

Ions métalliques, cascade amyloïde et maladie d'Alzheimer

Christelle Hureau

Résumé

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus fréquente et est devenue un véritable enjeu de santé publique. Deux types de lésions sont détectés chez les malades : des enchevêtrements intracellulaires de protéine Tau et des plaques séniles extracellulaires, constituées principalement de peptides amyloïdes- β ($A\beta$) dans un état agrégé. Dans la mesure où les plaques amyloïdes se retrouvent principalement chez les malades, le passage du peptide soluble au peptide agrégé est donc une étape clé dans le développement de la pathologie, comme le propose l'hypothèse de la cascade amyloïde. Les ions métalliques Cu(I/II), Zn(II) et Fe(II/III) sont impliqués dans ce processus d'agrégation et dans le mécanisme de stress oxydant. Nous avons étudié dans notre équipe de quelle(s) façon(s) ces ions métalliques se lient au peptide $A\beta$, pré-requis pour comprendre comment ils en influencent l'agrégation et induisent le stress oxydant, et en particulier comment la nature de l'ion métallique central et la séquence du peptide influencent le site de coordination. La maîtrise de ces données fondamentales est nécessaire à la conception et au développement de molécules à visée thérapeutique. Quelques-unes des stratégies thérapeutiques envisagées sont présentées dans cet article.

Mots-clés

Maladie d'Alzheimer, ions métalliques, peptide amyloïde, spectroscopies, chimie bio-inorganique, coordination.

Abstract

Metallic ions, amyloid cascade and Alzheimer's disease

Alzheimer's disease, characterized by a global deterioration of mental, cognitive and physical abilities, is the most common cause of dementia in the elderly population and represents a global public health problem. Two hallmarks are detected in patients brains: the intracellular neurofibrillary tangles of Tau protein (the protein involved in the "neuronal skeleton"), and the extracellular amyloid plaques (also known as senile plaques) made of aggregated forms of the amyloid- β ($A\beta$) peptide. These peptides are present in soluble (monomeric) form in healthy brains. Hence the route to the formation of the aggregated forms of the $A\beta$ peptide is a key in the etiology of the disease; such phenomenon is known as the amyloid cascade. A role in the amyloid cascade have been proposed for the metallic ions copper(I/II), zinc(II) and iron(II/III), also implicated in oxidative stress production, *i.e.* in the formation of highly toxic reactive oxygen species. We have studied in our group how such metallic ions are bound to the $A\beta$ peptide, which is a prerequisite to understand how they can interfere in the $A\beta$ aggregation process as well as in the reactive oxygen species production, and in particular how the nature of the metallic ion and the peptide sequence impact the coordination site. The good knowledge of these data is crucial for designing new kind of therapeutic tools; some therapeutic strategies are presented on this article.

Keywords

Alzheimer's disease, metallic ions, amyloid peptide, spectroscopies, bio-inorganic chemistry, coordination.



© freshidea-Fotolia.com

De nombreux ions métalliques jouent un rôle clé dans les systèmes biologiques. Ils occupent des fonctions structurales et catalytiques essentielles au sein d'enzymes et de protéines. C'est pourquoi il existe des systèmes complexes permettant de contrôler de manière extrêmement fine leur métabolisme : détection, transport, stockage, sélectivité... Par ailleurs, le cerveau représente un système biologique unique, en particulier en ce qui concerne l'homéostasie des ions métalliques, dont le dysfonctionnement est lié aux maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer.

Cette maladie, qui se caractérise par un déclin des capacités mentales, cognitives et physiques, est la cause la plus fréquente de démence dans la population âgée (50 à 80 % des cas [1]), et au niveau mondial, on estime qu'environ 30 millions de personnes sont atteintes, un chiffre qui devrait quadrupler dans les quarante prochaines années [2]. Un symptôme précoce de la maladie est la difficulté à se souvenir des informations récemment acquises. Ensuite, des symptômes plus sévères tels que des changements d'humeur et de comportement, de la confusion, de sérieuses

perles de mémoire, des difficultés d'élocution, etc. sont rencontrés. Avec le vieillissement annoncé de la population, le nombre de malades ne va cesser de croître dans les prochaines années. Les enjeux sanitaires et sociétaux sont donc très importants, d'où la nécessité de trouver rapidement des thérapies curatives. Le développement de telles thérapies repose entre autres sur une bonne connaissance des différents phénomènes moléculaires liés à la maladie.

Deux types de lésions morphologiques sont observées *post mortem* chez les malades : des dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires de protéines Tau (protéine qui constitue le « squelette du neurone ») et des plaques amyloïdes (ou plaques séniles) extracellulaires, constituées principalement de peptides amyloïdes-β (Aβ) dans un état agrégé (figures 1 et 2). Ces peptides, composés majoritairement de 40 à 42 acides aminés (Aβ40 et Aβ42, figure 3) sont issus de la dégradation d'une protéine membranaire (APP, figures 1 et 2) et sont présents sous forme monomère soluble dans les cerveaux sains. Il a été montré que les plaques séniles contiennent des concentrations anormalement élevées (de l'ordre du mM) en ions zinc, fer et cuivre, et que ces métaux étaient impliqués dans les processus d'agrégation des peptides Aβ. De plus, les ions Cu et Fe peuvent jouer un rôle important dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour « reactive oxygen species ») telles que H₂O₂ et HO• [3-4] très nocives pour la cellule. Bien que la disponibilité des ions Cu et Zn dans la fente synaptique soit relativement faibles (< μM, et de l'ordre du mM, respectivement) [5], les constantes d'affinité du peptide pour ces ions sont suffisamment élevées pour que les interactions Cu-Aβ et Zn(II)-Aβ soient physiologiquement pertinentes (voir plus loin « La coordination des ions Cu, Zn et Fe »).

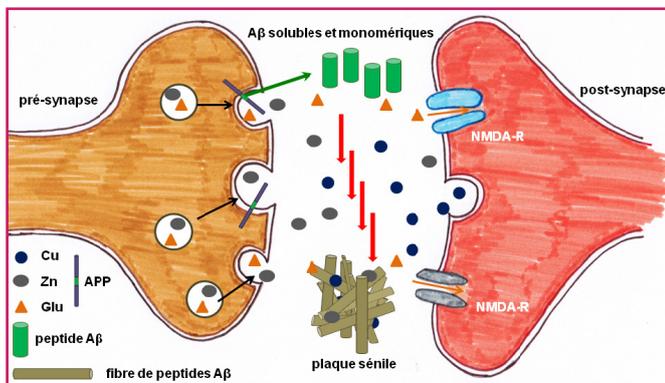


Figure 1 - Schéma de la fente synaptique où les ions Cu, Zn et les peptides Aβ sont trouvés en concentrations anormalement élevées. Le peptide Aβ sous sa forme monomère soluble est obtenu par coupure de l'« amyloid precursor protein » (APP), les ions Cu et Zn sont relâchés lors de l'excitation neuronale et sont impliqués dans le processus d'agrégation du peptide Aβ, qui conduit à la formation des plaques séniles détectées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (d'après [6]).

La cascade amyloïde

L'apparition des plaques séniles est un événement précoce dans le développement de la maladie et précède l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires de protéines Tau, associées à la dégénération neuronale [2]. Ceci est en accord avec l'hypothèse de la cascade amyloïde (figure 2) selon laquelle l'agrégation du peptide Aβ est liée à l'étiologie de la maladie, puisque les peptides Aβ monomères et solubles sont présents dans les cerveaux sains alors que les plaques amyloïdes/séniles sont détectées dans

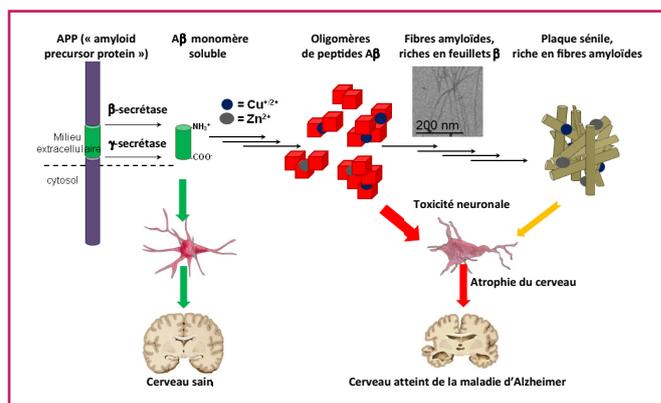


Figure 2 - Schéma de la cascade amyloïde faisant figurer le rôle des ions métalliques.

Le peptide Aβ est obtenu sous sa forme monomère soluble par coupure de l'APP (« amyloid precursor protein ») par les β- et γ-sécrétases. Sous cette forme, le peptide Aβ n'est pas neurotoxique (flèches vertes) et est retrouvé dans les cerveaux sains. Les plaques séniles sont des marqueurs histopathologiques détectés *post mortem* chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les espèces intermédiaires entre le peptide Aβ monomère et les plaques séniles sont désormais considérées comme plus toxiques (flèches rouges) que les plaques elles-mêmes (flèche orange). Les ions métalliques (ronds bleus et ovales gris) sont impliqués dans la cascade amyloïde via divers processus : accélération de l'agrégation, formation d'agrégats plus toxiques, etc. Par souci de simplicité, les réactions sont notées de façon unidirectionnelle, bien qu'elles soient toutes équilibrées (d'après [7]).

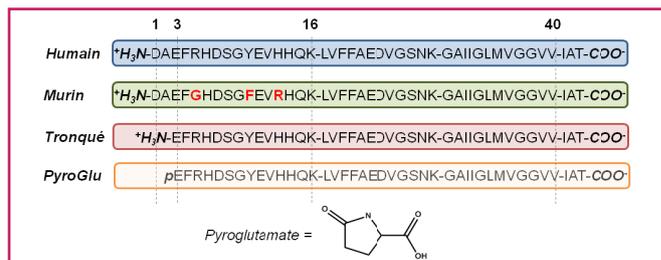


Figure 3 - Séquence des peptides Aβ humain (hAβ), murin (mAβ) et des formes tronquées du peptide humain : peptide tronqué en position 3 (tAβ) et forme pyroglutamate correspondante (pAβ).

les cerveaux des malades. En réalité, l'hypothèse la plus communément acceptée actuellement propose un rôle clé pour les espèces intermédiaires du processus d'agrégation, à savoir les formes oligomères solubles, et ce via différents phénomènes, tels que des effets sur l'intégrité des membranes, la perturbation des fonctions synaptiques, la production de ROS, etc. [7].

Le peptide Aβ ou plutôt les peptides Aβ sont constitués de 39 à 43 acides aminés avec deux formes majoritaires en contenant 40 et 42 (figure 3). Ils contiennent une partie N-terminale hydrophile s'étendant des résidus 1 à 16 et une partie C-terminale hydrophobe. La partie N-terminale est impliquée dans la coordination des ions métalliques et la partie C-terminale dans le processus d'agrégation. Par ailleurs, il a été montré que le peptide Aβ42, bien que présent en moindre quantité que le peptide Aβ40, est davantage toxique, ce qui est imputé à sa plus grande capacité à s'agréger et donc en accord avec l'hypothèse de la cascade amyloïde.

Le rôle des ions métalliques est double : ils peuvent soit intervenir dans l'agrégation du peptide, soit dans la production des ROS. En effet, le cœur hydrophobe du peptide, impliqué dans le processus de dimérisation, première étape de l'agrégation, se situe au niveau des résidus 17 à 21. La coordination des ions métalliques s'effectue quant à elle par la partie N-terminale (résidus 1 à 16) adjacente au cœur

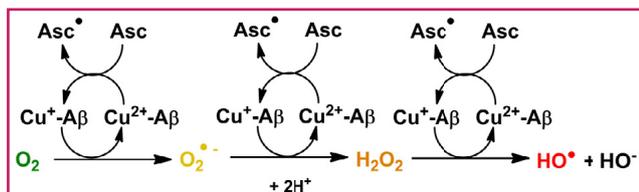


Figure 4 - Production des espèces réactives de l'oxygène catalysée par le complexe Cu-Aβ.

hydrophobe. Par conséquent, la coordination des ions métalliques peut moduler les propriétés d'agrégation du peptide, par exemple en favorisant la formation d'espèces dimères *via* le pontage entre deux peptides ou en modifiant la structure secondaire du peptide. Par ailleurs, en ce qui concerne la production de ROS, les ions à activité redox ont la capacité de catalyser la réduction du dioxygène et donc la formation des espèces oxygénées toxiques (figure 4).

En conséquence, la première étape pour comprendre comment les ions métalliques peuvent intervenir dans ces deux processus est de déterminer comment ils se lient au peptide Aβ et donc leur sphère de coordination. Par ailleurs, cette donnée sera également importante pour le développement raisonné de nouveaux agents à visée thérapeutique.

Les études spectroscopiques de coordination des ions métalliques sont réalisées sur le peptide Aβ₁₆ qui contient les 16 premiers acides aminés, seuls résidus impliqués dans la coordination. En effet, les complexes métalliques obtenus à partir de ce peptide restent solubles à des concentrations pouvant atteindre 10 mM, ce qui facilite significativement l'étude par différentes spectroscopies. Comme la flexibilité des peptides ne permet pas d'obtenir de structure par cristallographie des rayons X, il est nécessaire d'avoir recours à plusieurs techniques afin de proposer des modèles de coordination. Outre les données structurales, il est également important de déterminer la valeur de la constante d'affinité, valeur qui traduit la force de l'interaction ion métallique-peptide. Cette donnée est nécessaire pour évaluer la possibilité de rencontrer les complexes ions métalliques-peptides *in vivo*.

La coordination des ions Cu, Zn et Fe

L'ion Cu(II)

Grâce à des études, en fonction du pH, menées à l'aide de techniques spectroscopiques avancées – RPE pulsée, ENDOR et RMN paramagnétique ¹H, ¹³C et 2D – couplées à l'utilisation de peptides marqués ¹³C et ¹⁵N [9-10], nous avons :

- montré la coexistence à pH 7,4 de deux complexes Cu(II)-Aβ en équilibre acido-basique (espèce notée I majoritaire à pH 6,6 et espèce notée II majoritaire à pH 8,7 – voir figures 5 et 6) ;

- identifié sans ambiguïté les acides aminés impliqués dans la coordination de l'ion Cu(II) pour les deux complexes présents à pH physiologique (figure 5). Dans les deux formes, l'ion Cu(II) est pentacoordiné, occupant un site de géométrie pyramide à base carrée. Dans la forme I, l'ion Cu(II) est lié dans le plan équatorial par la fonction amine terminale, la fonction carbonyle de l'Asp1 adjacente, le noyau imidazole de l'His6 et le noyau imidazole de l'His13 ou 14, la position apicale étant occupée par une fonction carboxylate. Dans la forme II, l'ion Cu(II) est lié dans le plan équatorial par la fonction amine terminale, la fonction amide déprotonée de la liaison Asp1-Ala2 adjacente, la fonction carbonyle de l'Ala2 et

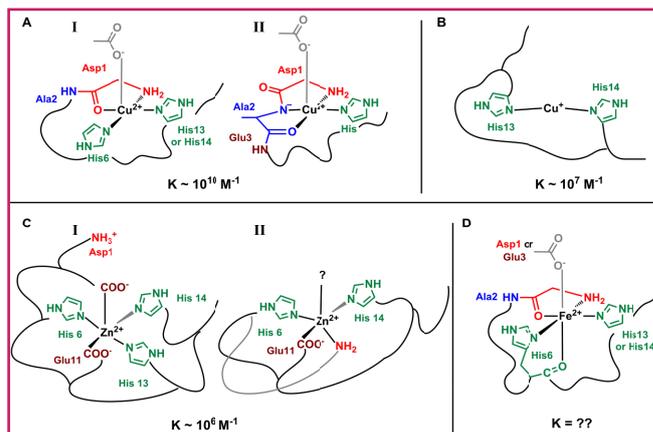


Figure 5 - Modèles de coordination avec le peptide Aβ des différents ions impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Pour les ions Cu(II) et Zn(II), deux formes coexistent à pH 7,4, la forme I étant majoritaire. Les constantes d'affinité traduisant l'importance de l'interaction ions métalliques-peptides Aβ sont données à titre indicatif (d'après [3]).

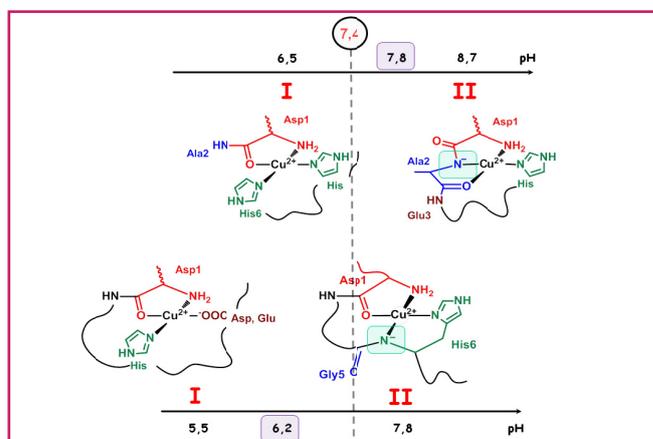


Figure 6 - Comparaison des modes de coordination de l'ion Cu(II) par les peptides humain et murin.

À pH physiologique (~ 7,4), les formes prédominantes sont respectivement I et II (d'après [11]).

- un noyau imidazole d'une des trois His, la position apicale étant occupée par la fonction carboxylate de l'Asp1 ;
- mis en évidence la présence d'équilibres entre plusieurs ligands équivalents pour une position de coordination (par exemple les fonctions carboxylates des deux aspartates et des deux glutamates pour la position apicale de la forme I) ;
- et enfin montré que la fonction amide de la liaison peptidique Asp1-Ala2 se déprotonne pour ensuite se lier à Cu(II) vers pH 7,8, permettant le passage de l'espèce I à l'espèce II (figures 5 et 6).

En particulier, la présence de deux espèces coexistant autour du pH physiologique est détectée par RPE conventionnelle (figure 7). Ces deux espèces sont différenciées par leurs paramètres RPE :

- pour l'espèce I : $g_{\perp} = 2,06$; $g_{\parallel} = 2,26$; $A_{\parallel}({}^{63}\text{Cu}) = 180 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$;
- et pour l'espèce II : $g_{\perp} = 2,07$; $g_{\parallel} = 2,23$; $A_{\parallel}({}^{63}\text{Cu}) = 160 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Par ailleurs, par spectroscopie RMN, il est possible d'attribuer les pics ¹H et ¹³C de chacun des acides aminés composant la séquence peptidique. De plus, dans le cas d'un équilibre rapide entre les formes apo- et métallées du peptide, la présence d'une quantité sub-stœchiométrique de Cu(II) élargit les pics associés aux atomes situés à proximité du centre paramagnétique. Il est ainsi possible de

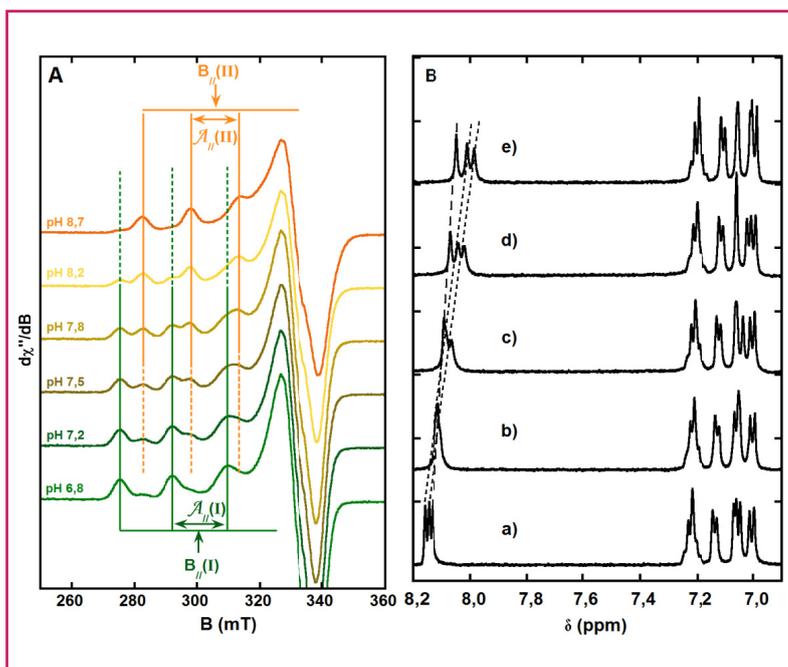


Figure 7 - Signatures spectroscopiques en résonance paramagnétique électronique (RPE) des complexes Cu(II)-A β (A) et en RMN des complexes Cu(I)-A β (B) autour de pH physiologique.

cartographier les atomes les plus affectés par la présence du centre paramagnétique et d'en déduire les positions les plus probables de Cu(II) au sein du peptide, et finalement de proposer des modèles structuraux pour les espèces I et II (figures 5 et 6).

Ces études ont été complétées par des mesures en dichroïsme circulaire, en spectroscopie d'absorption des rayons X [9, 12], en RPE impulsionnelle et ENDOR [10], et le modèle proposé sur les figures 5 et 6 est celui qui répond au mieux aux différents éléments structuraux déduits de ces techniques.

Enfin, des études par spectroscopie de fluorescence de la tyrosine (résidu 10 de la séquence du peptide A β) ont permis d'évaluer que l'affinité du peptide pour Cu(II) est de l'ordre de 10^{10} M $^{-1}$, ce qui, étant données les concentrations en Cu dans la fente synaptique sous certaines conditions, valide la possibilité de formation du complexe Cu(II)-A β *in vivo* [13].

L'ion Cu(I)

Ce degré d'oxydation du cuivre est pertinent d'un point de vue biologique. En effet, le cerveau est un environnement relativement réducteur, à la fois dans les milieux intracellulaires (potentiel d'environ - 300 mV vs. NHE) et extracellulaires (concentration en ascorbate de plusieurs centaines de μ M). Néanmoins, les techniques disponibles pour l'étude d'un tel ion (configuration électronique d 10) se résument principalement à la RMN et à la spectroscopie d'absorption X. Par l'utilisation conjointe de ces deux spectroscopies, nous avons montré i) que l'ion Cu(I) est lié par les noyaux imidazoles de deux résidus histidine (His) dans une géométrie linéaire (figure 5), et ii) que les trois His sont impliquées dans la coordination de Cu(I) (équilibre entre les trois couples possibles : (His6, His13), (His6, His14) et (His13, His14)).

En particulier, la signature par spectroscopie XANES (« X-ray absorption near-edge structure ») est très sensible à la coordinence de Cu(I) et à la géométrie autour du centre

métallique. Dans le cas présent, la signature XANES montre que Cu(I) est lié à deux ligands dans une géométrie linéaire [3, 14-15].

Par ailleurs, en spectroscopie RMN 1D 1 H, les déplacements chimiques des protons aromatiques des trois His sont impactés par la présence de Cu(I) (figure 7), mettant en évidence le rôle des trois His dans la coordination du Cu(I). Deux modèles sont compatibles avec ces données : soit les trois couples d'histidine – (His6, His13), (His6, His14) et (His13, His14) – sont en équilibre, avec une plus forte contribution du couple (His13, His14), soit l'His6 est transitoirement présente pour former un complexe où Cu(I) est tricoordiné [15].

Enfin, une étude par calculs (modélisation de type Car Parinello) a conforté les résultats obtenus expérimentalement, montrant par ailleurs que la configuration His13-Cu-His14 était favorisée par des effets à longue distance et non simplement par effet chélate comme initialement envisagé [16].

En ce qui concerne l'affinité de Cu(I) pour le peptide A β , nous avons entrepris une étude par compétition suivie par spectroscopie UV-visible avec un chromophore de Cu(I) : la ferrozine (Fz, 5,6-diphényl-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazine-4,4''-acide disulfonique), et déterminé que la constante d'affinité de Cu(I) pour ces peptides est de l'ordre de 10^7 M $^{-1}$ [13]. L'affinité des peptides A β pour Cu(I) est donc assez faible comparativement à d'autres ligands biologiques, laissant envisager que le peptide A β est lié à Cu(II) plutôt qu'à Cu(I) dans les conditions physiologiques.

Aspect dynamique de la coordination

L'aspect dynamique de la coordination des ions Cu(I) et Cu(II) (et également Fe(II) et Zn(II)) au peptide A β est apparu lors des études par spectroscopie RMN. Par exemple, en ce qui concerne Cu(II), plusieurs ligands équivalents, comme les quatre fonctions carboxylates d'une part et les trois fonctions imidazoles d'autre part, étaient affectés de la même façon dans l'espèce I, alors que pour l'espèce II, seule la fonction carboxylate de l'Asp1 est affectée et les équilibres ne concernent plus que les trois fonctions His. La présence d'équilibres entre fonctions équivalentes pour une même position de coordination a ainsi pu être mise en évidence. De même, pour Cu(I), les trois résidus imidazoles des His sont affectés en RMN, mais seuls deux d'entre eux se lient simultanément à Cu(I), d'où la présence d'équilibre entre les trois différents couples d'histidine. La présence de ces différents équilibres et de la dynamique de coordination qui en résulte est liée d'une part à la flexibilité du peptide et donc à l'absence de contraintes stériques imposant un ligand plutôt qu'un autre, et d'autre part aux affinités relativement faibles conduisant à l'échange rapide des ions métalliques entre peptides⁽¹⁾.

Les propriétés redox du couple Cu(I)/Cu(II)-A β

Comme nous l'avons vu précédemment, les géométries respectives des complexes de Cu(II) et de Cu(I) sont sous forme de pyramide à base carrée et linéaire (figure 5). Dans ce contexte, il est relativement difficile d'envisager un transfert électronique direct rapide, car il est associé à une forte réorganisation autour du centre métallique. Les données obtenues par électrochimie (voltamétrie cyclique) peuvent s'expliquer en considérant le mécanisme présenté sur la

figure 8, qui fait intervenir un état intermédiaire dans lequel la géométrie du centre métallique dépend peu du degré d'oxydation. Dans l'état d'oxydation + I (resp. + II), cette espèce intermédiaire est en équilibre avec le complexe Cu(I)-A β (resp. Cu(II)-A β). Cet état représente 1/1 000 des espèces en solution et ne peut donc être caractérisé spectroscopiquement. Par ailleurs, puisque sa géométrie dépend peu du degré d'oxydation, le transfert électronique y est extrêmement rapide. Le complexe Cu(I)-A β peut donc être oxydé et le complexe Cu(II)-A β réduit *via* cette espèce intermédiaire, dont la nature reste encore à élucider [17]. Il faut noter que l'existence de cet intermédiaire tout comme la possibilité d'équilibre avec les espèces « stables » (Cu(I)-A β et Cu(II)-A β) est imputable à la dynamique de coordination des systèmes Cu-A β .

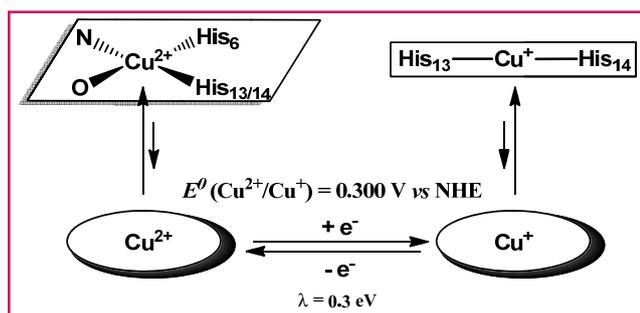


Figure 8 - Mécanisme proposé pour expliquer les propriétés redox du système Cu-A β (d'après [17]).

Fe(II)

La coordination des ions Fe au peptide A β est envisagée car une très forte quantité en Fe est retrouvée dans les plaques amyloïdes. Néanmoins, le fer s'y trouve principalement sous forme de ferritine. Il est donc question de savoir si l'interaction des ions Fe (Fe(II) et Fe(III)) avec le peptide A β peut avoir une pertinence biologique.

Nous avons montré par spectroscopie RMN qu'à pH physiologique, Fe(II) est capable d'interagir avec le peptide A β . En effet, tout comme pour Cu(II), le paramagnétisme de Fe(II) (Fe(II) haut spin) induit un élargissement des signaux RMN du peptide. L'analyse de ces élargissements nous a conduits à proposer le modèle de coordination reproduit sur la figure 5 (p. 33). L'ion Fe(II) est lié par l'amine N-terminale, la fonction carbonyle adjacente, le noyau imidazole de l'His6 et la fonction carbonyle adjacente, un noyau imidazole de l'His13 ou de l'His14, et une fonction carboxylate de l'Asp1 ou de Glu3 [18].

Nous avons donc réussi à démontrer la possibilité d'une interaction Fe(II)-A β en conditions proches des conditions physiologiques. L'enjeu est maintenant de déterminer l'affinité de Fe(II) pour le peptide A β . Par ailleurs, il n'existe pas d'interaction avec Fe(III), ce qui est dû à la très grande stabilité de l'hydroxyde de Fe(III) à pH physiologique.

Zn(II)

En ce qui concerne la coordination de l'ion Zn(II), de configuration d^{10} , tout comme le Cu(I), des études par spectroscopies d'absorption X et de RMN et qui ne seront pas détaillées ici (études par d'autres groupes [19-20] et études en cours dans notre équipe) aboutissent actuellement au modèle de coordination présenté sur la figure 5. Deux espèces sont rencontrées autour de pH physiologique. Dans

l'espèce I, prédominante, l'ion Zn(II) est pentacoordiné et lié par les trois groupements imidazoles des His et les fonctions carboxylates de l'Asp1 et du Glu11. Dans l'espèce II, la fonction amine terminale remplace le groupement imidazole de l'His13.

En ce qui concerne l'affinité du peptide pour Zn(II), une valeur de l'ordre de 10^{-6} M^{-1} a été proposée dans la littérature [21].

Remarque conclusive

Il apparaît donc que la nature de l'ion central joue un rôle prépondérant dans la structure du système ion métallique-A β (figure 5), ce qui est un phénomène directement lié : (i) à la flexibilité du peptide, qui n'impose pas de contraintes structurales, contrairement à la majorité des métalloprotéines qui sont structurées tridimensionnellement, et (ii) aux multiples possibilités de ligands disponibles dans la séquence du peptide (dans le cas du peptide A β , trois His, la fonction amine terminale, quatre fonctions carboxylates, les fonctions amides, etc.).

La coordination des ions Cu(II) à d'autres peptides amyloïdes

Deux cas nous ont plus particulièrement intéressés, à savoir la coordination de Cu(II) au (i) peptide murin (rat et souris) et (ii) au peptide tronqué en position N-terminale, commençant par le Glu3, ainsi qu'à la forme pyroglutamate correspondante (figure 3 p. 32).

(i) Le peptide murin possède trois mutations par rapport au peptide humain, à savoir R5G (mutation de l'arginine en position 5 en glycine), Y10F (mutation de la tyrosine en position 10 en phénylalanine) et H13R (mutation de l'histidine en position 13 en arginine). De plus, contrairement à l'Homme, les souris et les rats ne développent pas la maladie d'Alzheimer. Il est donc intéressant d'envisager une corrélation entre une possible différence de coordination des ions métalliques (due à la différence de séquence peptidique) et un comportement différent vis-à-vis du développement de la maladie. Pour cela, il faut comparer l'environnement de Cu(II) lorsqu'il se lie aux peptides humain ou murin. À noter également que, puisque ne développant pas la maladie et ne possédant pas le peptide humain, les souris utilisées comme modèles sont transgéniques, *i.e.* elles sont modifiées pour produire en grande quantité le peptide humain.

(ii) Les peptides modifiés en position N-terminale sont retrouvés en grande quantité dans les plaques séniles et sont davantage toxiques que le peptide A β complet car ils sont capables de déclencher l'agrégation. Là encore, il faut comparer l'environnement de Cu(II) lorsqu'il se lie au peptide humain entier ou à ses formes tronquées, pour pouvoir relier des modifications de la sphère de coordination à des capacités d'agrégation différentes.

Dans le paragraphe suivant, pour plus de clarté, le peptide humain sera noté hA β , le peptide murin mA β , le peptide tronqué en position N-terminale tA β , et la forme pyroglutamate correspondante pA β (figure 3 p. 32).

Peptide amyloïde murin

L'objectif est de comprendre l'origine de la différence de toxicité entre les peptides humain et murin en relation avec l'influence de ces trois mutations sur la complexation de Cu(II). Par des techniques similaires à celles développées pour l'étude de la coordination de Cu(II) à hA β et réalisées sur

différents mutants (R5G, Y10F, H13R, R5GH13R et peptide mA β), nous avons montré que :

- la coordination des ions Cu(II) diffère sensiblement entre hA β et mA β , comme cela avait déjà été montré par des études en potentiométrie [22] ;
- dans le cas du peptide mA β , les deux espèces I et II, dont les premières sphères de coordination de Cu(II) sont proches de celles rencontrées dans le cas du peptide hA β , présentent un pKa(I/II) très inférieur à celui rencontré dans le cas du peptide hA β (pKa = 6,2 vs. 7,8) ;
- la mutation à l'origine de cette différence est R5G : en effet, lorsque la position 5 est occupée par une glycine (mA β), il est plus facile de déprotoner la liaison Gly5-His6 que la liaison Asp1-Ala2. Au contraire, lorsque la position 5 est occupée par une arginine (hA β), il est plus facile de déprotoner la liaison Asp1-Ala2 que la liaison Arg5-His6. Ceci est dû principalement à l'encombrement et/ou à la charge de l'arginine qui empêche la déprotonation de la liaison Arg5-His6 rencontrée dans le peptide humain [11].

Cette différence de coordination de Cu(II) entre les deux peptides (figure 6 p. 33) a plusieurs conséquences :

- À pH physiologique, l'affinité de Cu(II) est environ trois fois plus grande pour le peptide mA β que pour le peptide hA β . Ceci corrèle avec le fait qu'une plus forte concentration en Cu-hA β est détectée dans les plaques extraites de cerveaux humains plutôt que de souris transgéniques [23]. En effet, chez les souris transgéniques, la présence de peptide mA β (en plus du peptide hA β) contribue à appauvrir la concentration en Cu disponible pour se lier au peptide hA β .
- La réduction de Cu(II) en Cu(I) par l'ascorbate est plus lente dans le cas du peptide murin (environ trois fois). Cette étape étant la première du cycle de formation des ROS, le complexe Cu-mA β produirait plus lentement des ROS que son homologue Cu-hA β .
- Il n'est pas possible d'induire la formation des formes tronquées (toxiques, voir ci-après) en position 3. En effet, dans le cas du peptide humain, l'hydrolyse de la liaison peptidique CO(Ala2)-NH(Glu3) serait facilitée par la coordination de Cu(II) à la fonction carbonyle CO(Ala2) et à la déstabilisation de la liaison peptidique. Or, dans le cas du peptide mA β , cette fonction carbonyle n'est pas impliquée dans la coordination de Cu(II).

Peptides tronqués en position N-terminale

L'objectif est de mettre en évidence un lien entre des coordinations différentes de Cu(II) avec le peptide humain entier (hA β) et ses formes tronquées (tA β) et le rôle particulièrement délétère des peptides tA β au niveau de l'agrégation.

Par une étude spectroscopique complète (RPE, RMN et dichroïsme circulaire), nous avons montré que la coordination de Cu(II) au peptide tA β différait de celle du peptide hA β , en particulier par la présence de trois formes autour du pH physiologique (figure 9), dont une espèce II majoritaire, et par la nature des métallacycles présents dans les formes II (deux métallacycles adjacents pour hA β et deux métallacycles indépendants pour tA β). Ceci est principalement dû à la nature des chaînes latérales qui modifient les pKa de déprotonation des fonctions peptidiques adjacentes [24].

En ce qui concerne la coordination de Cu(II) au peptide pA β , elle diffère significativement de celle observée pour hA β , ce qui est principalement dû à l'impossibilité de lier l'amine N-terminale à Cu(II). À pH physiologique, deux espèces prédominent, où Cu(II) est lié par un imidazole d'un résidu His et une ou deux fonctions amides déprotonées

adjacentes. Les plans équatoriaux sont complétés soit par des noyaux imidazole des His, soit par des fonctions carbonyles.

L'affinité pour Cu(II) de ces trois peptides suit la tendance hA β > tA β >> pA β . L'étude de l'impact de ces différences de coordination sur la réactivité des complexes de Cu(II) vis-à-vis de l'agrégation des peptides hA β et tA β est actuellement en cours.

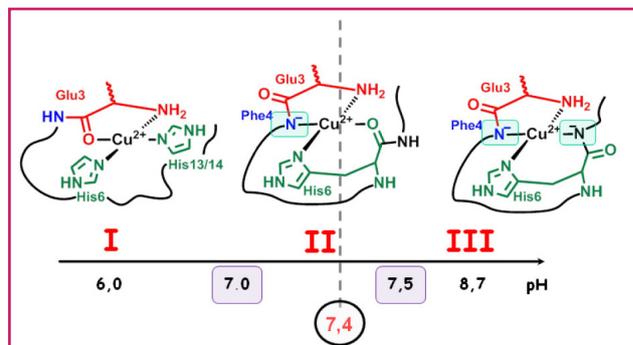


Figure 9 - Modes de coordination de l'ion Cu(II) par le peptide tA β , à comparer avec ceux du peptide hA β (figure 6) (d'après [24]).

Coordination = fonction de la séquence

Par ces deux exemples, il apparaît que la nature des chaînes latérales des acides aminés a une importance prépondérante sur la coordination de Cu(II), et ce même lorsque ces chaînes latérales ne sont pas directement impliquées dans la liaison avec le centre métallique. Autrement dit, des effets de seconde sphère impactent le site de coordination de l'ion Cu(II).

Conclusions et perspectives

Au cours de ces premières recherches, nous avons montré que le site de coordination des centres métalliques à des peptides flexibles du type A β est gouverné par la nature de l'ion métallique (contrairement à ce qui est rencontré dans des métalloprotéines possédant une structure 3D), par des effets de première sphère (natures des acides aminés impliqués dans la liaison avec le centre métallique) et également des effets de seconde sphère (natures des acides aminés *non* impliqués dans la liaison avec le centre métallique). Nous avons également déterminé l'affinité de ces différents ions pour le peptide A β . En liaison avec des affinités assez faibles, nous avons mis en évidence que ces ions sont labiles et qu'ils s'échangent rapidement entre peptides. La flexibilité du peptide ainsi que l'aspect dynamique de la coordination impactent de façon néfaste les propriétés redox du système Cu-A β . La labilité des ions métalliques joue quant à elle un rôle important sur l'induction de l'agrégation du peptide A β , phénomène qui n'a pas été détaillé ici.

Ces données fondamentales ont conduit au développement d'une nouvelle thématique de recherche basée sur l'interaction de complexes de Pt(II) et de Ru(II), plus inertes cinétiquement que les ions Cu(I/II), Zn(II) et Fe(II) mais tout aussi aptes à se lier aux résidus histidine de la chaîne peptidique. Il est donc envisagé d'empêcher la coordination des ions « toxiques » par des complexes d'ions platinoïdes [8, 25]. Dans ce contexte, nous avons récemment obtenu des premiers résultats très encourageants à l'aide d'un complexe de Pt(II) [26-27]. Nous avons montré en effet sa capacité à se lier au peptide A β , à en inhiber l'agrégation induite par le zinc mais pas la production de ROS par le complexe

Cu-A β . Ceci est dû au fait que le complexe de Pt(II) étudié se lie au peptide via Glu11 et His13, deux résidus essentiels à la coordination du zinc mais pas du cuivre. Il faut noter ici que l'effet obtenu est donc spécifique de l'ion métallique (Cu ou Zn). Néanmoins, la cytotoxicité des complexes de platine met en cause une utilisation thérapeutique ultérieure. Nous avons donc initié l'étude de complexes de Ru(II) moins cytotoxiques.

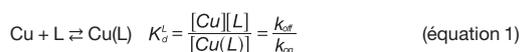
Une autre stratégie envisagée repose sur le développement de ligands du cuivre (Cu(II) [28-29] et Cu(I)) et du zinc capables d'empêcher la coordination de ces ions aux peptides A β .

Par ailleurs, des molécules de ciblage des agrégats amyloïdes sont développées dans l'équipe depuis plusieurs années [30]. Après liaison avec les composés décrits précédemment (complexes de ruthénium et ligands des ions Cu et Zn), elles devront en augmenter la sélectivité pour les formes oligomères des peptides A β , formes considérées comme les plus toxiques, et également diminuer leurs interactions avec d'autres molécules biologiques, responsables d'effets secondaires non désirés.

L'auteur tient à remercier les personnes qui ont contribué aux travaux et résultats présentés dans cet article, à savoir les collaborateurs (Pierre Dorlet, Véronique Balland, Jean-Michel Savéant, Pier-Lorenzo Solari, Emmanuel Guillon, Stéphanie Sayen, Giovanni La Penna et Fabrice Collin), les RMNistes du LCC (Yannick Coppel et Christian Bijani), ainsi que les étudiants, doctorants et postdoctorants (Hélène Eury, Emelyne Rénaglia, Fatima Bousejra-El Garah, Sabrina Noël et Bruno Aliès) et les collègues actuels de l'équipe « Chimie Biologique » du LCC (Viviane Peyrou et Emmanuel Gras) et ancienne collègue (Isabelle Sasaki), et enfin le responsable de notre équipe, Peter Faller. Un très grand merci à ce dernier pour son accueil, ses conseils et la grande liberté d'action qu'il laisse à ses collaborateurs ! Le CNRS, l'ANR ainsi que les plateformes techniques du Laboratoire de Chimie de Coordination et de l'Institut de Chimie de Toulouse sont remerciés pour leur soutien scientifique et financier.

Note et références

- (1) La constante d'affinité et les vitesses de complexation et de décomplexation sont liées par l'équation 1. Il est supposé que la vitesse de formation est limitée par la diffusion (éq. 1). Étant données les valeurs des constantes d'affinités, les vitesses de décomplexation sont assez rapides et les centres métalliques s'échangent donc rapidement entre peptides.



- [1] www.alz.org
 [2] Holtzman D.M., Morris J.C., Goate A.M., Alzheimer's disease: the challenge of the second century, *Sci. Transl. Med.*, **2011**, 3, p. 77sr1.
 [3] Faller P., Hureau C., Berthoumieu O., Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide, *Inorg. Chem.*, **2013**, 52, p.12193.
 [4] Noël S., Cadet S., Gras E., Hureau C., The benzazole scaffold: a SWAT to combat Alzheimer's disease, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, p. 7747.
 [5] Chassaing S., Collin F., Dorlet P., Gout J., Hureau C., Faller P., Copper and heme-mediated A β toxicity: redox chemistry, A β oxidations and anti-ROS compounds, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2012**, 12, p. 2573.
 [6] Hureau C., Faller P., A β -mediated ROS production by the Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease, *Biochimie*, **2009**, 91, p. 1212.
 [7] Hureau C., Coordination of redox active metal ions to the APP and to the amyloid- β peptides involved in AD. Part 1: an overview, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, p. 2164.
 [8] Valensin D., Gabbiani C., Messori L., Metal compounds as inhibitors of β -amyloid aggregation. Perspectives for an innovative metallotherapeutics on Alzheimer's disease, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, p. 2357.
 [9] Hureau C., Coppel Y., Dorlet P., Solari P.L., Sayen S., Guillon E., Sabater L., Faller P., Deprotonation of the Asp1-Ala2 peptide bond induces modification of the dynamic copper(II) environment in the amyloid- β peptide near physiological pH, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, 48, p. 9522.
 [10] Dorlet P., Gambarelli S., Faller P., Hureau C., Pulse EPR spectroscopy reveals the coordination sphere of copper(II) ions in the 1-16 amyloid- β

peptide: A key role of the first two N-terminus residues, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, 48, p. 9273.

- [11] Eury H., Bijani C., Faller P., Hureau C., Cu^{II} coordination to amyloid- β : murine versus human peptide, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2011**, 50, p. 901.
 [12] Faller P., Hureau C., Le rôle des ions métalliques dans la maladie d'Alzheimer : apport de la spectroscopie d'absorption X, *L'Act. Chim.*, **2011**, 356-357, p. 88.
 [13] Aliès B., Renaglia E., Rozga M., Bal W., Faller P., Hureau C., Cu(II) affinity for the Alzheimer's peptide: tyrosine fluorescence studies revisited, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, p. 1501.
 [14] Shearer J., Szalai V.A., The amyloid- β peptide of Alzheimer's disease binds Cu^I in a linear bis-His coordination environment: Insight into a possible neuroprotective mechanism for the amyloid- β peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, p. 17826.
 [15] Hureau C., Balland V., Coppel Y., Solari P.L., Fonda E., Faller P., Importance of dynamical processes in the coordination chemistry and redox conversion of copper amyloid- β complexes, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, p. 995.
 [16] Furlan S., Hureau C., Faller P., La Penna G., Modeling the Cu^I binding in the 1-16 region of the amyloid- β peptide involved in Alzheimer's disease, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, p. 15119.
 [17] Balland V., Hureau C., Savéant J.-M., Electrochemical and homogeneous electron transfers to the Alzheimer's amyloid- β copper complex follow a preorganization mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, p. 17113.
 [18] Bousejra-El-Garah F., Bijani C., Coppel Y., Faller P., Hureau C., Iron(II) binding to amyloid- β , the Alzheimer's peptide, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, p. 9024.
 [19] Migliorini C., Porciatti E., Luczkowski M., Valensin D., Structural characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, p. 352.
 [20] Tôugu V., Palumaa P., Coordination of zinc ions to the key proteins of neurodegenerative disease: A β , APP, α -synuclein and PrP, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, p. 2219.
 [21] Zawisza I., Rozga M., Bal W., Affinity of copper and zinc ions to proteins and peptides related to neurodegenerative conditions (A β , APP, α -synuclein, PrP), *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, p. 2297.
 [22] Kowalik-Jankowska T., Ruta-Dolejsz M., Wisniewska K., Kankiewicz L., Cu(II) interaction with N-terminal fragments of human and mouse beta-amyloid peptide, *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 86, p. 535.
 [23] Leskovic A.C., Lanzirotti A., Miller L.M., Increased brain iron coincides with early plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease, *Neuroimage*, **2009**, 47, p. 1215.
 [24] Aliès B., Bijani C., Sayen S., Guillon E., Faller P., Hureau C., Copper coordination to native N-terminally modified versus full-length amyloid- β : Second sphere effects determine the species present at physiological pH, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, p. 12988.
 [25] Barnham K.J., Kenche V.B., Ciccotosto G.D., Smith D.P., Tew D.J., Liu X., Perez K., Cranston G.A., Johanssen T.J., Volitakis I., Bush A.I., Masters C.L., White A.R., Smith J.P., Cherny R.A., Cappai R., Platinum-based inhibitors of amyloid-beta as therapeutic agents for Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, p. 6813.
 [26] Collin F., Sasaki I., Eury H., Faller P., Hureau C., Pt(II) compounds interplay with Cu(II) and Zn(II) coordination to the amyloid- β peptide has metal specific consequences on deleterious processes associated to Alzheimer's disease, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, p. 2130.
 [27] Sasaki I., Bijani C., Ladeira S., Bourdon V., Faller P., Hureau C., Interference of a new cyclometallated Pt compound with Cu binding to amyloid- β peptide, *Dalton Trans.*, **2012**, 41, p. 6404.
 [28] Jensen M., Canning A., Chiha S., Bouquerel P., Pedersen J.T., Østergaard J., Cuvillier O., Sasaki I., Hureau C., Faller P., Bi-functional peptide with β -sheet breaker and chelator moieties against Cu-amyloid- β , *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, p. 4836.
 [29] Noël S., Perez F., Ladeira S., Sayen S., Guillon E., Gras E., Hureau C., A new water-soluble Cu(II) chelator that retrieves Cu from Cu(A β) species and stop associated ROS production, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 117, p. 322.
 [30] Leuma Yona R., Mazères S., Faller P., Gras E., Thioflavin derivatives as markers for amyloid-beta fibrils: insights into structural features important for high-affinity binding, *ChemMedChem*, **2008**, 3, p. 63.



Christelle Hureau

est chargée de recherche au CNRS dans l'équipe « Chimie Biologique » au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) de l'Université de Toulouse*.

Elle a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2012.

* Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC), 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse.
 Courriel : christelle.hureau@ccc-toulouse.fr