

Les méthodes pour la chimie bioinorganique

Résumé La chimie bioinorganique est, par essence, un domaine interdisciplinaire couvrant des sujets de recherche allant du rôle des ions métalliques dans le vivant à la conception et à l'étude de catalyseurs bioinspirés, candidats médicaments et agents d'imagerie. Par conséquent, elle repose sur une combinaison de diverses méthodes spectroscopiques, analytiques et d'imagerie. Ces méthodes dépendent de la nature de l'ion métallique, par exemple para- ou diamagnétique, de la nature des interactions entre l'ion métallique et son environnement, et des informations (structurales, thermodynamiques, etc.) recherchées. Certaines d'entre elles sont utilisées en routine (spectroscopies UV-visible, fluorescence, résonance paramagnétique électronique RPE, infrarouge IR...), tandis que d'autres sont des méthodes avancées que l'on ne trouve que dans quelques laboratoires du réseau FrenchBIC, ou même quelques laboratoires dans le monde entier. Dans cette dernière partie du dossier spécial consacré à la chimie bioinorganique, quelques exemples-clés sont brièvement décrits pour illustrer la richesse des outils de caractérisation utilisés.

Mots-clés Spectroscopie, chimie analytique, imagerie, site de coordination, affinité.

Abstract Tools for bioinorganic chemistry

Bioinorganic chemistry is by essence an interdisciplinary field covering research topics spanning from the role of metallic ion in the living world to the design and studies of bio-inspired catalysts, drug candidates and imaging agents. Consequently, it relies on a combination of various spectroscopic, analytical and imaging methods. These methods depend on the nature of the metal ion, for instance leading to paramagnetic versus diamagnetic systems and/or on the nature of the interactions at play between the metallic ion and its environment, and of the insights (structures, thermodynamic parameters...) that are searched for. Some of them are routine (UV-Vis, fluorescence, EPR, IR...) while other are advanced methods that are found only in a couple of labs within the FrenchBIC network or even world-wide. In this article, some key examples are briefly described to illustrate the wealth of characterizing tools used in bioinorganic chemistry.

Keywords Spectroscopy, analytical chemistry, imaging, coordination site, affinity.

La chimie bioinorganique est, par nature, une discipline d'interface qui s'intéresse aux rôles des métaux dans le vivant. Elle couvre des sujets vastes, allant de l'étude des métalloenzymes et complexes bioinspirés (partie **Catalyse**), à la conception de complexes inorganiques candidats médicaments et/ou agents d'imagerie (partie **Santé**), ou encore à la description des métaux endogènes en milieu biologique (**Environnement** et **Catalyse**). En conséquence, elle requiert une palette d'outils spectroscopiques et analytiques qui sont souvent utilisés en combinaison. Ces techniques peuvent être spécifiques d'un ion métallique ; c'est le cas de la spectroscopie Mössbauer qui permet de caractériser les systèmes contenant du fer (voir la fiche M1, p. 55). Plus généralement, elles s'appliquent à une large gamme d'ions, mais, dans ce cas, les signatures obtenues sont souvent caractéristiques d'un ion donné. Des exemples classiques sont les spectroscopies de résonance paramagnétique électronique (M1, p. 55 et M2, p. 56) et d'absorption et de fluorescence des rayons X (M3, p. 56), de luminescence (pour les Ln) (M4, p. 57) et l'électrochimie (M5, p. 58). Enfin, des méthodes s'intéressent à la modification de la signature par le centre métallique de son environnement, c'est le cas des spectroscopies RMN (M6, p. 59) et IR.

Les interactions importantes en chimie bioinorganique concernent l'ion métallique et son « hôte » : chaînes peptidiques dans le cas des métalloenzymes, ou ligands dans celui des complexes inorganiques. S'y ajoutent des interactions avec les substrats ou les cibles thérapeutiques. Différents paramètres sont recherchés pour caractériser ces interactions : nombre et nature chimique des atomes liant le centre métallique (site de coordination), ainsi que les constantes

thermodynamiques et cinétiques. La méthode la plus puissante pour la détermination du site de coordination est la diffraction des rayons X, qui permet d'avoir une structure cristallographique à partir de cristaux. Une des avancées récentes dans ce domaine est la cristallographie femto-seconde qui permet de limiter les dommages causés aux cristaux par les rayons incidents (M7, p. 59). Pour des complexes difficiles à cristalliser et également pour caractériser des espèces en solution qui peuvent différer des espèces cristallisées, une combinaison de méthodes complémentaires est utilisée. Parmi les plus classiques et accessibles au laboratoire, on trouve les spectroscopies UV-visible, de dichroïsme circulaire (les biomolécules étant des entités chirales), vibrationnelles telles que l'infra-rouge, de RPE dans le cas d'espèces paramagnétiques (Cu(II), Fe(III), Mn(II), ...), de fluorescence, de résonance magnétique nucléaire (RMN) et l'électrochimie. D'autres méthodes plus avancées ne se retrouvent que dans certains laboratoires. On peut citer les spectroscopies de dichroïsme circulaire magnétique, de RPE à impulsions, à champs intenses et ENDOR, de Raman, de RMN du solide et d'absorption X et de fluorescence X, cette dernière nécessitant l'accès à un synchrotron pour des résolutions adaptées à l'imagerie subcellulaire.

L'obtention des paramètres thermodynamiques décrivant les équilibres en jeu (ligand, ion métallique, substrat/cible thérapeutique) peut se faire à l'aide de différentes méthodes : titration ou compétition suivie par une spectroscopie *ad hoc*, calorimétrie, potentiométrie, résonance plasmonique de surface, thermophorèse... Pour la détermination des paramètres cinétiques, plusieurs stratégies peuvent être développées

selon l'échelle de temps mise en jeu. Pour des temps longs (supérieurs à la seconde), les spectroscopies citées précédemment sont applicables ; à des temps plus courts (de l'ordre de la milliseconde), des techniques à flux bloqué (*stopped-flow*) ou de congélation rapide (*freeze-quench*) sont utilisées. Par électrochimie et RMN, il est possible d'avoir accès à de larges échelles, les temps les plus courts accessibles étant de l'ordre de la micro- à la milliseconde (M5, p. 58 et M6, p. 59). Dans le cas particulier de réactions impliquant des transferts électroniques, il est possible de coupler des électrolyses à différentes méthodes d'analyse, par spectro-électrochimie UV-Vis, IR, RPE, d'absorption X. Enfin, la modélisation en dynamique moléculaire apporte aussi un éclairage important pour comprendre des processus souvent complexes (M6, p. 59).

L'étude des ions métalliques ou de complexes inorganiques en milieux biologiques (cellules, tissus, organismes vivants) requiert également de faire appel à des méthodes spécifiques pour obtenir des informations sur leur activité biologique ou sur leur localisation. Pour cela, de nouvelles méthodes émergentes se concentrent sur la cartographie tissulaire, cellulaire et subcellulaire des différentes entités inorganiques importantes pour le vivant (M3, p. 56 et M8, p. 60).

Les informations concernant la spéciation des complexes inorganiques et leur devenir dans les milieux biologiques peuvent quant à elles être obtenues par spectrométrie de masse, qui se décline sous plusieurs formes, dont la mobilité ionique (M8, p. 60).

Appliqués à différents stades des cycles catalytiques, ces outils permettent ainsi de déterminer les mécanismes mis en jeu lors des réactions et donc de comprendre comment fonctionnent les métalloenzymes d'intérêt et les complexes bioinspirés. De même, la détermination des modes d'actions des composés inorganiques ou des ligands en chimie médicinale repose sur l'utilisation combinée de plusieurs de ces méthodes. Certaines de ces applications sont illustrées dans cette partie du dossier spécial de ce mois-ci.

La partie Méthodologies est coordonnée par **Christelle HUREAU***, directrice de recherche, Laboratoire de Chimie de coordination, ALAMBIC (Alzheimer, amyloïdes et chimie bioinorganique), Laboratoire de Chimie de coordination, CNRS, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse.

*christelle.hureau@lcc-toulouse.fr

M1 Apport de l'utilisation conjointe de spectroscopies magnétiques

La caractérisation des cofacteurs de protéines à base de métaux de transition nécessite l'utilisation conjointe de plusieurs spectroscopies, les plus fréquemment utilisées étant l'absorption UV-visible et la résonance paramagnétique électronique (RPE). Les protéines contenant du fer peuvent, de plus, être étudiées par spectroscopie Mössbauer qui permet de sonder sélectivement les noyaux ^{57}Fe . L'étude des centres Fer-Soufre (Fe-S), cofacteurs essentiels dans de nombreux processus biologiques, en est une parfaite illustration (*figure 1*) [1].

Nous avons récemment appliqué cette stratégie à l'étude de GciS (pour Glycine/cystéine iron-sulfur), une petite protéine virale très riche en glycine et cystéine, exprimée tardivement et en abondance au cours de l'infection de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* par le virus géant mimivirus [2]. La protéine purifiée, d'une couleur rouge-brun typique de centres Fe-S, présente une signature UV-visible en apparence classique tandis que la RPE suggère la présence de centres [3Fe-4S] avec une géométrie linéaire très rare. Ceci est confirmé par spectroscopie Mössbauer, qui révèle aussi la présence de centres [2Fe-2S] diamagnétiques. Si la fonction de GciS est encore inconnue, cette composition atypique en centres Fe-S est partagée par toutes les protéines équivalentes à GciS, issues de membres éloignés dans la famille des *Mimiviridae*. Depuis leur découverte au début des années 2000, les virus géants n'ont cessé d'étonner en repoussant nos connaissances en virologie [3] avec, à la clef, de possibles découvertes en chimie bioinorganique !

[1] M. Fontecave, Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles, *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, 2(4), p. 171-174.

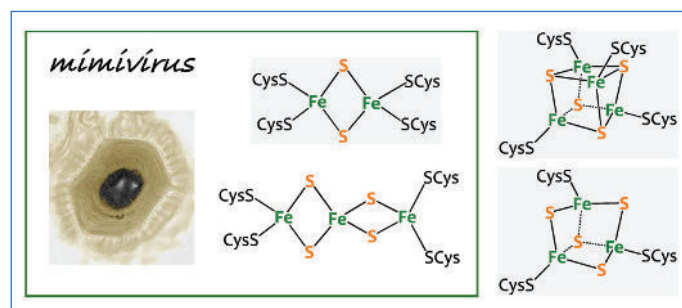


Figure 1 - Encadré vert (à gauche) : Types de centres Fe-S identifiés au sein de la protéine GciS issue de mimivirus ([2Fe-2S] et [3Fe-4S] linéaire). Sur fond gris : Les architectures de type [4Fe-4S] cubane, [3Fe-4S] cubane (à droite) et [2Fe-2S] sont les structures les plus courantes.

[2] A. Villalta *et al.*, Evidence for [2Fe-2S]²⁺ and linear [3Fe-4S]¹⁺ clusters in a unique family of glycine/cysteine-rich Fe-S proteins from *Megavirinae* giant viruses, *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(5), p. 2733-38.

[3] J.-M. Claverie, C. Abergel, Giant viruses: The difficult breaking of multiple epistemological barriers, *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.*, **2016**, 59, p. 89-99.

Geneviève BLONDIN¹, directrice de recherche, **Bénédicte BURLAT²**, maître de conférences, et **Chantal ABERGEL³**, directrice de recherche.

¹Laboratoire Chimie et biologie des métaux, UMR 5249, CNRS, CEA, Université Grenoble Alpes, Grenoble.

²Laboratoire Bioénergétique et ingénierie des Protéines, UMR 7281, CNRS, Aix-Marseille Université, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille.

³Laboratoire Information génomique et structurale, UMR 7256, CNRS, Aix-Marseille Université, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille.

M2 Analyser la diversité et les mécanismes des enzymes à molybdène et à tungstène par RPE

Les enzymes mononucléaires à molybdène (Mo) et tungstène (W) sont présentes chez la quasi-totalité des organismes vivants. Chez les procaryotes, elles utilisent une large gamme de substrats, catalysent des réactions de transfert d'atomes d'oxygène, de soufre ou d'hydrogène, et participent aux cycles biogéochimiques majeurs. Leur site actif est un cofacteur *bis*-pyranoptérine dinucléotide dans lequel le métal (Mo ou W) est coordonné par 4 atomes de soufre et par 2 autres ligands dont l'identification est souvent controversée. La grande réactivité du cofacteur Mo/W a conduit à des structures cristallographiques contradictoires, et la nature des mécanismes catalytiques reste fortement débattue. Toutefois, en combinant la résonance paramagnétique électronique (RPE) et l'analyse des couplages hyperfins liés à l'ion métallique et aux noyaux magnétiques voisins, avec les calculs théoriques basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), des informations structurales détaillées sur les intermédiaires réactionnels peuvent être obtenues.

Nous avons utilisé cette approche dans l'étude de formate déshydrogénases (Fdh) bactériennes à Mo [1] et W [2], qui sont des enzymes présentant un fort intérêt biotechnologique pour la valorisation du CO₂. Les résultats permettent de préciser la nature des intermédiaires Mo^V et W^V et d'interpréter les différences de réactivité (figure 2). Il s'agit là d'une avancée importante dans la compréhension du cycle catalytique de ces enzymes et l'élaboration future de complexes à Mo ou W bioinspirés.

[1] R. Arias-Cartin *et al.*, Identification and characterization of a noncanonical menaquinone-linked formate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **2022**, 298(2), e101384.

[2] A.R. Oliveira *et al.*, Spectroscopic and structural characterization of reduced *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough W-FdhAB reveals stable metal coordination during catalysis, *ACS Chem. Biol.*, **2022**, 17(7), p. 1901-09.

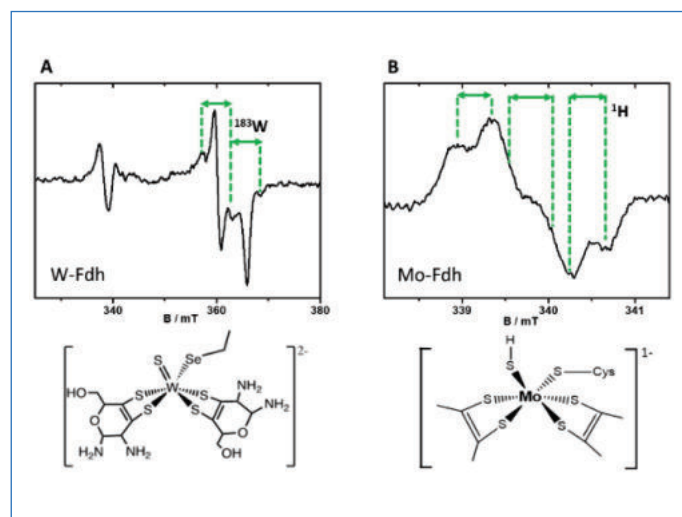


Figure 2 - A) Spectre RPE du centre W^V de Fdh montrant le couplage hyperfin avec l'isotope ¹⁸³W (I = 1/2, abondance naturelle 14 %) et modèle du site de coordination élaboré par calcul DFT. B) Spectres RPE du centre Mo^V de Fdh montrant le couplage hyperfin avec un proton (¹H, I = 1/2) et modèle d'intermédiaire réactionnel.

On notera la différence de largeur spectrale entre les signaux des deux centres métalliques.

Bruno GUIGLIARELLI, professeur, **Frédéric BIASO**, maître de conférences, **Stéphane GRIMALDI**, maître de conférences, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Laboratoire de Bioénergétique et ingénierie des protéines, UMR 7281, CNRS, Aix-Marseille Université, Marseille.

M3 Nanoimagerie du cuivre et du zinc dans les neurones à l'échelle de la synapse

Les métaux tels que le cuivre et le zinc sont essentiels au fonctionnement des neurones, mais la compréhension de leurs fonctions exactes n'est pas si aisée en raison de leur faible concentration et de la nature souvent labile de leurs liaisons chimiques avec les molécules biologiques. L'imagerie chimique élémentaire de fluorescence X induite par rayonnement synchrotron (SXRF) offre dans le domaine des neurosciences un champ d'application très riche. Grâce à une résolution spatiale sans précédent (30 nm) disponible à l'ESRF, le synchrotron européen situé à Grenoble, et jamais atteinte jusqu'alors, nous avons pu aborder l'imagerie des éléments chimiques à l'échelle de la synapse. L'une des principales difficultés du domaine réside néanmoins dans l'interprétation des cartographies des éléments *versus* leurs fonctions biologiques. Nous avons à cet effet développé une imagerie

corrélative à très haute résolution spatiale (inférieure à 30 nm) couplant l'imagerie nano-SXRF de métaux essentiels (cuivre et zinc) à celle des protéines par microscopie de super résolution STED (pour Stimulated emission depletion) [1-2].

Nous avons ainsi révélé le rôle du cuivre et du zinc dans la plasticité synaptique morphologique, en montrant leur interaction avec certaines protéines neuronales (figure 3). Ces résultats indiquent de nouvelles fonctions du Cu et du Zn dans la modulation de la morphologie des synapses, un mécanisme qui participe à la construction de la mémoire. Cette méthode de nanoimagerie corrélative ouvre de larges perspectives d'applications pour l'étude des fonctions biologiques des métaux dans les neurones, et du dérèglement de leur homéostasie dans les maladies neuro-dégénératives.

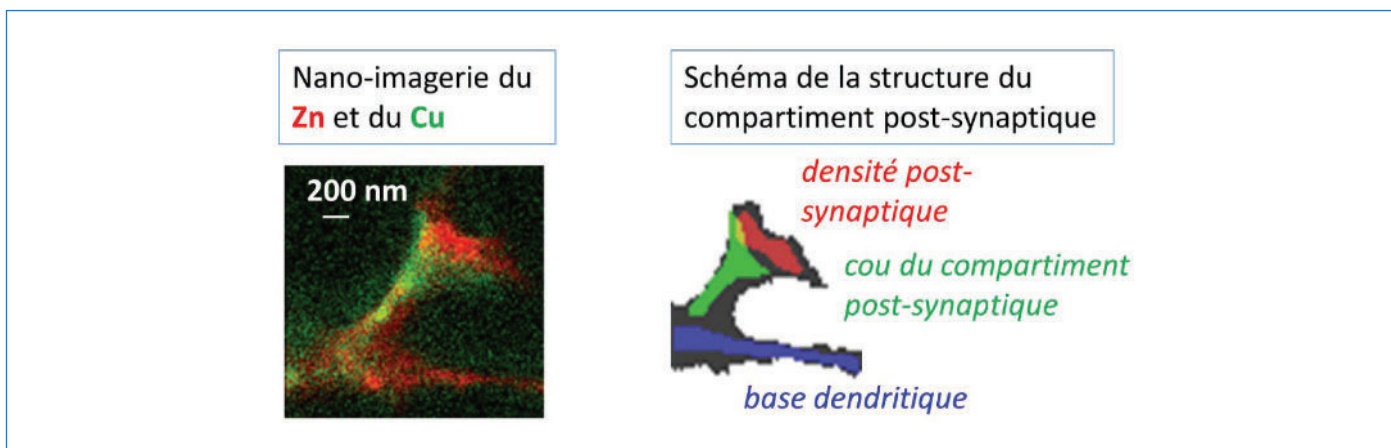


Figure 3 - Imagerie à très haute résolution spatiale (30 nm) du zinc (en rouge) et du cuivre (en vert) dans un compartiment post-synaptique. La synapse est constituée de deux compartiments, pré- et post-synaptiques, dont les dimensions sont inférieures au micron. Dans le compartiment post-synaptique, le zinc est présent en plus grande quantité au niveau de la densité post-synaptique et de la base dendritique, alors que le cuivre est présent dans le « cou » de la post-synapse. Cette distribution indique l'interaction des métaux avec des protéines neuronales impliquées dans la structuration des synapses.

[1] F. Domart *et al.*, Correlating STED and synchrotron XRF nano-imaging unveils cosegregation of metals and cytoskeleton proteins in dendrites, *eLife*, **2020**, *9*, e62334.

[2] R. Ortega, S. Roudeau, A. Carmona, Correlative nano-imaging of metals and proteins in primary neurons by synchrotron X-ray fluorescence and STED super resolution microscopy: Experimental validation, *J. Neurosci. Methods*, **2022**, *381*, 109702.

Richard ORTEGA, directeur de recherche, **Stéphane ROUDEAU**, ingénieur de recherche, et **Asuncion CARMONA**, chargée de recherche, Laboratoire de Physique des deux infinis, Imagerie chimique & Spéciation, UMR 5797, CNRS, IN2P3, Université de Bordeaux, Gradignan.

M4 Sonder le vivant grâce à des complexes de lanthanides plus luminescents

Les lanthanides (Ln) sont des métaux très attractifs pour sonder le vivant : leur émission va de l'ultraviolet au proche infrarouge, leurs bandes d'émission sont fines, ce qui permet de les identifier aisément, et leur temps de vie de luminescence est long (de l'ordre de la micro- à la milliseconde) comparé aux chromophores organiques (nanoseconde). Les transitions *f-f* étant peu intenses, l'utilisation d'un chromophore organique comme antenne pour absorber la lumière est souvent préférée à l'excitation directe des Ln^{3+} (figure 4). Les complexes ainsi obtenus sont peu photosensibles et ont des pseudo-déplacements de Stokes larges (différence entre les *maximas* d'absorption et d'émission).

Ces propriétés avantageuses ont été mises à profit pour développer des tests immunologiques, des sondes pour la détection d'analytes ou encore pour marquer des organelles [1,2].

L'obtention de complexes de Ln^{3+} brillants nécessite de minimiser les voies compétitives de désactivation non-radiative. La mieux documentée est celle liée à la présence d'oscillateurs X-H (X = O, N, C), tels que des molécules d'eau dans la sphère de coordination du Ln^{3+} . Une autre voie possible est le transfert d'électron photo-induit (PeT) de l'antenne vers le Ln^{3+} . Cette voie importante pour les Ln^{3+} les plus réductibles (Eu, Yb) n'a pas été étudiée de manière systématique.

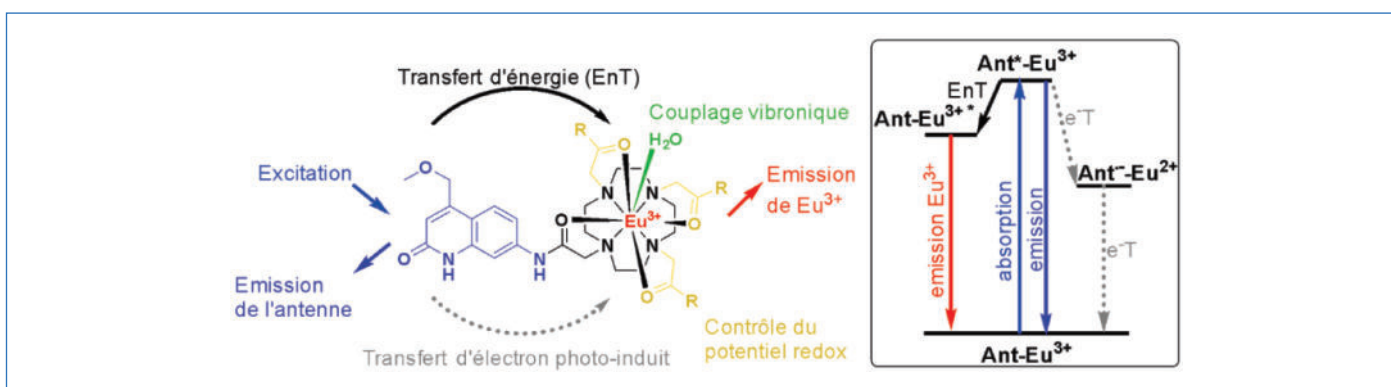


Figure 4 - Sensibilisation de l'émission de Eu^{3+} et mécanismes de désactivation non-radiatifs.

C'est avec l'objectif de quantifier l'importance du PeT et de proposer une solution pour le contrôler que nous avons synthétisé et étudié une librairie de complexes d'Eu³⁺ [3]. Nous avons montré que le remplacement des bras amides du ligand par des bras carboxylates stabilise l'Eu³⁺ en diminuant son potentiel redox d'environ 400 mV et conduit à une augmentation de sa luminescence. Nous avons aussi quantifié la désactivation due au PeT, qui peut être équivalente à celle induite par la présence d'une molécule d'eau dans la sphère de coordination d'Eu³⁺. Cette stratégie jusqu'alors inexplorée permet d'optimiser les propriétés de luminescence des complexes d'Eu³⁺ sans modifier l'antenne et pourrait être bénéfique pour de nombreuses sondes.

[1] J.-C.G. Bünzli, Lanthanide light for biology and medical diagnosis, *J. Luminescence*, **2016**, *170*(3), p. 866-878.

[2] E. Mathieu *et al.*, Lanthanide-based tools for the investigation of cellular environments, *Chem. Commun.*, **2018**, *54*(72), p. 10021-35.

[3] D. Kovacs *et al.*, Coordination environment-controlled photoinduced electron transfer quenching in luminescent europium complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(30), p. 13190-200.

Émilie MATHIEU¹, chargée de recherche, et **Eszter K. BORBAS**², professeure.

¹Laboratoire de Chimie de coordination, CNRS, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse.

²Department of Chemistry, Ångström Laboratory, Uppsala University, Uppsala (Suède).

M5 L'électrochimie, un outil pour révéler les mécanismes d'action des catalyseurs : des complexes bioinspirés aux métalloenzymes

De nombreuses enzymes, notamment celles impliquées dans l'activation de petites molécules (H₂, N₂, CO₂, O₂...), et les complexes inorganiques qui s'en inspirent, catalysent des réactions d'oxydoréduction à l'aide de sites actifs incorporant un ou plusieurs ions de métaux de transition (Ni, Fe, Cu, Mo, Fe, Mn, etc.). Ces réactions produisant ou consommant des électrons, les techniques de l'électrochimie dynamique telles que la voltammétrie sont indiquées pour en mesurer la vitesse, mais aussi pour en décrypter les mécanismes.

Si ces méthodes ont été très utiles pour étudier des réactions catalytiques irréversibles, des développements récents concernent la modélisation des réactions catalytiques bidirectionnelles, ce qui revêt un intérêt particulier dans le cas de certains systèmes, notamment ceux catalysant l'oxydation et la production du dihydrogène (H₂ ⇌ 2H⁺ + 2e⁻).

L'étude par électrochimie directe des hydrogénases – les enzymes à Ni et/ou Fe qui métabolisent le dihydrogène – a profité de ces avancées méthodologiques et de la découverte d'enzymes dont les propriétés catalytiques sont très variées. Une question actuelle concerne l'identification des raisons pour lesquelles certaines hydrogénases fonctionnent dans l'une ou l'autre des deux directions de la réaction presque sans surtension, alors que d'autres ne sont actives qu'au prix d'un large écart à l'équilibre [1].

Concernant les petits catalyseurs, une famille de complexes de coordination de Ni s'est révélée active pour la catalyse bidirectionnelle et réversible de cette même réaction (figure 5). Les études mécanistiques rendues possibles par les récents développements cinétiques révèlent que l'activité remarquable de ces catalyseurs repose sur une subtile combinaison entre les propriétés du centre métallique et la présence de relais de protons [2].

[1] A. Fasano *et al.*, Kinetic modeling of the reversible or irreversible electrochemical responses of FeFe-hydrogenases, *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(2), p. 1455-66.

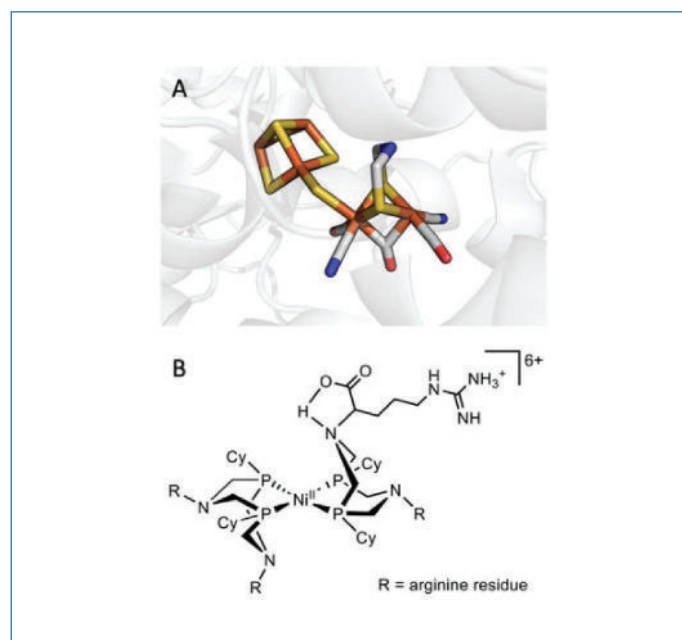


Figure 5 - Les structures du site actif de l'hydrogénase «FeFe» (A) et d'un complexe mononucléaire à nickel (B), qui catalysent l'oxydation et la production du dihydrogène.

[2] B. Reuillard, C. Costentin, V. Artero, Deciphering reversible homogeneous catalysis of the electrochemical H₂ evolution and oxidation: Role of proton relays and local concentration effects, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(36), e202302779.

Cyrille COSTENTIN¹, professeur, et **Christophe LÉGER**², directeur de recherche.

¹Département de Chimie moléculaire, EMPRe, UMR5250, CNRS, Université Grenoble Alpes.

²Laboratoire de Bioénergétique et ingénierie des protéines, UMR 7281, CNRS, Aix-Marseille Université, Marseille.

M6 Les complexes de lanthanide, des sondes polyvalentes de la structure des protéines

Les complexes de lanthanides (Ln) sont une famille de molécules dont plusieurs membres ont été développés pour aider la résolution de structure cristallographique par effet dit « d'atome lourd ». Ces complexes ont également montré leur capacité à aider la cristallisation de protéines [1]. Comprendre l'origine de cet effet « cristallophore » a nécessité de mieux connaître leurs interactions avec les protéines. Récemment, nous avons montré que le paramagnétisme des ions Ln^{3+} constitue un outil puissant pour sonder cette interaction supramoléculaire (figure 6). Lorsque la protéine est en interaction avec le complexe paramagnétique, les spins nucléaires des atomes qui sont proches de la zone d'interaction subissent une perturbation de leur spectre RMN due aux changements conformationnels et dynamiques induits, exacerbé par le paramagnétisme du complexe. Cette approche a été appliquée pour caractériser l'affinité de deux complexes de Ln^{3+} pour l'ubiquitine. Le processus d'interaction étant dynamique, les données RMN acquises ne reflètent que la moyenne temporelle des différentes étapes. Nous avons utilisé des simulations de dynamique moléculaire (MD) pour représenter à l'échelle de la microseconde le scénario détaillé de l'interaction [2]. Cette approche couplée RMN/MD nous a permis d'établir que les deux complexes interagissent différemment avec l'ubiquitine, le premier se liant spécifiquement aux résidus cationiques, arginines et lysines, et le second [3] explorant la surface de la protéine par des interactions faibles avec les fonctions carboxylate. Ces observations apportent un éclairage nouveau sur les propriétés d'interaction dynamiques de ces complexes, qui permettra de proposer un mécanisme par lequel ils induisent la cristallisation de protéines.

[1] G. Pompidor *et al.*, Protein crystallography through supramolecular interactions between a lanthanide complex and arginine, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47(18), p. 3388-91.

[2] K. Dos Santos *et al.*, One touch is all it takes: The supramolecular interaction between ubiquitin and lanthanide complexes revisited by paramagnetic NMR and molecular dynamics, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2024**, 26, p. 14573-81.

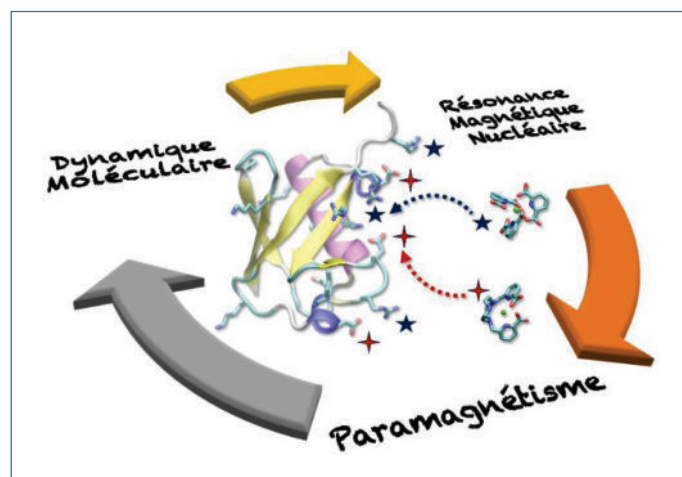


Figure 6 - Représentation de la structure de la protéine ubiquitine et des complexes de lanthanide dont l'interaction supramoléculaire a été étudiée par une combinaison de techniques RMN et de modélisation.

[3] S. Engilberge *et al.*, Crystallophore: a versatile lanthanide complex for protein crystallography combining nucleating effects, phasing properties, and luminescence, *Chem. Sci.*, **2017**, 8(9), p. 5909-17.

Élise DUMONT¹, professeure, Olivier MAURY², directeur de recherche, et Nicolas GIRAUD³, professeur.

¹Institut de Chimie de Nice, EUR Spectrum, UMR 7272, CNRS, Université Côte d'Azur, Nice.

²Laboratoire de Chimie, UMR 5182, CNRS, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon.

³Laboratoire de Chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques, Bio-Spectroscopy, UMR 8601, CNRS, Université Paris Cité, Paris.

M7 Préserver et capturer la structure atomique de métalloenzymes par cristallographie ultra-rapide

La détermination de la structure tridimensionnelle d'une métalloenzyme est une étape-clé dans la compréhension de sa fonction. Cependant, la sensibilité à l'oxydoréduction de certains cofacteurs, tels que les centres métalliques, constitue un obstacle à l'obtention de structures intactes d'enzymes par des méthodes conventionnelles de biologie structurale. En utilisant une méthode ultra-rapide, la cristallographie femto-seconde en série avec un laser à rayons X à électrons libres (XFEL), il est possible de relever ce défi grâce au principe de « diffraction avant destruction » (figure 7A). D'intenses impulsions de rayons X d'une durée de seulement quelques femto-secondes illuminent un flot de cristaux de protéine. Chaque

cristal produit un cliché de diffraction qui est enregistré avant que les radiations n'aient pu causer de dommage. L'assemblage de données issues de plusieurs milliers de cristaux permet de reconstruire la structure d'une protéine sans les artefacts dus à la photoréduction. Cette approche a récemment permis de déterminer la structure à résolution atomique et à température ambiante de plusieurs enzymes dans différents états rédox jusqu'alors inaccessibles.

Une ribonucléotide réductase de mycoplasme a ainsi pu être visualisée pour la première fois dans son état radicalaire fonctionnel [1], révélant une liaison hydrogène remarquablement courte et une réorganisation du site de stockage du

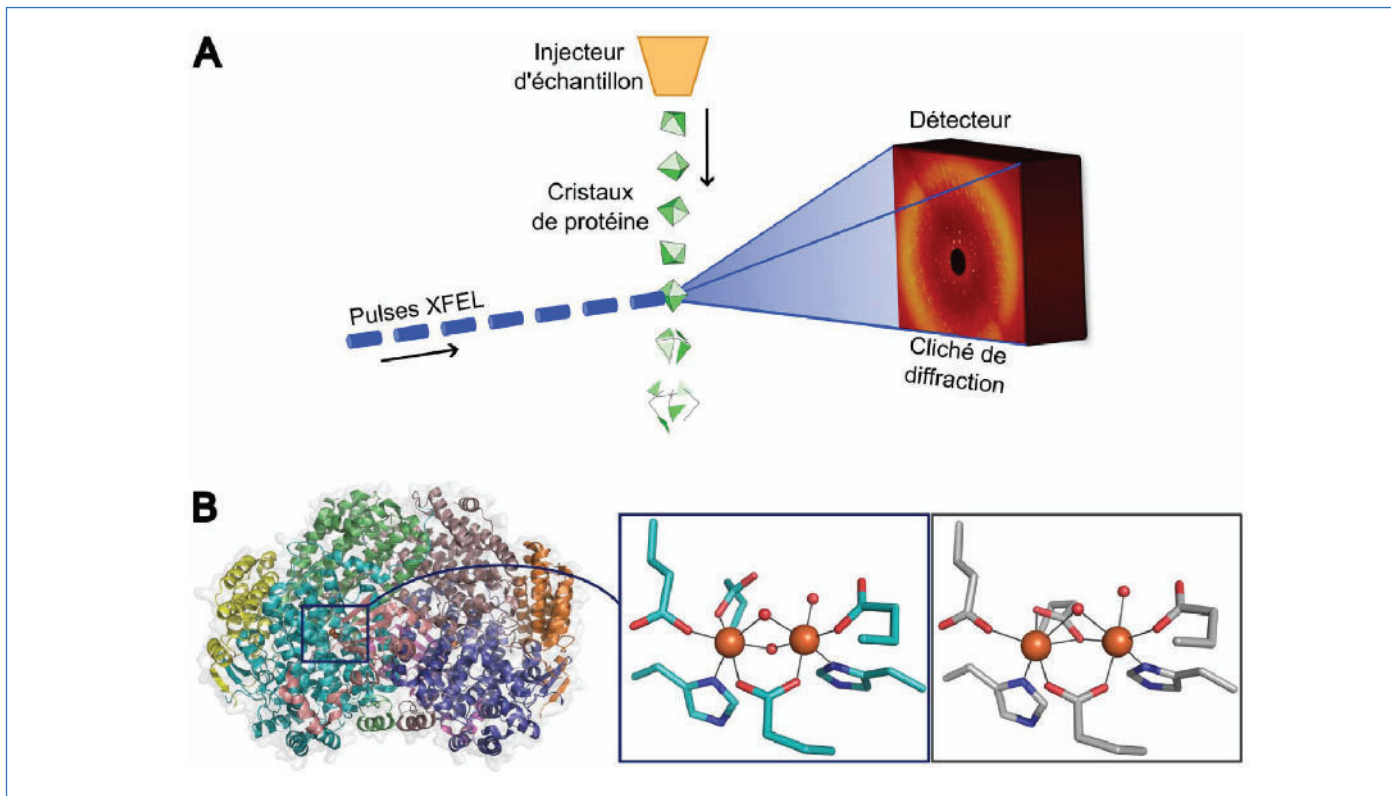


Figure 7 - A) Principe de la cristallographie femtoseconde en série avec un laser à rayons X à électrons libres (XFEL). B) Structures de l'enzyme méthane monoxygénase dans deux états d'oxydation : di-ferrique (cyan) et di-ferreux (gris). Codes PDB (Protein Data Bank) : 6YD0, 6YDI.

radical. De plus, cette approche de cristallographie peut être couplée à la spectroscopie d'émission de rayons X, permettant d'obtenir simultanément les structures tridimensionnelles et des informations sur l'état d'oxydation de métalloenzymes. De cette manière, le site actif de la méthane monoxygénase soluble a pu être étudié dans deux états d'oxydation distincts [2], dévoilant un réarrangement entre les états di-ferreux et di-ferrique de l'enzyme (figure 7B).

[2] V. Srinivas *et al.*, High-resolution XFEL structure of the soluble methane monooxygenase hydroxylase complex with its regulatory component at ambient temperature in two oxidation states, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(33), p. 14249-66.

[1] H. Lebrette *et al.*, Structure of a ribonucleotide reductase R2 protein radical, *Science*, **2023**, 382(6666), p. 109-113.

Hugo LEBRETTE, chercheur, et **Cécile ALBENNE**, enseignante-chercheuse, Centre de Biologie intégrative, Laboratoire de Microbiologie et génétique moléculaires, Métalloprotéome des mycoplasmes, UMR 5100, CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse.

M8 Chémobiologie inorganique : des techniques d'études innovantes

Étudier de manière intégrée les complexes métalliques bioactifs dans des cellules consiste à corréliser leur activité biologique avec leur pénétration, leur distribution intracellulaire et leur spéciation (ou nature). L'imagerie de fluorescence X par rayonnement synchrotron (μ SXRF) est une technique puissante pour la visualisation des cations métalliques dans les systèmes biologiques. Il est, par exemple, possible en marquant le ligand par un élément lourd (Re) d'interroger l'intégrité d'un complexe de Mn en analysant la colocalisation Re-Mn par imagerie de fluorescence X (figure 8A) [1]. Par ailleurs, en dépit de leur intérêt, des marqueurs d'organelles utilisables en μ SXRF sont peu nombreux : pour en concevoir un, nous avons fonctionnalisé un complexe de $\text{Re}(\text{CO})_3$ par un cation triphénylphosphonium méthylé (TP^+P^+), groupe très

lipophile et chargé positivement s'accumulant à la mitochondrie (figure 8B) [2].

La mobilité ionique permet de séparer les molécules en fonction de leur taille (ou de leur section de collision, notée CCS). Cette technique est assez puissante pour distinguer des complexes métalliques de CCS proche, par exemple des complexes construits avec un même ligand et des cations métalliques divalents présentant des rayons ioniques similaires mais différents, comme au sein de la première série des éléments de transition [3]. En couplage avec la spectrométrie de masse, elle a permis de détecter la présence intracellulaire de complexes antioxydants (Mn1 et Mn1P , figure 8C) dans les lysats de cellules avec lesquelles ils ont été incubés, ainsi que la présence des analogues où le Mn(II) a été échangé

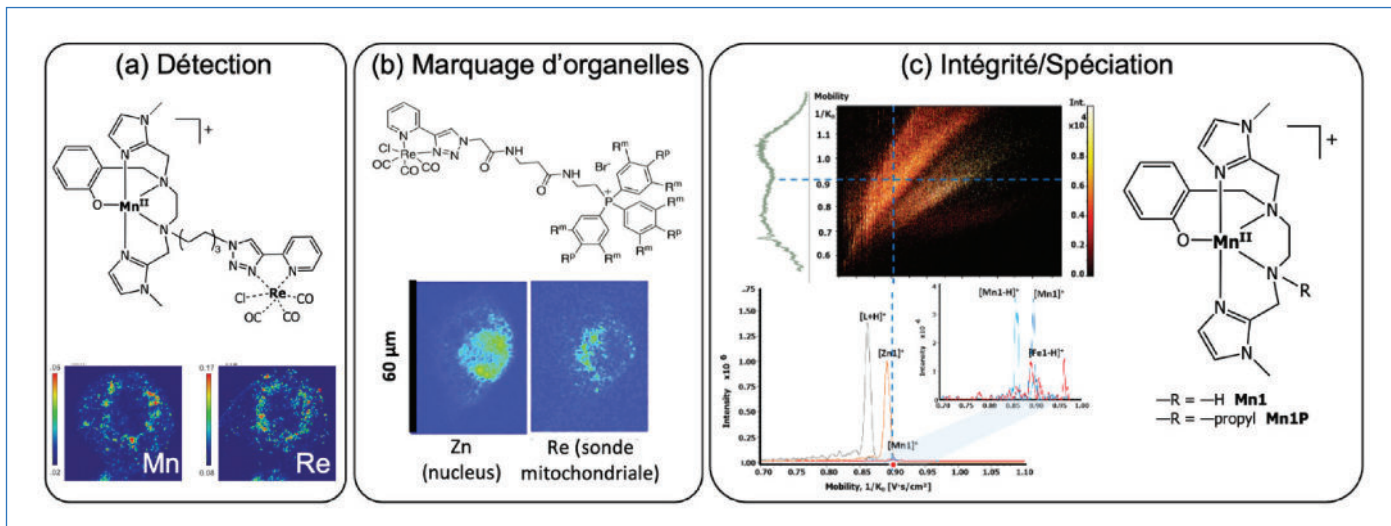


Figure 8 - A) Mime de superoxyde dismutase fonctionnalisé par une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ et distribution observée par émission de fluorescence X dans des cellules cryofixées. B) Marqueur de mitochondries actif en fluorescence classique, fluorescence X et microscopie IR : distribution dans des cellules chimiquement fixées ($\text{R} = \text{H/Me}$). C) Détection d'un complexe de Mn dans un lysat cellulaire par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse : intégrité du complexe métallique dans des lysats cellulaires et spéciation métallique.

par du $\text{Zn}(\text{II})$. La concentration intracellulaire a pu être estimée en utilisant un analogue avec un ligand lourd marqué au (^{13}C) et un cation $\text{Co}(\text{II})$ [3]. C'est une méthode de choix pour étudier la spéciation métallique dans les environnements biologiques très intriqués.

[3] M. Zoumpoulaki *et al.*, Deciphering the metal speciation in low-molecular-weight complexes by IMS-MS: Application to the detection of manganese superoxide dismutase mimics in cell lysates, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, e202203066.

[1] E. Mathieu *et al.*, Intracellular location matters: Rationalization of the anti-inflammatory activity of a manganese(II) superoxide dismutase mimic complex, *Chem. Commun.*, **2020**, 56(57), p. 7885-88.

[2] G. Schanne *et al.*, Rhenium carbonyl complexes bearing methylated triphenylphosphonium cations as antibody-free mitochondria trackers for X-ray fluorescence imaging, *Inorg. Chem. Front.*, **2021**, 8(16), p. 3905-15.

Hélène C. BERTRAND, maître de conférences, **Nicolas DELSUC**, chargé de recherches CNRS, et **Clotilde POLICAR**, professeure, Département de chimie, Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203, CNRS, ENS-PSL, Université Paris Sciences & Lettres, Sorbonne Université, Paris.

