.....	57
2.1.5.2	Différence entre les bactéries Gram - et Gram +	58
2.1.5.3	Stratégie d'acquisition du fer pour les Gram -	58
2.1.5.4	Stratégie d'acquisition pour les bactéries Gram +	60
2.1.6	Les sidérophores.....	60
2.1.6.1	Définition et utilité du pFe ³⁺	61
2.1.6.2	Affinité des sidérophores pour le Fe ^{III}	61
2.1.6.3	Acquisition du Fe ^{III} par les sidérophores	62
2.1.6.4	Applications humaines des sidérophores	63
2.1.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
2.1.8	Les peptides antimicrobiens (PAM)	64
2.1.8.1	Les familles structurales des PAM.....	64
2.1.8.2	Mode de fonctionnement	65
2.1.8.3	Avantages et limites de l'utilisation des PAM	66
2.1.8.4	Les PAM synthétiques	67
2.1.9	Exemples de stratégies d'immobilisation d'antibiotiques sur surface (dont relargage spécifique)	67
2.1.9.1	Stratégies d'immobilisation d'antibiotiques sur surface.....	67
2.1.9.2	Relargage spécifique	68
2.1.10	Projet global : Vers un système de relargage spécifique déclenché par la présence de sidérophores	69
2.2	Projet de thèse : DÉVELOPPEMENT DE COMPLEXES DE Fe (III) ET Ga (III) LIÉS À UN PEPTIDE POUR LA FORMATION DE POLYMÈRE DE COORDINATION POUR LE RELARGAGE DE PAM EN PRÉSENCE DE SIDÉROPHORES.....	72
2.2.1	Choix des PAM	73
2.2.2	Choix des ligands.....	74
2.2.3	Conception des espaceurs	75
2.2.4	Formations des complexes	76
2.2.5	Méthodologie employée.....	77
2.2.6	Diagramme de prédominance des espèces	78
2.2.7	Synthèse des ligands (L), des L-PAM et des L-PAM-L.....	79
2.2.7.1	Synthèse des ligands (L)	79
2.2.7.2	Synthèse des L-PAM.....	80
2.2.7.3	Synthèse des L-PAM-L.....	80
2.2.8	Dosage des solutions stock de ligands et détermination de leurs stœchiométries (L, L-PAM, L-PAM-L).....	81
2.2.9	Détermination de la durée d'oxydation du Fe ^{II} en Fe ^{III} coordonné aux L, L-PAM et L-PAM-L.	83
2.2.10	Titrage spectrophotométrique en fonction du pH des L, L-PAM et L-PAM-L	84
2.2.10.1	Titrage spectrophotométrique en fonction du pH des ligands 8HQ-Pro-OtBu et DFX-COOH	84
2.2.10.2	Titrage spectrophotométrique en fonction du pH des L-PAM, 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂ et DFX-WKWLKKWIKG-NH ₂	86
2.2.11	Détermination des MIC ₁₀₀ sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88
2.2.11.1	Détermination des MIC ₁₀₀ sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (L, PAM, L-PAM)	88
2.2.11.2	Détermination des MIC ₁₀₀ sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (métal seul, L, PAM, L-PAM et L + PAM en présence de métal)	89

2.2.11.3	Détermination des MIC ₁₀₀ des L-PAM-L sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
2.2.12	Analyse des bandes du Fe ^{III} et Ga ^{III} avec la DFO B	91
2.2.12.1	Compétition entre les complexes discrets de DFX et DFX-PAM et la DFO B.....	92
2.2.12.2	Compétition entre la DFO B et la 8HQ-Pro-OtBu et le PAM 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂ (L-PAM) ...	93
2.2.12.3	Compétition entre la DFO B et DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (L-PAM-L)	94
2.2.13	Formations des polymères de coordination.....	95
2.2.14	Stratégies développées pour le suivi du relargage des PAM (gel d'agarose et cassette à dialyse).....	96
2.2.14.1	Test de la stratégie de relargage « Gel d'agarose » avec de la DFO B.....	97
2.2.14.2	Analyses du surnageant de culture PA01 WT	98
2.2.14.3	Test de la stratégie « Gel d'agarose » avec du surnageant de culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	99
2.2.14.4	Test gel d'agarose sur souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WT	101
2.2.14.5	Stratégie cassette à dialyse	102
2.2.14.6	Quantification du relargage passif des L-PAM-L par HPLC en utilisant la méthodologie cassette a dialyse	103
2.2.14.7	Détermination de la quantité de métaux (Fe ^{III} ou Ga ^{III}) relarguée par les polymères en présence de compétiteur, avec la cassette de dialyse	104
2.2.14.8	Quantification des L-PAM-L en présence d'un compétiteur, en utilisant la méthode cassette à dialyse	105
2.3	CONCLUSION	106
3	CONCLUSION GÉNÉRALE	108
4	PARTIE EXPÉRIMENTALE	110
4.1	Réactifs et solvants.....	112
4.2	Liste du matériel utilisé	112
4.3	Méthode de purification HPLC LaPrep	112
4.4	Synthèse manuelle des peptides Ac-KFFAAKH-NH ₂ (PH+) et HEFFAAE-NH ₂ (HP-), HKFFAAK-NH ₂ (HP+), Ac-EFFAAEH-NH ₂ (PH-), Ac-KFFAAK-NH ₂ (P+), Ac-EFFAAE-NH ₂ (P-).....	113
4.5	Synthèse automatisée des peptides HKFFAAK-NH ₂ (HP+), Ac-EFFAAEH-NH ₂ (PH-), Ac-KFFAAK-NH ₂ (P+), Ac-EFFAAE-NH ₂ (P-) et Ac-IHIHIQI-NH ₂	114
4.5.1	Synthèse des peptides H* KFFAAK-NH ₂ (HP+)* et Ac-EFFAAEH*-NH ₂ (PH-)*	114
4.5.2	Purification, analyse HPLC et caractérisation LC-MS	114
4.6	Détermination des concentrations de Cu ^{II} et peptides	115
4.7	Préparation des échantillons pour la MET	115
4.8	Microscopie électronique à transmission (MET).....	116
4.9	Spectroscopie ATR FT-IR.....	116
4.10	Spectroscopie Raman	116
4.11	Résonance paramagnétique électronique	117
4.12	HYSORE.....	117
4.13	Tests catalytiques (analyse spectrophotométrique)	118
4.13.1	Substrat : 4-Nitrophenyl β-D-galacto-pyranoside (S).....	118
4.13.2	Substrat : 2,6-diméthoxyphénol (DMP).....	118
4.13.3	Tests catalytiques, oxydation de la DMP suivie par HPLC analytique	119
4.14	Synthèse des dérivés du deferasirox.....	119
4.14.1	2- (2-Hydroxyphenyl)-4 H-1, 3-benzoxazin-4-one ^{163,145}	119
4.14.2	Acide 4-[3,5-Bis (2-hydroxyphenyl)-1, 2, 4-triazol-1-yl] benzoïque ^{163,145}	120
4.14.3	N-(2-aminoethyl)-4-(3,5-bis (2-hydroxyphenyl)-1 H-1, 2, 4-triazol-1-yl) benzamide ^{47,47,164}	120
4.15	Synthèse des dérivés de la 8-hydroxyquinoléine	121
4.15.1	5-(chlorométhyl)quinolin-8-ol ¹⁶⁵	121
4.15.2	((8-hydroxyquinolin-5-yl) méthyl) proline ^{153,166}	122

4.15.3	5-(aminomethyl) quinolin-8-ol ¹⁵¹	123
4.16	Synthèses peptidiques.....	123
4.16.1	H ₂ N-WKWLKKWIKG-NH ₂ ⁴⁷	123
4.16.2	H ₂ N-IRIRIRIG-NH ₂ ⁴⁷	124
4.16.3	H ₂ N-WKWLKKWIKG-OH ^{167,154}	124
4.17	Fonctionnalisation des peptides en N-ter	125
4.17.1	DFX-WKWLKKWIKG-NH ₂ et DFX-WKWLKKWIKG-OH	125
4.17.2	DFX-WKWLKKWIKG-NH ₂ ⁴⁷	125
4.17.3	DFX-IRIRIRIG-NH ₂ ⁴⁷	125
4.17.4	DFX-WKWLKKWIKG-OH ^{154,167}	126
4.17.5	8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂ et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-OH	126
4.17.6	8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂ ⁴⁷	126
4.17.7	8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-OH ⁴⁷	127
4.18	Fonctionnalisation des peptides en C-ter.....	128
4.18.1	DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX ¹⁵⁵	128
4.18.2	8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ ¹⁵⁵	128
4.19	Caractérisation des PAM, L-PAM et L-PAM-L par LC-MS.....	129
4.20	Préparation des solutions stock de Fe ^{II} et Ga ^{III}	130
4.21	Titration spectrophotométrique des ligands et de leurs complexes en fonction du pH	130
4.22	Titration spectrophotométrique des L, L-PAM, L-PAM-L et du surnageant de culture de PA01 WT avec du Fe ^{III} ou Ga ^{III}	130
4.23	Compétition entre deux ligands : à partir des complexes de Ga ^{III} et Fe ^{III} en présence de DFO B... ..	130
4.24	Détermination des conditions de formation des polymères de coordination	131
4.25	Immobilisation du polymère dans un gel d'agarose	132
4.26	Immobilisation du polymère dans une cassette de dialyse	132
4.27	Tests de relargage des polymères de coordinations	132
4.27.1	Gel d'agarose (DFO B) :	132
4.27.2	Gel d'agarose (surnageant PA01 WT) :	133
4.27.3	Cassette de dialyse (surnageant PA01 WT) :	133
4.27.4	Gel d'agarose (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> en culture) :	133
4.28	BIBLIOGRAPHIE	136
5	ANNEXES.....	147
5.1	Chromatogramme HPLC analytique chapitre 1	149
5.2	Chromatogramme HPLC analytique Chapitre 2	154
5.3	Spectre RMN du protons (¹ H) des différents ligands synthétisés	159
5.4	Spectre RMN du carbone (¹³ C) des différents ligands synthétisés.....	162

LISTE DES ABRÉVIATIONS

HPLC	Chromatographie liquide haute performance
RP	Phase inverse
UHPLC	Chromatographie liquide ultra haute performance
RPE	Résonance Paramagnétique électronique
HYSCORE	Spectroscopie de corrélation des sous-niveaux hyperfins
ESI	Ionisation électro spray
MET	Microscopie électronique à transmission
ATR FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à réflectance totale atténuée
MS	Spectrométrie de masse
LCQ	Chromatographie liquide Quadripôle
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
ICP-MS	Plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
pH	Potentiel Hydrogène
TIS	Triisopropylsilane
ACN	Acétonitrile
Asc ^{•-}	Radical ascorbyl
AscH ⁻	Ascorbate
RSH	Thiol
RSSR	Pont disulfure
DCM	Dichlorométhane
Ac ₂ O	Anhydride acétique
DIC	Diisopropylcarbodiimide
TFA	Acide trifluoroacétique
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-Diméthylformamide
Fmoc	Groupe protecteur fluorenylméthoxycarbonyl
Oxyma	Cyanohydroxyiminoacétate d'éthyle
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
SOCl ₂	Chlorure de thionyle
EtOH	Éthanol
NEt ₃	Triéthylamine
HCl	Acide chlorhydrique
Et ₂ O	Éther diéthylique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
MeOH	Méthanol
HCHO	Formaldéhyde
NaCl	Chlorure de Sodium
DFX	Deferasirox
8HQ	8-Hydroxyquinoléine
CO ₃ ²⁻	Ion carbonate
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
AcU	Acétate d'uranyle
K-Oxyma	Éthyl cyanoglyxylate-2-oxyme, sel potassique
HSAB	Hard soft acid base
pFe ³⁺	Potentiel ions Fe ³⁺
LPMO	Lytique polysaccharide monooxygénase

LCHMO	Lytique chitine monooxygénase
MAR	Métalloenzymes artificiels
ADN	Acide désoxyribonucléique
LmrR	Régulateur de transcription multidrogue
ATP	Adénosine triphosphate
DMP	2,6-diméthoxyphén-1-ol
DCFH-DA	Dichloro-dihydro-fluorescéine diacétate
DCFH	Dichloro-dihydro-fluorescéine
DCF-DA	Dichloro-dihydro-fluorescéine diacétate
DCF	Dichloro-fluorescéine
AIP-1 = (P-)	Ac-EFFAAE-NH ₂
AIP-2 = (P+)	Ac-KFFAAK-NH ₂
Rpm	Rotation par minute
S	4 nitrophényl-β-D-galactopyranoside
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
DFO B	Desferrioxamine B
K _{sp}	Constante du produit de solubilité
PBP	Protéines de coordination du périplasme
PAMR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant
PDB	Proteins data bank
CSαβ	Défensines provenant d'un insecte
ΔΨ	Potentiel transmembranaire
LL-37	PAM naturelle
KL-12, KR-12	PAM synthétique dérivé de LL-37
GLK-19	PAM synthétique
HAP	Hydroxyapatite
LMCT	Transfert de charge du ligand vers le métal
MLCT	Transfert de charge du métal vers le ligand
LLCT	Transfert de charge du ligand vers le ligand
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
ε	Coefficient d'extinction molaire
PA01 WT	Souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sauvage
PA01 ΔpvdFΔpchA	Souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> déficiente en pyochéline et pyoverdine
DL ₅₀	Dose létale médiane
MIC ₁₀₀	Concentration minimale d'inhibition totale
TfRs (TfR1, TfR2)	Récepteur de la transferrine
DMT1	Transporteur de métaux divalent
ARN	Acide ribonucléique
RyhB	Régulateur ARN du fer (en cas de carence)
Fur	Régulateur de la capture du fer
TBDTs	Protéines de coordination du périplasme
Transporteur ABC	Transporteur a cassette liant l'ATP
CAA	Milieu bacto casaminoacide
DMSO-d ₆	DMSO deutéré
Fe ^{II} (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	Sels de Mohr
Pi	Tampon phosphate inorganique
CuCl ₂	Chlorure de cuivre
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
ESKAPEE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acitenobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tenais à remercier les membres du jury : Dr Nicolas Delsuc, Dr Olga Iranzo et Dr Fouzia Boulmedais, qui ont accepté avec enthousiasme d'évaluer mes travaux, et plus particulièrement Dr Fouzia Boulmedais pour avoir également participé au jury de mi-thèse.

J'aimerais également remercier tous les collaborateurs, sans qui tout ce travail n'aurait jamais pu être réalisé :

Merci aux Dr. Bertrand Vileno et Dr. Nolwenn Le Breton pour les analyses RPE, leurs expertises, leur patience ainsi que leur gentillesse. Vous m'avez beaucoup appris et beaucoup aidé et je vous en suis reconnaissant.

Merci aux Dr. Youssef El Khoury et Pr. Petra Hellwig pour les analyses IR, ainsi que pour l'aide précieuse lors de l'interprétation des résultats, mais également pour votre accueil au sein de votre laboratoire.

Merci aux Dr. Isabelle Schalk à Sarah Fritsch et Véronique Gasser, pour les tests de MIC₁₀₀ réalisés sur *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que de m'avoir permis d'assister au déroulement de ceux-ci. J'aimerais également remercier Dr. Gaétan Mislin pour avoir accepté de participer à mon jury de mi-thèse.

Merci à Valérie Demais pour les nombreux créneaux de MET mis à notre disposition ainsi que pour ta bonne humeur.

J'aimerais également remercier Bruno Vincent et Maurice Coppe du service RMN pour leur accueil toujours chaleureux et leur aide.

Merci à Georges et Antoine du magasin de chimie pour votre gentillesse et votre humour. Grâce à vous, aller faire les « courses » n'a jamais été aussi amusant.

Ho grand chef suprême, je n'ai pas les mots pour te témoigner ma gratitude. Je te dois mon avenir scientifique. Tu m'as sortie d'une situation difficile, tu m'as aidé quand j'en avais le plus besoin en me donnant du travail, en m'aidant à me relever, mais surtout en croyant en moi. Tu m'as appris à ne pas abandonner, et pour cela, je te serais éternellement reconnaissant. Tu as un super pouvoir, peu importe la personne en face de toi, son caractère ou son tempérament tu trouveras toujours le moyen d'en tirer le meilleur. Les discussions scientifiques que nous avons eues au long de ces cinq années ont été très enrichissantes, d'une aide précieuse et passionnante. Encore une fois je te dis merci du fond du cœur Peter, je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi !

Merci (et bravo) Vincent ! Tu as réussi à me supporter pendant cinq ans. Tu m'as énormément aidé, aussi bien scientifiquement qu'humainement. Ces cinq années n'ont pas été faciles pour l'un comme pour l'autre, mais ce fut une magnifique aventure et je t'en suis reconnaissant. PS : Tes bonjours du matin et les apéros du labo me laisseront un souvenir intarissable et vont très vite me manquer !

Merci Laurent, pour ta bonne humeur, ton humour et surtout ton comique de répétition ! Merci de m'avoir fait rire aux larmes quand j'en avais besoin, vous savez tous à quel point c'est vital pour moi. Surtout, ne change pas, reste ce « grand enfant » toute ta vie.

Merci Angélique pour toute l'aide que tu m'as donnée, aussi bien pour la synthèse que pour la rédaction, mais aussi pour les excellentes pâtisseries que tu ramenaient au labo, ta bonne humeur et ton sourire.

J'aimerais remercier toute l'équipe du BCB, Mickael, Katharina, Merwan, Susheela, Paulina, Alice, Rayan, Lucie, Korelly et tous les stagiaires pour tous les bons moments passés ensemble et pour le soutien à toute épreuve dont vous avez fait part. On est tous dans le même bateau et on s'est serré les coudes. Travailler avec vous a été un véritable plaisir et je le referais sans aucune hésitation.

J'aimerais plus particulièrement remercier Maxime, mon copain de galère, de champi, de Pokémon, et j'en passe et des meilleurs. Merci d'avoir supporté mon mauvais caractère pendant 3 ans. Merci de m'avoir aidé et soutenu. Merci pour ton expertise informatique qui a été salvateur, particulièrement pendant la rédaction. Merci pour toutes tes petites attentions et pour tous les moments qu'on a passés ensemble. J'ai gagné plus qu'un collègue, mais un vrai ami et tu vas cruellement me manquer.

A ton tour maintenant Enrico, grazie pour toute l'aide que tu m'as donnée. Tu m'as aidé plus que de raison, aussi bien scientifiquement que moralement. J'ai toujours pu compter sur toi et je t'en remercie. Tes blagues vont me manquer, et merci pour ton initiation à cette magnifique langue qu'est l'italien !

Un pazzo ne fa cento.

Thanks a lot Nina for everything, you taught me a lot and I really enjoyed working with you. I also liked a lot aperos with polish vodka! za twoje zdrowie!

J'aimerais remercier Nicolas et Batiste pour tous les bons moments partagés et l'aide durant les deux années de master.

Un grand merci du fond du cœur à Morgane et Elodie pour m'avoir aidé et soutenu durant toutes les années de fac, ces années de dur labeur, on les a passées ensemble. Sans vous, je n'aurais pas donné cher de ma peau. Ces quelques années qui font partie des meilleurs souvenirs de ma vie, merci. Ne t'inquiète pas Véro je ne vais pas t'oublier ! Certes, tu n'es arrivé qu'en Master, mais c'est comme si tu avais toujours été là. Merci pour tout Raphaël. Pour l'aide, les bons moments autour d'une bière et surtout merci d'avoir apporté une touche masculine supplémentaire dans notre groupe de travail.

J'aimerais remercier l'amicale de chimie ALCANES et tous ces amicalistes qui m'ont permis de rencontrer énormément de personnes des quatre coins de la planète, mais qui m'a également permis de trouver un lieu pour évacuer la pression quand c'était nécessaire. La plupart de mes meilleurs souvenirs de fac se sont déroulés dans cette cafétéria.

Merci à Kevin et Joefrey pour leur amitié qui dure depuis plus de 25 ans. On a fait les 400 coups ensemble. Merci d'avoir été ma soupape de sécurité quand j'étais trop sous pression, merci pour toutes ces balades et ce bon temps passer ensemble. Et surtout merci de m'avoir fait penser à autre chose que la science !

J'aimerais aussi remercier Claire qui a été un soutien très important pour moi.

Merci Eloy d'être toi et surtout ne change pas. Je pense, sincèrement que personne dans cet univers n'est capable d'imaginer une personne telle que toi. Tu es le dernier vestige de nos années de lycée. Merci d'être resté aussi longtemps à mes côtés. Je te souhaite le meilleur pour ton aventure en Nouvelle-Calédonie et j'espère vraiment que tu t'épanouiras là-bas.

Maman, papa, Catherine, Gauthier et Quentin, j'aimerais vous remercier pour tout le soutien dont vous avez fait preuve sans jamais faiblir et pourtant je vous en ai fait voir de toutes les couleurs, les dures années à l'école, les disputes entre frangins et frangine, le sport-étude (rugby), la perte de poids, Genève et finalement la thèse. Vous avez toujours été là. Je vous aime de tout mon cœur et aurais toujours une pensée pour vous tous. Malgré le fait que vous n'ayez jamais compris la chimie,

vous avez toujours fait l'effort de m'écouter parler de ma passion pendant des heures à n'importe quelle heure du jour ou de la nuit. Merci pour votre amour et pour votre contribution à me rendre meilleur.

Merci, parrain et tatie, pour votre aide, vous m'avez beaucoup plus aidé que vous ne l'imaginez. Merci de m'avoir fait découvrir le plaisir de manger des bonnes choses. Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance, merci tatie pour les paroles toujours réconfortantes quand j'étais triste.

Merci, parrain, pour tout le temps que tu m'as consacré, ça a toujours été spécial entre toi et moi et ça le restera, c'est un peu comme si j'avais eu la chance d'avoir deux papas !

Merci Capucine de me supporter depuis 7 ans et surtout de continuer à le faire. On a vécu énormément de choses et on s'en est toujours relevés. Tu es la personne qui me connais le mieux, que ce soit les bons ou les mauvais cotés, tu as toujours été d'un soutien sans faille et bienveillante. Tu m'as encouragé quand il le fallait, tu m'as aidé à passer les moments les plus difficiles de ma vie et tu es toujours là. Tu m'as accepté comme j'étais sans tenir compte de mes défauts. Tu as la tête dure, mais le cœur tendre et c'est pour ça que je t'aime. Merci aussi de m'écouter quand j'en ai besoin, merci pour tes conseils souvent avisés et de partager ma vie quotidiennement. Il y a peu de personnes sur qui je peux compter et tu en fais partie, encore une fois merci et je t'aime.

LISTE DES PUBLICATIONS

How trimerization of CTR1 N-terminal model peptides tunes Cu-binding and redox-chemistry DOI: 10.1039/d0cc04693k, Thibaut Galler, Vincent Lebrun, Laurent Raibaut, Peter Faller and Nina E. Wezynfeld, The royal Society of chemistry, ChemComm 56, 2020, 12194–12197

PREAMBULE

Durant les trois années de thèse, les travaux se sont orientés autour de deux axes de recherche. Le premier axe de recherche vise au développement d'un catalyseur d'oxydation hétérogène inspiré par une enzyme à cuivre, la lytique polysaccharide monooxygénase (LPMO), capable d'oxyder une liaison C-H. Le second axe de recherche vise à développer et étudier un système à relargage de peptides antimicrobiens uniquement en présence de bactéries. Ces deux sujets possèdent comme point commun l'utilisation d'une architecture peptidique bio-inspirée ainsi que l'utilisation d'ions métalliques.

Dans le premier sujet, l'ion cuivre est utilisé à des fins catalytiques (tel que l'oxydation, l'hydrolyse et transfert électronique). Nous avons tenté de reproduire le site catalytique de la LPMO avec une paire de peptides capables de s'autoassembler en feuillets β antiparallèles (même structure que dans le site actif de l'enzyme), comme support au site de coordination du cuivre.

Dans le second sujet, l'ion fer est utilisé. Dans un premier temps il possède un rôle structural, pour maintenir la cohésion du système de relargage. Il possède également un second rôle, c'est l'élément qui permet le relargage du principe actif, par le biais du système d'acquisition du fer chez la bactérie : la sécrétion de sidérophores. Un peptide antimicrobien est ici fonctionnalisé par des ligands affins pour le Fe^{III} (ou le Ga^{III}) pour produire un polymère de coordination relié par le biais du fer et des ligands.

Malgré les nettes différences de nature, d'objectif et d'expertise, les éléments utilisés pour parvenir au développement des deux projets sont de la même origine et démontrent la versatilité de l'utilisation de peptides, mais également des métaux de manière générale.

Les deux sujets traités étant si différents, ce manuscrit de thèse est découpé en deux chapitres distincts, avec leur propre introduction présentant tous les aspects nécessaires à la compréhension de chaque problématique.

CHAPITRE 1

1.1 INTRODUCTION

1.1.1 Cuivre

Le cuivre est un élément indispensable au bon fonctionnement de notre organisme. De plus, il représente 0,0068 % de la masse totale dans la croûte terrestre. L'atome de cuivre est composé de 29 électrons, il est présent majoritairement aux degrés d'oxydation Cu^I et Cu^{II} en biologie, avec pour configurations électroniques respectives $[\text{Ar}] 3d^{10}$ et $[\text{Ar}] 3d^9$. Dans des conditions aérobies et autour du pH neutre, le Cu^I n'est pas stable et a tendance à s'oxyder rapidement en présence de dioxygène, et se dismuter en Cu^0 et Cu^{II} en conditions anaérobies. C'est pourquoi, pour avoir un complexe du Cu^I stable en solution aqueuse, les ligands sont essentiels afin de stabiliser l'ion (ex thiolates, thioethers, etc.).¹⁻³

Les complexes de Cu^{II} possèdent une particularité géométrique : la liaison entre les ligands axiaux et le cuivre est allongée (liaison plus faible) alors que les ligands équatoriaux sont plus rapprochés du cuivre (liaison plus forte) en comparaison à une géométrie octaédrique classique. Cette particularité est due à l'effet Jahn Teller (Figure 1), amenant à différentes géométries en fonction des ligands coordonnés, tels que plan carré, pyramidal à base carrée et bipyramidal à base carrée. Cet effet favorise aussi l'échange de ligands dans les positions axiales du complexe de Cu^{II} .¹

Le Cu^I quant à lui étant d^{10} , il ne bénéficie pas de stabilisation par le champ des ligands et adoptera une géométrie linéaire, tétraédrique ou encore trigonale, qui sont des espèces avec peu de ligands, dont la géométrie est principalement régie par les contraintes stériques.⁴

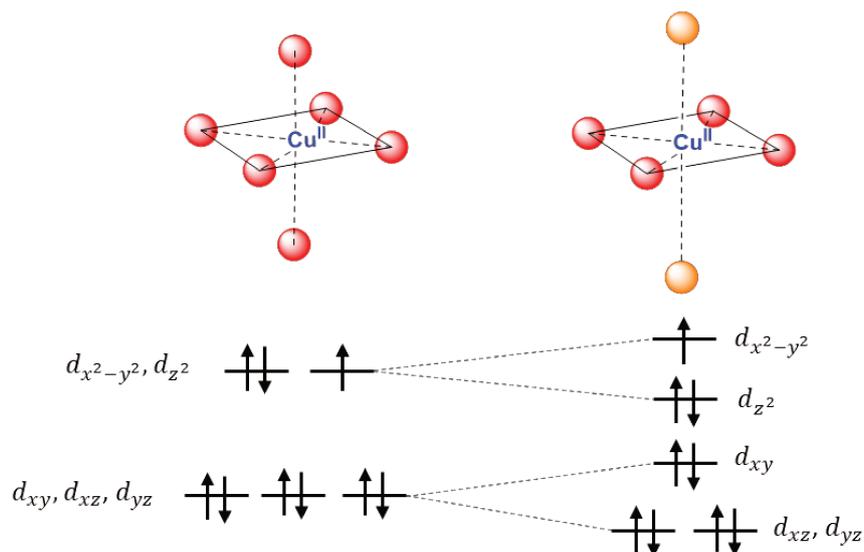


Figure 1 : Effet Jahn Teller pour le cuivre : levée de dégénérescence par l'effet Jahn Teller, géométrie et remplissage des couches électroniques.

Les deux degrés d'oxydation du cuivre (Cu^I et Cu^{II}) ci-dessus présentent un ratio charge/rayon différent. Cette information permet la classification des ions selon la classification de Pearson HSAB (dur et mou, acide et basique). En effet, le Cu^I possède une charge diffuse et est considéré selon la théorie HSAB comme mou. Cette particularité nous informe sur les ligands protéiques les plus aptes à stabiliser le Cu^I : les thiolates ou les thioéthers. Le Cu^{II} , quant à lui, possède une dureté/mollesse intermédiaire, c'est pourquoi il préfère les atomes N et O pour se coordiner, comme les amines, les acides carboxyliques, les histidines, etc.⁵

Les organismes vivants utilisent cet élément à des fins catalytiques, pour sa capacité à changer de degré d'oxydation dans une vaste plage de potentiels (de -0,4 à 0,8 V à pH 7 pour $\text{Cu}^{II}/\text{Cu}^I$), modulable par le biais

des ligands coordonnés sur le métal et leurs géométries. Les deux états du cuivre ayant des géométries très différentes, le défi pour le vivant a été de développer des ligands permettant un cycle redox efficace du cuivre (cycler efficacement entre Cu^{II} et Cu^{I}) ou au contraire, totalement supprimer les capacités redox du cuivre (transport). Pour le transport, le cuivre doit également être cinétiquement labile afin de pouvoir être échangé facilement entre le transporteur extracellulaire et son récepteur/transporteur transmembranaire afin d'être acheminé à l'intérieur de la cellule.^{4,6}

1.1.2 Génération de stress oxydant par le cuivre

Le couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ ayant un potentiel de réduction de 0,16 V, il peut également catalyser la formation de ROS à partir de dioxygène, comme le fer, mais avec un mécanisme légèrement différent. Tout comme le fer, le cuivre a besoin de la présence d'un réducteur (tel que l'ascorbate (AscH^-) ou un thiol comme le glutathion dans les organismes vivants) afin de pouvoir cycler entre les deux états d'oxydation du cuivre pour générer des ROS (Figure 2). C'est pourquoi le cuivre est systématiquement coordonné à un ligand permettant de moduler ses propriétés, inerte pour le transport dans l'organisme, afin d'éviter la production de ROS ou facilitant les échanges électroniques, afin de réaliser de la catalyse ou du transport d'électron. La régulation du cuivre dans le corps est essentielle et finement régulée, pour empêcher la présence de cuivre libre dans notre organisme.^{3,6,7}

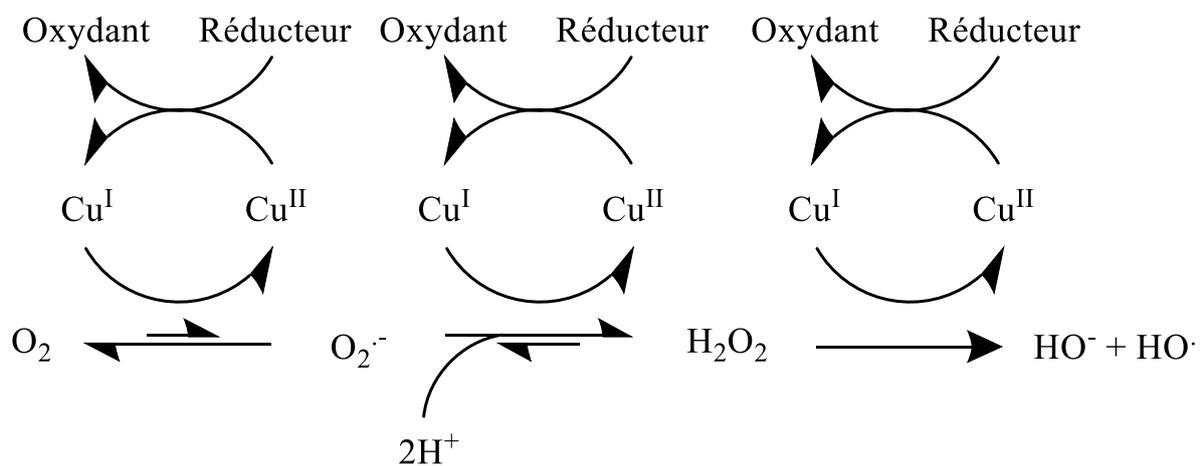


Figure 2 : Mécanisme de production des ROS avec le cuivre (type Fenton). Réducteur/Oxydant = $\text{AscH}^-/\text{Asc}^{\cdot -}$ ou RSH/RSSR

1.1.3 Les métalloenzymes à cuivre

L'émergence des enzymes à cuivre est intimement liée à l'augmentation drastique du dioxygène présent dans notre atmosphère. En effet, lors du « Great oxidation event », une augmentation majeure de la concentration en dioxygène a conduit à l'oxydation du Fe^{II} des océans en Fe^{III} .⁸ Or, le Fe^{III} forme très rapidement des oxydes de fer fortement insolubles, le rendant beaucoup moins biodisponible, contrairement au cuivre, qui lui s'est retrouvé oxydé du Cu^{I} (Cu_2S fortement insoluble) en Cu^{II} , une espèce nettement plus soluble.⁹ C'est pourquoi les organismes aérobies ont développé des stratégies d'utilisation du cuivre tout en conservant les enzymes à fer déjà développées. De plus, les organismes anaérobies, n'étant pas en contact avec le dioxygène, ils n'ont pas eu la nécessité de développer des enzymes à cuivre. C'est pourquoi il existe très peu d'enzymes à cuivre développées par les organismes anaérobies, mais une forte conservation d'enzymes à fer.³

1.1.3.1 Les différentes familles de métalloenzymes à cuivre

Les protéines utilisant le cuivre comme cofacteur sont classées dans différentes familles et sont catégorisées par le type de ligands qui les composent, la géométrie du centre métallique et le nombre d'ions de cuivre composant le site catalytique (Tableau 1).^{4,10}

Site (Cu)	Nb Cu	Géométrie	Fonction	Exemple type	Ligands
Type I : Classe I	1	Tétraécoordiné	Transfert e ⁻ - photosynthèse	Plastocyanine	Cu (N _{HIS}) ₂ (S _{Cys}) (S _{Met})
Type I : Classe II	1	Tétraédrique	Transfert e ⁻ - procaryote et eucaryote	Umecyanine	Cu (N _{HIS}) ₂ (S _{Cys}) (O _{Glu})
Type I : Classe III	1	Bipyramide à base trigonale	Transfert e ⁻ - respiration	Azurine	Cu (N _{HIS}) ₂ (S _{Cys}) (S _{Met}) (O _{Gly})
Type II	1	Pyramide à base carrée	Réduction O ₂ ⁻ (H ₂ O ₂) Oxydation O ₂ ⁻ (O ₂)	Cu, Zn SOD, monooxygénase	- Cu (N _{HIS}) ₄ H ₂ O - Cu (N _{HIS}) ₂ (S _{Met})
Type III	2	Bipyramide à base trigonale	Transport du O ₂	Hémocyanine	[Cu (N _{HIS}) ₃] ₂
Cu _A	2	Tétraédrique	Réduction O ₂ en H ₂ O	Cyt C oxydase	μ(S _{Cys}) ₂ [Cu (N _{HIS}) (S _{Met})] [Cu (N _{HIS}) (O _{Glu})]
Cu _B	1	Pyramide à base trigonale	Réduction O ₂ en H ₂ O	Cyt C oxydase	Cu (N _{HIS}) ₃
Cu _Z	4	Tétraédral	Réduction NO ₂ ⁻ en N ₂	NO ₂ réductase	μS ²⁻ [4Cu (N _{HIS}) ₇ O (?)]

Tableau 1 : Tableau regroupant tous les différents types de protéines à cuivre avec leurs géométries, les ligands coordonnés ainsi que leur fonction.⁴

Le type I (T1Cu ou « blue copper proteins »)

C'est le groupe le plus étudié et caractérisé dans la littérature. La majorité des représentants de ce groupe réalise des réactions de transfert électronique (ex. cupredoxine). La différence entre les 3 classes de protéines de type I varie simplement par la géométrie du site de coordination ainsi que les résidus coordonnés.⁴

Le type II (T2Cu)

Ce type d'enzyme réalise principalement des réactions d'oxydoréduction (oxydoréductases) permises par la morphologie du site catalytique.⁴

Le type III (T3Cu)

Les enzymes composant cette famille possèdent un centre à cuivre binucléaire et sont le plus souvent impliquées dans des réactions d'oxydation ainsi que pour le transport d'oxygène (ex. hémocyanine).⁴

Les types Cu_A et Cu_B

Ces types de sites sont retrouvés dans le cytochrome C oxydase (CcO), une protéine multidomaine qui catalyse la réduction du dioxygène en eau en tant qu'accepteur final d'électron de la chaîne respiratoire. Cu_A est hypothétiquement considéré comme accepteur d'électron (qui le transmettra à l'hème) tandis que Cu_B serait engagé dans la coordination du dioxygène lors de l'étape de transfert électronique de l'hème.⁴

Le type Cu_z

Ce type de site a été découvert récemment et est présent dans la nitrite réductase, dont le fonctionnement n'est pas encore parfaitement compris.⁴

Toutes ces classes regroupent toutes les enzymes à cuivre connues à ce jour. Nous allons nous intéresser de plus près au type II. Cette famille regroupe la plus grande diversité de structure et d'activité. Nous allons parler d'une enzyme découverte en 2010, la monooxygénase lytique de polysaccharides qui dégrade les polysaccharides (cellulose, chitine).⁴

1.1.4 Monooxygénase lytique de polysaccharides (LPMO)

Les composés lignocellulosiques sont les composants majoritaires de la paroi des cellules végétales et possèdent un fort potentiel comme matériaux bruts renouvelable pour la production de biocarburant de seconde génération.¹¹ Cependant, certains polymères lignocellulosiques sont difficiles à hydrolyser et induisent un surcoût lors de la production de biocarburants basés sur cette méthodologie.¹² Le clivage hydrolytique des biopolymères lignocellulosiques par les cellulases (endoglucanase, exoglucanase et β -gluconidase) est la première étape fondamentale pour la production de biocarburant. Cette dégradation est réalisée par un cocktail d'enzymes sur la cellulose, les endoglucanases permettent un clivage des zones amorphes de la cellulose (pas besoin d'extrémité pour initier la catalyse), les exoglucanases servent à produire du glucose ou de la cellobiose en coupant à une extrémité d'un polysaccharide, et les β -gluconidases servent à hydrolyser la cellobiose en glucose.^{11,13}

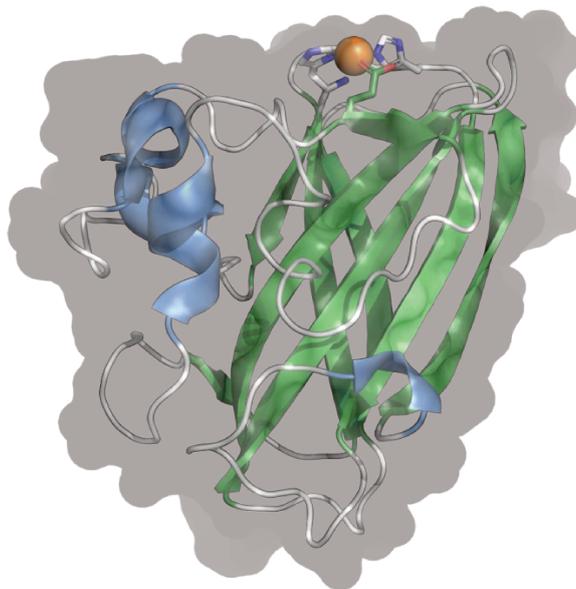


Figure 3 : Structure de la lytique chitine monooxygénase (LCHMO) d'*Enterococcus faecalis* (PDB : 4alc)¹¹

Une famille d'enzyme appelée monooxygénase lytique de polysaccharides (Figure 3), est capable de dégrader, via un mécanisme oxydant cette fois, la cellulose, mais également la chitine, l'amidon ou encore le xylane qui sont des polymères connus pour être difficiles à dégrader.¹² C'est une monooxygénase pouvant être assimilée aux protéines à cuivre de type II (activation du dioxygène) tout en possédant une coordination spécifique et hautement conservée. Elle permet de cliver le polysaccharide par oxydation, aléatoirement dans le polymère (ex. même au milieu) et non aux extrémités du polymère (réduits ou non). Cette oxydation a pour effet de rompre la liaison sucre-sucre et ainsi former de nouveaux fragments dégradables par une exoglucanase et ainsi accélérer le processus de dégradation (augmente le nombre d'extrémités de polysaccharides).^{12,14}

1.1.4.1 Site de coordination des LPMO (résidu conservé)

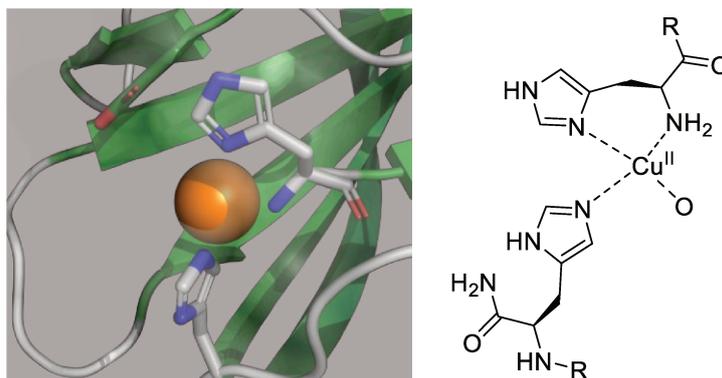


Figure 4 : Site catalytique de la LCHMO d'*Enterococcus faecalis* (PDB code 4ALC) appelé « Histidine Brace »¹¹

La sphère de coordination du cuivre est composée de l'amine N-terminal de la 1^{re} histidine, un azote (N^π) du cycle imidazole de ce même acide aminé, ainsi que de la chaîne latérale de l'His 68 (N^π). Ils forment ainsi un « T », et ce type de géométrie a été nommé « Histidine Brace » et est hautement conservé chez toutes les LPMO connues à ce jour (Figure 4).¹⁵

Il existe plusieurs LPMO différentes, pouvant être différenciées par leurs aspects structuraux (résidus coordonnés au cuivre). Trois types structuraux peuvent être identifiés : les LPMO avec un résidu tyrosine coordonné (en plus des résidus formant le site « histidine brace »), les LPMO avec un résidu glutamate coordonné et finalement la structure que dont nous allons nous inspirer, les LPMO avec uniquement la coordination « histidine brace ». ¹⁶

1.1.4.2 Réaction catalysée par les LPMO

Cette enzyme possède un fort intérêt chimique. En effet, elle permet de dégrader efficacement les polysaccharides. Elle est actuellement présente dans les cocktails enzymatiques utilisés en bioraffinerie industrielle.¹⁷

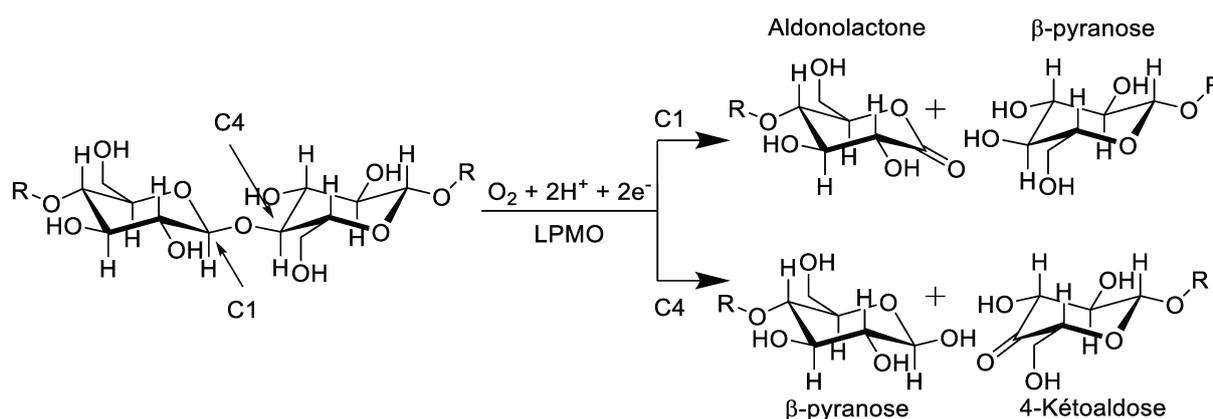


Figure 5 : Réaction d'oxydation d'un polysaccharide catalysée par la LPMO¹¹

La LPMO catalyse la dégradation des polysaccharides par le biais d'une monoxygénation du polysaccharide soit sur le carbone anomérique C1, afin d'obtenir une aldolactone et un β-pyranose (Figure 5 : flèche du haut C1), ou sur le carbone C4, pour obtenir un β-pyranose et un 4-kétoaldose sont produits (Figure 5 : flèche du bas C4).¹⁸

1.1.5 Comparaison catalyseur enzymatique et catalyseur organique

Les enzymes sont capables de positionner le substrat et l'activer par le biais de liaisons covalentes ou de stabiliser l'état de transition par le biais d'interactions de Van Der Waals ou de liaisons hydrogène et ainsi accélérer les réactions chimiques qu'elles catalysent. Les complexes métal/protéine ayant une activité catalytique sont appelés métalloenzymes. Elles sont responsables de la catalyse d'une très grande variété de réactions chimiques dans la cellule, et dans certains cas, des réactions très difficiles à mettre en œuvre au laboratoire (ex. synthèse d'acide gras, synthèse des terpènes ou encore la chimie des sucres).¹⁹ En effet, les propriétés les plus souvent rencontrées en catalyse enzymatique sont : (i) une excellente sélectivité de substrat même dans un milieu complexe (ii) une forte énantiosélectivité permettant de produire un composé chiral pur (iii), une régiosélectivité et une chimiosélectivité, permettant ainsi de former spécifiquement un produit par rapport à tous les autres dérivés qui peuvent être produits à partir du même substrat. C'est une prouesse qui est possible grâce à une reconnaissance précise du substrat par le site de liaison, ainsi que grâce aux ligands coordonnant l'ion métallique, car il permet un contrôle fin sur la réactivité de l'enzyme par modification du potentiel du métal du site actif. La seconde sphère de coordination joue également un rôle dans les propriétés du centre catalytique, avec un effet moindre que les ligands directement coordonnés à l'ion métallique.^{20,21}

En comparaison, les catalyseurs dits classiques (ex. catalyseur de Grubbs)²² sont de taille nettement plus modeste (petites molécules : taille et masse) et ainsi plus faciles et moins coûteux à produire et à utiliser, mais atteignent difficilement les sélectivités des enzymes, citées ci-dessus. De plus, ils sont essentiellement utilisés en solvants organiques.

Le développement de catalyseurs bio-inspirés tels que les métalloenzymes artificielles, permettrait de fusionner les caractéristiques d'un catalyseur classique et d'un catalyseur enzymatique : idéalement l'exceptionnelle sélectivité des enzymes, tout en ayant la facilité de production, d'utilisation ou encore le faible coût de production d'un catalyseur classique.²³

1.1.6 Catalyseur métallique artificiel bio-inspiré

Depuis une trentaine d'années, on observe une émergence de catalyseurs bioinspirés voulant reproduire l'activité des biocatalyseurs (enzyme) tout en l'appliquant sur des substrats utiles pour la chimie industrielle, et en utilisant une architecture moins complexe qu'une enzyme. Dans la littérature les catalyseurs bio-inspirés peuvent être très différents, autant dans leur composition (ex. catalyseur à base d'ADN ou à base de ligand organique) que dans le type de catalyse qu'il effectue (ex. oxydation, réduction, etc.).²⁴

La LPMO est une enzyme d'intérêt ayant fait l'objet de travaux consistant à développer un catalyseur basé sur cette enzyme (bioinspiré). On peut trouver dans la littérature deux catégories de ligand : les ligands synthétiques consistant à reproduire la catalyse de la LPMO en développant un ligand organique capable de reproduire la sphère de coordination du cuivre et ainsi reproduire l'activité de la LPMO.^{168, 169} La seconde catégorie et les ligands peptidiques, qui consiste à conserver le même type de molécules qui coordonne le métal (peptide) afin de reproduire l'activité de l'enzyme en simplifiant le ligand.^{170,171} Les métalloenzymes artificielles pouvant être assimilées à la catégorie des ligands peptidiques seront présentées plus en détails ci-dessous.

1.1.6.1 métalloenzymes artificielles

Les métalloenzymes artificielles (MAR) sont des catalyseurs hybrides dans lesquels un complexe de métal de transition catalytiquement actif est incorporé dans une biomacromolécule hôte telle qu'une protéine ou encore un acide nucléique. L'activité catalytique ainsi que la sélectivité sont majoritairement contrôlées par le ligand (première sphère de coordination) de l'ion métallique. Afin d'obtenir un catalyseur énantiosélectif, deux stratégies sont possibles tout en pouvant être complémentaires. La première stratégie est la ségrégation d'une face prochirale par rapport à une autre par le biais de blocage stérique, c'est-à-dire qu'une seule face du substrat est capable d'approcher le site actif de l'enzyme, afin d'être modifiée chimiquement. La seconde stratégie est habituellement réalisée par la seconde sphère de coordination qui va permettre, par le biais de liaison hydrogène et/ou d'interactions hydrophobes, de stabiliser l'état de transition pour un énantiomère par rapport à l'autre.^{23,25,26}

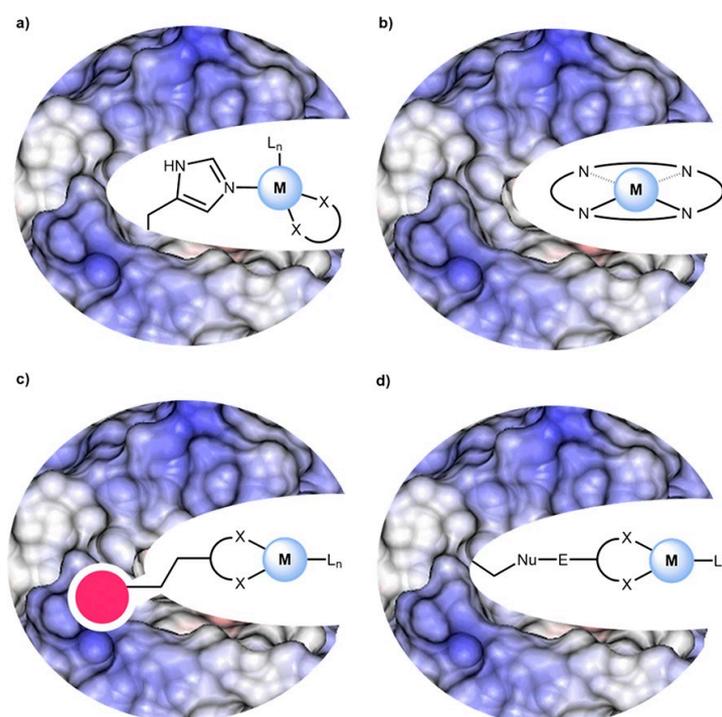


Figure 6 : Les quatre approches générales pour l'assemblage des MAR : a) Coordination dative avec un complexe métallique insaturé, b) Substitution métallique, c) Coordination supramoléculaire à l'aide d'une ancre à forte affinité, d) Immobilisation covalente. (Figure extraite de la référence²³)

Quatre stratégies d'assemblage des MAR sont utilisées (Figure 6). I) Par le biais d'interactions entre les acides aminés de la cavité et un métal avec une sphère de coordination insaturée via une liaison dative. II) Par remplacement de l'ion métallique natif de l'enzyme par un autre ion conférant ainsi une nouvelle activité catalytique à la protéine. III) Par ancrage d'un cofacteur métallique au sein d'une protéine utilisant un inhibiteur ou un substrat de haute affinité via des interactions supramoléculaires. IV) Par immobilisation covalente du cofacteur de manière irréversible dans la protéine hôte.^{23,26}

Les métalloenzymes artificielles bénéficient d'un grand intérêt de la part de la communauté scientifique, en effet, Kaiser et ses collaborateurs ainsi que Wilson et Whitesides, sont les premiers à avoir essayé de construire une MAR dans les années 1970.^{27,28} Cependant, ce n'est qu'après les années 2000 qu'un réel essor a été observé pour le développement de métalloenzymes artificielles, ce qui est certainement dû à la limitation des outils à disposition pour leurs synthèses et développement avant. Cette résurgence d'intérêt envers les MAR

peut également être expliquée par le potentiel catalytique de ces structures : combiner l'aspect sélectivité des enzymes avec la facilité d'utilisation des catalyseurs organiques classiques.^{23,26}

Une structure très intéressante pouvant servir de support pour le développement de catalyseurs bio-inspirés est les amyloïdes. Ils sont composés de peptide souvent courts s'autoassemblant sous forme de fibres par le biais de la formation de structures secondaires de type feuillet β parallèles ou antiparallèles (structure β croisée).²⁹ Ils ont été, entre autres, découverts dans les plaques amyloïdes chez les malades atteints d'Alzheimer.³⁰

Il existe également des amyloïdes catalytiques qui sont des catalyseurs basés sur une structure amyloïde, avec ou sans cofacteur. Les métaux sont des cofacteurs attractifs, afin de réaliser une catalyse (oxydation, hydroxylation).³¹ Ces structures catalytiques sont plus communément appelées métalloamyloïdes. L'utilisation de cette structure nous permettra de réduire l'objet catalytique à une taille minimum.

Les métalloenzymes artificielles connues peuvent catalyser les réactions suivantes : de réduction comme l'hydrogénation énantiosélective de cétone à l'aide d'une MAR dérivée de la lactoglobuline β bovine,²⁶ d'oxydation telle que la sulfoxydation énantiosélective à l'aide d'une MAR dérivée d'une peroxydase,³² d'hydratation comme par exemple l'hydratation d'une cétone α,β insaturés en utilisant une MAR dérivée du régulateur de transcription multidrogue (LmrR)³³ et les réactions de formation de liaisons C-C comme la transformation d'une lipase en une MAR appelée Heckase.³⁴

1.1.6.2 Métalloamyloïde

L'intérêt d'un design minimaliste réside dans la simplification maximum de l'enzyme cible tout en conservant son activité catalytique. Ceci permettrait de développer un catalyseur simple et bon marché et faciliterait également son utilisation. Afin de pouvoir réduire la taille de notre objet au minimum, il nous faut utiliser des peptides courts. Or, leur utilisation est limitée pour réaliser des complexes catalytiques, notamment par la flexibilité des peptides, ce qui empêche d'avoir un environnement bien défini autour du métal, et donc, d'avoir des sélectivités aussi fortes qu'avec les enzymes. Cependant, la particularité des peptides amyloïdes et l'autoassemblage en fibres qui leur permet de « verrouiller » leurs conformations et ainsi, nous permet de résoudre leurs défauts principaux en facilitant la coordination du cofacteur métallique.³¹

L'équipe du professeur Korendovych a développé un catalyseur se basant sur de précédentes recherches visant à développer des catalyseurs pouvant réaliser des réactions d'hydrolyse ou d'oxydation à base de cuivre et de peptide amyloïde.³¹ La conception se base sur des métalloamyloïdes à base de zinc.³⁵ Cependant, cette séquence est également capable d'accommoder d'autres métaux que le zinc, comme le cuivre (oxydation, réduction, transfert d'électron et hydrolyse).³⁶ Ce type de catalyseur métalloamyloïde est peu développé et constitue un domaine de recherche très innovant pouvant amener à la production d'une plateforme catalytique. Le professeur Korendovych est le contributeur principal dans ce domaine.

D'autres équipes travaillent sur l'utilisation des fibres amyloïdes comme ligand pour un métal permettant de catalyser une réaction. Les fibres amyloïdes peuvent servir à réaliser des réactions d'hydrolyse des phosphoesters,³¹ ou d'ATP,³⁷ et également des réactions d'oxydation^{29,38}. Elles peuvent également servir, comme démontré récemment, à catalyser une réaction de cyclopropanation par le biais du greffage d'une Fe-protoporphyrine IX sur les fibres amyloïdes.³⁹

En outre, certains amyloïdes présentent une activité catalytique dans des conditions extrêmes, telles qu'une température élevée, une forte teneur en sel et en solvant organique.⁴⁰ Ces propriétés très avantageuses font de l'amyloïde une plateforme attrayante pour la nature, qui pourrait l'avoir utilisée pour le développement d'enzymes prébiotiques. Cette théorie sur les mécanismes de l'origine de la vie, et l'implication actuelle d'une

His pour son l'activité catalytique est considérée comme problématique, car l'histidine est un acide aminé prébiotique rare.^{40,41}

Dans un premier temps, le meilleur peptide pour la catalyse a été sélectionné en testant une petite librairie de 16 peptides. La séquence peptidique est la suivante Ac-IHIIHQI-NH₂. Il forme des fibres en s'autoassemblant. Une fois ce peptide coordonné avec du zinc, il présente une activité hydrolytique. Il est également capable de former des feuillets β parallèles et catalyser l'oxydation du diméthoxyphénol (DMP) quand le site de catalyse est chargé en cuivre (Figure 7). L'avantage de l'utilisation du DMP comme substrat est qu'après oxydation, il dimérise et cette espèce est coloré. Elle absorbe aux alentours de 470 nm, permettant ainsi de suivre facilement l'oxydation du DMP par le catalyseur par spectrophotométrie.³⁶

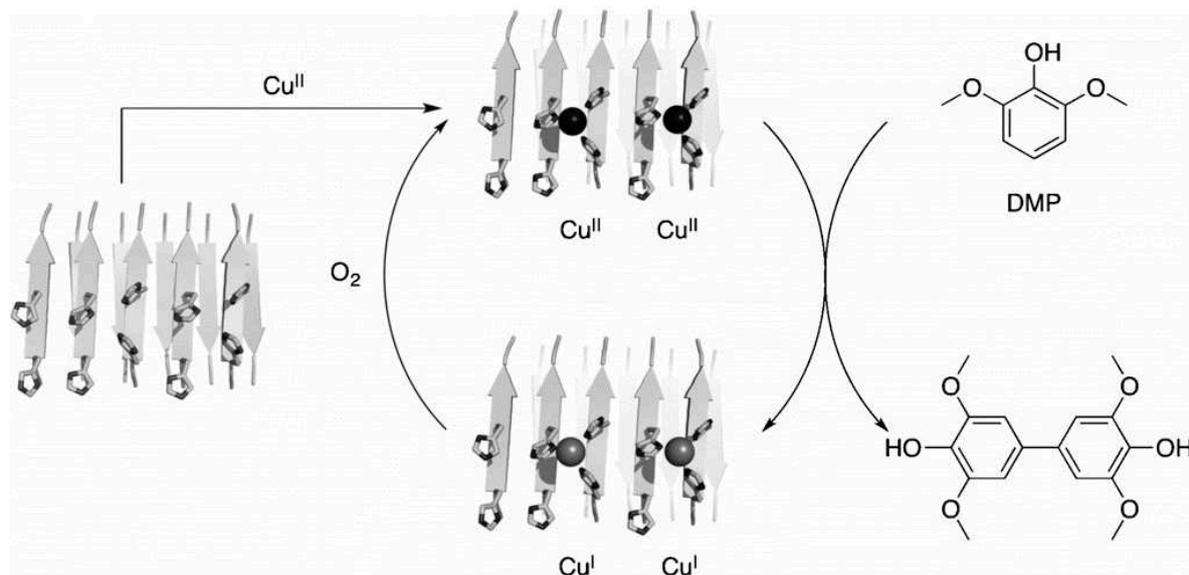


Figure 7 : Oxydation du diméthoxyphénol (DMP) par le dioxygène catalysé par des fibres peptidiques chargées en cuivre. (Figure extraite de la référence³⁶)

Cependant, pour développer un catalyseur capable d'activer le dioxygène, plusieurs points sont à respecter. Les ligands coordonnés au cuivre doivent être judicieusement choisis afin de correctement moduler le potentiel redox de l'ion métallique. Les ligands doivent être capables d'accommoder les différents états d'oxydation de l'ion métallique afin de pouvoir cycliser entre la forme oxydée et réduite de l'ion métallique et ainsi être capables de fournir ou capturer un électron du substrat. La catalyse ne doit pas être capable de laisser échapper des ROS dits « libre » (plus coordonné au cuivre) de manière non contrôlée, pour éviter la décomposition du ligand.

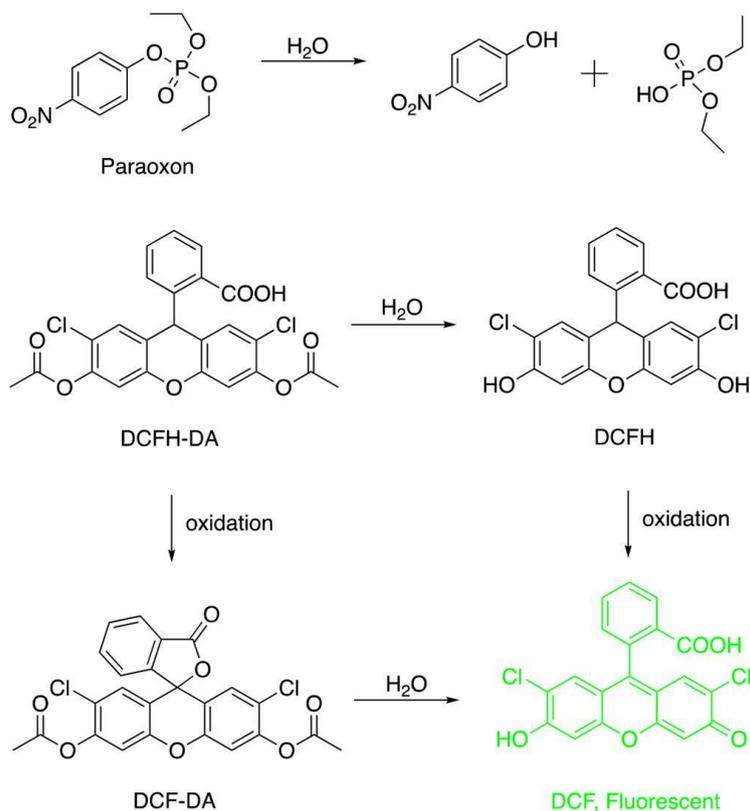


Figure 8 : Hydrolyse du paraoxon et une réaction tandem catalysée par un metalloamyloïde. (Figure extraite de la référence³¹)

Cette séquence peptidique a également été utilisée afin d'hydrolyser le paraoxon qui est un pesticide persistant dans l'environnement et très toxique, et également pour la réalisation d'une réaction en tandem. Celle-ci consiste à hydrolyser le dichloro-dihydro-fluorescéine diacétate (DCFH-DA) en dichloro-dihydro-fluorescéine (DCFH) puis à oxyder le DCFH en dichloro-fluorescéine (DCF) qui lui, étant fluorescent, peut être facilement suivi par fluorimétrie. Cette réaction en tandem peut également avoir lieu dans l'autre ordre, c'est-à-dire d'abord l'étape d'oxydation afin d'obtenir la Dichloro-dihydro-fluorescéine (DCF-DA) suivi par l'étape d'hydrolyse afin d'obtenir la DCF (Figure 8).³¹

Ces études démontrent le potentiel de l'utilisation d'une matrice amyloïde pour supporter des sites de catalyse, l'agencement particulier des peptides permet une promiscuité des sites de catalyse et ainsi une action synergique des deux types de catalyse réalisées par ce métal amyloïde (hydrolyse en tandem avec des réactions d'oxydation).³¹ Les outils nécessaires à la conception de notre catalyseur seront présentés dans la partie ci-dessous.

1.1.7 Vers un design minimaliste de mimes de LPMO

Le site catalytique de la LPMO étant supporté par des feuillettes β ,⁴² nous nous sommes naturellement tournés vers les séquences peptidiques les plus simples capables de former des feuillettes β antiparallèles comme support pour concevoir un mime de LPMO en suivant une approche minimaliste, rappelant les travaux de Korendovych.³¹

1.1.7.1 Feuillettes

Les feuillettes β forment une classe de structure secondaire composée de deux structures différentes, les feuillettes β antiparallèles et les feuillettes β parallèles (Figure 9).⁴³

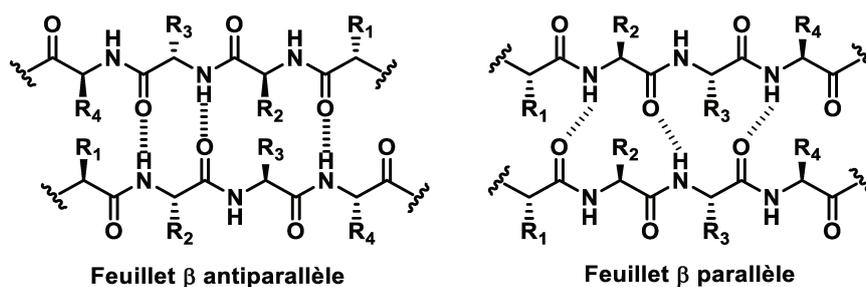


Figure 9 : Schéma d'un feuillet β antiparallèle (gauche) et parallèle (droite)

Le choix de la structure antiparallèle n'est pas anodin, car elle permet une fonctionnalisation des histidines à l'extrémité des peptides, en N-ter d'un premier peptide pour reproduire la pince coordinante du site « histidine brace » et en C-ter du second peptide, qui nous permet d'apporter l'autre ligand du site « histidine brace » sans autre groupement compétiteur de coordination. Le site de coordination du cuivre est donc préformé après autoassemblage des peptides en feuillets β antiparallèles.

Ces feuillets antiparallèles sont également plus stables grâce à un meilleur alignement des dipôles dans le feuillet. Les liaisons hydrogène sont plus courtes du fait que les NH et les CO de la chaîne peptidique sont alignés (induisant un décalage de séquence) et par conséquent, les feuillets sont plus stables, contrairement aux feuillets β parallèles où un angle est observé pour la liaison hydrogène, ce qui la rallonge, et donc nuit à la stabilité de la structure (Figure 9).⁴⁴

Notre recherche sera donc orientée vers des séquences peptidiques courtes capables de s'autoassembler en feuillets β antiparallèles afin d'obtenir la meilleure stabilité possible, pour mimer au mieux le support naturel du site de catalyse.

1.1.7.2 Nanofibres peptidiques autoassemblées inspirées des structures amyloïdes

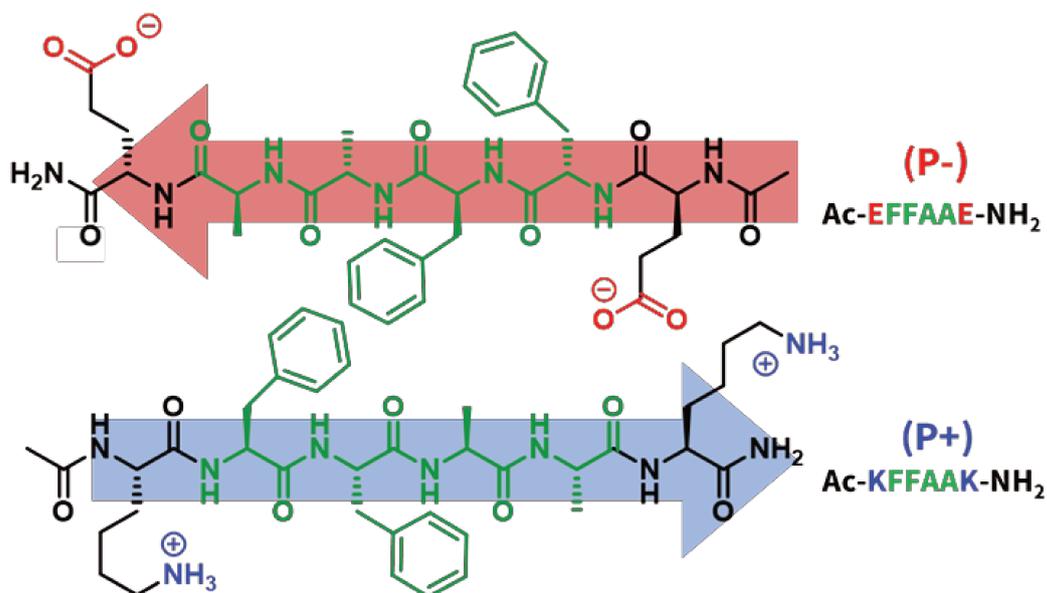


Figure 10 : Feuillets β antiparallèles développés par l'équipe du Pr Guler

S'inspirant des peptides amyloïdes, l'équipe du professeur Guler a conçu un couple de peptides, de charges complémentaires à pH neutre, capable de s'autoassembler en feuillets β antiparallèles.⁴⁵ Leurs séquences sont Ac-EFFAAE-NH₂ (AIP-1, **(P-)**) pour le peptide chargé négativement et Ac-KFFAAK-NH₂ (AIP-2, **(P+)**) pour le peptide chargé positivement (Figure 10). Pour pouvoir s'autoassembler, les deux peptides doivent être

chargés, c'est pourquoi le pH est un élément essentiel à prendre en considération, afin d'être en présence des espèces chargées capables de s'autoassembler. Pour le peptide Ac-EFFAAE-NH₂, les acides glutamiques ayant un pKa aux alentours de 4, le pH de la solution ne devra pas descendre en dessous de 6, afin d'être sûr que tous les glutamates soient bien déprotonés. Pour le peptide Ac-KFFAAK-NH₂, les lysines possèdent un pKa aux alentours de 10 et le pH ne doit pas dépasser 8 afin de garder chargées toutes les lysines. Les peptides AIP-1 et AIP-2 ont été acétylés (et C-ter amidés) afin d'obtenir une charge globale du peptide uniquement induite par les chaînes latérales des peptides, sans contribution de l'extrémité N-ter des peptides. Si l'amine N-ter avait été libre, une complémentarité de charge pourrait apparaître entre le glutamate et l'amine N-ter et ainsi favoriser l'autoassemblage du peptide avec lui-même. Les amines N-ter libres auraient également pu induire un agencement différent des deux peptides entre eux, justement dus à l'introduction d'un site chargé supplémentaire et ainsi amener à une formation très hétérogène de structure.⁴⁵

La reconnaissance par complémentarité de charge entre la lysine et le glutamate (rapprochement spatial des deux peptides) et la formation du « cœur » hydrophobe par le biais des alanines et des phénylalanines se réalise de manière concomitante et ainsi, agence les séquences de manière à former un feuillet β antiparallèle. Cette interaction est la plus stabilisante et permet de conserver la cohésion entre les deux peptides. Les résidus hydrophobes sont agencés sur le peptide de manière à pouvoir former des fibres virtuellement sans fin et dans toutes les directions et ainsi former de longs réseaux de feuillets β antiparallèles pouvant interagir entre eux également par interactions hydrophobes.⁴⁵ Les séquences peptidiques courtes capables de s'autoassembler sont connues pour avoir généralement une faible stabilité due à la présence du minimum d'interaction possible entre les peptides afin d'obtenir la structure secondaire voulue. Cependant, cette particularité n'est pas une généralité. En effet, les peptides dérivés de la huntingtine, composé de beaucoup d'asparagines et de glutamines, sont capables de former avec des peptides courts des structures très stables.⁴⁶

L'étude de modélisation infrarouge réalisée suggère la formation d'un hydrogel composé de fibres formées par les peptides ayant une structure secondaire en feuillet β antiparallèle (Figure 14).

Un autre avantage réside dans la simplicité d'utilisation des peptides. En effet, les peptides possèdent une bonne solubilité dans l'eau et sont difficilement capables de s'autoassembler avec eux même due à la répulsion électronique des glutamates entre eux, ou des lysines entre elles, ce qui facilite grandement leurs manipulations. Il n'y a pas de formation d'oligomère ou de fibres si les deux peptides ne sont pas mélangés, contrairement au développement d'un peptide unique qui, une fois mis en solution, peut s'autoassembler directement sans que cet assemblage ne soit contrôlé et ainsi rend sa manipulation beaucoup plus difficile.

Ces deux peptides ont donc été sélectionnés comme support, car ils permettent d'obtenir l'objet recherché : une séquence courte où les deux peptides sont composés uniquement de 6 acides aminés adoptant la structure secondaire d'un feuillet β antiparallèle, sans requérir le cuivre.

1.2 HÉTÉROASSEMBLAGE DE PEPTIDES COURTS POUR LA FORMATION DE MIMES DE LPMO.

1.2.1 Fonctionnalisation des peptides par les histidines (Figure 11 : en orange et violet)

Les deux peptides choisis comme support s'autoassemblent, en formant un cœur hydrophobe (FFAA) par complémentarité de charges, et s'arrangent en feuillets β antiparallèles. Afin de former le site « Histidine brace » sur ces deux peptides, une fonctionnalisation des peptides par deux histidines (une histidine chacune) est nécessaire. Le site « Histidine brace » est composé de deux histidines non équivalentes, car l'une est coordonnée également au cuivre via l'amine N-terminal. Le support étant basée sur l'assemblage de deux peptides différents, nous allons nous en servir à notre avantage en fonctionnalisant chaque peptide avec un type de ligand différent.

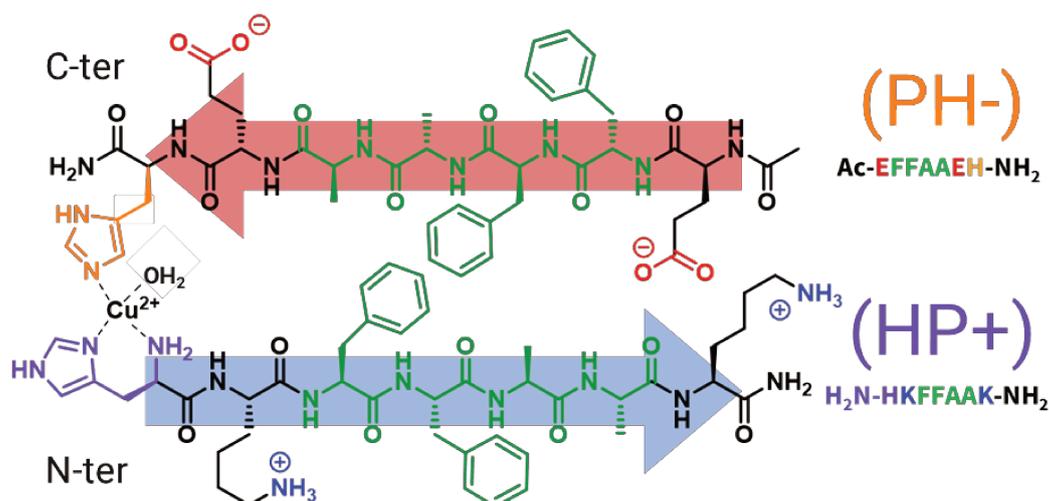


Figure 11 : Représentation de la structure imaginée pour le mime de LPMO formé par l'interaction de deux peptides, préorganisant ainsi les ligands du site de liaison du cuivre. Sont représentés : le cœur hydrophobe (en vert), la complémentarité de charge entre les Lysines (bleu) et les glutamates (rouge), l'histidine en N-ter (en violet) et la seconde (en orange).

Les histidines doivent être judicieusement positionnées, afin qu'après autoassemblage, le site de coordination du cuivre soit préformé. Les feuillets étant antiparallèles, une histidine sera ajoutée à l'extrémité N-ter du peptide afin de former le ligand chélate composé du N-ter de la protéine et de sa 1^{re} histidine. Sur l'autre peptide, l'histidine sera ajoutée en C-ter. Ce dernier peptide aura le N-ter acétylé, afin d'éviter une éventuelle coordination parasite de celui-ci. Cette répartition est essentielle pour pouvoir contrôler la préorganisation du site de coordination par l'autoassemblage des peptides (rapprocher spatialement les ligands du cuivre) facilitant la coordination du cuivre sur notre structure.

1.2.2 Synthèse des peptides

Les séquences peptidiques de référence ont donc été modifiées en introduisant les ligands du site de coordination de la LPMO à leurs extrémités. Quatre peptides (séquences présentées dans le Tableau 2) ont été synthétisés afin de pouvoir étudier toutes les combinaisons possibles.

Peptide de référence		Histidine ajoutée en C-ter		Histidine ajoutée en N-ter	
(P+)	Ac-KFFAAK-NH ₂	(PH+)	Ac-KFFAAKH-NH ₂	(HP+)	NH ₂ -HKFFAAK-NH ₂
(P-)	Ac-EFFAAE-NH ₂	(PH-)	Ac-EFFAAEH-NH ₂	(HP-)	NH ₂ -HEFFAAE-NH ₂

Tableau 2 : Séquences des peptides synthétisés

Les peptides ont été synthétisés « à la main » en suivant la stratégie Fmoc/tBu en phase solide (SPPS).⁴⁷⁻⁴⁹

1.2.3 Formation des fibres

D'après la conception présentée précédemment, l'on peut s'attendre à un effet synergique entre l'assemblage des peptides (ie formation des fibres) et la coordination du cuivre. Si l'autoassemblage des peptides permet un rapprochement spatial des deux ligands, préassemblant ainsi le site de coordination du cuivre (histidine brace). Cette préorganisation du site de coordination devrait faciliter la coordination de l'ion Cu^{II} aux peptides. Si cette affirmation se révèle exacte, cela veut également dire que la coordination du cuivre sur les peptides en solution pourrait rapprocher suffisamment les peptides afin de promouvoir la formation de fibres.

Dans un premier temps, toutes les combinaisons possibles pouvant amener à un autoassemblage ainsi que le bon agencement des ligands entre les 4 peptides synthétisés ont été investiguées. Ceci nous permettra également de déterminer pour quelle(s) combinaison(s) de peptides, le cuivre facilite la formation des fibres, c'est-à-dire que la fibrillation devrait se faire plus rapidement et/ou à plus basse concentration en présence de cuivre.

Peptides	Cu^{II}	[Peptide] / mM						
		10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
(PH -) - (HP+)	-	o*	o	-	-	-	-	-
	+		o	o	o	-	-	-
(PH+) - (PH -)	-	o*	-	-	-	-	-	-
	+		o	-	-	-	-	-
(PH+) - (HP -)	-	o*	-	-	-	-	-	-
	+		o	o	-	-	-	-
(HP+) - (HP -)	-	o*	-	-	-	-	-	-
	+		o	o	-	-	-	-
(PH+) - (HP+)	-	-*						
	+							
(PH -) - (HP -)	-	-*						
	+							

Tableau 3 : Estimation de la concentration limite de fibrillation. o : solution devenue turbide. - : solution restée limpide. Tests réalisés avec 20 mM de tampon HEPES à pH 7,4 pour les concentrations 0,5, 0,1, 0,05 et 0,01 mM de chaque peptide et 50 mM pour les concentrations 1 et 5 mM de chaque peptide, incubé à 37 °C et 1000 rpm. * : Test réalisé sans tampon à pH 7, incubé à 37 °C et 1000 rpm ; Le mélange de **(PH -) - (HP+)** a pris 15 min à fibriller **(PH+) - (PH -)** a pris 12 h, **(PH+) - (HP -)** et **(HP+) - (HP -)** a pris 6 h. Les mélanges **(PH+) - (HP+)** et **(PH -) - (HP -)** n'ont pas formé de fibres.

Différentes concentrations de peptides ont été testées afin d'estimer la concentration minimale de peptide nécessaire pour observer la formation de fibres (visuellement, par apparition d'un précipité) sans ou avec cuivre (0,9 équivalent) (Tableau 3). Pour les quatre combinaisons de peptides avec chacun une charge opposée à l'autre (4 premières lignes du Tableau 3), une formation de fibres a été observée (apparition visuelle d'une turbidité, puis précipitation) à une concentration en peptide plus faible en présence de cuivre qu'en son absence. Cependant, cet effet est plus prononcé pour le mélange **(PH -) - (HP+)** qui forme des fibres en présence de cuivre dès 0,5 mM de chaque peptide et à 5 mM en absence de cuivre. Les autres mélanges fibrillent en présence de cuivre à 1 mM minimum et, en absence de cuivre, à 10 mM de chaque peptide. De cette observation, nous émettons l'hypothèse que la morphologie du site de coordination du cuivre pour le mélange **(PH -) - (HP+)** est plus favorable que pour les autres combinaisons de peptides. C'est donc cette combinaison qui a été sélectionnée pour la suite.

1.2.4 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission est un outil de choix pour identifier la morphologie de nano-objet.⁵⁰ Elle a couramment été utilisée afin de déterminer la morphologie de fibres protéiques/peptidiques (ex. amyloïde β_{1-40} ou encore α -synucléine).⁵¹

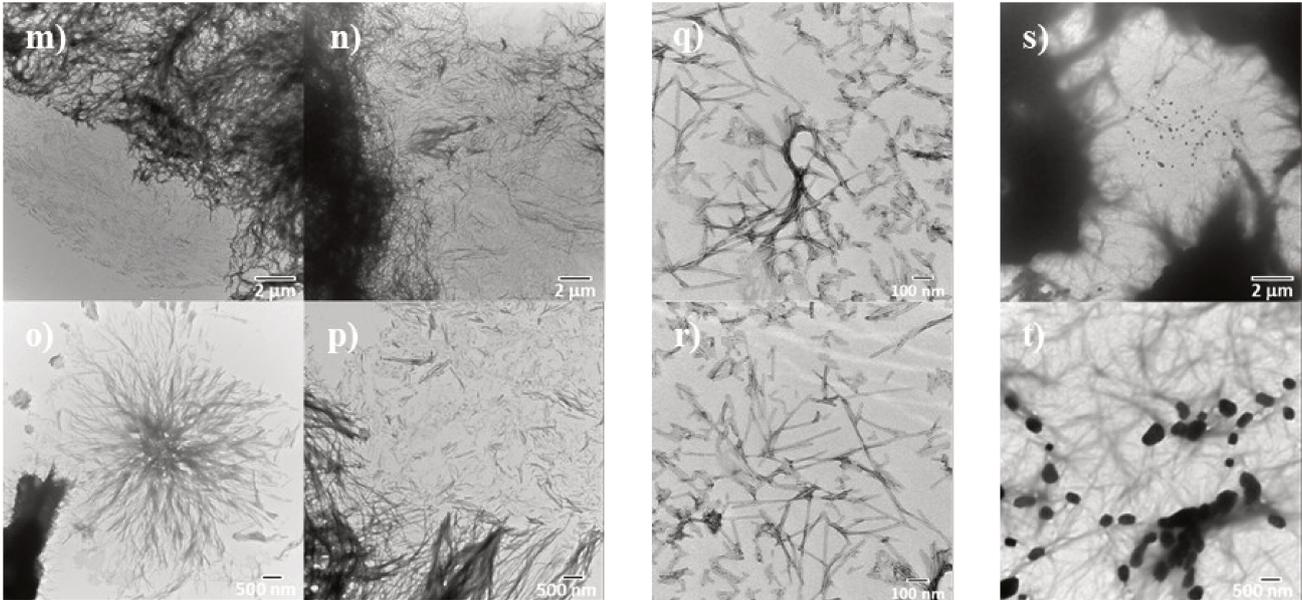


Figure 12 : Cliché de microscopie électronique à transmission des fibres formées par les peptides originaux de Guler. Chaque échantillon est composé de 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4, de 5 mM de chaque peptide. m), n), o), p) échantillon (P+) - (P-) sans cuivre. q), r) échantillon (P+) - (P-) avec coloration négative à l'acétate d'uranyle (AcU). s), t) échantillon (P+) - (P-) avec 0,9 équivalent de cuivre.

Dans un premier temps, les fibres formées par les peptides originaux de l'équipe de Guler ont été observées en microscopie électronique à transmission (MET) (Figure 12). En comparaison avec les résultats obtenus par l'équipe du professeur Guler,⁴⁵ la morphologie des fibres obtenues dans notre laboratoire n'est pas tout à fait la même.⁴⁵ En effet, la morphologie observée dans la publication de référence tend vers la formation d'un hydrogel composé d'un maillage formé par les peptides, tandis que dans notre cas, nous obtenons des fibres similaires, mais ayant tendance à se rassembler entre elles, former des « pelotes » et sédimenter. Les fibres en elle-même ressemblent à celles que nous avons obtenues. Elles possèdent une largeur et une longueur similaires et possèdent une morphologie comparable. Cette différence de morphologie peut être expliquée par des différences lors de la préparation de l'échantillon. En effet, les concentrations de travail entre les résultats de la publication et les nôtres ne sont pas la même, ce qui peut induire la formation de morphologies différentes. Le second facteur pouvant influencer la formation des fibres est le choix des conditions d'incubation. Dans les conditions de référence, les deux solutions de peptides sont mélangées, puis cette solution est laissée à fibriller à température ambiante, tandis que dans notre étude, le mélange des deux peptides est incubé à 37 °C, sous une agitation de 1200 rpm. L'acétate d'uranyle servant à contraster peut également dégrader la structure observée, ce qui peut également induire une différence dans l'observation de l'échantillon.

L'échantillon (P+) - (P-) avec le cuivre ajouté avant fibrillation a été analysé (Figure 12s-t) afin de tester si les peptides de référence peuvent coordonner le cuivre sans site de coordination spécifique. La faible résolution des fibres, dans ce cas-là, peut-être expliquée par l'incapacité du peptide à coordonner le cuivre ou par le biais d'une liaison faible et non spécifique et/ou l'absence d'agent de contraste. Pour les clichés s) et t) on observe des cristaux noirs correspondant à un sel de cuivre ayant cristallisé. Cette particularité nous informe que les peptides (P+) et (P-) sont incapable de coordonner le cuivre.

Les échantillons composés par les peptides **(PH -)** - **(HP+)** avec et sans cuivre ont été observés à l'aide d'un microscope électronique à transmission (TEM) (Figure 13). Ces échantillons n'ont pas été contrastés avec de l'acétate d'uranyle, car il induit une dénaturation des fibres. Ces analyses nous permettent une comparaison entre les peptides de référence **(P+)** - **(P -)** et les nouveaux peptides synthétisés **(PH -)** - **(HP+)**. Tout d'abord en absence de cuivre, les fibres formées par le mélange **(PH -)** - **(HP+)** sont longues (>2 μ M) et larges (30-40 nm). Les fibres les plus grosses semblent être composées d'un amoncellement de fibres plus petites (Figure 13a-d). En comparaison avec l'échantillon **(P+)** - **(P -)** (Figure 12), les fibres ont essentiellement la même morphologie, ce qui peut indiquer que la structure secondaire et l'arrangement spatial adopté par **(PH -)** - **(HP+)** est similaire à **(P+)** - **(P -)**, malgré l'incorporation des histidines sur les deux peptides.

La coordination du cuivre sur les peptides **(PH -)** et **(HP+)** est confirmée par l'absence de cristaux de sels de cuivre, contrairement à ce qui a été observé avec les peptides sans histidine.

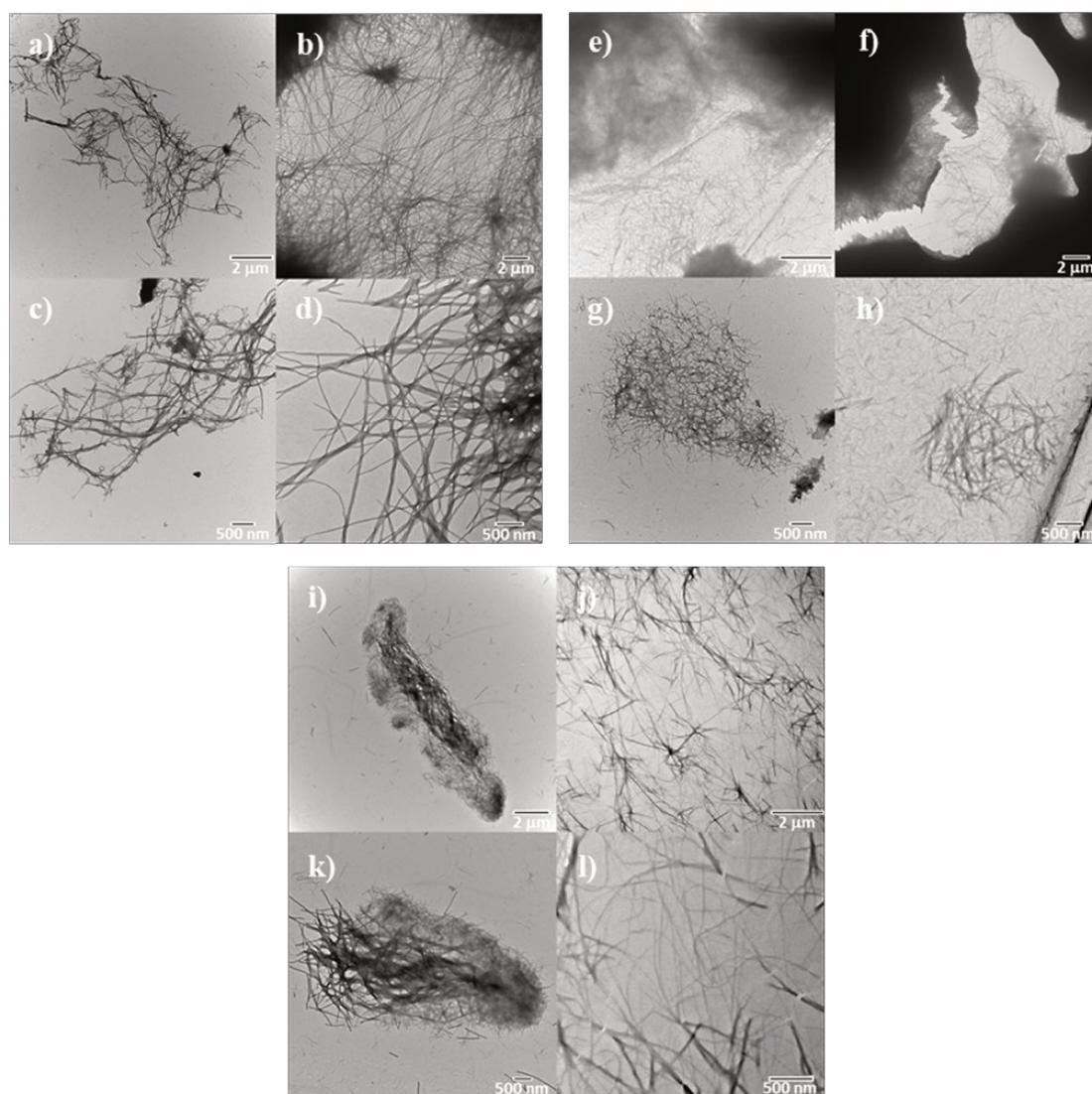


Figure 13 : Clichés de Microscopie électronique à transmission des fibres formées par le mélange **(PH -)** - **(HP+)** sans métal (a, b, c, d), avec 0,9 équivalent de Cu^{II} ajouté avant fibrillations (e, f, g, h) et avec 0,9 équivalent de Cu^{II} ajouté après fibrillations (i, j, k, l). Chaque échantillon contient 5 mM de chaque peptide et 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4.

Quand 0,9 équivalent de Cu^{II} [relatif au peptide **(HP+)**] est ajouté, avant la formation de fibres dans le mélange **(PH -)** - **(HP+)** [c'est-à-dire que le cuivre est ajouté à la solution de **(HP+)** avant l'addition de **(PH -)**], les fibres observées sont nettement plus courtes (< 1 μ M) et fines (8-10 nm) (Figure 13g-h). L'hypothèse proposée pour

expliquer cette modification de morphologie est que la coordination du cuivre sur les peptides induit des contraintes structurales qui gênent l'assemblage « latérale » des feuillets β (d'où des fibres plus fines) et/ou induit la formation d'une paire avec **(PH -)** et **(HP+)** distordue qui limite l'élongation des fibres [en comparaison aux peptides de référence **(P+) - (P -)**].

Ces fibres peuvent également être enchevêtrées entre elles (Figure 13e-f) rappelant les agencements interfibrilles dans les échantillons **(PH -) - (HP+)** et **(P+) - (P -)**.

Dans l'échantillon où le cuivre (0,9 équivalent) est ajouté après que les fibres **(PH -) - (HP+)** soient formées, on observe la coexistence des deux morphologies discutées ci-dessus (Figure 13i-l). Dans cet échantillon, on observe la morphologie des fibres avec cuivre à la surface de fibres déjà formées (fibre sans cuivre) (Figure 13-i, 13-k). Il semble donc que le cuivre, quand il interagit avec les fibres sans métal déjà formées, détruit dans un premier temps l'assemblage pour promouvoir la formation de fibres avec cuivre. Une information importante à noter est que lors de l'ajout du cuivre dans la suspension de fibres (turbide, blanchâtre), la solution redevient momentanément limpide avant de redevenir turbide (et bleutée cette fois). Ceci pourrait être dû à une destruction de l'assemblage déjà formé, puis à la reformation de fibres.

1.2.5 ATR-FTIR

Des analyses spectroscopiques à réflectance totale atténuée couplée à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR) ont été réalisées afin de caractériser la/les structure(s) secondaire(s) adoptées par les peptides dans ces assemblages, en se basant sur l'interprétation de la bande Amide I.⁵² Premièrement, les peptides de référence **(P+) - (P -)**, ont été analysés en présence et en absence de cuivre (Figure 14). L'interprétation des spectres obtenus a été réalisée à l'aide du Dr Y. El Khoury.

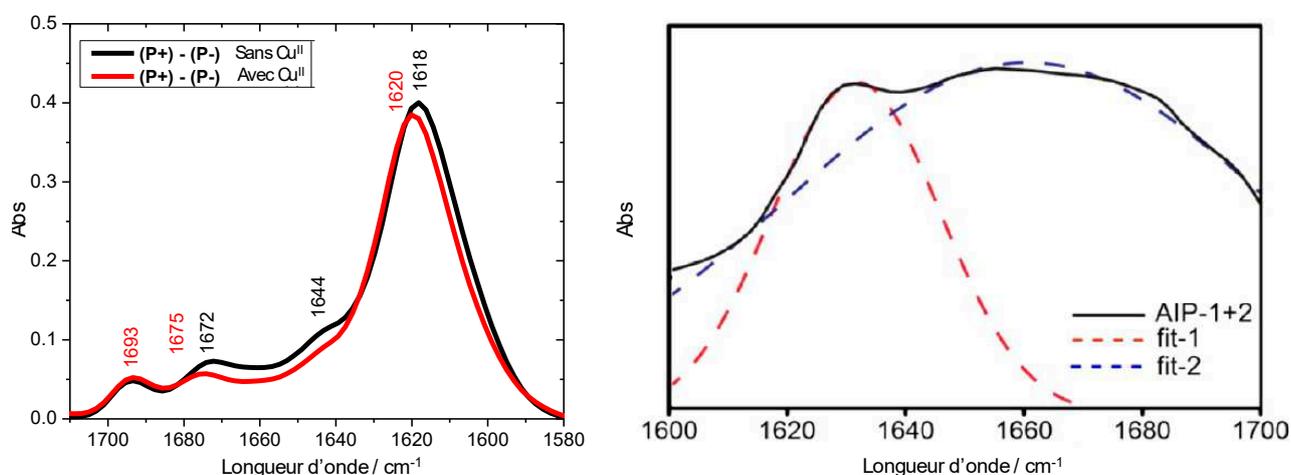


Figure 14 : Gauche : Bande amide I du spectre ATR FTIR des fibres **(P+) - (P -)** avec et sans cuivre. 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4, 2,5 mM de chaque peptide et 0,9 équivalent de Cu^{II} (pour l'échantillon avec cuivre). Droite : Bande amide I du spectre FT-IR du mélange entre AIP-1 (**P -**) et AIP-2 (**P+**) sans cuivre + le fitting gaussien (données et figure de droite provenant de la publication de Guler et coll.).

La vibration amide I de l'échantillon **(P+) - (P -)** montre principalement deux bandes à 1618 cm^{-1} et 1693 cm^{-1} , qui correspondent à la signature des feuillets β antiparallèles structurés en (longues) fibres. La bande à 1672 cm^{-1} peut être expliquée par la présence de coudes β . L'épaule observable à 1644 cm^{-1} indique un mélange de différentes structures, majoritairement attribuées aux structures coudes β ou pelotes aléatoires. L'addition de 0,9 équivalent de cuivre induit un déplacement de la bande la plus intense du feuillet β de 1618 cm^{-1} à 1620 cm^{-1} , reflétant la formation de fibrilles légèrement plus courtes, car la division de fréquence légèrement plus faible des deux modes des feuillets β antiparallèles est très probablement due à un plus petit nombre de brins par feuillet. Cependant, aucun déplacement n'est observé pour la bande à 1693 cm^{-1} , ce qui

indique qu'une structure similaire est adoptée par les peptides dans les fibres avec ou sans cuivre. Ces résultats peuvent simplement refléter l'absence d'une coordination spécifique de l'ion Cu^{II} par les peptides de référence (sans histidine). Il est important de noter que les spectres présentés ici sont significativement différents de ceux de présenter dans la publication originale de Guler et coll. (Figure 14, spectre de droite) en accord avec la microscopie (voir partie 2.4).⁴⁵ Ceci indique que la préparation de l'échantillon peut avoir un impact important sur la conformation adoptée par les peptides. Les principales différences sont les suivantes, d'abord, des concentrations de peptide différentes : de 6,6 à 53 mM dans la publication originale contre 1 à 5 mM dans notre cas. Ensuite, dans la publication, le mélange est laissé gélifié à température ambiante (environ 20-25 °C) sans agitation, tandis que dans notre cas, le mélange a été incubé à 37 °C avec une agitation de 1200 rpm, pour une durée minimale de 30 min. Ces deux facteurs peuvent jouer un rôle essentiel et ainsi induire une morphologie de fibres différentes, malgré le même matériel de départ. Finalement, la préparation de l'échantillon pour la mesure du spectre infrarouge est très différente : tandis que nous avons déposé et laissé sécher une goutte de suspension dense des fibres, l'équipe de Guler a d'abord lyophilisé l'échantillon et cette poudre a ensuite été mélangée à de la poudre de KBr pour la compresser en pastille.

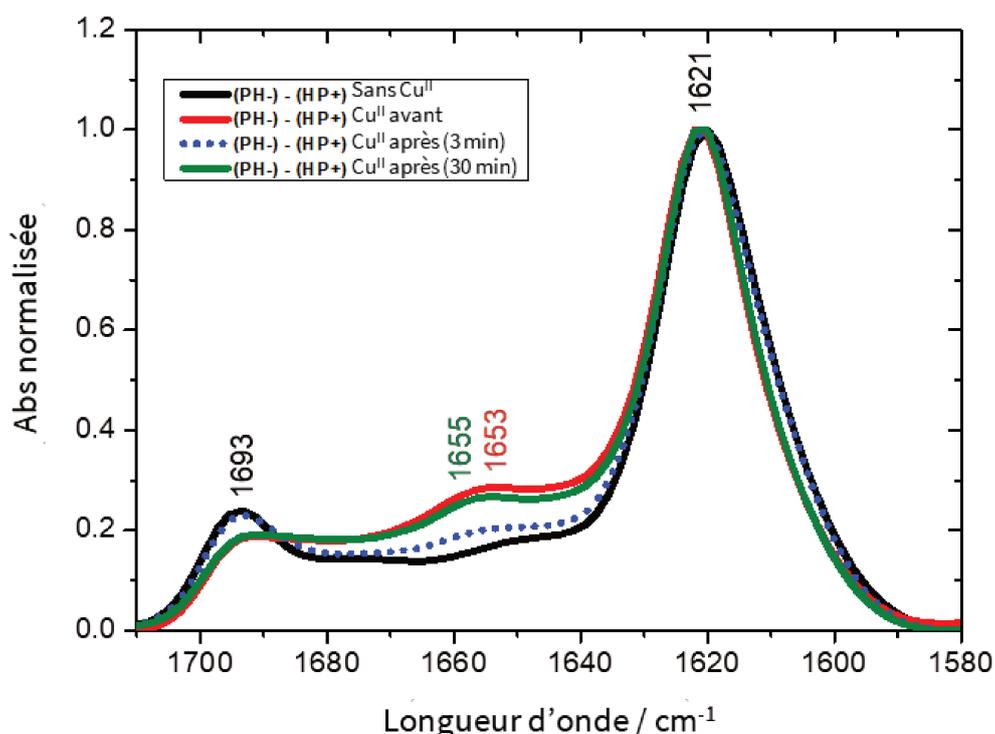


Figure 15 : Bande amide I du spectre normalisé ATR-FTIR des fibres (PH-) - (HP+), sans cuivre (noir), avec cuivre ajouté avant fibrillation (rouge) ou après fibrillation [après 3 min (bleu pointillé)] et après 30 min (vert) incubation. 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4, 2,5 mM de chaque peptide, 0,9 équivalent de Cu^{II} .

Le spectre de l'échantillon (PH-) - (HP+) a été analysé en présence et en absence de cuivre (Figure 15). Le spectre du mélange (PH-) - (HP+) sans cuivre présente deux bandes à 1693 cm^{-1} et 1621 cm^{-1} , qui sont similaires à celles observées sur le spectre des peptides parents (P+) - (P-) et montrent une signature claire de la formation de feuilletts β antiparallèles. L'incorporation d'une histidine sur chaque peptide [donnant (PH-) et (HP+)] ne semble pas changer fondamentalement la manière dont ils s'assemblent.

L'échantillon (PH-) - (HP+) avec le cuivre ajouté avant fibrillation a été incubé pendant 30 min (Figure 15, rouge). Dans ce cas de figure, la bande à 1693 cm^{-1} est moins intense en comparaison avec l'échantillon (PH-) - (HP+) sans cuivre, alors que le faible épaulement observé aux alentours de 1650 cm^{-1} pour les peptides sans cuivre devient plus important, et à 1653 cm^{-1} . Ce comportement peut être hypothétiquement expliqué par la

formation de fibres plus courtes, d'où la présence de plus de motifs de terminaison de fibres qui sont probablement moins bien organisées, induisant une croissance de la bande aux alentours de 1650 cm^{-1} (correspondant à un motif désordonné). Ce signal peut également être attribué à la formation d'hélices α .⁵² La chaîne principale du peptide (**HP+**) étant probablement coordonnée au cuivre, il est plausible que cette coordination induise une contrainte structurale sur la chaîne principale, affectant la structure secondaire. En résumé, l'ajout de cuivre entraîne une diminution de la structuration en feuillets β antiparallèles.

Un spectre de l'échantillon de fibre a été enregistré directement après ajout du cuivre (sur des fibres déjà formées) et agitation (environ 3 min) (Figure 15, spectre bleu pointillé). Le spectre présente également deux bandes à 1693 cm^{-1} et 1620 cm^{-1} (ie essentiellement identique au spectre de **(PH -) - (HP+)** sans cuivre) avec une petite bande à 1655 cm^{-1} (hélices α ou désordonné) ce qui indique que le cuivre n'est pas encore totalement coordonné dans son site final et qu'une importante partie est encore à l'état de cuivre libre ou lié non spécifiquement. Cet échantillon a été réanalysé après 30 min d'incubation. Cette fois, le spectre est identique à celui observé pour l'échantillon **(PH -) - (HP+)** avec le cuivre ajouté avant fibrillation. Ceci veut dire que lorsque l'on ajoute du cuivre sur des fibres déjà formées, le Cu^{II} est capable de déclencher le réarrangement des fibres afin d'obtenir la même structure que celle observée pour l'échantillon **(PH -) - (HP+)** avec le cuivre ajouté avant fibrillation, en accord avec les résultats de MET (voir partie 2.4).

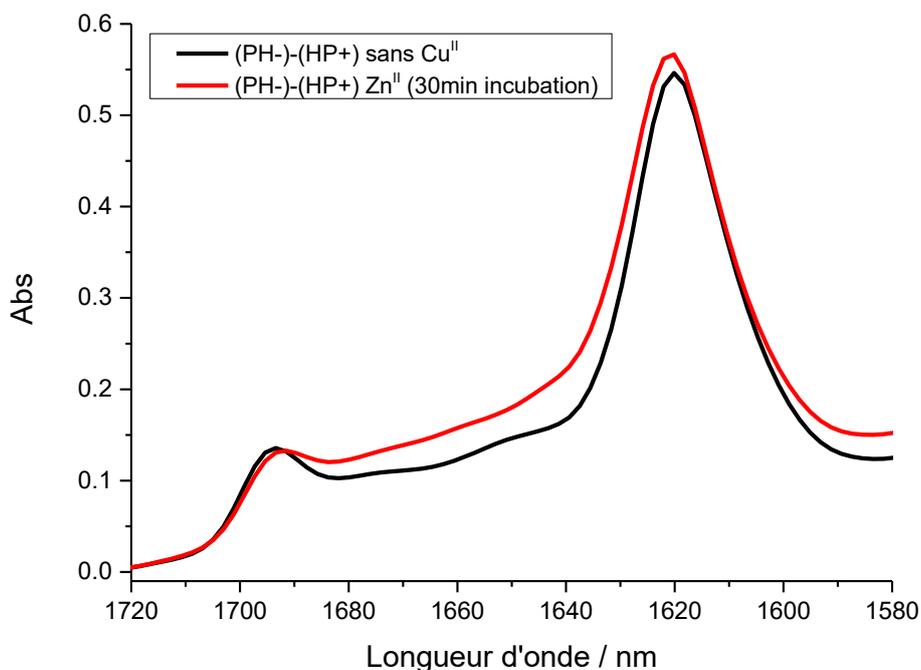


Figure 16 : Bande amide I du spectre ATR FT-IR des fibres **(PH -) - (HP+)** sans cuivre (spectre noir), et avec du zinc après 30 min d'incubation (spectre bleu).

Une analyse supplémentaire a été réalisée avec le mélange **(PH -) - (HP+)** et du zinc ajouté après la formation de fibres (Figure 16). L'échantillon a été analysé 30 min plus tard afin d'observer un potentiel réarrangement des fibres. Contrairement au cuivre, le zinc semble très peu influencer l'agencement adopté par les peptides, même après 30 min d'incubation.

Cet effet peut s'expliquer par la chimie de coordination différente entre un complexe de zinc, qui n'a pas d'énergie de stabilisation du champ de ligands (LFSE) et donc peut adopter facilement des géométries variées avec classiquement 4 à 6 ligands, tandis que le cuivre, possédant une énergie de stabilisation du champ de ligands, s'adaptera moins aux vues de sa préférence pour une géométrie carrée plan (avec ou sans ligands axiaux).

1.2.6 Raman

Les résidus spécifiquement coordonnés au cuivre ne sont pas encore connus. C'est pourquoi, des analyses utilisant la spectroscopie Raman avec des peptides dont l'histidine est entièrement marquée à l'azote 15 (^{15}N) ont été faites, afin d'essayer de déterminer si ces résidus sont effectivement coordonnés au cuivre. Ces peptides contenant (^{15}N)₃- histidine sont notés ci-après **(PH -)*** et **(HP+)***.

Ces analyses ont été réalisées sur un microspectromètre Raman sur les échantillons **(PH -) - (HP+)**, **(PH -)* - (HP+)**, **(PH -) - (HP+)***, **(PH -)* - (HP+)***, chargés avec 0,9 équivalent de Cu^{II} par rapport à (HP+) (Figure 17). Cette comparaison a été utilisée pour déterminer le déplacement du signal dû au peptide marqué **(PH -)*** ou **(HP+)*** et savoir où les signaux de l' ^{15}N apparaissent dans les spectres Raman du dimère. Tout changement de l'ordre de 1 à 3 cm^{-1} n'a pas été pris en compte. L'acquisition et l'interprétation des spectres ont été réalisées avec l'aide du Dr Y. El-Khoury.

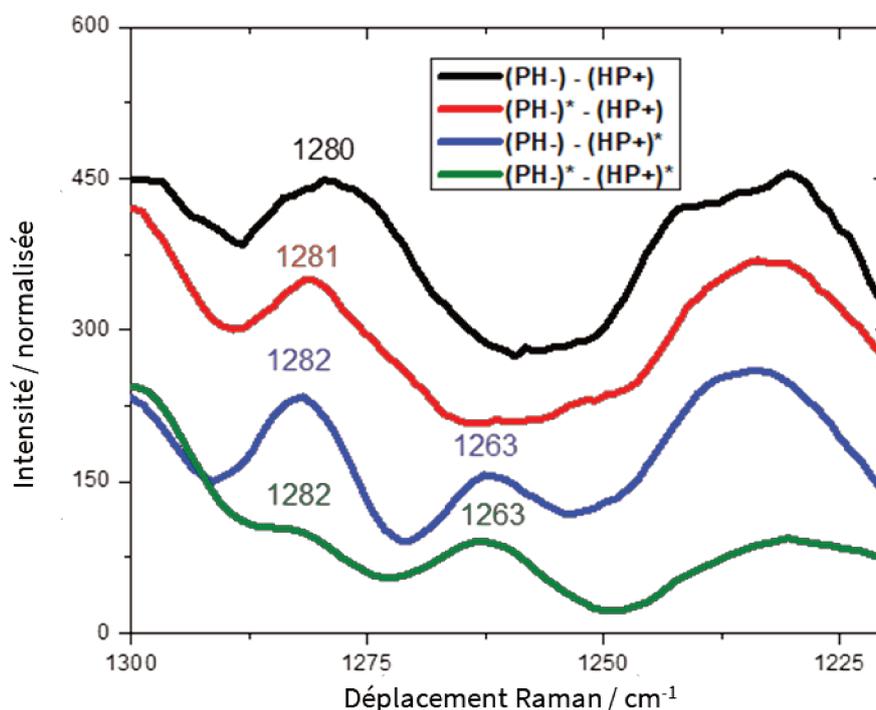


Figure 17 : Spectre Raman des complexes du cuivre avec les peptides marqués à l' ^{15}N et non marqués : **(PH -) - (HP+)**, **(PH -)* - (HP+)**, **(PH -) - (HP+)***, **(PH -)* - (HP+)*** composés de 2,5 mM de chaque peptide, 0,9 équivalent de Cu^{II} et 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4

Les spectres des deux échantillons **(PH -) - (HP+)*** et **(PH -)* - (HP+)*** chargés de cuivre montrent une bande à 1263 cm^{-1} , alors que cette bande est visible à une fréquence de 1278 cm^{-1} pour le hétérodimère non marqué (Figure 17). Cela confirme que l'histidine de **(HP+)*** lie le cuivre via $\text{N}\pi$ alors que son $\text{N}\epsilon$ est protonée. Pour **(PH -)* - (HP+)** avec le cuivre, aucune différence visible par rapport au non marqué n'a été observée dans la région d'intérêt. Par conséquent, il semble que l'histidine **(PH -)*** ne se lie pas au cuivre.⁵³

Afin de vérifier cette hypothèse et de mieux comprendre la coordination du Cu^{II} , des études en RPE bande continue et HYSORE ont été réalisées.

1.2.7 Résonance paramagnétique électronique

L'acquisition et l'interprétation des spectres ont été réalisées par le Dr B. Vileno et la Dr N. Le Breton. Tout d'abord, Le Cu^{II} dans 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4 a été mesuré, afin d'obtenir la signature RPE du Cu^{II} coordonné à l'HEPES dans ces conditions (Figure 18A). Ensuite, le spectre RPE du Cu^{II} avec chaque peptide individuellement (rapport Cu^{II} /Peptide 1:2) a été mesuré (Figure 18B). Aucun signal de Cu^{II} (HEPES) n'est observable, indiquant que tout le Cu^{II} est lié au peptide (**PH -**) ou (**HP+**). Le spectre RPE de Cu^{II} - (**PH -**) a montré une espèce principale (mais l'échantillon n'est pas homogène) avec des paramètres différents, comparés au Cu^{II} (HEPES) ainsi que comparé à l'espèce principale dans l'échantillon Cu^{II} - (**HP+**).

Ensuite, un mélange équimolaire de (**PH -**) et (**HP+**) a été titré par Cu^{II} , de 0,25 à 1,5 équivalent (Figure 18-C). De 0,25 à 1 équivalent de cuivre, une seule espèce (très majoritaire) apparaît. Son spectre est très similaire à celui de Cu^{II} dans (**HP+**) seulement (Figure 18 - A, vert). De 1 à 1,5 équivalent, la première espèce est consommée au profit d'une nouvelle, dont le spectre est clairement distinct de celui du Cu^{II} - (**HP+**) et du Cu^{II} - (**PH -**).

Il est important de noter qu'à partir d'1 équivalent, un élargissement des bandes a été observé, diminuant la résolution et rendant l'analyse difficile. Une explication possible serait une interaction magnétique entre les centres du cuivre dans l'agrégat à cause de leur proximité. Cet effet n'étant pas compatible avec la réalisation de RPE pulsée, car la résolution est trop faible, il nous faut développer des conditions d'analyse où cette communication est supprimée.

Dans une première tentative pour diminuer ce phénomène, le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}@$ (**PH -**) - (**HP+**) a été dilué en utilisant les peptides de référence (**P+**) et (**P -**). L'idée était d'augmenter la distance entre les complexes $\text{Cu}^{\text{II}}@$ (**PH -**) - (**HP+**) en intercalant des peptides autoassemblés (**P+**) - (**P -**) (ie sans le site de liaison au Cu^{II}), étant donné qu'ils partagent tout le même motif d'agrégation. Les proportions utilisées étaient 60 % de (**P+**) - (**P -**) et 40 % de $\text{Cu}^{\text{II}}@$ (**PH -**) - (**HP+**) (Figure 19 spectre noir). Malheureusement, le résultat obtenu n'est pas satisfaisant, on observe toujours un élargissement des bandes du cuivre. L'inefficacité de la dilution du peptide peut être expliquée par une première formation (plus rapide) de $\text{Cu}^{\text{II}}@$ (**PH -**) - (**HP+**)

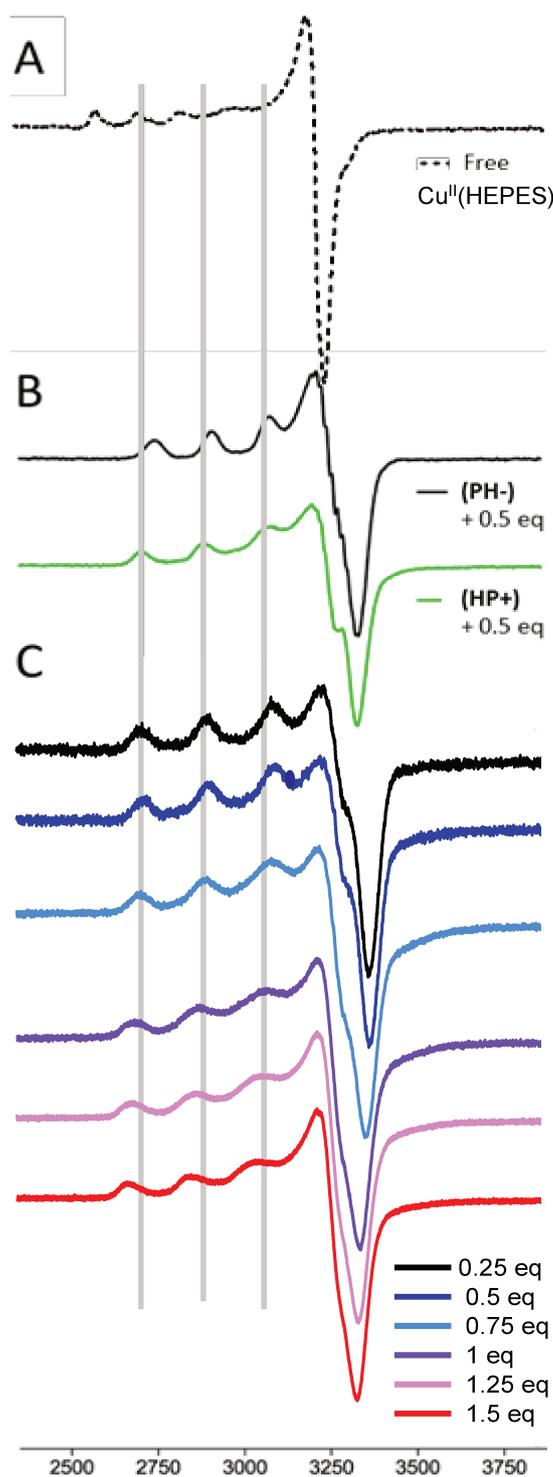


Figure 18 : **A**) Spectre RPE du cuivre libre (même quantité que l'analyse de **B**), **B**) Spectre RPE des complexes avec le peptide Cu^{II} - (**PH -**) et Cu^{II} - (**HP+**) seul (0,5 équivalent de Cu) et **C**) Titrage RPE (spectre normalisé) d'un mélange 1:1 du peptide (**PH -**) et (**HP+**) avec Cu^{II} , de 0 à 1,5 équivalent par rapport à (**HP+**). Tous les échantillons contenaient 5 mM de chaque peptide, 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4 et 10 % de glycérol.

entraînée par le cuivre et après toute la consommation de **(PH -)**, **(HP+)** et du cuivre, les peptides **(P+)** - **(P -)** se sont assemblés sur les noyaux de **Cu^{II}@ (PH -) - (HP+)**.

Une deuxième stratégie consiste en une dilution magnétique qui est une technique couramment employée en RPE afin de séparer des centres diamagnétiques. Le complexe **Cu^{II}@ (PH -) - (HP+)** a été dilué avec du Zn^{II}, un ion diamagnétique, c'est-à-dire invisible en RPE. L'idée ici est d'augmenter significativement la distance moyenne entre 2 Cu^{II} en occupant des ligands, diminuant ainsi l'interaction magnétique des centres de Cu^{II}.

Une condition préalable à cette stratégie est que le Zn^{II} se lie aux mêmes résidus que le Cu^{II} et ne perturbe pas la structure fibrillaire. Une hypothèse raisonnable est d'admettre que l'ion Zn^{II} a de fortes chances d'interagir avec les histidines libres. Cependant, même si le complexe formé n'a pas exactement la même géométrie que le complexe de cuivre, ceci n'empêche pas le zinc d'être un ligand compétiteur pour les histidines.

En effet, le Zn^{II} n'a pas affecté la structure secondaire des fibres après la liaison (Figure 16). Un ratio de 80 % de Zn^{II} et 20 % de Cu^{II} a été utilisé pour obtenir une dilution efficace (Figure 19, spectre rouge). C'est cette méthode qui s'est révélée la meilleure puisque dans ce cas, les bandes de cuivre sont bien définies et fines.

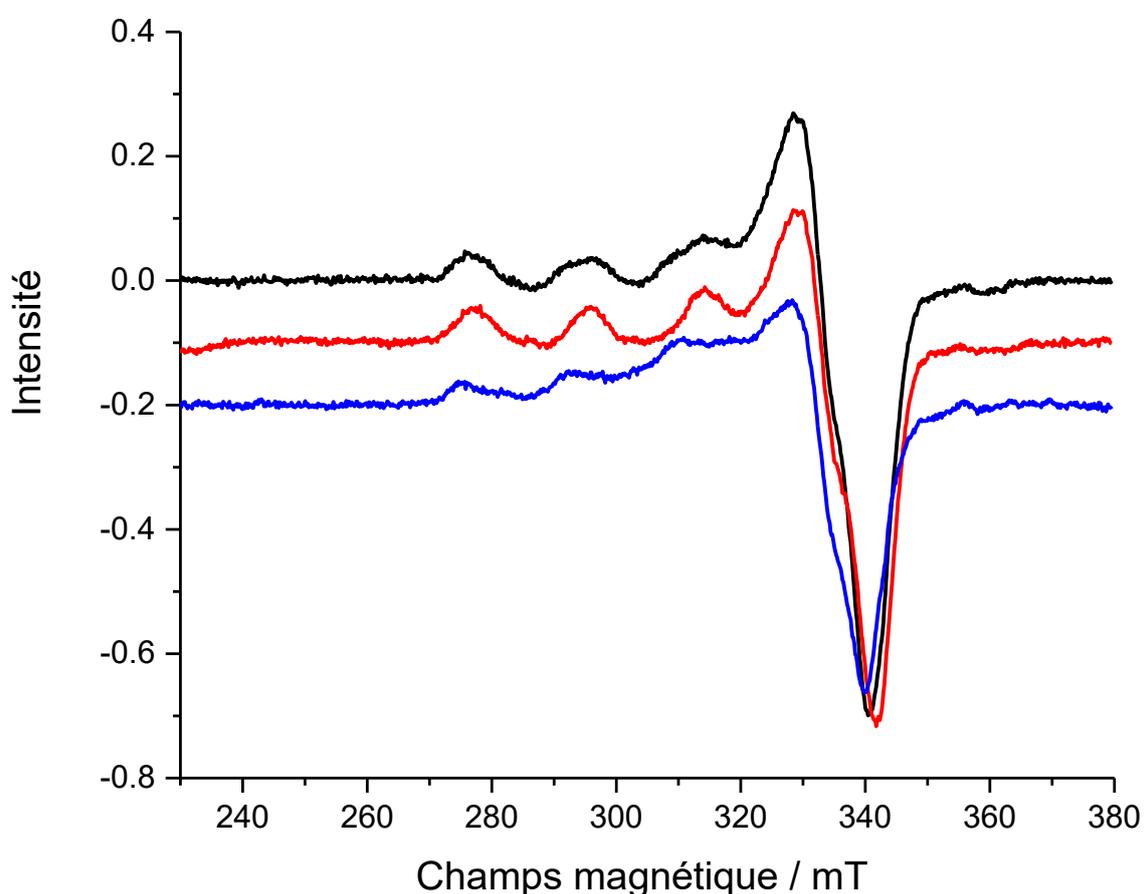


Figure 19 : Optimisation de la résolution du spectre pour le mélange **(PH -) - (HP+)**. Le spectre noir correspond à la dilution peptidique 3 mM de **(P -) - (P+)**, 2 mM de **(PH -) - (HP+)**, 0,9 équivalent (1,8 mM) de cuivre et 10% de glycérol. Le spectre rouge correspond à la dilution métallique, 5 mM de **(PH -) - (HP+)**, 0,9 équivalent (4,5 mM) de métal, dont 80% de zinc et 20% de cuivre ainsi que 10% de glycérol. Le spectre bleu correspond au mélange classique, 5 mM de **(PH -) - (HP+)**, 0,9 équivalent (4,5 mM) de cuivre et 10% de glycérol.

Cette condition a été utilisée pour effectuer l'analyse des échantillons marqués **(PH -) - (HP+)**, **(PH -)* - (HP+)**, **(PH -) - (HP+)***, **(PH -)* - (HP+)***, **(PH -)* - (PH -)*** et **(HP+)* - (HP+)*** avec du cuivre. Le but de cette expérience est de vérifier si l'histidine du peptide **(PH -)** est vraiment absente de la sphère de coordination du cuivre dans

les fibres. Dans le cas où un peptide marqué se lie au cuivre via son histidine, une modification du signal est attendue. En effet, l'histidine étant marquée à l' ^{15}N , un couplage entre l'électron du cuivre et ce noyau est attendu faisant apparaître des signaux d'interactions superhyperfines.

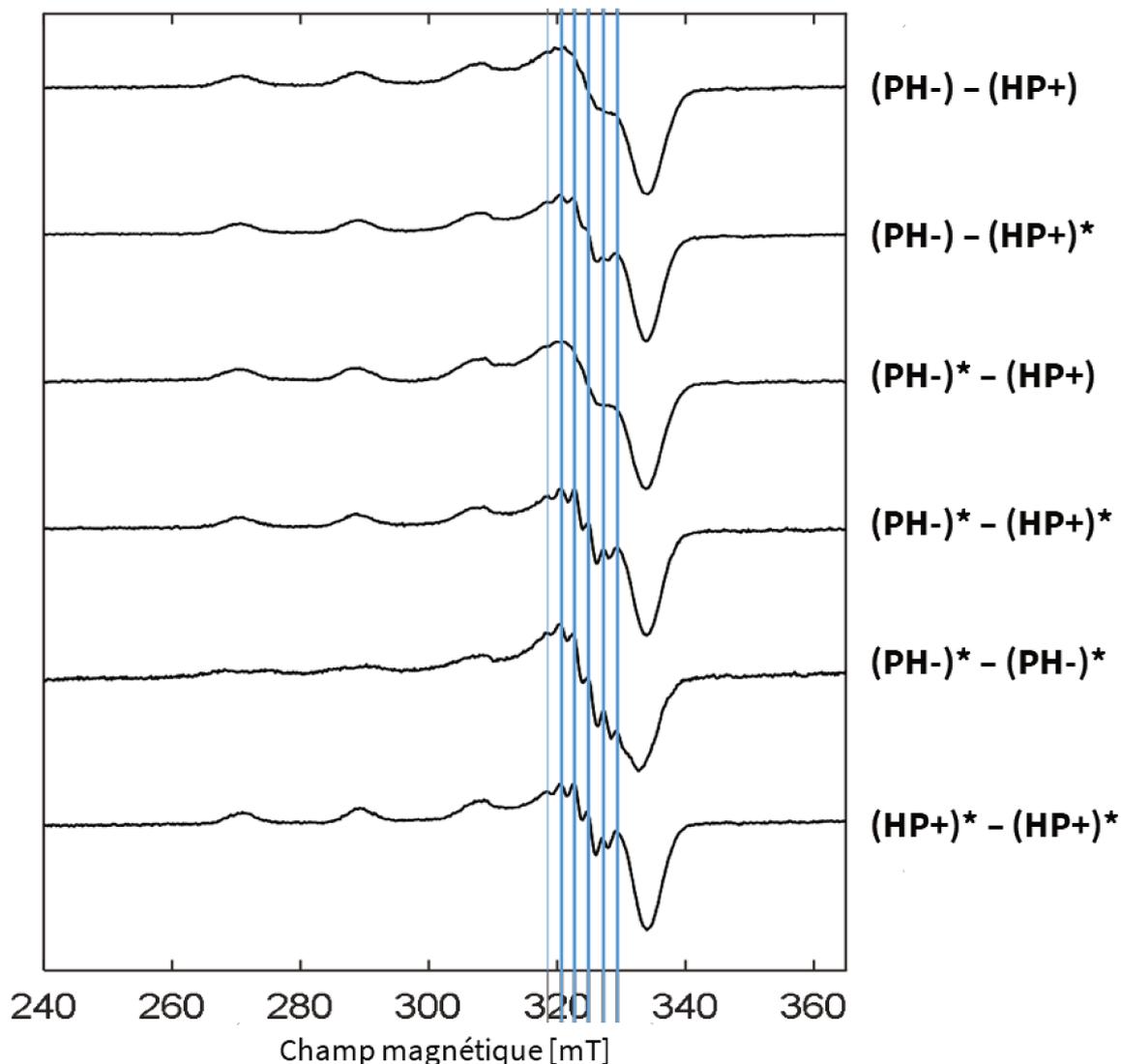


Figure 20 : Spectres RPE du Cu^{II} dans les fibres formées par les peptides marqués et non marqués : $(\text{PH}^-) - (\text{HP}^+)$, $(\text{PH}^-)^* - (\text{HP}^+)$, $(\text{PH}^-) - (\text{HP}^+)^*$, $(\text{PH}^-)^* - (\text{HP}^+)^*$, $(\text{PH}^-)^* - (\text{PH}^-)^*$ et $(\text{HP}^+)^* - (\text{HP}^+)^*$ 3 mM de chaque peptide (sauf pour le peptide seul : 6 mM), 0, 18 équivalent de Cu^{II} , 0,72 équivalent de Zn^{II} , et 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4 en présence de 10 % de glycérol.

La comparaison de $(\text{PH}^-) - (\text{HP}^+)$ et $(\text{PH}^-) - (\text{HP}^+)^*$ montre une coordination de l'histidine du peptide (HP^+) au cuivre dans les fibres, soutenue par l'observation des couplages superhyperfins centrés autour de 325 mT (Figure 20 ligne bleue). Le spectre $(\text{PH}^-)^* - (\text{HP}^+)$ est quasiment identique à $(\text{PH}^-) - (\text{HP}^+)$ mais ne présente pas les mêmes signaux dus aux couplages superhyperfins, ce qui semble indiquer l'absence de coordination de l'histidine du peptide (PH^-) au cuivre. Ces résultats sont en accord avec la liaison largement préférentielle du cuivre au peptide (HP^+) . Visiblement une très faible contribution de structure superhyperfine du peptide (PH^-) est observable dans l'échantillon $(\text{PH}^-)^* - (\text{HP}^+)$. Les deux spectres du cuivre avec un seul peptide (Figure 20 les deux spectres du bas) montrent une structure superhyperfine de la bande du cuivre, confirmant que l'histidine de (PH^-) est coordonnée à celui-ci. L'échantillon $(\text{PH}^-)^* - (\text{HP}^+)^*$ a montré un signal similaire à l'échantillon $(\text{PH}^-) - (\text{HP}^+)^*$ et un mélange du signal de cuivre de (PH^-) et (HP^+) n'a pas été observé.

Cette analyse, en accord avec la spectroscopie RAMAN, soutient la liaison de l'histidine du peptide **(HP+)** au cuivre, mais pas celle du peptide **(PH -)**, ou d'une manière minoritaire. Une analyse HYSORE a été réalisée pour obtenir une analyse plus sensible et pour prouver cette hypothèse.

1.2.8 HYSORE

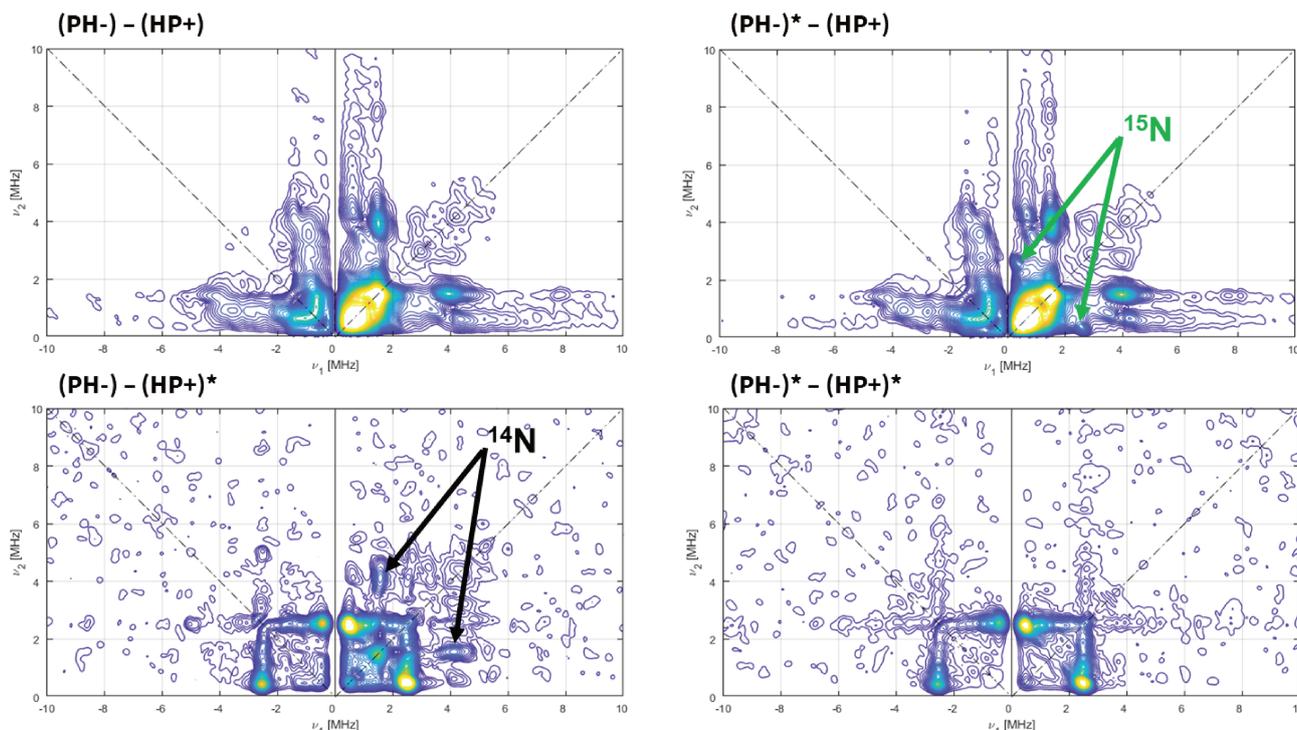


Figure 21 : Analyse HYSORE de **(PH -) - (HP+)**, **(PH -)* - (HP+)**, **(PH -) - (HP+)***, **(PH -)* - (HP+)*** : 3 mM de chaque peptide, 0,18 équivalent de Cu^{II} , 0,72 équivalent de Zn^{II} , et 50 mM de tampon HEPES pH 7,4 en présence de 10 % de glycérol.

L'analyse HYSORE est un spectre RPE 2D montrant les couplages entre le spin nucléaire du ligand et le spin électronique du métal par le biais de l'apparition de taches de corrélation. Dans notre cas, cette analyse a montré un couplage de Cu (II) aux peptides marqués avec ^{15}N -His. La comparaison entre le mélange de peptide marqué et non marqué permettra donc de déterminer les résidus histidine de quels peptides sont coordonnés sur le cuivre. Les échantillons **(PH -) - (HP+)**, **(PH -)* - (HP+)**, **(PH -) - (HP+)*** et **(PH -)* - (HP+)*** avec du cuivre ont été analysés (Figure 21). L'acquisition et l'interprétation des spectres ont été réalisées par le Dr B. Vileno et la Dr N. Le Breton.

Pour l'échantillon **(PH -) - (HP+)** (Figure 21, spectre en haut à gauche) on n'observe pas d'apparition de tache de corrélation entre le cuivre et l' ^{15}N (signal ^{14}N pur) puisqu'aucun des deux peptides utilisés pour la formation des fibres n'est marqué. De même que le spectre de l'échantillon avec les deux peptides **(PH -)*** et **(HP+)*** marqué à l' ^{15}N , on observe uniquement les taches de corrélation du cuivre avec l' ^{15}N , sans pouvoir faire la distinction entre les deux peptides. Pour l'échantillon **(PH -) - (HP+)*** (Figure 21, spectre en bas à gauche), on observe l'apparition de tâches de corrélation intenses qui confirment la coordination de l'histidine du peptide **(HP+)**, mais également une faible tache de corrélation correspondant à une coordination à un ^{14}N provenant du peptide **(PH -)**. Dans l'échantillon **(PH -)* - (HP+)** on observe une forte tache de corrélation pour un couplage avec un ^{14}N qui confirme une nouvelle fois la coordination du peptide **(HP+)** et une faible tache de corrélation avec l' ^{15}N qui traduit une faible, mais bien présente, coordination du peptide **(PH -)**.

Ces analyses ont confirmé la présence majoritaire du peptide **(HP+)** dans la sphère de coordination du Cu^{II} , mais également une coordination en faible proportion de l'histidine du peptide **(PH -)**. Les données indiquent

donc la présence d'une autre espèce que $\text{Cu}^{II}-(\text{HP}^+)_x$ dans le mélange qui possède une coordination du peptide (PH^-) au cuivre et également que cette espèce est présente en faibles proportions.

1.2.9 Proposition de la répartition des espèces présentes en dessous d'un équivalent de cuivre

Les résultats de la spectroscopie Raman nous informent que l'azote de la chaîne latérale de l'histidine du peptide (HP^+) est coordonné via l'azote π ($\text{N}\pi$) (Figure 22). Il est donc très probable que l'amine N-ter soit également coordonnée au cuivre. C'est pourquoi, on propose la coordination en pince (chélate) du peptide (HP^+) via l'amine N-ter et l' $\text{N}\pi$ de l'histidine. De plus, nous partons également du principe que l'affinité du chélate de (HP^+) est plus forte que l'histidine seule du peptide (PH^-). Cette hypothèse est également corroborée par le spectre de l'espèce majoritaire qui est différente du spectre $\text{Cu}^{II}-(\text{PH}^-)$, mais très similaire au spectre $\text{Cu}^{II}-(\text{HP}^+)$. Cependant, les analyses HYSCORE montrent clairement une faible coordination du peptide (PH^-) par le biais de son histidine (coordination analogue à la LPMO). En se basant sur ces résultats, nous proposons deux espèces différentes. L'espèce majoritaire, où le cuivre serait coordonné par le chélate de (HP^+) ainsi que par un autre peptide (HP^+) par le biais de la chaîne secondaire de son histidine ou l'amine N-ter (Figure 22). L'espèce minoritaire où le cuivre serait coordonné par le chélate (HP^+) ainsi que par un autre atome d'azote fourni par l'histidine provenant du peptide (PH^-) (Figure 22). Malheureusement pour nous, ce serait cette espèce minoritaire qui aurait le mode de coordination le plus proche de celui présent dans la LPMO. Dans les deux cas, la sphère de coordination équatoriale est complétée par un quatrième ligand, probablement une molécule d'eau ou le carboxylate d'un glutamate.

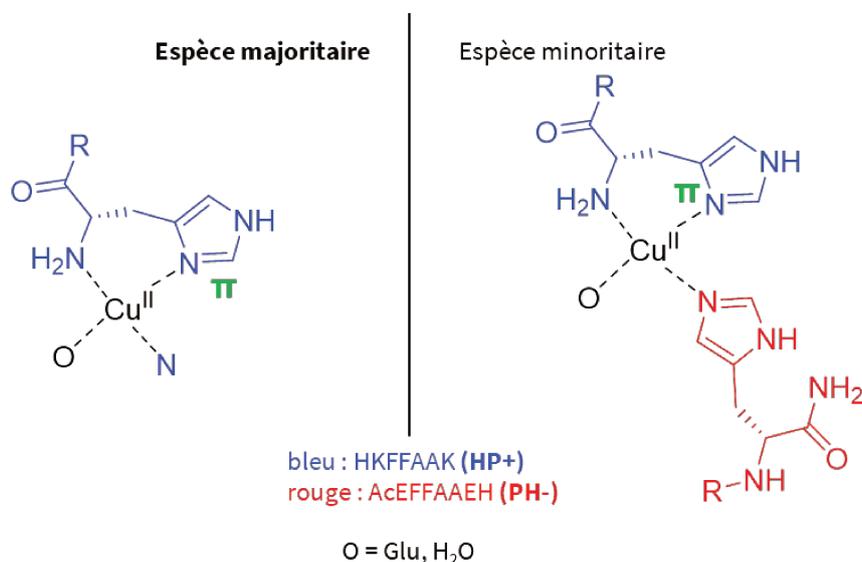


Figure 22 : Spéciation du cuivre (PH^-) - (HP^+) dans les fibres, dans les échantillons avec 0,18 équivalent de Cu^{II} (par rapport à (HP^+)).

La raison de la promotion de la liaison du Cu^{II} à deux (HP^+) n'est pas connue, mais d'après la microscopie électronique et les spectres ATR-FTIR, les peptides dans les fibres (PH^-) - (HP^+) n'adoptent pas exactement la même structure en présence et en l'absence de cuivre. Ce réarrangement induit par l'ion métallique peut expliquer pourquoi l'espèce majoritaire n'est pas le complexe imaginé, mais un homodimère. En outre, si le cuivre est ajouté sur des fibres préformées sans métal, il déclenche un réarrangement qui converge vers la structure (signature ATR-FTIR) des fibres formées avec le cuivre ajouté. Cela indique clairement que l'assemblage avec et sans Cu^{II} est différent. Les raisons possibles peuvent être multiples, comme un déplacement le long de l'interaction de la feuille β entre les deux peptides. Il faut aussi garder à l'esprit que

les fibrilles sont constituées de **(PH -)** - **(HP+)** en trois dimensions, donc deux **(HP+)** peuvent être relativement proches dans l'espace, ce qui pourrait permettre la liaison de Cu^{II} aux histidines de deux **(HP+)**.

Néanmoins, d'après le titrage RPE, on constate que le signal observé est identique de 0 à 1 équivalent de cuivre. Cependant, une fois cette quantité de cuivre dépassée, on constate une modification de la valeur de g des bandes du cuivre ce qui indique une modification des complexes formés. Plus la quantité de cuivre ajoutée se rapproche de 1,5 équivalents, plus le signal tend vers la formation d'une tout autre espèce. Quelques analyses complémentaires devront être réalisées avec 2 équivalents, 2,5 équivalents et 3 équivalents de cuivre par rapport au peptide afin de totalement saturer le complexe en cuivre et ainsi voir apparaître les bandes du Cu^{II} (HEPES) ce qui permettra de confirmer la saturation des sites de coordinations.

1.2.10 Tests catalytiques

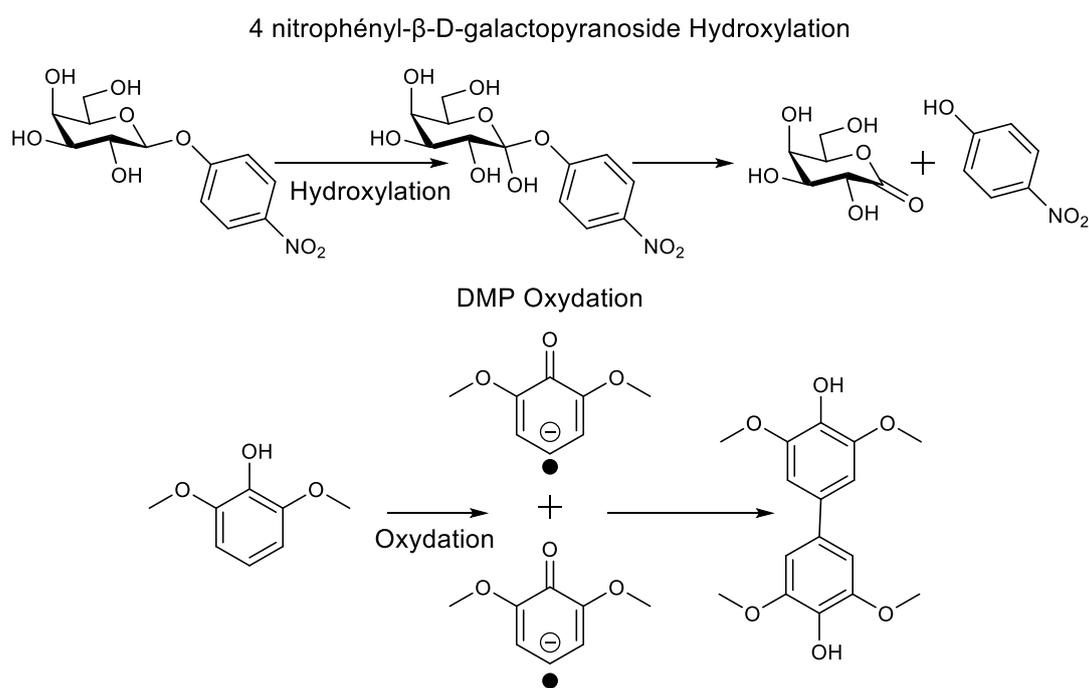


Figure 23 : Substrat et réaction hypothétiquement catalysée par notre complexe

Des tests d'activité catalytique ont également été entrepris afin d'évaluer l'activité du complexe. Le premier substrat testé est le 4 nitrophényl- β -D-galactopyranoside car c'est un composé qui modélise le substrat naturel de l'enzyme : la cellulose. Il est également facile de suivre l'oxydation en spectrophotométrie par le biais du relargage du nitrophénolate qui est optiquement actif avec un maxima à 400 nm ($\epsilon = 12\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Le paranitrophénolate est relargué par le biais de l'oxydation de la liaison C-H du carbone anomérique du β -D-galactopyranoside. Une fois oxydé, le sucre va former une lactone qui va permet de le libérer (Figure 23, schéma réactionnel du haut).

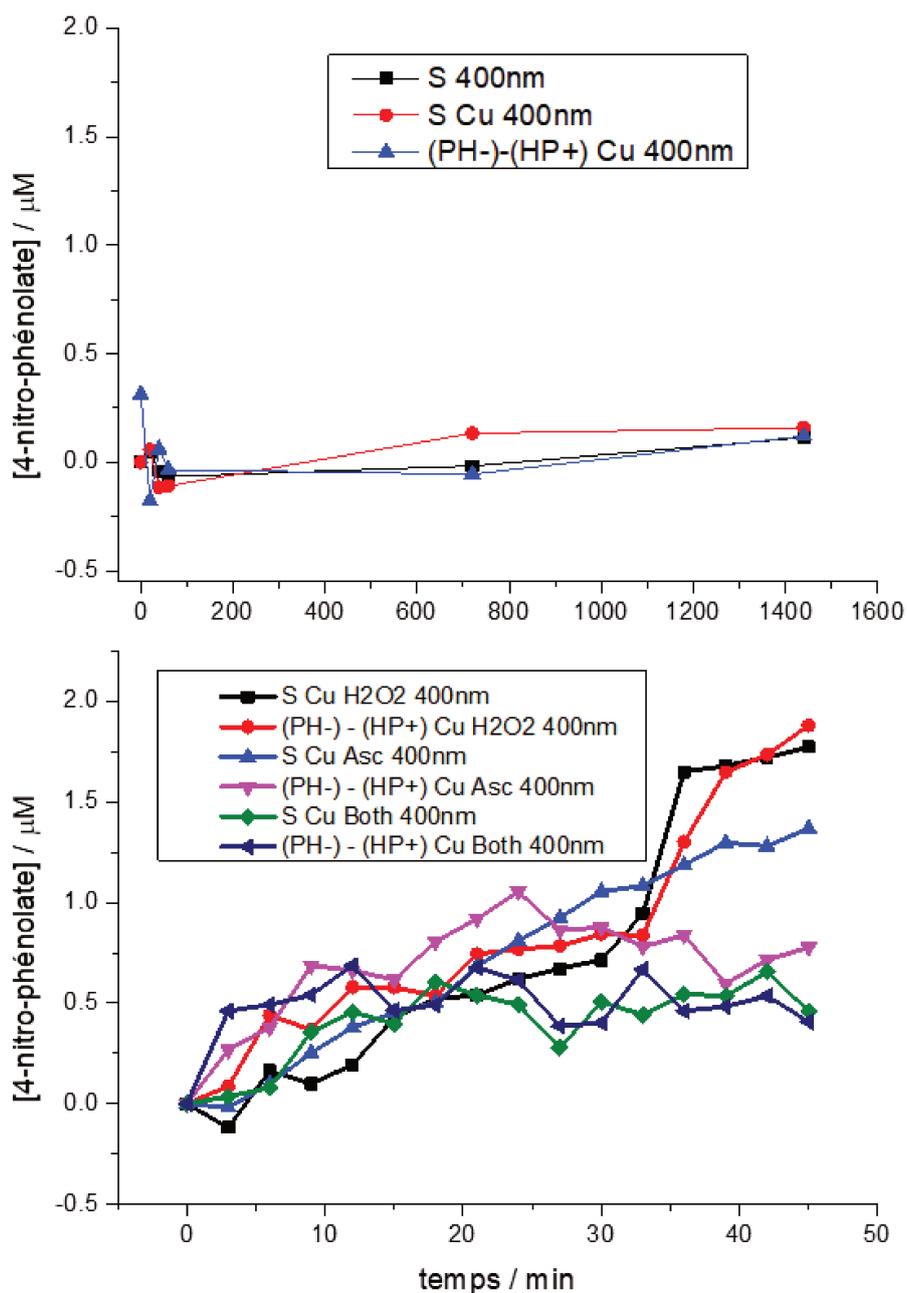


Figure 24 : Suivi de la libération du paranitrophénol, à 400 nm, par oxydation du 4 nitrophényl- β -D-galactopyranoside (S). Graphique du haut, échantillons composés de 200 mM de tampon HEPES à pH 7,4 et de 25 mM de substrat (échantillon « S » courbe noir). L'échantillon « S Cu » (courbe rouge) est contient 0,45 mM de cuivre en plus, et l'échantillon « (PH-) – (HP+) Cu » contient 0,5 mM de (PH-) et de (HP+) en plus. Graphique du bas, échantillons composés de 200 mM de tampon HEPES à pH 7,4, 0,45 mM de cuivre et de 25 mM de substrat. Pour les 3 échantillons avec le mélange (PH-) – (HP+), ils contiennent 0,5 mM de (PH-) et (HP+). Les échantillons « S Cu H₂O₂ » et « S (PH-) – (HP+) Cu H₂O₂ » (courbes noir et rouge) contiennent, en plus, 25 mM de H₂O₂. Les échantillons « S Cu Asc » et « S (PH-) – (HP+) Cu Asc » (courbes bleu et mauve) contiennent 25 mM d'acide ascorbique en plus. Les échantillons « S Cu les deux » et « S (PH-) – (HP+) Cu les deux » (courbes verte et bleu foncé) sont composés en plus de 25 mM de H₂O₂ et de 25 mM d'acide ascorbique. Ces conditions sont proches de la littérature.¹⁶⁸

Dans un premier temps, ces analyses ont été réalisées simplement avec le substrat sans oxydant ou réducteur (Figure 24, haut), cependant aucune conversion n'est observée pour tous les échantillons, autant avec le Cu^{II}(HEPES) qu'avec notre complexe Cu^{II} @ (HP+) - (PH-), c'est pourquoi nous avons réalisé le même test en présence d'acide ascorbique et/ou de peroxyde d'hydrogène (Figure 24, bas). Après 45 min d'incubation, en présence de 25 mM de substrat et 450 μM de cuivre, on mesure moins de 2 μM de paranitrophenolate (et

notons que le signal est proche du bruit de fond). De plus, on observe des profils très proches pour toutes les conditions. Nous en concluons qu'aucune conversion du substrat n'est observée. Le système développé et caractérisé ici ne permet donc pas de reproduire l'activité catalytique de la LPMO. Il ne peut donc pas être considéré comme un mime fonctionnel.

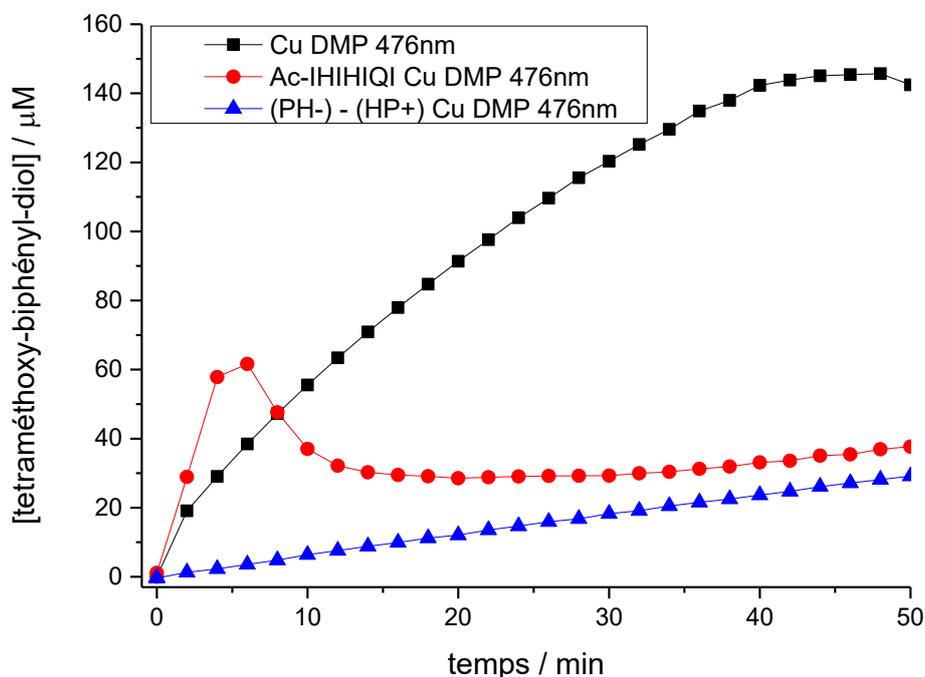


Figure 25 : Suivi de la formation de la 3,3', 5,5' - tetraméthoxy (1,1'- biphényl)-4,4'-diol, à 476 nm, lors de l'oxydation de la DMP. Conditions : 10 µM de cuivre, 21 µM de peptide [Ac-IHIIHQI-NH₂ ou (PH-) - (HP+)], 22,5 mM de tampon HEPES pH 8 et 200 µM de DMP (V_{tot} : 100 µL). Ce sont les mêmes conditions d'analyse que celles appliquées par l'équipe du Pr Korendovych.

Un second substrat a été utilisé, le 2,6-diméthoxyphénol dont on suit l'oxydation, ie la production de la 3,3', 5,5' - tetraméthoxy (1,1'- biphényl)-4,4'- dione, par absorbance à 476 nm ($\epsilon = 17\,033\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).^{36,54,55} L'oxydation à un électron du phénol forme un radical, stabilisé par délocalisation, puis deux de ces radicaux vont se coupler pour former 3,3', 5,5' - tetraméthoxy (1,1'- biphényl)-4,4'- diol (Figure 25 schémas réactionnels du bas).

Ce substrat a été utilisé par l'équipe du professeur Korendovych pour déterminer l'activité catalytique (oxydation) de métalloamyloïdes.³⁶ L'activité observée pour le complexe avec le peptide Ac-IHIIHQI-NH₂ rivalise avec celle produite par la nature.^{31,36} L'utilisation de ce substrat nous a permis de réaliser une comparaison. Avec ce substrat, l'activité de notre système reste plus lente que celle du Cu^{II}(HEPES) et beaucoup plus lente que celle du métalloamyloïde développé par l'équipe du professeur Korendovych.

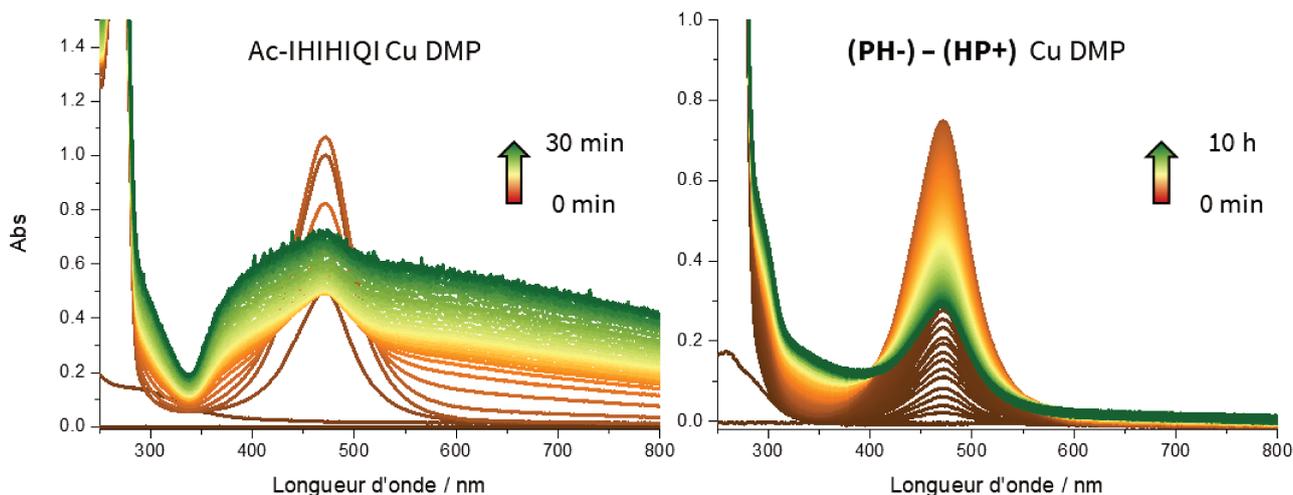


Figure 26 : Spectre spectrophotométrique d'absorption de la formation de 3,3', 5, 5' - tetraméthoxy (1,1'- biphényl)-4,4'- diol lors de l'oxydation du DMP. Conditions : 10 μM de cuivre, 21 μM de peptide [Ac-IHIHIQI-NH₂ ou (PH -) et (HP+)], 22,5 mM de tampon HEPES pH 8 et 200 μM de DMP (V_{tot} : 100 μL). Un spectre acquis toutes les minutes. Ce sont les mêmes conditions d'analyse que celles utilisées par l'équipe du Pr Korendovych.³¹

On constate que la conversion est nettement plus rapide pour le métalloamyloïde de l'équipe du Pr Korendovych que pour notre complexe, malgré l'apparition de produit secondaire nettement plus rapidement que pour (PH -) -Cu^{II} -(HP+).

Le métalloamyloïde (Figure 26, spectre de gauche) conduit à la formation de plusieurs produits. Il convertit rapidement le DMP en un produit, très probablement le diol, qui à son tour est consommé, pour donner divers autres produits non identifiés. On observe également une augmentation drastique de la ligne de base (probablement dû à la formation d'un précipité, visible à l'œil en fin d'expérience). Pour notre complexe (Figure 26 spectre de droite), on constate l'apparition du même produit primaire, le diol, cependant la conversion du DMP en diol et beaucoup plus lente que pour le métalloamyloïde du Pr Korendovych. Pour le complexe (PH -) -Cu^{II} -(HP+), une forte augmentation de la ligne de base n'est pas observée. Cependant, on observe également l'apparition de produit non identifié différent de ceux observés pour le métalloamyloïde.³¹

D'après l'évolution du spectre d'absorption du mélange et son profil (Figure 26), notre complexe induit la formation d'un mélange de produits différents du métalloamyloïde de l'équipe du professeur Korendovych. Les produits obtenus n'ont pas été caractérisés, cependant, le spectre d'absorbance ainsi que les observations de précipitation dans la cuve UV pour le complexe Ac-IHIHIQI-NH₂ nous permettent d'émettre l'hypothèse que chaque complexe forme un mélange de produits différents et que le complexe Ac-IHIHIQI-NH₂ induit la formation d'un polymère du 3,3', 5, 5' - tetraméthoxy (1,1'- biphényl)-4,4'- diol.^{31,36}

1.3 CONCLUSION

Les résultats présentés ci-dessus décrivent la conception d'un assemblage contrôlé de deux peptides (**PH -**) et (**HP+**), de charge opposée, avec un ion Cu^{II} . En effet, à 0,5 mM de chaque peptide, seule la combinaison des trois partenaires [(**PH -**), (**HP+**) et Cu^{II}] a permis d'obtenir des agrégats. Les deux peptides choisis nous ont permis de pouvoir contrôler le processus d'assemblage. En effet, l'autoassemblage se réalise uniquement quand les peptides sont en présence l'un de l'autre. Ces agrégats étaient conçus pour rigidifier l'autoassemblage et ainsi favoriser la coordination du cuivre dans le site « Histidine brace » développé.

Le but de ce projet était d'appliquer l'approche du professeur Korendovych appelée « minimalist protein design »³¹ afin de développer un mime de la LPMO. Dans ce système, les deux histidines (non équivalentes) du site « Histidine brace » de l'enzyme sont apportées par deux peptides différents. Afin de pouvoir contrôler la préformation du site de coordination du cuivre, deux séquences peptidiques courtes complémentaires capables de s'assembler uniquement en présence l'un de l'autre en feuillet β antiparallèles ont été recherchées dans la littérature. Les deux séquences trouvées sont (**P+**) et (**P -**) qui, après avoir été fonctionnalisées judicieusement par une histidine (une histidine sur chaque peptide, à une extrémité différente) amène à la production de deux nouveaux peptides (**PH -**) et (**HP+**). Le mélange de ces deux peptides ainsi que du Cu^{II} a conduit à la formation de fibres avec le Cu^{II} coordonné au moins à la pince apportée par le peptide (HP+). La morphologie des fibres a été analysée par MET. La structure secondaire adoptée par les peptides a été investiguée par le biais de la spectroscopie vibrationnelle. Les spectroscopies RPE, Raman et HYSCORE ont permis d'émettre des hypothèses plausibles sur la sphère de coordination du cuivre et la spéciation.

Finalement, les tests catalytiques montrent que ce système, inspiré par la LPMO, n'en est pas un mime fonctionnel. Néanmoins, l'activité de ce système pourra être investiguée pour d'autres types de réactions.

CHAPITRE 2

2.1 INTRODUCTION

2.1.1 Métaux en biologie

Pour le bon fonctionnement d'un organisme vivant, toute une série d'éléments est absolument indispensable. Les métaux tels que Mn, Fe, Zn, Se, Co et Mo le sont, malgré la faible quantité de ces éléments retrouvée dans les différents organismes (mammifère, bactérie, levure, virus... etc.). Les métaux de transitions sont essentiels (Tableau 4), car impliqués dans une série de mécanismes biologiques vitaux tels que la catalyse enzymatique, la structuration de protéines, la formation des os ou encore comme messenger.⁵⁶

Éléments	Quantité (g)
Ca	1000
K	140
Na	100
Mg	30
Fe	5
Zn	2
Cu	0,1
Mn	0,016
Mo	0,005
Co	0,002

Tableau 4 : Tableau représentant les ions métalliques essentiels chez l'Homme (pour un homme de 70 kg)⁵⁶

Chez l'Homme, le fer est un élément principalement utilisé pour transporter le dioxygène, pour réaliser des réactions redox (catalyse) et transporter des électrons.⁵⁶ Les deux tiers des ions fer circulent dans l'hémoglobine des globules rouges et 300 mg est contenu dans la myoglobine des muscles. La majeure partie du fer plasmatique est dirigée vers la moelle osseuse pour l'érythropoïèse.

2.1.2 Chimie du fer (Fe^{III}) et d'un ion modèle diamagnétique : le gallium (Ga^{III})

2.1.2.1 Fer

Le fer possède les propriétés chimiques intéressantes pour le vivant, il peut facilement changer d'état d'oxydation en fonction de son environnement chimique et ainsi permettre de réaliser des réactions d'oxydoréduction. Il est composé de 26 électrons arrangés dans la configuration [Ar] 3d⁶4s². Ses deux états d'oxydation les plus stables sont le Fe^{II}, avec comme configuration [Ar] 3d⁶4s⁰ et le Fe^{III}, avec comme configuration [Ar] 3d⁵4s⁰. Le Fe^{III} possède un rayon ionique de 0,067 nm (pour le Fe^{III} haut spin) et il peut adopter quatre géométries en fonction de son degré d'oxydation des ligands qui lui sont associés et du nombre de coordination : octaédrique, trigonal bipyramidale, pyramidale à base carrée, tétraédrique (avec une coordination de 4) et la géométrie la plus souvent retrouvée est octaédrique. Le Fe^{III} est quasiment insoluble dans l'eau et forme des hydroxydes de fer (III) ($K_{sp} = 10^{-39}$ M à pH 7,0, ce qui correspond à une concentration dans l'eau de $[Fe^{3+}] = 10^{-18}$ M à pH 7).⁵⁷ Son potentiel redox (Fe^{III}/Fe^{II}) est de 0,77 V.

2.1.2.2 Gallium

Le gallium est un élément possédant 31 électrons et possède une configuration [Ar] 3d¹⁰4s²4p¹. Son état d'oxydation le plus stable est le Ga^{III} avec comme configuration [Ar] 3d¹⁰4s⁰4p⁰. Il possède un rayon ionique de 0,062 nm, très proche de celui du Fe^{III}. Le Ga^{III} et le Fe^{III} sont des acides de Lewis dure selon la classification de Pearson.⁵⁸ De plus, il est d¹⁰ et ne possède pas d'énergie de stabilisation du champ des ligands (LFSE) et peut donc s'adapter à différentes géométries. Ses propriétés de coordination sont également proches de celles du fer, ce qui permet au Ga^{III} de se fixer fortement sur des sites de fixation du Fe^{III} dans les protéines ou sidérophore et éventuellement remplacer les ions ferriques dans les organismes vivants.⁵⁹ Le potentiel redox

du fer ($\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$) est de 0,77 V tandis que celui du gallium ($\text{Ga}^{\text{III}}/\text{Ga}^0$) est de -0,56 V.⁶⁰ Il diffère également par son incapacité à changer de degré d'oxydation (virtuellement irréductible en conditions physiologiques) et le rend ainsi incapable de participer à des réactions d'oxydoréduction, contrairement au Fe^{II} . Cette particularité empêche l'ions Ga^{III} de remplacer l'ion Fe^{II} dans l'hème. Il permet également d'inactiver la fonction d'enzymes par remplacement du cofacteur Fe^{II} par du Ga^{III} .⁵⁹

2.1.3 Homéostasie et toxicité

2.1.3.1 Toxicité du Fer

La réaction de Fenton (Figure 27) illustre la capacité du fer à générer des espèces radicalaires hautement réactives. Le fer, en cas d'excès dans l'organisme, peut réagir avec l'oxygène et causer un stress oxydant. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) ainsi produites réagissent avec diverses molécules essentielles telles que les acides nucléiques, protéines et lipides.⁵⁷ C'est pour cette raison qu'il ne faut pas de fer libre dans l'organisme, il faut qu'il soit toujours pris en charge (coordonné).

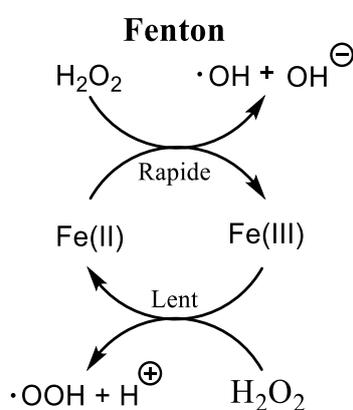


Figure 27 : Réaction de Fenton. Rapide : 30 s - 1 min ; Lent : quelques minutes.⁶¹

Les organismes vivants ont développé des ligands très affins pour le fer. Premièrement, cela leur permet d'éviter la formation d'oxyde de fer qui possède une très faible solubilité en solution aqueuse (précipitation) et permet donc de le rendre disponible pour les organismes, permettant de l'acquérir, même dans un milieu pauvre en fer. Deuxièmement, cela empêche aussi des réactions non contrôlées (ex. Fenton) afin de limiter la toxicité de cet ion. Ces ligands permettent d'utiliser les capacités oxydoréductrices du fer à des fins catalytiques contrôlées.⁶²

2.1.3.2 Importance de l'homéostasie du fer

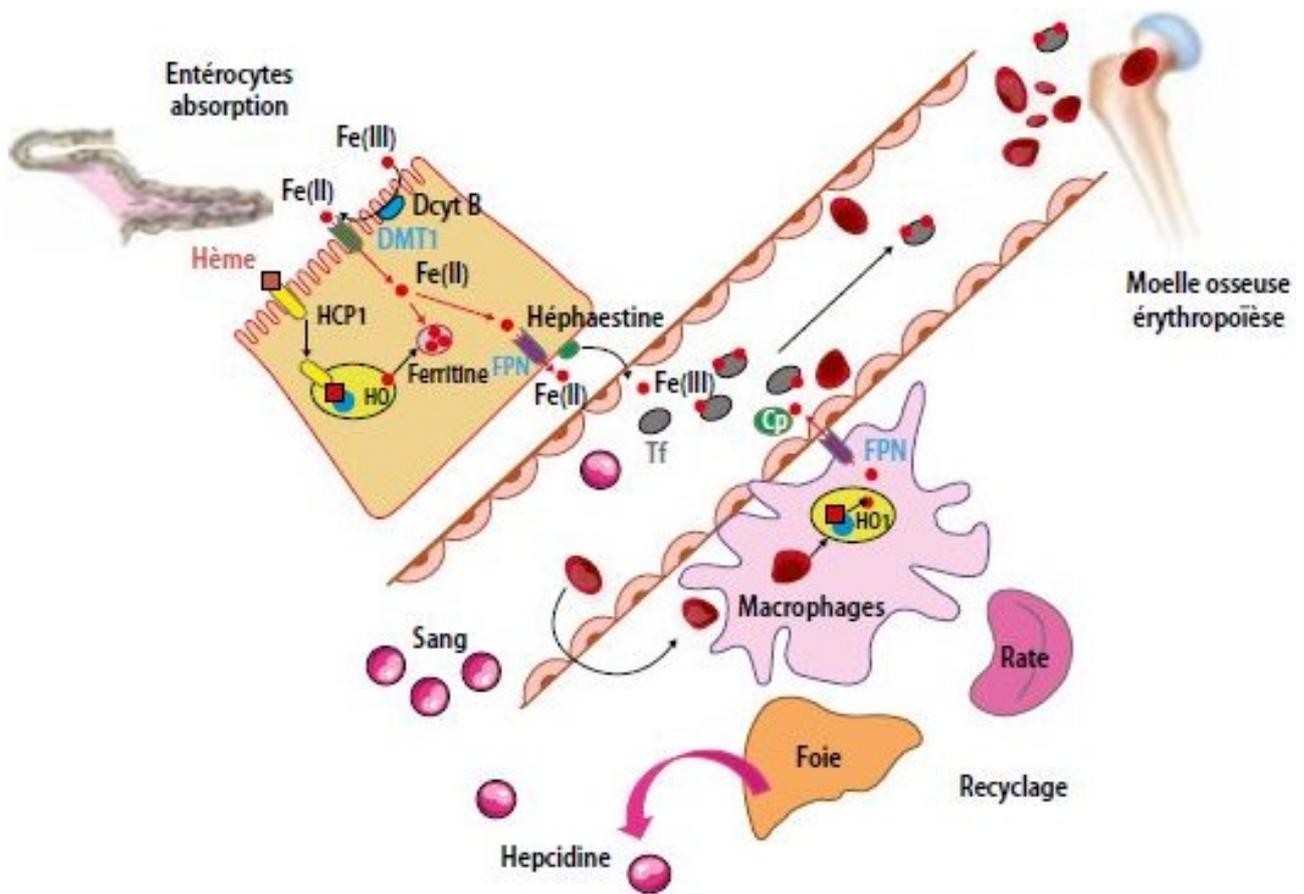


Figure 28 : L'homéostasie du fer au niveau moléculaire. Le fer est absorbé dans l'intestin par les entérocytes. Une fois réduit et introduit dans l'entérocyte, il est soit stocké dans une ferritine ou transféré après oxydation, traversée la membrane et coordonne à la transferrine dans le système circulatoire pour être distribué dans tout l'organisme. (Figure extraite de la référence ⁶³)

Le fer ainsi que son homéostasie sont essentiels au bon fonctionnement des organismes vivants. Il est essentiellement utilisé pour assurer le transport d'oxygène et catalyser des réactions de transfert d'électrons, de fixation d'azote ou de synthèse d'ADN. Un déficit ou un excès de fer peuvent être d'origine héréditaire ou acquise, et conduire à de nombreuses maladies. ^{63,64}

Dans des conditions physiologiques normales, près des trois quarts du fer corporel se trouvent sous forme d'hémoglobine, le reste étant stocké de manière intracellulaire sous forme de ferritine ou lié à des protéines extracellulaires ainsi que dans les enzymes à fer (intracellulaires). ⁶⁵ Le taux sérique normal de fer est de 10-30 μM lié à la transferrine, ce qui donne entre 12 et 50 % de saturation de la capacité de fixation du fer sur la transferrine (60-75 μM), des taux plus élevés sont symptomatiques d'une surcharge en fer. ^{63,66,67}

Le maintien de concentrations stables en fer, intracellulaires et extracellulaires, nécessite la régulation coordonnée du transport du fer dans le plasma à partir de sources alimentaires absorbées dans le duodénum, à partir des globules rouges sénescents recyclés par les macrophages et de son stockage dans les hépatocytes. Le fer est stocké dans la moelle osseuse, le foie et la rate, dans des protéines appelées ferritine et hémossidérine (la dernière est plus lente à restituer son fer). Quand l'érythropoïétine stimule la production de globules rouges, le fer est lié à la transferrine pour être transporté à la moelle osseuse par le sang (Figure 28). ⁶⁸

C'est pourquoi, la régulation est essentielle afin de conserver une quantité de fer optimale dans tout l'organisme. Chez les mammifères, ce rôle est joué par l'hépcidine produite par le foie et qui permet d'exprimer ou réprimer les protéines de transport du fer et ainsi réguler efficacement le fer dans l'organisme en cas de carence ou de surcharge (Figure 28). ^{57,69,70}

2.1.3.3 Toxicité du gallium

Le gallium n'est pas un ion métallique essentiel, cependant, il est connu pour avoir tendance à déréguler l'homéostasie du fer des organismes vivants. Surtout, le gallium n'ayant pas les mêmes propriétés redox que le fer, il rend inactives les enzymes desquelles il remplace le métal.⁵⁹

Pour les bactéries, le gallium peut être difficilement différencié du fer car il est internalisé par les mêmes voies d'import que le fer.⁷¹ Il se coordine aux sidérophores puis est internalisé par le biais d'un récepteur membranaire. Une fois introduit dans la bactérie, il se comporte principalement comme un mime du fer et va le remplacer directement dans les enzymes, les rendant inactives, ce qui finit par induire la mort bactérienne. Il peut également induire une perturbation de l'homéostasie de fer de la bactérie par appauvrissement de sa quantité de fer disponible et ainsi inhiber l'activité de certaines enzymes. Des travaux récents démontrent le potentiel thérapeutique du gallium comme substance antibactérienne, malgré la toxicité induite sur les êtres humains.^{72,73}

Pour les mammifères, le gallium perturbe l'homéostasie du fer dès son introduction dans l'organisme. Il est importé via les mêmes voies que celles du fer. En effet, il sera coordonné par la transferrine, diminuant la quantité de fer disponible, et conduisant à l'inactivation d'enzymes (ex. diminution de la production d'hémoglobine ou encore perte de l'activité de la ribonucléotide réductase). Une fois dans la cellule, le gallium peut agir sur la mitochondrie par activation d'une protéine proapoptotique et induire l'apoptose de la cellule.⁷²

Cependant, une étude toxicologique doit être réalisée sur les complexes pour connaître leurs DL₅₀ (dose létale pour tuer 50% des individus d'un groupe d'animaux) afin de déterminer leurs toxicités. C'est pourquoi différentes substances à base de gallium ont été utilisées comme le nitrate de gallium (utilisé comme traitement pour l'hypercalcémie avec une DL₅₀ pour la souris estimée à 80 mg/kg⁷⁴), le citrate de gallium (en cours de développement, utilisé comme anti-infectieux avec une DL₅₀ pour la souris de 2,23 g/kg⁷⁵), le maltolate de gallium (utilisé comme traitement contre les lymphomes avec un DL₅₀ pour la souris supérieure à 500 mg/kg⁷⁶) et le tris(8-hydroxyquinoléinate) de gallium (en cours de test préclinique avec un DL₅₀ pour la souris de 2,9 g/kg⁷⁶).^{72,76}

2.1.4 Le fer dans le corps humain

Comme mentionné plus haut, la réactivité du fer est modulée par les ligands qui lui sont coordonnés (ex. chaînes latérales d'acides aminés dans les protéines) ce qui permet de moduler très finement le potentiel redox du fer et ainsi permettre une catalyse très diversifiée.⁷⁷ Le rôle du fer peut donc être décrit par le biais de toutes les familles d'enzymes à fer présentes dans notre organisme. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à deux types d'organismes, l'Homme et les bactéries.⁵⁷

2.1.4.1 Les hémoprotéines

Les hémoprotéines possèdent trois sous-classes. La première est constituée des transporteurs d'oxygène (eg hémoglobine, myoglobine), la seconde, des activateurs d'oxygène moléculaires (eg cytochromes oxydases, cytochromes P450, catalases et peroxydases) et la troisième, des protéines de transport électronique (eg cytochromes *a*, *b* et *c*).⁵⁷

2.1.4.2 Les protéines fer-soufre (Fe-S)

Les protéines Fe-S sont composées d'un cluster Fe-S qui sert de donneur ou d'accepteur d'électrons dans une large variété de réactions biologique (large plage de potentiel redox). Cependant, dans certains cas, ils peuvent aussi former des sites catalytiques.⁵⁷

2.1.4.3 Les protéines non hémiques et non Fe-S

La troisième famille est très hétérogène et regroupe les protéines où le fer n'est ni dans un hème ni dans un cluster Fe-S. Cette famille peut elle aussi être divisée en deux sous-familles, les enzymes mononucléaires à fer non-hémique (eg oxygénases, dioxygénases, hydroxylases) et les enzymes binucléaires à fer non-hémique (eg ribonucléotide réductase, désaturase). La particularité de cette classe est la formation d'un centre bimétallique qui favorise la coordination et l'activation du dioxygène.⁵⁷

2.1.4.4 Les protéines de stockage, du métabolisme et transport du fer

La dernière famille est composée des protéines de stockage, telles que la ferritine et des protéines de transport comme les transferrines.⁵⁷ 25 % du fer est stocké dans des ferritines ou autres protéines de stockage du fer, ce qui correspond à une réserve de fer disponible à tout moment.

2.1.4.4.1 La transferrine

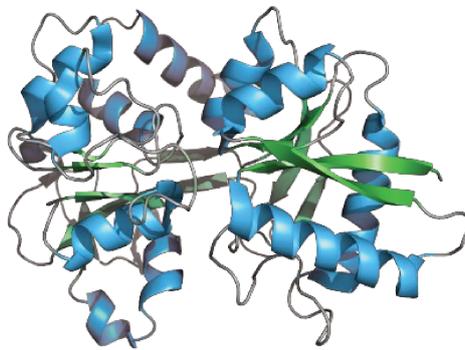


Figure 29 : Structure de la transferrine du sérum humain (PDB: 1d3k)

La transferrine est une protéine d'environ 80 kDa avec une concentration sanguine comprise entre 2 et 4 g/L, elle est composée d'une chaîne unique de 680 acides aminés.⁵⁷ C'est une protéine soluble composée de deux sites de coordination du fer (une dans chaque lobe (Figure 29)) et de deux sites de coordination d'ions carbonate qui se coordonnent synergiquement avec les ions Fe^{III} (augmente grandement l'affinité de la transferrine pour les ions ferriques). Dans cette configuration, la transferrine a un pFe^{3+} d'environ 22-24 (définition du pFe^{3+} disponible dans la partie 2.1.6.1).⁷⁸

Dans un premier temps, le fer absorbé de notre alimentation est récupéré par les entérocytes de notre intestin afin d'être distribué, après oxydation, dans le système circulatoire. L'apotransferrine va lier deux ions Fe^{III} pour devenir la transferrine. C'est une fois sous cette forme que les ions ferriques sont distribués dans tout l'organisme par le biais du sang et libérés aux besoins.⁵⁷ Une fois la transferrine reconnue par un récepteur TfRs le complexe est endocyté, l'endosome est acidifié afin de pouvoir libérer les deux ions du complexe transferrine/TfRs. Une fois les ions libérés dans l'endosome, ceux-ci sont réduits à l'aide d'une ferriréductase en ions ferreux, avant d'être relargués dans le cytosol de la cellule par le biais d'un transporteur des ions Fe^{II} (DMT1).⁵⁷

2.1.4.4.2 La ferritine

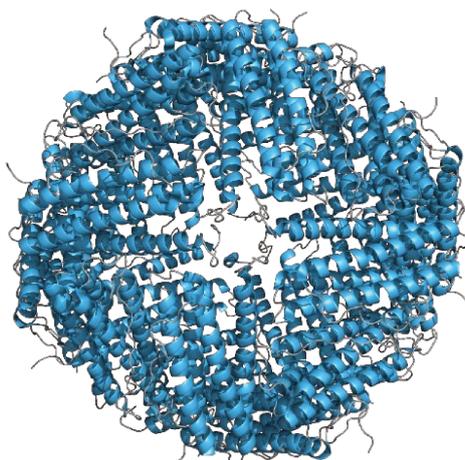


Figure 30 : Structure de la ferritine humaine (PDB : 3xh2)

L'apoferritine (ferritine sans fer) est la protéine majeure dans le stockage intracellulaire du fer. C'est une protéine composée de 24 sous-unités pour un poids moléculaire de 450 kDa chez l'Humain (les bactéries possèdent des « ferritine-like » protéines, telles que les bactérioferritine).⁷⁹ La ferritine Humaine est composée de deux sous-unités différentes, la sous-unité H de 21 kDa et 182 acides aminés et la sous-unité L de 18,5 kDa et 174 acides aminés (Figure 30). Bien que la ferritine soit une protéine principalement intracellulaire, sa fraction circulante plasmatique est proportionnelle au stock intracellulaire. Sa concentration sérique se situe entre 20 et 200 µg/L et elle sert de protéines de stockage du fer par le biais de sa fonction ferroxidase qui va oxyder le Fe^{II} en Fe^{III} lors de l'internalisation de celui-ci dans le cœur minéral de la ferritine et ainsi le séquestrer par précipitation.⁸⁰

2.1.5 Les bactéries et l'import du Fe^{III}

2.1.5.1 Homéostasie du fer chez les bactéries

L'homéostasie du fer dans les organismes vivants est de première importance car, en cas de déficit l'organisme n'est plus capable de fonctionner correctement (inactivation d'enzyme, anémie, etc.) et au contraire en cas d'excès, des réactions parasites (réaction de fenton) peuvent avoir lieu et déclencher un stress oxydant.^{81,82} Chez la bactérie, deux systèmes de régulation existent. Le premier utilise le facteur de transcription protéique Fur : en cas de surcharge en fer dans la bactérie, Fur aide à promouvoir la production de chélateur de fer afin de détoxifier la bactérie par stockage du fer.⁸³ Le second système utilise un ARN non codant appelé RyhB qui, en cas de carence en fer dans la bactérie, inhibe la production de protéines à fer qui ne sont pas indispensables lors d'une carence, mais utilisées en cas de surcharge (ferritine, superoxyde dismutase).⁸⁴

2.1.5.2 Différence entre les bactéries Gram - et Gram +

Aux vues de l'importance du fer et de sa faible biodisponibilité en conditions aérobies, et allant de 10^{-9} M jusqu'à 10^{-18} M chez l'hôte, les micro-organismes ont dû trouver un moyen efficace pour subvenir à leurs besoins en fer (concentration de 10^{-5} à 10^{-7} M nécessaire pour une croissance optimale⁸⁵). Les bactéries ont également un besoin important en fer pour vivre. C'est pourquoi, elles ont développé différentes stratégies d'acquisition du fer. Ces stratégies varient légèrement entre les bactéries Gram + et Gram - à cause de la morphologie très différente de leurs membranes.⁵⁷

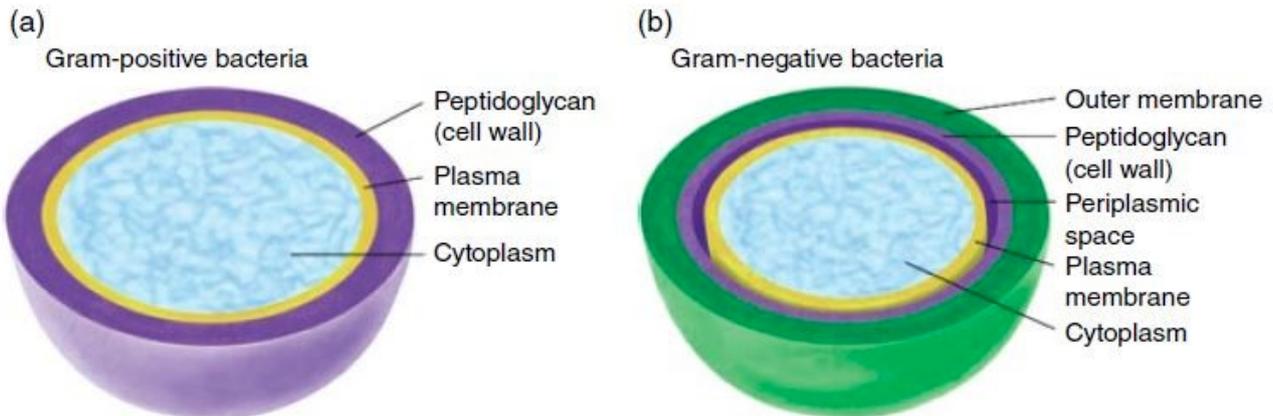


Figure 31 : Structure de la membrane des Gram + et Gram -. (Figure extraite de la référence⁵⁷)

En effet, les bactéries Gram - possède deux membranes, une membrane externe et une membrane interne reliée par le périplasma (Figure 31a) tandis que les Gram + possèdent uniquement une membrane (Figure 31b).⁸⁶

2.1.5.3 Stratégie d'acquisition du fer pour les Gram -

Pour les bactéries Gram -, la majorité des nutriments nécessaires traverse la membrane de la bactérie par diffusion passive ou par le biais de porines (pores transmembranaires de type tonneau- β peu sélectifs avec un débit d'entrée important pour les ions et petites molécules organiques et permettant également leur sortie).⁵⁷

Cependant, en cas de faible disponibilité de fer dans le milieu, celui-ci doit être transporté activement à l'intérieur de la bactérie. Trois mécanismes (pas nécessairement présents chez toutes les bactéries) ont été identifiés. L'acquisition par la transferrine (Figure 32 : schéma rouge) consiste à directement coordonner le Fe^{III} complexé par la transferrine par le biais d'un transporteur transmembranaire et ainsi puiser directement dans le fer en circulation dans l'organisme infecté. L'acquisition par le fer hémique (Figure 32 : schéma bleu) est une stratégie très similaire à la précédente, mais avec une autre source de fer, le fer hémique. Finalement, l'acquisition par les sidérophores (Figure 32 : schéma vert) est une stratégie qui consiste à sécréter des sidérophores (ligands avec une très forte affinité pour le Fe^{III}) dans l'environnement extracellulaire, puis de le récupérer par transport à travers la membrane une fois celui-ci chargé en fer. Cette dernière stratégie sera traitée plus en détail dans la suite du chapitre.^{57,87}

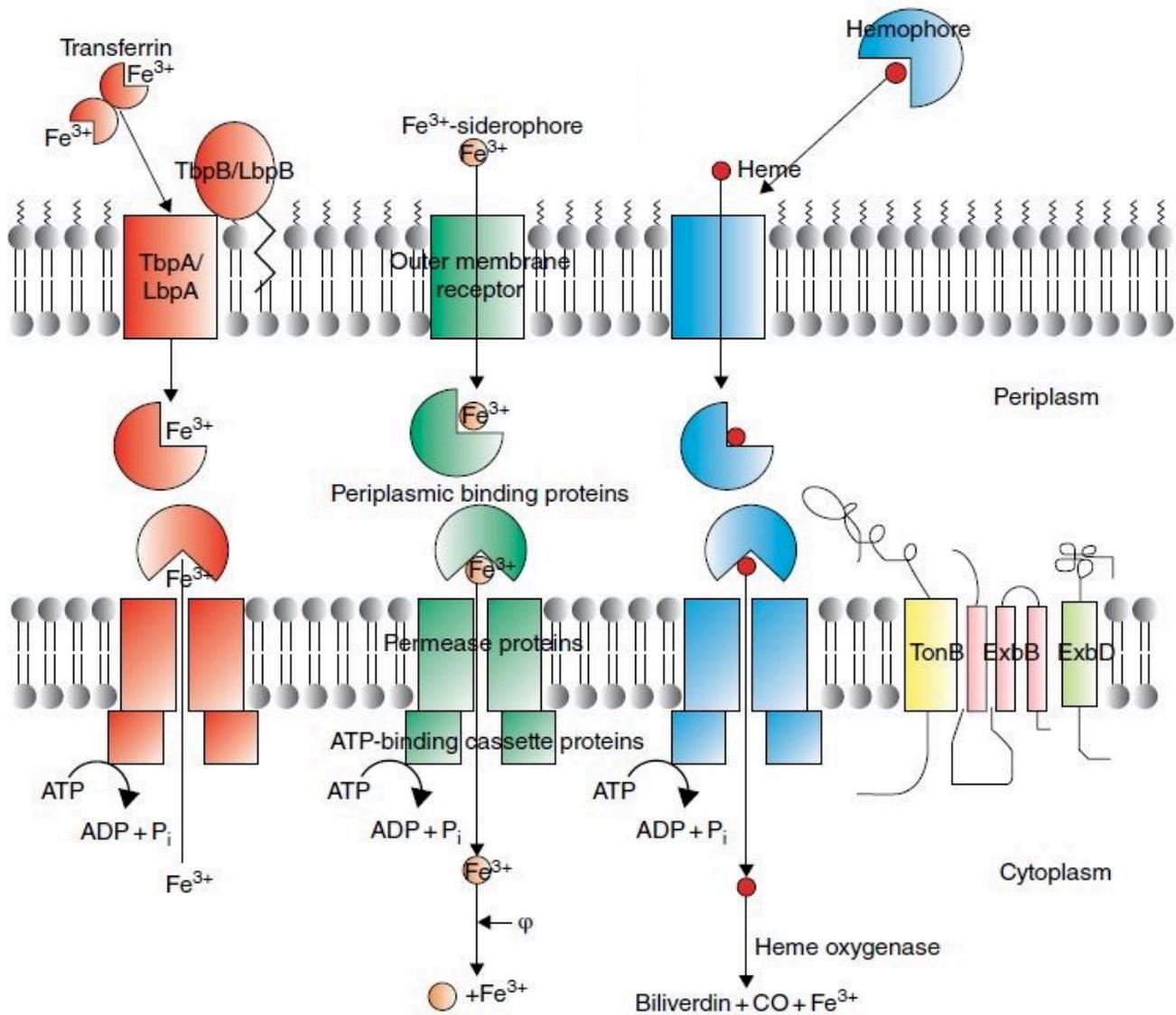


Figure 32 : les différentes stratégies de capture du fer (Gram -). (Figure extraite de la référence ⁵⁷)

Il est important de noter que les bactéries se développant en milieu anaérobie ont également développé une stratégie de capture du Fe^{II} qui ne sera pas discutée dans ce manuscrit. ^{57,87}

Les stratégies d'import du fer basées sur le fer hémique et le fer lié à la transferrine fonctionnent quasiment de la même manière. Un transporteur localisé dans la membrane extérieure de la bactérie Gram - va reconnaître la transferrine chargée (protéines de liaison à la transferrine [Tbdt]) avec un ou deux atomes de fer et va permettre l'entrée du fer par le biais du système tonB (uniquement l'ion pour l'acquisition par la transferrine ; fer avec l'hème pour hémique) dans le périplasm. Une fois dans le périplasm, des protéines périplasmiques vont lier soit le fer seul, soit le complexe hémique, afin de délivrer chaque complexe à son transporteur correspondant. Pour la stratégie transferrine, un transporteur va reconnaître le complexe et par le biais de consommation d'ATP, le fer va être transporté dans le cytoplasme. Pour la stratégie de l'hème, c'est le complexe entier (Fe^{III} (hème)) qui traverse la membrane par le biais d'un transporteur similaire (à l'aide d'ATP). Une fois le complexe hémique introduit dans le cytoplasme, l'ion ferrique est libéré suite à l'oxydation de l'hème par une oxygénase puis tout le Fe^{III} sera réduit en Fe^{II} pour les deux stratégies. ^{57,87,88,89}

2.1.5.4 Stratégie d'acquisition pour les bactéries Gram +

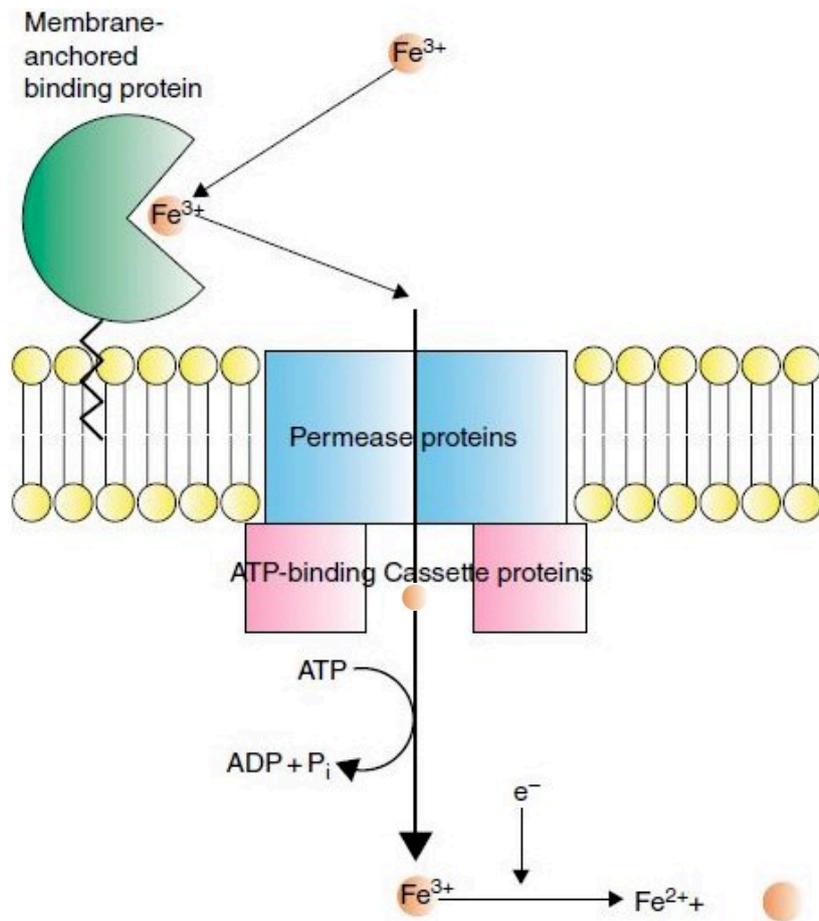


Figure 33 : les différentes stratégies de capture du fer (Gram +), = Complexes Hème, Sidérophore, Transferrine. (Figure extraite de la référence⁵⁷)

Les bactéries Gram +, telles que *Streptomyces pilosus*, possèdent des stratégies d'import de fer similaires à celles des Gram – avec comme différence majeure l'absence d'une seconde membrane et d'un périplasme. En comparaison avec les Gram-, une protéine extramembranaire spécifique à la voie d'acquisition utilisée va reconnaître les complexes (fer-hème, fer-transferrine ou encore fer-sidérophore). Cette protéine va importer le complexe dans la bactérie par le biais d'une perméase associée à elle-même utilisant l'énergie de l'hydrolyse d'ATP. Une fois dans le cytosol, le fer sera dissocié du complexe (sidérophore ou hème) puis réduit en Fe^{II} (Figure 33).^{57,87,90}

2.1.6 Les sidérophores

Les sidérophores du grec *sideros* voulant dire fer et *phores* voulant dire porteur,⁹¹ sont des petites molécules avec une taille comprise entre 200-2000 Da synthétisés par presque tous les organismes procaryotes et eucaryotes.⁹² Ceux qui n'en produisent pas utilisent les sidérophores sécrétés par d'autres microorganismes, qu'on nomme alors xénosidérophores dans ce contexte. Les sidérophores complexent le fer avec une très forte affinité et spécificité. Ils sont synthétisés par voie enzymatique puis excrétés de la bactérie à l'aide des pompe à efflux. Cette famille de molécules est composée de plus de 500 espèces différentes. Cependant, uniquement quatre motifs chimiques différents sont retrouvés dans la quasi-totalité des sidérophores connus en tant que motifs chélatants. Ce sont les hydroxamates, les phénolates, les catécholates et les carboxylates (Figure 34). La valeur de pFe³⁺ des sidérophores se situe sur une plage comprise entre 10 et 35,5.^{57,93}

2.1.6.1 Définition et utilité du pFe^{3+}

Le pM , introduit par K.N. Raymond (JACS 1979 p183), permet de quantifier le pouvoir complexant des chélateurs à pH physiologique. Le potentiel de l'ion Fe^{3+} (pFe^{3+}) est défini comme l'opposé du logarithme de la concentration des ions Fe^{III} libre en solutions ($pFe^{3+} = -\log [Fe^{3+}]$) avec une concentration en ligand de l'ordre de 10^{-5} M et une concentration totale en Fe^{III} de 10^{-6} M à un pH de 7,4. Il est plus pratique d'utiliser le pFe^{3+} lors de la comparaison des affinités de ligand pour le Fe^{3+} à pH physiologique, que les constantes d'affinités de ceux-ci, car il permet de facilement comparer entre eux des complexes de stœchiométries différentes. Il est déterminé sur la base du pK_s et le $\log \beta$ du complexe $Fe^{III}/ligand$. Plus la valeur de pFe^{3+} est élevé, plus l'affinité du ligand pour le Fe^{III} est forte.⁹⁴

2.1.6.2 Affinité des sidérophores pour le Fe^{III}

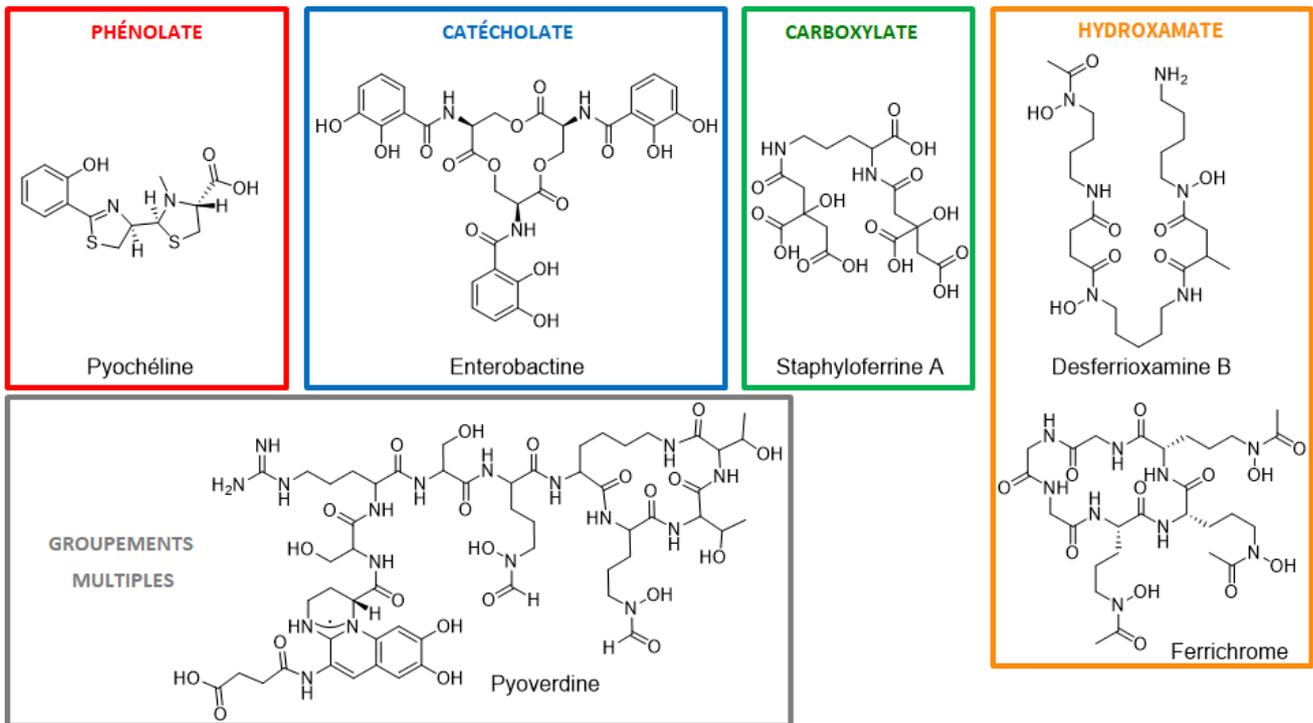


Figure 34 : Illustration des différentes familles de sidérophores par un exemple représentatif.⁹³

Les sidérophores majeurs pouvant être rencontrés chez les bactéries sont les suivants, l'entérobactine ($pFe^{3+} = 35,5$)⁵⁷ et ses dérivés C-glycosylé faisant partie de la famille des catécholates sont les sidérophores les plus couramment utilisés par les entérobactéries telles que *E. coli*, *Klebsiella spp* ou encore *Salmonella enterica* (Fig. 1).⁹⁵ La staphyloferrine A ($pFe^{3+} = 23,6$), faisant partie de la famille des carboxylates, est un sidérophore utilisé par la famille des *Staphylococcus*, telle que la bactérie *Staphylococcus aureus*.⁹⁶ La Desferrioxamine B ($pFe^{3+} = 26,6$), faisant partie de la famille des hydroxamates, est le sidérophore majeur de *Streptomyces pilosus*, une bactérie Gram +.⁹⁷ Les ferrioxamines sont produites par différentes espèces bactériennes. En plus de ces espèces productrices de ferrioxamines, il a été démontré que de nombreuses autres bactéries utilisent également les ferrioxamines.⁹⁸ La desferrioxamine ou desféral est également utilisée comme médicament pour traiter les surcharges de fer chez l'Homme.⁹⁹ Le ferrichrome ($pFe^{3+} = 25,2$) faisant partie lui aussi de la famille des hydroxamates, est un sidérophore synthétisé principalement par des levures telles que les *Penicillium* et les *Aspergillus*.^{57 100} La Pochéline ($pFe^{3+} = 18$), de la famille des phénolates, et la pyoverdine ($pFe^{3+} = 27$), possédant des groupements multiples (hydroxamates et catécholates) sont les deux sidérophores synthétisés par *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 34).¹⁰¹

2.1.6.3 Acquisition du Fe^{III} par les sidérophores

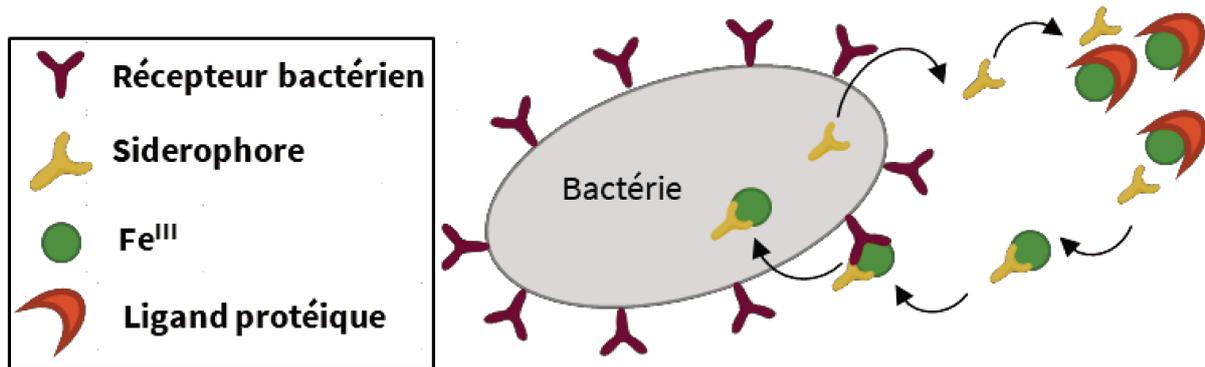


Figure 35 : Stratégie de capture du fer par les sidérophores

La bactérie sécrète les sidérophores dans le milieu afin qu'il chélate le fer de l'environnement (Figure 35). Pour les Gram -, une fois le fer capté (peut venir de différentes sources, selon la localisation de l'infection), le complexe sera reconnu par un récepteur TonB-dépendant de la membrane extérieure, qui permet l'entrée du complexe Fe^{III}-sidérophore à l'intérieur du périplasme. Dans ce compartiment, des protéines périplasmiques vont se lier aux complexes Fe^{III}-sidérophore. Le nouveau complexe formé va migrer vers une perméase, et une fois reconnue par le bon récepteur de la membrane interne, la PBP va relarguer le complexe Fe^{III}-sidérophore à la perméase qui va dissocier le sidérophore et l'ion Fe^{III}. Une fois l'ion Fe^{III} libérée celui-ci est réduit en ion Fe^{II} afin de pouvoir traverser la membrane à l'aide d'hydrolyse d'ATP et de la membrane cytoplasmique (ABC).^{57,102}

Pour les bactéries Gram +, le principe de fonctionnement est un peu différent. Des protéines de reconnaissance sont greffées dans la gangue de peptidoglycane à proximité d'une perméase et vont permettre la reconnaissance du complexe Fe^{III}-sidérophore. Une fois le complexe lié à la protéine ancrée, celle-ci va présenter le complexe Fe^{III}-sidérophore et grâce à l'hydrolyse de l'ATP par le transporteur ABC, le complexe va pouvoir traverser la membrane et entrer dans le cytosol.^{57,103}

Il existe également une autre stratégie d'acquisition du fer commune aux deux types de bactéries se basant également sur les sidérophores. Elle s'appelle le « piratage de sidérophore » et consiste à utiliser des xénosidérophores d'autres bactéries de l'environnement. La bactérie va exprimer sur sa surface bactérienne, des récepteurs spécifiques à certains sidérophores qu'elle est incapable de synthétiser, et ainsi « voler » le fer pour lequel d'autres bactéries environnantes avaient dépensé de l'énergie. Par exemple, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'utiliser la ferrioxamine, tout en étant incapable de synthétiser ce sidérophore.^{57,104,105}

Une fois le complexe Fe^{III}-sidérophore introduit dans le cytosol, il existe deux mécanismes principaux de relargage du fer depuis le sidérophore. Le premier implique une réduction du Fe^{III} en Fe^{II} par des réductases, ce qui affaiblit la liaison fer-sidérophore.^{57,106}

2.1.6.4 Applications humaines des sidérophores

Du fait de leur très forte affinité pour le Fe^{III} , les sidérophores ont trouvé des débouchés dans diverses utilisations. Ils sont utilisés pour traiter des maladies comme la surcharge de fer par le biais de la chélation de l'excès de fer dans l'organisme (ex. Desferrioxamine B).¹⁰⁷ Ils peuvent aussi être utilisés comme biosenseurs où ils servent de récepteur de reconnaissance du fer. Le signal qui en résulte est par la suite converti par un biotransducteur afin de mesurer le signal plus facilement.⁹¹ Les sidérophores peuvent également servir d'agent détoxifiant des métaux lourds qu'ils sont capables de coordonner.¹⁰⁸ Ils sont considérés comme une alternative écologique aux pesticides chimiques utilisés dans l'agriculture.⁹¹ Ils sont aussi utilisés dans des stratégies antimicrobiennes, comme la stratégie « cheval de Troie », qui consiste à faire internaliser le principe actif par la bactérie en le fonctionnalisant avec un sidérophore.^{91,109} Cette stratégie consiste à fonctionnaliser un sidérophore avec un agent antibactérien par le biais d'un espaceur sacrificiel (Figure 36). Ce complexe est introduit dans le milieu, il se charge en fer puis est internalisé par la bactérie utilisant les récepteurs de la voie d'acquisition du fer. Une fois dans le cytosol de la bactérie, l'antibactérien est libéré et va induire la mort de la bactérie.¹¹⁰ Plusieurs stratégies de relargage de l'antimicrobien existent, mais ne seront pas traitées dans ce manuscrit. Les sidérophores sont aussi utilisés comme agent anti-malaria ou encore anti-cancéreux.¹⁰⁶

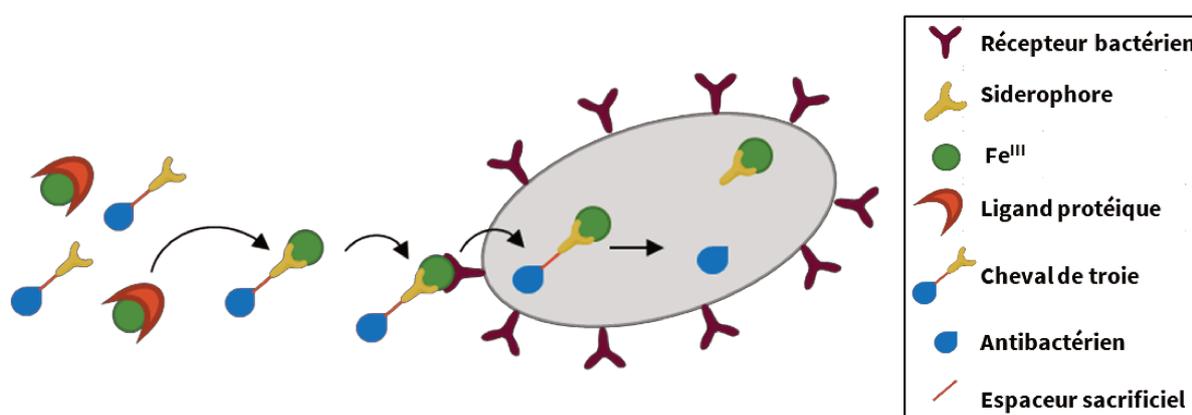


Figure 36 : Stratégie du cheval de Troie à base de sidérophore

2.1.7 *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sera présentée ci-dessous, car elle sera utilisée expérimentalement dans ce chapitre. Cette bactérie Gram – est anaérobie facultative, en forme de bâtonnet et fait partie de la flore intestinale normale chez l'Homme.

Pseudomonas aeruginosa fait partie des trois bactéries les plus fréquemment impliquées dans les maladies nosocomiales et à ce titre, fait partie des pathogènes « ESKAPE » composé de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, les *Enterobacter*,¹¹¹ *Staphylococcus epidermis* et *Candida albicans*, une bactérie et une levure, étant aussi responsables d'infections nosocomiales, mais moins fréquemment.¹¹² *Pseudomonas aeruginosa* peut causer des infections multiples de l'organisme : respiratoire (pneumonie), cutanée, urinaire ou encore ophtalmologique. Cette bactérie est opportuniste et se développe notamment chez les personnes immunodéprimées.¹¹³ Cette souche est également connue pour développer des multirésistances.¹¹¹ En effet, en 2019, 12,1 % de la totalité des infections dues à *Pseudomonas aeruginosa* en Europe ont été déclarées comme étant des souches multirésistantes (souches résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques différents).¹¹⁴ Les cas de PAMR (*Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes) sont en constante hausse depuis les 20 dernières années. L'arsenal thérapeutique disponible pour traiter cette souche s'appauvrit drastiquement et il ne reste plus que quelques substances ayant encore une activité. L'option la plus prometteuse actuellement est l'utilisation de la Colistine (polymyxine ϵ).^{115,116}

Pseudomonas aeruginosa sécrète deux sidérophores, la pyoverdine et la pyocheline. Cependant, elle est également capable d'utiliser des xénosidérophores. Elle possède plus d'une trentaine de gènes, codants chacun pour un récepteur spécifique à un xénosidérophore.¹¹⁷ Elle possède donc la capacité d'utiliser des sidérophores qu'elle est incapable de synthétiser comme l'entérobactine, le ferrichrome, la ferrioxamine ou encore à partir du citrate, en exprimant sur la surface de sa membrane les récepteurs de ces xénosidérophores. Cette particularité permet à *Pseudomonas aeruginosa* d'acquérir le fer efficacement et de manière compétitive dans le cadre d'une infection polymicrobienne et de prendre le dessus sur les autres pathogènes.^{118,119,117}

L'émergence de souches multirésistantes impose le développement de nouvelles molécules étant moins susceptible de développer des résistances. Une famille de molécules étant très prometteuse sont les peptides antimicrobiens (PAM), ils seront présentés dans la suite de ce chapitre.

2.1.8 Les peptides antimicrobiens (PAM)

Les PAM naturels sont des peptides exprimés chez beaucoup d'organismes (champignons, plantes, mammifères, insectes, mollusques, etc...). Ils ont été hautement conservés par l'évolution et jouent le rôle de première ligne défensive.¹²⁰ La plupart d'entre eux agissent en perturbant la cohésion des membranes du pathogène afin de la percer ou de la briser. Ce sont des peptides amphipatiques possédant une charge globale positive qui permet une sélectivité vis-à-vis de la membrane bactérienne chargée négativement, puis allant interagir avec la membrane par le biais des résidus hydrophobes du peptide.¹²¹ Leur toxicité sur les cellules qui les sécrètent est inexistante à des concentrations physiologiques, grâce aux fortes différences de composition des membranes entre les cellules humaines (eucaryotes) et les bactéries ou les levures (procaryotes). Environ 5000 séquences de PAM ont été identifiées (tous organismes confondus) et classifiées en fonction de leurs structures secondaires.¹²²

2.1.8.1 Les familles structurales des PAM

Une classification des PAM par structure permet de distinguer quatre grandes familles (Figure 37).¹²³

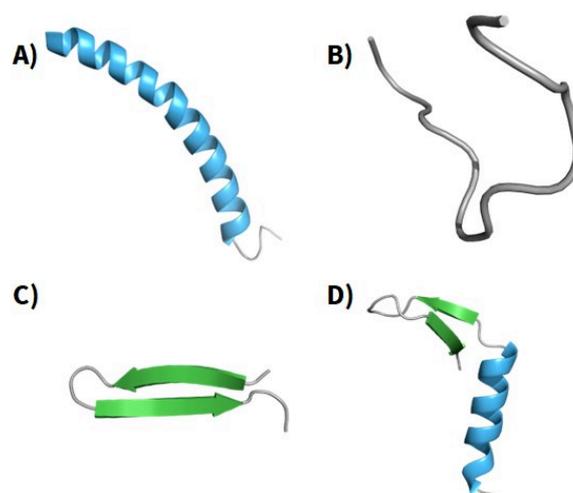


Figure 37 : Classes structurales communes des PAM naturels. A) hélice α (PDB = 2k6o), B) pelote statistique (PDB = 1g89), C) feuillettes β (PDB = 1kfp), D) Structure mixte¹²³

La première famille représente approximativement 30 à 50 % des PAM identifiés à ce jour. C'est la plus grande famille des PAM, ce qui est probablement due à une facilité de synthèse de ce type de séquences, composées de résidus stabilisant la formation d'hélices α . Sous leur forme soluble, ces PAM sont majoritairement non-structurés et nécessitent d'interagir avec une membrane pour se replier en hélice- α et ainsi exercer leur activité antimicrobienne. Toute la séquence n'est pas nécessairement repliée, certaines portions du peptide peuvent rester désordonnées (Figure 37A).^{123,124}

La seconde famille est la plus petite, elle est composée de peptides dont la séquence est dominée par un acide aminé en particulier (tryptophane, histidine, arginine etc....). Les séquences retrouvées dans cette famille étant très variables, une grande variété de structures secondaires sont observables (Figure 37B, aussi bien des structures pures que mixtes).¹²³

La troisième famille est composée de peptides comportant souvent de 1 à 10 cystéines formant de 1 à 5 ponts disulfures. Cependant, la présence d'une ou plusieurs cystéines n'est pas nécessaire à la formation de feuillets β , mais permet une meilleure stabilisation de la structure. Les défensines font partie de cette famille et jouent un rôle essentiel pour les organismes eucaryotes (plantes, champignons, animaux vertébrés, etc....). Contrairement à la première famille qui n'est pas structurée en solution, les défensines adoptent une structuration globulaire en solution stabilisée par des ponts disulfures. Dans quelques cas isolés, le peptide peut aussi avoir une portion non structurée ou en hélice α (Figure 37C).¹²³

La quatrième famille comprend les structures mixtes, c'est-à-dire toutes les structures comportant plusieurs familles structurales, comme la défensine CS $\alpha\beta$ (insecte) qui comporte aussi bien des structures en hélice α qu'en feuillets β (Figure 37D).¹²³

2.1.8.2 Mode de fonctionnement

Comme mentionné plus haut, les PAM sont globalement chargées positivement et c'est cette particularité qui permet la reconnaissance de la membrane bactérienne qui, elle, est chargée négativement. Il est important de noter que la distinction que les PAM font entre les cellules eucaryotes (ex. les mammifères) et procaryotes (ex. les bactéries) est probablement due à la composition en charge négative de la membrane. Les bactéries possèdent un potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi$) 50 % plus élevé que les cellules de mammifère. En effet, un potentiel classique pour une cellule de mammifère est compris entre -90 et -110 mV tandis que les bactéries possèdent un potentiel compris entre -130 et -150 mV. Cette différence est un facteur important qui permettent aux PAM d'avoir une affinité plus élevée pour les cellules pathogènes que pour les cellules hôtes.¹²⁴

Une fois à la surface de la membrane et en particulier pour la famille des hélices α , des réarrangements conformationnels du peptide ont lieu de manière concomitante avec l'insertion du peptide dans la membrane. Les résidus hydrophobes interagissent avec l'environnement apolaire de la membrane, et ainsi réarrangent le peptide en hélice α , afin de réduire un maximum les interactions entre le solvant et les résidus hydrophobes du PAM. Pour la famille des feuillets β avec pont disulfure, les choses diffèrent. Etant déjà structurés en solution, on n'observe pas de réarrangement structural significatif des peptides, mais il peut y avoir une métamérisation des PAM et/ou la formation de structures plus complexes avec la membrane (comme des ports ou canaux) induisant une perméabilisation de celle-ci.^{125,124}

Trois modèles d'interaction avec la membrane ont été proposés (Figure 38) : (a) formation de pores en tonneau, (b) formation de pores toroïdaux et (c) modèle du tapis.

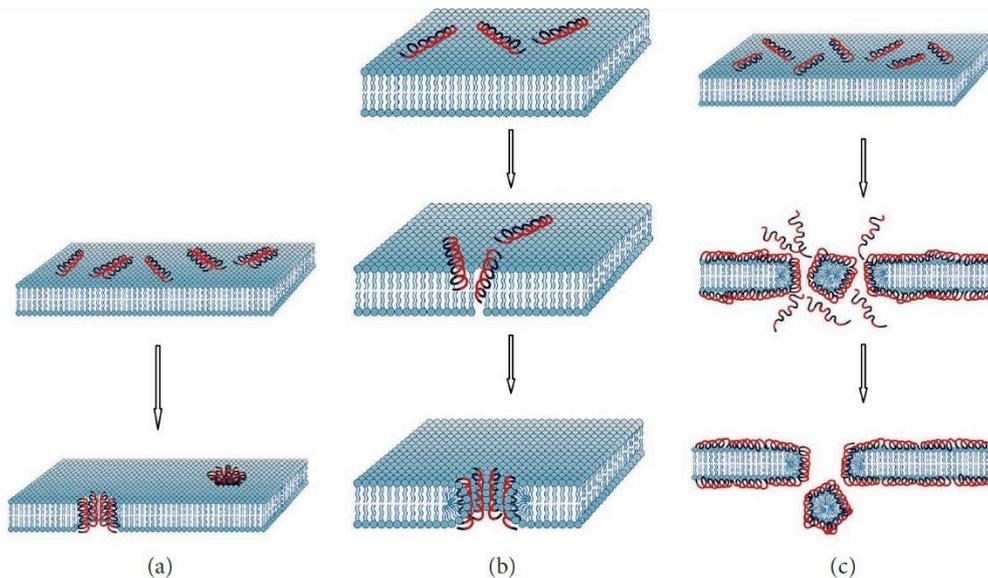


Figure 38 : Modes d'action principaux des PAM. (a) formation de pores en tonneau, (b) formation de pores mixte en tonneau, (c) modèle du tapis. (Figure extraite de la référence ¹²⁴)

Le premier modèle consiste en la formation d'un pore sur le modèle d'un tonneau. Les peptides adsorbés sur la membrane vont migrer, interagir entre eux et s'insérer dans la membrane pour finir par former un pore. Le réarrangement des PAM lors de l'insertion dans la membrane induit une orientation des charges vers l'intérieur du pore, tandis que les résidus hydrophobes sont orientés vers la membrane ainsi que vers les autres zones hydrophobes des PAM présents (Figure 38). ^{124,125}

Le second modèle proposé passe aussi par la formation de pores, mais mixtes, c'est-à-dire avec des phospholipides. Dans ce modèle, les phospholipides séparent chaque peptide et forment ainsi des pores avec une plus faible stabilité que dans le modèle précédent. Dans ce modèle, les PAM ne s'insèrent pas dans la membrane, mais restent sur la surface et induisent une courbure de la membrane, qui, après réarrangement des peptides, forment le pore (Figure 38). ^{124,125}

Le dernier modèle, dit du tapis, a un fonctionnement différent des deux précédents. Dans ce cas, il n'y a pas de formation spécifique de pore, mais une déstabilisation de la fluidité membranaire induite par un déplacement des phospholipides, ce qui a pour conséquence de fragiliser et ainsi disloquer la membrane bactérienne (Figure 38). ^{124,125}

2.1.8.3 Avantages et limites de l'utilisation des PAM

Les principaux intérêts de l'utilisation des PAM (naturels et synthétiques) résident dans leur compatibilité avec notre organisme (faible toxicité sur nos cellules, facilement métabolisable), leur bonne activité antibactérienne de l'ordre du μM pour la plupart (bien que certains soient actifs au nM) et également l'induction d'un faible taux de résistance. En effet, en comparaison aux antibactériens classiques tels que la famille des β -lactames où la résistance de la bactérie apparaît après seulement 14-27 cycles de division cellulaire, la résistance pour les PAM apparaît chez la bactérie après 600-700 cycles de division cellulaire. ¹²⁶ Par exemple, la nisine est un PAM utilisé depuis 1969 comme conservateur alimentaire, il n'a pas conduit aux développements de souches résistantes, ni une augmentation de la sensibilité des hôtes aux infections. ^{127,128} Une explication possible est le fait que, pour devenir résistante pour le(s) PAM, une souche bactérienne doit modifier la composition de sa membrane afin que le PAM ne puisse plus la déstabiliser. De plus, compte tenu de la diversité des familles et de composition des PAM, la résistance développée envers un PAM ou une famille de PAM ne protégera vraisemblablement pas la bactérie contre la totalité des PAM. ¹²⁶

2.1.8.4 Les PAM synthétiques

Plus de 3000 PAM différents ont été identifiés et caractérisés. Cependant, dans leur état naturel, la plupart des PAM ne sont pas appropriés pour le développement de nouveaux médicaments chez l'homme. En effet, les PAM peuvent présenter une toxicité trop élevée pour les cellules humaines, une faible tolérance au milieu salin ou encore une instabilité métabolique qui dégrade le PAM en un peptide ayant une moindre activité antimicrobienne.¹²⁹ Plusieurs méthodes ont été développées afin de développer des PAM synthétiques. La cyclisation du peptide permet une meilleure perméabilité membranaire. La troncation consiste à réduire une séquence connue tout en conservant une activité antimicrobienne. L'hybridation consiste à coupler, par exemple, deux PAM aux propriétés différentes (un PAM avec une faible activité et toxicité avec un PAM avec une forte activité et toxicité). Finalement, il a y aussi eu des exemples design *de novo* de PAM basé sur les propriétés des PAM déjà connues.¹³⁰

Depuis l'isolement des magainines à partir de la peau de grenouille en 1987,¹³¹ de nombreuses tentatives ont été réalisées afin de développer des antibiotiques à partir de PAM naturels. Cependant, malgré les efforts accomplis depuis plus de deux décennies, peu de PAM ont été approuvés actuellement par la FDA.¹²⁹ Les PAM sont sensibles à leur environnement, la présence de protéases, les variations de pH, les variations de température ou de la concentration ionique peuvent influencer sur leur activité ainsi que sur leur stabilité.¹³² La production de peptide à visée industrielle reste également très coûteuse.

2.1.9 Exemples de stratégies d'immobilisation d'antibiotiques sur surface (dont relargage spécifique)

2.1.9.1 Stratégies d'immobilisation d'antibiotiques sur surface

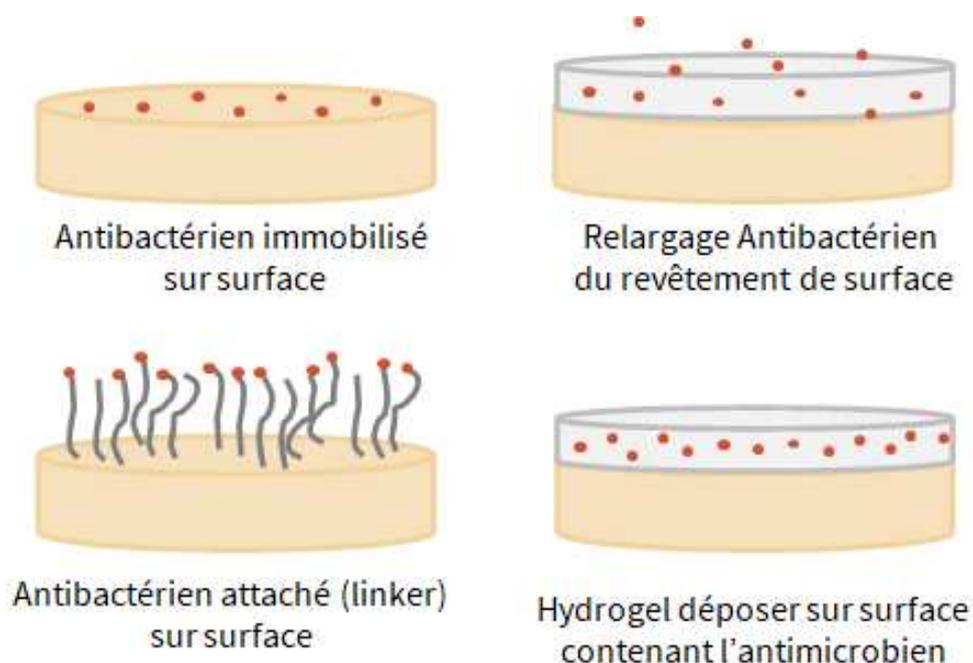


Figure 39 : Les différents types de fonctionnalisations de surface.¹³³

Il existe différentes stratégies d'immobilisation d'antibiotiques sur une surface, la stratégie la plus simple consiste à immobiliser de manière covalente l'antibiotique sur la surface afin de produire un revêtement fixe (Figure 39). Cette méthodologie permet de produire un revêtement de surface immobile sans libération, mais qui empêchera tout développement bactérien sur cette surface (antiadhésive ou « contact killing »).¹³⁴ Dans certains cas, le principe actif nécessite de pénétrer dans le pathogène pour être actif, un espaceur est ajouté entre la surface et le principe actif, comme l'immobilisation de la vancomycine sur une surface (Figure 39).¹³³

Une autre stratégie consiste à fonctionnaliser une surface avec un revêtement laissant diffuser l'antimicrobien en continu (Figure 39), ce qui permet une diffusion localisée aux alentours de l'implant comme dans le cas des implants osseux qui sont recouverts d'un revêtement d'HAP chargé en antimicrobien.¹³³ Cependant, la diffusion est continue, même en absence de pathogène, ce qui induit un temps de vie dans l'organisme plus faible, et une fois tout relargué, la surface se retrouve sans aucune protection et peut laisser place à un développement bactérien.

Une autre stratégie consiste à déposer un revêtement contenant l'antibiotique sur la surface devant être fonctionnalisée. Le revêtement peut être de composition différente afin d'obtenir des propriétés différentes, par exemple, un hydrogel chargé avec un antimicrobien (Figure 39). Dans ce cas-là, l'antimicrobien peut diffuser dans le milieu environnant.

Cette stratégie peut également s'appliquer avec un revêtement étant dégradable, ce qui aura comme conséquence de relarguer en continu le principe actif au fur et à mesure de sa dégradation (libération continue). Cette méthodologie possède les mêmes limitations que la stratégie précédente (hydrogel chargé avec libération pH dépendante). Il est important de noter que toutes ces méthodologies de fonctionnalisation de surface sont compatibles avec les PAM.^{133,135,136}

2.1.9.2 Relargage spécifique

À ce jour, la conception de revêtements qui maintiennent les niveaux de composés antibactériens libérés dans la fenêtre thérapeutique suffisante pour tuer les bactéries, mais suffisamment basse pour limiter la cytotoxicité envers les eucaryotes reste un défi important.¹³⁴

Toutes les méthodologies de relargage peuvent être classées en deux familles : l'approche passive et l'approche active.

Le relargage passif est catégorisé comme un relargage continue dans le temps, sans déclencheur. Le relargage n'est pas dépendant de la présence de pathogène et induit une libération en continu jusqu'à épuisement du stock. Une fois le stock consommé, plus rien n'empêche un développement bactérien sur la surface.^{134,137}

Le relargage actif peut être classé en différentes sous-catégories : stimulus-déclenché et bactério-déclenché.

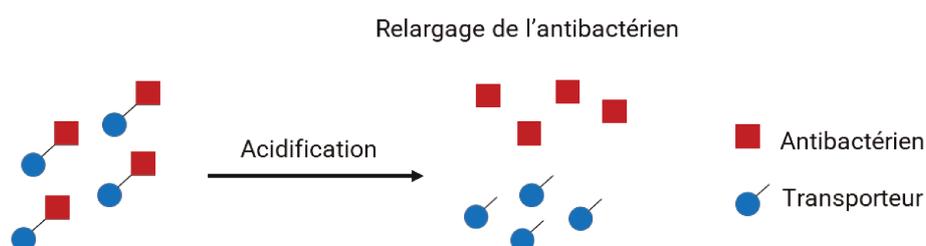


Figure 40 : Cas générale d'un relargage stimulus déclenché

Le relargage stimulus-déclenché est défini comme un relargage contrôlé par un stimulus externe (électrique, changement de pH, ultrason, photothermique, magnétique, mécanique, ...). Ils ont la capacité de produire un effet antibactérien à la demande, ce qui permet d'étendre la durée de vie de ce type de revêtement. Par exemple, le relargage pourra être modulé par le pH, ce qui permettrait de cibler les compartiments avec un pH particulier (lysosomes) et ainsi libérer spécifiquement l'antimicrobien (libération contrôlée).¹³⁵ Cependant, cette méthodologie se base sur le compartiment d'action cible, donc même sans contamination bactérienne, l'antibactérien sera libéré à son site d'action en continu. Dans ce cas de figure le relargage est plus ciblée, mais toujours pas exclusivement spécifique à la présence de pathogène. Néanmoins, les principales limitations résident dans le relargage d'une quantité suffisante de principes actifs après de multiples cycles d'activation/inactivation (du relargage) et également minimiser le relargage passif (sans déclencheur) de l'antibactérien.^{134,137}

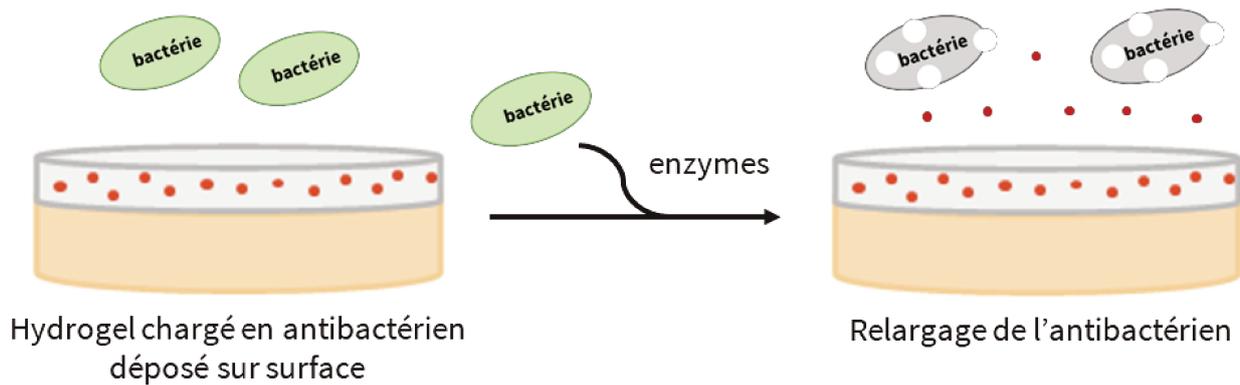


Figure 41 : Exemple d'un relargage bactério-déclenché par une enzyme sécrétée par une bactérie

Le relargage bactério-dépendant est la stratégie la plus intéressante et prometteuse, mais aussi la plus difficile à mettre en œuvre. Elle consiste à relarguer l'antibactérien uniquement en présence ou en contact du pathogène. Le relargage est induit par la bactérie, par exemple par acidification locale due à la sécrétion d'acide acétique ou lactique ou encore par action d'une enzyme sécrétée par la bactérie. Cela permet un relargage très sélectif et permet de conserver un stock nettement plus longtemps. Cependant, il faut pouvoir sécréter une quantité suffisante pour tuer les bactéries et aussi limiter le relargage passif (comme pour le relargage stimulus-déclenché).^{134,137} C'est une nouvelle approche de cette catégorie qui est décrite dans ce chapitre.

2.1.10 Projet global : Vers un système de relargage spécifique déclenché par la présence de sidérophores

Les stratégies de relargage contrôlé permettent déjà d'avoir un stock relativement inerte (ie stable dans le temps) de composés antibactériens à la surface d'un dispositif médical. Néanmoins, elles ont certaines limites. Par exemple, le relargage pH-dépendant n'est pas forcément spécifique de la présence de bactérie. À l'opposé, la stratégie reposant sur l'activité d'une enzyme bactérienne peut être trop spécifique d'une bactérie, ou d'une famille, ce qui fait que le stock prévient les infections par les microorganismes qui sécrètent cette enzyme, mais pas des autres. Qui plus est, si jamais cette enzyme n'est pas essentielle à la survie du pathogène, ce dernier peut échapper au piège en réprimant son expression. Finalement, une mutation de l'enzyme qui empêcherait sa reconnaissance du système de relargage permettrait aussi à la bactérie de contourner le système.

C'est pourquoi, développer un système d'immobilisation dont le relargage serait déclenché par les sidérophores nous paraît réunir plusieurs avantages par rapport aux systèmes précédents :

- D'abord, parce que les sidérophores sont produits par un très grand nombre de micro-organismes, donc le système sera applicable pour une large variété de pathogènes.
- Ensuite, les sidérophores ne sont pas produits par les humains. La présence de sidérophores à l'intérieur de notre corps (ex. localement dans un tissu) est donc spécifique de la présence d'un microorganisme.
- Ensuite, parce que le fer est absolument nécessaire à la survie et la multiplication de la plupart des bactéries. Aussi, il sera très difficile pour elles de contourner le problème (ex. faible probabilité d'apparition de « résistance » au mécanisme de relargage). Ceci est à mitiger puisque les bactéries ont aussi des stratégies d'import du fer indépendantes des sidérophores (voir plus haut).

À notre connaissance, aucune stratégie de relargage d'un stock inerte d'antimicrobien utilisant les sidérophores n'a été développée.

Ainsi, les travaux de thèse décrits ici s'inscrivent dans un projet à plus long terme, dont le but est le développement d'une nouvelle méthode d'immobilisation de composés antimicrobiens, dont le relargage est déclenché par la présence de sidérophores (ex. présence de bactéries). En théorie, aussi longtemps qu'aucun pathogène ne se développe à proximité du complexe, aucun antibactérien n'est libéré, le stock d'antimicrobien reste inerte sur un temps long (Figure 40).

La stratégie imaginée peut être comparée à une « tapette à souris » : la souris va elle-même déclencher le mécanisme létal (ici, libération d'antimicrobiens) en allant chercher ce dont elle a besoin, le fromage (ici, le Fe^{III}). Contrairement à la stratégie classique dite du « cheval de Troie », ici le sidérophore n'est pas un moyen de faire importer le principe actif à la bactérie, mais le déclencheur du relargage de ce dernier.

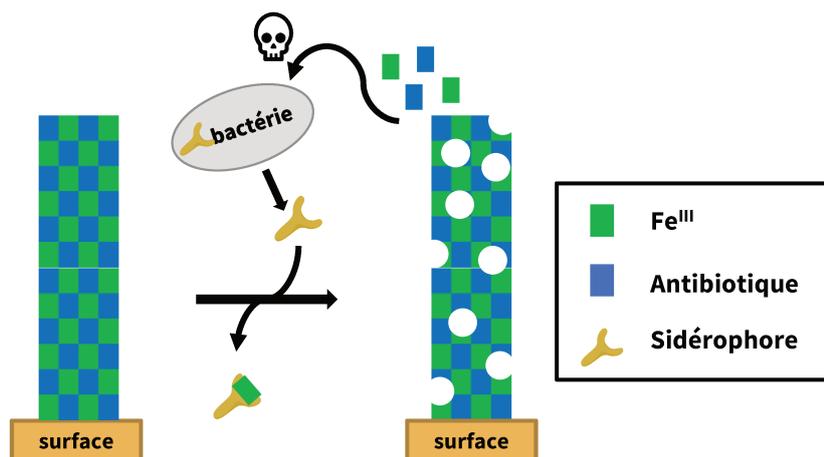


Figure 42 : Stratégie de relargage spécifique d'antibiotique contrôlé par les sidérophores.

À terme, ce système pourra être utilisé comme revêtement de surface, par exemple sur des implants ou autres objets introduits dans l'organisme pour une longue période (ex. stimulateurs cardiaques, prothèses, cathéters, sondes, etc).

2.2 Projet de thèse: DÉVELOPPEMENT DE COMPLEXES DE Fe (III) ET Ga (III) LIÉS À UN PEPTIDE POUR LA FORMATION DE POLYMÈRES DE COORDINATION POUR LE RELARGAGE DE PAM EN PRÉSENCE DE SIDÉROPHORES.

Les objectifs de thèse sur ce sujet correspondant aux premiers pas vers le but final, ont été :

- La conception d'une première génération d'un tel système.
- La synthèse et la caractérisation des éléments permettant la formation de ce système.
- L'obtention des premières preuves de concept quant au relargage d'un antimicrobien déclenché par la présence de sidérophores.

Nous avons choisi d'utiliser des peptides antimicrobiens (PAM) comme principe actif pour leurs différents avantages à l'utilisation (voir plus haut). Afin de pouvoir contrôler la libération des PAM, le choix s'est tourné vers la formation de complexes métalliques : un polymère de coordination d'ions Fe^{III} liant les PAM entre eux. L'ion Fe^{III} est à la fois un ion métallique peu labile (ex. permettant la formation de complexes inerte et stables) et l'ion pour lequel les sidérophores ont une affinité très forte. Les sidérophores seront donc capables de venir prendre les ions Fe^{III} du polymère de coordination, libérant alors les PAM dans le milieu, qui pourront alors interagir avec (et donc tuer) les bactéries à proximité (Figure 41). Dans cette stratégie, le Fe^{III} pourra être substitué par du Ga^{III} , puisque les sidérophores ont aussi une forte affinité pour lui et puisqu'il est toxique pour les bactéries (combinaison de deux effets toxiques pour la bactérie, PAM et Ga^{III} -sidérophore). Un tel système est donc composé de ces différentes parties : un peptide antimicrobien (PAM), un ion métallique, un ligand chélatant le Fe^{III} (fonctionnalisé sur le PAM) et éventuellement un espaceur.

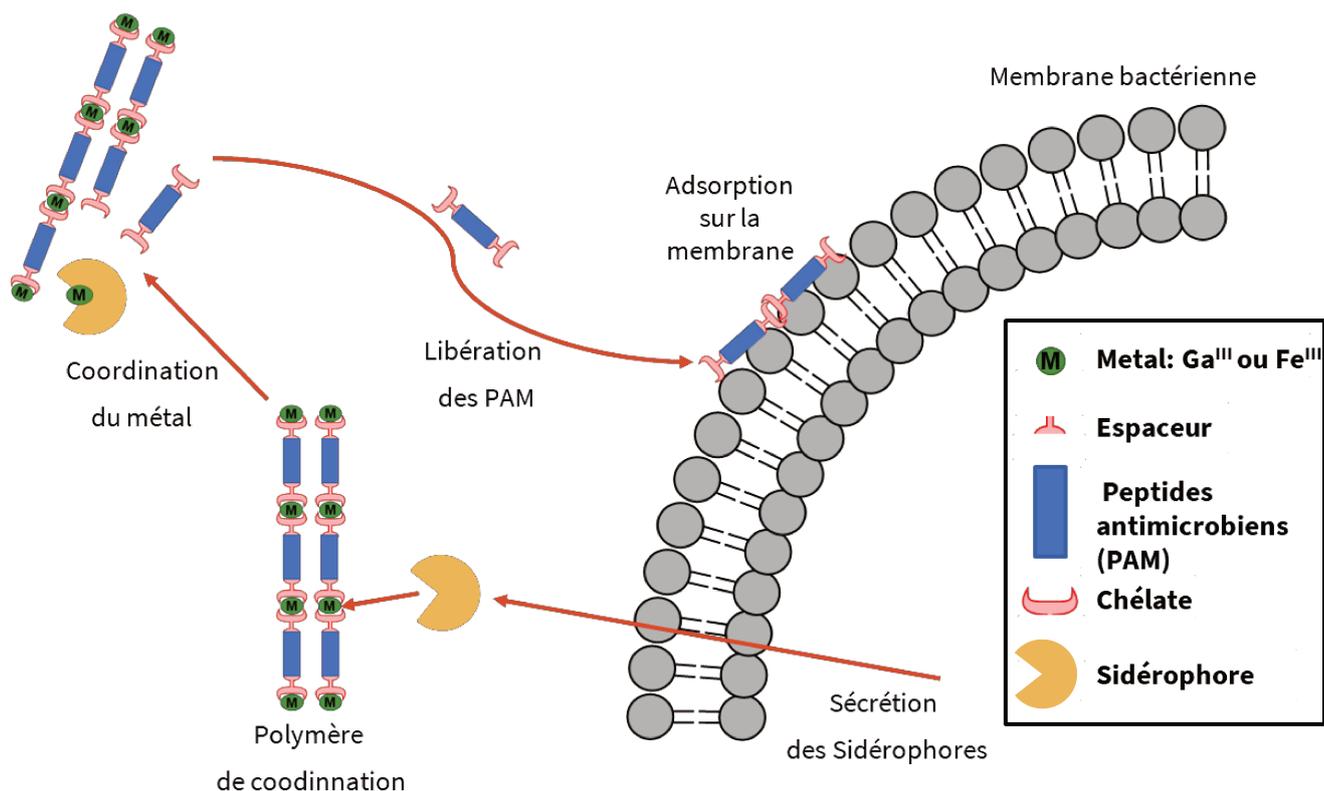


Figure 43 : Relargage spécifique d'un peptide antimicrobien en présence de sidérophores bactériens.

2.2.1 Choix des PAM

Les PAM NH₂-WKWLKKWIK-NH₂ et NH₂-IRIRIRIR-NH₂ ont été sélectionnés pour leur large spectre d'action et leurs courtes séquences permettant de faciliter la synthèse.^{138,139} En effet, ces deux PAM sont actifs sur plusieurs souches de bactéries Gram -, Gram + (Tableau 5) et également certains champignons (*Candida albicans*). En particulier, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont fréquemment responsables d'infections nosocomiales, et font partie des « ESKAPE ». Pour les avantages liés à l'utilisation des PAM (voir paragraphe 2.1.8), nous avons choisi d'utiliser ce type de molécule comme principe actif dans notre système. Finalement, le fait qu'ils soient courts a aussi été pris en compte lors de leur sélection, puisque la règle générale est que plus un peptide est court, plus il devrait être facile à synthétiser.

La toxicité sur les cellules de mammifère est évaluée par le biais de l'HC₅₀ (concentration hémolytique). Il est de 80 μmol/L⁻¹ pour NH₂-WKWLKKWIK-NH₂ et est inconnue pour NH₂-IRIRIRIR-NH₂¹⁴⁰ (HC₅₀ = la concentration où 50 % des globules rouges sont lysés en 1 h d'incubation).¹⁴¹

Séquence peptidique	MIC (μM) *				
	S. epidermidis	S. aureus	E. coli	P. aeruginosa	C. albicans
NH ₂ -WKWLKKWIK-NH ₂ (MIC ₉₀)	0,7-0,3	0,7	5,8	2,9	5,8
NH ₂ -IRIRIRIR-NH ₂ (MIC ₁₀₀)	3,4	27,2	6,8	6,8	13,6

* : Les valeurs pour le peptide NH₂-IRIRIRIR-NH₂ ont été converties de mg/L en μM (avec une masse molaire de 1094,4 g/mol).

Tableau 5 : Valeurs de concentration minimum d'inhibition (MIC) pour les peptides sélectionnés. (Données extraites des références^{138,139})

Nous avons choisi d'ajouter une glycine en C-ter des deux PAM pour éviter une épimérisation lors du couplage avec le ligand en C-ter. Cet acide aminé n'étant pas chiral, aucune épimérisation du peptide ne pourra avoir lieu (Figure 42). Cet ajout ne modifie pas l'activité antimicrobienne du peptide (*vide infra*).

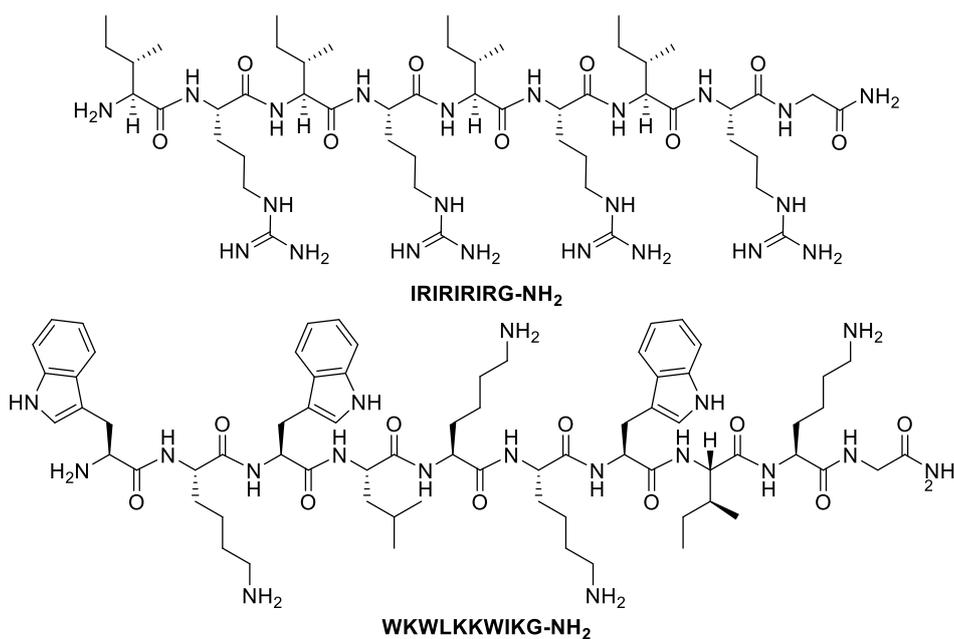


Figure 44 : Structure développée des deux PAM synthétisés

2.2.2 Choix des ligands

Le choix du ligand est essentiel pour que la stratégie imaginée fonctionne correctement. En effet, il doit posséder quelques caractéristiques de complexation très importantes : il doit être capable de coordonner le fer dans une gamme d'affinité appropriée aux bactéries cibles et au milieu dans lequel il sera déposé. Si son affinité est trop forte (ie supérieure à celle des sidérophores), aucun échange de ligands ne se produira, notre complexe resterait formé et aucune libération de PAM ne serait induite. Cette valeur ne doit pas non plus être trop faible, car dans ce cas, les chélateurs du fer de notre organisme seront capables d'entrer en compétition avec les ligands de notre complexe et ainsi libérer les principes actifs de manière continue et non contrôlée. Le relargage ne serait pas spécifique à la présence de bactérie et le stock de composé antimicrobien serait perdu.

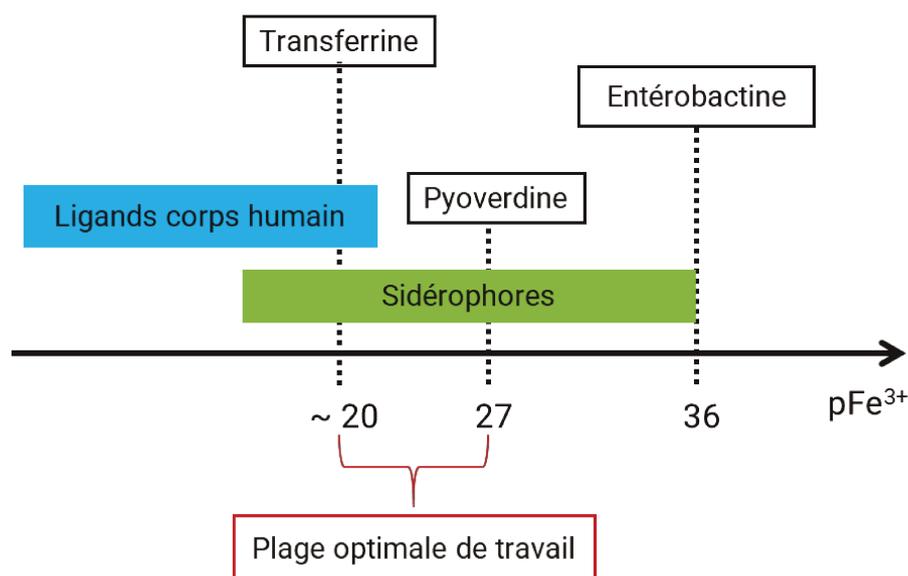


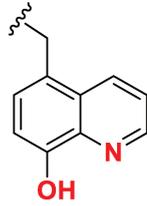
Figure 45 : Gamme de pFe³⁺ optimale pour les ligands du fer

Une gamme de pFe³⁺ a été déterminée, afin de correspondre aux critères précédents. Elle est comprise entre 20 et 27. La limite basse a été sélectionnée par comparaison des pFe³⁺ des différents ligands du fer de notre organisme (circulatoire), comme la transferrine, possédant un pFe³⁺ pour le fer aux alentours de 20.⁷⁸ La limite haute a été déterminée en utilisant la valeur de pFe³⁺ du sidérophore le plus fort de *Pseudomonas aeruginosa* qui est de 27.¹⁴² La plage de pFe³⁺ des sidérophores des souches présentes dans la liste « ESKAPE » va de 23 à 35 pour les sidérophores les plus forts de chaque souche (23,6 = Staphyloferrine B⁹⁶, 34,3 = entérobactine¹⁴³), cette gamme est compatible avec la précédente, car la seule limitation pour le sidérophore est de dépasser un pFe³⁺ de 20 afin de pouvoir décoordonner le fer des ligands choisis.

Deux ligands ont été retenus : i) une 8-hydroxyquinoléine qui sera reliée en position 5 à un espaceur et ii) un bisphenol-1, 2, 4-triazole (ou deferasirox) relié au PAM par la fonction acide (Figure 43).

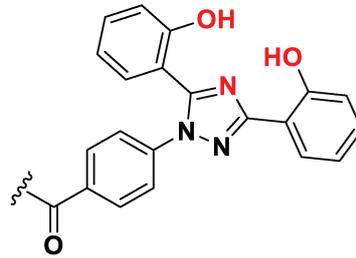
Ces deux ligands ont été choisis avec une denticité différente, ce qui peut être important pour l'accessibilité du sidérophore bactérien au Fe^{III} dans la construction chélateur-PAM, car ceci est déterminant pour la cinétique de transfert du Fe^{III} et ainsi pour la relargage de PAM.

Dérivé de la 8-hydroxyquinoléine (8HQ)



$$pFe^{3+} \text{ 8HQ} = 20,6$$

Dérivé du Deferasirox (DFX)



$$pFe^{3+} \text{ DFX} = 23,5$$

Figure 46 : Structure des dérivés des ligands sélectionnés

Il est intéressant de noter que ces deux composés sont d'intérêt pharmaceutique. En effet, le deferasirox est utilisé pour détoxifier les personnes ayant un surplus de fer, tandis que la 8-hydroxyquinoléine est connue comme étant un bactéricide.¹⁴⁴ Le deferasirox possède un pFe^{3+} de 23,5¹⁴⁵ et la 8-hydroxyquinoléine de 20,6¹⁴⁶. Ces deux valeurs entrent dans la gamme mise en place précédemment.

2.2.3 Conception des espaceurs

Une fois les PAMs et les ligands choisis, il reste la conception de l'espaceur qui va permettre de relier le PAM au ligand.

Ligand	Fonctionnalisation	N-Ter	C-Ter
Deferasirox (DFX)		 DFX-COOH	 DFX-NH ₂
Hydroxyquinoline (8HQ)		 8HQ-Pro-COOH	 8HQ-NH ₂
		$pFe^{3+} \text{ 8HQ} = 20.3$	

Tableau 6 : Tableau des ligands produits pour la fonctionnalisation en N-terminal et C-terminal du peptide

Le deferasirox (**DFX-COOH**) présentant déjà un acide carboxylique, il peut directement être ajouté en position N-ter du PAM. Afin d'être fonctionnalisé du côté C-ter du peptide, le deferasirox est fonctionnalisé avec de l'éthylène diamine et portera un groupe amine primaire libre (**DFX-NH₂**). La 8-hydroxyquinoléine doit également être fonctionnalisée. Pour fonctionnaliser le N-ter du PAM, le choix de l'espaceur s'est tourné vers la proline qui possède une amine secondaire que l'on greffe de manière covalente à la 8-hydroxyquinoléine pour donner **8HQ-Pro-COOH**. Afin d'être fonctionnalisé du côté C-ter du peptide, la 8-hydroxyquinoléine est fonctionnalisée afin d'obtenir un groupe méthylène-amine en position 5 (**8HQ-NH₂**) (Tableau 6).

2.2.4 Formation des complexes

La stœchiométrie métal : ligand n'est pas la même pour les deux ligands. Le deferasirox étant un ligand tridenté,¹⁴⁵ il conduit à la formation de complexes linéaires 1 : 2 avec les PAM. La 8-hydroxyquinoléine, un ligand bidenté¹⁴⁷ conduit à la formation de complexes 3 :1 avec le Fe^{III}. On s'attend donc à ce que les PAM soient agencés de manière trigonale (Figure 44).

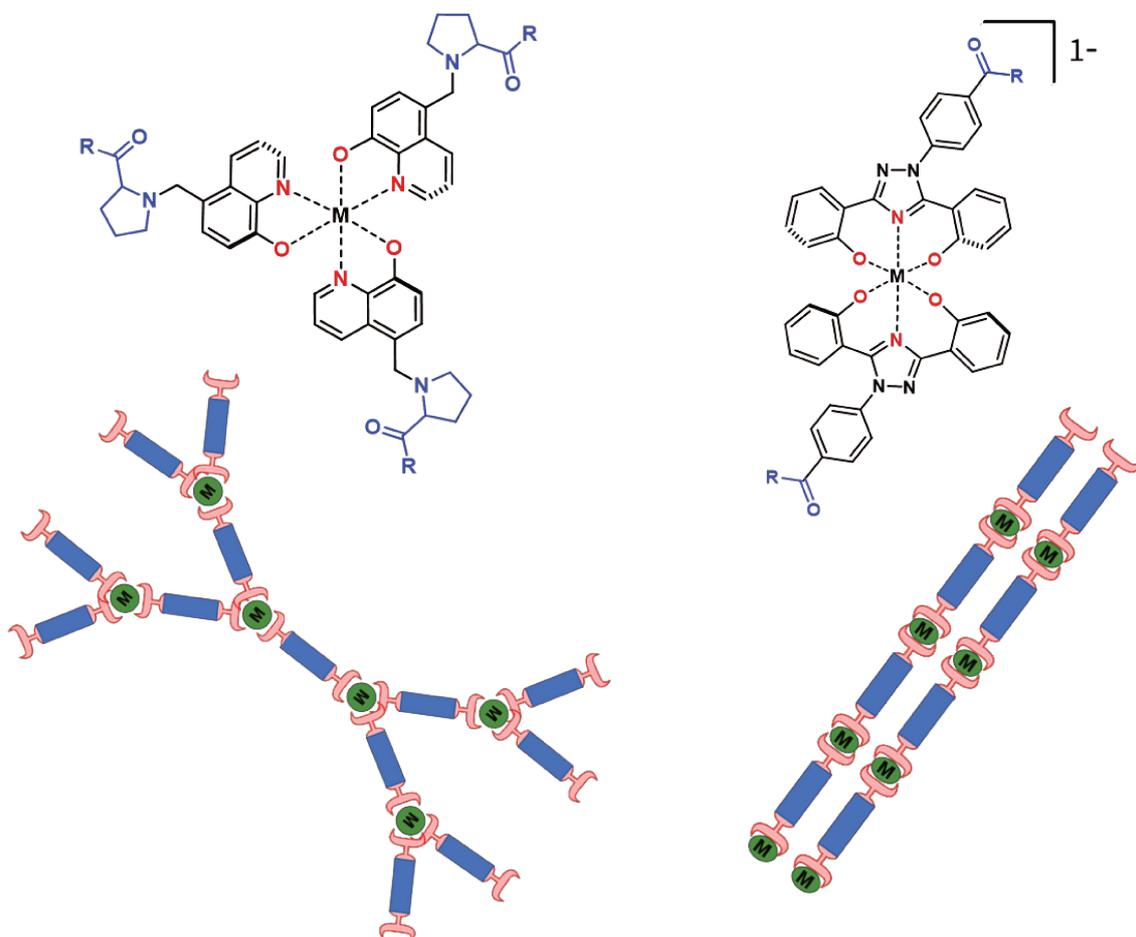


Figure 47 : Structure des complexes métalliques et des polymères de coordination (hypothétique) à partir de la 8-hydroxyquinoléine et du deferasirox. $M = \text{Fe}^{\text{III}}, \text{Ga}^{\text{III}}$. $R = \text{OH}, \text{OtBu}, \text{WKWLKKWIKG}$

Deux complexes différents peuvent être imaginés et pourraient ainsi former, à terme, deux types de structuration du polymère différents. L'un des polymères aurait une structure linéaire, tandis que l'autre posséderait une structure branchée, rappelant les dendrimères (Figure 44).

2.2.5 Méthodologie employée

Dans un souci de simplification du système, le chemin vers le but ultime de la fonctionnalisation de surface a été découpé en étapes. Cela permet de faciliter le travail expérimental et d'obtenir une preuve de concept pour chaque étape clé. À cette fin, différentes structures ont été explorées : 1) complexe soluble, 2) polymères de coordination, 3) complexes greffés sur une surface (Figure 45). Cette dernière étape est au-delà des objectifs de cette thèse.

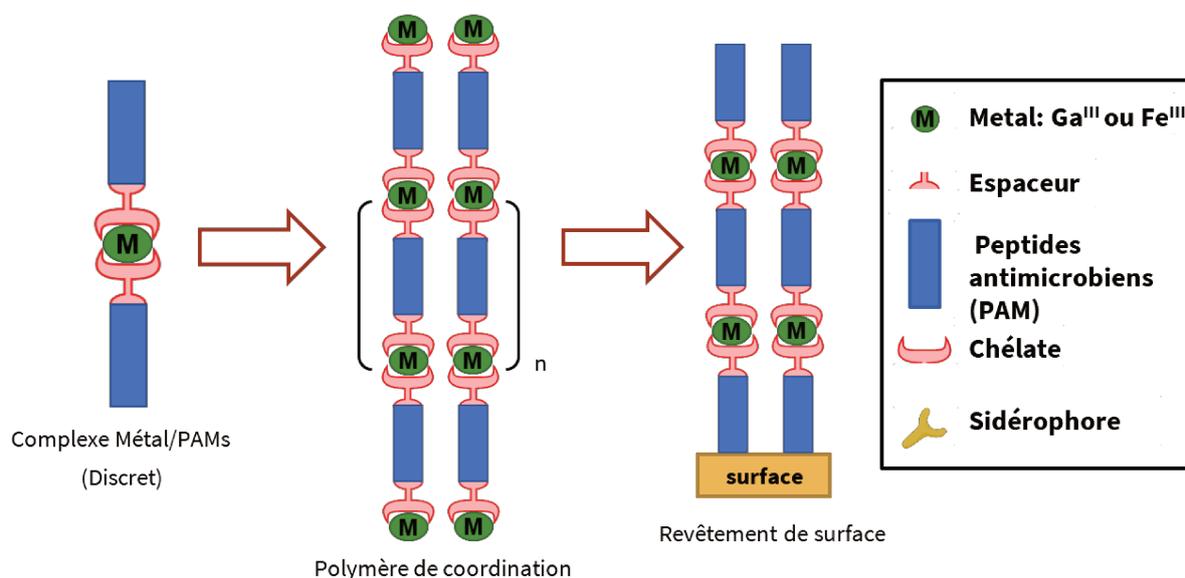


Figure 48 : Représentation schématique des systèmes étudiés

La première étape consiste à développer un complexe soluble composé du fer et des ligands greffés sur les PAM. Les complexes L-PAM formés ne sont pas reliés entre eux et peuvent donc être caractérisés et analysés plus facilement puisqu'ils sont vraiment solubles (Figure 45 : complexe discret). Cela permettra, par exemple, de faire des expériences de compétition pour tester la stabilité de nos complexes en présence d'autres ligands. Une fois cette première preuve de concept acquise, l'étape suivante consiste à fonctionnaliser les peptides des deux côtés afin de pouvoir produire un polymère de coordination (Figure 45 : polymère de coordination). La dernière étape est le but final de ce projet de recherche. Elle consiste à utiliser les composés produits afin de former un revêtement pouvant être déposé sur une surface, servant de stock dormant d'antimicrobiens (Figure 45 : revêtement de surface).

2.2.6 Diagramme de prédominance des espèces

Les complexes de Fe^{III} et de Ga^{III} sont connus pour former différentes espèces en milieu aqueux et en fonction du pH, tels que des complexes protonés, des hydroxydes, ou ne portant qu'un ou deux ligands, au lieu de deux ou trois respectivement. Les diagrammes de prédominance trouvés dans la littérature des complexes de fer et gallium (le plus proche possible des ligands conçus) avec les ligands deferasirox, 8-hydroxyquinoléine, deferasirox(sulfonate) et 8-hydroxyquinoléine(sulfonate), ont montré qu'ils forment des espèces 2 : 1 pour le deferasirox et 3 : 1 pour la 8-hydroxyquinoléine stable en conditions physiologiques (pH 7,4) (Figure 46).

Ceci a permis d'avoir une idée de la stœchiométrie qu'adopteront nos complexes en conditions physiologiques (pH 7,4), 2 : 1 pour le deferasirox et 3 : 1 pour la 8-hydroxyquinoléine. Cependant, les exemples trouvés dans la littérature pour les complexes Fe^{III} -8-hydroxyquinoléine- Ga^{III} -deferasirox ne sont pas les mêmes ligands que ceux développés, ce sont leurs dérivés sulfonates. C'est pourquoi, il faudra tout de même vérifier la spéciation de nos ligands et complexes.

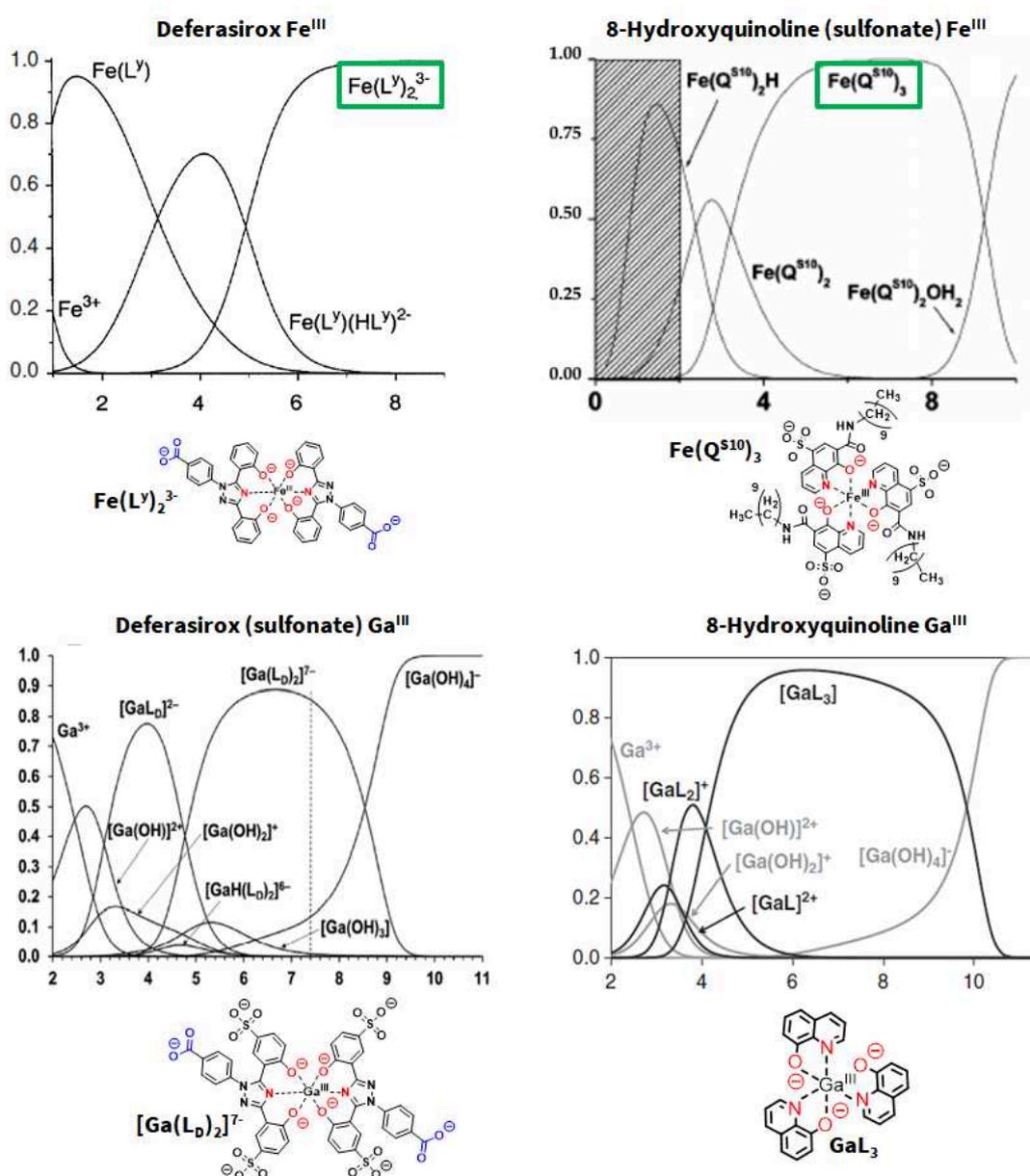


Figure 49 : Diagramme de prédominance des espèces pour le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{L}^{\text{Y}})_2]^{3-}$ (en haut à gauche)¹⁴⁵, le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Q}^{\text{S10}})_3$ (avec un groupement sulfonate, en haut à droite)¹⁴⁸, Le complexe $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{L}_\text{D})_2]^{7-}$ (avec deux groupements sulfonates, en bas à gauche)¹⁴⁹ et le complexe GaL_3 (en bas à droite).¹⁵⁰

2.2.7 Synthèse des ligands (L), des L-PAM et des L-PAM-L

2.2.7.1 Synthèse des ligands (L)

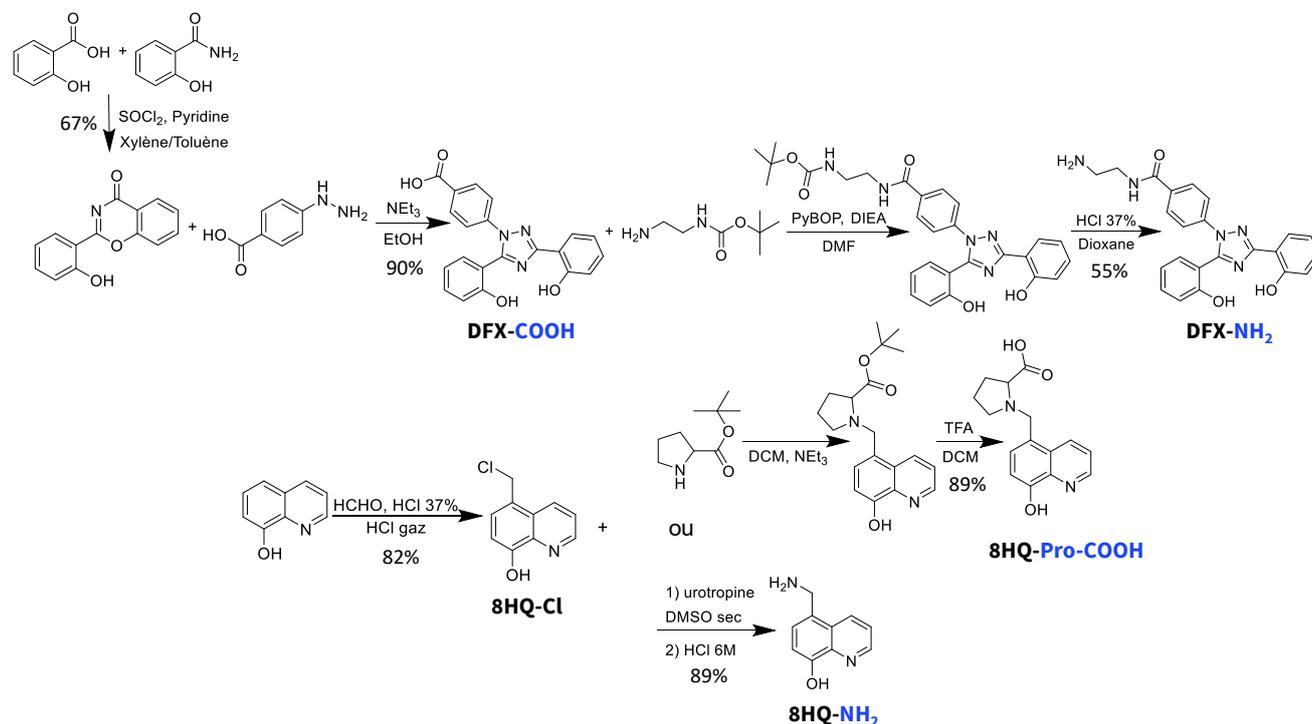


Figure 50 : Schéma de synthèse des dérivés du deferasirox et de la 8-hydroxyquinoléine

À la suite de ces recherches, les synthèses des dérivés C-ter et N-ter du deferasirox (**DFX-COOH** et **DFX-NH₂**) et de la 8-hydroxyquinoléine (**8HQ-Pro-COOH** et **8HQ-NH₂**) ont été réalisées. Le précurseur commun **8HQ-Cl** est synthétisé par addition nucléophile aromatique de la 8-hydroxyquinoléine sur le formaldéhyde, l'alcool formé est ensuite engagé dans une réaction de substitution nucléophile entre l'alcool activé par le SOCl₂ et un chlorure présent dans le milieu pour former le composé **8HQ-Cl** (Figure 47).

Le composé **8HQ-NH₂** a été synthétisé par une réaction de substitution nucléophile entre une urotropine et la 5-chlorométhyl-8-Hydroxyquinoléine suivie d'une hydrolyse pour obtenir une amine.¹⁵¹ Le composé **DFX-NH₂** a été obtenu par condensation entre le **DFX** et l'éthylène diamine mono protégée (en suivant un protocole de couplage peptidique).⁴⁹ Finalement, le ligand **8HQ-Pro-COOH** a été produit par addition/élimination entre la 5-chloro-8-Hydroxyquinoléine et la proline. Cependant, l'amine doit être secondaire afin d'éviter une double fonctionnalisation de la 8-hydroxyquinoléine par l'amine.^{152,153}

2.2.7.2 Synthèse des L-PAM

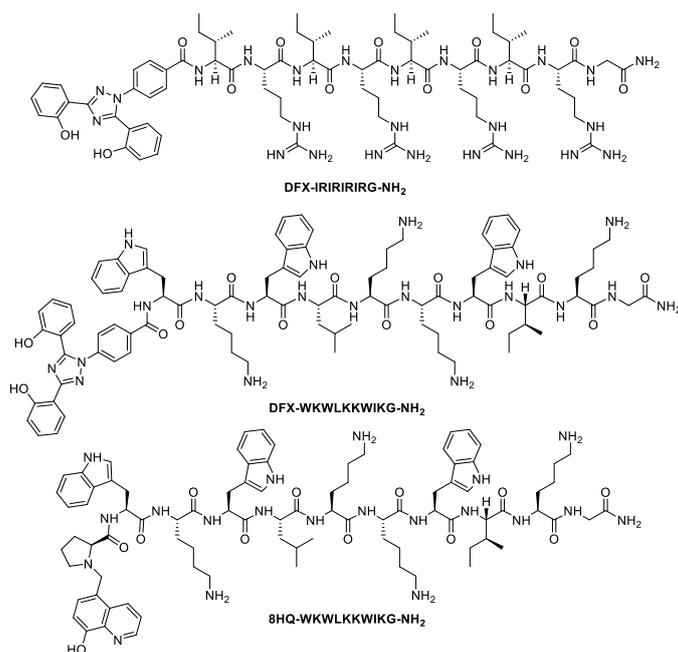


Figure 51 : Structure développée des L-PAM synthétisés

La synthèse des L-PAM a été réalisée sur phase solide (SPPS) en utilisant la stratégie Fmoc/tBu et une résine Rink amide permettant d'avoir une fonction amide en C-ter, après clivage de la résine. La méthodologie de couplage des ligands est la même que lors de l'ajout d'un acide aminé.⁴⁷ La seule différence réside dans l'activateur utilisé, ici nous avons utilisé le PyBOP qui permet de travailler en excès d'activateur et ainsi déplacer l'équilibre vers la formation du L-PAM (Figure 48).⁴⁹

2.2.7.3 Synthèse des L-PAM-L

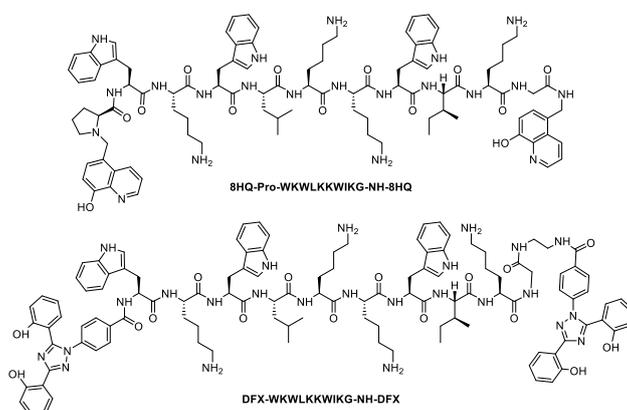


Figure 52 : Structure développée des L-PAM-L synthétisés

La synthèse des L-PAM-L (Figure 49) a été réalisée sur phase solide (SPPS) en utilisant la stratégie Fmoc/tBu sur une résine chlorotrytile, afin de pouvoir sélectivement cliver le peptide de la résine sans déprotéger les chaînes secondaires du peptide, mais également d'obtenir un acide carboxylique en C-ter afin de pouvoir le coupler au ligand spécifiquement développé pour cette extrémité (ie avec une amine).¹⁵⁴ La conservation des groupements protecteurs des chaînes secondaires permet d'éviter des réactions parasites, en particulier avec les résidus comportant un acide carboxylique ou une amine libre (Glu, Asp, Lys... etc.). Dans un premier temps, le peptide est synthétisé comme précédemment, puis le ligand N-ter est couplé et le peptide est sélectivement clivé de la résine. Une fois le peptide protégé clivé de la résine, le ligand C-ter est couplé en phase liquide.¹⁵⁵ Une fois le dernier ligand couplé, le peptide est intégralement déprotégé puis purifié.

2.2.8 Dosage des solutions mères de ligands et détermination de leurs stœchiométries (L, L-PAM, L-PAM-L)

Un titrage spectrophotométrique avec une solution de GaCl_3 à pH 7,4 tamponnée par de l'HEPES (100 mM) a été effectué pour tous les ligands (L, L-PAM et L-PAM-L), afin de déterminer la concentration des solutions mères préparées. Le titrage a été réalisé uniquement avec le gallium pour s'affranchir des problèmes de précipitation d'oxyde de fer dus aux pH élevés de la solution, et également, car la concentration de la solution de GaCl_3 (82 mM) a été déterminée par ICP (Plasma à couplage inductif).

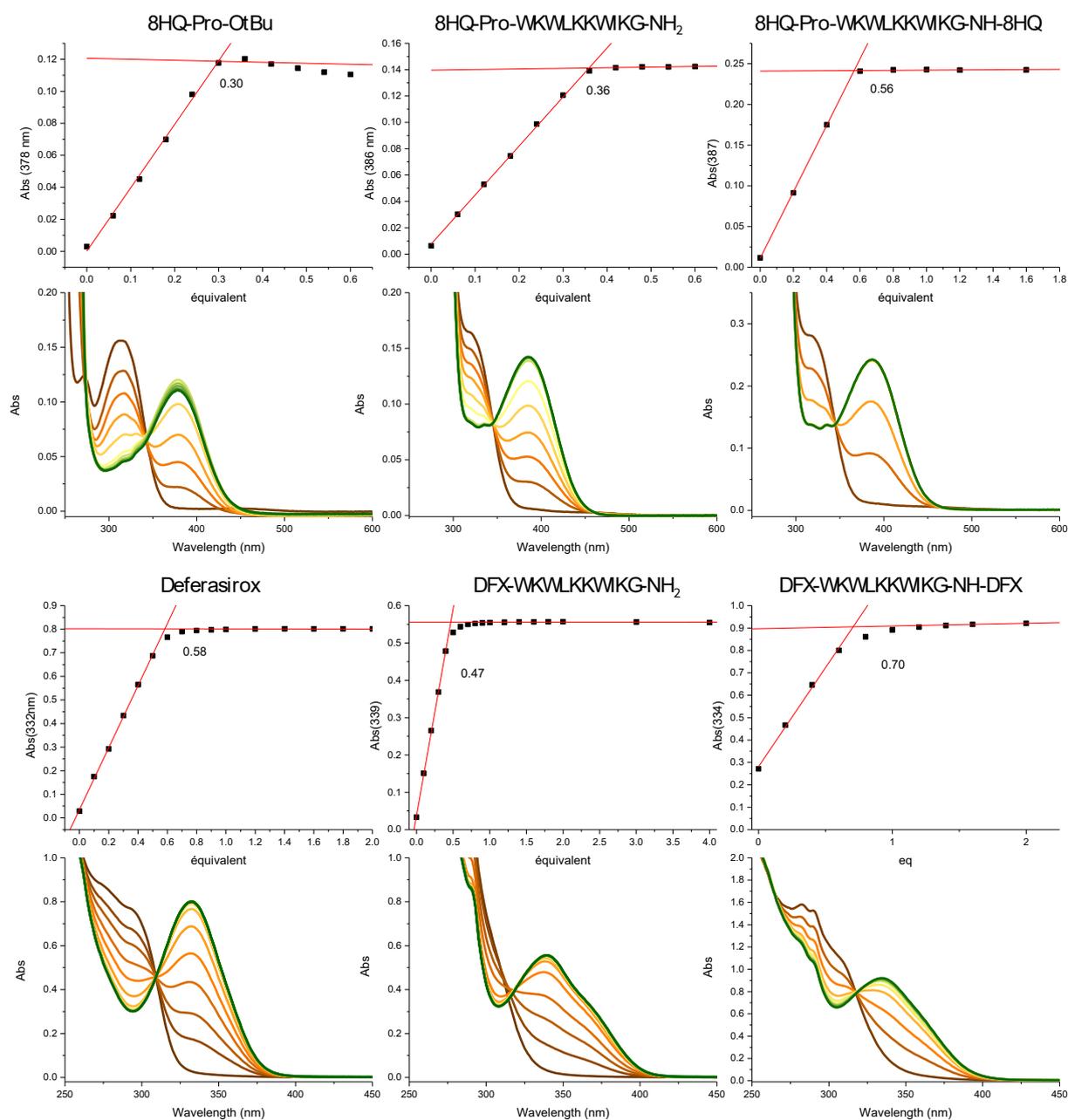


Figure 53 : Titrage spectrophotométrique de la 8HQ-Pro-OtBu, du deferasirox, et de leurs dérivés peptidiques, par une solution de GaCl_3 . Conditions : 50 μM de ligand, 100 mM de tampon HEPES à pH 7,4. Ajour successif de 2 μM pour les dérivés du 8HQ et de 3 μM pour les dérivés du DFX (valable pour les L et L-PAM). Pour les L-PAM-L les ajouts sont doublé, 4 μM pour les dérivés du 8HQ et 6 μM pour les dérivés du DFX

Cette analyse a été réalisée pour tous les ligands développés afin de déterminer le plus précisément possible les concentrations des solutions mères préparées. La manipulation consiste à ajouter de faibles quantités de GaCl₃ jusqu'à observer l'apparition d'un plateau.

La stœchiométrie des complexes à base de deferasirox étant 2 : 1 et pour la 8-hydroxyquinoléine 3 : 1, les concentrations peuvent être déterminées par le biais de la saturation du site de coordination (apparition d'un plateau). La valeur d'équivalence obtenue correspond à la quantité de métal nécessaire pour totalement saturer les ligands, et permet également d'observer si la stœchiométrie est respectée. En effet, les valeurs pour les dérivées de la 8-hydroxyquinoléine doivent être aux alentours de 0,33 équivalents pour avoir une stœchiométrie de 3 : 1 et aux alentours de 0,5 équivalents pour le deferasirox, pour avoir une stœchiométrie de 2 : 1. Pour les L-PAM-L la stœchiométrie attendue est de 1 : 1 pour les dérivés du deferasirox et 3 : 2 pour les dérivés de la 8-hydroxyquinoléine (Figure 50).

Les valeurs obtenues pour les ligands simples sont les suivantes, 0,30 équivalent pour le composé 8HQ-Pro-OH et 0,58 équivalent pour le composé deferasirox, ce qui est en accord avec les stœchiométries attendues.

Les valeurs obtenues pour les L-PAM sont les suivantes, 0,36 équivalent pour le composé 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂ et 0,47 équivalent pour le composé DFX-WKWLKKWIKG-NH₂, ce qui est en accord avec les stœchiométries attendues.

Les valeurs obtenues pour les L-PAM-L sont 0,56 équivalent pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ et de 0,70 équivalent pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX. On constate que toutes les espèces analysées, sauf DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX, sont en accord avec une erreur acceptable (DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX) avec la stœchiométrie du ligand/métal attendue.

Les dérivés d'hydroxyquinoléine possèdent une bande MLCT aux alentours de 380 nm,¹⁴⁷ et les dérivés du deferasirox possèdent une bande MLCT aux alentours de 330 nm,¹⁵⁶ ceci traduit la formation de complexes similaires, malgré la fonctionnalisation de ceux-ci par le PAM.

Il est important de noter que pour toutes les espèces, leur stœchiométrie reste inchangée (3 : 1 pour les dérivés 8HQ et 2 : 1 pour les dérivés DFX) malgré un excès de fer.

Notons que les complexes de L-PAM-L sont sensés former un polymère de coordination et ainsi induire une précipitation à une concentration assez élevée. Cependant, la concentration de travail ici est de 50 μM et aucun précipité n'a été observé. En revanche, à 1 mM de complexe, une forte précipitation est observable à l'œil nu, que l'on suppose être le polymère de coordination.

2.2.9 Détermination de la durée d'oxydation du Fe^{II} en Fe^{III} coordonné aux L, L-PAM et L-PAM-L.

Les analyses utilisant une solution de FeCl₃ présentent des problèmes de précipitation d'oxyde de fer. Pour pallier à ce problème, le fer a été ajouté sous forme de sel de Mohr, c'est-à-dire Fe^{II}, car c'est un sel beaucoup plus stable en conditions aqueuses à pH neutre et permet d'éviter la formation d'hydroxyde de fer insoluble. L'idée est que le Fe^{II}, une fois coordonné au ligand, s'oxyde rapidement en Fe^{III} en conditions aérobies. Cette méthode permet de former les complexes de Fe^{III}, en évitant les problèmes de stabilité de ce dernier en solution aqueuse.

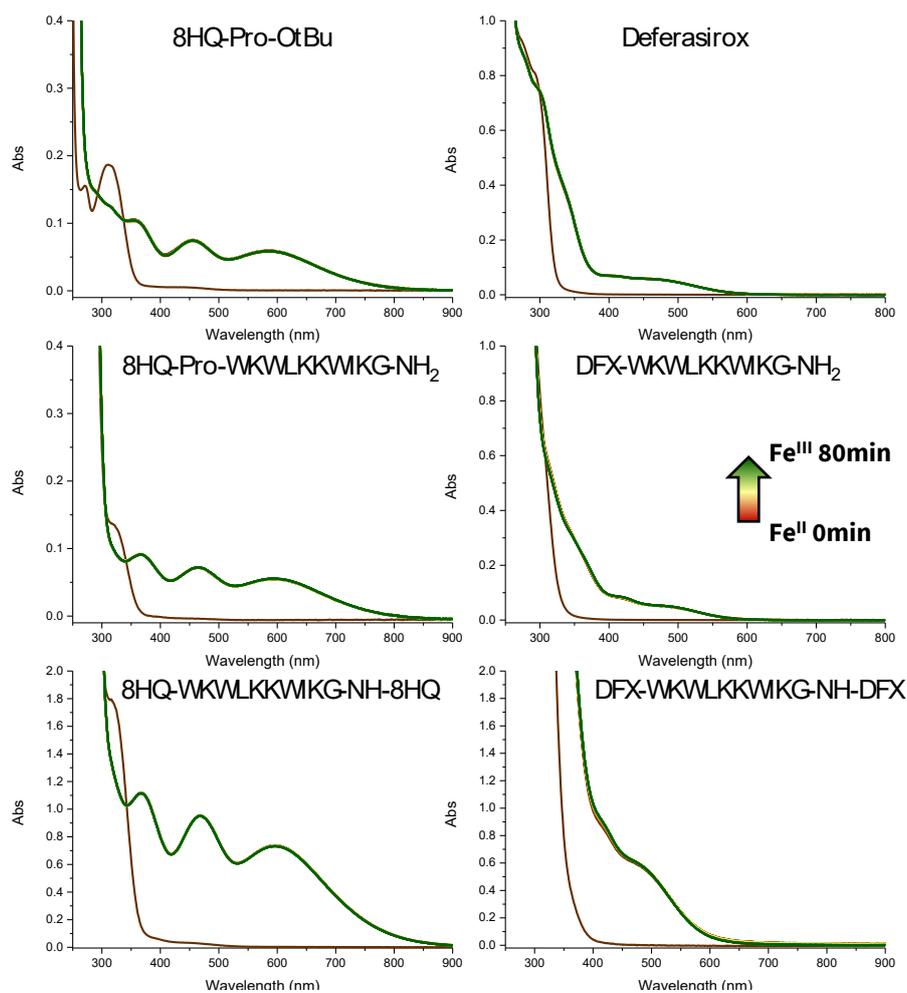


Figure 54 : Cinétique d'oxydation du Fe^{II} en fonction du ligand fixé. Conditions : 50 μ M de ligand, L-PAM ou L-PAM-L, 100 mM de tampon HEPES pH 7,4, 22,5 μ M de Fe^{II} pour DFX et DFX-WKWLKKWIKG-NH₂, 15 μ M pour 8HQ-Pro-OtBu et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂, 45 μ M de Fe^{II} pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX et 30 μ M de Fe^{II} pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ.

Un test consistant à observer la cinétique d'oxydation du Fe^{II} en fonction du ligand qui le coordonne a été réalisé afin de valider l'utilisation du sel de Mohr, mais également la durée nécessaire pour oxyder tout le Fe^{II} en Fe^{III} (réalisé par le dioxygène en solution) en fonction du ligand qui est coordonné (conditions dans la légende de la Figure 51). Le spectre brun correspond aux différents dérivés en absence de Fe^{II}. Après ajout de Fe^{II}, on observe dès le premier spectre (t=0) les bandes correspondantes à la coordination du Fe^{III} avec nos différents ligands. On peut voir sur les graphiques que sur les 80 min qui suivent, aucune évolution des spectres n'est observée, indiquant que l'oxydation est quasiment instantanée pour tous les échantillons (Figure 51). Ainsi, l'utilisation d'une solution de sel de Mohr permet effectivement de préparer nos complexes de Fe^{III}, et le mélange peut être directement engagé dans la manipulation suivante sans temps d'incubation.

2.2.10 Titrage spectrophotométrique en fonction du pH des L, L-PAM et L-PAM-L

2.2.10.1 Titrage spectrophotométrique en fonction du pH des ligands 8HQ-Pro-OtBu et DFX-COOH

Afin d'obtenir des informations de spéciation des complexes, nous avons réalisé des titrages spectrophotométriques en fonction du pH pour chaque ligand, et aussi bien avec le Fe^{III} que le Ga^{III} .

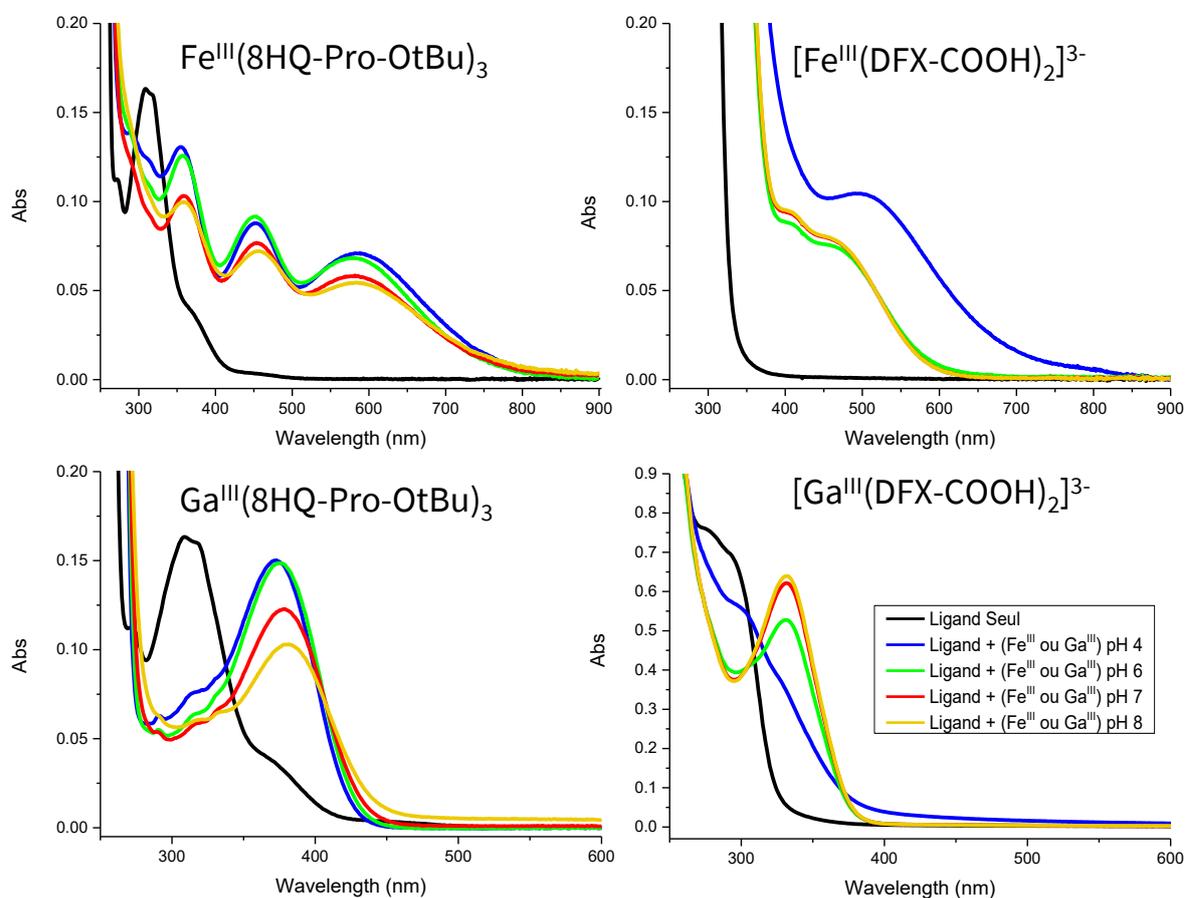


Figure 55 : Titrage spectrophotométrique en fonction du pH des complexes des ligands seul au fer et au gallium. Conditions : 50 μM de ligand, 22,5 μM de Fe^{II} (sels de mohr) ou de Ga^{III} (GaCl_3) pour les dérivés du deferasirox, et 15 μM de Fe^{II} ou de Ga^{III} pour les dérivés de la 8-hydroxyquinoléine. Le pH est augmenté par ajout de solution de soude à différentes concentrations.

Complexes métalliques	Type	λ (nm)	ε (L. mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Fe ^{III} (8HQ-Pro-OtBu) ₃	π - π^*	356	3300
	LLCT	444	2260
	MLCT	574	1524
Ga ^{III} (8HQ-Pro-OtBu) ₃	π - π^*	379	3960
Fe ^{III} (DFX-COOH) ₂	π - π^*	311	16 600
	n/a	408	2460
	MLCT	465	2000
Ga ^{III} (DFX-COOH) ₂	π - π^*	332	16 800
8HQ-Pro-OtBu	π - π^*	308	4340
DFX-COOH	π - π^*	293	16 600

Tableau 7 : Tableau des transitions électroniques des ligands seuls et leurs complexes avec leurs longueurs d'onde et leurs coefficients d'extinction molaire. Toutes les valeurs ont été obtenues à partir du spectre à pH 7.^{147,156}

On constate que pour les complexes Fe^{III}(DFX-COOH)₂, Ga^{III}(DFX-COOH)₂ et Fe^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃, la bande π - π^* du complexe se stabilise aux alentours du pH 7, ce qui est parfaitement compatible avec le pH de travail qui est 7,4 (pH physiologique). Cette bande correspond également à la formation des complexes 3 : 1 des dérivés d'hydroxyquinoléine et 2 : 1 pour les dérivés du deferasirox (Tableau 7).^{147,156}

Ces analyses nous permettent de confirmer la prédominance de l'espèce voulue à pH physiologique (7,4), excepté pour le complexe Ga^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃. La perte de signal observée (et l'augmentation de la ligne de base) peut être due à la formation d'une espèce neutre. En effet, la déprotonation de l'alcool phénolique et la coordination du métal par ce groupement induisent une neutralisation de la charge globale du complexe et peuvent favoriser sa précipitation. On observe une diminution de la bande MLCT du complexe ce qui traduit une perte de celle-ci. Cependant, nous n'observons pas d'augmentation de la bande du ligand seul ce qui peut être expliqué par la précipitation (manque de solubilité) du complexe qui augmente en basifiant le milieu. On observe également pour le spectre jaune (pH 8) une augmentation de la ligne de base sur tout le spectre, ce qui est caractéristique de la formation d'un précipité (diffusion induite par les solides en suspension) (Figure 52).

La fonctionnalisation du ligand par le PAM pourra augmenter sa solubilité par le biais des résidus chargés positivement du PAM (Lys) et ainsi éviter la précipitation de l'échantillon. C'est pourquoi, malgré le manque de stabilité pour le complexe Ga^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃, le ligand a tout de même été engagé dans l'étape suivante, consistant à fonctionnaliser les PAM avec les deux ligands développés.

2.2.10.2 Titration spectrophotométrique en fonction du pH des L-PAM, 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂ et DFX-WKWLKKWIKG-NH₂

Par la suite, les deux L-PAM ont été engagés dans un titrage spectrophotométrique en fonction du pH afin d'observer si le complexe métallique formé (gallium ou fer) respecte la spéciation voulue à pH physiologique.

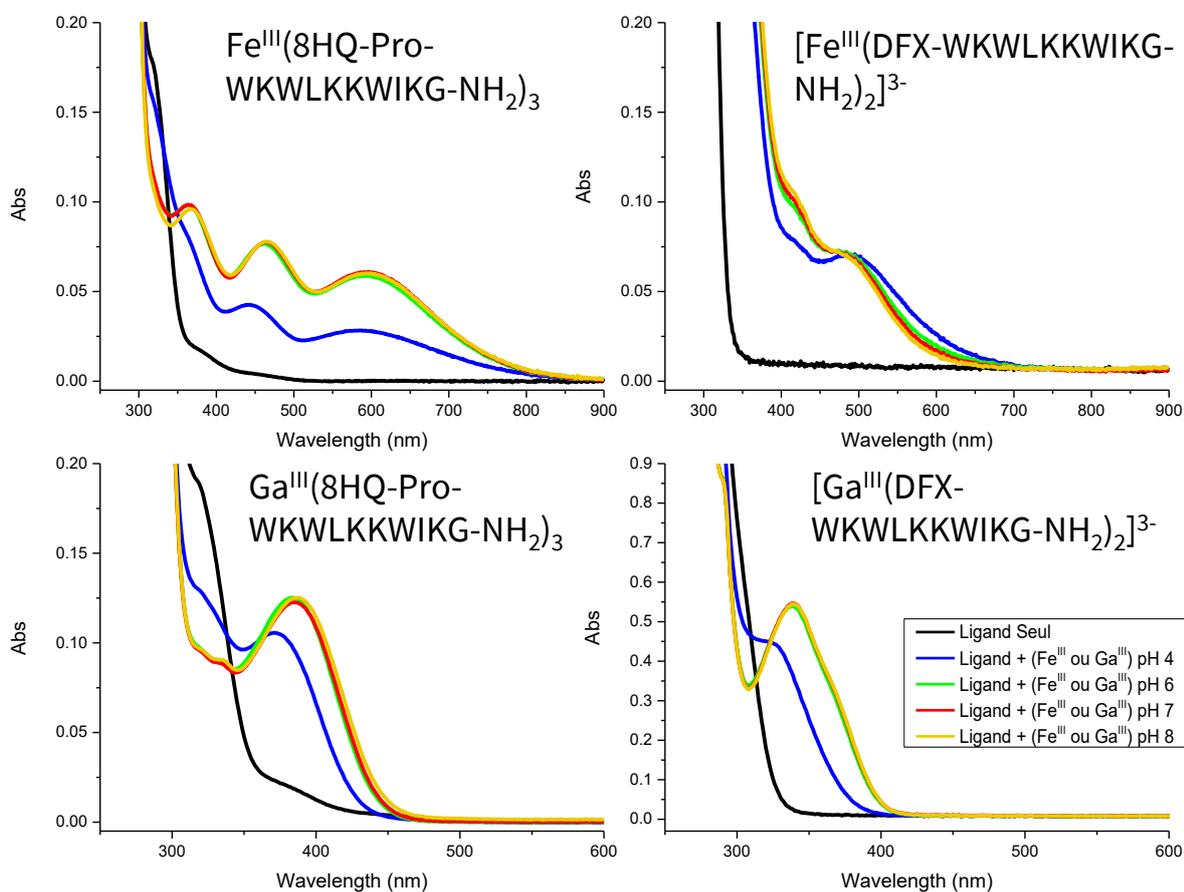


Figure 56 : Titration spectrophotométrique en fonction du pH des complexes L-PAM au fer et au gallium. Conditions : 50 μM de ligand ou de L-PAM, 22,5 μM de Fe^{II} ou de Ga^{III} pour les dérivés du deferasirox, et 15 μM de Fe^{II} ou de Ga^{III} pour les dérivés de la 8-hydroxyquinoléine. Le pH est augmenté par ajout de solution de soude à différentes concentrations. (les charges apparaissant sur les spectres sont uniquement celle du complexe métallique)

Complexes métalliques	Type	λ (nm)	ε (L. mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Fe ^{III} (8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂) ₃	π - π *	366	2400
	LLCT	463	2000
	MLCT	596	1400
Ga ^{III} (8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂) ₃	π - π *	385	2600
Fe ^{III} (DFX- WKWLKKWIKG-NH ₂) ₂	π - π *	311	13 200
	n/a	417	2400
	MLCT	476	1480
Ga ^{III} (DFX- WKWLKKWIKG-NH ₂) ₂	π - π *	338	12 200
8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂	π - π *	319	3200
DFX- WKWLKKWIKG-NH ₂	π - π *	302	16 400

Tableau 8 : Tableau des transitions électroniques des L-PAM et de leurs complexes avec leurs longueurs d'onde et leurs coefficients d'extinction molaire. Toutes les valeurs ont été obtenues à partir du spectre à pH 7.^{147,156}

On constate que pour tous les complexes L-PAM avec le fer ou le gallium, on observe les mêmes bandes MLCT (pour les dérivés d'hydroxyquinoléine) et MLCT (pour les dérivés du deferasirox) qu'avec les complexes des ligands seuls, donc les complexes formés sont les mêmes (ou en tout cas très proches). De plus, ces bandes sont stables sur une gamme plus large de pH (entre pH 6 et 8), ce qui est parfaitement compatible avec le pH de travail qui sera de 7,4 (pH physiologique) (Tableau 8).

Si l'on compare ces résultats avec ceux des ligands sans greffage du PAM on constate que la spéciation des espèces est nettement plus marquée sur la formation des espèces 3:1 (dérivées d'hydroxyquinoléine) et 2:1 (dérivées du deferasirox). Une fois le pH 6 atteint, les spectres n'évoluent plus, indiquant que les espèces en solutions restent les mêmes. On constate également que la fonctionnalisation du ligand 8HQ-Pro par le PAM supprime tout problème de précipitation qui a été observé pour le complexe du ligand non-fonctionnalisé et protégé par un tBu (Figure 53).

Les titrages pH-métriques pour les peptides L-PAM-L n'ont pas pu être réalisés à cause de soucis de précipitation due à la formation d'oligomères en solution et des variations de pH (précipitation du polymère en conditions acides et basiques malgré une faible concentration).

2.2.11 Détermination des MIC₁₀₀ sur *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.11.1 Détermination des MIC₁₀₀ sur *Pseudomonas aeruginosa* (L, PAM, L-PAM)

Après avoir caractérisé les ligands, le PAM et les complexes correspondants en solution aqueuse, nous nous intéressons à leurs propriétés en présence de bactéries. Leur activité antibactérienne pour deux souches de *Pseudomonas aeruginosa*, PA01 WT et PA01 Δ pvdF Δ pchA a été évaluée par détermination de MIC₁₀₀.

Cette étude fait l'objet d'une collaboration avec le Dr. Isabelle Schalk (UMR 7242) spécialiste de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, et notamment de son homéostasie du fer. Ce laboratoire possède une bibliothèque de souches mutantes de ce pathogène telle que : PA01 WT la souche naturelle ou des souches déficientes pour la pyocheline, pyoverdine ou déficientes pour les deux sidérophores, telles que PA01 Δ pvdF Δ pchA. De telles souches seront des outils très pertinents pour tester nos hypothèses de travail, car elle permettrait par exemple de tester chaque sidérophore indépendamment l'un de l'autre.

L, PAM et L-PAM	MIC ₁₀₀ (μ M)	
	PA01 WT	PA01 Δ pvdF Δ pchA
NH ₂ -IRIRIRIRG-NH ₂	2/4	4/2
NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂	4/4/4	4/4/4
Deferasirox	>64/>64/>64	>64/>64/>64
DFX-IRIRIRIRG-NH ₂	>64/>64	1/1
DFX-WKWLKKWIKG-NH ₂	2/2/2	0,25/0,25/0,25
8HQ-Pro-OtBu	>64/>64/>64	4/4/4
8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂	1/1/1	0,125/0,125/0,125

Tableau 9 : Valeurs de MIC₁₀₀ pour les L, PAM, et les L-PAM

L'activité antibactérienne in vitro des peptides synthétiques a été évaluée contre des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* WT et Δ pvdF Δ pchA (Tableau 9). Elle a été déterminée par la technique de microdilution en milieu liquide à différentes doses de peptides permettant de déterminer leur Concentration Minimale Inhibitrice (MIC). La MIC correspond à la concentration la plus faible requise pour inhiber visuellement la croissance bactérienne après 18 heures (dans notre cas 48 h) de culture à 37 °C. Elle permet ainsi de connaître la concentration d'agent antimicrobien efficace contre une souche bactérienne. Les expériences ont été faites en duplicata ou triplicata.¹⁵⁷ Ces analyses ont été réalisées par l'équipe d'Isabelle Schalk.

On constate que les ligands seuls possèdent une faible activité. Pour le deferasirox, peu importe la souche utilisée (WT ou Δ pvdF Δ pchA) la MIC₁₀₀ est supérieure à 64 μ M. Pour la 8-hydroxyquinoléine la MIC₁₀₀ est supérieure à 64 μ M pour PA01 WT et de 4 μ M pour la souche PA01 Δ pvdF Δ pchA.

Pour les PAM seuls, les valeurs pour la souche PA01 WT sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature (6,8 μ M pour NH₂-IRIRIRIR-NH₂¹³⁸ et 2,9 μ M pour NH₂-WKWLKKWIKG-NH₂¹³⁹). Pour la souche PA01 Δ pvdF Δ pchA les valeurs de MIC₁₀₀ sont identiques à celle obtenue pour PA01 WT. La fonctionnalisation des peptides avec une glycine en C-ter afin d'empêcher l'épimérisation du peptide lors du couplage en C-ter n'impacte donc pas significativement leurs activités antibactériennes sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats montrent, pour le peptide L-PAM (DFX-IRIRIRIRG-NH₂), une perte très importante d'activité du PAM probablement due à de sévères problèmes de précipitation. Le peptide L-PAM, DFX-WKWLKKWIKG-NH₂ quant à lui, possède une activité similaire, voir légèrement meilleure au PAM non fonctionnalisé, et le peptide 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂ possède également une activité antibactérienne légèrement meilleure que la MIC₁₀₀ du ligand 8HQ-Pro-OtBu (cette interprétation est valable pour les deux souches testées). À la

lumière de ces résultats, le peptide NH₂-IRIRIRIG-NH₂ a été abandonné au profit du peptide NH₂-WKWLKKWIKG-NH₂, possédant une activité bactéricide nettement meilleure après fonctionnalisation.

2.2.11.2 Détermination des MIC₁₀₀ sur *Pseudomonas aeruginosa* (métal seul, L, PAM, L-PAM et L + PAM en présence de métal)

La MIC₁₀₀ de ces mêmes éléments a également été mesurée en présence de métal.

Dans un premier temps, on a mesuré la toxicité des métaux seuls coordonnés au citrate (Fe^{III} et Ga^{III}) (Tableau 10, lignes 1 et 2). On constate la toxicité du gallium qui possède une MIC₁₀₀ de 16 µM pour la souche PA01 WT et 32 mM pour la souche PA01 ΔpvdFΔpchA et alors que pour le fer, on n'observe pas de toxicité dans la gamme de concentration testée.

Pour les lignes 3 à 6 qui correspondent aux ligands coordonnés avec le fer et le gallium, on n'observe aucune toxicité des complexes de fer (dans les concentrations étudiées), sur les deux souches. Quant aux complexes de gallium, ils ont une toxicité plus importante pour la souche PA01 ΔpvdFΔpchA que pour la WT : 8 µM vs >64 µM pour Ga^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃, et 0,5 µM vs 8 µM pour Ga^{III}(DFX)₂³⁻. Le complexe Ga^{III}(DFX)₂³⁻ est donc plus toxique que le ligand libre.

PAM/µM	PA01 WT	PA01 ΔpvdFΔpchA
① Fe ^{III} + Citrate	>64/>64/>64	>64/>64/>64
② Ga ^{III} + Citrate	32/16/16	64/32/32
⑦ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + Fe ^{III} + Citrate	4/4/8	4/4/4
⑧ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + Ga ^{III} + Citrate	4/4/8	2/1/2
⑤ Deferasirox + Fe ^{III}	>64/>64/>64	>64/>64/>64
⑥ Deferasirox + Ga ^{III}	8/8/16	1/0,5/0,5
⑭ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + Deferasirox	4/8/8	1/1/0,5
⑫ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + Deferasirox + Fe ^{III}	4/8/8	4/8/8
⑬ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + Deferasirox + Ga ^{III}	4/4/4	0,5/0,25/0,25
⑰ DFX-WKWLKKWIKG-NH ₂ + Fe ^{III}	2/2/2	2/2/2
⑱ DFX-WKWLKKWIKG-NH ₂ + Ga ^{III}	2/1/2	0,5/0,25/0,5
DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX	4/4/4	0,25/0,25/0,25
③ 8HQ-Pro-OtBu + Fe ^{III}	>64/>64/>64	>64/>64/>64
④ 8HQ-Pro-OtBu + Ga ^{III}	>64/>64/>64	8/8/8
⑪ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + 8HQ-Pro-OtBu	4/4/4	2/1/1
⑨ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + 8HQ-Pro-OtBu + Fe ^{III}	4/4/8	4/4/8
⑩ NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ + 8HQ-Pro-OtBu + Ga ^{III}	8/8/8	4/2/2
⑮ 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂ + Fe ^{III}	1/1/1	1/1/1
⑯ 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂ + Ga ^{III}	1/1/1	0,25/0,25/0,25
8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ	2/1/1	0,125/0,125/0,125

Tableau 10 : Valeurs de MIC₁₀₀ pour les métaux + citrate, ligand + métaux, PAM + métaux, PAM + ligand + métaux et les L-PAM + métaux. Métaux = Ga^{III} ou Fe^{III}

Les lignes 7 et 8 correspondent au peptide en présence de fer ou de gallium lié au citrate. On ne constate aucun gain significatif pour la souche PA01 WT ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'effet synergique. De manière générale, sur la souche WT, on constate que les complexes au gallium n'ont pas nécessairement une meilleure activité antibactérienne que les espèces sans. Cet effet peut s'expliquer par le fait que la MIC₁₀₀ du peptide (4 µM) est fortement inférieure à celle du Gallium seul (16 µM). L'écart d'activité étant important, la contribution du gallium à l'activité antibactérienne n'est pas visible. On notera que pour la souche PA01 ΔpvdFΔpchA, on

observe un léger gain d'activité pour l'échantillon $\text{NH}_2\text{-WKWLKKWIKG-NH}_2 + \text{Ga}^{\text{III}}(\text{citrate})_2$, on passe d'une MIC_{100} de 4 μM à 2 μM .

Les lignes 15 à 18 correspondent à l'espèce L-PAM complexée avec du fer ou du gallium. Pour ces complexes, on observe une MIC_{100} légèrement meilleure que le PAM seul, le L-PAM 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂ coordonné au gallium ou au fer possède une MIC_{100} de 1 μM tandis que le L-PAM, DFX-WKWLKKWIKG-NH₂ montre une MIC_{100} de 2 μM .

Les lignes 9 à 14 correspondent aux mélanges PAM + ligand et PAM + ligand + métal. Ces échantillons ont été préparés et analysés afin de déterminer si c'est bel et bien le greffage du ligand sur le peptide qui améliore la MIC_{100} ou simplement la présence des deux composés (ligand + PAM).

L'effet notable est l'amélioration de l'activité qui est observée uniquement pour les L-PAM et non pour les mélanges, ce qui indique que c'est bel et bien la fonctionnalisation qui améliore l'activité et non simplement la présence du ligand (peut être due à une meilleure interaction avec la membrane favorisant sa dislocation). Il est important de noter que la MIC_{100} pour les complexes L-PAM est identique au MIC_{100} des L-PAM seul (sans métal).

2.2.11.3 Détermination des MIC_{100} des L-PAM-L sur *Pseudomonas aeruginosa*

PAM/ μM	PA01 WT	PA01 $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}$
DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX	4/4/4	0,25/0,25/0,25
8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ	2/1/1	0,125/0,125/0,125

Tableau 11 : Valeurs de MIC_{100} pour les L-PAM-L

Les MIC_{100} des L-PAM-L ont été déterminées (Tableau 11). On ne mesure aucune perte d'activité antibactérienne notable en comparaison au PAM seul. On constate une très légère perte d'activité pour le L-PAM-L, DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX en comparaison au L-PAM, DFX-WKWLKKWIKG-NH₂.

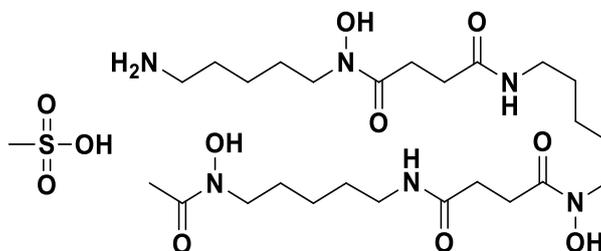


Figure 57 : Desferrioxamine B mesylate ($\text{pFe}^{3+} = 26,6$)

Afin de tester notre hypothèse de travail, les différents complexes que nous avons formés vont être mis en compétition avec un sidérophore. L'idée ici est de vérifier par spectroscopie qu'un sidérophore bactérien peut démétaller ces complexes-là. Cela constituera une preuve de concept vers la stratégie finale.

Dans un premier temps, afin de faciliter les analyses, le sidérophore choisi pour les compétitions est la desferrioxamine B (DFO B) qui est commercialisée à prix raisonnable et possède un pFe^{3+} de 26,6, ce qui est dans la gamme déterminée précédemment (voir plus haut) (Figure 54).¹⁵⁸ Le second avantage est un très faible signal en spectrophotométrie, puisque la molécule n'a pas d'aromatiques, ce qui limite ainsi les superpositions de bandes et facilite l'interprétation des spectres UV-Vis.

2.2.12 Analyse des bandes du Fe^{III} et Ga^{III} avec la DFO B

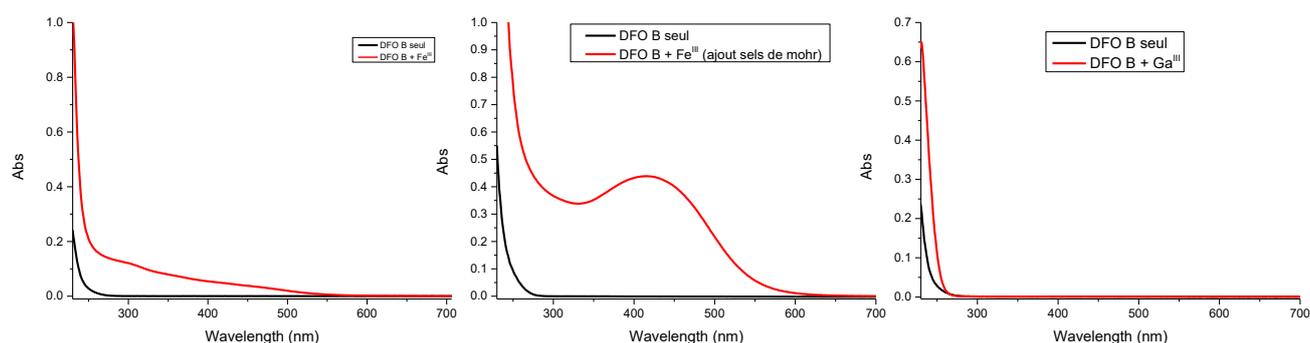


Figure 58 : Analyse spectrophotométrique du Fer et du Gallium avec la DFO B (les deux graphiques du haut [C] = 50 μ M de DFO B et de Fe^{III} ou Ga^{III}, graph du milieu [C] = 150 mM de DFO B et de Fe^{II} ajouté sous forme de sel de Mohr dans l'HEPES 100 mM pH 7,4). Il est important de noter qu'une fois le Fe^{II} coordonné au DFO B, il est oxydé quasiment instantanément en Fe^{III} (solvant non dégazé).

Dans un premier temps, deux échantillons ont été analysés (Figure 55 : spectres de gauche et du milieu), un avec le DFO coordonné au Fe^{III} préparé avec une solution de nitrate de Fe^{III} (Figure 55 : spectre de gauche) et un échantillon coordonné au Ga^{III} (Figure 55 : spectre de droite), le spectre noir correspond au DFO B seul et le spectre rouge au DFO B coordonné au fer ou au gallium (complexes 1 : 1). Avoir les spectres de ces espèces permettra après de suivre et quantifier la décooordination efficacement. Pour l'échantillon de droite, le DFO B et coordonné au Ga^{III}, aucune bande n'est observable, seulement une augmentation du signal aux alentours de 250 nm. Pour le spectre de gauche, correspondant au DFO B coordonné au Fe^{III}, on observe une augmentation d'absorbance entre 200 nm et 500 nm. Pour cet échantillon, la précipitation d'hydroxyde de fer est suspectée. C'est pourquoi, la même analyse a été réalisée en utilisant du Fe^{II} (sels de Mohr, spectre du milieu). On observe une bande aux alentours de 420 nm qui correspond à une bande MLCT.¹⁵⁶

Pour tous les complexes de gallium, aucun problème d'analyse n'est à déplorer, car aucun signal du Ga^{III} coordonné au DFO B n'est observable de 300 à 700 nm. Aussi, dans cette fenêtre spectrale, la décooordination du gallium de notre complexe peut être suivie facilement par disparition des bandes correspondant au complexe de départ. Pour les complexes de fer et des dérivés de la 8-hydroxyquinoléine (8HQ-Pro-OtBu, 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂ et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ), leur disparition pourra être suivie facilement au-dessus de 600 nm, car dans cette zone du spectre le signal du Fe^{III}(DFO B) est très faible et le spectre de Fe^{III}(8HQ-Pro-XXX)₃ possède une bande aux alentours de 600 nm (MLCT). Pour les complexes de fer avec les dérivés du deferasirox (deferasirox, DFX-WKWLKKWIKG-NH₂ et DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX) la décooordination sera suivie aux alentours de 340-350 nm, c'est la zone où le signal Fe^{III}(DFO B) est le plus faible et où l'on observe une bande Fe^{III}(DFX-XXX)₂.

2.2.12.1 Compétition entre les complexes discrets de DFX et DFX-PAM et la DFO B

Dans un premier temps, les expériences de compétition ont été réalisées avec le deferasirox ainsi que le L-PAM (DFX-WKWLKWKWIKG-NH₂), en présence de 100 équivalents (par rapport au ligand) de desferrioxamine B.

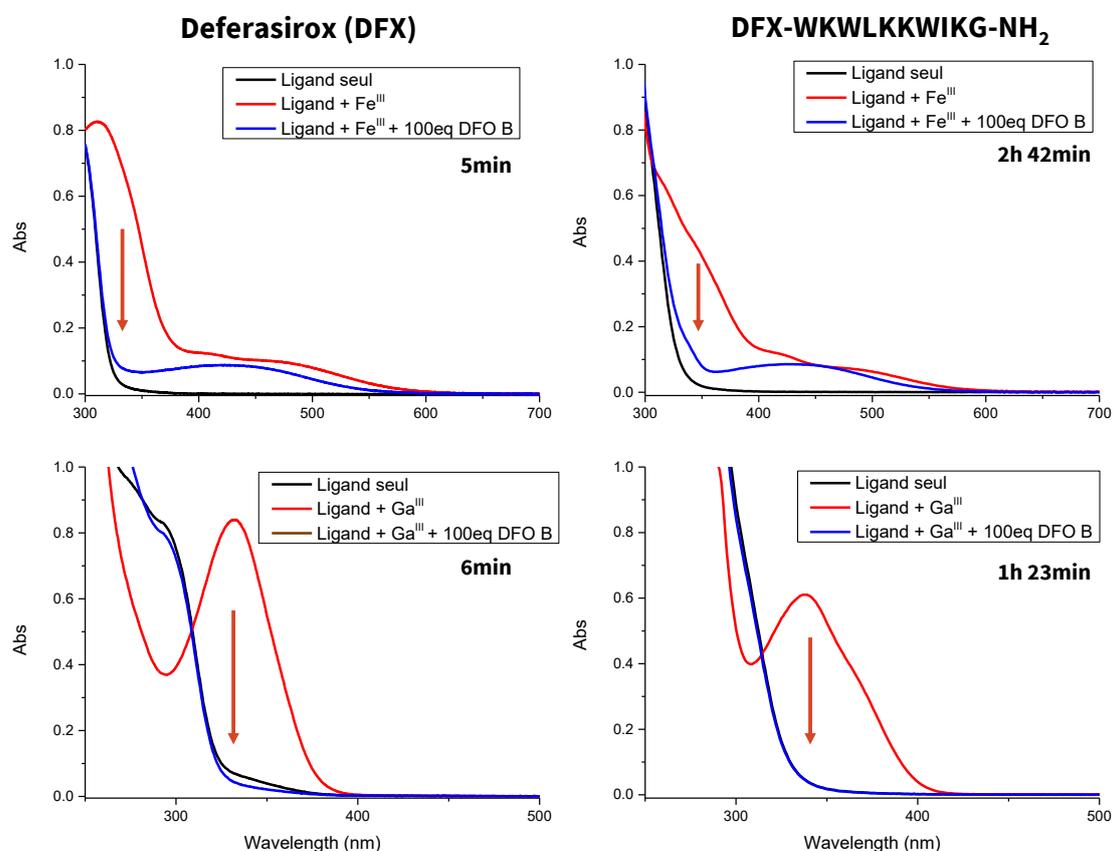


Figure 59 : Compétition entre la DFO B et les complexes du deferasirox (DFX et DFX-WKWLKWKWIKG-NH₂). Conditions : 50 μ M de DFX-WKWLKWKWIKG-NH₂, 22,5 μ M de Fe^{III} (sels de Mohr) ou Ga^{III} (GaCl₃) (1 : 2), 5 mM de DFO B et 100 mM de tampon HEPES pH 7,4.

Le premier constat est la disparition des bandes d'absorption caractéristiques des complexes de départ, ce qui indique que la DFO B est un ligand capable de décoordonner tous les complexes. On observe une cinétique de décooordination de l'ion métallique (Fe^{III} ou Ga^{III}) nettement plus rapide pour les ligands seuls que pour les L-PAM. La décooordination complète du métal des complexes Fe^{III} (DFX)₂ et Ga^{III}(DFX)₂ est atteinte après respectivement 5 min et 6 min (Figure 56). En comparaison, pour les L-PAM Fe^{III} (DFX-WKWLKWKWIKG-NH₂)₂ et Ga^{III} (DFX-WKWLKWKWIKG-NH₂)₂, elle est atteinte après respectivement 2 h 42 min et 1 h 23 min. Cette observation peut être expliquée par une augmentation de la gêne stérique autour du complexe, due à la fonctionnalisation par le PAM, ce qui réduit l'accessibilité du métal pour le sidérophore et ainsi ralentit la cinétique de capture de l'ion métallique. La décooordination du gallium est plus rapide que celle du fer.

2.2.12.2 Compétition entre la DFO B et la 8HQ-Pro-OtBu et le PAM 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂ (L-PAM)

La même méthodologie d'analyse a été appliquée sur les complexes Fe^{III}(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂)₃ et Ga^{III}(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂)₃ : une fois les complexes formés, 100 équivalents de DFO B (par rapport au ligand) sont ajoutés.

Comme discuté ci-dessus (partie 2.2.12.3), on observe la disparition des bandes d'absorption caractéristiques des complexes de départ, indiquant une décooordination de l'ion métallique (Fe^{III} ou Ga^{III}) de notre complexe en faveur du DFO B. On constate également que la cinétique de décooordination complète de l'ion métallique pour les ligands seuls est nettement plus rapide que pour les L-PAM. Pour les complexes Fe^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃ et Ga^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃, la décooordination complète est atteinte après 7 min pour le complexe au Fe^{III} et 10 min pour le complexe au Ga^{III}. En comparaison, pour les L-PAM complexes Fe^{III}(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂)₃ et Ga^{III}(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂)₃, la décooordination est atteinte après 1 h pour le complexe au Fe^{III} et 1 h 10 min pour le complexe au Ga^{III}.

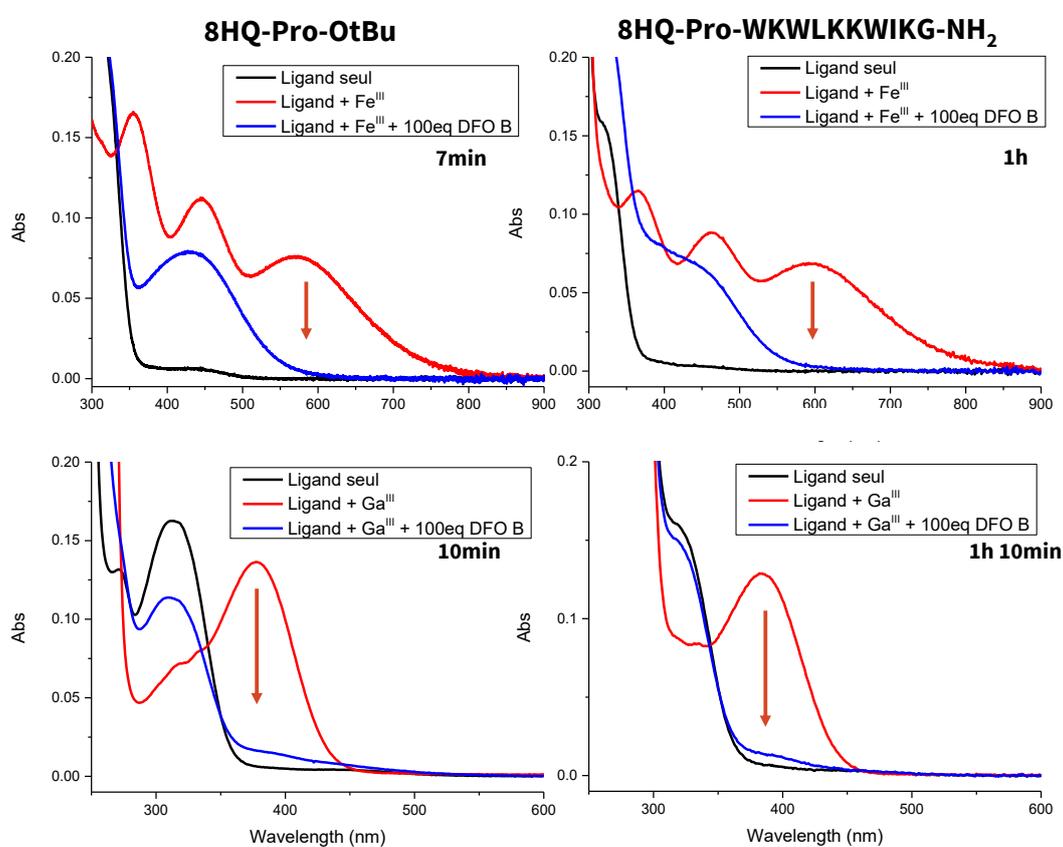


Figure 60 : Compétition DFO B avec les dérivés de la 8-hydroxyquinoléine (8HQ-Pro-OtBu et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂). Conditions : 50 μ M de 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂, 15 μ M de Fe^{III} ou Ga^{III} (1 : 3), 5 mM de DFO B et 100 mM de tampon HEPES pH 7,4.

La stabilité des complexes à pH physiologique permet tout de même une décooordination de l'ion métallique du complexe par le biais d'un sidérophore.

La durée maximum pour une décooordination complète est de 1 h 10 min. Cependant, la quantité de sidérophore nécessaire pour obtenir ce ratio de relargage est élevée (100 équivalents par rapport au ligand, soit 333 équivalents par rapport au complexe). Ceci peut être une limitation de notre modèle qui induit une concentration minimum de sidérophore nécessaire pour en relarguer une quantité suffisante afin d'obtenir un effet antibactérien. Autrement dit, les petites infections pourraient ne pas sécréter assez de sidérophore et la libération de PAM ne serait pas suffisante pour atteindre la MIC₁₀₀ (Figure 57).

2.2.12.3 Compétition entre la DFO B et DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (L-PAM-L)

Il est important de noter que le ratio entre le métal (Ga^{III} ou Fe^{III})/ligand (L-PAM-L) a été modifié afin d'avoir la quantité nécessaire de métal pour coordonner tous les sites disponibles des L-PAM-L. Le ratio pour le complexe $[\text{M}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX})]$ est de 1:1 et le ratio pour le complexe $[\text{M}^{\text{III}}_2(\text{8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ})_3]$ est de 2:3 ($\text{M} = \text{Ga}^{\text{III}}$ ou Fe^{III}).

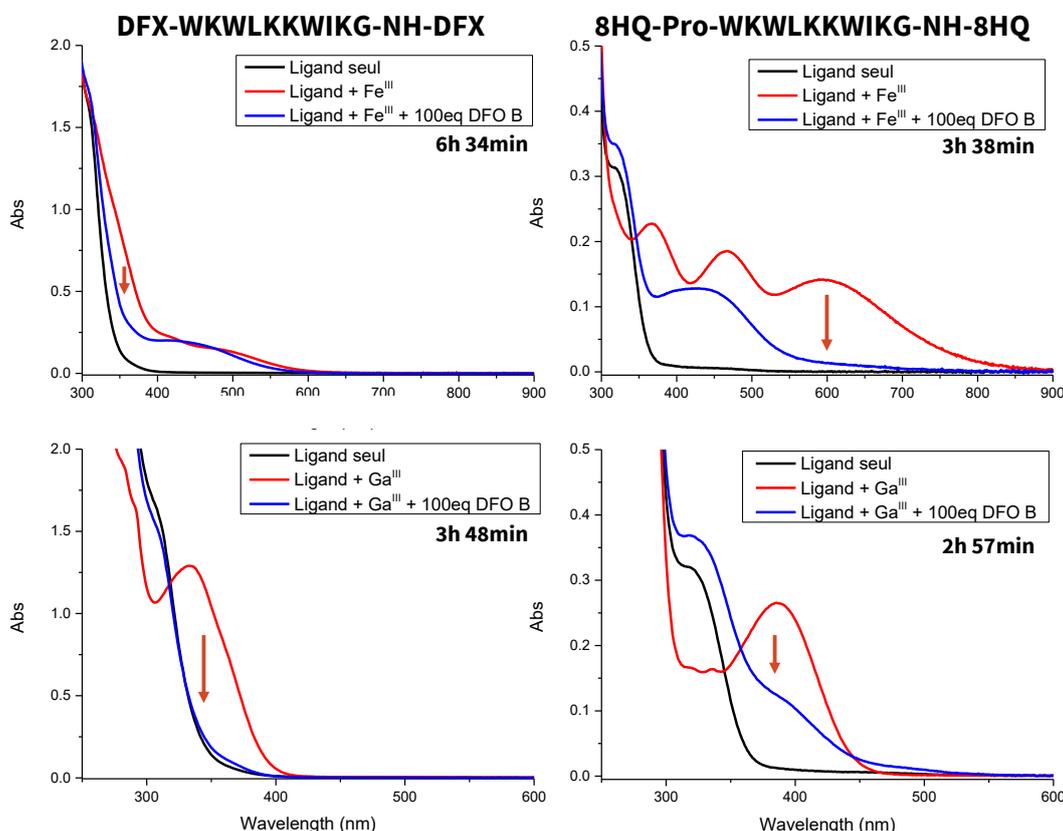


Figure 61 : Compétition DFO B avec DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ. Conditions : 50 μM de 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ ou DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX, 45 μM de Fe^{III} ou Ga^{III} (1 : 1) pour le complexe avec DFX-WKWLKKWIKG-DFX ou 30 μM de Fe^{III} ou Ga^{III} (2 : 3) pour le complexe 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ, 5 mM de DFO B et 100 mM de tampon HEPES pH 7,4.

Des expériences de compétition ont été réalisées avec les L-PAM-L, (DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ) à 50 μM pour éviter une éventuelle précipitation des différents polymères de coordination. De plus, les deux ions métalliques Fe^{III} et Ga^{III} ont été testés. Une fois les complexes formés, 100 équivalents de DFO B (par rapport aux L-PAM-L) sont ajoutés, et on suit la disparition des complexes initiaux (Figure 58) est suivie. Les spectres bleus correspondent aux spectres finaux, lorsque l'équilibre est atteint.

Le premier constat est que, même en présence de 100 équivalents de DFO, la décooordination n'est pas totale, pour les deux échantillons (DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX + Fe^{III} et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ + Ga^{III}). Le pourcentage maximal de décooordination observé est d'environ 50 %. Malgré une incubation plus longue que le temps indiqué (jusqu'à 6 jours, 13 h et 30 min), le spectre du mélange n'évolue plus. Ceci peut traduire une affinité plus importante des dérivés du deferasirox pour le Fe^{III} et une meilleure affinité des dérivés de la 8-hydroxyquinoléine pour le Ga^{III} .

Pour les complexes des L-PAM-L, on observe les mêmes effets qu'avec les L-PAM, mais exacerbés. Le sidérophore a encore plus de difficulté à accéder au métal du complexe, ce qui ralentit drastiquement la cinétique de décooordination.

2.2.13 Formations des polymères de coordination

L'objectif est de préparer différents polymères à base de fer (ou de gallium) coordonnés aux L-PAM-L. Pour rappel, ce polymère de coordination jouera le rôle de stock inerte de PAM en absence de sidérophore. La formation de quatre polymères de coordination a été réalisée $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKWKWIKG-NH-DFX})]_n$ et $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKWKWIKG-NH-DFX})]_n$, avec une stœchiométrie 1:1 (M/L-PAM-L), ainsi que $[\text{Fe}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKWKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$ et $[\text{Ga}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKWKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$ possédant une stœchiométrie 2:3 (M/L-PAM-L).

Après l'essai de différentes conditions (voir partie expérimentale), quatre d'entre elles ont été sélectionnées, car elles ont permis la formation des polymères voulus sous forme de précipité (Tableau 12 ci-dessous).

Conditions	DFX-WKWLKWKWIKG-NH-DFX	8HQ-Pro-WKWLKWKWIKG-NH-8HQ
TRIS 0,1 M pH 7,4 _ complexes Fe^{III}	gélification	0
TRIS 0,1 M pH 7,4 _ complexes Ga^{III}	gélification	/
TRIS 0,1 M CO_3^{2-} 50 mM pH7,4 _ complexe Ga^{III}	/	gélification
TRIS 0,1 M CO_3^{2-} 50 mM pH7,4 _ complexe Fe^{III}	/	gélification

Tableau 12 : Tableau des conditions de gélification. Légende : /, conditions tester, mais ou aucune gélification n'a eu lieu ; 0, conditions qui n'ont pas été testées. Chaque échantillon est composé de 1 mM de complexe (Fe^{III} ou Ga^{III}).

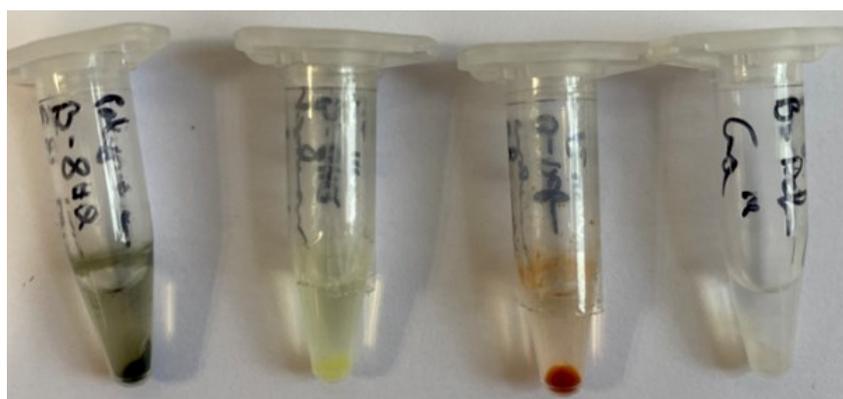


Figure 62 : Photo des polymères de coordination formés. Microvials (Eppendorfs) de gauche à droite : (précipité foncé) polymère de coordination $\text{Fe}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKWKWIKG-NH-8HQ})_3$; (précipité jaune) polymère de coordination $\text{Ga}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKWKWIKG-NH-8HQ})_3$; (précipité rouge) polymère de coordination $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKWKWIKG-NH-DFX})$; et (précipité blanc) polymère de coordination $\text{Ga}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKWKWIKG-NH-DFX})$. Les conditions de formation des précipités sont celles présentées dans le Tableau 12 ci-dessus.

Afin de caractériser le relargage du PAM en présence d'un sidérophore, les analyses spectroscopiques sont plus difficiles que précédemment puisque le polymère de coordination est vu comme un solide. Deux stratégies de suivi ont donc été imaginées.

2.2.14 Stratégies développées pour le suivi du relargage des PAM (gel d'agarose et cassette à dialyse)

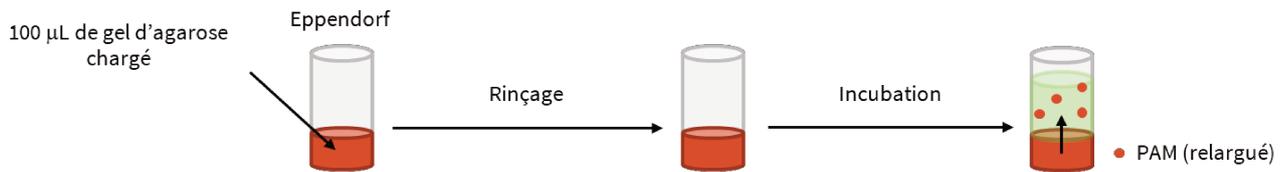


Figure 63 : Stratégie avec le gel d'agarose. Conditions : 100 µL de gel d'agarose à 2,3 ou 4 % chargé à chaud avec 1 mM de complexe (5 min d'agitation à chaud), puis ajout du tampon correspondant au polymère voulu (voir Tableau 12) (une nouvelle fois 5 min d'agitation à chaud puis refroidit à température ambiante). Étape de rinçage : trois rinçages de 2 h avec une solution de tampon TRIS à 20 mM pH 7,4 et un dernier rinçage de 16 h dans les mêmes conditions. Incubation : ajout de 1 mL de surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* ou d'une solution de sidérophore, puis suivie du relargage par spectrophotométrie et analyse HPLC.

La première stratégie consiste à former le polymère de coordination à l'intérieur d'une matrice d'agarose. L'agarose est dissous et conservé à chaud afin qu'il reste liquide, puis les composants du polymère sont ajoutés (L-PAM-L puis fer ou gallium), suivi par le tampon. Le mélange est incubé 5 min à 100 °C, 2000 rpm, puis laissé à refroidir jusqu'à température ambiante pour que le gel se solidifie. Il est ensuite rincé pour enlever les espèces qui peuvent librement diffuser (ex. ions métalliques et/ou peptides en excès). Puis, du surnageant de culture de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sauvages (PA01 WT), contenant des sidérophores, est déposé sur le gel (Figure 60). Le relargage de métal et de peptide est quantifié par analyse du surnageant de culture par HPLC et spectroscopie UV-Vis. Cette méthodologie est appliquée pour tous les polymères de coordination produits. L'intérêt d'utiliser le surnageant de culture carencée de PA01 WT est qu'il est très proche, en nature et concentrations, du mélange de sidérophores retrouvé dans le milieu de culture lors des tests de MIC₁₀₀.

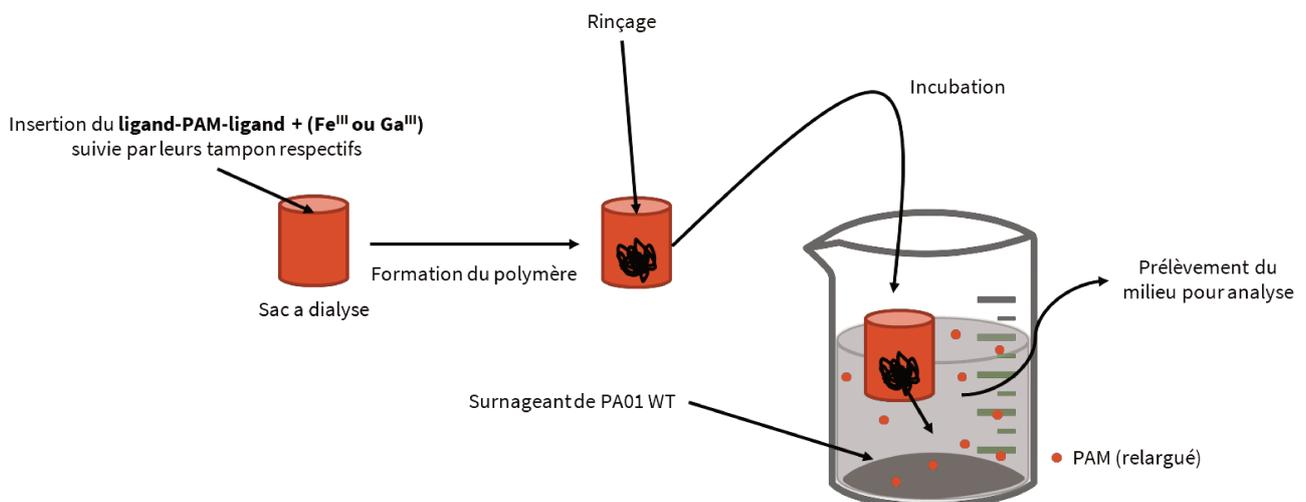


Figure 64 : Stratégie de la cassette à dialyse. Conditions : 100 µL de solution composés de 1 mM de complexe (Fer ou gallium) et le tampon correspondant au polymère voulu (voir Tableau 12). Rinçage : deux rinçages de 2 h avec une solution de tampon TRIS à 20 mM pH 7,4 et un derniers rinçages de 16 h dans les mêmes conditions. Incubation : ajout de 3 mL de surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* puis suivi du relargage par spectrophotométrie et analyse HPLC.

La seconde stratégie consiste à former le polymère à l'intérieur d'une cassette de dialyse possédant des pores suffisamment grands (3000 Da) pour laisser passer les sidérophores, les L-PAM-L et les complexes (métal/sidérophore), mais pas un polymère de coordination de ces espèces. Le polymère sera ensuite rincé dans une solution de rinçage (20 mM tampons TRIS pH 7,4) 2 fois 2 h et une fois 24 h (rinçage par diffusion) (Figure 61). La cassette de dialyse sera finalement incubée dans du surnageant de culture PA01 et le relargage quantifié par analyse HPLC et spectroscopie UV-Vis.

2.2.14.1 Test de la stratégie de relargage « Gel d'agarose » avec de la DFO B

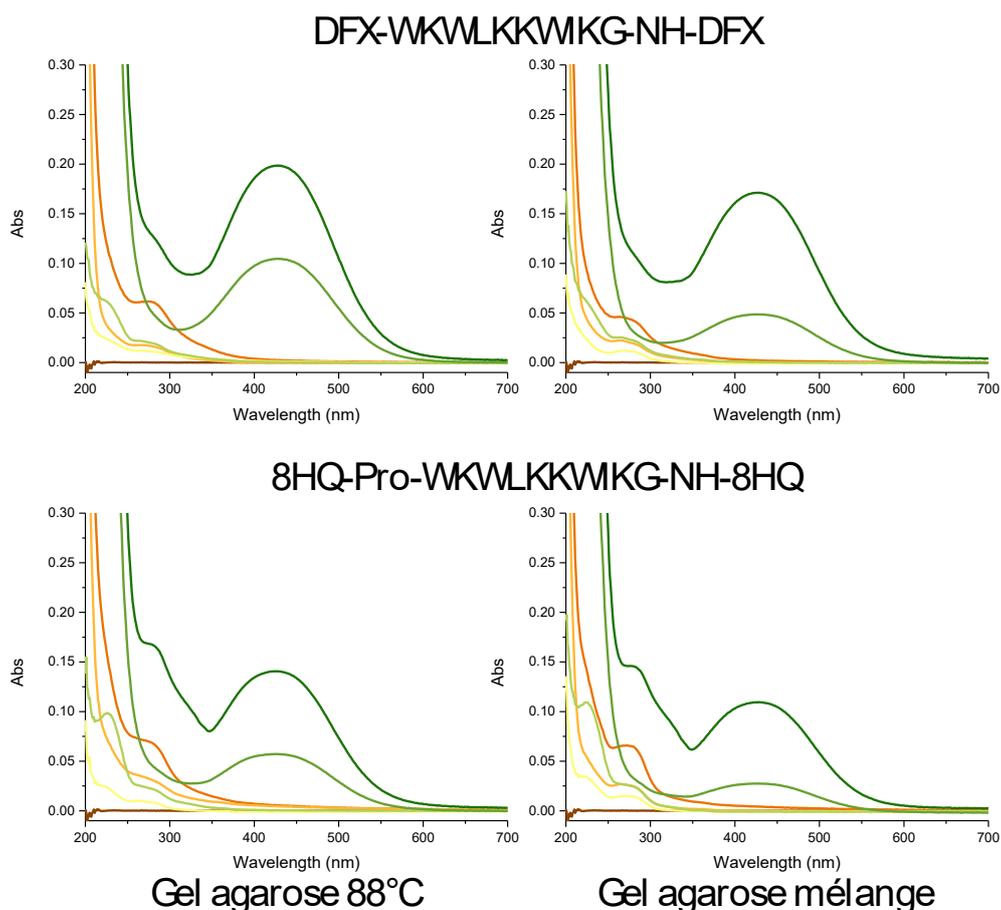


Figure 65 : Test de relargage du fer des polymères de coordination en présence DFO B, en utilisant la stratégie du gel d'agarose. Conditions : 100 μ L de gel d'agarose à 5 %, soit un mélange soit agarose 88 °C uniquement, avec 1 mM de L-PAM-L pour une concentration en complexes final de 1 mM pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX et 0,67 mM pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ et le mélange de tampons correspondant aux complexes voulus (voir Tableau 12). Le spectre marron correspond au blanc, le spectre jaune (1^{er} rinçage de 2 h avec 20 mM de tampon TRIS pH 7,4), orange clair (2^e rinçage), orange foncé (3^e rinçage) et vert clair (4^e rinçage de 16 h). Les deux derniers spectres vert et vert foncé correspondent aux échantillons après ajout de la solution de DFO B, après 16 h et 83 h respectivement.

Pour faciliter le suivi et sélectionner le meilleur gel d'agarose pour le relargage, deux gels d'agarose à 5 % avec différentes compositions ont été testés et les analyses ont été réalisées pour les polymères à base de fer pour faciliter le suivi spectrophotométrique. Le premier est composé uniquement d'agarose ayant un point de fusion à 88 °C, le second est un mélange 1 : 1 entre ce dernier agarose et un agarose à bas point de fusion (28 °C). Les 4 rinçages réalisés montrent qu'au début il y a plusieurs espèces labiles qui diffusent librement et en faible quantité avec un relargage de plus en plus important jusqu'au troisième lavage inclus. Cependant le quatrième rinçage durant 16 h amène à un relargage nettement moins important que les rinçages 2 et 3 (Figure 62). Cela indique qu'en l'absence de sidérophore et une fois toutes les espèces labiles relarguées, le stock produit est relativement stable dans des conditions de température et de pH physiologique (pH 7,4, tampon TRIS 20 mM, 37 °C).

Pour les deux spectres vert foncé et vert (Figure 62) la bande à 425 nm correspond au complexe Fe^{III}(DFO B) ce qui traduit la coordination du Fe^{III} avec la DFO B et donc la décooordination de cet ion métallique de nos polymères (capture du Fe^{III} de nos polymères par la DFO B).

Le meilleur gel pour le relargage est celui uniquement composé d'un seul type d'agarose. En effet, la quantité de fer relarguée pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ est de 47,7 μ M après 83 h d'incubation (37 °C,

400 rpm, tampon TRIS 100 mM pH 7,4) et de 68 μM pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX. En revanche, avec le mélange d'agarose, les valeurs sont d'environ 10 μM plus faibles pour chaque L-PAM-L (37,5 μM pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ et 58 μM pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX).

Les gels contenant les polymères formés doivent être stables à 37 °C pour permettre l'incubation avec le surnageant de culture. Or le mélange des deux agaroses fond partiellement à 37 °C (gel ramolli, mais non liquide, l'agitation peut arracher des fragments du gel) contrairement au gel d'agarose fondant à 88 °C qui reste bien rigide. On constate également que le relargage est plus favorable dans le gel classique comparé au mélange. C'est pourquoi le gel fondant à 88 °C a été sélectionné pour la suite des analyses.

2.2.14.2 Analyses du surnageant de culture PA01 WT

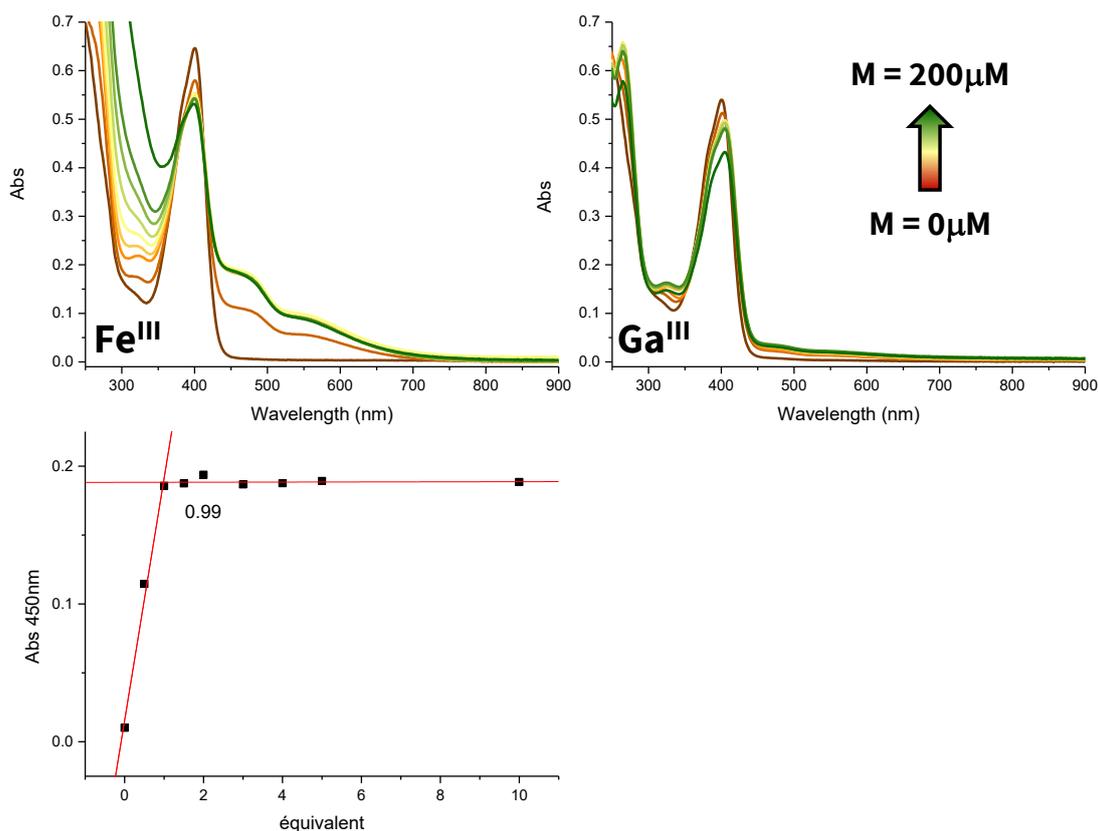


Figure 66 : Titrage du surnageant de culture PA01 WT par une solution de gallium ou de fer. Conditions : 1 mL de surnageant de culture (diluée 5X) suivie par 8 ajouts d'ions métalliques (Fe^{III} et Ga^{III}) de 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 et 200 μM

Dans un premier temps, une analyse du surnageant de culture qui nous a été fournie par l'équipe du Dr. Isabelle Schalk a été réalisée afin d'observer les spectres du milieu en fonction de la quantité de métal coordonné (fer ou gallium) sur le sidérophore par spectrophotométrie. Le spectre marron correspond au milieu CAA (CAA = milieu utilisé pour induire une carence en fer chez *Pseudomonas aeruginosa*, il est composé de 5 g/L de Bacto casaminoacides, 1,46 g/L de KH_2PO_4 , 0,25 g/L de MgSO_4 et la concentration en fer du milieu est de 20 nM) seul utilisé pour carencer *Pseudomonas aeruginosa*. Les autres spectres (Figure 63, orange, jaune et vert) correspondent au surnageant de culture avec différentes quantités de fer ou de gallium, afin de quantifier la pyoverdine dans le surnageant et également afin d'observer où se situent les bandes du complexe.

Pour le fer, la coordination peut être suivie par le biais des deux bandes aux alentours de 450 nm et 550 nm, qui correspondent à la coordination du métal par la pyoverdine. Pour le gallium, on n'observe pas d'apparition de bande, le suivi du relargage métallique pour le polymère à base de gallium sera donc impossible à mettre

en œuvre. D'après le titrage réalisé avec le fer et sachant la stœchiométrie du complexe Fe^{III}-pyoverdine (1 : 1), la concentration estimée du surnageant de culture PA01 WT est d'environ 100 μM de pyoverdine.

La quantité de pyoverdine dans le surnageant a été déterminée par dosage métallique (Figure 63) où l'on atteint un plateau correspondant à une stœchiométrie 1 : 1 et de 19,8 μM (450 nm). Le milieu ayant été dilué 5 fois. Cette valeur doit être multipliée par 5 pour obtenir une concentration du surnageant d'environ 99 μM. Cependant, le titrage possède peu de point avant l'apparition du plateau. La valeur obtenue est imprécise, mais reste utilisable, car nous ne recherchons pas une concentration exacte, mais une estimation afin de savoir à quelle concentration de polymère nous pouvons travailler (afin d'avoir un ratio sidérophore/polymère permettant d'observer la libération de L-PAM-L). Cette estimation est aussi cohérente avec les concentrations estimées par l'équipe du Dr. Isabelle Schalk.

La bande de la pyochéline étant située aux alentours de 300 nm. Il n'est pas possible de la quantifier à cause de la contribution du milieu ainsi que du signal de la pyoverdine.

2.2.14.3 Test de la stratégie « Gel d'agarose » avec du surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa*

Par la suite, nous avons utilisé ce surnageant pour tester notre stratégie de gel d'agarose. Nous avons fait varier la concentration du gel d'agarose de 2 à 4 % (Figure 64), afin de voir s'il était possible de moduler la libération par le biais de la densité du gel d'agarose utilisée avec l'idée que moins le gel est dense, plus les PAM devraient avoir des facilités à diffuser du gel vers la solution, et le sidérophore aura également plus de facilité à accéder au métal qui maintient le polymère de coordination.

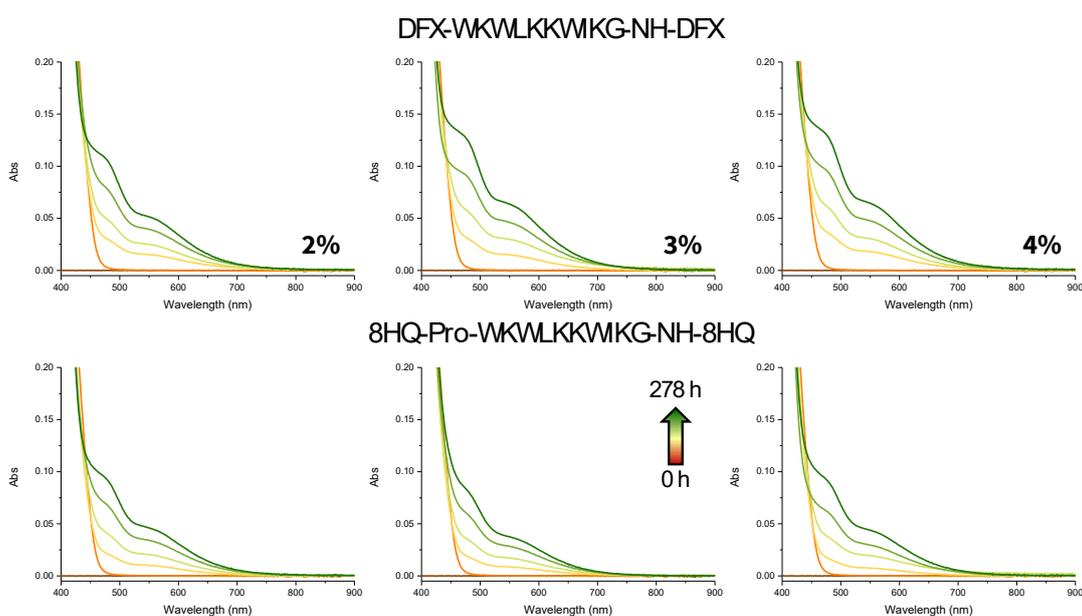


Figure 67 : Quantification du relargage du fer depuis des gels d'agarose dans le milieu de culture de *Pseudomonas aeruginosa*, à différentes concentrations en agarose (2,3 et 4 %) par spectrophotométrie d'absorption électronique. Conditions : 1 mL de surnageant de culture PA01 WT, 100 μL de gel d'agarose chargé avec 1 mM de polymère de Fe^{III} et le mélange de tampon pour le polymère voulu.

Le spectre marron correspond au milieu CAA, et les autres (orange, jaune et vert) correspondent au milieu après différents temps d'incubation avec le gel d'agarose chargé en polymère de coordination (orange = 0 h, jaune = 16 h, vert clair = 43 h, vert = 112 h et vert foncé = 278 h).

Cette analyse nous permet d'évaluer la capacité du sidérophore à capturer le fer de notre polymère de coordination (dans le gel) et également comment le complexe fer-sidérophore diffuse dans la solution. Aucun gain significatif de relargage de métal n'est observé pour les différentes concentrations d'agarose. En effet,

pour les différents pourcentages d'agarose, le relargage est quasiment le même (fourchette comprise entre 50 μM et 75 μM).

Des analyses HPLC ont également été entreprises afin de pouvoir quantifier directement les PAM libérés (Figure 65).

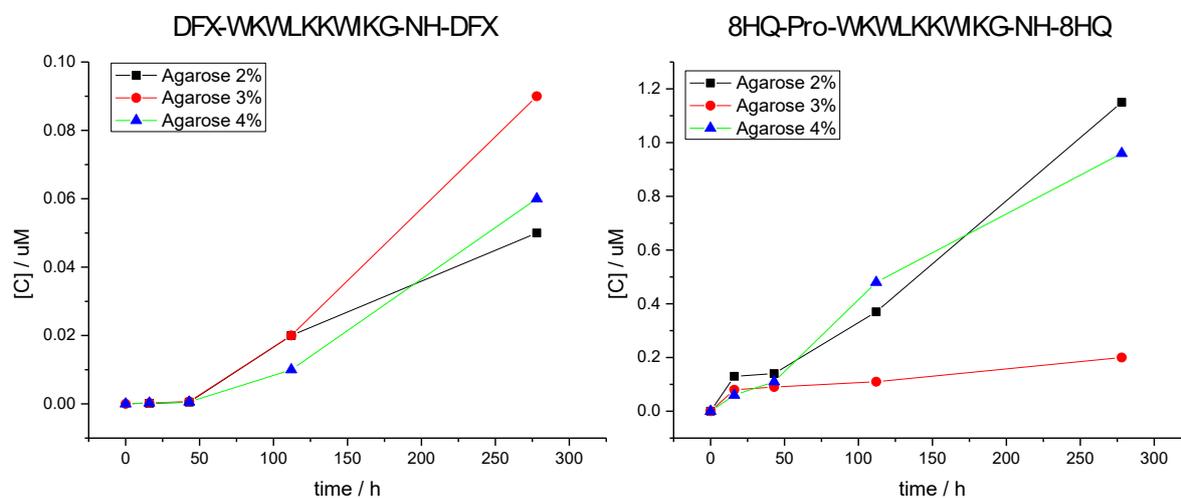


Figure 68 : Quantification du relargage des L-PAM-L depuis des gels d'agarose à différentes concentrations en agarose (2,3 et 4 %) par HPLC. Conditions : 100 μL de gel d'agarose à 2,3 ou 4 % chargé avec 1 mM de polymère $[\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{L-Pam-L})_y]_n$ et le mélange de tampon pour le polymère voulu. Les concentrations indiquées sur le graphique correspondent aux concentrations en L-PAM-L dans le surnageant de culture PA01 WT.

À chaque prise de valeur avec le spectrophotomètre (Figure 65), un volume de 20 μL est prélevée puis injecté en HPLC.

Contrairement à ce qui a été observé pour le fer, le relargage du PAM est très faible (moins de 1 μM) et prend beaucoup de temps avant de s'initier (48-72h). Ceci est peu compatible avec le principe de base de la stratégie : la présence de sidérophore ne déclenche pas un relargage de PAM suffisamment important ni rapidement pour être bactéricide.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet effet. D'abord, la morphologie du gel d'agarose, qui est déposé dans le fond d'un microvial Eppendorf de 1,5 mL. La surface en contact avec le surnageant de culture est donc peu importante au regard du volume de gel. Cela peut donc expliquer la diffusion lente des L-PAM-L observée dans ce cas de figure. Une diminution de l'épaisseur du gel déposé (augmenter le ratio surface d'échange/volume du) pourrait limiter ce problème.

Nous avons décidé de tester directement le gel d'agarose chargé en polymère sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* WT en diminuant la quantité de gel déposé pour augmenter la surface d'échange.

2.2.14.4 Test gel d'agarose sur souches *Pseudomonas aeruginosa* WT

L'objectif de ce test est d'obtenir la preuve de concept de notre stratégie avec notre polymère pris dans un gel d'agarose, en présence d'une culture bactérienne.

Néanmoins, avant de le réaliser, il faut d'abord déterminer si un rinçage des gels déposés dans les puits de la plaque est nécessaire, c'est-à-dire voir si la quantité de L-PAM-L relargué est négligeable ou non dans le cas où l'on ne fait pas de rinçage avec dépôt des gels.

Dans un premier temps, une plaque (composition dans le Tableau 13 ci-dessous) composée de conditions témoins (polymères de coordinations, gel d'agarose seule, L-PAM-L seuls, sels de citrates de Fe ou Ga [permettant de former des complexes solubles en conditions physiologiques]) a été préparée afin de réaliser des tests de rinçage. Le volume de gel déposé est de 2 μ L, et ce volume est déposé sur les bords du fond des puits puis étiré un maximum afin d'augmenter la surface d'échange.

A1 à A2	A3 à A4	A5 à A6	A7 à A8	A9 à A10	A11 à A12
Agarose 2%	Agarose 2 % + NH ₂ - WKWLKKWIKG- NH ₂ seul	Agarose 2 % + (citrate) Fe ^{III}	Agarose 2 % + (citrate) Ga ^{III}	Agarose 2 % + Bis-Def seul	Agarose 2 % + Bis-8HQ seul
B1 à B2	B3 à B4	B5 à B6	B7 à B8	B9 à B10	B11 à B12
Agarose 2% + Bis-Def + Fe ^{III} (polymère)	Agarose 2% + Bis-8HQ + Fe ^{III} (polymère)	Agarose 2% + Bis-Def + Ga ^{III} (polymère)	Agarose 2% + Bis-8HQ + Ga ^{III} (polymère)		

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des conditions pour les tests de rinçage réalisés avec une plaque multipuits

Une fois les dépôts faits et le gel figé, ils ont été incubés avec 100 μ L d'une solution de tampon à 100 mM de TRIS pH 7,4 dans chaque puits. L'absorbance à 315 nm, région commune où chaque L-PAM-L possède une bande d'absorption, est suivie sur 30 min (Figure 66).

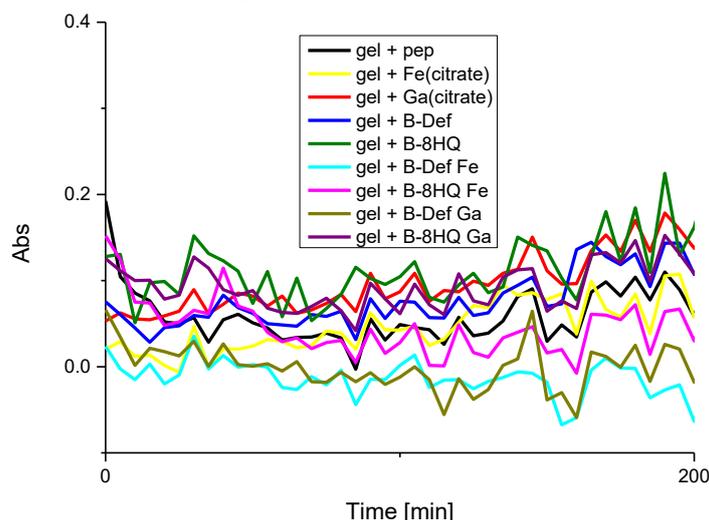


Figure 69 : Test de relargage en plaque multipuits des L-PAM-L dans la solution de tampon après dépôt des gels. Les résultats montrés le sont après soustraction du blanc.

Aucun gain significatif d'absorbance à 315 nm n'est observé (Figure 66), néanmoins ces résultats sont à relativiser au vu du bruit de la mesure. Nous sommes tout de même passés à l'étape suivante en partant de l'hypothèse que la diffusion des monomères n'étant pas engagés dans le polymère de coordination est assez faible pour pouvoir être négligée. De ce fait, les gels seront engagés dans les tests sur les souches bactériennes sans avoir été préalablement rincés, en tant qu'expérience préliminaire.

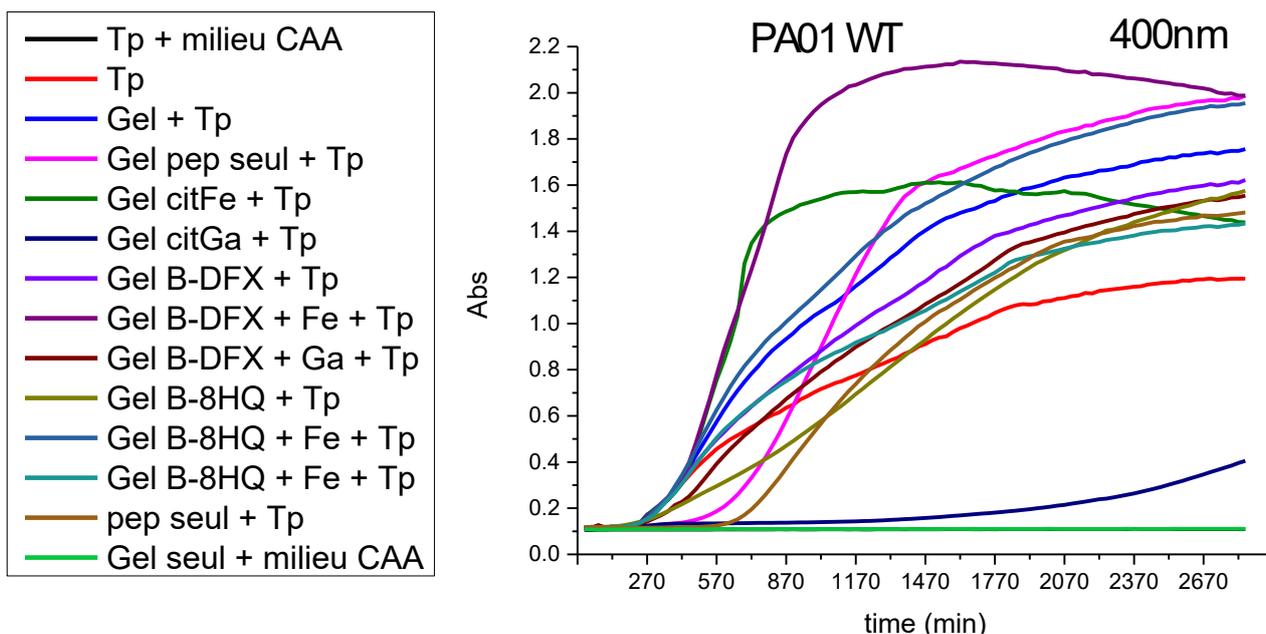


Figure 70 : Test de croissance bactérienne en présence des L-PAM-L à partir d'un gel d'agarose sur la souche PA01 WT. Dépôt : 2 μ L de gel d'agarose à 2% chargé avec 1 mM de polymère de Fe^{III} ou de Ga^{III} et le mélange de tampon pour le polymère voulu (voir tableau 12).

Les analyses suivantes consistent à déposer 2 μ L de gel d'agarose à l'intérieur des puits d'une plaque 96 puits (dépôt le plus fin possible). On ajoute ensuite 200 μ L de milieu de culture de la souche PA01 WT dans les puits et on suit le développement bactérien par absorbance, toutes les 30 min durant 48 h (Figure 67).

En prenant en considération la concentration du polymère dans le gel d'agarose et le volume de milieu bactérien qui a été ajouté, on peut calculer la concentration maximale de L-PAM-L qui pourrait être libérée dans le milieu de culture. Cette concentration est de 10 μ M, une concentration supérieure à la MIC₁₀₀ des deux L-PAM-L et inférieure à la concentration de pyoverdine dans le milieu de culture (env. 100 μ M). Or, on observe une augmentation de l'absorbance à 400 nm dans tous les cas de figure, ce qui correspond à une croissance bactérienne. Les tests montrent que dans ces conditions, aucune activité bactéricide n'est observée, ce qui traduit un relargage des L-PAM-L à des concentrations bien inférieures à la MIC₁₀₀ pour 48 h d'incubation.

Cette expérience devra donc être répétée avec une quantité plus importante de L-PAM-L sous forme de polymère de coordination.

2.2.14.5 Stratégie cassette à dialyse

Comme présentée plus haut, la méthodologie de la cassette à dialyse consiste à former le polymère à l'intérieur de la cassette dont la membrane permet la diffusion de molécules à faible poids moléculaire (en dessous de 3000 Da) et donc devrait retenir le polymère de coordination. 100 μ L d'une solution composée de 1 mM L-PAM-L complexé et du mélange de tampons adéquats pour la formation du polymère voulu est mise à incuber dans la cassette. Les rinçages pourront être réalisés par diffusion (incubation de la cassette dans 3 mL de tampon TRIS 100 mM pH 7,4). Une fois les rinçages réalisés, la cassette à dialyse sera incubée dans le surnageant de culture de PA01 WT afin d'observer le relargage obtenu avec cette technique. À terme la cassette sera directement incubée dans le milieu bactérien (en présence de bactéries) pour déterminer son activité bactéricide. La membrane de la cassette de dialyse est un élément essentiel, car elle doit avoir une taille de pores pouvant laisser passer les sidérophores, complexes (sidérophore/métal) et L-PAM-L libre, mais pas trop grande afin d'éviter que des fragments du polymère traversent la membrane. Nous avons donc utilisé une membrane dont le « cut-off » est de 3000 Da.

Il est important de noter que le volume de surnageant de culture utilisé pour cette méthode est trois fois plus élevé que pour la méthode du gel d'agarose, ce qui induit un facteur de dilution de 3. C'est pourquoi, afin de pouvoir comparer les résultats des deux méthodologies, les valeurs des analyses (décrite ci-après) du type cassette à dialyse ont été multipliées par trois.

2.2.14.6 Quantification du relargage passif des L-PAM-L par HPLC en utilisant la méthodologie cassette à dialyse

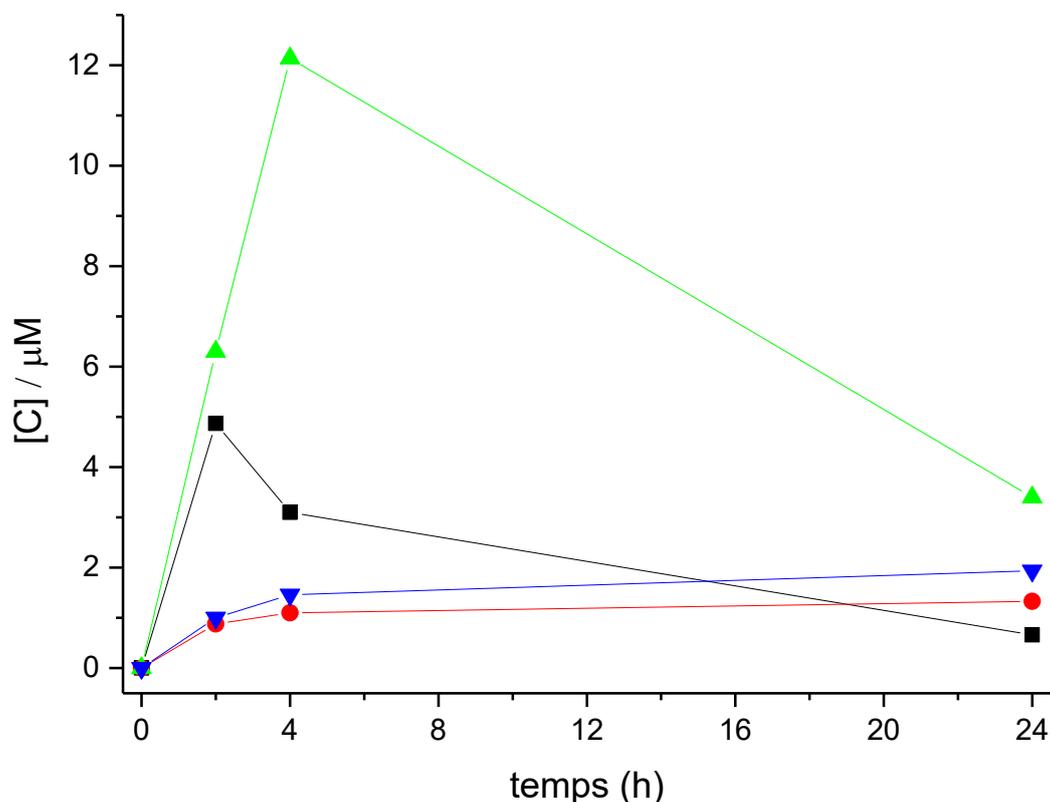


Figure 71 : Quantité de L-PAM-L relarguée de la cassette à dialyse au cours des rinçages du polymère de coordination. La courbe verte correspond au polymère $Fe^{III}_2(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ)_3$, la courbe noire correspond au polymère $Fe^{III}(DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX)$, la courbe bleue correspond au polymère $Ga^{III}_2(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ)_3$ et la courbe rouge correspond au polymère $Ga^{III}(DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX)$.

Dans un premier temps, les 3 rinçages réalisés avant de faire l'expérience de compétition ont été analysés afin de déterminer la quantité éventuelle de PAM relarguée de manière passive dans le milieu (Figure 68). On constate que pour les polymères de coordination à base de L-PAM-L et de Ga^{III} , la quantité de PAM relarguée dans la solution de rinçage est très faible, 4,4 μM de relargage total (somme de tous les rinçages) pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ et 3,31 μM de relargage total (somme de tous les rinçages) pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX. Si tous les L-PAM-L engagés dans le polymère étaient relargués, on mesurerait 100 μM pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX et 150 μM pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ. En comparaison avec les quantités relarguées par rinçage représentent quelques pourcents seulement, ce qui démontre également la robustesse des polymères de coordination.

Pour les polymères de coordination à base de L-PAM-L et de Fe^{III} , on constate un relargage passif plus important, mais reste malgré tout faible en comparaison à la quantité totale de complexes dans l'échantillon. La quantité totale de DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX relarguée est de 8,63 μM et pour le PAM 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ elle est de 21,8 μM , ce qui devient beaucoup moins négligeable, puisqu'on approche respectivement 10 et 20 % du peptide initialement introduit dans la cassette. On constate également que, pour ces deux échantillons, la quantité relarguée dans le milieu est de moins en moins importante au fur et à

mesure des rinçages. Ceci semble indiquer qu'on se débarrasse des peptides non immobilisés, mais que ceux engagés dans le polymère de coordination restent dans la cassette.

2.2.14.7 Détermination de la quantité de métaux (Fe^{III} ou Ga^{III}) relarguée par les polymères en présence de compétiteur, avec la cassette de dialyse

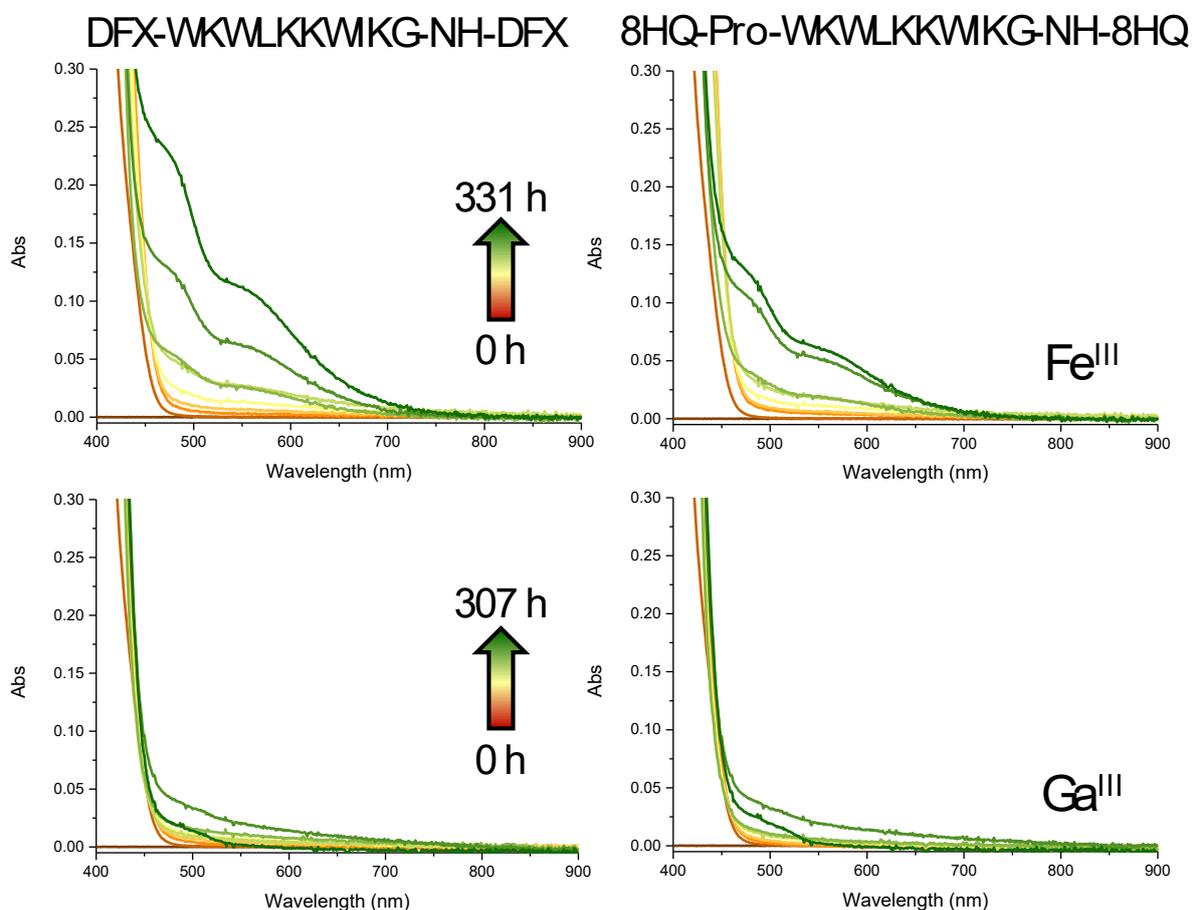


Figure 72 : Détermination de la quantité de métal (Ga^{III} ou Fe^{III}) capturée par la pyoverdine. Conditions : 3 mL de surnageant de culture PA01 WT, la cassette à dialyse et remplie avec 100 μL de solution à 1 mM de polymère de Fe^{III} et le mélange de tampon pour le polymère voulu (polymère formé dans la cassette à dialyse avant incubation).

Une fois les différents rinçages terminés, les cassettes à dialyse sont mises à incuber dans 3 mL de surnageant de culture PA01 WT et on mesure le spectre d'absorption régulièrement jusqu'à 331 h. Cette analyse consiste à observer l'apparition de la bande du complexe métal (Ga^{III} ou Fe^{III}) pyoverdine afin de quantifier la capture des métaux par le sidérophore.

Le complexe $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{pyoverdine})]$ n'ayant aucune bande en spectroscopie UV-Vis, nous ne pouvons pas suivre la capture du gallium par le sidérophore pour les polymères de coordination formés avec le gallium (Figure 69, deux graphiques du bas). Pour les polymères de coordination à base de fer, la même quantification du relargage des métaux que pour la méthodologie du gel d'agarose peut être entreprise. Cela consiste à quantifier le complexe $[\text{M}^{\text{III}}(\text{Pyoverdine})]$ ($\text{M} = \text{Fe}^{\text{III}}$ ou Ga^{III}) en solution dans le surnageant de culture et en déduire la concentration en métal. On constate que la capture se fait plus facilement pour la méthodologie de la cassette à dialyse que la méthodologie gel d'agarose pour le polymère $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX})]_n$. On obtient une concentration en fer dans le surnageant de culture jusqu'à 125 μM , contrairement au gel d'agarose où l'on obtient 75 μM . Pour le polymère $[\text{Ga}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$, on obtient une concentration jusqu'à 75 μM en fer, ce qui est du même ordre de grandeur que la méthodologie du gel d'agarose.

2.2.14.8 Quantification des L-PAM-L en présence d'un compétiteur, en utilisant la méthode cassette à dialyse

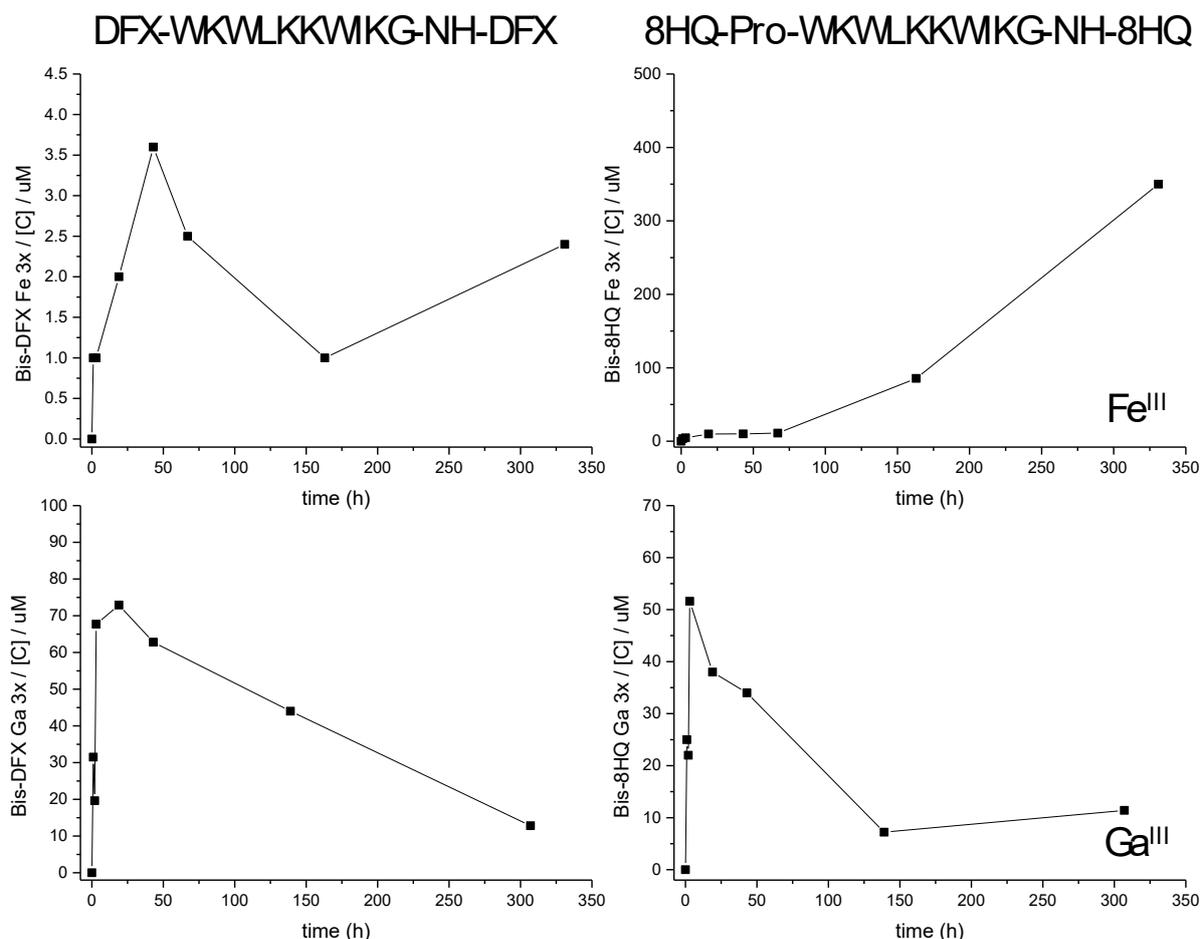


Figure 73 : Quantification par HPLC du relargage des L-PAM-L pour la méthodologie de la cassette à dialyse en μM . Ce sont les mêmes échantillons que pour la détermination de la concentration en métal (Fe^{III} ou Ga^{III})

Un prélèvement de 20 μL a été réalisé après chaque analyse spectroscopique (paragraphe : détermination de la concentration de métaux) puis injectée en HPLC afin de suivre le relargage des PAM des différents polymères formés.

La quantification des PAM relargués nous informe que le relargage des L-PAM-L est nettement plus important avec une cinétique d'initiation du relargage beaucoup plus rapide que pour la méthodologie du gel d'agarose (Figure 70). En effet, pour le gel d'agarose, le relargage était trop lent et insuffisant pour induire une quelconque activité bactéricide.

Polymères	Durée d'incubation (h)	Relargage maximum observé (μM)
$[\text{Fe}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$	163	80-100
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX})]_n$	48	1-5
$[\text{Ga}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$	3	40-60
$[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX})]_n$	19	60-80

Tableau 14 : Tableau listant les quantités de L-PAM-L relargués en μM et le temps d'incubation nécessaire pour obtenir ce relargage.

D'abord notons que le point à 331 h pour le polymère $[\text{Fe}^{\text{III}}_2(8\text{HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$ n'est pas pris en compte, car c'est un point aberrant : on mesure un relargage supérieur à la quantité totale de 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ présente dans le gel. Cela pourrait être causé par la précipitation des L-PAM-L dus à

la présence de Pi dans le milieu CAA, une quantité importante de peptide se serait trouvé au fond du microvial, où le prélèvement a été fait.

Ensuite, on constate que la cinétique de relargage est différente en fonction des ions métalliques utilisés (Fe^{III} et Ga^{III}). En effet, les polymères au Ga^{III} ont tendance à relarguer une forte quantité de L-PAM-L dans les premières heures d'incubation tandis que pour les polymères au Fe^{III} , on observait un faible relargage beaucoup plus faible et plus lent (Tableau 14). La perte de concentration en L-PAM-L observée dans le milieu (très visible pour les polymères au Ga^{III}) pourrait être expliquée par la présence d'enzymes capables de dégrader les peptides dans le surnagent de culture. Les L-PAM-L relargués dans le milieu seraient dégradés au cours du temps, expliquant la baisse de concentration observée.

Cette méthodologie semble donc permettre un meilleur relargage des PAM que la stratégie précédente, basée sur des gels d'agarose. Comme discuté plus haut, ceci peut être expliqué par un emprisonnement des PAM par le gel d'agarose. Les sidérophores peuvent diffuser sans trop de difficulté, mais le PAM, même décomplexé, reste piégé dans le gel. Cette hypothèse est confirmée par les résultats de relargage de L-PAM-L et également par la quantité de métal relargué. En effet, la quantité de métaux relargués par le polymère nous donne une information sur la quantité de L-PAM-L qui n'est plus coordonné au métal. Les valeurs sont similaires pour les dérivés de 8HQ et meilleures pour les dérivés DFX pour la méthodologie de la cassette à dialyse. Aux vues de la quantité de métal capturée par le sidérophore, l'on s'attend à ce que le relargage des PAM soit quasiment identique entre les deux méthodologies pour les dérivés du 8HQ. Cependant, on constate une différence énorme de relargage ce qui conforte l'hypothèse ci-dessus. Cette expérience n'ayant été faite qu'une seule fois, elle devra être reproduire au minimum deux fois supplémentaires afin de vérifier la reproductibilité de ces données.

2.3 CONCLUSION

Ce second projet de thèse a donc consisté à gravir les premières marches vers le développement d'un système innovant de relargage de peptides antimicrobiens (**PAM**) spécifiquement déclenché par la présence de bactéries, via les sidérophores qu'elle excrètent. Celui-ci est composé de **PAM**, en tant que principe actif, maintenus ensemble par complexation d'ions Fe^{III} ou Ga^{III} . Le relargage des **PAM** est déclenché par la sécrétion de sidérophores d'une bactérie présente dans le milieu. Le **PAM** est libéré uniquement en présence de bactéries, mais reste immobilisé en leur absence.

La synthèse d'une première série de ligands de type 8-hydroxyquinoline et deferasirox a été réalisée, ainsi que leur greffage sur un PAM (synthèse organique et SPPS). La MIC_{100} des différents composés a été déterminée sur deux souches de *Pseudomonas aeruginosa*, en collaboration avec l'équipe du Dr. Isabelle Schalk. Nous avons pu confirmer la bonne activité des PAM avec une MIC_{100} de l'ordre de quelque μM comme rapporté dans la littérature¹³⁹ et cette bonne activité est quasiment maintenue voire, dans certains cas, améliorée par le greffage des ligands. La caractérisation par titrage spectrophotométrique en fonction du pH ainsi que par titrages métalliques a permis d'évaluer les domaines de pH ou la prédominance des complexes avec la bonne stœchiométrie est observée (largement majoritaire). Ceci a aidé à choisir une gamme de pH optimale pour la formation des complexes voulus.

Puis, des tests de compétition avec un sidérophore (la DFO B) ont permis d'évaluer la capacité des sidérophores à démétaller nos complexes, et donc, à relarguer le **PAM**. Des polymères de coordinations ont été formés avec des L-PAM-L. Puis, le relargage des **PAM** et du métal de ces polymères de coordination dans du surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* a été évalué. Toutes ces analyses ont permis de tester cette stratégie de relargage contrôlé à l'aide d'un sidérophore bactérien. Deux preuves de concept ont pu être développées à ce jour. Premièrement, la mise au point d'un complexe discret en solution, nous ayant permis d'observer qu'un sidérophore est capable de décoordonner l'ion métallique de nos complexes. La seconde

preuve de concept a consisté à développer un polymère de coordination afin de former un stock de PAM « inerte » avec un relargage uniquement en présence de sidérophores. Les résultats sont prometteurs et engageants pour le futur du projet. Cependant, il reste quelques analyses à faire afin de compléter nos résultats. Dans un premier temps il serait intéressant de réaliser les tests de croissance bactérienne avec la méthodologie de la cassette à dialyse, car le relargage de L-PAM-L est plus important que pour la méthodologie du gel d'agarose. La quantité maximum pouvant être libérée pour les tests avec le gel d'agarose étant proche de la MIC₁₀₀ des bactéries, il serait intéressant de reproduire cette expérience avec un gel beaucoup plus concentrée en polymère. Une autre possibilité est de changer la nature du gel, car comme observé précédemment, les ions métalliques sont relargués sans problème, mais pas les L-PAM-L. Cet effet peut être dû à des interactions électrostatiques entre l'agarose (négatif) et notre L-PAM-L (positif). C'est pourquoi utiliser un gel avec des charges résiduelles positives devrait faciliter la libération du L-PAM-L par effet répulsif. Une analyse très importante n'ayant pas encore été entreprise consiste à déterminer la stabilité de nos polymères dans un milieu simulant, au plus proche un milieu biologique du corps Humain, comme le sang. Ces expériences devront également être reproduites avec le polymère précipité seul, sans matrice de maintien du polymère, afin d'observer si le polymère reste malgré tout « inerte » (pas de relargage sans sidérophore).

Le but final est de développer un revêtement de surface, composée des L-PAM-L liés par le biais d'ions Fe^{III} ou Ga^{III}. La première étape est la sélection d'une surface à fonctionnaliser. Plusieurs options sont possibles, comme utiliser une surface d'or fonctionnalisée avec des thiols pour le greffage¹⁵⁹ ou encore un polymère fonctionnalisé avec des amines libres afin de greffer directement le L-PAM (ou le ligand seul) sur la surface.¹⁶⁰ Pour la méthodologie de la surface d'or et des thiols, une cystéine devra être ajoutée en C-ter du peptide afin de pouvoir être greffé sur la surface par formation de liaison de coordination thiolate-or. Pour le polymère aminé, le couplage pourra se faire directement sur le ligand seul par le biais de la fonction acide carboxylique en C-ter du L-PAM. Une fois la surface fonctionnalisée, l'étape suivante est la constitution du revêtement. Par exemple, via une méthodologie couche par couche.¹⁶¹ La surface fonctionnalisée avec le ligand seul ou le PAM-Ligand est incubée dans une solution de Fe^{III} ou Ga^{III} afin de chélater tous les ligands disponibles sur la surface. Ceci fait, la surface est rincée afin de retirer tout excès d'ions métallique. Une nouvelle solution de Ligand-PAM-Ligand est déposée sur la surface chargée en Fe^{III} ou Ga^{III} afin qu'il se coordine aux métaux déjà fixés (mais pas saturé) sur la surface. La surface est une nouvelle fois rincée afin de retirer l'éventuel excès de Ligand-PAM-Ligand présent sur la surface. Ces étapes seront répétées afin d'obtenir un revêtement avec une épaisseur contrôlée ainsi qu'une quantité de principes actifs connue. La surface fonctionnalisée avec le revêtement sera testée sur *Pseudomonas aeruginosa* afin d'en démontrer l'activité anti-bactérienne. Une fois cette preuve de concept réalisée, il faudra se tourner vers des matériaux couramment utilisés pour la confection d'implants, de cathéters, de stimulateurs cardiaques..., et développer une méthodologie de fonctionnalisation de surface spécifique à ces matériaux.¹⁶²

3 CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux de recherche réalisés durant ces trois années se sont articulés autour de deux projets de développement d'assemblages peptidiques contrôlés à visée catalytique et antibactérienne.

Le premier a consisté à développer un mime de la LPMO en appliquant l'approche du professeur Korendovych appelée « minimalist protein design ». Ici, les deux histidines (non équivalentes) du site « Histidine brace » (site de fixation du Cu^{II} de l'enzyme [LPMO]) sont apportées par deux peptides différents. Ces deux séquences peptidiques courtes complémentaires, capables de s'assembler uniquement en présence l'une de l'autre en feuillets β antiparallèles, permettent de contrôler la préformation du site de coordination du cuivre. Deux peptides issus de la littérature (P+) et (P-), ont donc été fonctionnalisés par une histidine (une histidine sur chaque peptide à une extrémité différente) pour donner les deux nouveaux peptides (PH-) et (HP+). Le mélange de ces deux peptides ainsi que du Cu^{II} a amené à la formation de fibres avec le cuivre coordonné au moins à la pince apportée par le peptide (HP+). Ces peptides courts ont été synthétisés par SPPS, leur assemblage avec les ions Cu^{II} a été analysé par microscopie électronique à transmission (MET), ce qui a permis de déterminer la morphologie des fibres. La structure secondaire adoptée par les peptides a été investiguée par le biais de la spectroscopie vibrationnelle, confirmant l'assemblage en feuillets β antiparallèles. Les spectroscopies RPE, Raman et HYSCORE ont permis d'émettre des hypothèses plausibles sur la sphère de coordination du cuivre et la spéciation. Néanmoins, ce système n'a pas montré d'activité catalytique intéressante pour l'oxydation, sur les quelques substrats testés. Nous devons tester la réactivité de ce système sur d'autres types de réactions.

Le second projet s'est focalisé sur le développement d'un nouveau système de relargage de peptides antimicrobiens (PAM) spécifiquement déclenché par la présence de bactéries (qui sécrètent des sidérophores). Cet assemblage est composé de PAM en tant que principe actif, liés entre eux par des ions métalliques (Fe^{III} ou Ga^{III}) complexés. En absence de bactérie, ce polymère de coordination devrait être stable, inerte, un stock d'antimicrobien dormant. La sécrétion de sidérophores par des bactéries présentes dans le milieu déclencherait le relargage des PAM de ce polymère de coordination. La synthèse des ligands ainsi que des peptides a été réalisée (synthèse organique et SPPS). La caractérisation par le biais de titrage par spectrophotométrie en fonction du pH ainsi que par titrage métallique a permis de déterminer les domaines de pH de stabilité des complexes ainsi que leur stœchiométrie, ce qui a aidé à choisir une gamme de pH optimale pour la formation des complexes voulus. Des analyses de MIC_{100} ont également été réalisées afin de quantifier l'activité antibactérienne de tous les composés (concentration minimum pour une inhibition totale de la croissance bactérienne). Les tests de compétition avec un sidérophore (la desferrioxamine B) ont permis de vérifier la capacité d'un sidérophore naturel à démétaller nos complexes. Des tests de relargage des PAM du polymère de coordination ont été réalisés à l'aide du surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa*, contenant le mélange de sidérophores excrétés par cette bactérie. Toutes ces analyses ont permis de tester les hypothèses de travail qui sous-tendent cette stratégie de relargage contrôlée à l'aide d'un sidérophore bactérien. Deux types de systèmes (des complexes solubles et des polymères de coordinations) ont pu être développés à ce jour, les résultats sont prometteurs et engageants pour le futur du projet. Les perspectives à moyen terme de ce projet sont donc de développer un revêtement de surface, composé des L-PAM-L eux-mêmes liés par des ions Fe^{III} ou Ga^{III} .

PARTIE EXPÉRIMENTALE

4.1 Réactifs et solvants

Tous les réactifs et solvants ont été achetés auprès de fournisseurs commerciaux et utilisés sans autre purification.

Les acides aminés Fmoc et le PyBOP ont été achetés chez Novabiochem (Merck). Le TFA, la pipéridine, l'Oxyma, le K-Oxyma, le TIS, le thioanisole et la DIEA ont été achetés chez Merck et le DIC chez IRIS Biotech. Les produits Ac₂O, HEPES, TRIS HCl, SOCl₂, HCHO 37 % massique dans l'eau et l'éther diéthylique ont été achetés chez Sigma-Aldrich. La résine Fmoc-Rink amide AM a été achetée chez Rapp Polymer GmbH. L'Ascorbate de sodium et le NaCl ont été obtenus chez Alfa Aesar. Le DCM et l'EtOH ont été achetés chez Carlo Erba. La DMF, le MeOH, le DMSO, le NaHCO₃, l'HCl et l'ACN ont été obtenus chez Fischer Chemical. La NEt₃ a été achetée chez Acros Organics.

4.2 Liste du matériel utilisé

La résine utilisée pour les synthèses est la Fmoc-Rink Amide AM (Br-1330 Iris Biotech GMBH, 0,74 mmol/g) et la résine 2-Chlorotriyl chloride (BR-1065.0025 Iris Biotech GMBH, 1,6 mmol/g, 200–400 mesh). Certains peptides ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides à micro-ondes Biotage® Initiator+ Alstra™. La purification des peptides a été réalisée à l'aide d'une HPLC préparative LaPrep équipée d'une colonne XBridge BEH C18 130 A, 5 µm, 1/pkg (19 mm × 150 mm) utilisant deux éluants : 0,1 % TFA dans H₂O (éluant A) et 0,1 % de TFA dans 10 % H₂O et 90 % d'ACN (solution B). La pureté des peptides a été déterminée à l'aide d'une RP-HPLC analytique Hitachi Primaide, équipée d'une colonne C18 (XBridge® Peptide BEH C18 OBD™ 4,6 mm x 150 mm, taille des pores 300 Å, taille des particules 3,5 µm (Waters) possédant un détecteur à barrette de diodes avec détection UV-Vis à 214 nm et 254 nm. Les masses des peptides ont été déterminées à l'aide d'une LC-MS Vanquish Thermo Scientific Accela UHPLC (Hypers II GOLD column, 50 × 2,1 mm, 1,9 µm) équipée d'un module de masse LCQ Fleet ESI-MS. Les spectres spectrophotométriques ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Agilent Cary 60 UV-Vis. Les analyses utilisant un lecteur de plaques ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaques CLARIOStar Plus (GMB Biotech).

4.3 Méthode de purification HPLC LaPrep

Toutes les méthodes de purification utilisent deux éluants : 0,1 % TFA dans H₂O (éluant A) et 0,1 % de TFA dans 10 % H₂O et 90 % d'ACN (solution B).

Méthode de purification :

Méthode A : Démarrant à 95 : 5 (A/B) et terminant à 50 : 50 après 15 min (débit : 14 mL/min).

Méthode B : Démarrant à 95 : 5 (A/B) et terminant à 0 : 100 après 30 min (débit : 14 mL/min).

Méthode C : Démarrant à 90 : 10 (A/B) pour finir à 50 : 50 après 20 min d'élution (débit : 14 mL/min).

Méthode D : Démarrant à 90 : 10 (A/B) pour finir à 50 : 50 après 20 min d'élution (débit : 20 mL/min).

Méthode E : Démarrant à 80 : 20 (A/B), pour finir à 0 : 100 après 20 min d'élution (débit : 20 mL/min).

Méthode F : Démarrant à 98 : 2 (A/B) pour finir à 10 : 90 après 30 min d'élution (débit : 14 mL/min).

Méthode G : Démarrant à 80 : 20 (A/B) pour finir à 40 : 60 après 30 min d'élution (débit : 20 mL/min).

Méthode H : Démarrant à 50 : 50 (A/B) pour finir à 0 : 100 après 30 min d'élution (débit : 20 mL/min).

Méthode I : Démarrant à 20 : 80 (A/B) pour finir à 60 : 40 après 30 min d'élution (débit : 20 mL/min).

Méthode J : Démarrant à 98 : 2 (A/B) pour finir à 90 : 10 après 12 min d'élution (débit : 20 mL/min).

Méthode d'analyse :

Méthode AA : Démarrant à 95 : 5 (A/B) pour finir à 0 : 100 après 15 min d'élution (débit : 1 mL/min)

4.4 Synthèse manuelle des peptides Ac-KFFAAKH-NH₂ (PH+) et NH₂-HEFFAAE-NH₂ (HP-), NH₂-HKFFAAK-NH₂ (HP+), Ac-EFFAAEH-NH₂ (PH-), Ac-KFFAAK-NH₂ (P+), Ac-EFFAAE-NH₂ (P-)

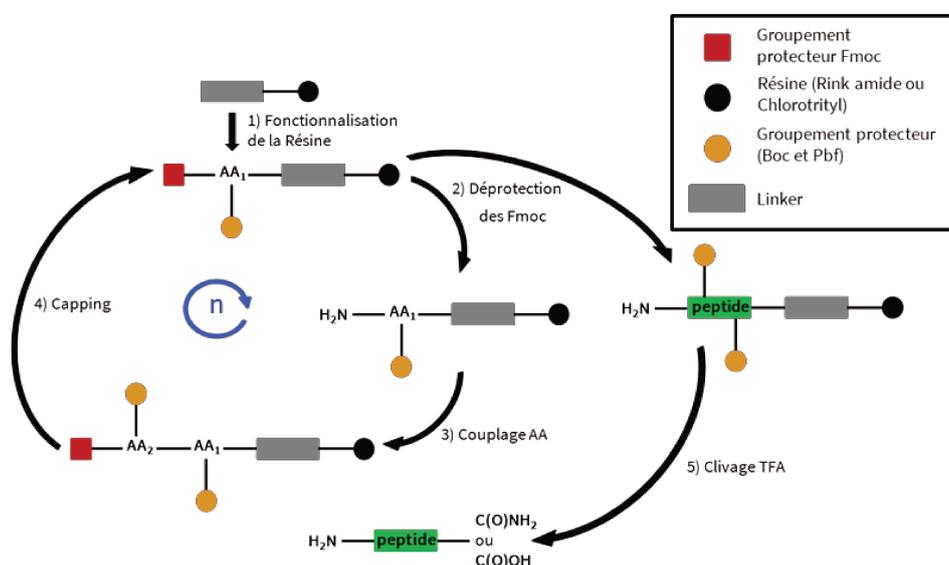


Figure 74 : Procédure générale pour la synthèse peptidique SPPS

La synthèse des peptides **Ac-KFFAAKH-NH₂ (PH+)** et **NH₂-HEFFAAE-NH₂ (HP-)**, **NH₂-HKFFAAK-NH₂ (HP+)**, **Ac-EFFAAEH-NH₂ (PH-)**, **Ac-KFFAAK-NH₂ (P+)**, **Ac-EFFAAE-NH₂ (P-)** est réalisée à la main, en phase solide (SPPS) en utilisant la stratégie Fmoc/tBu sur une résine Fmoc-Rink Amide à une échelle de 0,1 mmol. La résine a été préalablement gonflée dans une solution de DCM pour une durée de 30 min. Entre chaque étape de synthèse présentée ci-dessus (Figure 71), 4 rinçages sont effectués 2 x DMF suivi d'une fois au DCM et une dernière fois au DMF.

Les acides aminés sont couplés par introduction du milieu réactionnel dans une seringue SPPS chargée en résine sous agitation oscillante pendant une durée d'une heure. Cette étape est répétée deux fois. Le milieu réactionnel est composé de 4 équivalents d'acides aminés protégés, 3,8 équivalents de l'activateur PyBOP, ainsi que 20 équivalents de DIEA dans la DMF, à température ambiante. Une étape de capping est réalisée après le deuxième couplage en utilisant un mélange Ac₂O/DIEA/DMF (1 : 1 : 8) pendant 1 min. La déprotection des groupements Fmoc est réalisée avec une solution de 20 % pipéridine dans la DMF pendant 3 min. Cette étape est répétée deux fois supplémentaires. Ce cycle de synthèse SPPS est répété pour chaque acide aminé de la séquence. La quantité de peptide restant sur la résine est déterminé par mesure des Fmoc (après chaque acide aminés couplés).

Finalement, l'étape de clivage du peptide de la résine (2 x 1 h) est réalisée avec un mélange de TFA/TIS/H₂O (94 : 3 : 3) (V_{tot} = 10 mL). Le milieu est ensuite précipité à l'aide d'Et₂O glacé puis centrifugé, le surnageant est jeté et cette étape est répétée 3 fois, puis le solide obtenu est séché et purifié. Les contre-ions sont échangés en dissolvant le solide pur dans 15 mL d'un mélange 80 : 20 d'une solution à 2 mM d'HCl et d'ACN puis lyophilisé afin d'obtenir un sel de chlorure blanc. Cette étape est répétée 3 fois.

4.5 Synthèse automatisée des peptides NH₂-HKFFAAK-NH₂ (HP+), Ac-EFFAAEH-NH₂ (PH-), Ac-KFFAAK-NH₂ (P+), Ac-EFFAAE-NH₂ (P-) et Ac-IHIHIQI-NH₂

La synthèse des peptides **HKFFAAK-NH₂ (HP+)**, **Ac-EFFAAEH-NH₂ (PH-)**, **Ac-KFFAAK-NH₂ (P+)**, **Ac-EFFAAE-NH₂ (P-)** et **Ac-IHIHIQI-NH₂** est réalisée sur un synthétiseur de peptide automatique à micro-ondes Biotage® Initiator+ Alstra™ utilisant la stratégie Fmoc/tBu et la résine Fmoc-Rink Amide. Les acides aminés sont tous doublement couplés (60 min) avec 4 équivalents d'acides aminés protégés, 3,8 équivalents de DIC, 3,8 équivalents d'Oxyma à température ambiante. Une étape de capping est réalisée après chaque couplage d'acide aminé à l'aide d'un mélange Ac₂O/DIEA/DMF (1 : 1 : 8) pendant une durée de 2 min. La déprotection des groupements Fmoc est réalisée à l'aide d'une solution de 20 % de pipéridine dans la DMF pendant 5 min, 3 fois. L'étape de clivage du peptide de la résine est réalisée pendant 1 heure, 2 fois, avec un mélange de TFA/TIS/H₂O (93 : 3 : 3). Le milieu est ensuite précipité à l'aide d'Et₂O glacé 3 fois, puis le solide obtenu est séché et purifié.

4.5.1 Synthèse des peptides NH₂-H* KFFAAK-NH₂ (HP+)* et Ac-EFFAAEH*-NH₂ (PH-)*

Les peptides marqués à l'¹⁵N **NH₂-H* KFFAAK-NH₂ (HP+)*** et **Ac-EFFAAEH*-NH₂ (PH-)*** sont synthétisés en suivant le même protocole que pour la synthèse automatisée, excepté pour les acides aminés marqués, qui ont été couplés à la main, en suivant le protocole de synthèse manuelle. Pour le peptide **(HP+)***, étant le dernier acide aminé incorporé, la charge de la résine a été vérifiée par spectrophotométrie (mesure des Fmoc) avant le couplage afin de constater si la charge de la résine est toujours satisfaisante pour passer à l'étape suivante de synthèse. Une fois cette vérification faite, l'histidine marquée est couplée à l'aide de 1,1 équivalent d'acide aminé marqué et 1,2 équivalent de PyBOP. Pour **(PH-)***, le premier acide aminé étant l'His marquée, l'étape de couplage est réalisée une seule fois avec 1,1 équivalent d'acide aminé et 1,2 équivalent de PyBOP à température ambiante, durant 16 heures. Après cette étape, la synthèse du peptide est terminée à l'aide du robot de synthèse. Les peptides ainsi obtenus sont précipités dans l'Et₂O, puis purifiés.

4.5.2 Purification, analyse HPLC et caractérisation LC-MS

Tous les produits bruts sont purifiés à l'aide d'une HPLC préparative LaPrep en appliquant la méthode de purification A pour tous les peptides, excepté Ac-IHIHIQI-NH₂ qui a été purifié en utilisant la méthode B (détails du matériel dans la partie 3.2 et des méthodes de purification dans la partie 3.3).

La pureté des peptides est vérifiée par RP-HPLC analytique et leur masse est déterminée à l'aide d'une LC-MS (Tableau 15).

Après purification : 49,9 mg de **(PH+)** (rendement : 52 %), 36,6 mg de **(HP-)** (rendement : 41 %), 69 mg de **(PH-)** (rendement : 60 %), 79 mg de **(HP+)** (rendement : 51 %), 49,2 mg de **(P+)** (rendement : 50 %), 27,6 mg de **(P-)** (rendement : 37 %), 4,9 mg de **(HP+)*** (rendement : 21 %), 5,3 mg de **(PH-)*** (rendement : 25 %) et 100 mg de **Ac-IHIHIQI-NH₂** (rendement : 44 %) sont obtenus.

Peptide	[M+xH] ^{x+}	m/z Théorique	m/z Mesuré
(PH ⁺)	[M+H] ¹⁺	889,50	889,6
(HP ⁻)	[M+H] ¹⁺	849,38	849,5
(PH ⁻)	[M+H] ¹⁺	891,40	891,5
(HP ⁺)	[M+H] ¹⁺	847,49	847,6
(P ⁺)	[M+H] ¹⁺	752,45	752,6
(P ⁻)	[M+H] ¹⁺	754,34	754,2
(PH ⁻)*	[M+H] ¹⁺	894,40	894,1
(HP ⁺)*	[M+H] ¹⁺	850,49	850,2
Ac-IHIHIQI-NH ₂	[M+H] ¹⁺	914,56	914,5
	[M+2H] ²⁺	457,78	457,8

Tableau 15 : Caractérisation LC-MS de tous les peptides synthétisés ci-dessus

Les chromatogrammes obtenus par HPLC analytique de tous les peptides purs sont disponibles dans la partie Annexes (à la fin de cette partie expérimentale).

4.6 Détermination des concentrations de Cu^{II} et peptides

La concentration de la solution mère de CuCl₂ est déterminée par spectroscopie d'absorption à l'aide du coefficient d'extinction molaire $\epsilon=12 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 780 nm. Les solutions mères des peptides sont préparées sur la base de la masse molaire, en prenant en compte les éventuels contre-ions. La concentration exacte de ces solutions est déterminée à l'aide du coefficient d'extinction molaire de la phénylalanine $\epsilon= 200 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm dans 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4, et mesurant l'absorbance de chaque solution mère de peptide sur un spectrophotomètre Agilent.

4.7 Préparation des échantillons pour la MET

Les échantillons **(PH⁻)-(HP⁺)** sans cuivre, avec le cuivre ajouté avant la formation de fibres, avec le cuivre ajouté après la formation de fibres ainsi que les peptides de référence **(P⁻)-(P⁺)** sont analysés par microscopie électronique à transmission. Les échantillons sont préparés de deux manières. La première consiste à introduire le peptide **(HP⁺)** dans le milieu suivi du cuivre puis du peptide **(PH⁻)** et le milieu est incubé pour fibrillation, cet échantillon est appelée « cuivre ajouté avant fibrillation ». La seconde consiste à mélanger les peptides **(HP⁺)** et **(PH⁻)**, les faire fibriller, et une fois la fibrillation terminée, le cuivre est ajoutée. Cet échantillon est appelé « cuivre ajouté après fibrillation ». L'échantillon sans cuivre est préparé de la même manière que l'échantillon avec cuivre ajouté après fibrillation, mais sans ajout de cuivre. Tous les échantillons sont préparés pour obtenir un volume total de 20 μL et sont incubés de la même manière, à 37 °C et agités à 1200 rpm dans un Thermomixer C (Eppendorf) équipé d'un Thermotop, pour une durée minimum de 30 min. Tous les échantillons sont composés de 5 mM de chaque peptide, de 50 mM de tampon HEPES pH 7,4 et pour l'échantillon avec cuivre, 0,9 équivalent de cuivre est ajouté.

4.8 Microscopie électronique à transmission (MET)

Tous les échantillons préparés ci-dessus (partie 4.4) sont préparés de la manière suivante pour les analyses de MET (préparation des grilles) : une goutte de 2 μL d'échantillon dilué 10X avec 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4 est déposée sur la grille afin d'améliorer l'observation des échantillons (la dilution permet d'obtenir un échantillon plus homogène). Toutes les analyses sont réalisées avec un microscope électronique à transmission HITACHI H7500. La coloration est réalisée après séchage de la grille par une solution à 2 % (m/v) d'acétate d'uranyle (AcU) déposée durant 3 min puis rincée trois fois à l'eau. Les échantillons **(PH-)** - **(HP+)** sans cuivre n'ont pas été contrastés avec de l'acétate d'uranyle, car il induit une dénaturation des fibres.

4.9 Spectroscopie ATR FT-IR

Pour pouvoir réaliser correctement ces analyses, les contre-anions TFA^- des peptides ont été échangés par des ions chlorure. Sans échange, le signal du carboxylate du TFA recouvrirait celui des liaisons amides. Les peptides sont dissous dans une solution aqueuse d'HCl (10 mL, 2 mM) puis lyophilisés. Cette étape est répétée 3 fois.

Pour les analyses ATR FT-IR des fibres, trois types d'échantillons sont préparés (avant/après/sans). Les échantillons sont préparés de la même manière que dans la partie 3.7 avec pour différence la concentration en peptide qui est de 2,5 mM et la quantité de cuivre est divisée par deux, mais reste 0,9 équivalent. Les deux peptides seuls avec 0,9 équivalent de cuivre sont également analysés. Les échantillons sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 min.

Le spectre ATR FT-IR est analysé sur un spectromètre Vertex 70 (Brüker, Karlsruhe, Allemagne), d'une source Globar et d'un détecteur MCT. Une goutte de 1 μL de culot est déposée sur le diamant ATR-cristal (Harrick). Les spectres des films séchés sont analysés avec une résolution de 4 cm^{-1} . 5 spectres de 128 scans chacun sont moyennés afin d'obtenir le spectre de chaque échantillon.

Une analyse supplémentaire est réalisée avec le mélange **(PH-)-(HP+)** et du zinc ajouté après la formation de fibres ($V_{\text{tot}} = 20 \mu\text{L}$). L'échantillon est analysé (2 μL dilués 10X ont été déposés) 30 min après l'ajout de zinc (incubation : 37 °C, 1200rpm), afin d'observer un potentiel réarrangement des fibres.

4.10 Spectroscopie Raman

Tous les échantillons précédemment préparés avec du cuivre sont utilisés pour les analyses Raman et les échantillons **(PH-)* - (HP+)**, **(PH-) - (HP+)*** et **(PH-)* - (HP+)*** avec 0,9 équivalent de cuivre sont analysés.

Les spectres Raman sont analysés sur un microscope Raman (Renishaw) équipé d'un détecteur CCD. Un laser à 514 nm (argon) est utilisé pour exciter l'échantillon (avec une puissance de sortie de 16,5 mW). Le laser est focalisé avec un objectif 50 X. 3 μL d'échantillon sont déposés sur une fenêtre en silicium. Pour chaque échantillon, 6 accumulations sont moyennées avec un temps d'exposition de 10 secondes. La gamme spectrale utilisée pour tous les spectres FT-IR et Raman est comprise entre 1750-1200 cm^{-1} .

4.11 Résonance paramagnétique électronique

Les échantillons **(PH-)**, **(PH-)***, **(HP+)**, **(HP+)***, **(P+)**, **(P-)**, **(PH-) - (HP+)**, **(PH-) - (HP+)***, **(PH-)* - (HP+)** et **(HP+)* - (HP+)*** sont préparés à l'aide de 5 mM de chaque peptide, 0,9 équivalent de cuivre ainsi que 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4 et 10 % de glycérol ont été ajoutés à chaque échantillon pour augmenter l'homogénéité de congélation de l'échantillon et la résolution du spectre RPE. Les peptides **(PH-)** et **(HP+)** sont analysés « seuls » avec 0,9 équivalent de cuivre, afin d'obtenir les signaux du cuivre coordonné à chaque peptide. Un titrage au cuivre de **(PH-) - (HP+)** est réalisé, chaque équivalent (0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,75) correspond à un échantillon différent, pour avoir le même volume et la même concentration en peptide dans tous les échantillons.

Deux différentes dilutions (dilution peptidique et dilution métallique) sont ensuite testées afin d'améliorer la résolution des spectres. La dilution peptidique est réalisée en mélangeant 60 % de peptide **(P+)**, **(P-)** et 40 % de peptide **(HP+)** et **(PH-)** (pour une concentration finale tous peptides confondus de 5 mM), puis 0,9 équivalent de cuivre par rapport au peptide **(HP+)** et **(PH-)** est ajouté et le milieu est mis à fibriller dans les mêmes conditions que précédemment. La dilution métallique est réalisée à l'aide de 5 mM de **(HP+)**, **(PH-)** ainsi que 0,9 équivalent de métal composé de 80 % de Zn^{II} et 20 % de Cu^{II} (ajout du zinc en premier suivi du cuivre). Ces deux échantillons sont également composés de 50 mM de tampon HEPES pH 7,4, de 10 % de glycérol et sont incubés comme présenté précédemment.

Les échantillons **(PH-)***, **(HP+)***, **(PH-) - (HP+)**, **(PH-) - (HP+)***, **(PH-)* - (HP+)** et **(HP+)* - (HP+)*** sont analysés en utilisant la stratégie de dilution métallique.

Le spectre RPE en bande X (9,4 GHz) est obtenu à l'aide d'un spectromètre à flux continu EMX-plus (Bruker Biospin GmbH, Allemagne) équipé d'un résonateur à haute sensibilité (4119 HS-W1, Bruker). Le facteur de g est calibré à l'aide d'un Bruker strong pitch ($g = 2,0028$). Les échantillons sont introduits dans un tube en quartz d'un diamètre de 4 mm (Wilmad-Labglass) puis congelés à l'aide d'azote liquide, puis sont introduits dans la cavité prérefroidie (100 K, grâce au cryostat à flux continu d'azote). La valeur du paramètre principal expérimental est la modulation de l'amplitude 5 G ; puissance des micro-ondes ca. 0,1 mW ; le temps de conversion ainsi que la constante de temps sont programmés à 200 et 80 ms ; 1500 G sont balayés en 5 min et 1-4 scans sont accumulés pour obtenir un ratio signal/bruit (S/N) acceptable.

4.12 HYSORE

Les échantillons **(PH-) - (HP+)**, **(PH-) - (HP+)***, **(PH-)* - (HP+)** and **(HP+)* - (HP+)*** sont préparés avec 3 mM de chaque peptide, 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4, 10 % de glycérol, 0,72 équivalent de Zn^{II} (2,16 mM) et de 0,18 équivalent de Cu^{II} (0,54 mM). Ils sont ensuite analysés par RPE pulsé à l'aide d'un spectromètre X-band Elexsys E500 équipé d'un résonateur ER 4118X-MS3 (Bruker) et d'un cryostat CF935 (Oxford Instrument).

Les balayages de champ échodéfectés (EDFS) ont été enregistrés avec la séquence d'impulsions $\pi/2$ - τ - π - τ -echo ($\pi/2 = 16$ ns, $\pi = 32$, et $\tau = 252$ ns). Les spectres HYSORE ont été enregistrés au maximum de l'intensité du signal RPE avec la séquence de 4 impulsions $\pi/2$ - τ - $\pi/2$ - t_1 - π - t_2 - $\pi/2$ - τ -echo; $\pi/2 = 16$ ns, $\pi = 32$ ns, $t_1 = t_2 = 212$ ns, $\tau = 200$ ns et un cycle de phase à 8 étapes. Le domaine temporel t_1 et t_2 a été varié de 212 ns à 4212 ns avec des pas de 20 ns. Les spectres obtenus ont été corrigés (ligne de base), apodisés (fenêtre de Hamming), « zero filled » et convertis par la transformé de Fourier rapide à l'aide de Matlab (Mathworks).

4.13 Tests catalytiques (analyse spectrophotométrique)

4.13.1 Substrat: 4-Nitrophenyl β -D-galacto-pyranoside (S)

Les premiers tests catalytiques sont réalisés à l'aide d'une microplaque 96 puits (UV-star, Half area, Grenier BioOne) pour les mélanges suivants : **(PH-)** - **(HP+)** + Cu + S, **(HP+)** + Cu + S, Cu + S et S seul. Le mélange **(PH-)** - **(HP+)** + Cu + S est composé de 1 mM de chaque peptide [**(PH-)** et **(HP+)**], 0,9 mM de CuCl_2 , 200 mM de tampon HEPES à pH 7,4 et 50 mM de 4-Nitrophenyl β -D-galacto-pyran-oside. Le mélange **(HP+)** + Cu + S est composé de 1 mM de peptide **(HP+)**, 0,9 mM de CuCl_2 , 200 mM tampons HEPES pH 7,4 et 50 mM de substrat. Le mélange Cu + S est composé de 0,9 mM de CuCl_2 , 200 mM de tampon HEPES pH 7,4 et 50 mM de substrat. Le dernier échantillon est composé uniquement de tampon HEPES pH 7,4 et de 50 mM de substrat. Cette série d'échantillons est préparée dans trois puits, afin de pouvoir suivre l'activité catalytique dans différentes conditions : avec ajout d'un réducteur (Ascorbate de sodium, 50 mM), avec ajout d'un oxydant (H_2O_2 , 50 mM) et sans ajout d'oxydant ou de réducteur. Tous les volumes des échantillons sont complétés à l'aide d'eau milliQ afin d'obtenir un volume total de 60 μL .

En parallèle, des aliquotes de 99 μL , composées de 1 mM d'EDTA et de 50 mM de tampon carbonate à pH 10,5 sont préparées afin de stopper la réaction lors du prélèvement. 8 prélèvements à 0, 20, 40, 60, 120, 180, 720 et 960 min de 1 μL pour chaque échantillon sont réalisés, puis ajoutés dans les aliquotes préparées ($V_{\text{tot}} = 100 \mu\text{L}$). L'intégralité de l'aliquote est transférée dans une cuve en quartz, et analysée à l'aide d'un spectrophotomètre Agilent.

Les seconds tests de catalyse sont réalisés pour les échantillons suivants : **(PH-)** - **(HP+)** + Cu + S et Cu + S. Le mélange **(PH-)** - **(HP+)** + Cu + S est composé de 0,5 mM de chaque peptide [**(PH-)** et **(HP+)**], 0,45 mM de CuCl_2 , 200 mM de tampon HEPES à pH 7,4 et 25 mM de substrat. Le mélange Cu + S est composé de 0,45 mM de CuCl_2 , 200 mM de tampon HEPES pH 7,4 et 25 mM de substrat. Les échantillons sont également préparés dans trois puits, afin de pouvoir tester avec ajout d'oxydant (H_2O_2 , 25 mM) ou de réducteur (Ascorbate de sodium, 25 mM) ainsi qu'une dernière condition où l'on mélange l'oxydant et le réducteur (25 mM de chaque). De l'eau milliQ est ajoutée pour obtenir un volume total de 60 μL .

16 prélèvements à 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 et 45 min de 1 μL pour chaque échantillon sont réalisés puis ajoutés dans les aliquotes préparées comme décrit plus haut ($V_{\text{tot}} = 100 \mu\text{L}$), et analysés de manière identique.

4.13.2 Substrat : 2,6-diméthoxyphénol (DMP)

Quatre solutions mères sont préparées : la première est composée de 93,4 μM de peptide Ac-IHIIHIQI-NH₂ (+5 % de peptide par rapport au cuivre), 44,44 μM de cuivre et 27,8 mM de tampon HEPES pH 8. La seconde solution est composée de 45,6 μM de chaque peptide **(PH-)** et **(HP+)** (+2,5 % de peptide pour chaque peptide par rapport au cuivre), 44,44 μM de cuivre et 27,8 mM de tampon HEPES pH 8. La troisième solution est composée de 44,44 μM de cuivre et 27,8 mM de tampon HEPES pH 8. Les trois solutions mères préparées ($V_{\text{tot}} = 450 \mu\text{L}$) sont incubées à 37 °C avec une agitation de 500 rpm pendant 2 heures.

Les tests catalytiques sont réalisés sur les échantillons suivants : Ac-IHIIHIQI-NH₂ + Cu + DMP, **(PH-)**-**(HP+)** + Cu + DMP, Cu + DMP. Les échantillons sont tous préparés à partir de 90 μL des solutions mères précédemment préparées et 10 μL d'une solution de DMP à 2 mM pour obtenir des échantillons avec une concentration de 10 μM de complexe (pour les échantillons composés de peptides avec 5 % de peptide total en excès), 10 μM de cuivre (pour les échantillons composés de cuivre), 22,5 mM de tampon HEPES pH 8 et 200 μM de DMP ($V_{\text{tot}} = 100 \mu\text{L}$). Tous les échantillons sont analysés avec le spectrophotomètre Agilent avec une durée de 2050 min et acquisition d'un spectre toutes les 2 min.

4.13.3 Tests catalytiques, oxydation de la DMP suivie par HPLC analytique

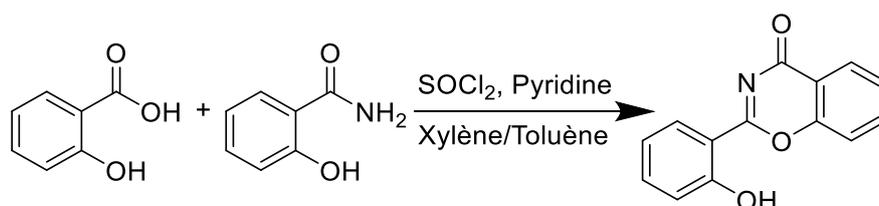
Les échantillons sont préparés à l'aide de la méthodologie de préparation des quatre solutions mères du point 3.12.2. Les échantillons suivants : Ac-IHIIHQI-NH₂ + Cu + DMP, **(PH-)-(HP+)** + Cu + DMP et Cu + DMP sont tous préparés avec 450 µL de solution mère d'échantillon et 50 µL de solution de DMP à 2 mM pour obtenir une concentration finale de l'échantillon de 10 µM de cuivre, 21 µM de peptide [Ac-IHIIHQI-NH₂ ou **(PH-)** et **(HP+)**], 22,5 mM de tampon HEPES pH 8 et 200 µM de DMP (V_{tot} : 500 µL).

Des aliquotes de 0,9 µL composées de 1 mM d'EDTA et de 50 mM de tampon HEPES à pH 7,4 sont préparées afin de stopper la réaction lors du prélèvement. 15 prélèvements de 12 µL pour chaque échantillon sont réalisés à 0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 12 min, 17 min, 22 min, 30 min, 40 min, 1 h, 2 h, 18 h, 24 h et 34 h puis ajoutés dans les aliquotes préparées (V_{tot} = 12,9 µL). Les échantillons sont incubés à 25 °C avec une agitation de 500 rpm pendant toute la durée des prélèvements. 10 µL de chaque aliquote sont injectés et analysés par RP-HPLC utilisant la méthode AA.

4.14 Synthèse des dérivés du deferasirox

Toutes les étapes de synthèse du deferasirox ont été réalisées sous Argon.

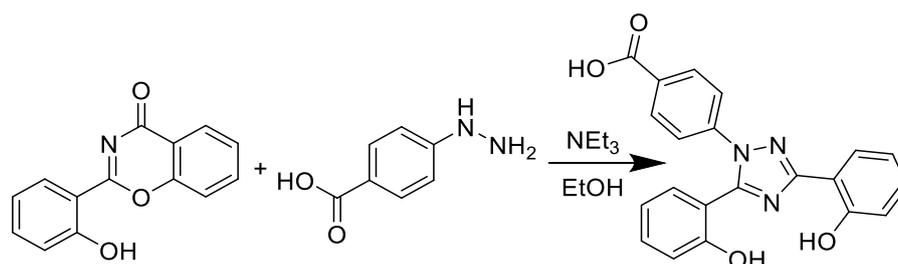
4.14.1 2- (2 -Hydroxyphenyl)-4 H-1, 3-benzoxazin-4-one^{163,145}



2 g d'acide salicylique (14,5 mmol, 1 équivalent) et 2,42 g de salicylamide (17,6 mmol, 1,2 équivalent) sont suspendus dans 3 mL de xylène (mélange d'isomères) et 146 µL de pyridine (18 mmol, 1,24 équivalent) séchés à l'aide d'un tamis moléculaire. Le mélange est chauffé à reflux jusqu'à la dissolution complète de tous les solides. 2,33 mL de SOCl₂ (32 mmol, 2,2 équivalents) sont ensuite ajoutés au goutte à goutte pendant 1 h, à reflux. Puis, le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 20 min supplémentaires. Il est ensuite lentement refroidi jusqu'à température ambiante. Le solvant est retiré par évaporation sous pression réduite. Un mélange de 8,8 mL d'EtOH et 146 µL d'acide acétique (25,4 mmol, 1,75 équivalent) sont ensuite ajoutés sur le solide, et le mélange est chauffé à reflux. Après dissolution du solide, le milieu est refroidi à température ambiante puis filtré, lavé à l'EtOH et séché sous vide, afin d'obtenir le 2-(2-Hydroxyphenyl)-4 H-1,3-benzoxazin-4-one sous forme d'un solide jaune-beige (2 g, rendement 67 %).

¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ 7,17-7,06 (2 H, m), 7,64 (2 H, m), 7,81 (1 H, dd, J = 8,5, 1,1 Hz), 7,96 (1 H, ddd, J = 8,8, 7,3, 1,7 Hz), 8,09 (1 H, dd, J = 7,9, 1,6 Hz), 9,27-8,18 (1 H, m) ppm.

4.14.2 Acide 4-[3,5-Bis(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl] benzoïque^{163,145}



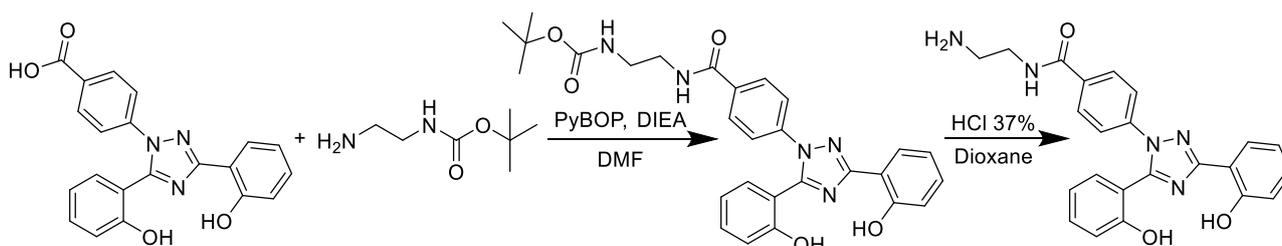
Le deferasirox a été synthétisé en utilisant 702 mg d'acide 4-hydrazino-benzoïque (4,6 mmol, 1,1 équivalent) et 650 μ L de NEt_3 (4,6 mmol, 1,1 équivalent) suspendus dans 30 mL d'éthanol. Le mélange est chauffé à reflux jusqu'à la dissolution complète du solide. 1 g de 2-(2-hydroxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-one (4,2 mmol, 1 équivalent) est ensuite ajouté, puis le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 2 h. Il est ensuite refroidi jusqu'à température ambiante à l'aide d'un bain de glace. Le milieu est ensuite acidifié à l'aide d'une solution à 18 % d'HCl, afin de faire précipiter l'acide 4-[3,5-Bis-(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl] benzoïque. Une fois le pH à 1, le milieu est agité dans un bain de glace durant 10 min, puis filtré sous vide. Le solide beige-marron obtenu est rincé avec une solution glacée d'HCl 18 % m/v, puis séché sous vide. Le produit est obtenu sous forme de sel de chlorure (1,542 g rendement 90 %).

¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) : δ 6,91 (1 H, dd, $J = 8,3, 1,0$ Hz), 7,11-6,97 (3 H, m), 7,47-7,37 (2 H, m), 7,65-7,54 (3 H, m), 8,07-7,99 (2 H, dd, m), 8,09 (1 H, dd, $J = 7,8, 1,7$ Hz) ppm

Ligand	[M+xH] ^{x+}	m/z Théorique	m/z Mesuré
Deferasirox	[M+H] ¹⁺	374,37	374,3

Tableau 16 : Caractérisation LC-MS du deferasirox

4.14.3 N-(2-aminoéthyl)-4-(3,5-bis(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzamide^{47,47,164}



200 mg de deferasirox (49 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 3 mL de DMF. 356 mg de PyBOP (68,5 mmol, 1,4 équivalent) sont ensuite ajoutés, ainsi que 500 μ L de DIEA (294 mmol, 6 équivalents). Une fois les réactifs dissous, 83 μ L de N-Boc-éthylènediamine (59 mmol, 1,2 équivalent) sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. La consommation de deferasirox est suivie par CCM (SiO_2 , éluant 90/10 DCM/MeOH). Le solvant est évaporé sous vide et le composé obtenu est engagé directement dans la réaction suivante : 1,5 mL de HCl 37 % est ajouté au composé intermédiaire, ainsi que 8,5 mL de dioxane. Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures puis le solvant est retiré sous vide. Le solide obtenu est dissout dans un mélange 8:2 (A/B) de solvant A (0,1 % TFA dans H_2O) et de solvant B (0,1 % TFA dans ACN/ H_2O 9 : 1), puis est purifié par HPLC préparative équipé d'une colonne XBridge peptide BEH C18 (130 Å, 5 μ m, 19 mm \times 150 mm) avec un gradient de 7:3 (A/B) 100 % B en 30 min (20 mL/min). Les

fractions récupérées sont ensuite lyophilisées, pour obtenir un sel de TFA de couleurs beige-marron (122 mg, rendement global 55 %).

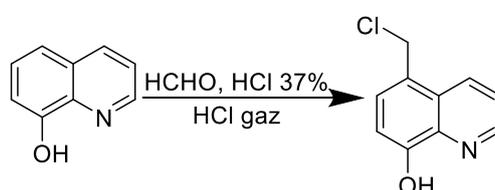
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) : δ 3,0 (2 H, m), 3,5 (2 H, m), 7,04-6,86 (3 H, m), 7,44-7,34 (2 H, m), 7,58-7,49 (2 H, m), 7,86-7,90 (2 H, m), 7,93 (2 H, m), 8,05 (1 H, dd, $J = 7,8, 1,8$ Hz) ppm.

Ligand	[M+xH] ^{x+}	m/z Théorique	m/z Mesuré
Deferasirox-NH-Boc	[M+H] ¹⁺	516,57	515,2
	[M+2H] ²⁺	258,79	258,1
Deferasirox-NH ₂	[M+H] ¹⁺	416,45	416,2
	[M+2H] ²⁺	208,73	208,7

Tableau 17 : Caractérisation LC-MS des composés deferasirox-NH-Boc et deferasirox-NH₂

4.15 Synthèse des dérivés de la 8-hydroxyquinoléine

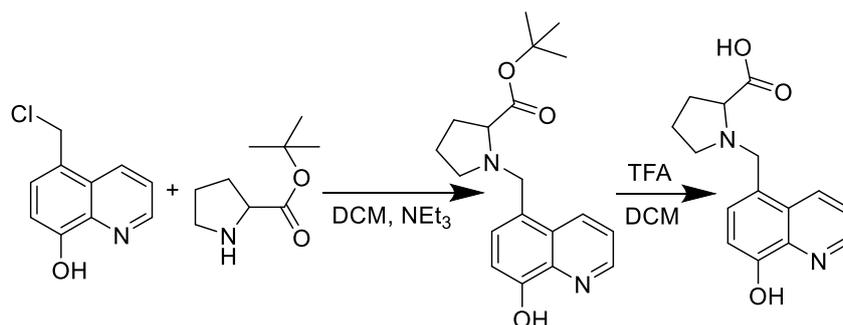
4.15.1 5-(chlorométhyl)quinolin-8-ol ¹⁶⁵



4 g de 8-Hydroxyquinoléine (27,6 mmol, 1 équivalent) est introduit dans un ballon, puis dissout dans 12 mL de solution d'HCl 37 %. Le milieu est refroidi à l'aide d'un bain de glace à 0 °C, puis 5,5 mL de formaldéhyde (55,2 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés au milieu froid. Une fois la solution à nouveau à 0 °C, du HCl gazeux est mis à buller pendant 2 h, à 0 °C. Aucun précipité ne s'étant formé, un nouvel ajout de 2 mL de formaldéhyde est réalisé et le milieu est agité pendant 16 h, à température ambiante. La solution est filtrée et le sel de chlorure jaune obtenu est lavé 3 fois avec 6 mL d'HCl à 37 % dans l'eau, puis séché à chaud, sous vide (5,16 g, rendement 82 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) : δ 5,34 (2 H, s), 7,45 (1 H, d, $J = 7,44$ Hz), 7,87 (1 H, d, $J = 7,85$ Hz), 8,11 (1 H, dd, $J = 8,6, 5,0$ Hz), 9,12 (1 H, dd, $J = 5,0, 1,4$ Hz), 9,20 (1 H, dd, $J = 8,7, 1,4$ Hz) ppm.

4.15.2 ((8-hydroxyquinolin-5-yl) methyl) proline ^{153,166}



451 mg d'ester de tert-butyle L-proline (2,6 mmol, 1,2 équivalent) et 910 μ L de NEt_3 (7,8 mmol, 3 équivalents) sont dissouts dans 10 mL de DCM. En parallèle, 500 mg de 5-(chlorométhyl) quinolin-8-ol (2,2 mmol, 1 équivalent) sont dissouts dans 5 mL de DCM. Après dissolution complète du dérivé chloré de la 8-hydroxyquinoléine, cette solution est ajoutée à celle de proline au goutte-à-goutte, durant 10 min. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 h 30. Après vérification de l'avancement de la réaction par CCM, (SiO_2 , éluant 90/10 DCM/MeOH) la phase organique est lavée avec de l' H_2O (5 mL x 3), puis une fois avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sous vide (620 mg, rendement 71 %). L'huile obtenue est directement engagée dans la réaction suivante. 361 mg du composé intermédiaire (0,9 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 3,7 mL de DCM. Sous faible agitation, 3,7 mL de TFA sont été lentement ajoutés. Une fois l'addition terminée, le milieu est agité à température ambiante pendant 18 h. Après vérification de la complétion de la réaction par CCM, (SiO_2 , éluant 90/10 DCM/MeOH) le solvant est retiré sous vide. Le milieu résiduel est ensuite redissout dans 13 mL d' H_2O . La phase aqueuse ainsi obtenue est lavée trois fois avec 6 mL d' Et_2O . Elle est ensuite directement purifiée par HPLC préparative utilisant la méthode J. Les fractions sont ensuite lyophilisées pour obtenir un sel de TFA jaune (376,7 mg, rendement, déprotection 89 %, rendement global 63 %).

tert-butyl ((8-hydroxyquinolin-5-yl) methyl)prolinate (8HQ-Pro-OtBu) :

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) : δ 1,26 (9 H, s), 1,98-1,86 (2 H, m), 2,13 (1 H, m), 2,50 (1 H, m), 3,42 (1 H, m), 3,58 (1 H, s), 4,46 (1 H, m), 4,85 (2 H, s), 7,19 (1 H, d, $J=7,9$ Hz), 7,74 (1 H, dd, $J=7,9; 1,7$ Hz), 7,82 (1 H, dd, $J=8,6; 4,3$ Hz), 8,86-8,79 (1 H, m), 8,99 (1 H, dd, $J=4,2; 1,4$ Hz) ppm.

¹³C NMR (500MHz, DMSO-d_6) : δ 22,5; 27,7 (3C), 28,8; 5,4; 55,7; 65,9; 111,4; 115,7; 118,0; 120,3; 122,8; 128,37; 133,1; 148,4 ppm.

((8-hydroxyquinolin-5-yl) methyl) proline (8HQ-Pro-OH) :

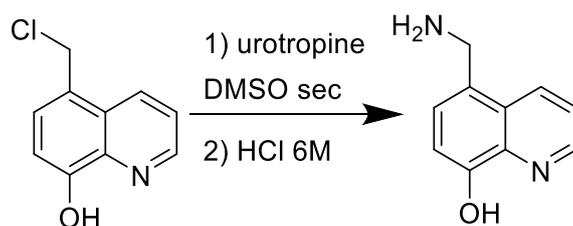
¹H NMR (500MHz, DMSO-d_6) : δ 2,16-1,81 (4H, m), 3,41-3,38 (2H, m), 4,47 (1H, t, $J=9,1$ Hz), 4,70 (1H, d, $J=13,6$ Hz), 4,99 (1H, d, $J=13,5$ Hz), 7,18 (1H, d, $J=7,9$ Hz), 7,73 (1H, d, $J=7,9$ Hz), 7,80 (1H, dd, $J=8,6; 4,2$ Hz), 8,82 (1H, d, $J=8,8$ Hz), 8,99 (1H, dd, 4,2; 1,5 Hz) ppm.

¹³C NMR (500MHz, DMSO-d_6) : δ 22,3; 28,2; 54,4; 54,8; 66,2; 111,4; 117,6; 122,8; 128,4; 133,1; 133,7; 148,6; 155,8; 170,5 ppm.

Ligand	[M+xH] ^{x+}	Théorique m/z	Mesuré m/z
8 HQ-Pro-OtBu	[M+H] ¹⁺	329,41	329,1
8 HQ-Pro-OH	[M+H] ¹⁺	273,31	273,1

Tableau 18 : Caractérisation LC-MS des composés 8HQ-Pro-OtBu et 8HQ-Pro-OH

4.15.3 5-(aminométhyl)quinolin-8-ol¹⁵¹

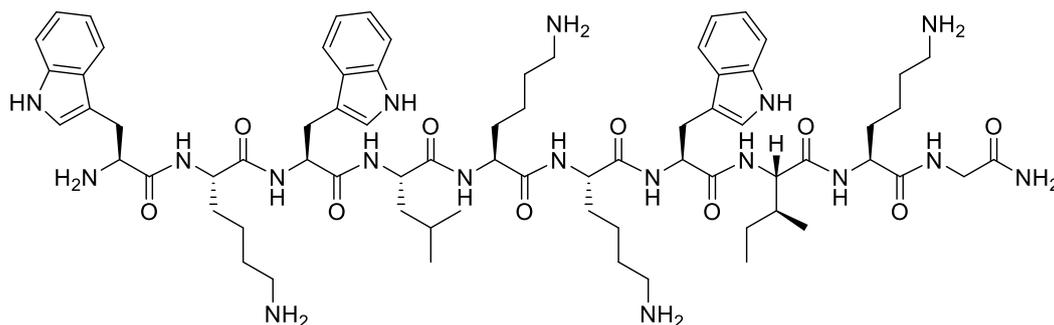


200 mg de 5-(chlorométhyl)quinolin-8-ol (0,86 mmol, 1 équivalent) sont dissouts dans 6,7 mL de DMSO, préalablement séché à l'aide d'un tamis moléculaire, puis 250 mg d'urotropine (1,8 mmol, 2,1 équivalents) sont ajoutés et le milieu est agité à température ambiante pendant 16 h. Il est ensuite filtré, afin de retirer l'urotropine protonée ayant précipité. Après filtration, 12 mL d'HCl 6 M sont ajoutés et le milieu est agité à température ambiante pendant 2 jours. Le solvant est ensuite retiré sous vide grâce à un piège à solvant et le composé est obtenu sous forme d'un sel de chlorure jaune (192 mg, rendement 89 %).

¹ H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) : δ 4,49 (2 H, s), 7,23 (1 H, d, J= 7,9 Hz), 7,68 (1 H, d, 8,0 Hz), 7,79 (1 H, dd, J= 8,6, 4,3 Hz), 8,77 (1 H, dd, J= 8,7, 1,5 Hz) ppm

4.16 Synthèses peptidiques

4.16.1 H₂N-WKWLKKWIKG-NH₂⁴⁷

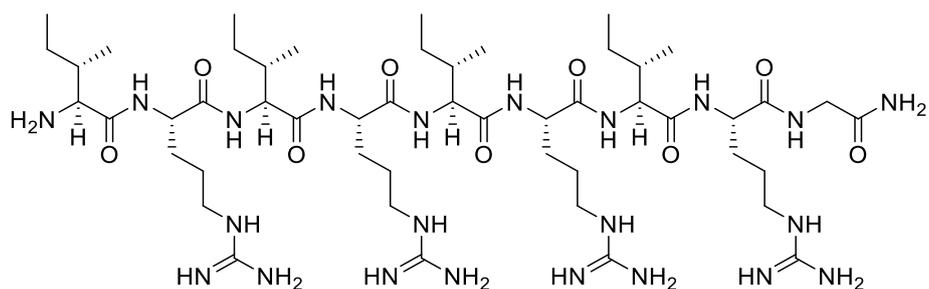


La synthèse du peptide NH₂-WKWLKKWIKG-NH₂ a été réalisée par Synthèse peptidique en Phase solide (SPPS) en suivant la stratégie Fmoc/tBu, sur un synthétiseur automatique de peptides à micro-ondes Biotage® Initiator+ Alstra™. La synthèse a été faite sur une échelle de 0,2 mmol, sur une résine Fmoc-Rink Amide, 0,74 mmol/g, 100–200 mesh). La synthèse est réalisé suivant le protocole de la partie 4.4.

La résine fonctionnalisée par le peptide est approximativement séparée en deux avant la dernière déprotection des groupements Fmoc. Puis, chaque moitié est déprotégée afin de déterminer la charge de la résine. La partie la plus importante (88 μmol) est conservée sur la résine et sera engagée dans la réaction de monofonctionnalisation. La partie la plus faible (67 μmol) est déprotégée et clivée de la résine. Le solide ainsi obtenu est dissous dans une solution 9 : 1 de solutions A/B et purifié à l'aide d'une HPLC préparative utilisant la méthode C. La pureté du peptide est évalués à l'aide d'une RP-HPLC analytique et une LC-MS (même matériel que dans la partie 4.2) les contre-ions sont échangés par des ions chlorure (80 mg rendement 73 %).

Une seconde synthèse de 0,1 mmol du peptide est réalisée en utilisant le protocole décrit ci-dessus. L'intégralité de la résine fonctionnalisée est conservée afin de réaliser l'étape de monofonctionnalisation.

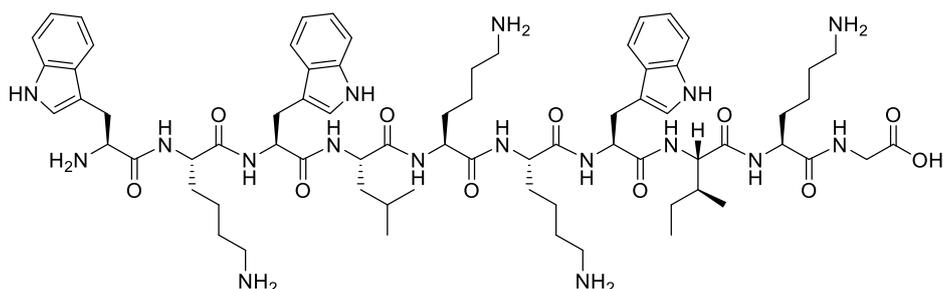
4.16.2 H₂N-IRIRIRIG-NH₂⁴⁷



La synthèse du peptide NH₂-IRIRIRIG-NH₂ est réalisée en suivant le même protocole que pour le peptide NH₂-WKWLKKWIKG-NH₂, sur une échelle de 0,1 mmol.

L'étape de clivage est réalisée de la même manière que précédemment avec pour seule différence la durée du clivage. L'arginine étant difficile à déprotéger, 1 heure de déprotection par arginine est requise. La durée totale du clivage a donc été de 4 heures, et la solution (5 mL) est renouvelée toutes les heures (V_{tot} = 20 mL de solution de clivage). Le peptide obtenu après précipitation dans le Et₂O est séché, puis dissout dans un mélange 9 : 1 (A/B), puis purifié par HPLC préparative utilisant la méthode D. Après lyophilisation, le peptide est obtenu sous forme d'un solide blanc (82 mg, rendement 72 %).

4.16.3 H₂N-WKWLKKWIKG-OH^{167,154}



La synthèse du peptide NH₂-WKWLKKWIKG-OH est réalisée à l'aide du protocole Fmoc/tBu sur un synthétiseur automatique de peptides à micro-ondes Biotage® Initiator+ Alstra™ sur une échelle de 0,25 mmol sur résine 2-Chlorotrityl chloride.

Une solution de DCM contenant de la DIEA (500 µL pour 200 mL) est préparée. Cette solution est utilisée pour faire gonfler la résine durant 30 min, et pour la rincer trois fois. Le premier couplage est réalisé en utilisant 1,5 équivalent de Fmoc-glycine-OH et 10 équivalents de DIEA durant 30 min. Une fois le greffage terminé, la résine est rincée une fois avec de la solution basique de DCM. Une étape de saturation est réalisée avec une solution de MeOH/DCM/DIEA (1 : 7 : 2) durant 1 min. La résine est ensuite rincée deux fois au DCM basifié et trois fois à la DMF. La première déprotection des Fmoc est réalisée à la main avec une solution à 20 % de pipéridine dans le DMF, afin de déterminer la charge effective de la résine. La suite du peptide est synthétisée à l'aide d'un synthétiseur automatique. Des doubles couplages (60 min chacun) à température ambiante sont réalisés pour tous les acides aminés en utilisant 4 équivalents de Fmoc-L-acide aminé, 3,8 équivalents de DIC/K-Oxyma et 20 équivalents de DIEA sous agitation. Une étape de capping est réalisée à la fin de chaque couplage avec une solution d'Ac₂O/DIEA/DMF (mélange 1 : 1 : 8 pendant 2 min). Le retrait du groupement Fmoc est réalisé à l'aide d'une solution à 20 % de pipéridine dans la DMF (3 x 5 min).

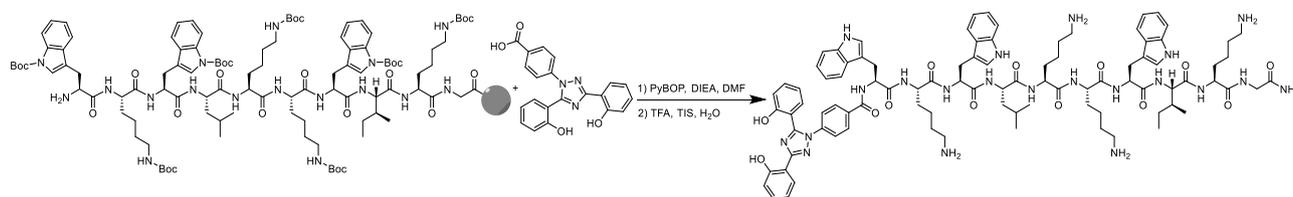
Une fois tous les acides aminés couplés, la résine est séparée en deux pour les prochaines étapes de synthèse (0,103 mmol et 0,110 mmol). (rendement jusqu'à cette étape de synthèse, sur la base des Fmoc : 86 %)

4.17 Fonctionnalisation des peptides en N-ter

4.17.1 DFX-WKWLKKWIKG-NH₂ et DFX-WKWLKKWIKG-OH

La synthèse du peptide WKWLKKWIKG-(NH₂ ou OH) monofonctionnelisé en N-ter par le deferasirox est réalisée sur phase solide.

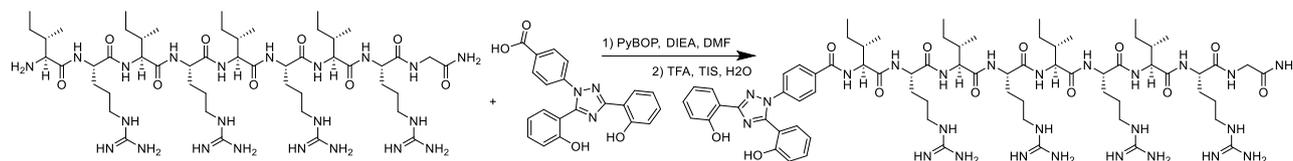
4.17.2 DFX-WKWLKKWIKG-NH₂⁴⁷



Une solution de 47 mg de deferasirox (0,11 mmol, 1,2 équivalent) dissouts dans 4 mL de DMF est préparée, puis 69 mg de PyBOP (0,13 mmol, 1,4 équivalent) sont ajoutés, suivis par 92 μ L de DIEA (6 équivalents). La solution est introduite dans la seringue contenant la résine (0,09 mmol de peptide, 1 équivalent), puis celle-ci est agitée à température ambiante durant 5 heures. Deux autres couplages sont réalisés de la même manière, avec une durée de 16 heures par couplage. Une fois le deferasirox couplé au peptide, celui-ci est déprotégé et clivé de la résine (suivant le protocole de la synthèse de NH₂-WKWLKKWIKG-NH₂) afin d'obtenir le L-PAM fonctionnelisé par le deferasirox. Le produit brut obtenu est purifié à l'aide d'une HPLC préparative, utilisant la méthode E. Les contre-ions sont échangés à l'aide d'une solution à 2 mM de HCl. Le solide est dissout dans 15 mL d'un mélange 80 : 20 HCl (2 mM)/ACN puis lyophilisé. Cette étape est répétée 3 fois afin d'obtenir un solide blanc (150 mg, rendement 77 %).

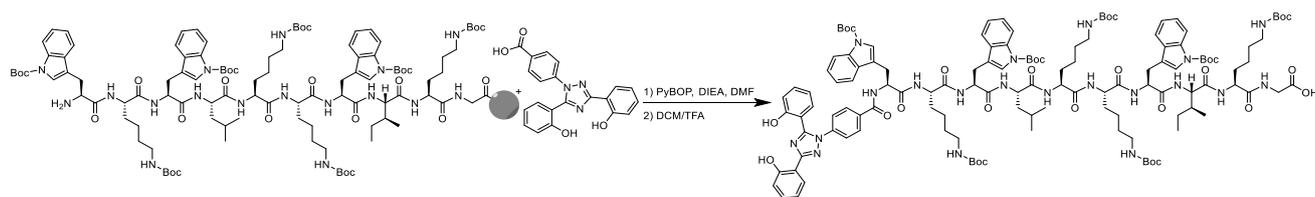
4.17.3 DFX-IRIRIRIG-NH₂⁴⁷

La synthèse du peptide IRIRIRIG-NH₂ monofonctionnelisé par le deferasirox a été réalisée sur phase solide, mais n'a pas permis d'obtenir le produit voulu. La synthèse de ce composé a donc été réalisée en phase liquide.



Un mélange composé de 15 mg de deferasirox (0,037 mmol, 2 équivalents) dissouts dans 400 μ L DMF est préparé. 30 mg de peptide NH₂-IRIRIRIG-NH₂ (0,018 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés, 13,6 mg de PyBOP (0,027 mmol, 1,5 équivalent), suivi par 24 μ L de DIEA (0,144 mmol, 8 équivalents). Une fois tous les solides dissouts, le milieu est agité pendant 16 heures à température ambiante. Une fois la complétion de la réaction vérifiée par HPLC (après 16 h), la DMF et la DIEA sont évaporées et le milieu est redissout dans un mélange 9 : 1 (A/B) et est purifié par HPLC préparative, utilisant la méthode E. La pureté du peptide est vérifiée par LC-MS. Les contre-anions sont échangés à l'aide d'une solution à 2 mM d'HCl. Le solide est dissout dans 5 mL d'un mélange 80 : 20 d'HCl (2 mM)/ACN puis lyophilisé. Cette étape est répétée trois fois afin d'obtenir un sel de chlorure blanc (24 mg rendement 70 %).

4.17.4 DFX-WKWLKKWIKG-OH^{154,167}



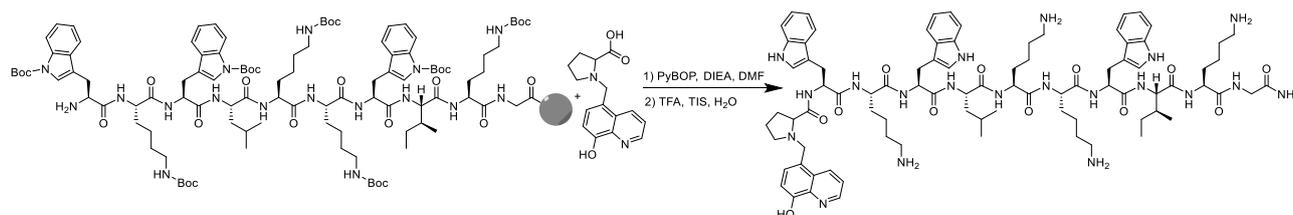
Une solution composée de 54 mg de deferasirox (0,13 mmol, 1,2 équivalent) dissous dans 5 mL de DMF est préparée, puis 86 mg de PyBOP (0,17 mmol, 1,5 équivalent) sont ajoutés, suivis par 118 μ L de DIEA (1.1 mmol, 6 équivalents). Ce mélange est introduit dans la seringue contenant la résine fonctionnalisée (0,11 mmol de peptide) puis celle-ci est agitée à température ambiante durant 24 heures (même protocole que pour la synthèse de DFX-WKWLKKWIKG-NH₂). Un second couplage de 24 heures a également été réalisé. Après complétion de la réaction (24 h), suivie par HPLC, le peptide est clivé sélectivement de la résine tout en conservant les groupements protecteurs.

Une solution de DCM à 1 % de TFA est préparée (50 mL), ainsi qu'une solution de MeOH avec 5 % de NEt₃ (100 mL). Plusieurs lavages successifs (20 lavages) d'une durée de 1 min, avec la solution de DCM/TFA 1 % sont réalisés. Les fractions obtenues sont directement ajoutées dans la totalité de la solution de MeOH/NEt₃ 5 % afin de neutraliser le plus rapidement possible l'acidité et éviter la déprotection du peptide. La libération du peptide est suivie par CCM (pas d'éluant, observation du relargage à l'aide de la lampe UV à 254 nm) afin de déterminer quand le peptide est totalement décroché de la résine. Une fois tout le peptide récupéré, la fraction obtenue est évaporée, redissoute dans du DCM (20 mL), puis extraite à l'aide de 3 x 10 mL d'H₂O acidifié à pH \approx 4 avec du HCl à 37 %, et le solvant est finalement évaporé sous vide afin d'obtenir un sel de chlorure blanc (225 mg, rendement 80 %).

4.17.5 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂ et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-OH

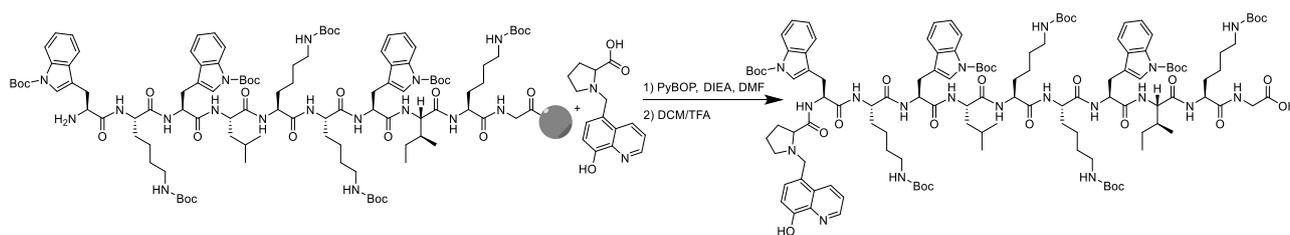
Les synthèses du peptide NH₂-WKWLKKWIKG -(NH₂ ou OH) monofonctionnalisé par la 8-hydroxyquinoléine ou le deferasirox ont été réalisés sur phase solide.

4.17.6 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂⁴⁷



Une solution de 41 mg de 8-hydroxyquinoléine (8HQ) (0,13 mmol, 1,4 équivalent) dans 4 mL de DMF est préparée. Puis, 77,3 mg de PyBOP (0,15 mmol, 1,7 équivalent) est ajouté, suivi par 103 μ L de DIEA (0.56 mmol, 6 équivalents). Ce mélange est introduit dans la seringue contenant la résine (0,09 mmol de peptide), puis celle-ci est agitée à température ambiante durant 16 heures. Deux autres couplages sont réalisés de la même manière, avec une durée de 24 heures chacun. Une fois la 8HQ couplée au peptide, celui-ci est déprotégé et clivé de la résine (suivant le protocole de la synthèse de NH₂-WKWLKKWIKG-NH₂), afin d'obtenir le L-PAM fonctionnalisé par la 8HQ-Pro-OH. Le produit brut obtenu est purifié deux fois consécutives par HPLC préparative. La première purification est réalisée suivant la méthode F et la seconde suivant la méthode G. Les contre-ions sont échangés à l'aide d'une solution à 2 mM d'HCl, comme précédemment décrit. Le solide est ensuite dissout dans un mélange 80 : 20 HCl/ACN (V = 15 mL) puis lyophilisé. Cette étape est répétée 3 fois afin d'obtenir un sel de chlorure jaune (146 mg, rendement 85 %).

4.17.7 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-OH⁴⁷



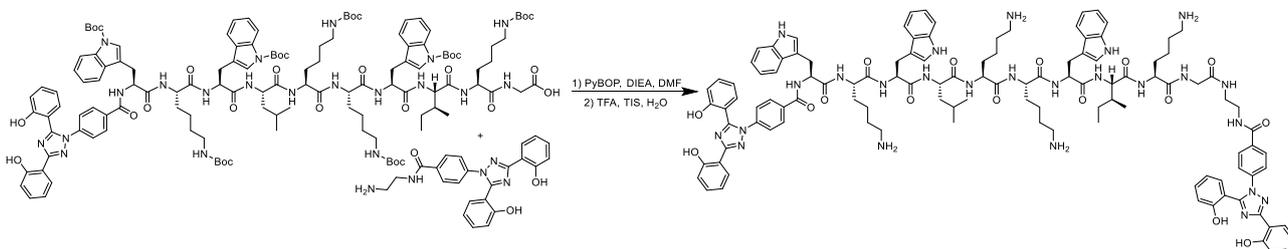
Une solution composée de 43 mg de 8HQ (0,14 mmol, 1,4 équivalent) dissous dans 5 mL de DMF est préparée. 81 mg de PyBOP (0,16 mmol, 1,6 équivalent) y sont ensuite ajoutés, suivis par 110 μ L de DIEA (0,62 mmol, 6 équivalents). Ce mélange est introduit dans la seringue contenant la résine fonctionnalisée (0,103 mmol de peptide, 1 équivalent) puis celle-ci est agitée à température ambiante durant 24 heures (suivant le même protocole que pour la synthèse de DFX-WKWLKKWIKG-NH₂). Un second couplage de 24 heures est également réalisé. Le peptide est finalement clivé sélectivement de la résine, tout en conservant ses groupements protecteurs.

Une solution de TFA à 1 % dans le DCM est préparée (50 mL), ainsi qu'une solution de NEt₃ à 5 % dans le MeOH (100 mL). Plusieurs lavages successifs (20 lavages) d'une durée de 1 min chacun sont réalisés avec la solution de DCM/TFA 1 %. Les fractions obtenues sont directement ajoutées dans la totalité de la solution de MeOH/NEt₃ 5 % afin de neutraliser le plus rapidement possible l'acidité, et éviter la déprotection du peptide. La libération du peptide est suivie par CCM (pas d'éluion, observation du relargage à l'aide de la lampe UV à 254 nm) afin de déterminer quand le peptide est totalement décroché de la résine. Une fois tout le peptide récupéré, la fraction obtenue est évaporée, redissoute dans du DCM (20 mL) puis extraite à l'aide de 3 x 10 mL H₂O à pH \approx 4. Une forte émulsion s'étant formée, une perte de produit est à déplorer. Le solvant de la phase organique est évaporé une dernière fois sous vide afin d'obtenir un sel de chlorure jaune (120 mg, rendement 47 %).

4.18 Fonctionnalisation des peptides en C-ter

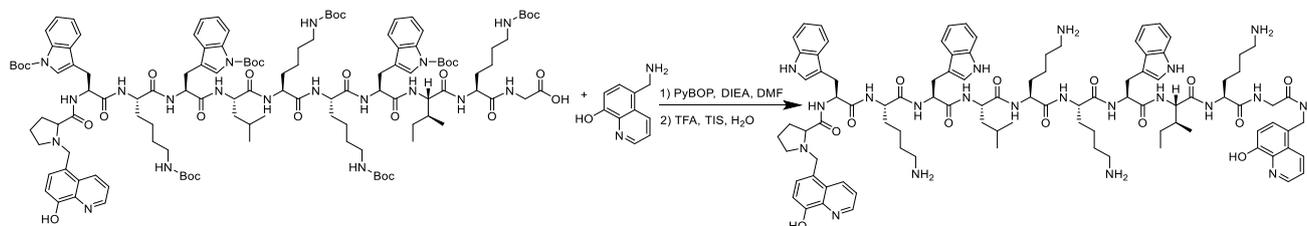
Les synthèses des peptides (DFX ou 8HQ-Pro)-WKWLKKWIKG-OH bisfonctionnalisés par la 8-hydroxyquinoléine ou le deferasirox ont été réalisées en phase liquide.

4.18.1 DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX¹⁵⁵



Une solution de 200 mg de DFX-WKWLKKWIKG-OH (0,08 mmol, 1 équivalent) est préparée dans 5 mL de DMF. 61 mg de PyBOP (0,12 mmol, 1,5 équivalent) sont ensuite ajoutés. Après 2 min d'agitation, une solution composée de 42 mg de N-(2-aminoéthyl)-4-(3,5-bis(2-hydroxyphényl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl) benzamide (0,09 mmol, 1,1 équivalent) et de 300 μ L de DIEA (0,48 mmol, 6 équivalents) est ajoutée pour obtenir un volume final de 10 mL. Le milieu est agité à température ambiante durant 48 heures. Le solvant est retiré sous vide à l'aide d'un piège à solvant. Le produit brut ainsi obtenu est dissout dans une solution TFA/TIS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5) puis la solution est agitée à température ambiante durant 45 min. Le L-PAM-L est précipité dans l'Et₂O. Le solide obtenu est dissout dans un mélange 80 : 20 de A/B et purifié deux fois par HPLC. La première purification est réalisée suivant la méthode F et la seconde suivant la méthode H. Les contre-ions sont échangés à l'aide d'une solution à 2 mM de HCl, comme décrit précédemment. Le solide est dissout dans un mélange 80 : 20 d'HCl/ACN (V = 15 mL) puis lyophilisé. Cette étape est répétée 3 fois afin d'obtenir un sel de chlorure blanc (45 mg rendement 25 %).

4.18.2 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ¹⁵⁵



Une solution de 100 mg de 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-OH (0,04 mmol, 1 équivalent) est préparée dans 2,5 mL de DMF. 32 mg de PyBOP (0,06 mmol, 1,5 équivalent) y sont ensuite ajoutés. Après 2 min d'agitation, une solution composée de 12,1 mg de 5-(aminométhyl)quinolin-8-ol (0,05 mmol, 1,2 équivalent) et de 150 μ L de DIEA (0,24 mmol, 6 équivalents) est ajoutée pour obtenir un volume final de 5 mL. Le milieu est agité à température ambiante durant 48 heures. Le milieu est évaporé sous vide, à l'aide d'un piège à solvant. Le produit brut ainsi obtenu est dissout dans une solution TFA/TIS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5) puis le mélange est agité à température ambiante durant 45 min. Le L-PAM-L est précipité à l'aide de Et₂O. Le solide obtenu est dissout dans un mélange 80 : 20 de A/B puis purifié par HPLC suivant la méthode I. Les contre-ions sont échangés à l'aide d'une solution à 2 mM de HCl, comme décrit précédemment. Le solide est dissout dans un mélange 80 : 20 HCl/ACN (V = 15 mL) puis lyophilisé. Cette étape est répétée 3 fois afin d'obtenir un sel de chlorure jaune (48 mg rendement 60 %).

4.19 Caractérisation des PAM, L-PAM et L-PAM-L par LC-MS

La pureté des peptides (seul, mono et bis) est vérifiée à l'aide d'une RP-HPLC analytique. La masse des peptides est aussi vérifiée par LC-MS (Tableau 19).

peptide	[M+xH] ^{x+}	Théorique m/z	Mesuré m/z
WKWLKKWIKG-NH ₂	[M+H] ¹⁺	1372,73	1372,8
	[M+2H] ²⁺	686,86	686,8
	[M+3H] ³⁺	458,25	458,4
	[M+4H] ⁴⁺	343,94	344,0
WKWLKKWIKG-OH	[M+H] ¹⁺	1373,71	1373,8
	[M+2H] ²⁺	687,36	687,2
	[M+3H] ³⁺	458,58	458,7
	[M+4H] ⁴⁺	344,18	344,3
IRIRIRIG-NH ₂	[M+H] ¹⁺	1152,47	1152,8
	[M+2H] ²⁺	576,74	576,9
	[M+3H] ³⁺	384,83	385,2
	[M+4H] ⁴⁺	288,87	289,2
DFX-WKWLKKWIKG-NH ₂	[M+H] ¹⁺	1728,07	1727,8
	[M+2H] ²⁺	864,54	863,9
	[M+3H] ³⁺	576,70	576,4
	[M+4H] ⁴⁺	432,77	432,5
8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH ₂	[M+H] ¹⁺	1627,01	1626,9
	[M+2H] ²⁺	814,01	814,3
	[M+3H] ³⁺	543,01	543,4
	[M+4H] ⁴⁺	407,50	407,9
DFX-IRIRIRIG-NH ₂	[M+H] ¹⁺	1507,81	1508,3
	[M+2H] ²⁺	754,41	754,6
	[M+3H] ³⁺	503,28	503,5
	[M+4H] ⁴⁺	377,71	377,8
DFX-WKWLKKWIKG-OH	[M+H] ¹⁺	1729,06	1728,9
	[M+2H] ²⁺	865,03	865,8
	[M+3H] ³⁺	577,02	577,2
	[M+4H] ⁴⁺	433,02	433,2
8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-OH	[M+H] ¹⁺	1627,99	1627,9
	[M+2H] ²⁺	814,50	814,2
	[M+3H] ³⁺	543,34	543,7
	[M+4H] ⁴⁺	407,75	408,2
DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX	[M+H] ¹⁺	2126,49	/
	[M+2H] ²⁺	1063,75	1063,7
	[M+3H] ³⁺	709,50	709,8
	[M+4H] ⁴⁺	532,38	532,7
8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ	[M+H] ¹⁺	1784,17	1784,0
	[M+2H] ²⁺	892,59	892,9
	[M+3H] ³⁺	595,40	595,8
	[M+4H] ⁴⁺	357,64	357,9

Tableau 19 : Caractérisation par LC-MS des PAM et leurs dérivés synthétisés

4.20 Préparation des solutions stock de Fe^{II} et Ga^{III}

Les concentrations des solutions titrées des ions métalliques sont déterminées par absorbance UV-Vis. La concentration de la solution de chlorure de gallium est déterminée par analyse ICP-MS (82 mM). Le Fe^{III} n'étant pas stable à pH physiologique (formation d'hydroxydes de fer insolubles), le sel de Mohr (Fe^{II}(NH₄)₂(SO₄)₂) est utilisé, car il possède une stabilité nettement meilleure à pH physiologique (7,4, et s'oxyde lentement en Fe^{III}). Ce sel (101 mM) a été dosé à l'aide d'une solution de 8HQ-Pro-OtBu préalablement dosée à l'aide de la solution de GaCl₃. L'oxydation du Fe^{II} en Fe^{III} après coordination est investiguée pour toutes les espèces (L, L-PAM et L-PAM-L). L'oxydation complète du métal est observée après une durée maximale de 15 min. Tous les dosages sont démarrés 15 min après l'ajout de métal dans le milieu.

4.21 Titrage spectrophotométrique des ligands et de leurs complexes en fonction du pH

Des titrages sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60 avec toutes les espèces synthétisées afin d'observer l'évolution des spectres d'absorbance en fonction du pH. Une solution de 50 µM de chaque espèce est préparée dans une cuve UV de 1 mL (avec un trajet optique de 1 cm), puis plusieurs solutions de HCl sont utilisées (à 0,001 mM, 0,01 mM, 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM et 1M) pour acidifier le milieu à pH 4 et obtenir un volume total de 1 mL. Afin d'augmenter le pH de 0,5 unité entre chaque spectre, différentes solutions de soude ont été utilisées (à 0,001 mM, 0,01 mM, 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM et 1M). Le pH a été varié entre pH 4 et pH 11.

Dans le cas des complexes, les proportions de métal ajoutées sont dépendantes du ligand analysé. Pour les dérivés 8-hydroxyquinoléine, la stœchiométrie étant de 1 pour 3, 0,3 équivalent est ajouté soit en Ga^{III} ou en Fe^{III}. Pour les dérivés du deferasirox, la stœchiométrie étant de 1 pour 2, 0,45 équivalent est ajouté soit en Ga^{III} ou en Fe^{III}. Le titrage démarre à pH 4 pour finir à pH 11 avec un incrément de 0,5 unité de pH.

4.22 Titrage spectrophotométrique des L, L-PAM, L-PAM-L et du surnageant de culture de PA01 WT avec du Fe^{III} ou Ga^{III}

Les titrages des solutions de ligands sont réalisés par le Fe^{III} et le Ga^{III} avec une concentration de 50 µM de chaque ligand dans du tampon HEPES 100 mM à pH 7,4, préparés dans une cuve UV de 1 mL. Les ions métalliques sont ajoutés par faibles portions jusqu'à atteindre un plateau qui correspond à une coordination complète des ligands par le métal. Pour les surnageants de culture, la concentration est déterminée en utilisant la même méthodologie que ci-dessus, mais avec une concentration environ trois fois plus élevée.

4.23 Compétition entre deux ligands: à partir des complexes de Ga^{III} et Fe^{III} en présence de DFO B.

Des expériences de compétition de ligands ont été réalisées avec les complexes suivants : [Fe^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃], [Ga^{III}(8HQ-Pro-OtBu)₃], [Fe^{III}(DFX-COOH)₂], [Ga^{III}(DFX-COOH)₂], [Fe^{III}(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂)₃], [Ga^{III}(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂)₃], [Fe^{III}(DFX-WKWLKKWIKG-NH₂)₂], [Ga^{III}(DFX-WKWLKKWIKG-NH₂)₂], [Fe^{III}₂(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ)₃], [Ga^{III}₂(8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ)₃], [Fe^{III}(DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX)]_n et [Ga^{III}(DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX)]_n. Ces expériences sont réalisées dans une cuve UV de 1 mL (avec un trajet optique de 1 cm), avec une concentration de 100 mM de tampon HEPES à pH 7,4, ainsi qu'une concentration en ligand de 50 µM. La quantité de métal ajoutée est dépendante du ligand utilisé. Pour les ligands seuls et les L-PAM, un ratio 1 : 3 (métal/ligand, 15 µM) est utilisé pour la formation des complexes avec un dérivé 8HQ. Un ratio 1 : 2 (22,5 µM) est choisi pour la formation des complexes avec un

dérivé DFX. Pour les L-PAM-L, un ratio 2 : 3 (30 μ M) est appliqué pour les complexes composés des dérivés 8HQ et 1 : 1 (45 μ M) pour les complexes composés des dérivés DFX. 100 équivalents (par rapport au ligand) de desferrioxamine B sont ajoutés, et la disparition de notre complexe initial est suivie par absorption UV-visible sur une durée variant de 1 heure, pour les décoordinations les plus rapides, à 12 jours pour les plus lentes.

4.24 Détermination des conditions de formation des polymères de coordination

Différentes conditions sont investiguées, afin de former quatre polymères de coordination différents : $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX})]_n$, $[\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$, $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX})]_n$ et $[\text{Ga}^{\text{III}}_2(\text{8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ})_3]_n$. Toutes les conditions sont listées dans le Tableau 20 ci-dessous. Les conditions utilisées sont colorées en **bleu** pour les polymères à base de Fe^{III} et en **vert** pour les polymères à base de Ga^{III} . Le volume total des tests est de 100 μ L et toutes les solutions sont incubées à 37 °C et agitées à 500 rpm pendant 24 heures. La stœchiométrie est différente en fonction du L-PAM-L utilisé : pour le ligand DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX la quantité de ligand est égale à la quantité de métal et pour le ligand 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ la stœchiométrie est de 3/2 (ligand/métal).

Conditions utilisées	DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX (1/1)	8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (3/2)
Pi 0,1 M pH 7,4_0,05 mM complexe Fe^{III}	précipitation	précipitation
Pi 0,1 M pH 7,4_0,1 mM complexe Fe^{III}	précipitation	précipitation
Pi 0,1 M pH 7,4_0,5 mM complexe Fe^{III}	précipitation	précipitation
Pi 0,1 M pH 7,4_1 mM complexe Fe^{III}	précipitation	précipitation
Pi 0,05 M pH 7,4_0,1 mM complexe Fe^{III}	précipitation	précipitation
HEPES 0,1 M pH 7,4_1 mM complexe Fe^{III}	0	0
HEPES 0,1 M pH 7,4_5 mM complexe Fe^{III}	gélification	0
HEPES 0,1 M CO_3^{2-} 50 mM pH 7,4_1 mM complexe Fe^{III}	/	gélification
HEPES 0,1 M CO_3^{2-} 50 mM pH 7,4_1 mM complexe Ga^{III}	/	0
TRIS 0,1 M pH 7,4_1 mM complexe Fe^{III}	gélification	0
TRIS 0,1 M pH 7,4_5 mM complexe Fe^{III}	/	0
TRIS 0,1 M pH 7,4_1 mM complexe Ga^{III}	gélification	/
TRIS 0,1 M CO_3^{2-} 50 mM pH7,4_1 mM complexe Ga^{III}	/	gélification
TRIS 0,1 M CO_3^{2-} 50 mM pH7,4_1 mM complexe Fe^{III}	/	gélification

Tableau 20 : Tableau des conditions de polymérisation utilisée : / = échantillon pas réalisé, 0 = échantillon testé, mais aucune formation de polymère

4.25 Immobilisation du polymère dans un gel d'agarose

1. Plusieurs gels d'agarose de 4 % 3 %, et 2 % (% massique final) sont préparés dans un microvial, afin de faire varier le maillage du gel d'agarose. Chaque gel est préparé en double afin de pouvoir tester les polymères au Fe^{III} et au Ga^{III}.

Une fois le gel fondu, le L-PAM-L est ajouté au milieu (5 µL à 20 mM), suivi par le métal (300 mM pour 8HQ et 1 mM pour DFX de Fe^{III} ou Ga^{III}). Le milieu est incubé à 100 °C et agité à 2000 rpm pendant 5 min. Le tampon ou mélange de tampons (100 mM de tampon TRIS pH 7,4 pour les dérivés DFX et 50 mM de carbonate + 100 mM de tampon TRIS pH 7,4 pour les dérivés 8HQ) est ensuite ajouté au milieu, pour obtenir un volume total de 100 µL. La solution est agitée une nouvelle fois pendant 5 min à 100 °C et 2000 rpm (13 g), afin d'obtenir un échantillon homogène, puis laisser redescendre à température ambiante. Une fois le gel figé, celui-ci est rincé trois fois avec 1 mL solution de tampon TRIS pH 7,4 à 20 mM, 2 fois 2 heures et une fois 16 heures.

2. D'autres échantillons ont été préparés avec deux types d'agarose : un agarose classique qui fond à 88 °C et un agarose à bas point de fusion qui fond à 28 °C. Deux séries de gels à 5 % ont été préparées : deux gels avec de l'agarose 88 °C pur, et deux gels avec un mélange 50 : 50 des deux types d'agaroses. 4 échantillons sont préparés : DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX + Fe^{III} + agarose 88 °C, DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX + Fe^{III} + agarose mélange, 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ + Fe^{III} + agarose 88 °C et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ + Fe^{III} + agarose mélange. Les échantillons avec le composé DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX sont composés de 1 mM de DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX, 1 mM de Fe^{II} (1 : 1) et 100 mM de tampon TRIS pH 7,4. Les échantillons avec le composé 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ sont composés de 1 mM de 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ, 660 µM de Fe^{II} (2 : 3), 50 mM de carbonate et 100 mM de tampon TRIS pH 7,4. Le protocole de rinçage présenté précédemment est appliqué.

Les analyses des solutions de rinçage sont réalisées à l'aide d'une cuve de 1 mL avec un trajet optique de 1 cm dans laquelle sont ajoutés 500 µL de la solution de rinçage, puis analysées en absorption UV-Vis. Cette analyse a été réalisée pour toutes les solutions de rinçage. Ces analyses sont réalisées afin de déterminer la quantité d'ions métalliques ou de L-PAM-L relargué. Pour déterminer la concentration des espèces par spectrophotométrie, l'absorbance de la solution est mesurée et divisée par le coefficient d'extinction molaire de l'espèce (Beer Lambert $[C] = A/(\epsilon \cdot l)$).

4.26 Immobilisation du polymère dans une cassette de dialyse

Les quatre polymères de coordination sont directement formés dans les cassettes de dialyse dans les mêmes conditions que dans le Tableau 20 de détermination des conditions de formation des polymères ci-dessus. La cassette est ensuite mise à incuber dans 3 mL de solution de tampon TRIS 100 mM à pH 7,4 durant 2 heures. Cette étape est répétée deux fois, puis une troisième fois pendant 16 heures.

4.27 Tests de relargage des polymères de coordinations

4.27.1 Gel d'agarose (DFO B):

Une fois les échantillons de la partie 3.25-2. préparés, 1 mL de solution de DFO B à 150 µM est déposé sur chaque échantillon. Ils sont ensuite mis à l'incubation à 37 °C, avec une agitation de 400 rpm. Deux prélèvements sont réalisés pour chaque échantillon, à 18 heures et 83 heures. Les analyses sont réalisées à l'aide d'une cuve de 1 mL avec un trajet optique de 1 cm dans laquelle sont ajoutés 500 µL du surnageant. Après mesure du spectre d'absorption, le volume prélevé est réintroduit dans l'échantillon. Ces analyses nous permettent de déterminer la concentration de Fe^{III} libérée dans le milieu ainsi que la quantité de L-PAM-L libérée dans le milieu suivant la méthodologie présentée dans la partie 3.25.

4.27.2 Gel d'agarose (surnageant PA01 WT):

Pour réaliser ces analyses, différents gels d'agarose à différents pourcentages sont préparés comme présenté ci-dessus (dans la partie 3.25-1.). Les analyses des solutions de rinçage sont réalisées comme présenté ci-dessus (3.25-2.).

Une fois les échantillons préparés, 1 mL de surnageant de culture de la souche sauvage de *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 WT) provenant d'une culture réalisée par l'équipe du Dr Isabelle Schalk et étant composée d'approximativement 150 μM de pyoverdine et 100 μM de pyochéline ainsi que du milieu CAA (Il est composé de 5 g/L d'acides bacto casamino, 1,46 g/L de KH_2PO_4 , 0,25 g/L de MgSO_4) est déposé sur les échantillons. Ils sont ensuite mis à l'incubation à 37 °C, avec une agitation de 500 rpm. Quatre prélèvements sont réalisés pour chaque échantillon, à 16 heures, 43 heures, 112 heures et 278 heures. Les analyses spectrophotométriques de ces échantillons sont réalisées à l'aide d'une cuve ayant un trajet optique de 0,2 cm, dans laquelle sont ajoutés 500 μL de surnageant. Une fois l'analyse terminée, le volume prélevé est réintroduit dans l'échantillon. Ces analyses nous permettent de déterminer la quantité d'ions Fe^{III} libérée dans le milieu par le biais de la coordination de la pyoverdine et la pyochéline. Cependant la quantification du gallium n'est pas possible, car aucune bande Ga^{III} pyoverdine ou pyochéline n'est observable.

Une seconde série d'analyse par HPLC est également réalisée avec les mêmes échantillons, car il n'est plus possible de déterminer spectrophotométriquement le relargage des L-PAM-L à cause de la forte contribution de la pyoverdine et la pyochéline. Seul le relargage du Fe^{III} pourra être quantifié de cette manière. Les analyses HPLC nous permettent de déterminer la quantité de L-PAM-L relargué dans le milieu. Pour ce faire il faut déterminer l'aire sous le pic d'une solution de concentration connue en L-PAM-L (étalon), puis diviser l'aire sous le pic observée pour un échantillon de concentration inconnue par l'aire sous le pic de l'étalon.

30 μL d'échantillon sont prélevés, puis 20 μL de celui-ci sont injectés sur RP-HPLC utilisant la méthode d'analyse AA.

4.27.3 Cassette de dialyse (surnageant PA01 WT):

Les échantillons sont préparés comme présenté précédemment. Quatre échantillons sont préparés : DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX + Fe^{III} , DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX + Ga^{III} , 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ + Fe^{III} et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ + Ga^{III} suivant le même protocole que dans la partie 3.26. Les analyses des solutions de rinçage sont réalisées comme présenté dans la partie 3.25-2.

Une fois les échantillons préparés, les cassettes de dialyse sont incubées dans 3 mL de surnageant de culture de PA01 WT à 37 °C et une agitation à 500rpm. Sept prélèvements sont réalisés pour chaque échantillon à 1 heure, 2 heures, 19 heures, 43 heures, 67 heures, 163 heures et 331 heures. Les analyses spectrophotométriques et HPLC sont réalisées comme présenté dans le paragraphe précédent (3.27.2).

4.27.4 Gel d'agarose (*Pseudomonas aeruginosa* en culture):

Quatre solutions stock sont préparées à partir d'un gel d'agarose à 2 % : DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX + Fe^{III} , DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX + Ga^{III} , 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ + Fe^{III} et 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ + Ga^{III} . Les échantillons avec le DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX sont composés de 1 mM de DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX, 1 mM de Fe^{II} ou Ga^{III} et 100 mM de tampon TRIS à pH 7,4. Les échantillons avec le 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ sont composés de 1 mM de 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ, 660 mM de Fe^{II} ou Ga^{III} , 50 mM de carbonate et 100 mM de tampon TRIS pH 7,4.

L'idée est de pouvoir déposer un milieu de culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur le gel d'agarose chargé et observer si les bactéries continuent de croître ou non ce qui nous communiquera une information sur le relargage ainsi que la capacité de notre système à stopper la croissance bactérienne. La stratégie imaginée consiste (i) à déposer du gel d'agarose chargé dans le fond d'un puits d'une plaque (plaque 96 puits pour lecteur de plaque), (ii) rincer les puits afin de retirer l'excédent de L-PAM-L ou d'ions métalliques n'ayant pas réagi (iii) déposer une culture de *Pseudomonas aeruginosa* dans le puits et (iiii) suivre la croissance bactérienne à l'aide d'un lecteur de plaque.

2 µL de gel sont étalés sur le bord du fond du puits et une fois le gel figé, les puits sont rincés avec 100 µL de solution de tampon TRIS à 100 mM et analysés à l'aide d'un lecteur de plaque pendant une durée de 4 h (Tableau 21). Ce test de rinçage nous permet de déterminer si le rinçage est nécessaire, si une proportion non négligeable d'ions ou de L-PAM-Li sont relargués, ou si la quantité relarguée est négligeable et les rinçages pas indispensables. Tous les échantillons sont analysés à l'aide d'un lecteur de plaque CLARIOStar Plus (GMB Biotech) pour une durée de 1245 min (20 h 45 min), avec acquisition d'un spectre toutes les 5 min.

Les tests de rinçage suivant sont entrepris.

A1 à A2	A3 à A4	A5 à A6	A7 à A8	A9 à A10	A11 à A12
Agarose 2%	Agarose 2 % + NH ₂ - WKWLKKWI KG-NH ₂ seul	Agarose 2 % + (citrate) Fe ^{III}	Agarose 2 % + (citrate) Ga ^{III}	Agarose 2 % + DFX- WKWLKKWI KG-NH-DFX seul	Agarose 2 % + 8HQ-Pro- WKWLKKWI KG-NH-8HQ seul
B1 à B2	B3 à B4	B5 à B6	B7 à B8	B9 à B10	B11 à B12
Agarose 2 % + DFX- WKWLKKWI KG-NH-DFX + Fe ^{III} (polymère)	Agarose 2% + 8HQ- Pro- WKWLKKWIKG- NH-8HQ + Fe ^{III} (polymère)	Agarose 2 % + DFX- WKWLKKWIKG -NH-DFX + Ga ^{III} (polymère)	Agarose 2% + 8HQ-Pro- WKWLKKWIKG- NH-8HQ + Ga ^{III} (polymère)		

Tableau 21 : Tableau listant toutes les conditions de rinçage testées

2 µL de tous les échantillons présentés dans le Tableau 22 et 23 ci-dessous sont déposés dans la plaque en l'étalant bien sur le bord du fond du puits, puis après s'être figé, 200 µL de milieu de culture préalablement carencé (incubée 24 h dans un milieu pauvre CAA afin que les bactéries produisent des sidérophores) sont ajoutés (analyse réalisée en triplicata ou quadriplicata). La croissance bactérienne dans les puits est mesurée toutes les 30 min pendant 48 heures. Les échantillons de la plaque sont répartis comme suit :

Tests sur la souche PA01 WT :

A1 à A3	A4 à A6	A7 à A9	A10 à A12		
Tp + CAA	Tp	Agarose 2% + Tp	Agarose 2 % + NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ (1 mM) + Tp		
B1 à B4		B5 à B8		B9 à B12	
Agarose 2 % + (citrate)Fe (1 mM) + Tp		Agarose 2% + (citrate) Ga (1 mM) + Tp		Agarose 2 % + DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX (1 mM) + Tp	
C1 à C4		C5 à C8		C9 à C12	
Agarose 2 % + DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX (1 mM) + Fe ^{III} (1 mM) + Tp		Agarose 2 % + DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX (1 mM) + Ga ^{III} (1 mM) + Tp		Agarose 2 % + 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (1 mM) + Tp	
D1 à D4		D5 à D8		D9 à D11	D12
Agarose 2% + 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (1 mM) + Fe ^{III} (0,66 mM) + Tp		Agarose 2% + 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (1 mM) + Ga ^{III} (0,66 mM) + Tp		NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ (1 mM) + Tp	Agarose 2 % + CAA

Tableau 22 : Tableau listant toutes les conditions testées sur la souche PA01 WT

Tests sur la souche PA01 ΔpvdFΔpchA* :

E1 à E3	E4 à E6	E7 à E9	E10 à E12		
Tp + CAA	Tp	Agarose 2% + Tp	Agarose 2 % + NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ (1 mM) + Tp		
F1 à F4		F5 à F8		F9 à F12	
Agarose 2 % + (citrate) Fe (1 mM) + Tp		Agarose 2% + (citrate) Ga (1 mM) + Tp		Agarose 2 % + DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX (1 mM) + Tp	
G1 à G4		G5 à G8		G9 à G12	
Agarose 2 % + DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX (1 mM) + Fe ^{III} (1 mM) + Tp		Agarose 2 % + DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX (1 mM) + Ga ^{III} (1 mM) + Tp		Agarose 2 % + 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (1 mM) + Tp	
H1 à H4		H5 à H8		H9 à H11	H12
Agarose 2% + 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (1 mM) + Fe ^{III} (0,66 mM) + Tp		Agarose 2% + 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ (1 mM) + Ga ^{III} (0,66 mM) + Tp		NH ₂ -WKWLKKWIKG-NH ₂ (1 mM) + Tp	Agarose 2 % + CAA

Tableau 23 : Tableau listant toutes les conditions testées sur la souche PA01 ΔpvdFΔpchA

Tp = 100 mM TRIS pH 7,4 (pour DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX) ; 50 mM carbonate + 100 mM de tampon TRIS pH 7,4 (pour 8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ) CAA = milieu utilisé pour induire une carence en fer chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il est composé de 5 g/L d'acides bacto casamino, 1,46 g/L de KH₂PO₄, 0,25 g/L de MgSO₄. La concentration en fer du milieu est de 20 nM. * = souche PA01 ΔpvdFΔpchA : souche ne synthétisant pas la pyochéline ni la pyoverdine.

4.28 BIBLIOGRAPHIE

1. Jahn, H. A., Teller, E. & Donnan, F. G. Stability of polyatomic molecules in degenerate electronic states - I—Orbital degeneracy. *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci* **161**, 220–235 (1937).
2. Fraústo da Silva, J. J. R. & Williams, R. J. P. *The biology chemistry of the elements : the inorganic chemistry of life*. Oxford university press (2nd ed.) (2001).
3. Kaim, W. & Rall, J. Copper-A “Modern” Bioelement. *Angewandte chemie* **35**, 43–60 (1996).
4. Rubino, J. T. & Franz, K. J. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry* vol. 107 129–143 (2012).
5. Myers, R. T. Hard and Soft Acids and Bases. *Inorganic Chemistry* vol. 13 (8) 2040–2041 (1974).
6. Gray, H. B. Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 100 (7) 3563–3568 (2003).
7. Huang, H. *et al.* A comprehensive study on the generation of reactive oxygen species in Cu- β -catalyzed redox processes. *Free Radic Biol Med* **135**, 125–131 (2019).
8. Blaustein, R. The Great Oxidation Event. *Bioscience* **66 (3)**, 189–195 (2016).
9. Crichton, R. R. & Pierre, J. L. Old iron, young copper: From Mars to Venus. *BioMetals* vol. 14 (2) 99–112 (2001).
10. Liu, J. *et al.* Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chemical Reviews* vol. 114 (8) 4366–4369 (2014).
11. Hemsworth, G. R., Johnston, E. M., Davies, G. J. & Walton, P. H. Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. *Trends in Biotechnology* vol. 33 (12) 747–761 (2015).
12. Forsberg, Z. *et al.* Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology* vol. 59 54–64 (2019).
13. Harris, P. v. *et al.* Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* **49 (15)**, 3305–3316 (2010).
14. Moreau, C. *et al.* Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. *Biotechnol Biofuels* **12 (156)**, 1-19 (2019).
15. Hemsworth, G. R., Ciano, L., Davies, G. J. & Walton, P. H. Production and spectroscopic characterization of lytic polysaccharide monooxygenases. in *Methods in Enzymology* vol. 613 63–90 (Academic Press Inc., 2018).
16. Wang, D., Li, Y., Zheng, Y. & Hsieh, Y. S. Y. Recent Advances in Screening Methods for the Functional Investigation of Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Frontiers in Chemistry* vol. 9, 1-28 (2021).
17. Müller, G., Várnai, A., Johansen, K. S., Eijsink, V. G. H. & Horn, S. J. Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. *Biotechnol Biofuels* **8 (187)**, 1-9 (2015).
18. Manavalan, T., Stepnov, A. A., Hegnar, O. A. & Eijsink, V. G. H. Sugar oxidoreductases and LPMOs – two sides of the same polysaccharide degradation story? *Carbohydr Res* **505**, (108350) 1-10 (2021).
19. Bhatia, S. Introduction to enzymes and their applications. in *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 2* (IOP Publishing, 2018).

20. Sugawara, E. & Nikaido, H. *The cell A Molecular Approach. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 58, Oxford university press (8 ed.) (2014).
21. Agarwal, P. K. A Biophysical Perspective on Enzyme Catalysis. *Biochemistry* vol. 58 (6) 438–449 (2019).
22. Matsuo, T. Functionalization of ruthenium olefin-metathesis catalysts for interdisciplinary studies in chemistry and biology. *Catalysts* vol. 11 (3) 1–26 (2021).
23. Davis, H. J. & Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes: Challenges and Opportunities. *ACS Cent Sci* **5 (7)**, 1120–1136 (2019).
24. Fontecave, M. & Artero, V. Bioinspired catalysis at the crossroads between biology and chemistry: A remarkable example of an electrocatalytic material mimicking hydrogenases. in *Comptes Rendus Chimie* vol. 14 (4) 362–371 (2011).
25. Swiegers, G. F. *BIOINSPIRATION AND BIOMIMICRY IN CHEMISTRY REVERSE-ENGINEERING NATURE*. (John Wiley & Sons, Inc., 2012).
26. Schwizer, F. *et al.* Artificial Metalloenzymes: Reaction Scope and Optimization Strategies. *Chemical Reviews* vol. 118 (1) 142–231 (2018).
27. Kazuo Yamamura, B. & Thomas Kaiser, E. Studies on the Oxidase Activity of Copper(II) Carboxypeptidase A. *J Chem Soc Chem Commun* (20) 830–831 (1976).
28. Wilson, M. E. & Whitesides, G. M. Conversion of a Protein to a Homogeneous Asymmetric Hydrogenation Catalyst by Site-Specific Modification with a Diphosphinerhodium(I) Moiety. *Journal of the American Chemical Society* vol. 100 (1) 306–307 (1978).
29. Pal, S., Goswami, S. & Das, D. Cross β amyloid assemblies as complex catalytic machinery. *Chemical Communications* **57 (62)**, 7597–7609 (2021).
30. Fraser, P. E., Lévesque, L. & McLachlan, D. R. Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clin Biochem* **26 (62)**, 339–349 (1993).
31. Lengyel, Z., Rufo, C. M., Moroz, Y. S., Makhlynets, O. v. & Korendovych, I. v. Copper-Containing Catalytic Amyloids Promote Phosphoester Hydrolysis and Tandem Reactions. *ACS Catal* **8 (1)**, 59–62 (2018).
32. van de Velde, F., Arends, I. W. C. E. & Sheldon, R. A. *Vanadium-catalysed enantioselective sulfoxidations: rational design of biocatalytic and biomimetic systems*. *Topics in Catalysis* vol. 13 259-265(2000).
33. Roelfes, G. LmrR: A Privileged Scaffold for Artificial Metalloenzymes. *Acc Chem Res* **52 (3)**, 545–556 (2019).
34. Filice, M. *et al.* Preparation of an Immobilized Lipase-Palladium Artificial Metalloenzyme as Catalyst in the Heck Reaction: Role of the Solid Phase. *Adv Synth Catal* **357 (12)**, 2687–2696 (2015).
35. Zozulia, O., Dolan, M. A. & Korendovych, I. v. Catalytic peptide assemblies. *Chemical Society Reviews* vol. 47 (10), 3621–3639 (2018).
36. Makhlynets, O. v., Gosavi, P. M. & Korendovych, I. v. Short Self-Assembling Peptides Are Able to Bind to Copper and Activate Oxygen. *Angewandte Chemie* **128 (31)**, 9163–9166 (2016).
37. Monasterio, O., Nova, E. & Diaz-Espinoza, R. Development of a novel catalytic amyloid displaying a metal-dependent ATPase-like activity. *Biochem Biophys Res Commun* **482 (4)**, 1194–1200 (2017).
38. Chatterjee, A., Mahato, C. & Das, D. Complex Cascade Reaction Networks via Cross β Amyloid Nanotubes. *Angewandte Chemie - International Edition* **60 (1)**, 202–207 (2021).
39. Zozulia, O. & Korendovych, I. v. Semi-Rationally Designed Short Peptides Self-Assemble and Bind Hemin to Promote Cyclopropanation. *Angewandte Chemie - International Edition* **59 (21)**, 8108–8112 (2020).

40. Friedmann, M. P. *et al.* Towards Prebiotic Catalytic Amyloids Using High Throughput Screening. *PLoS One* **10** (12), 1-3 (2015).
41. Trifonov, E. N. *Consensus temporal order of amino acids and evolution of the triplet code.* *Gene* volume 261 (1), 139-151 (2000).
42. Ipsen, J., Hallas-Møller, M., Brander, S., Leggio, L. Io & Johansen, K. S. Lytic polysaccharide monoxygenases and other histidine-brace copper proteins: Structure, oxygen activation and biotechnological applications. *Biochemical Society Transactions* vol. 49 (1), 531–540 (2021).
43. Barth, A. & Zscherp, C. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* vol. 35 (4), 369–430 (2002).
44. Gailer, C. & Feigel, M. Is the parallel or antiparallel β -sheet more stable? A semiempirical study. *J Comput Aided Mol Des* **11** (3), 273–277 (1997).
45. Cinar, G. *et al.* Amyloid inspired self-assembled peptide nanofibers. *Biomacromolecules* **13** (10), 3377–3387 (2012).
46. Ceccon, A. *et al.* Interaction of Huntingtin Exon-1 Peptides with Lipid-Based Micellar Nanoparticles Probed by Solution NMR and Q-Band Pulsed EPR. *J Am Chem Soc* **140** (20), 6199–6202 (2018).
47. ten Brink, H. T. *et al.* Solid-phase synthesis of C-terminally modified peptides. *Journal of Peptide Science* **12** (11), 686–692 (2006).
48. Grant, G. A. *Synthetic peptides : a user's guide.* Oxford university press (2nd ed.) (2002).
49. El-Faham, A. & Albericio, F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev* **111** (11), 6557–6602 (2011).
50. Rizvi, A., Mulvey, J. T., Carpenter, B. P., Talosig, R. & Patterson, J. P. A Close Look at Molecular Self-Assembly with the Transmission Electron Microscope. *Chemical Reviews* vol. 121 (22), 14232–14280 (2021).
51. Anderson, V. L. & Webb, W. W. Transmission electron microscopy characterization of fluorescently labelled amyloid β 1-40 and α -synuclein aggregates. *BMC Biotechnol* **11** (1), 125 (2011).
52. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* vol. 1767 (9), 1073–1101 (2007).
53. el Khoury, Y. & Hellwig, P. Infrared spectroscopic characterization of copper-polyhistidine from 1,800 to 50 cm⁻¹: Model systems for copper coordination. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **14** (1), 23–34 (2009).
54. Kuipers, B. J. H. & Gruppen, H. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. *J Agric Food Chem* **55** (14), 5445–5451 (2007).
55. Solano, F., Lucas-Elío, P., López-Serrano, D., Fernández, E. & Sanchez-Amat, A. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiol Lett* **204** (1), 175–181 (2001).
56. Zoroddu, M. A. *et al.* The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem* **195**, 120–129 (2019).
57. Crichton, R., Iron Metabolism. *Wiley* **100** (S102), (4 ed.), 164–206 (2009).
58. Pearson, R. G. *Chemical Hardness.* (Wiley, 1997).

59. Bernstein, L. R. ³¹Ga Therapeutic Gallium Compounds. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine* 259–277 (2005)
60. Bard, A. J., Parsons, R. & Jordan, J. *Standard Potentials in Aqueous Solution*. CRC press (Routledge, 2017).
61. Ambroggi, E., Asenath-Smith, Emily., Ballard, W., Moores, L. & Brame, J. *Cross-comparison of advanced oxidation processes for remediation of organic pollutants in water treatment systems*. The U.S. army engineer research and development center (ERDC) (2019)
62. Sousa, L., Oliveira, M. M., Pessôa, M. T. C. & Barbosa, L. A. Iron overload: Effects on cellular biochemistry. *Clinica Chimica Acta* **504**, 180–189 (2020).
63. Page, M. G. P. The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases* **69**, S529–S537 (2019).
64. Anderson, G. J. & Frazer, D. M. Current understanding of iron homeostasis. in *American Journal of Clinical Nutrition* vol. 106 1559S-1566S (2017).
65. Brock, J. H. Benefits and dangers of iron during infection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2** (6), 507–510 (1999).
66. Yamanishi, H., Iyama, S., Yamaguchi, Y., Kanakura, Y. & Iwatani, Y. Total Iron-binding Capacity Calculated from Serum Transferrin Concentration or Serum Iron Concentration and Unsaturated Iron-binding Capacity. *Clin Chem* **49** (1), 175–178 (2003).
67. Kasvosve, I. & Delanghe, J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* vol. 40 (10), 1014–1018 (2002).
68. Vaulont, S., Masson, E. & Tous, S. A. S. Métabolisme du fer Iron metabolism. *Correspondances en Onco-Hématologie* **6**, 32–39 (2017).
69. Beaumont, C. Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer. *médecine/sciences* **20** (1), 68–72 (2004).
70. Basu, U., Roy, M. & Chakravarty, A. R. Recent advances in the chemistry of iron-based chemotherapeutic agents. *Coord Chem Rev* **417**, 213339 (2020).
71. Kircheva, N. & Dudev, T. Gallium as an Antibacterial Agent: A DFT/SMD Study of the Ga³⁺/Fe³⁺ Competition for Binding Bacterial Siderophores. *Inorg Chem* **59** (9), 6242–6254 (2020).
72. Chitambar, C. R. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1863** (8), 2044–2053 (2016).
73. Crumbliss, A. L. & Banerjee, S. A perspective essay on the use of Ga³⁺ as a proxy for Fe³⁺ in bioinorganic model studies and its successful use for therapeutic purposes. *J Inorg Biochem* **219**, 111411 (2021).
74. Hart, M. M., Smith, C. F., Yancey, S. T. & Adamson, R. H. Toxicity and Antitumor Activity of Gallium Nitrate and Periodically Related Metal Salts. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **47** (5), 1121–1127 (1971).
75. DUDLEY, H. C. & LEVINE, M. D. Studies of the toxic action of gallium. *J Pharmacol Exp Ther* **98** (4), 409–417 (1950).
76. Chitambar, C. R. Gallium-containing anticancer compounds. *Future Med Chem* **4** (10), 1257–1272 (2012).
77. Chifman, J., Laubenbacher, R. & Torti, S. v. A Systems Biology Approach to Iron Metabolism. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 844 201–225 (2014).

78. Evans, R. W., Kong, X. & Hider, R. C. Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1820 (3)**, 282–290 (2012).
79. Rivera, M. Bacterioferritin: Structure, Dynamics, and Protein–Protein Interactions at Play in Iron Storage and Mobilization. *Acc Chem Res* **50 (2)**, 331–340 (2017).
80. Knovich, M. A., Storey, J. A., Coffman, L. G., Torti, S. v. & Torti, F. M. Ferritin for the clinician. *Blood Rev* **23 (3)**, 95–104 (2009).
81. Bystrom, L. M., Guzman, M. L. & Rivella, S. Iron and Reactive Oxygen Species: Friends or Foes of Cancer Cells? *Antioxid Redox Signal* **20 (12)**, 1917–1924 (2014).
82. Kehrer, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149 (1)**, 43–50 (2000).
83. Fillat, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys* **546**, 41–52 (2014).
84. Salvail, H., Massé, E., Regulating iron storage and metabolism with RNA_ an overview of post transcriptional controls of intracellular iron homeostasis. *WIREs RNA* **3**, 26-36 (2012).
85. Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quifones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 27 (2-3), 215–237 (2003).
86. Lakna. Difference Between Gram Positive and Gram Negative Bacteria Stunning images of cells Discover how scientists use Main Difference – Gram Positive vs Gram Negative Bacteria. *Pediaa* 1-13 (2017).
87. Sheldon, J. R., Laakso, H. A. & Heinrichs, D. E. Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* 43–85 (2016).
88. Runyen-Janecky, L. J. Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 1–11 (2013).
89. Pogoutse, A. K. & Moraes, T. F. Iron acquisition through the bacterial transferrin receptor. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **52 (3)**, 314–326 (2017).
90. Sheldon, J. R. & Heinrichs, D. E. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **39 (4)**, 592–630 (2015).
91. Saha, M. *et al.* Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* **23 (5)**, 3984–3999 (2016).
92. Correnti, C. & Strong, R. K. Mammalian siderophores, siderophore-binding lipocalins, and the labile iron pool. *Journal of Biological Chemistry* vol. 287 (17), 13524–13531 311829 (2012).
93. Aznar, A. & Dellagi, A. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *J Exp Bot* **66 (11)**, 3001–3010 (2015).
94. Ma, Y., Xie, Y. & Hider, R. C. A novel fluorescence method for determination of pFe 3+. *Analyst* **138 (1)**, 96–99 (2013).
95. Raymond, K. N., Dertz, E. A. & Kim, S. S. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100 (7)**, 3584–3588 (2003).
96. Madsen, J., Johnstone, T., Nolan, E., Chemical Synthesis of Staphyloferrin B Affords Insight into the Molecular Structure, Iron Chelation, and Biological Activity of a Polycarboxylate Siderophore Deployed by the Human Pathogen staphylococcus aureus. *JACS* volume 137 (28), 9117-9127 (2015).
97. Pierre, J. Une santé de fer Pathologies humaines et thérapeutiques chélatrices : *l'actualité chimique* 123–127 (2003).

98. Voulhoux, R., Filloux, A. & Schalk, I. J. Pyoverdine-Mediated Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* : the Tat System Is Required for PvdN but Not for FpvA Transport. *J Bacteriol* **188** (9), 3317–3323 (2006).
99. Harrington, J. M. & Crumbliss, A. L. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. *BioMetals* vol. 22 (4), 679–689 (2009).
100. Charlang, G., Ng, B., Horowitz, N. H. & Horowitz, R. M. Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol Cell Biol* **1** (2), 94–100 (1981).
101. Brandel, J. *et al.* Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Transactions* **41** (9), 2820–2834 (2012).
102. Faraldo-Gómez, J. D. & Sansom, M. S. P. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (2), 105–116 (2003).
103. Fukushima, T., Allred, B. E. & Raymond, K. N. Direct Evidence of Iron Uptake by the Gram-Positive Siderophore-Shuttle Mechanism without Iron Reduction. *ACS Chem Biol* **9** (9), 2092–2100 (2014).
104. Cornelis, P. & Dingemans, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 1–7 (2013).
105. Traxler, M. F., Seyedsayamdost, M. R., Clardy, J. & Kolter, R. Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. *Mol Microbiol* **86**, 628–644 (2012).
106. Miethke, M. & Marahiel, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71** (3), 413–451 (2007).
107. Jones, G., Goswami, S. K., Kang, H., Choi, H. S. & Kim, J. Combating iron overload: A case for deferoxamine-based nanochelators. *Nanomedicine* vol. 15 (13), 1341–1356 (2020).
108. Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V. & Freitas, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* vol. 28 (3), 142–149 (2010).
109. Gerner, R. R., Nuccio, S.-P. & Raffatellu, M. Iron at the host-microbe interface. *Mol Aspects Med* **75**, 100895 (2020).
110. de Carvalho, C. C. C. R. & Fernandes, P. Siderophores as Trojan Horses: tackling multidrug resistance? *Front Microbiol* **5**, 1-3 (2014).
111. Santajit, S. & Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int* **2016**, 1–8 (2016).
112. Rothan-Tondeur, M. Surveillance des infections nosocomiales. *Santé publique France. Résultats 2017* (571) 18–24 (2017).
113. Woods, D. E. & Iglewski, B. H. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: New Perspectives. *Clinical Infectious Diseases* **5**, S715–S722 (1983).
114. *antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022-2020. European center for disease prevention and control. World health organization regional office for Europe.* 1-139 (2022).
115. Barbier, F. & Wolff, M. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *médecine/sciences* **26** (11), 960–968 (2010).
116. Falagas, M. E., Kasiakou, S. K. & Saravolatz, L. D. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* **40** (9), 1333–1341 (2005).

117. Ó Cuív, P., Keogh, D., Clarke, P. & O'Connell, M. FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* Functions in the Utilization of the Xenosiderophores Ferrichrome, Ferrioxamine B, and Schizokinen: Evidence for Transport Redundancy at the Inner Membrane. *J Bacteriol* **189** (1), 284–287 (2007).
118. Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L. A., Shanzer, A. & Schalk, I. J. The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. *J Bacteriol* **192** (5), 1212–1220 (2010).
119. Perraud, Q. *et al.* A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol* **13** (9), 2603–2614 (2018).
120. Boparai, J. K. & Sharma, P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett* **27** (1), 4–16 (2019).
121. Ye, Z. & Aparicio, C. Modulation of supramolecular self-assembly of an antimicrobial designer peptide by single amino acid substitution: implications on peptide activity. *Nanoscale Adv* **1** (12), 4679–4682 (2019).
122. Ramazi, S., Mohammadi, N., Allahverdi, A., Khalili, E. & Abdolmaleki, P. A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. *Database* vol. 2022 1-7 (2022).
123. Koehbach, J. & Craik, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends Pharmacol Sci* **40** (7), 517–528 (2019).
124. Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R. & Sathekge, M. M. Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. *Biomed Res Int* **2014**, 1–15 (2014).
125. Nguyen, L. T., Haney, E. F. & Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* **29**, 464–472 (2011).
126. Schlüsselhuber, M. Les peptides antimicrobiens cationiques: Vers un renforcement de l'arsenal thérapeutique anti-infectieux? *Journal des Anti-Infectieux* **15** (3), 111–118 (2013).
127. Hancock, R. E. W. Concerns regarding resistance to self-proteins. *Microbiology (N Y)* **149** (12), 3343–3344 (2003).
128. Bell, G. & Gouyon, P.-H. Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins. *Microbiology (N Y)* **149** (6), 1367–1375 (2003).
129. Chen, C. H. & Lu, T. K. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics* **9** (1), 24 1-7 (2020).
130. Erdem Büyükkiraz, M. & Kesmen, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *J Appl Microbiol* **132** (3), 1573–1596 (2022).
131. Zasloff, M. *Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor (vertebrate peptide antibiotics)*. vol. 84 5449-5453 (1987).
132. Mahlapuu, M., Björn, C. & Ekblom, J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* vol. 40 (7), 978–992 (2020).
133. Swartjes, J. J. T. M. *et al.* Current Developments in Antimicrobial Surface Coatings for Biomedical Applications. *Curr Med Chem* **22** (18), 2116–2129 (2015).
134. Cloutier, M., Mantovani, D. & Rosei, F. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. *Trends in Biotechnology* vol. 33 (11), 637–652 (2015).
135. Qiu, H. *et al.* The Mechanisms and the Applications of Antibacterial Polymers in Surface Modification on Medical Devices. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, (2020).

136. Salwiczek, M. *et al.* Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends Biotechnol* **32** (2), 82–90 (2014).
137. Wei, T., Yu, Q. & Chen, H. Responsive and Synergistic Antibacterial Coatings: Fighting against Bacteria in a Smart and Effective Way. *Advanced Healthcare Materials* vol. 8 (3), 1801381 1-24 (2019).
138. Ong, Z. Y., Gao, S. J. & Yang, Y. Y. Short synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles as broad spectrum antimicrobials with antibiofilm and endotoxin neutralizing capabilities. *Advanced Functional Materials* vol. 23 (29), 3682–3692 (2013).
139. Ramón-García, S. *et al.* Targeting Mycobacterium tuberculosis and Other Microbial Pathogens Using Improved Synthetic Antibacterial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **57** (5), 2295–2303 (2013).
140. Hilpert *et al.* Antimicrobial peptides for treatment of infectious disease. U.S. Patent Application No 9044426B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. (2015).
141. Punia, A. *et al.* Effect of Relative Arrangement of Cationic and Lipophilic Moieties on Hemolytic and Antibacterial Activities of PEGylated Polyacrylates. *Int J Mol Sci* **16** (5), 23867–23880 (2015).
142. Cezard, C., Farvacques, N. & Sonnet, P. Chemistry and Biology of Pyoverdines, Pseudomonas Primary Siderophores. *Curr Med Chem* **22** (2), 165–186 (2014).
143. Abergel, R. J., Warner, J. A., Shuh, D. K. & Raymond, K. N. Enterobactin protonation and iron release: structural characterization of the salicylate coordination shift in ferric enterobactin. *J Am Chem Soc* **128** (27), 8920–8931 (2006).
144. Odingo, J. O. *et al.* 8-Hydroxyquinolines are bactericidal against *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Dev Res* **80** (5), 566–572 (2019).
145. Steinhäuser, S. *et al.* Complex Formation of ICL670 and Related Ligands with Fe III and Fe II. *Eur J Inorg Chem* **2005** (11), 2262–2262 (2005).
146. Hider, R. Recent Developments Centered on Orally Active Iron Chelators. *Thalassemia Reports* **4** (2), 2261 (2014).
147. Huyen Vu, T., Serradji, N., Seydou, M., Brémond, É. & Ha-Duong, N.-T. T. Electronic spectroscopic characterization of the formation of iron(III) metal complexes: The 8-HydroxyQuinoline as ligand case study. *J Inorg Biochem* **203**, 110864 (2020).
148. Brandel, J. *et al.* From molecular to nanostructured iron complexes of amphiphilic chelators based on 8-hydroxyquinoline subunits - Evidence of self-assembled edifices mimicking siderophores from marine bacteria. *Eur J Inorg Chem* (1) 86–92 (2009)
149. Nagy, I. *et al.* Metal complexation of deferasirox derivatives: A solid state and equilibrium study. *Polyhedron* **190**, 114780 (2020).
150. Enyedy, É. A. *et al.* Comparative solution equilibrium studies of anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and hydroxy(thio)pyrone ligands. *J Inorg Biochem* **117**, 189–197 (2012).
151. Li, L. & Xu, B. Synthesis and characterization of 5-substituted 8-hydroxyquinoline derivatives and their metal complexes. *Tetrahedron* **64** (49), 10986–10995 (2008).
152. Peng, R., Wang, F. & Sha, Y. Synthesis of 5-Dialkyl(aryl)aminomethyl-8-hydroxyquinoline Dansylates as Selective Fluorescent Sensors for Fe³⁺. *Molecules* **12** (5), 1191–1201 (2007).
153. Wang, F., Peng, R. & Sha, Y. Selective Dendritic Fluorescent Sensors for Zn(II). *Molecules* **13** (4), 922–930 (2008).

154. Alhassan, M., al Musaimi, O., Collins, J. M., Albericio, F. & de la Torre, B. G. Cleaving protected peptides from 2-chlorotrityl chloride resin. Moving away from dichloromethane. *Green Chemistry* **22** (9), 2840–2845 (2020).
155. Sharma, A., Kumar, A., de la Torre, B. G. & Albericio, F. Liquid-Phase Peptide Synthesis (LPPS): A Third Wave for the Preparation of Peptides. *Chem Rev* **122** (16), 13516–13546 (2022).
156. Bou-Abdallah, F., McNally, J., Liu, X. X. & Melman, A. Oxygen catalyzed mobilization of iron from ferritin by iron chelate ligands. *Chem. Commun.* **47** (2), 731–733 (2011).
157. Sauvageot, E. *et al.* Antipseudomonal activity enhancement of luminescent iridium(III) dipyritydylamine complexes under visible blue light. *Metallomics* **9** (12), 1820–1827 (2017).
158. Boukhalfa, H. & Crumbliss, A. L. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* **15** (4), 325–339 (2002).
159. Egorova, E. A. *et al.* One Peptide for Them All: Gold Nanoparticles of Different Sizes Are Stabilized by a Common Peptide Amphiphile. *ACS Nano* **14** (5), 5874–5886 (2020).
160. Stillger, L. & Müller, D. Peptide-coating combating antimicrobial contaminations: a review of covalent immobilization strategies for industrial applications. *J Mater Sci* **57** (24), 10863–10885 (2022).
161. Decher, G., Eckle, M., Schmitt, J. & Struth, B. Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **3** (1), 32–39 (1998).
162. Saini, M. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World J Clin Cases* **3** (1), 52 (2015).
163. Stucky, S., Koch, N., Heinz, U. & Hegetschweiler, K. 3,5-Bis(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,4-triazole based ligands — protonation and metal complex formation. *Chemical Papers* **62** (4), 388–397 (2008).
164. Meister, D. *et al.* Covalently Functionalized Sawdust for the Remediation of Phosphate from Agricultural Wastewater. *ACS Sustain Chem Eng* **7** (24), 20139–20150 (2019).
165. Klenc, J. *et al.* Synthesis of 4-Substituted 2-(4-Methylpiperazino) pyrimidines and Quinazoline Analogs as Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Ligands. *J Heterocycl Chem* **46**, 1259–1265 (2009).
166. Lundt, B. F., Johansen, N. L., Vølund, A. & Markussen, J. REMOVAL OF t-BUTYL AND t-BUTOXYCARBONYL PROTECTING GROUPS WITH TRIFLUOROACETIC ACID. *Int J Pept Protein Res* **12** (5), 258–268 (2009).
167. WHITE, W. C. C. and P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. The practical approach series (PAS). 216-218 (Oxford University Press, 1999).
168. Concia, A. L. *et al.* Copper Complexes as Bioinspired Models for Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Inorg. Chem.* **56**, 1023–1026 (2017).
169. Castillo, I. *et al.* Cellulose Depolymerisation with LPMO-inspired Cu Complexes. *ChemCatChem*, (2021), **13**,4654.
170. Paksi, Z., *et al.* Solution chemical properties and catecholase-like activity of the copper(II)-Ac-His-His-Gly-OH system, a relevant functional model for copper containing oxidases. *Dalton. Transaction.* (2005), 3187–3194.
171. Dancs, Á. *et al.* Tuning the coordination properties of multi-histidine peptides by using a tripodal scaffold: solution chemical study and catechol oxidase mimicking. *New J. Chem.* **41**, (2017), 808–823.

ANNEXES

5.1 Chromatogramme HPLC analytique chapitre 1

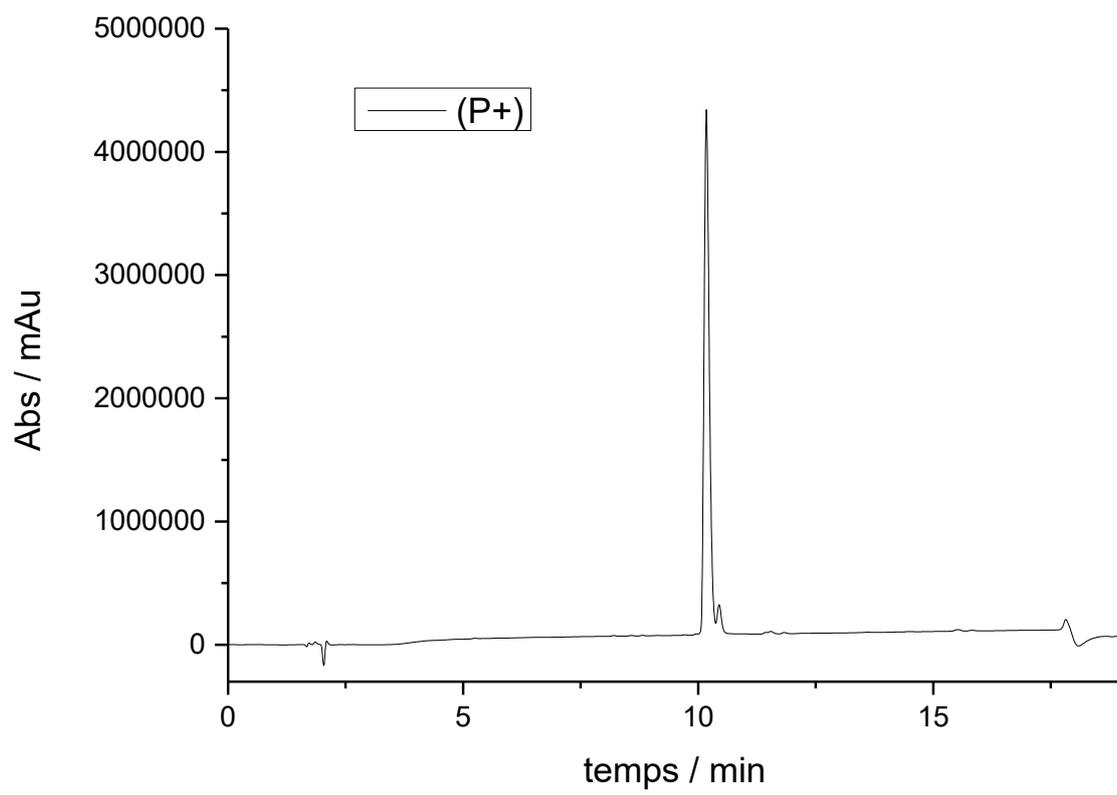


Figure 75 : Chromatogramme du peptide **Ac-KFFAAK-NH₂(P+)**. Conditions d'élution : 0-50 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

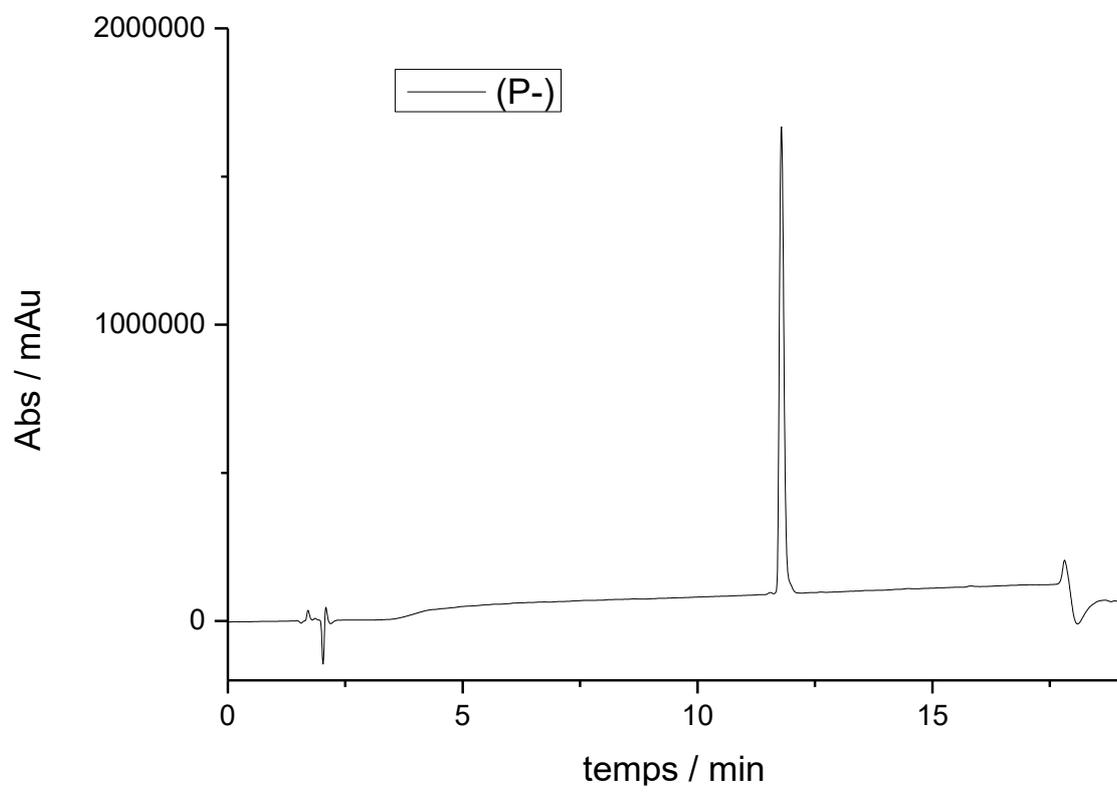


Figure 76 : Chromatogramme du peptide **Ac-EFFAAE-NH₂(P-)**. Conditions d'élution : 0-50 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

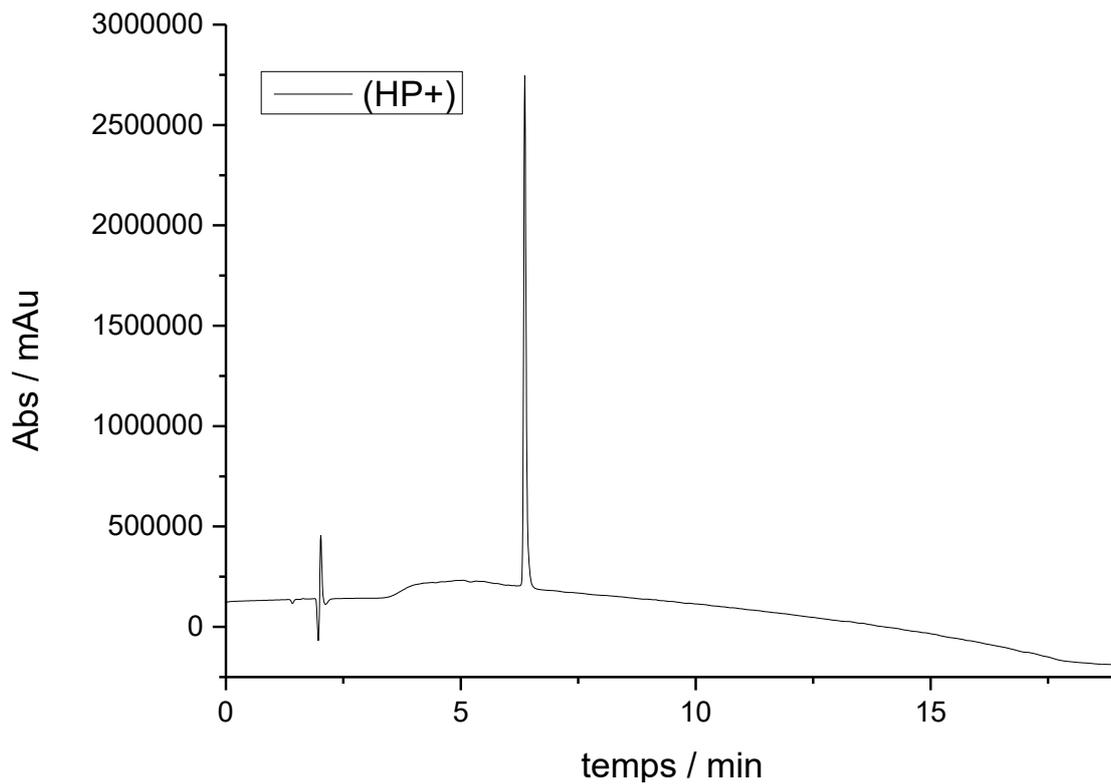


Figure 77 : Chromatogramme du peptide $\text{NH}_2\text{-HKFFAAK-NH}_2$ (HP+). Conditions d'élution : 0-100 % $\text{H}_2\text{O-ACN}$ 15 min ($\text{H}_2\text{O} = 0,1$ % TFA, ACN = 10 % H_2O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

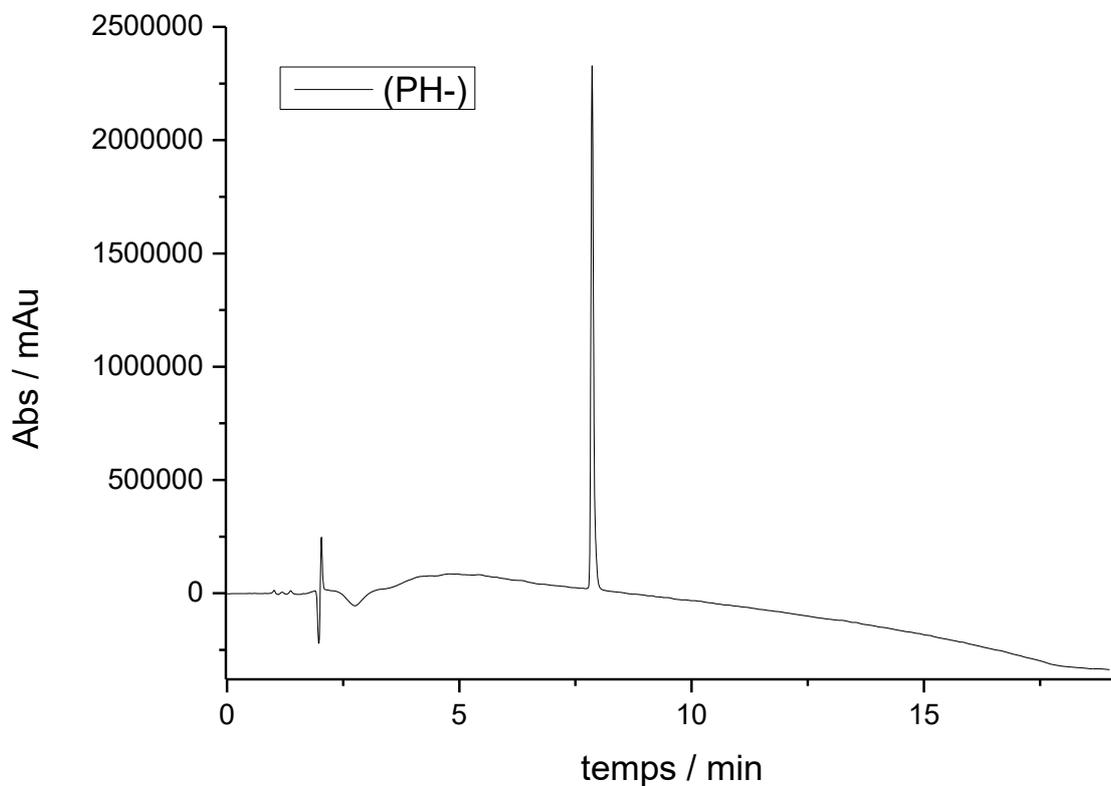


Figure 78 : Chromatogramme du peptide Ac-EFFAAEH-NH_2 (PH-). Conditions d'élution : 0-100 % $\text{H}_2\text{O-ACN}$ 15 min ($\text{H}_2\text{O} = 0,1$ % TFA, ACN = 10 % H_2O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

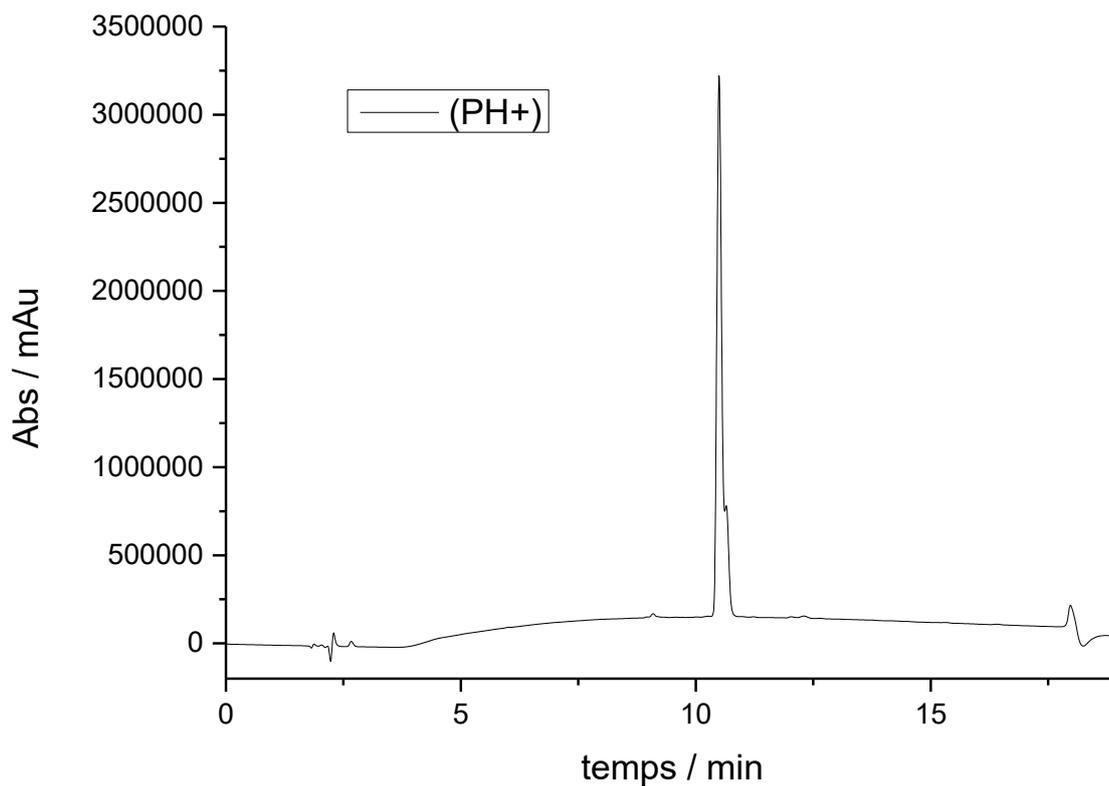


Figure 79 : Chromatogramme du peptide **Ac-KFFAAKH-NH₂ (PH+)**. Conditions d'élution : 0-50 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

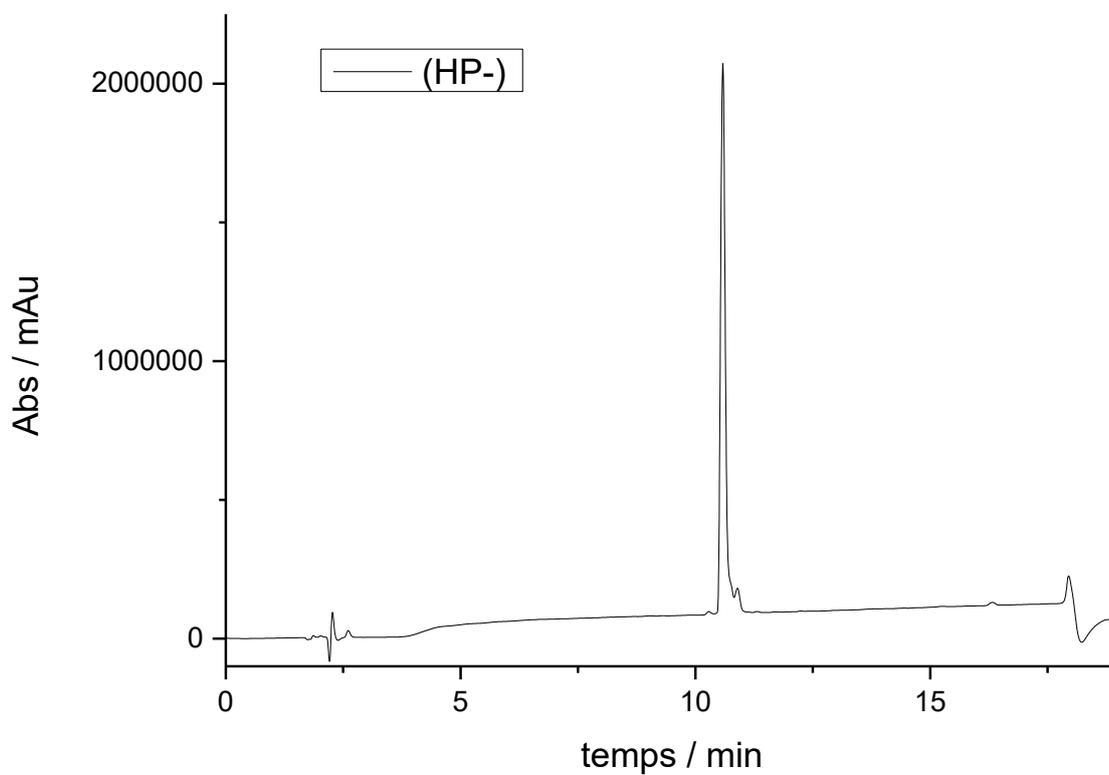


Figure 80 : Chromatogramme du peptide **NH₂-HEFFAAE-NH₂ (HP-)**. Conditions d'élution : 0-50 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

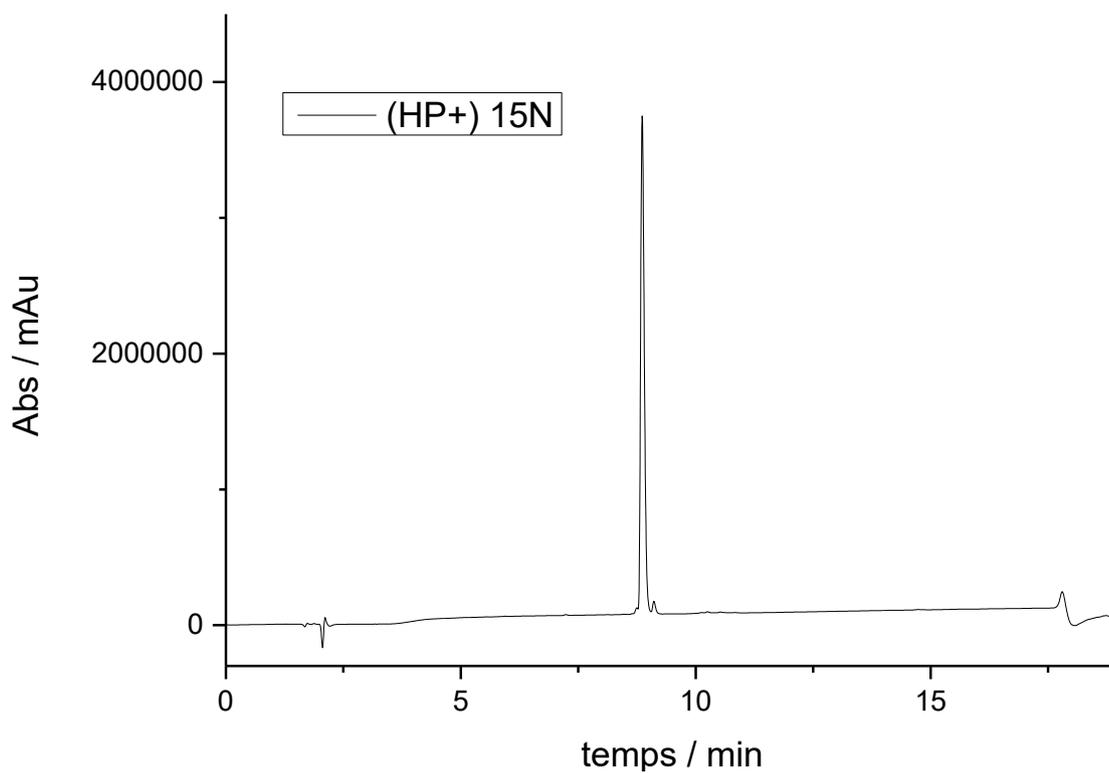


Figure 81 : Chromatogramme du peptide $\text{NH}_2\text{-HKFFAAK-NH}_2$ (HP+)* avec l'histidine marquée à l' ^{15}N . Conditions d'élution : 0-50 % $\text{H}_2\text{O-ACN}$ 15 min ($\text{H}_2\text{O} = 0,1$ % TFA, ACN = 10 % H_2O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

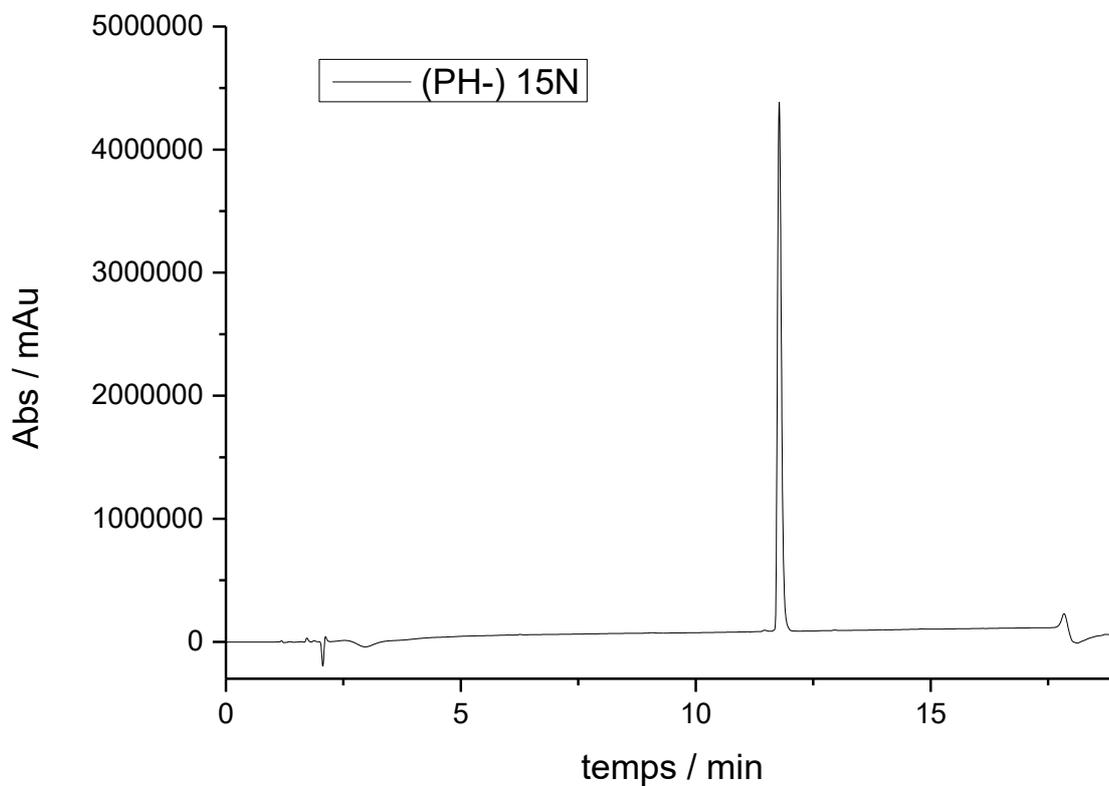


Figure 82 : Chromatogramme du peptide Ac-EFFAAEH-NH_2 (PH-)* avec l'histidine marquée à l' ^{15}N . Conditions d'élution : 0-50 % $\text{H}_2\text{O-ACN}$ 15 min ($\text{H}_2\text{O} = 0,1$ % TFA, ACN = 10 % H_2O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

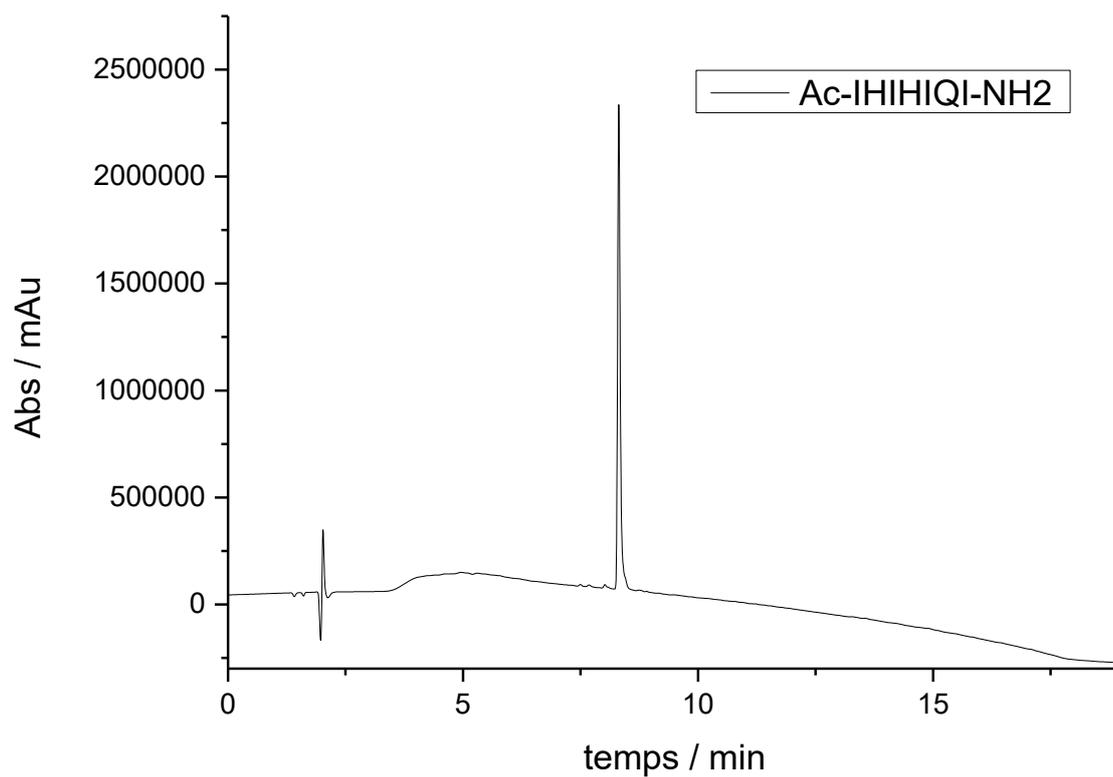


Figure 83 : Chromatogramme du peptide **Ac-IHIHIQI-NH₂**. Conditions d'élution : 0-100 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

5.2 Chromatogramme HPLC analytique Chapitre 2

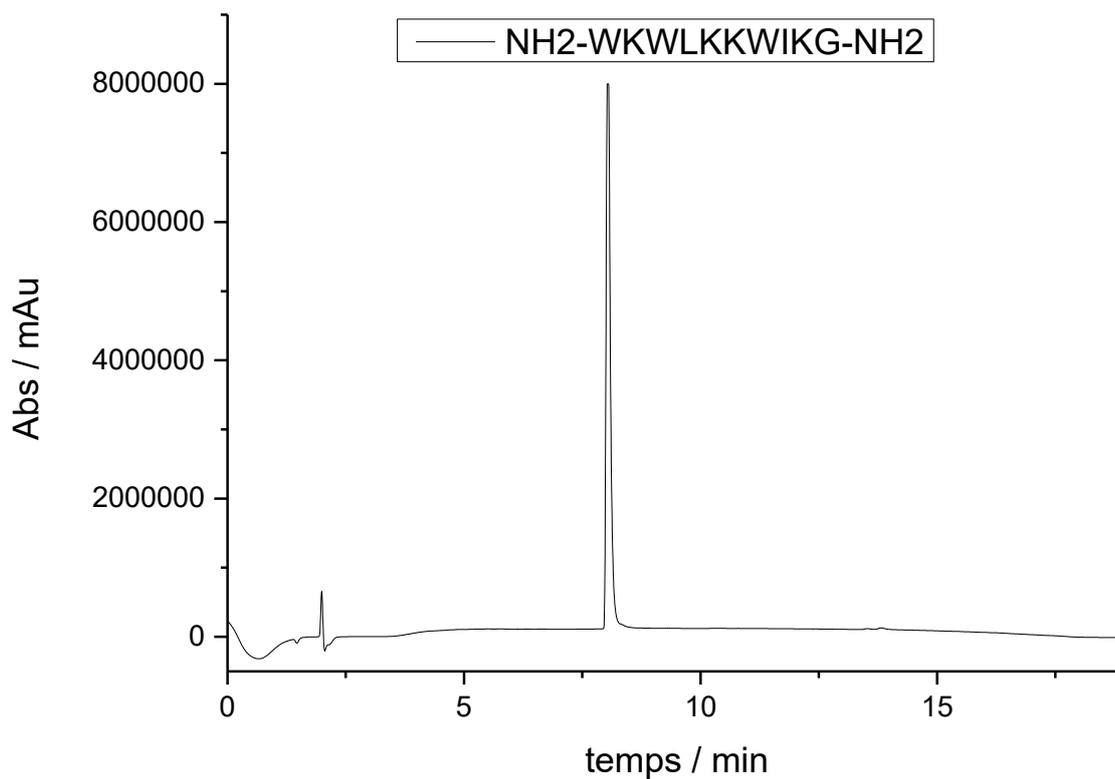


Figure 84 : Chromatogramme du peptide $\text{NH}_2\text{-WKWLKKWIKG-NH}_2$. Conditions d'élution : 0-100 % $\text{H}_2\text{O-ACN}$ 15 min ($\text{H}_2\text{O} = 0,1\%$ TFA, $\text{ACN} = 10\%$ H_2O $0,1\%$ TFA)

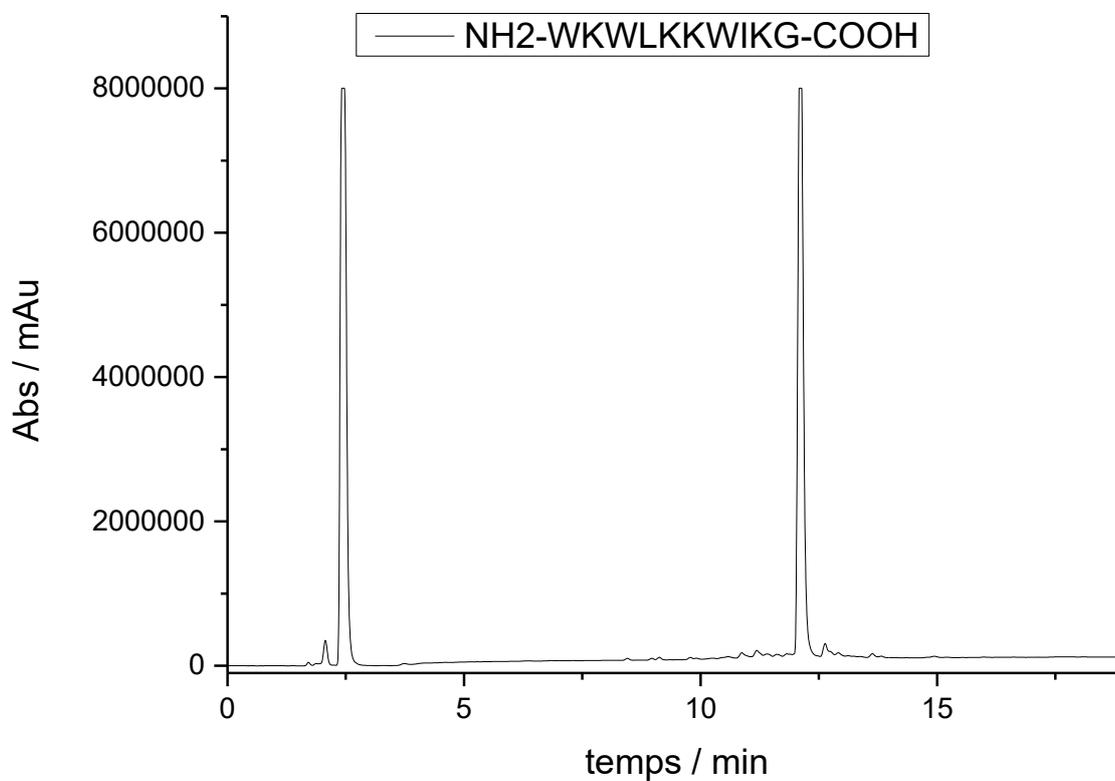


Figure 85 : Chromatogramme du peptide $\text{NH}_2\text{-WKWLKKWIKG-COOH}$. Conditions d'élution : 0-100 % $\text{H}_2\text{O-ACN}$ 30 min ($\text{H}_2\text{O} = 0,1\%$ TFA, $\text{ACN} = 10\%$ H_2O $0,1\%$ TFA, 90% ACN)

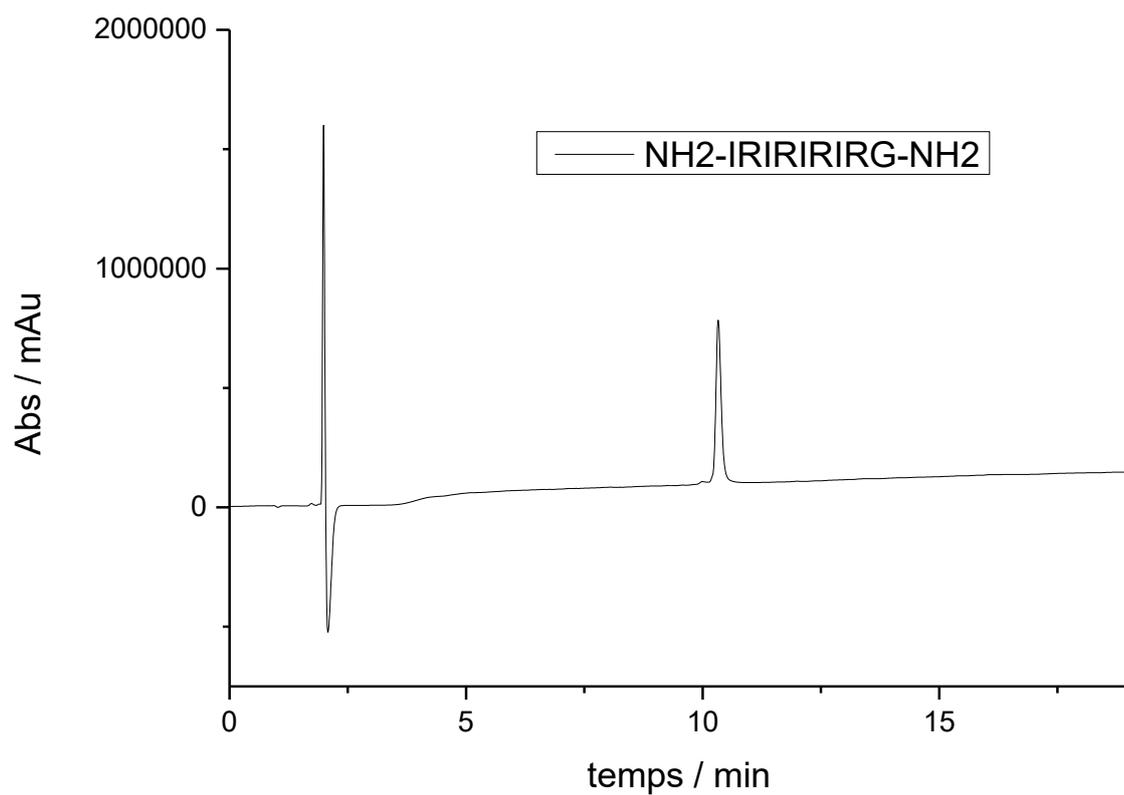


Figure 86 : Chromatogramme du peptide **NH₂-IRIRIRIG-NH₂**. Conditions d'éluion : 0-100 % H₂O-ACN 30 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

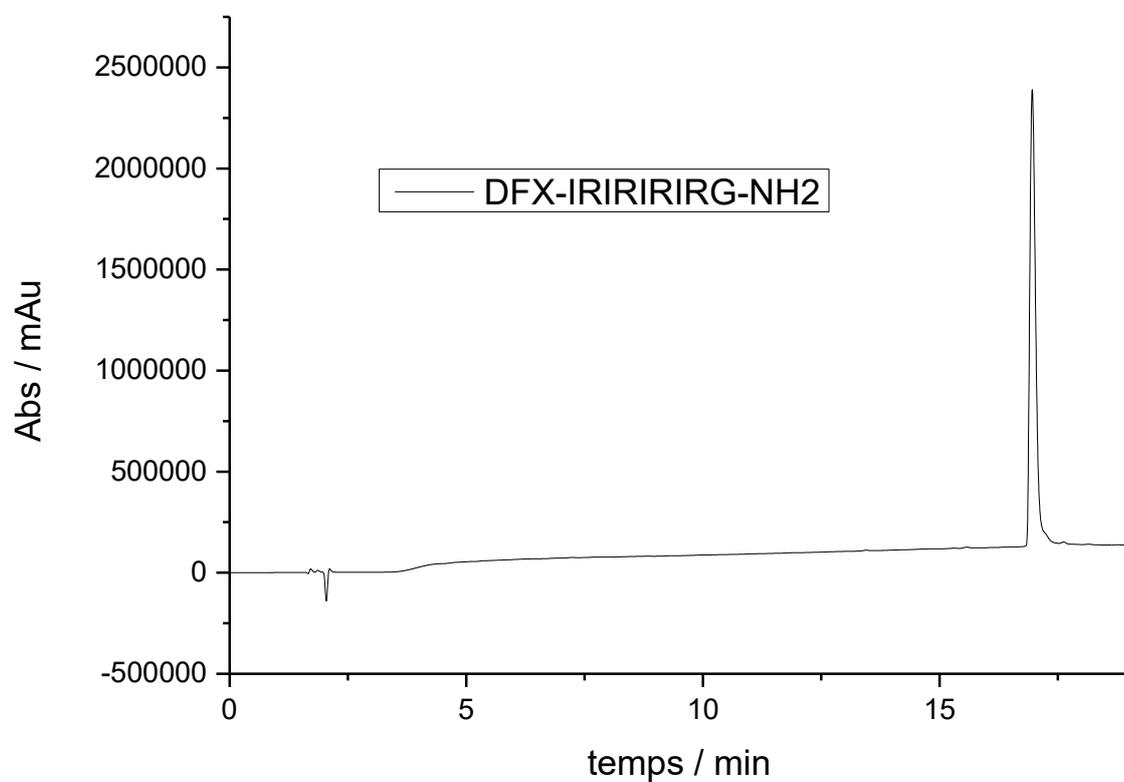


Figure 87 : Chromatogramme du peptide **DFX-IRIRIRIG-NH₂**. Conditions d'éluion : 0-100 % H₂O-ACN 30 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

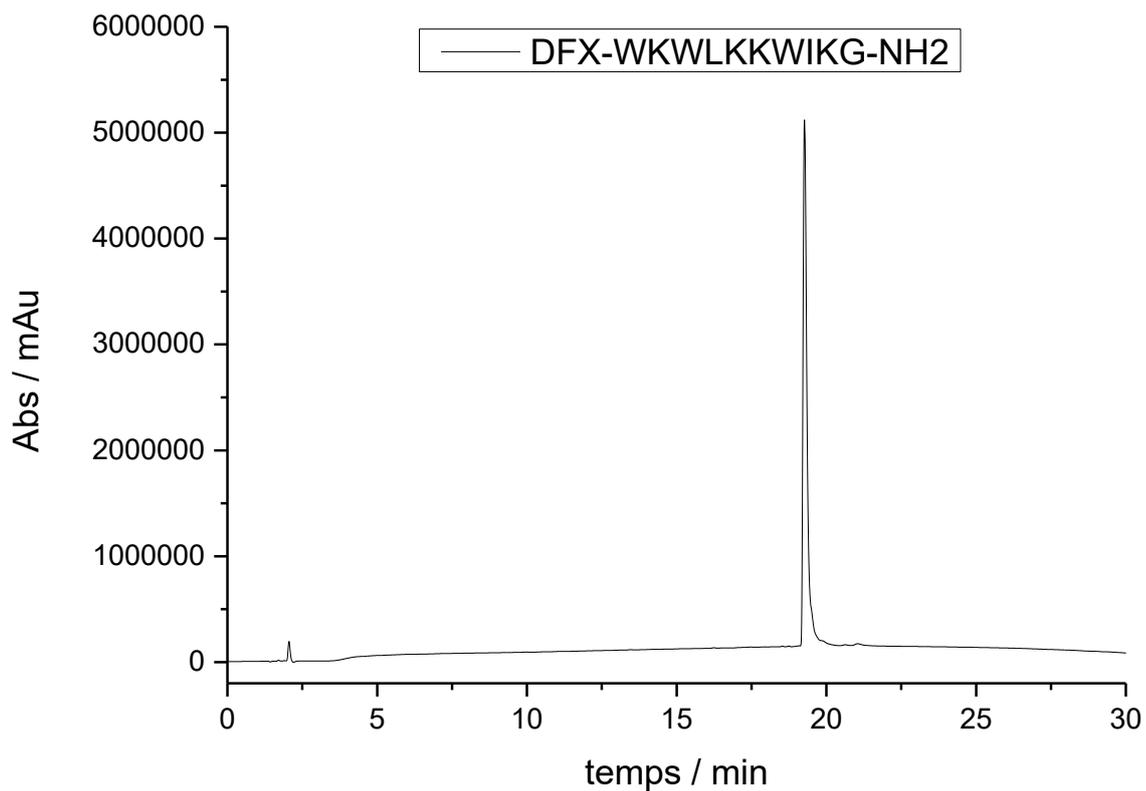


Figure 88 : Chromatogramme du peptide **DFX-WKWLKKWIKG-NH₂**. Conditions d'éluion : 0-100 % H₂O-ACN 30 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

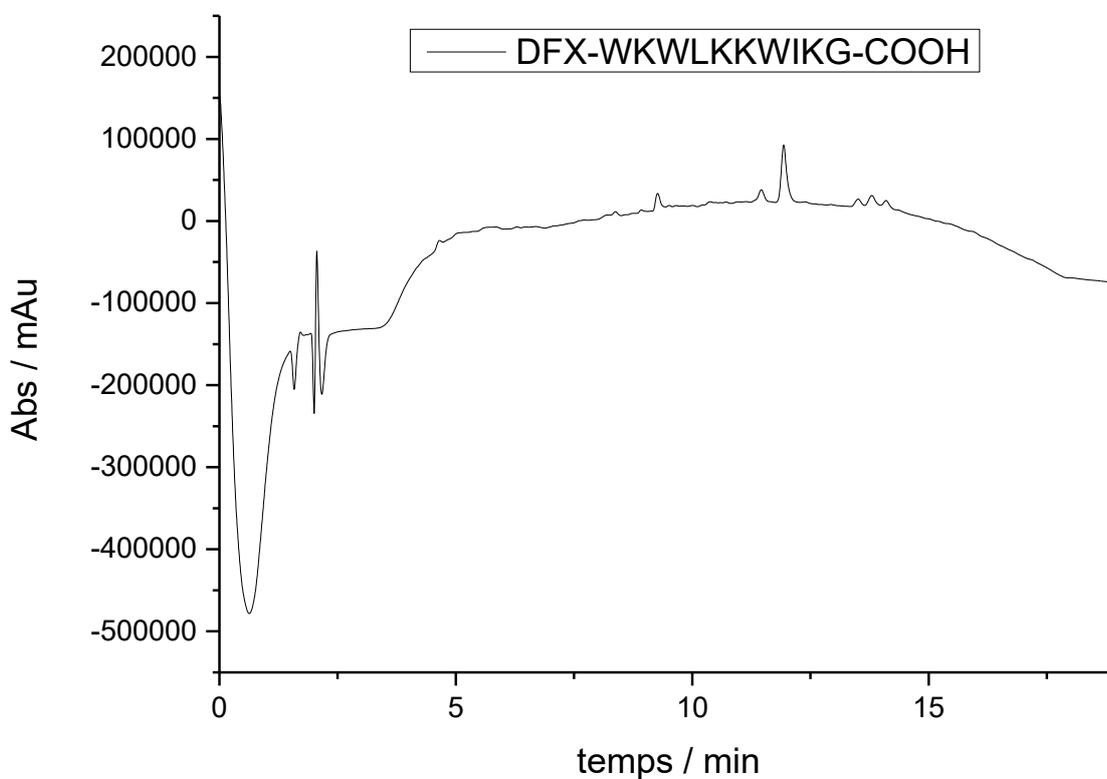


Figure 89 : Chromatogramme du peptide **DFX-WKWLKKWIKG-COOH**. Conditions d'éluion : 0-100 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

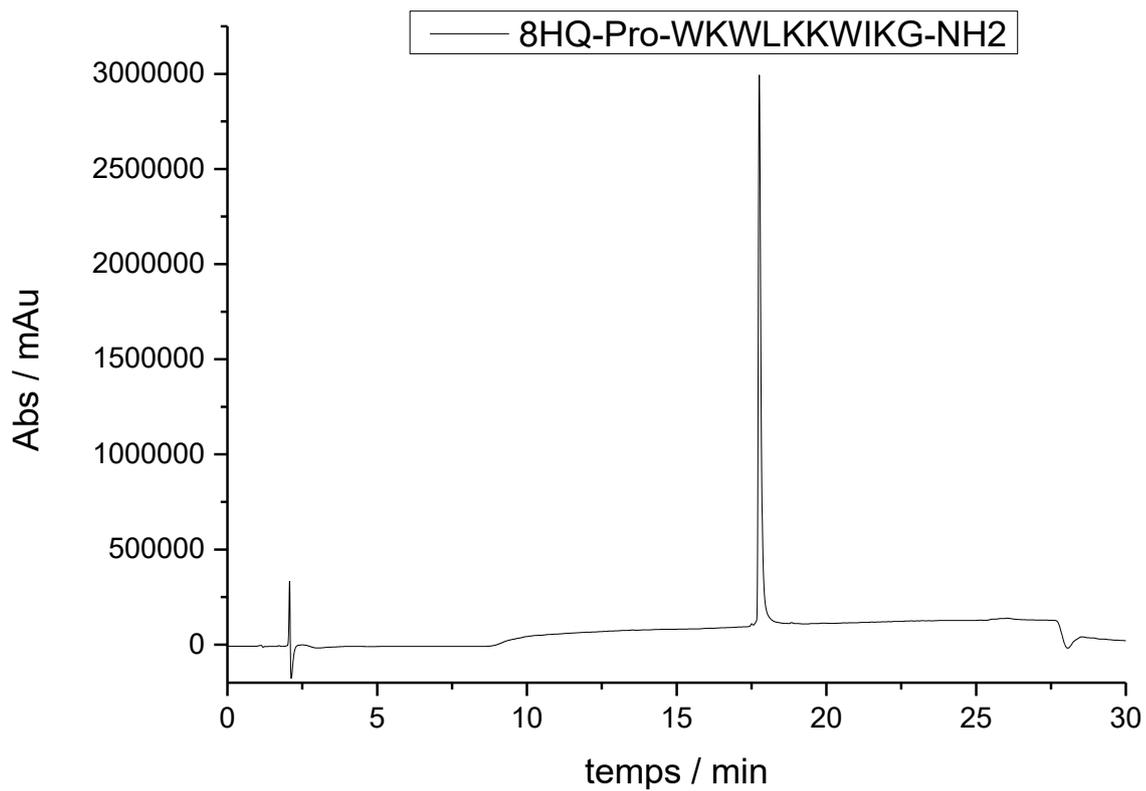


Figure 90 : Chromatogramme du peptide **8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH₂**. Conditions d'éluion : 2-70 % H₂O-ACN 20 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

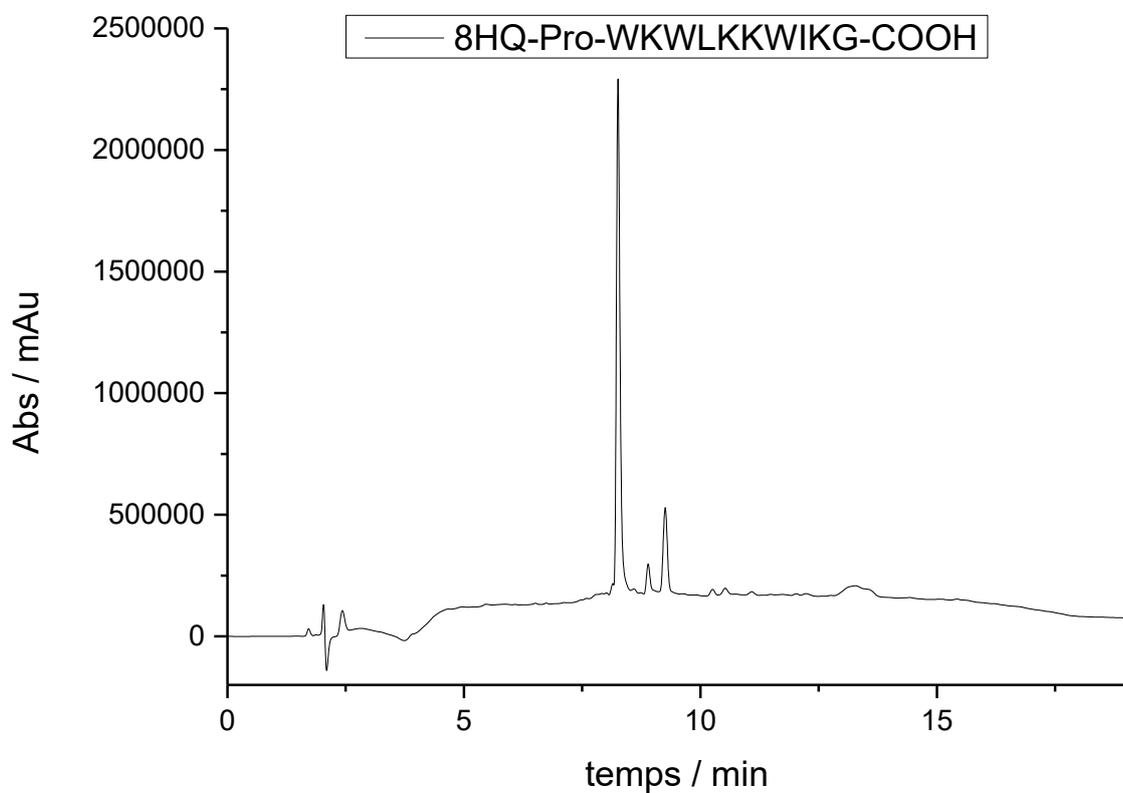


Figure 91 : Chromatogramme du peptide **8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-COOH**. Conditions d'éluion : 0-100 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

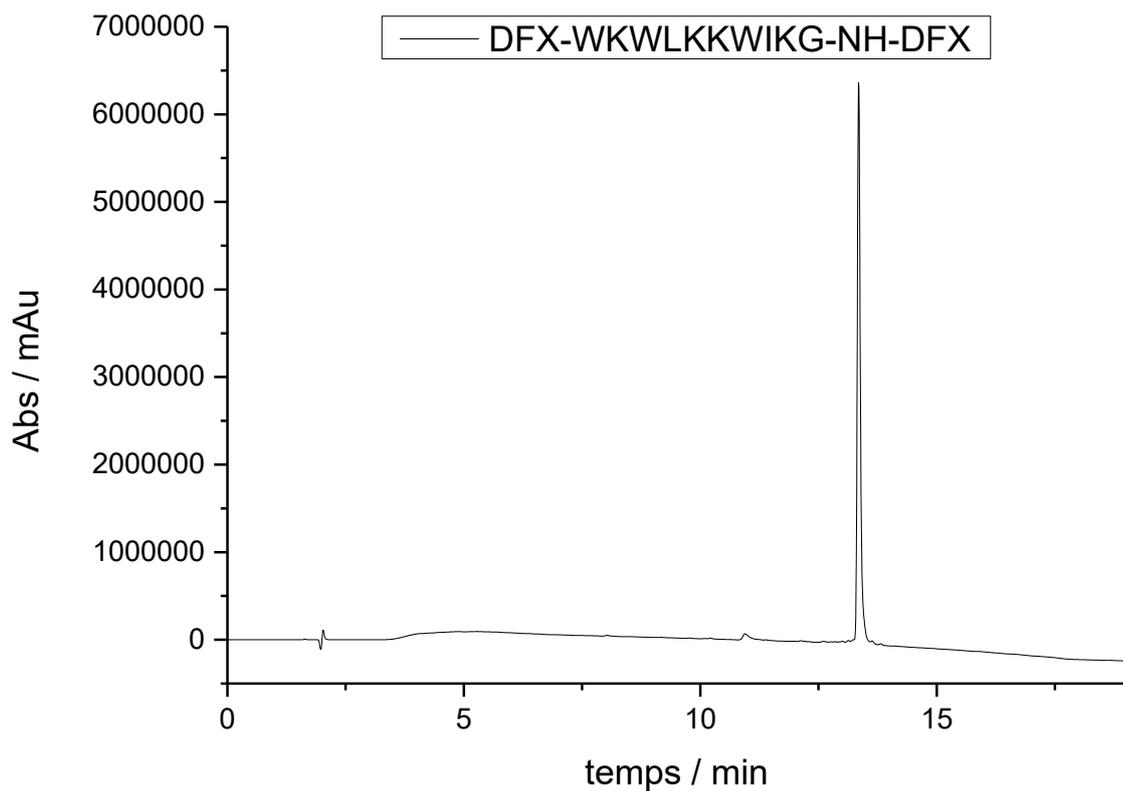


Figure 92 : Chromatogramme du peptide **DFX-WKWLKKWIKG-NH-DFX**. Conditions d'éluion : 0-100 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

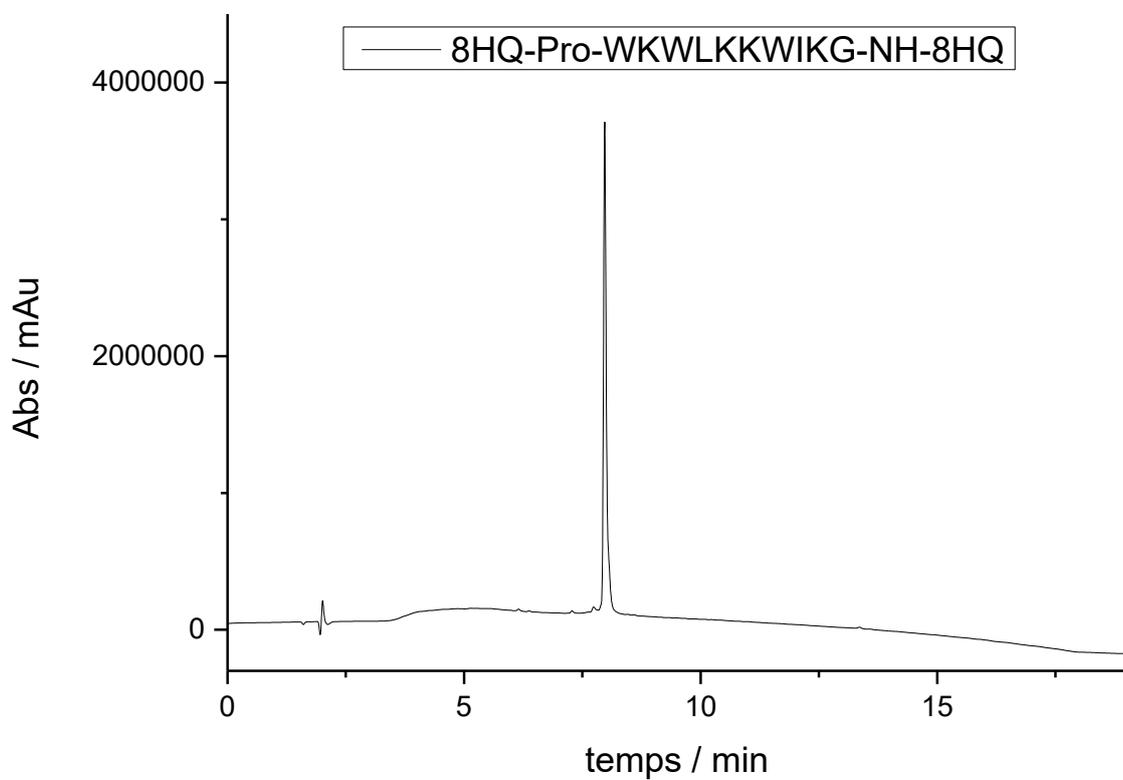


Figure 93 : Chromatogramme du peptide **8HQ-Pro-WKWLKKWIKG-NH-8HQ**. Conditions d'éluion : 0-100 % H₂O-ACN 15 min (H₂O = 0,1 % TFA, ACN = 10 % H₂O 0,1 % TFA, 90 % ACN)

5.3 Spectre RMN du protons (^1H) des différents ligands synthétisés

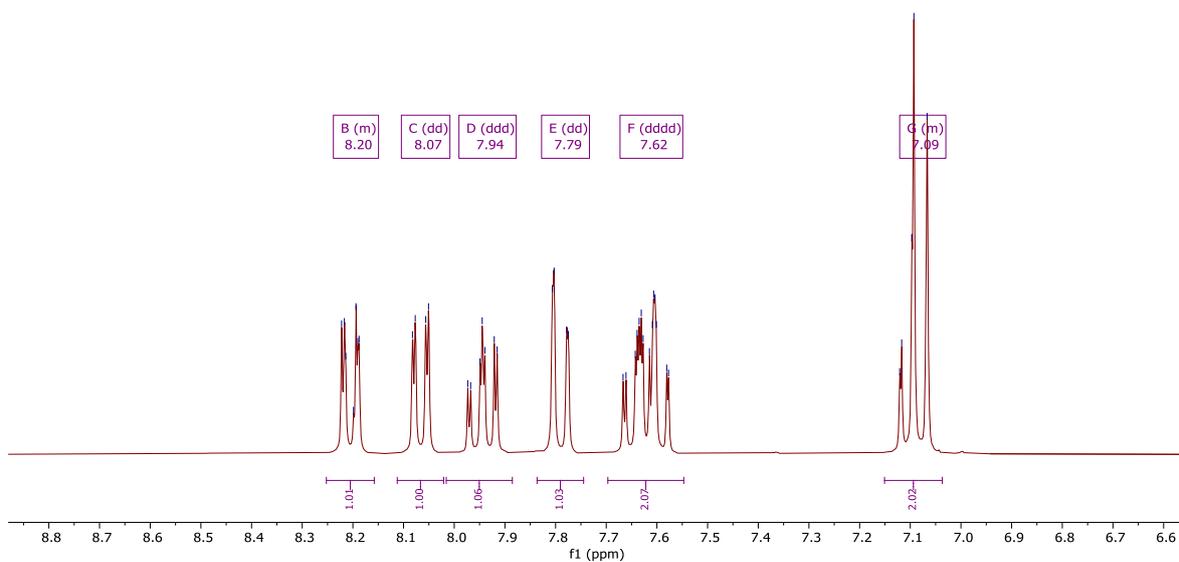


Figure 94 : Spectre RMN ^1H du 2-(2-Hydroxyphenyl)-4-H-1,3-benzoxazin-4-one dans le DMSO-d_6 à 300 MHz

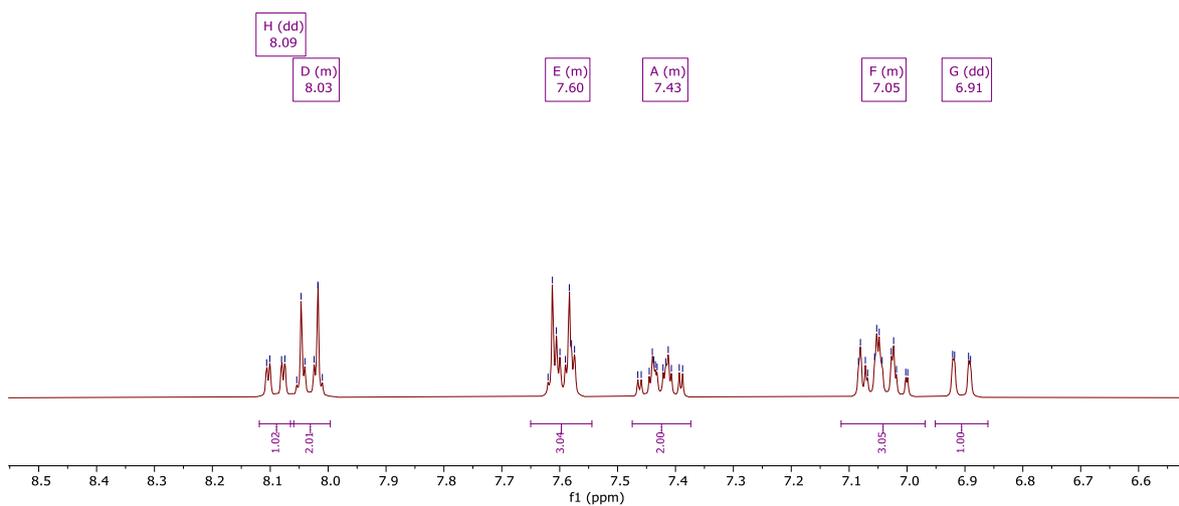


Figure 95 : Spectre RMN ^1H du deferasirox dans le DMSO-d_6 à 300 MHz

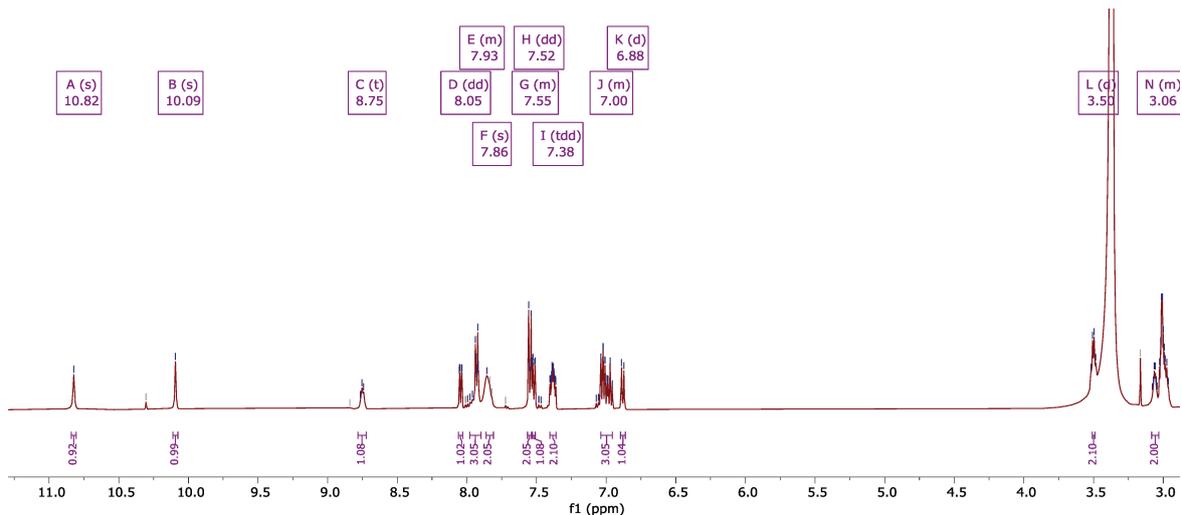


Figure 96 : Spectre RMN ^1H du *N*-(2-aminoethyl)-4-(3,5-bis(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzamide dans le DMSO-d_6 à 300 MHz

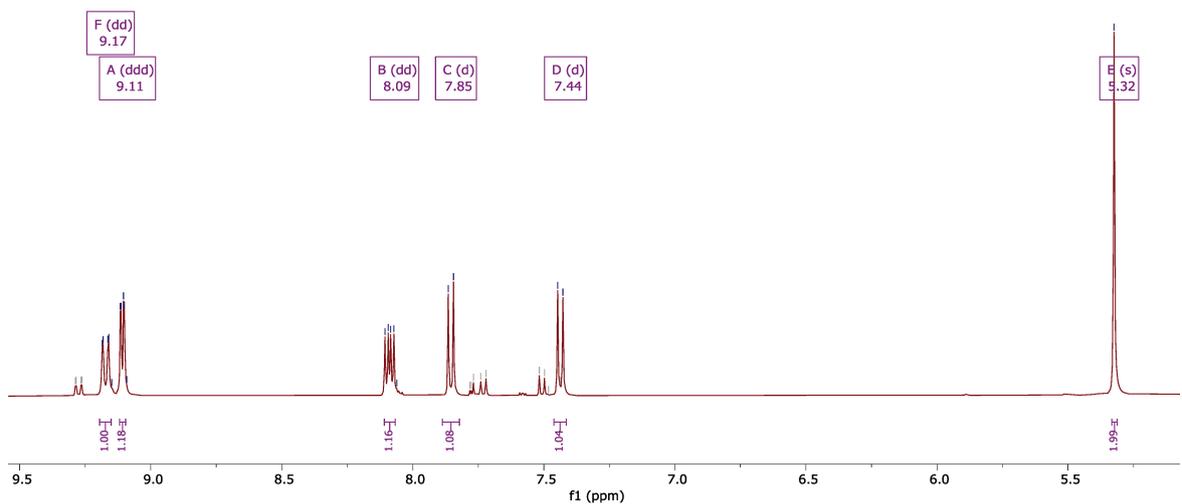


Figure 97 : Spectre RMN ^1H du 5-(chlorométhyl)quinolin-8-ol dans du DMSO-d_6 à 300 MHz

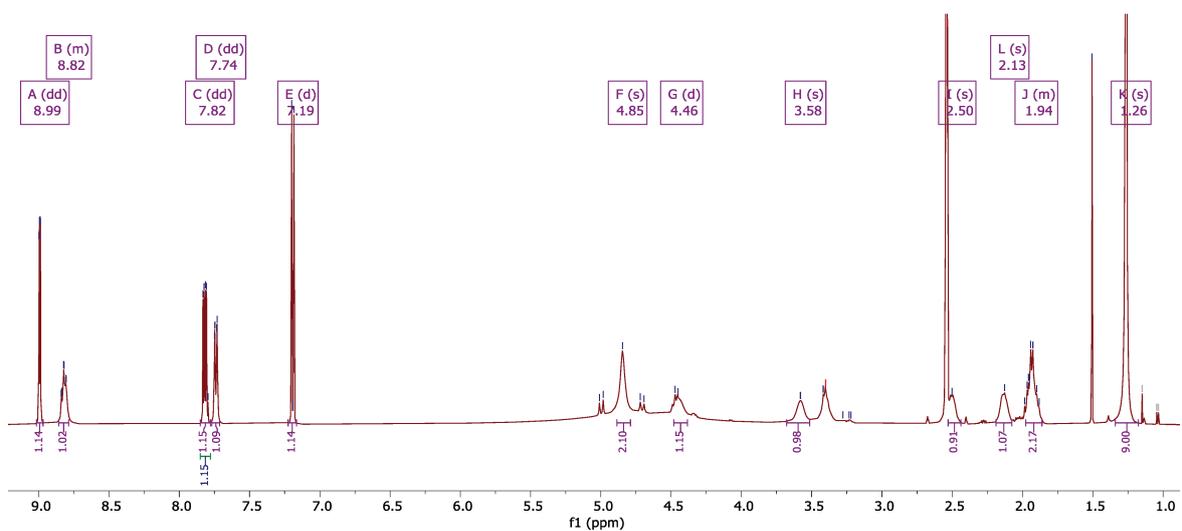


Figure 98 : Spectre RMN ^1H du *tert*-butyl ((8-hydroxyquinolin-5-yl) méthyl)prolinate dans du DMSO-d_6 à 500 MHz

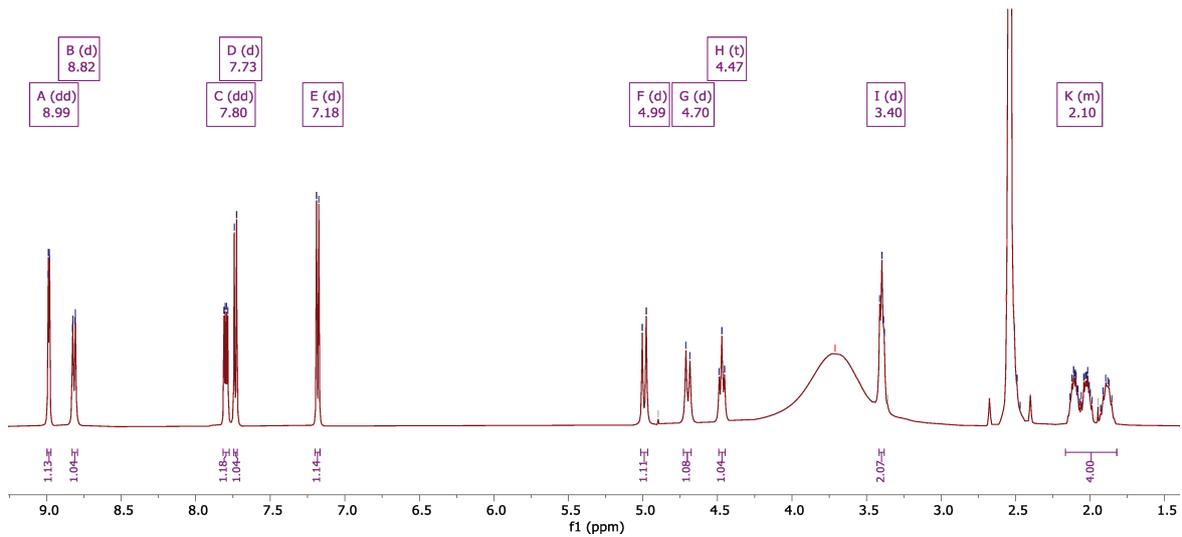


Figure 99 : Spectre RMN ^1H du ((8-hydroxyquinolin-5-yl) methyl) proline dans du DMSO-d_6 à 500 MHz

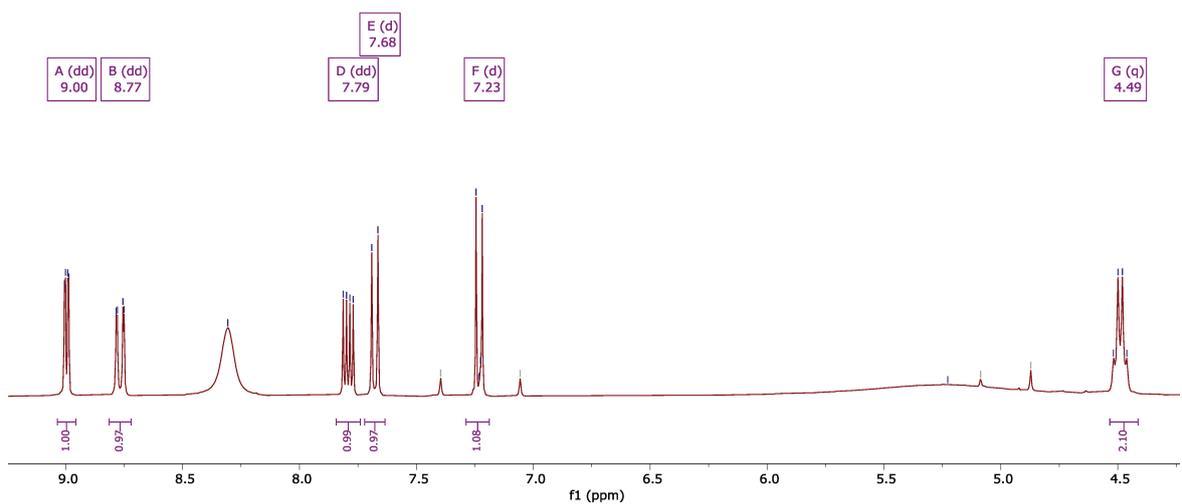


Figure 100 : Spectre RMN ^1H du 5-(aminomethyl) quinolin-8-ol dans du DMSO-d_6 à 300 MHz

5.4 Spectre RMN du carbone (^{13}C) des différents ligands synthésisés

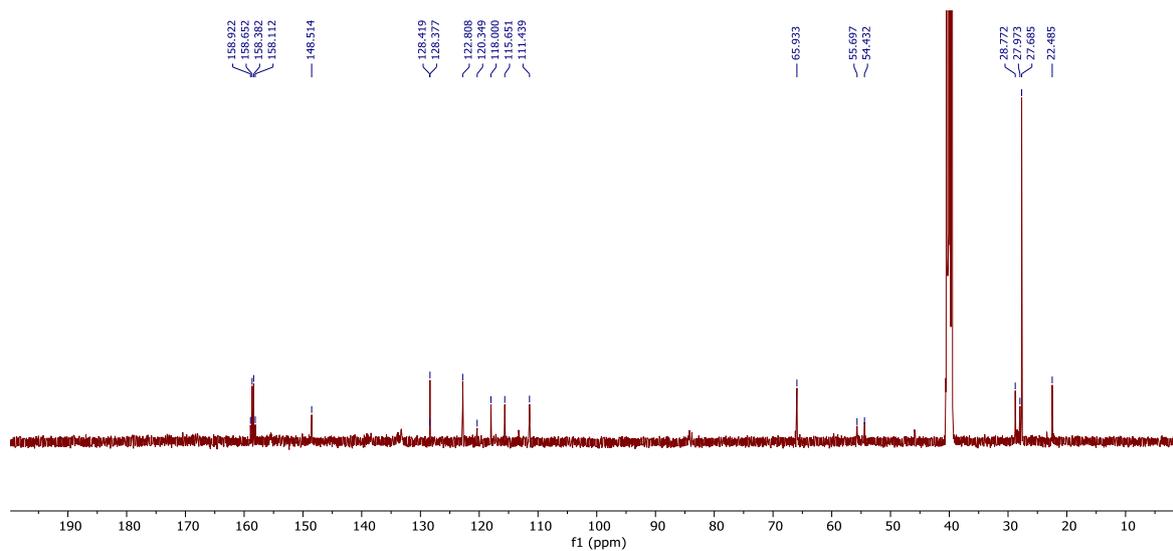


Figure 101 : Spectre RMN ^{13}C du *tert-butyl ((8-hydroxyquinolin-5-yl) methyl)prolinate* dans du DMSO-d_6 à 500 MHz (BB)

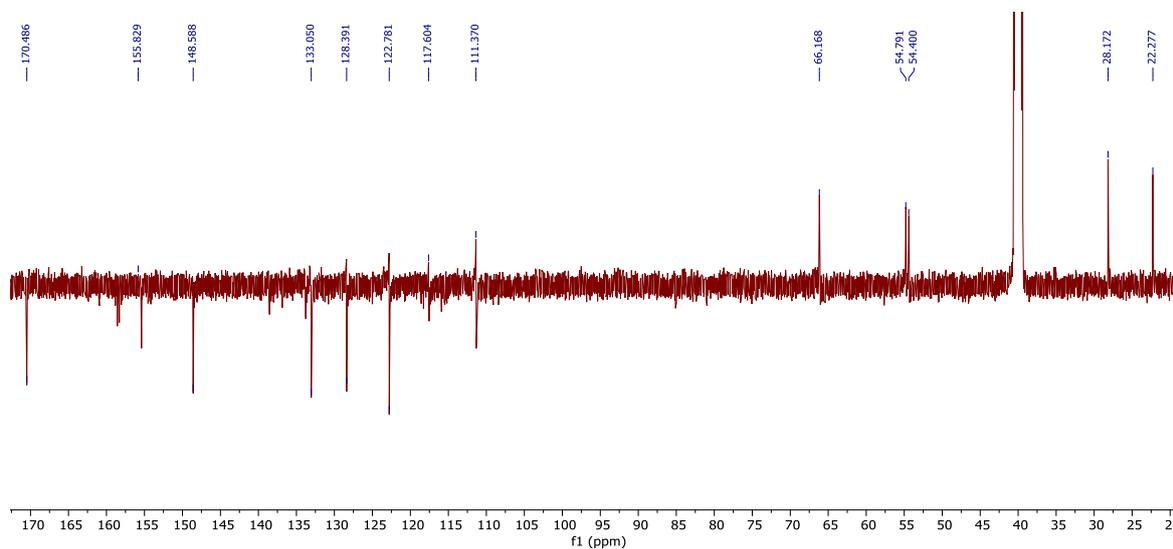


Figure 102 : Spectre RMN ^{13}C du *((8-hydroxyquinolin-5-yl) methyl) proline* dans du DMSO-d_6 à 500 MHz (DEPT)

DÉVELOPPEMENT D'ASSEMBLAGES CONTRÔLÉS À VISÉE CATALYTIQUE ET ANTI-BACTERIENNE

Résumé

Cette thèse est composée de deux projets de développement d'assemblages peptidiques contrôlés, l'un pour la catalyse, l'autre à visée antibactérienne.

Le premier projet traite du développement d'un hétéroassemblage de peptides courts avec des ions Cu^{II} pour la formation contrôlée de mimes de métalloenzymes (ici LPMO). Deux séquences complémentaires ont été utilisées comme support et ils ont été fonctionnalisés afin de former le site de coordination après l'autoassemblage des peptides. Cet objet a été caractérisé par différentes techniques telles que la RPE, l'IR et la MET.

Le second projet est le développement d'assemblages peptidiques maintenus par du Fe^{III} ou du Ga^{III} . Cet assemblage est composé d'un peptide antimicrobien, fonctionnalisé avec des ligands affins pour le Fe^{III} (ou le Ga^{III}) afin de relier tous les peptides entre eux et produire un polymère de coordination. Cette structure a été caractérisée par spectrophotométrie et des tests de MIC_{100} .

LPMO, métalloenzymes, Histidine brace, conception minimaliste de protéines, peptides, autoassemblage, cuivre.

Peptide antimicrobien, relargage contrôlé, sidérophore, fer, gallium, *Pseudomonas aeruginosa*.

Summary in English

This thesis is composed of two projects for the development of controlled peptide assemblies, one for catalysis, the other for antibacterial purposes.

The first project deals with the development of a heteroassembly of short peptides with Cu^{II} ions for the controlled formation of metalloenzyme mimes (here LPMO). Two complementary sequences were used as support and they were functionalized to form the coordination site after the self-assembly of the peptides. This object was characterized by different techniques such as EPR, IR and TEM.

The second project is the development of peptide assemblies held together by Fe^{III} or Ga^{III} . This assembly is composed of an antimicrobial peptide, functionalized with Fe^{III} (or Ga^{III}) affine ligands to link all the peptides together and produce a coordination polymer. This structure was characterized by spectrophotometry and MIC_{100} tests.

LPMO, metalloenzymes, Histidine brace, minimalist protein design, peptides, self-assembly, copper.

Antimicrobial peptides, controlled release, siderophore, iron, gallium, *Pseudomonas aeruginosa*.