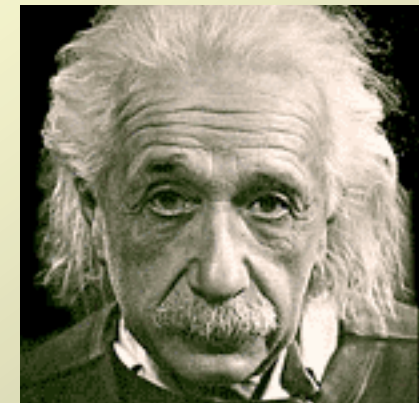
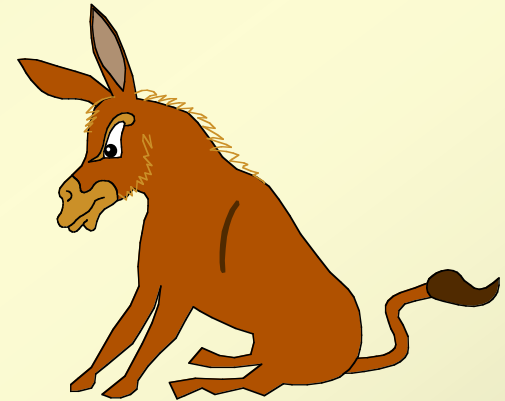


La nutrition ferrique des organismes vivants : du complexant moléculaire aux nanostructures autoassemblées

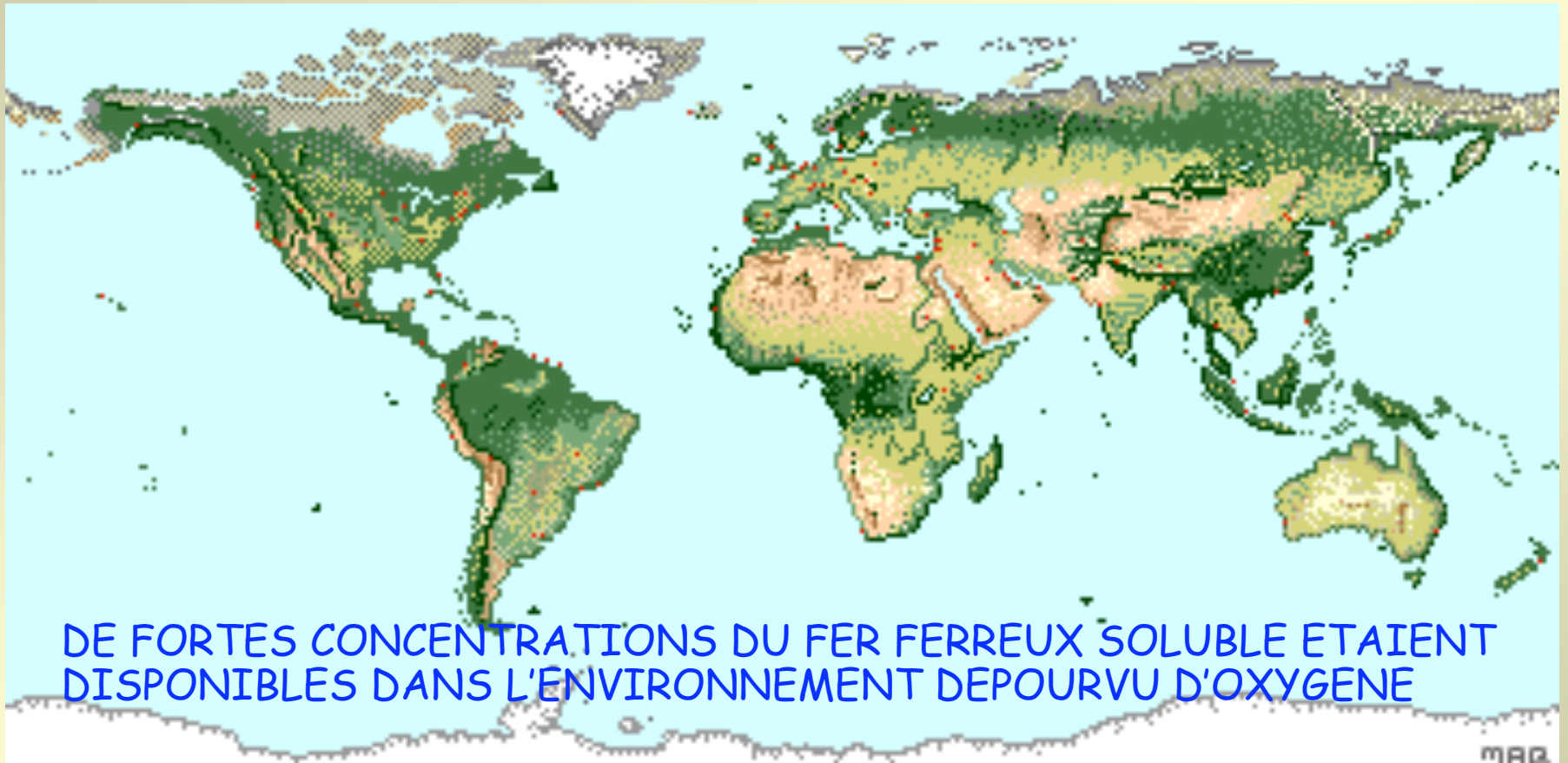
J.L. Pierre
Université de Grenoble

Le fer joue un rôle vital dans l'ensemble du règne vivant



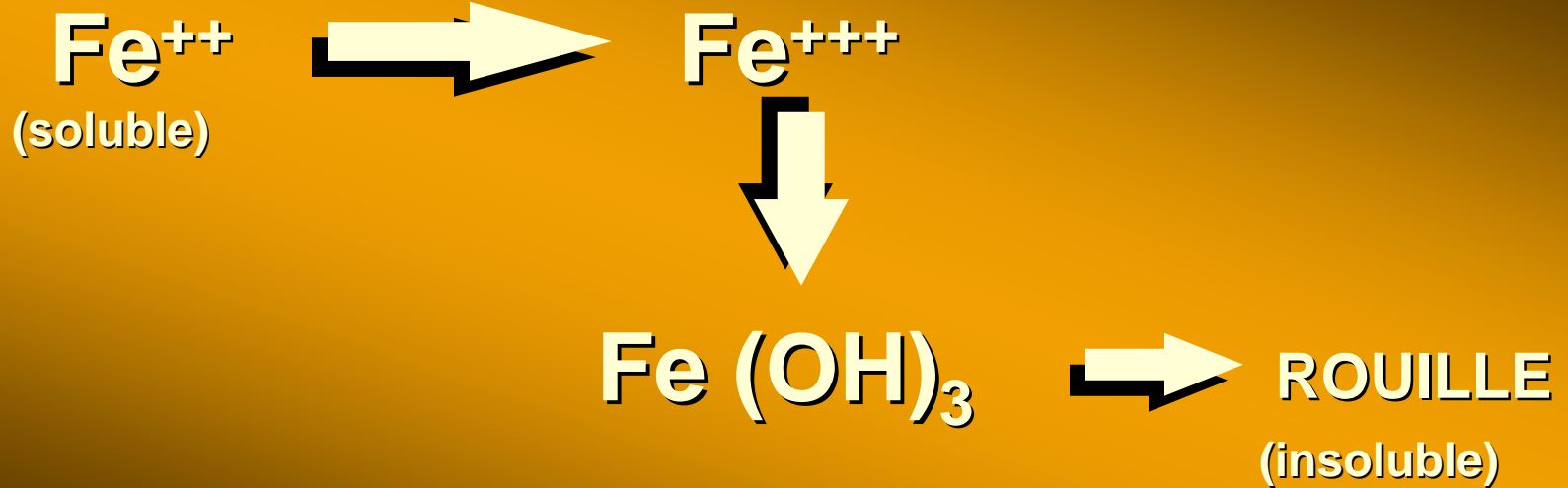
*Transport, stockage et activation de l'oxygène
Réduction des nucléotides et de l'azote
Transport d'électrons*

*Le fer est abondant dans la croûte terrestre
(deuxième élément après l'aluminium)*



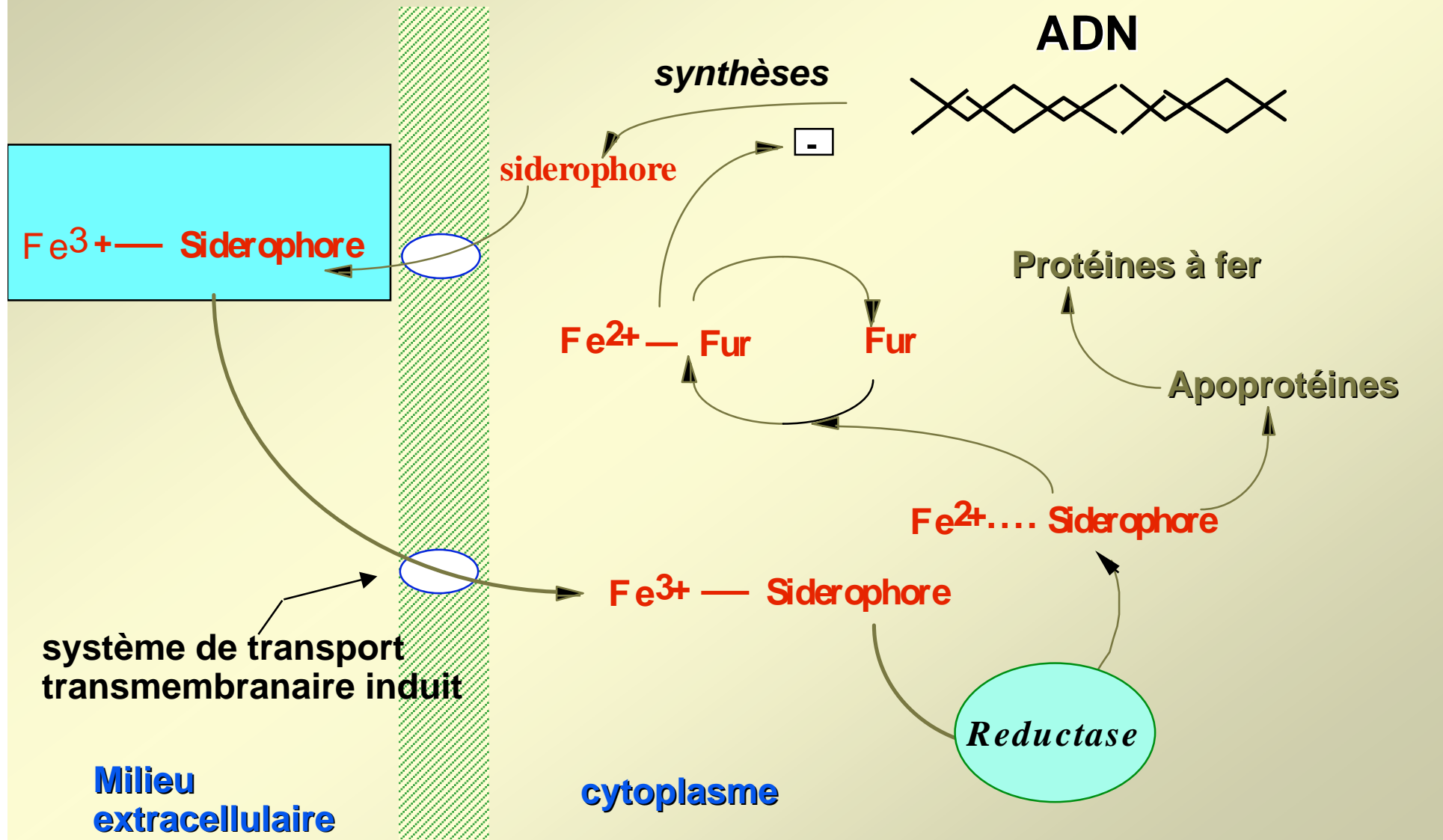
Les premiers ages de la vie ont utilisé le fer (II)

L'APPARITION DES ALGUES BLEUES (BACTERIES PHOTOSYNTHTIQUES) QUI ONT CONVERTI L'EAU EN OXYGENE A ENTRAINE L'OXIDATION DU FER FERREUX EN FER FERRIQUE INSOLUBLE



L'ARRIVEE DE O_2 FUT UN EVENEMENT FATAL A LA PLUPART DES ORGANISMES VIVANTS

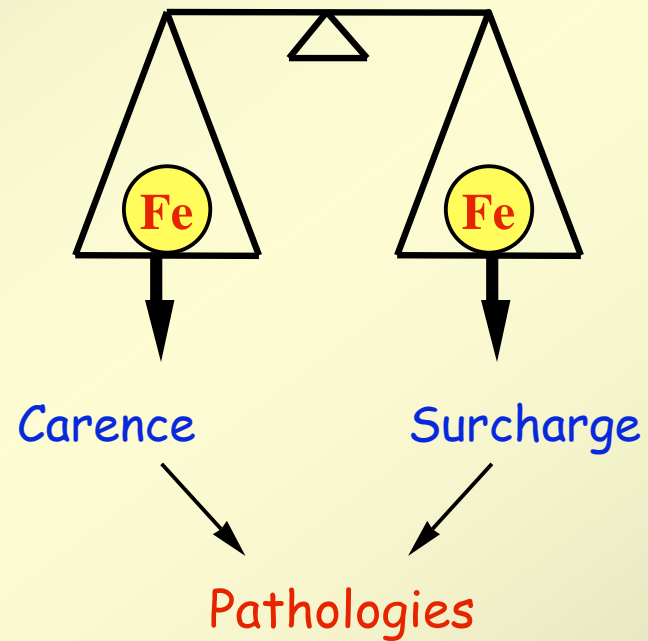
Réponse évolutive : les microorganismes ont synthétisé les siderophores (chélateurs du fer (III)) pour la solubilisation du fer et la nutrition cellulaire

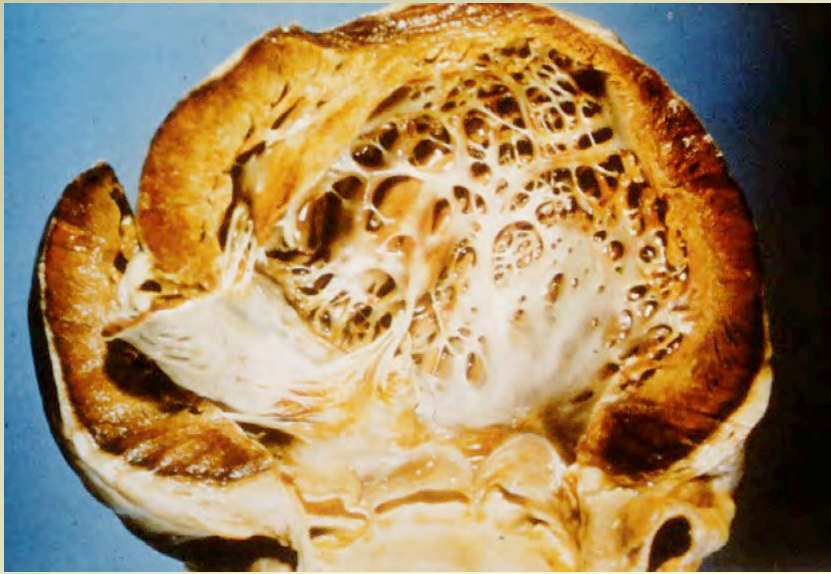


LE FER EST INDISPENSABLE A LA VIE ... MAIS LE FER EST TOXIQUE !

Surcharge en fer

Stress Oxydant





Des thérapeuthiques chélatrice sont utilisées contre la surcharge

Utilisations cliniques des chélateurs du fer

- ➔ Hémochromatose
- ➔ Thalassémie
- ➔ Effets antiprolifératifs (inhibition de RNR)
- ➔ Thérapeutique antioxydante
- ➔ Malaria
- ➔ Antibiothérapie (vecteur)

Quel rôle pour les chimistes ?

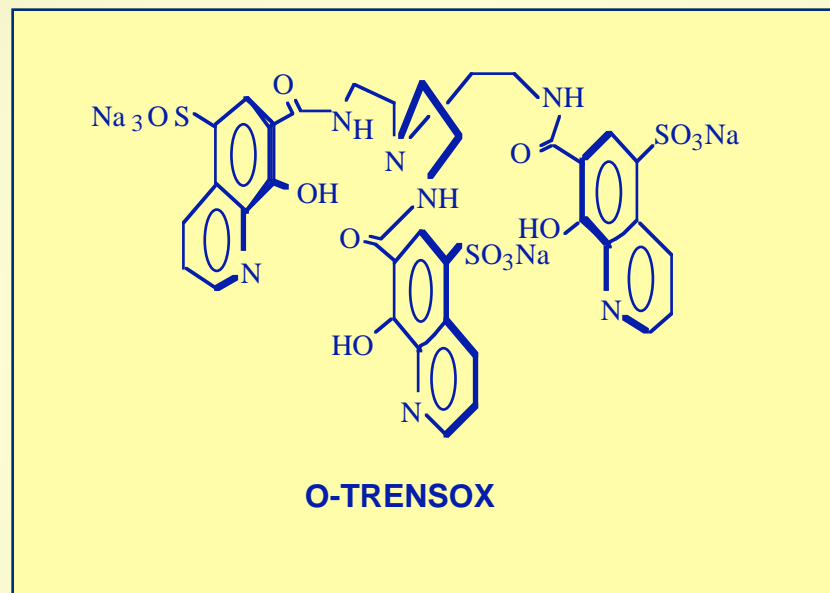
Complexes des Chélateurs du fer pour la nutrition végétale
Chélateurs du fer pour traiter les surcharges
Outils pour l'étude du métabolisme du fer

Une approche classique : « O-TRENDOX STORY »

En 1995, nous avons décrit O-TRENDOX, un nouveau chélateur aux propriétés prometteuses

(*J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 9760)

$$pFe_{III} = 29.5$$



TRENDOX (tris hydroxamate) : $pFe_{III} = 27.8$

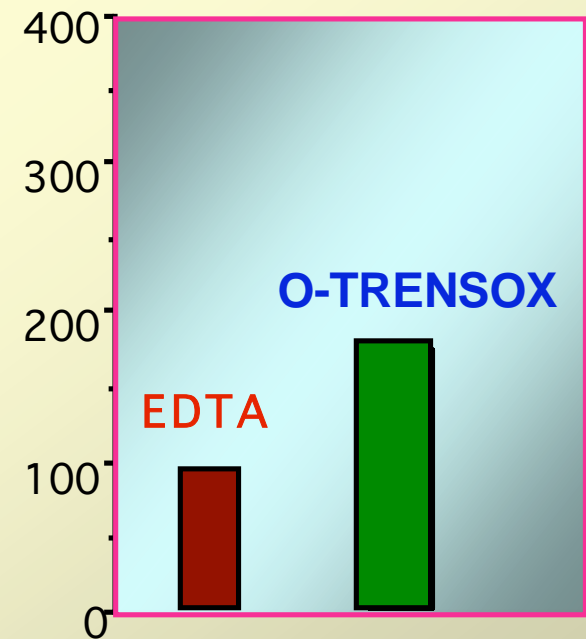
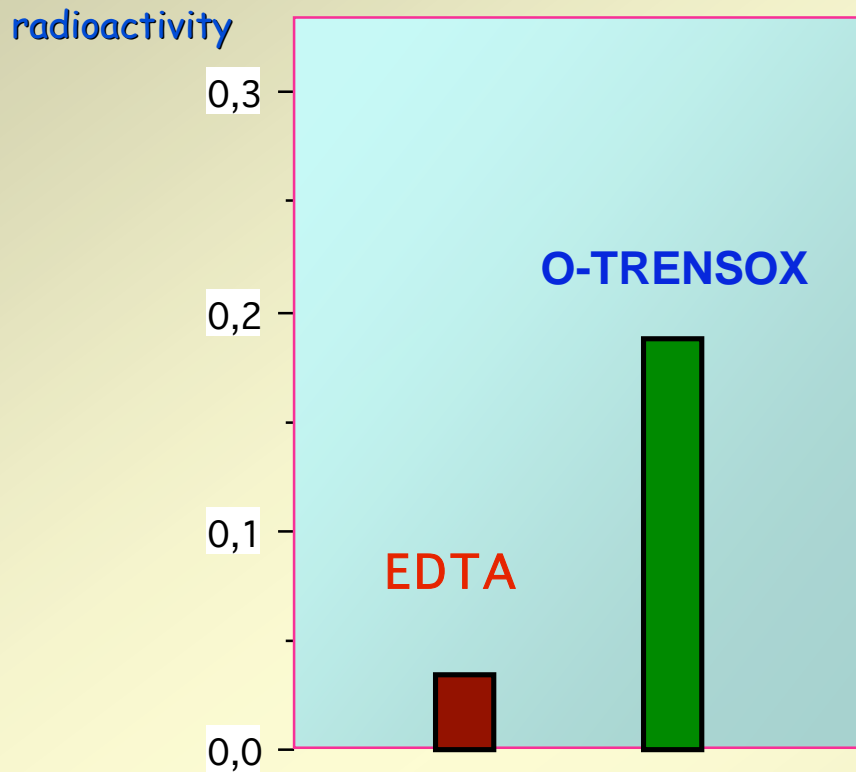
DEFERAL (tris hydroxamate) : $pFe_{III} = 26.6$

- Le complexe ferrique de O-TRENDOX n'est pas photoréduit
- Le complexe ferreux de O-TRENDOX ne catalyse pas la réaction de Fenton

Fe^{III}-O-TRENSOX est apte à prévenir ou traiter la chlorose
(Biochem. J. 1995, 312,879)



^{59}Fe incorporation into maple cells incubated during 17 h



^{59}Fe incorporation into ferritin of maple cells

O-TRENSOX montre une protection cellulaire par mobilisation du fer (hepatocytes de rats (in vitro and in vivo)

(Biochem Pharmacol. 1998, 55, 1797)

O-TRENSOX est doué d'effets antiprolifératifs
(European J. Pharmacol 2006, Biometals 2006)

Sélectivité de la complexation envers les ions métalliques d'intérêt biologique

(J. Inorg. Biochem. 2002)

| pFe(III) | pFe(II) | pCu(II) | pZn(II) | pCa(II) | pAl(III) |
|----------|---------|---------|---------|---------|----------|
| 29.5 | 17.9 | 22.8 | 21.7 | 7.2 | 19.9 |

A pH physiologique, O-TRENTOX complexe Fe^{3+} très sélectivement

Études cinétiques de la dissociation de Fe(III)-O-TRENTOX Par protonation (hydrolyse acide) (Inorg. Chem. 1997)

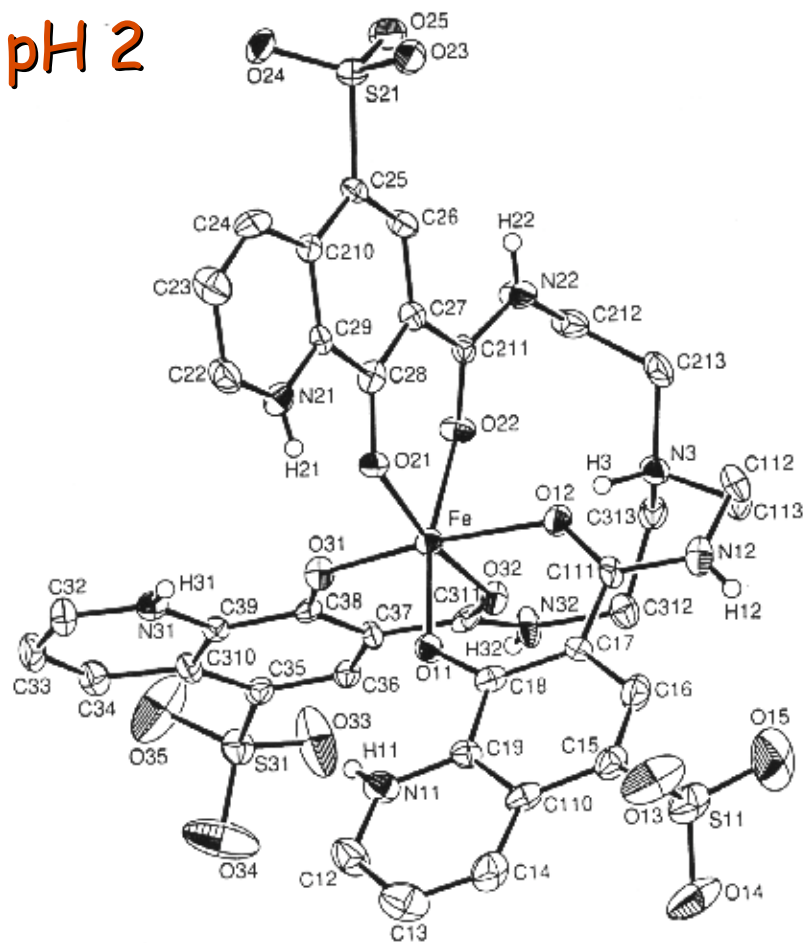
étape 1 : perte de l'un des 3 bras bidentates (2 protons ajoutés) $k > 5000 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$

étape 2 : un des 2 bras restant passe en coordination salicylate
(protonation de l'azote pyridinique ($k = 723 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$))

étape 3 : le dernier bras passe en coordination salicylate ($k = 5.56 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)

Le fer n'est pas "relâché" à pH 2

pH 2



(Inorg. Chem. 1999)

Une molécule très prometteuse

O-TRENOSX, mise au point par des chercheurs de l'université Joseph-Fourier, présente d'intéressantes propriétés pour la nutrition des plantes ainsi que pour le traitement des surcharges en fer chez l'homme

Elle s'appelle "O-TRENOSX". Et les chimistes de l'université Joseph-Fourier (associés au CNRS) qui ont mis au point cette molécule ou ce "nouvel agent chélateur du fer hydro-soluble" (traduisez : cette nouvelle molécule soluble dans l'eau qui capte le fer) disent qu'il "est potentiellement important pour d'intéressantes propriétés biologiques mises en évidence, tant dans le domaine de la nutrition des plantes que dans l'optique du traitement des surcharges en fer chez l'homme".

Le potentiel de ce produit n'est d'ailleurs pas passé inaperçu aux yeux de la recherche internationale

plantes. Ces dernières utilisent d'ailleurs différentes stratégies pour capter le fer dont elles ont besoin. Cela étant, elles peuvent développer des syndromes de déficience en fer (chlorose ferrique) en particulier dans les sols calcaires qui représentent environ le tiers de la surface terrestre. Pallier ce problème est évidemment fondamental pour l'agriculture.

Bien sûr il existe déjà des produits de traitement mais qui, à l'usage, ne se révèlent pas totalement satisfaisants. Des études en milieu neutre ont déjà montré que le complexe ferrique de "O-TRENOSX" était capable de potentialiser l'absorption de



Au cours d'une opération de repiquage cellulaire

surcharge. Une surabsorption accidentelle de fer (des gens sont morts pour avoir bu de la bière avariée dans des boîtes en fer, l'acidité de la bière ayant solubilisé le fer) ou un

but de mettre au point un agent efficace administrable par voie orale. O-TRENOSX, soluble dans l'eau, pourrait répondre à cette exigence. En outre, des résultats

Un nouveau chélateur du fer hydrosoluble

Nutrition des plantes et thérapeutiques chélatrices

Des chimistes de l'Université J. Fourier de Grenoble ont mis au point un nouvel agent chélateur du fer hydrosoluble, potentiellement important pour des applications biologiques. Le composé, O-TRENTOX, possède une forte affinité à la fois pour le fer (III) et le fer (II), ce qui est très rare. De plus, le complexe ferrique n'est pas photoréductible et le complexe ferreux ne catalyse pas la réaction de Fenton productrice de radicaux hydroxyles hautement toxiques, ce qui constitue un avantage majeur. A Grenoble, mais aussi dans le cadre de collaborations induites par le GDR 1154 « Transport du fer dans les systèmes biologiques », d'intéressantes propriétés biologiques ont déjà été mises en évidence, tant dans le domaine de la nutrition des plantes que dans l'optique du traitement des surcharges en fer chez l'homme.

SCIENCE/TECHNOLOGY CONCENTRATES

Phosphate fertilizer verses lake acidification

searchers in England have shown that treating an acid lake with small amounts of phosphate fertilizer can increase biological productivity and restore the pH of the lake to pre-acidification levels. Environmental science professor William Davison and doctoral student Neil J. A. Edwards at Lancaster University, and D. Glen George, a research group leader at the Institute of Freshwater Ecology, Ambleside, conducted a three-year experiment on Seathwaite Tarn, a reservoir in the English Lake District. They report that the pH increased about 0.5 within the range pH 5 to 6 over a two-year period of fertilization with "modest amounts" of a concentrated solution of sodium phosphate [*Nature*, 377, 504 (1995)]. The team points out that algal production is an important factor in controlling the long-term acidity of lakes. Addition of phosphate stimulates growth of phytoplankton, which assimilate nitrate from the water, resulting in the generation of basic hydroxide ion. "The increase in primary productivity is very modest and certainly does not approach eutrophic conditions," Davison tells C&EN. The team suggests the treatment could be used to combat acidity in waters throughout Europe where there are increasingly high concentrations of nitrate.

New chelator has potential for plant nutrition, iron therapy

Chemists at Joseph Fourier University, Grenoble, France, have designed a hydroxyquinoline-based iron chelator with essentially important biological applications. The compound, called O-Trensox, has high affinity for both iron(III) and iron(II) [*J. Am. Chem. Soc.*, 117, 9760 (1995)]. Its iron(II) complex does not catalyze so-called Fenton reactions that

Barry M. Trost and postdoctoral fellow Shon R. Pulley, advances the efforts to develop a practical and efficient synthesis of (+)-pancratistatin, a subject of intense interest because of its antimitotic properties. Earlier work by Samuel J. Danishefsky of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York City, and Columbia University resulted in synthesis of the racemic mixture. Then, Tomas Hudlicky and coworkers at Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, completed the first total asymmetric synthesis (C&EN, April 10, page 31). Their route gave a yield of 2% from a diol prepared by whole-cell bacterial oxidation of bromobenzene. By comparison, the Stanford method gives a yield of 11% from the starting diol and an overall yield of 7% from benzoquinone.

IUPAC invites comments on heavy-element names

The International Union of Pure & Applied Chemistry has made its controversial recommendations on names and symbols of transfermium elements available for comment. It has distributed the provisional recommendations to 19 national and regional centers around the world and requested that they be published in chemistry journals or magazines. The report, which reverted from definitive to provisional status in August (C&EN, Aug. 21, page 4), was originally published in the union's official journal *Pure & Applied Chemistry* [66, 2419 (1994)]. American Chemical Society members can obtain copies from Mary E. Scardan, Journals Department, American Chemical Society, 2540 Olentangy River Rd., P.O. Box 3330, Columbus, Ohio 43210; phone (614) 447-3600, ext. 3171; fax: (614) 447-3745. Comments on the recommendations should be sent by May 31, 1996, to Alan M. Sargeson, Research School of Chemistry, Australian National University, Canberra, ACT 0200, Australia.

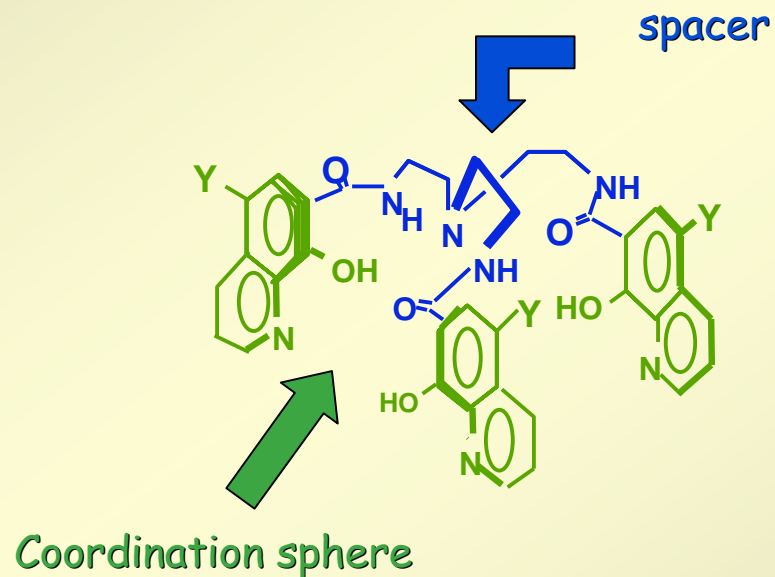


Partant des propriétés prometteuses de O-TRENTOX,

Comment moduler le ligand, pour en améliorer les capacités ?

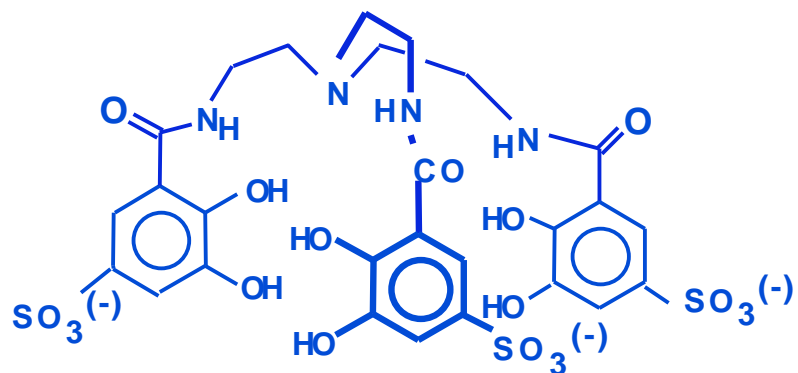
Première approche:

Modification de la sphère de coordination



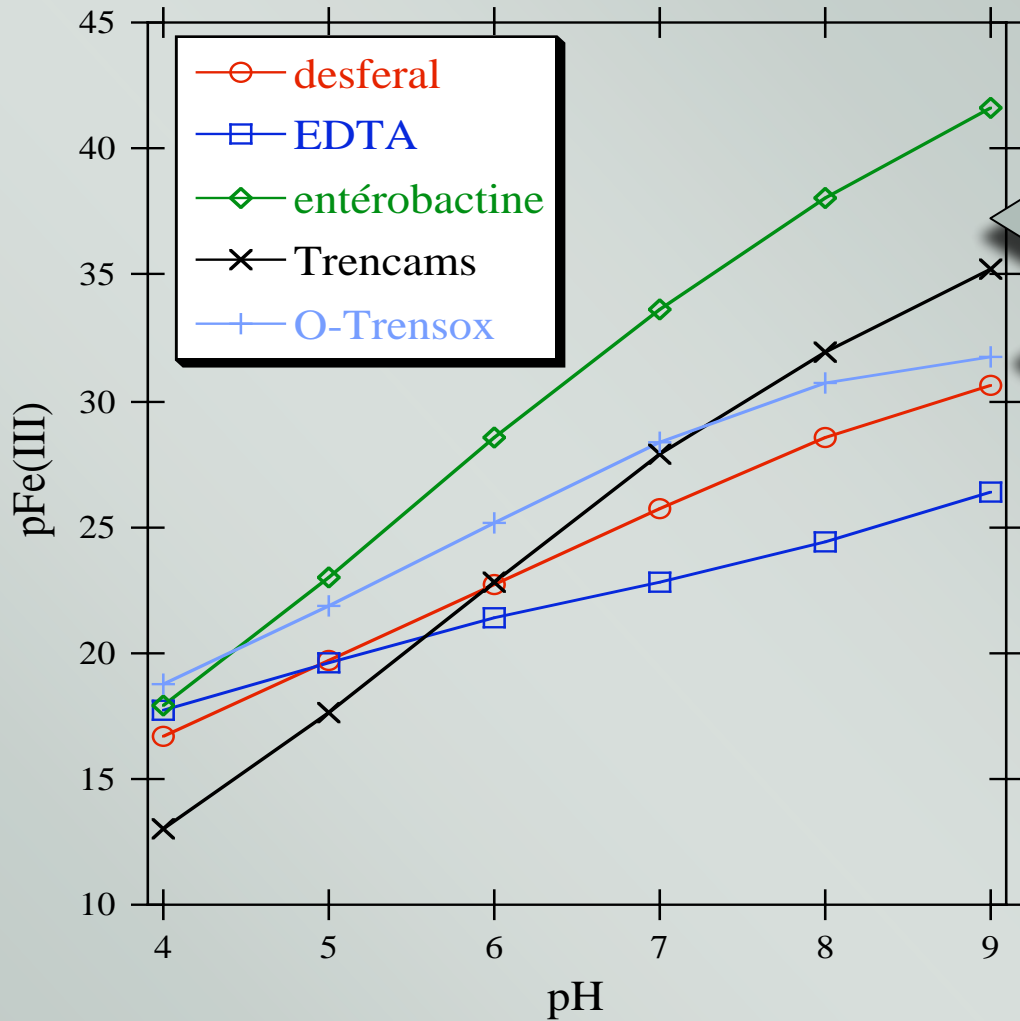
Modulation de la complexation en fonction du pH par des ligands mixtes

Etudes préliminaires : Le ligand TRENCAMS
(Inorg. Chem. Acta 1999)



pFe : 29.6

Dépendance pFe(III) au pH

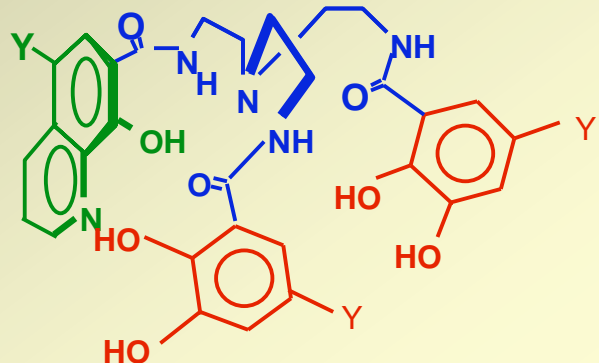


TRENCAMS est le chélateur synthétique le plus puissant dans la zone pH : 7.4 - 9

O-TRENSEX est le plus puissant dans la zone pH : 3-7

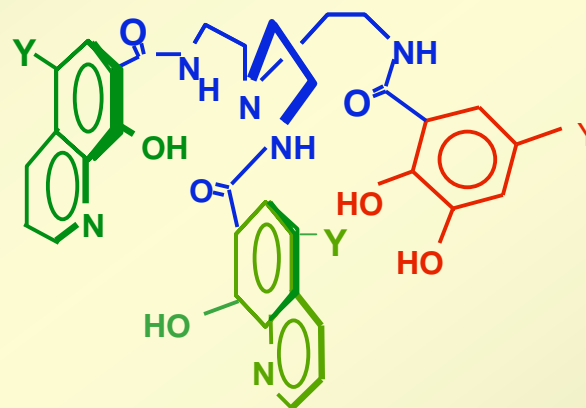
Des ligands mixtes impliquant des sous-unités catécholate et hydroxyquinolinolate ont été préparés pour une forte chélation sur toute la gamme de pH

(Eur. J. Inorg. Chem. 2003)



TRENsoxcams 2
(Y = SO₃⁻)

↓
pFe : 32.2

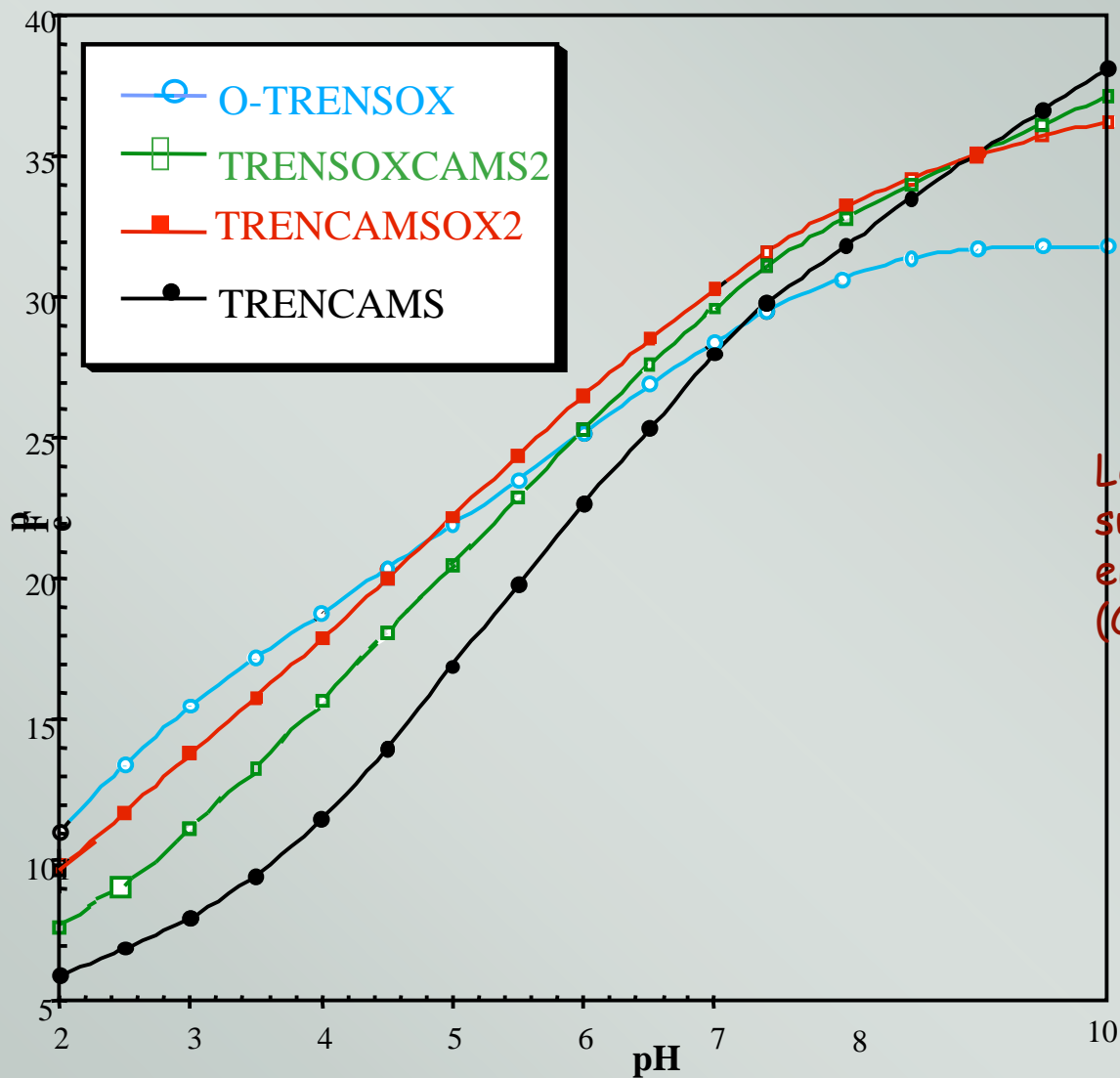


TRENcamssox 2
(Y = SO₃⁻)

↓
pFe : 30.2

Les ligands mixtes sont des chélateurs plus puissants que ceux à bras identiques

Dépendance au pH de pFe(III)

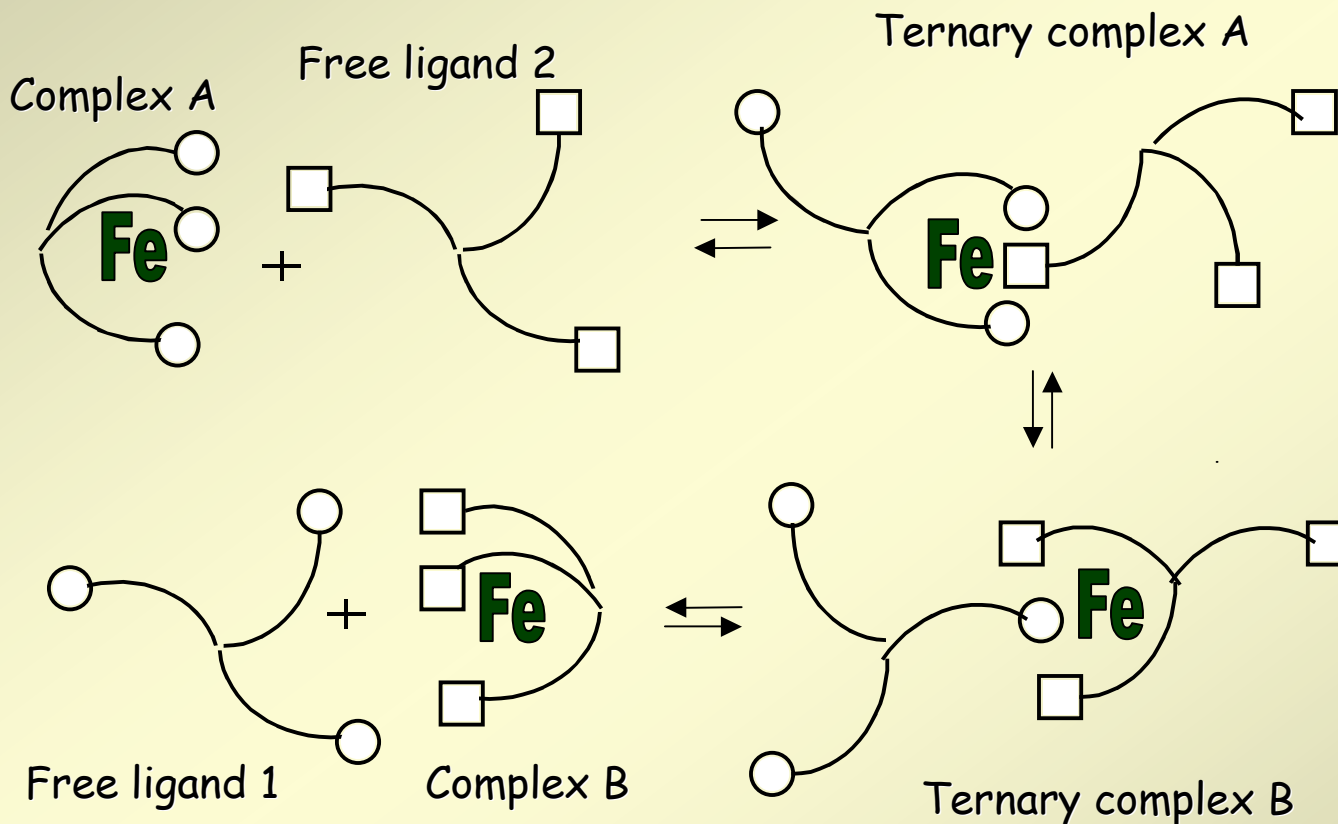


8-HQ est supérieur à Cat à pH < 5 (plus basse constante de protonation)

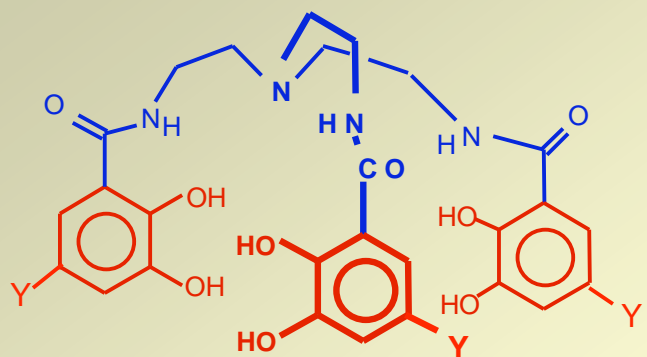
Cat est supérieur à 8-HQ à pH > 8

Les ligands mixtes sont supérieurs sur une grande gamme de pH, en particulier à pH neutre (Coopérativité de 8-HQ et Cat)

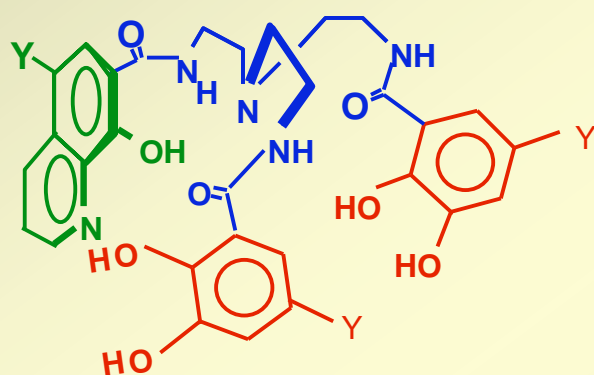
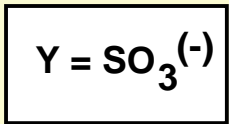
IRON EXCHANGE PROCESS BETWEEN TWO CHELATORS : a ternary complex ?



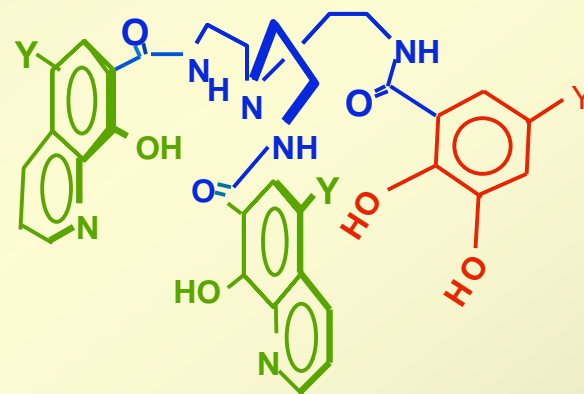
Circles : bidentate hydroxyquinolate subunits
Squares : bidentate catechololate subunits



TRENOCAMS

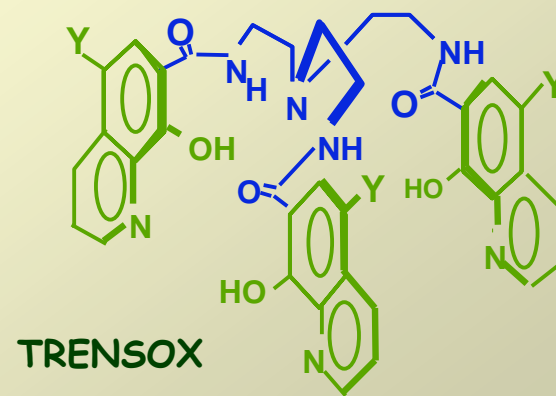


Iron-TRENOCAMSSOX2 : a model for ternary Complex 1



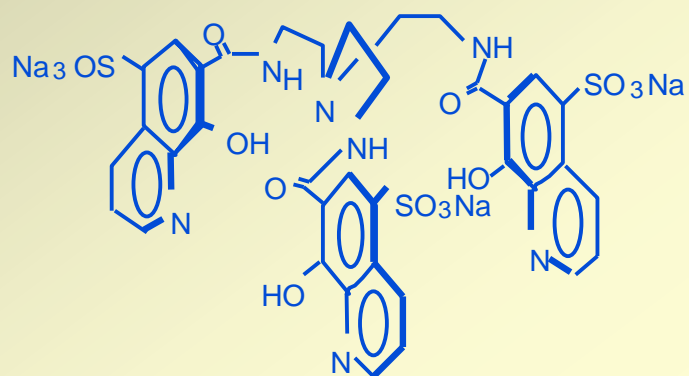
Iron-TRENOCAMSSOX2 : a model for ternary Complex 2

Kinetics results are in accordance with the proposed scenario

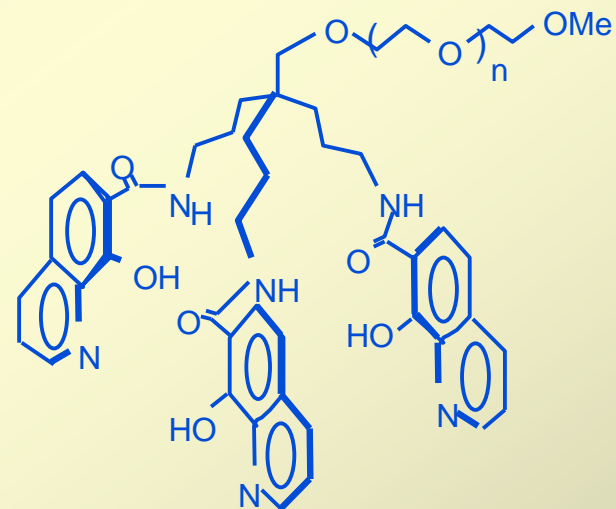


TRENOCAMSSOX

Une nouvelle famille possédant la shère de coordination de
O-TRENSOX greffée sur une chaîne de POE
(Chem Eur. J. 2002)

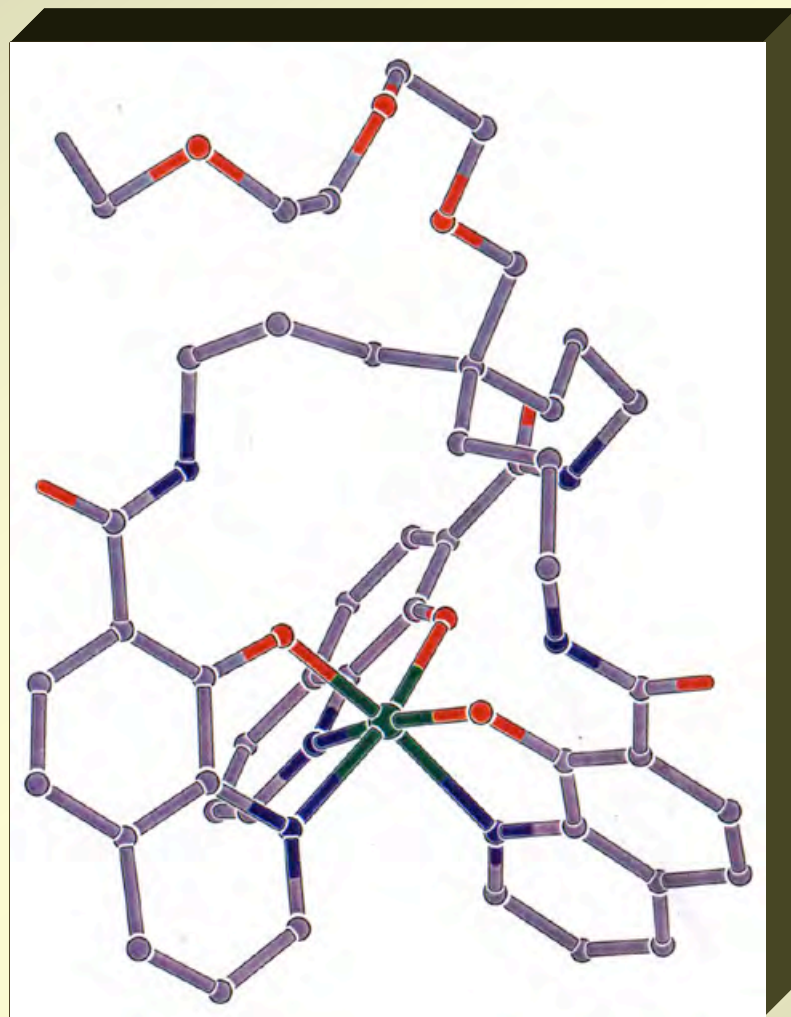


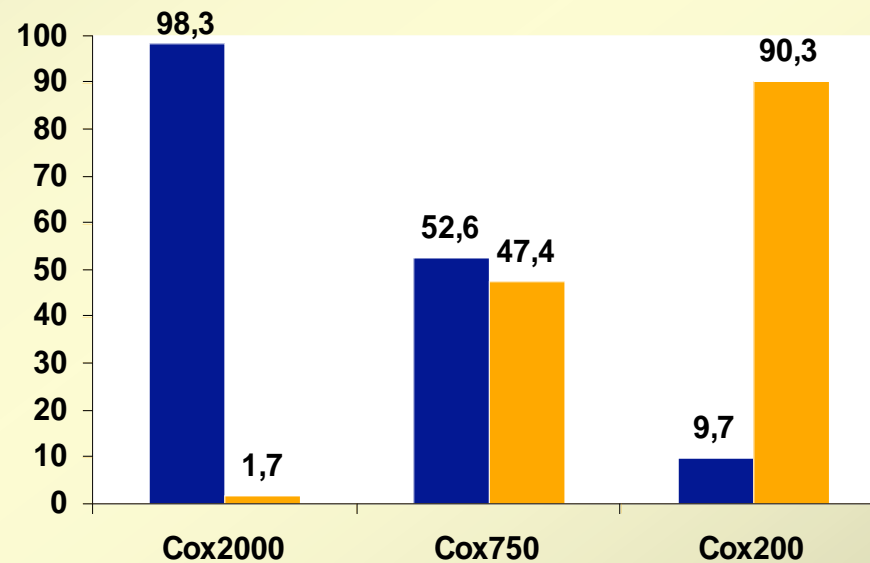
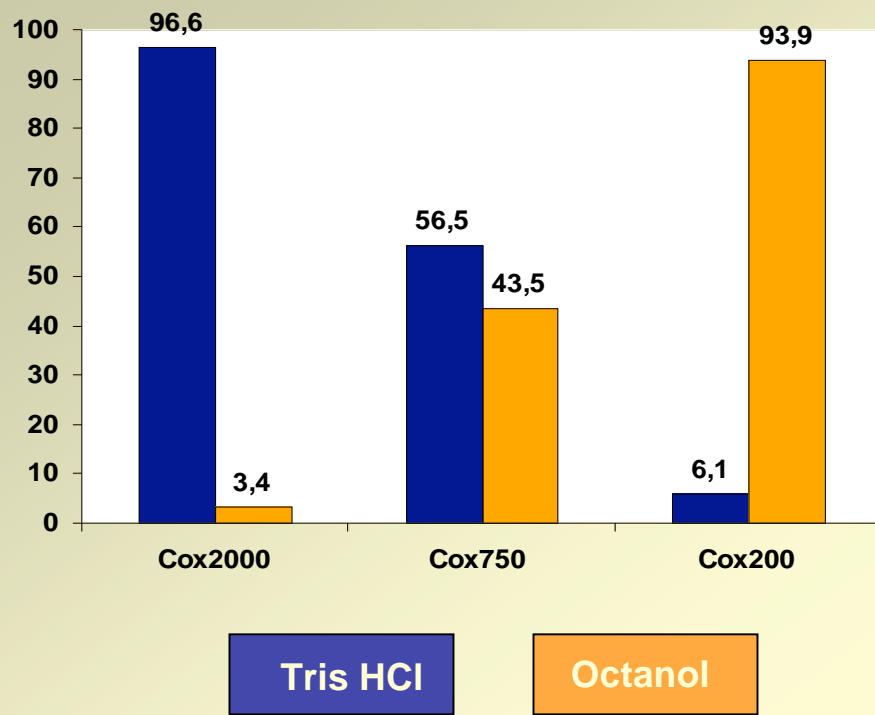
O-TRENSOX



Tous les ligands greffés ont le même pFe
que O-TRENSOX

n = 3 : COX 200
n = ~ 15 : COX 750
n = ~ 43 : COX 2000





La valeur similaire de P pour un ligand libre donné et pour son complexe ferrique, indique que seule la chaîne de POE, contrôle la balance hydrophilie/lipophilie

Thérapeutique chélatrice (Biochem. Pharmacol. 2001)

⇒ Mobilisation du fer d'hépatocytes de rats
(in collaboration with RR Crichton, G Lescoat and coll.)

O-TRENTOX and Cox 750 donnent les mêmes résultats

⇒ Effets antiprolifératifs

O-TRENTOX et Cox 750 donnent les mêmes résultats

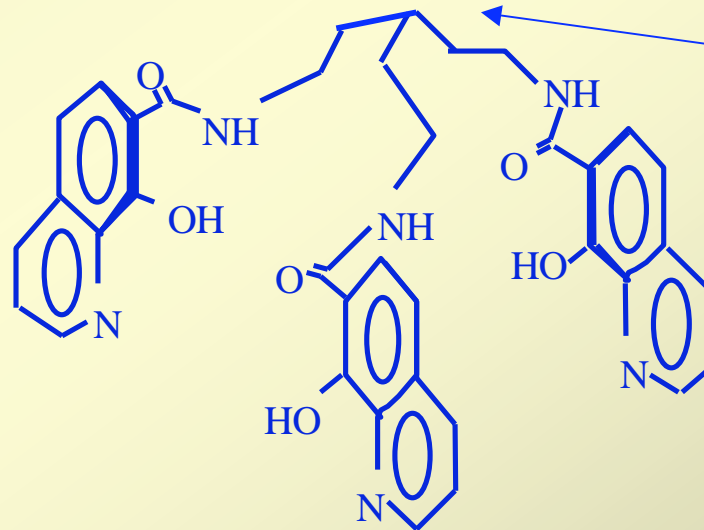
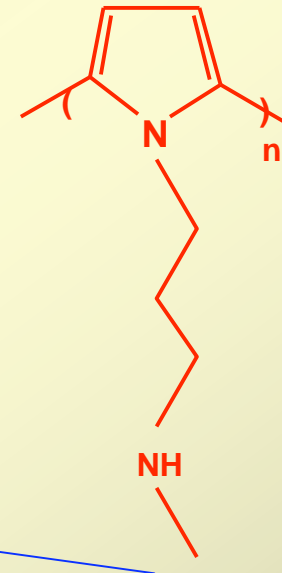
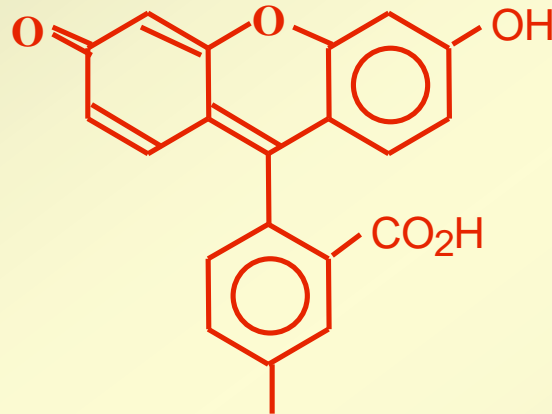
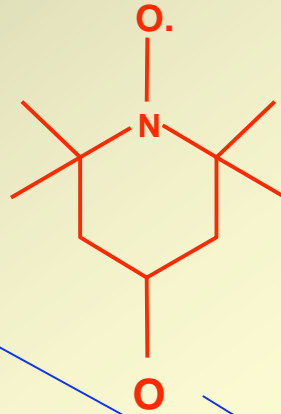
Les résultats biologiques ne sont pas corrélés avec les coefficients de partage

Leur rôle souvent affirmé en thérapeutique chélatrice ou en nutrition ferrique doit être remis en question

Nouveaux outils chimiques pour l'étude du métabolisme du fer

Sonde Radioactive Sonde "Spin labeled" Sonde fluorescente Electrode Selective pour iron(III)

$^{14}\text{CO}_2\text{H}$ (or $^{14}\text{CO}_2\text{R}$)



Approche nouvelle de l'assimilation ou de la capture du fer : Quand les chimistes miment le phytoplancton

L'incorporation dans des vésicules est couramment utilisée par les pharmacologues pour permettre la distribution de médicaments hydrophiles

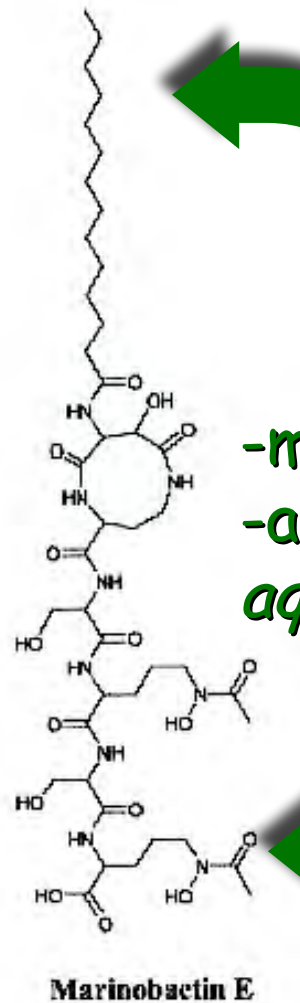
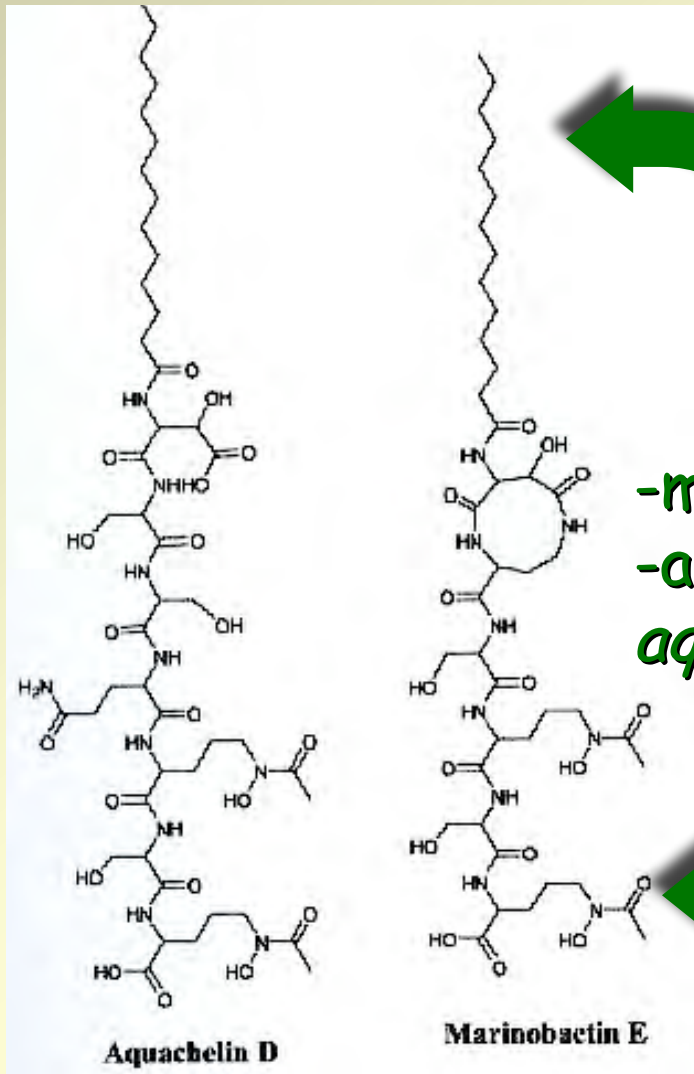
Une molécule active, capable de "s'autoassembler" en agrégats nanostructurés ou en vésicules peut être une élégante réponse au problème de sa distribution dans un organisme vivant

...Nature did it !

La faible concentration du fer près de la surface des océans (from 20 pM to 1 nM) limite la croissance du phytoplancton

La faible biodisponibilité de Fe dans les océans par rapport aux besoins des microorganismes marins pose question concernant les mécanismes utilisés par ces organismes pour acquérir le fer

Des sidérophores amphiphiles ont été découverts chez des bactéries marines
(A. BUTLER *et al.* Science, 2000)



Queue "acide gras"

-marinobactines chez *Marinobacter*
-aquachelines chez *Halomonas aquamarina*

Tête peptidique
qui coordine Fe(III)

Marinobactines and aquachelines sont hydrophiles

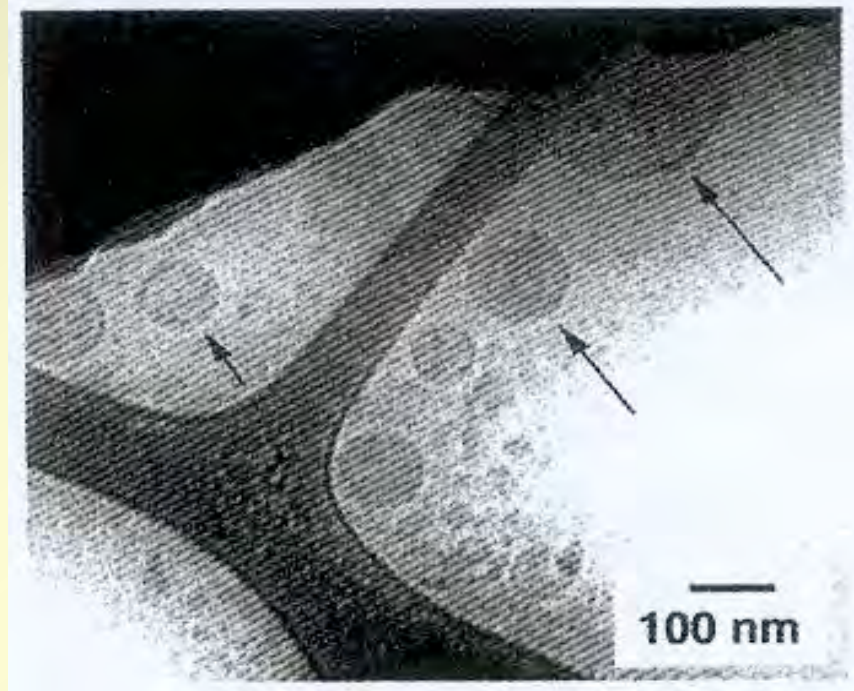
Leur nature amphiphile induit la formation de structures autoassemblées

-Les ligands libres ont des CMC basses (from 25 to 150 μ M)

-Les complexes ferriques sont également tensio-actifs avec des CMC plus élevées

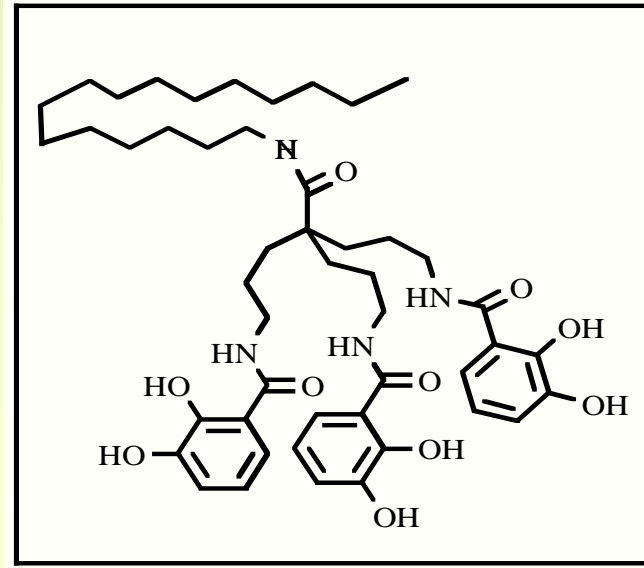
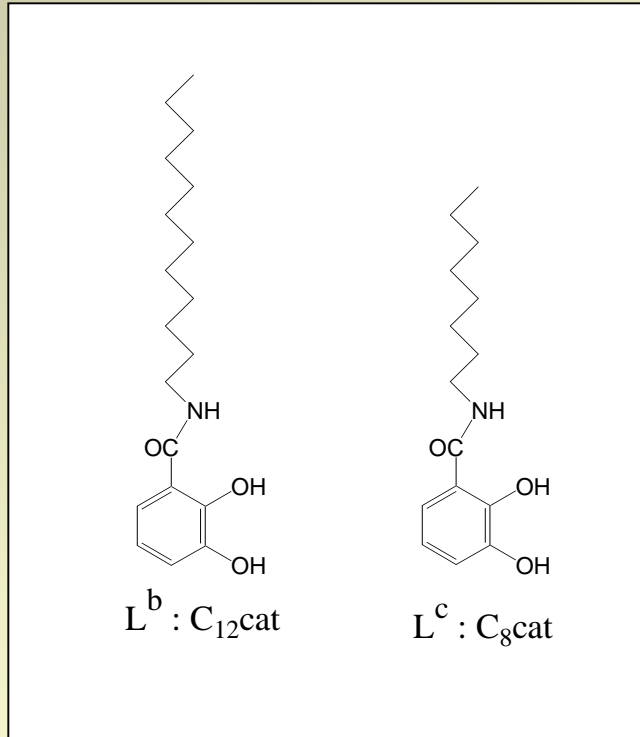
La formation de particules sphériques (diamètres de 140 à 180 nm) a été mise en évidence (dynamic light scattering) pour les complexes alors que les ligands libres sont limités à des micelles.

La microscopie cryoélectronique (solutions 2 mM des complexes)
a mis en évidence la formation de vésicules sphériques polydispersés
(50 à 200 nm)



Fe(III)-marinobactin D vesicles

Mimes des siderophores des bactéries marines

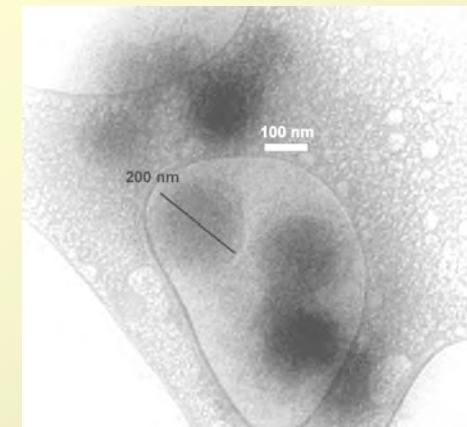
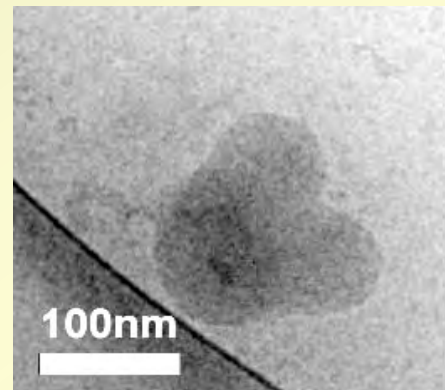
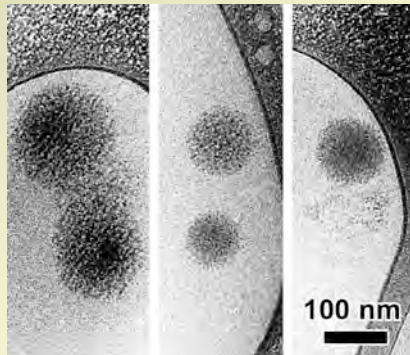


Propriétés tensio-actives

à pH = 8.4 , $CMC < 10^{-6} M$; à pH = 7.4 , $CMC < 10^{-5} M$

Les triscatécholates ferriques sont triplement chargés

Microscopie cryoélectronique pour Fe-L^T (pH 7.2-7.4 ; 1.25x10⁻³ M)

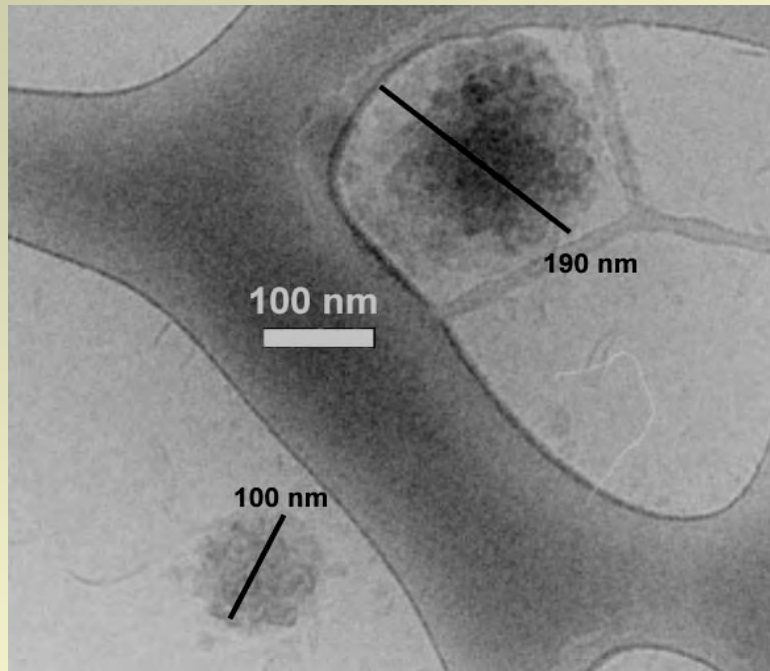


Particules sphériques (100 à 300 nm)

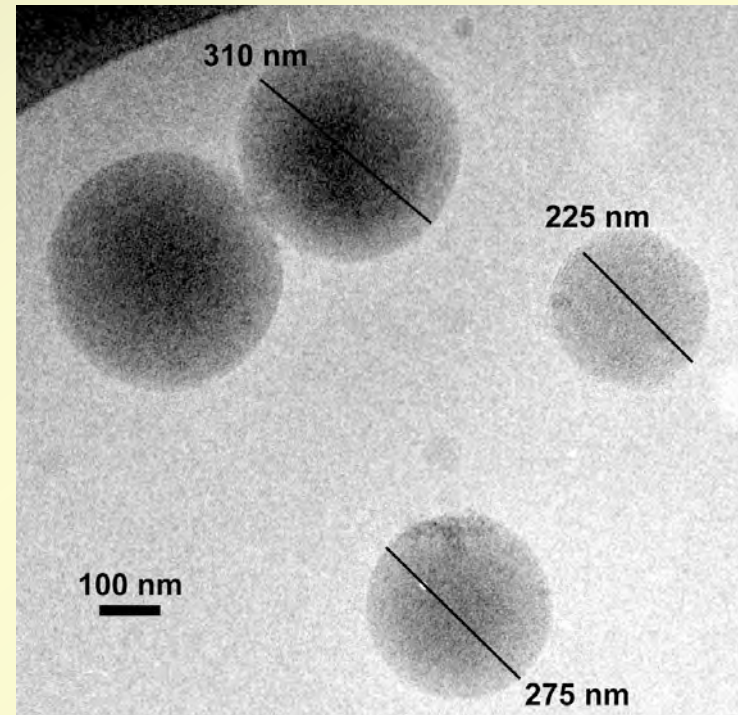
« Dynamic light-scattering »

| Complexe | Taille des particules |
|--|-----------------------|
| FeL^{T} , 10^{-4}M Mops/MeOH (99/1) | 230 nm |
| FeL_2^{b} , 10^{-4}M Mops/MeOH (99/1) | 100 nm |
| FeL_2^{c} , 10^{-4}M Mops/MeOH (99/1) | 130 nm |

Tampon Mops : pH 7.2-7.4



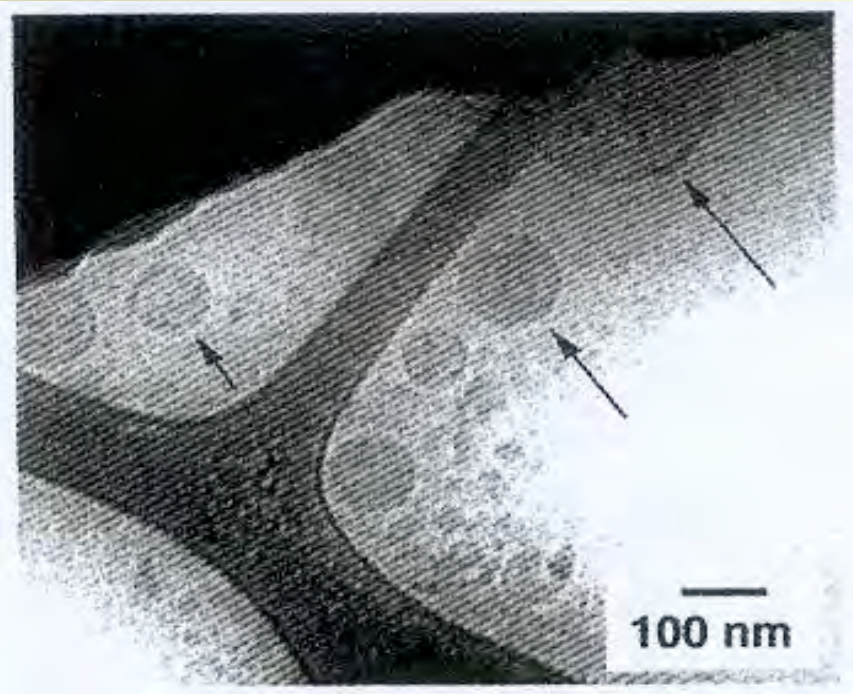
Cryoelectron micrograph
MOPS / MeOH (95/5) for
 FeL_2^b , $1.4 \cdot 10^{-3}$ M



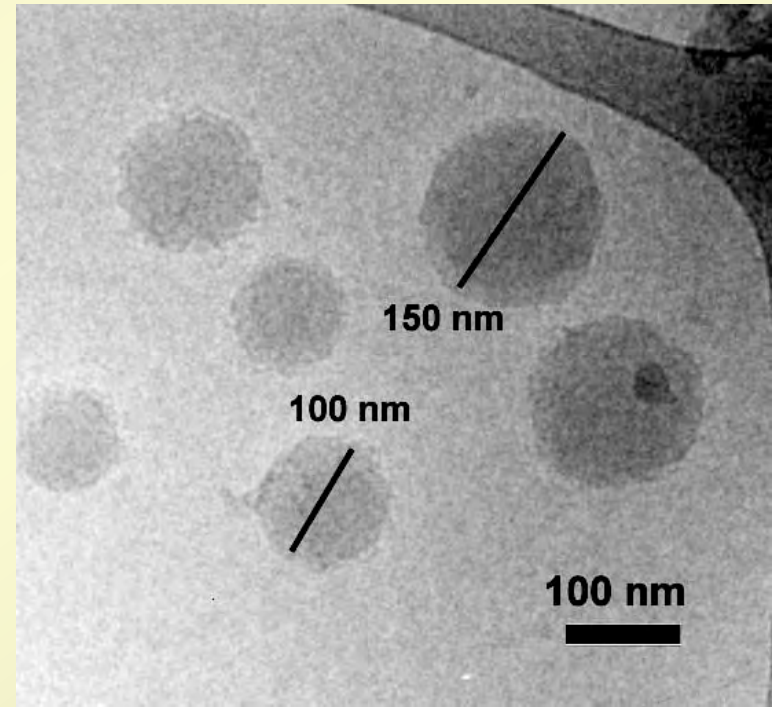
The same with octanol (1%)

Mimes des sidérophores marins

(Angew Chem 2005)

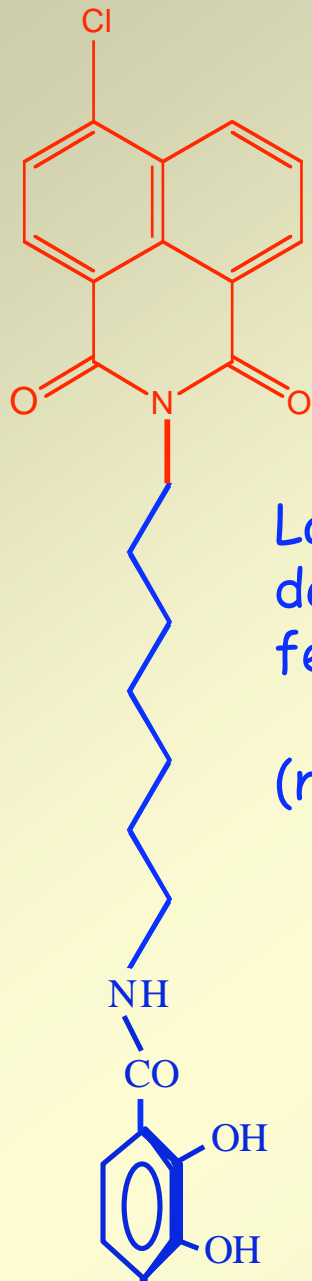


Fe(III)-marinobactin D vesicles



Fe(III)-L₂^b vesicles

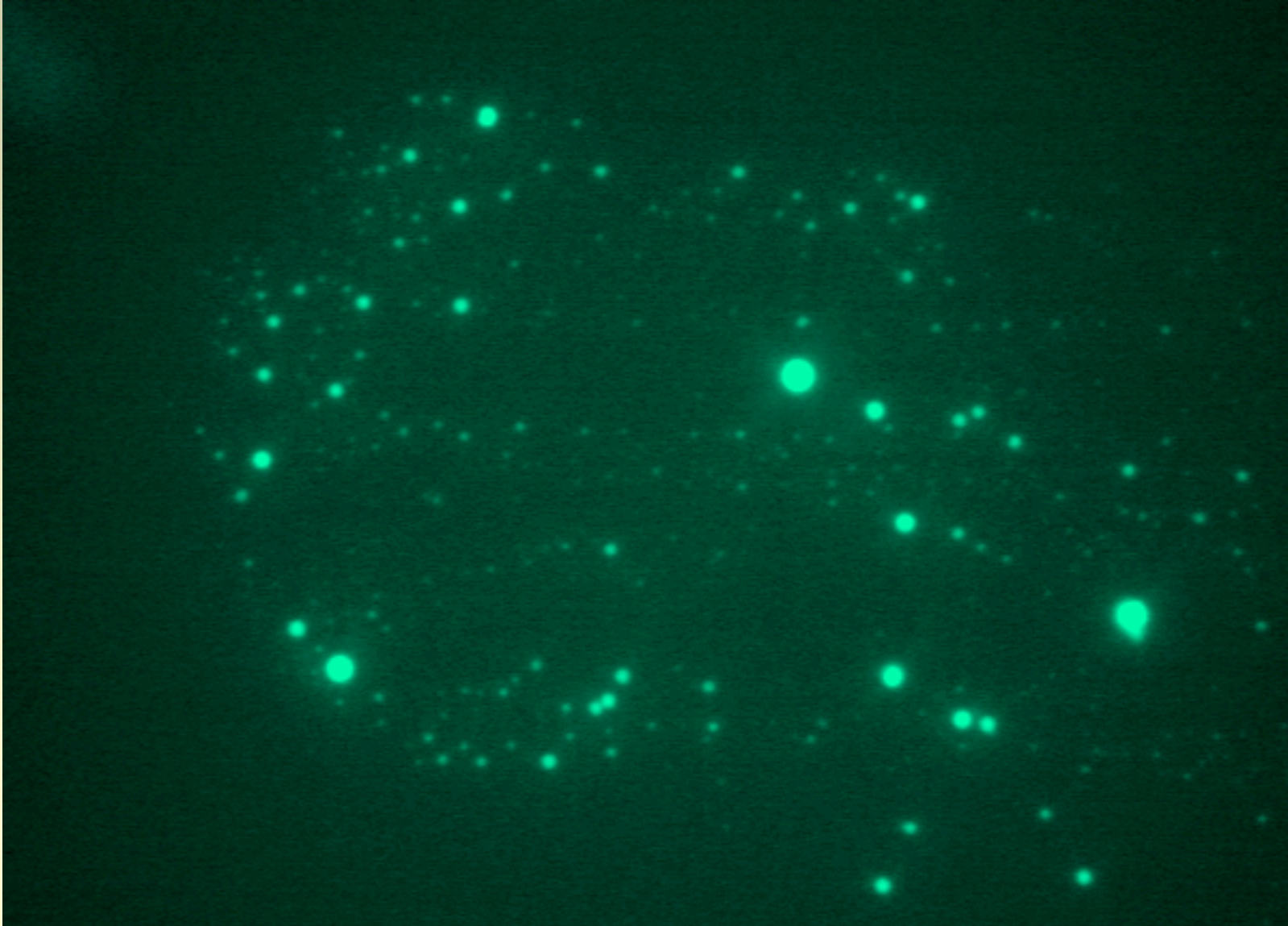
Outils pour l'étude des vésicules



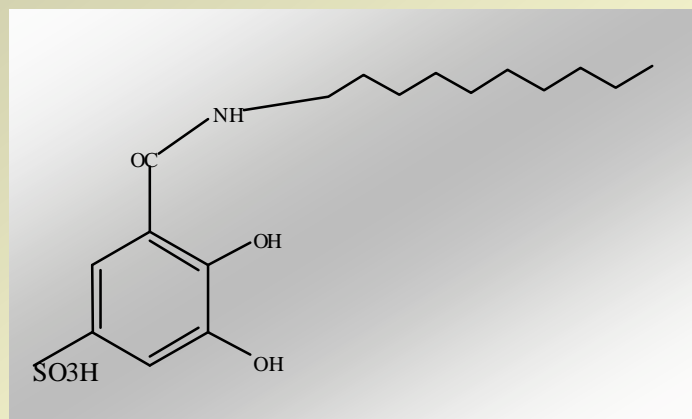
La microscopie de fluorescence met en évidence des particules fluorescentes seulement pour les complexes ferriques

(non observées avec les complexes de sodium)

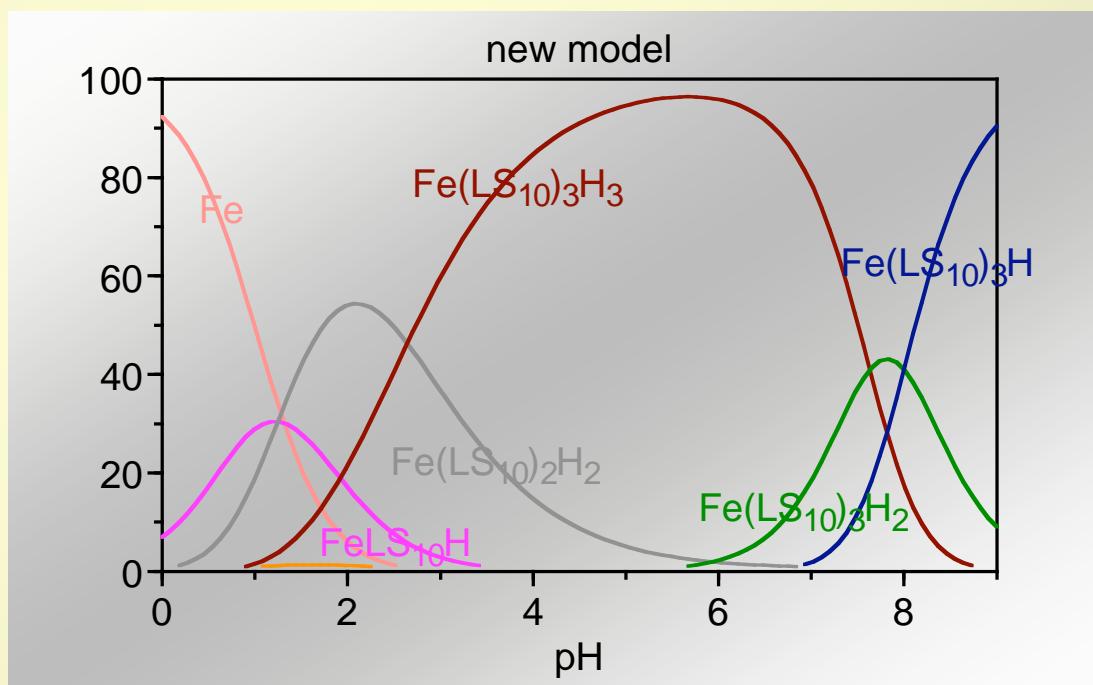
La complexation du fer n'éteint pas la fluorescence



Ligand sulfoné LS_{10}



Complexation de Fe^{3+}



Propriétés amphiphiles

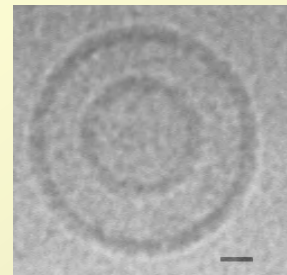
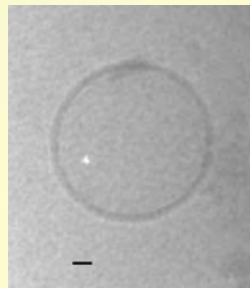
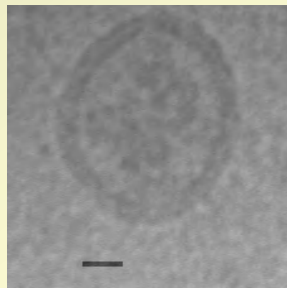
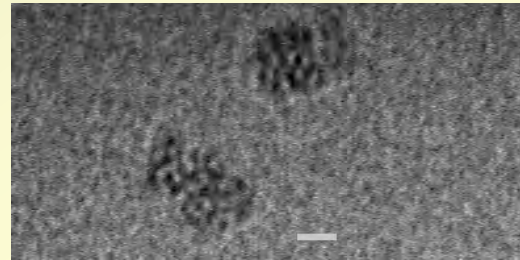
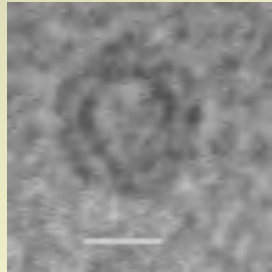
CMC pH 7,4 ligand : $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ complexe : $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

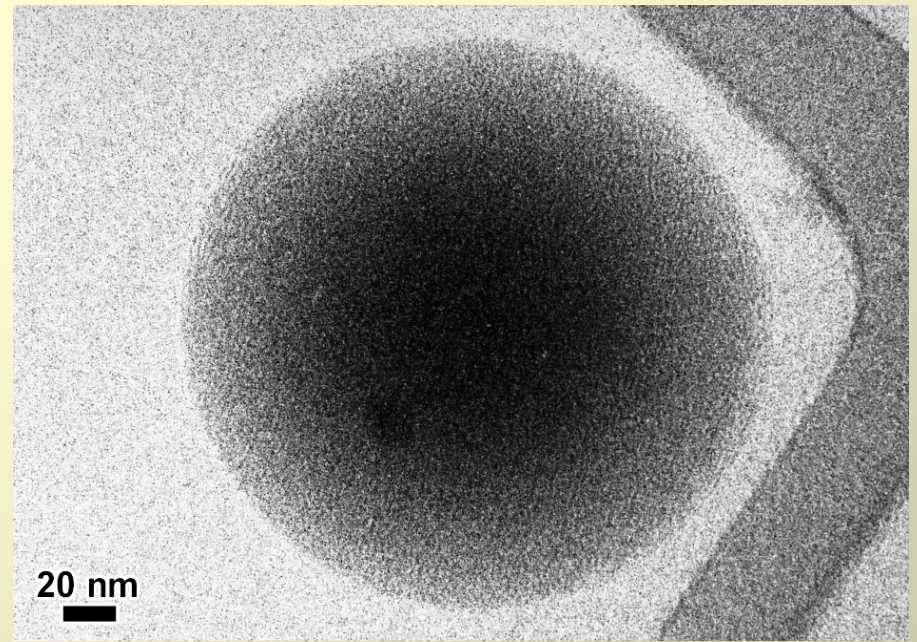
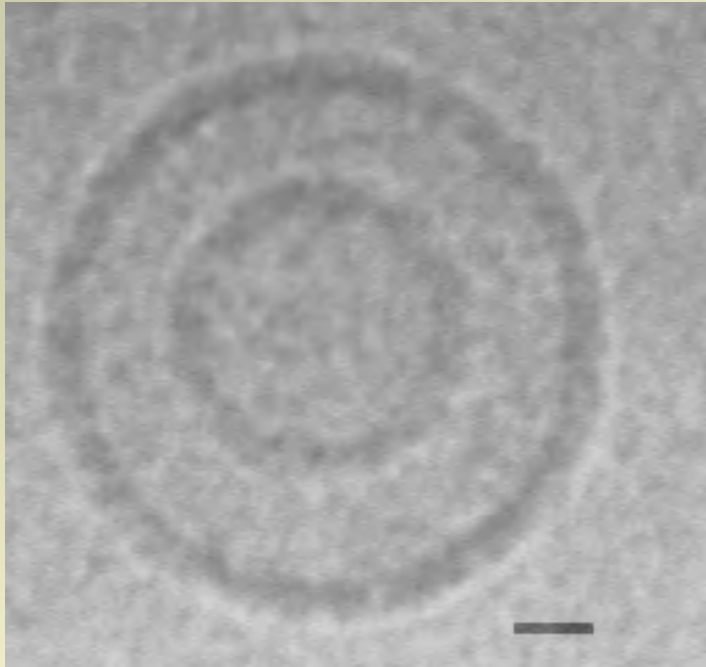
Cryo- Microscopie (cryoTEM)

Conditions : Fe/LS10 1/3 $c_{\text{LS10}} = 2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ $c_{\text{Fe}} = 8.3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
tampon MOPS (0.1M) pH=7.4

Taille des particules = 4,2 nm

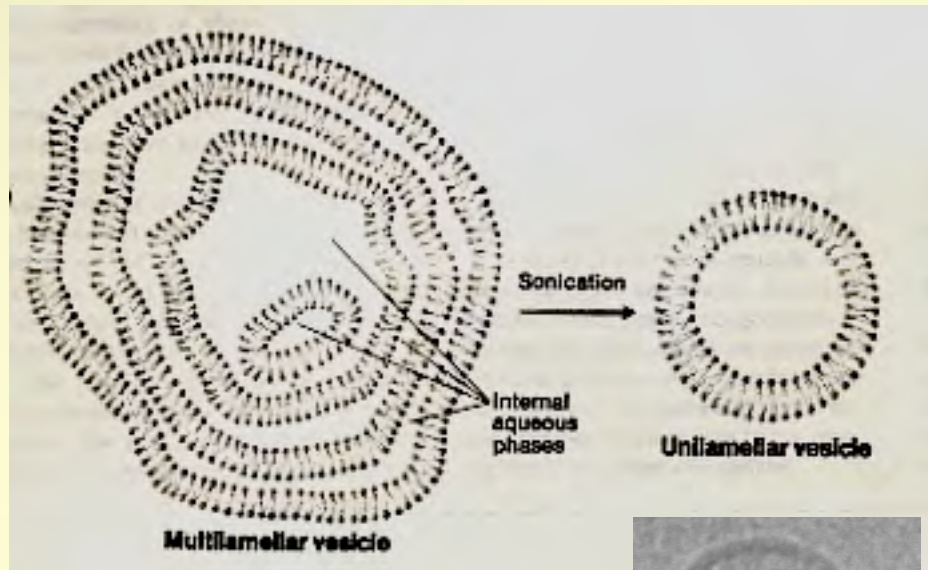
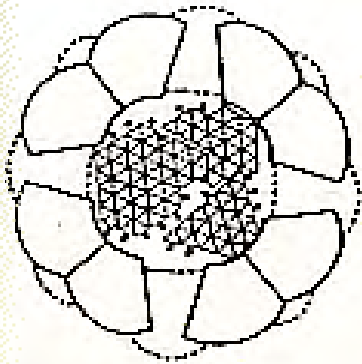
Après 40 jours
_ 10 nm



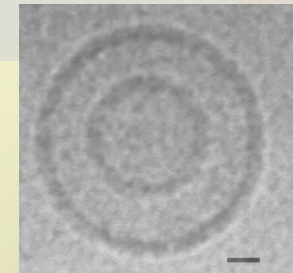
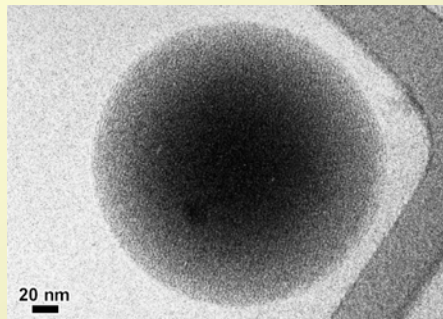


conclusions :

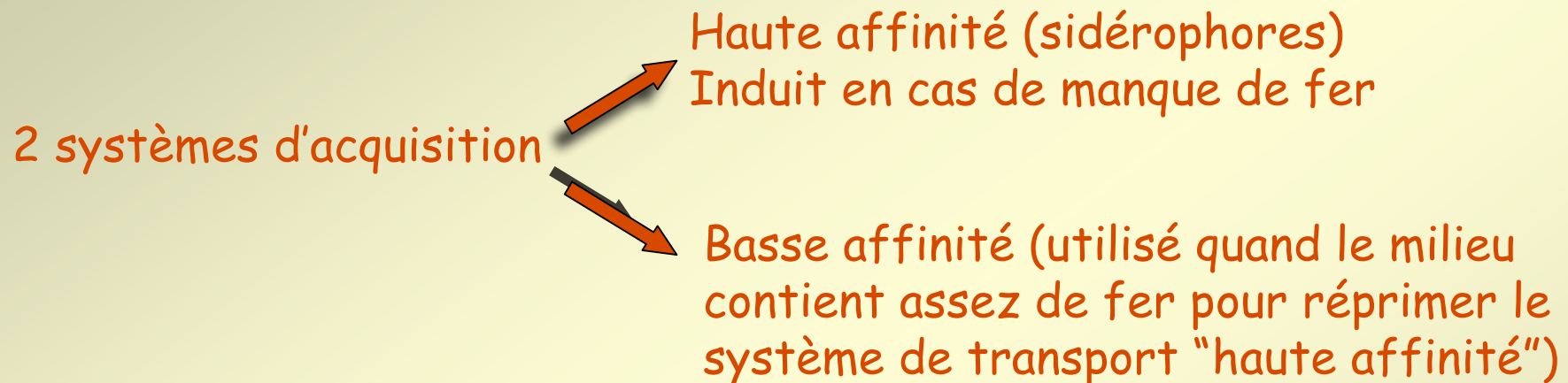
Un «piège à fer » pour les océans qui peut -être comparé à une « ferritine externe »



?

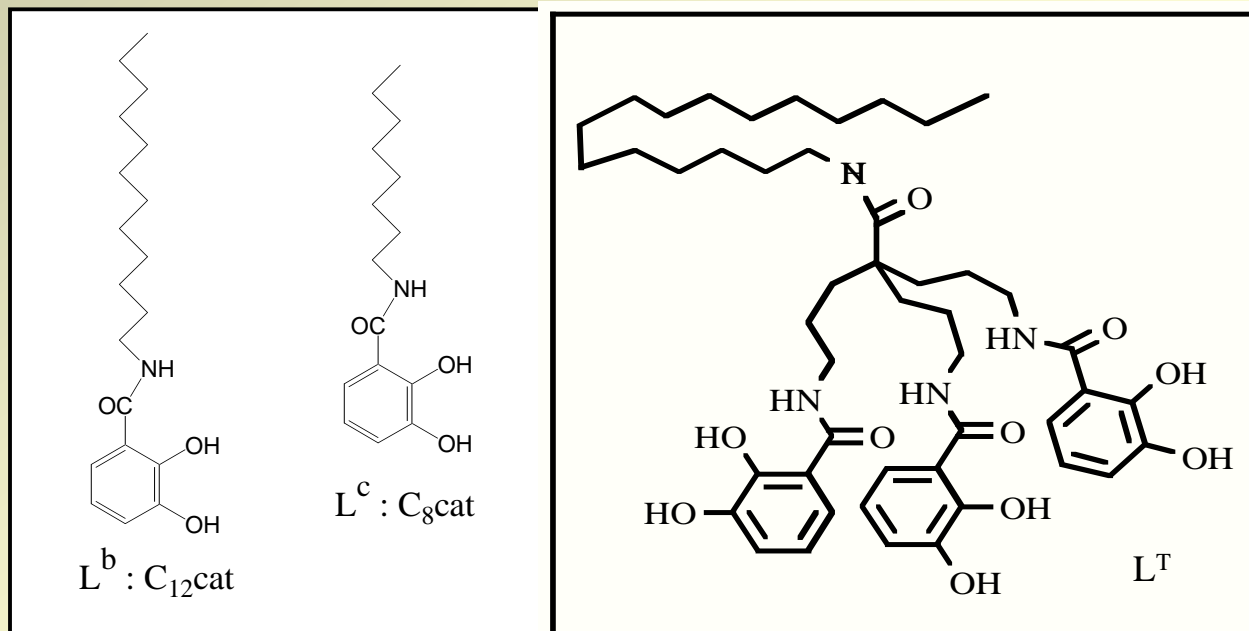


Nutrition ferrique par les chélateurs amphiphiles
pour *Erwinia chrysanthemi*,
Une bactérie pathogène (Gram-négative) pour les plantes



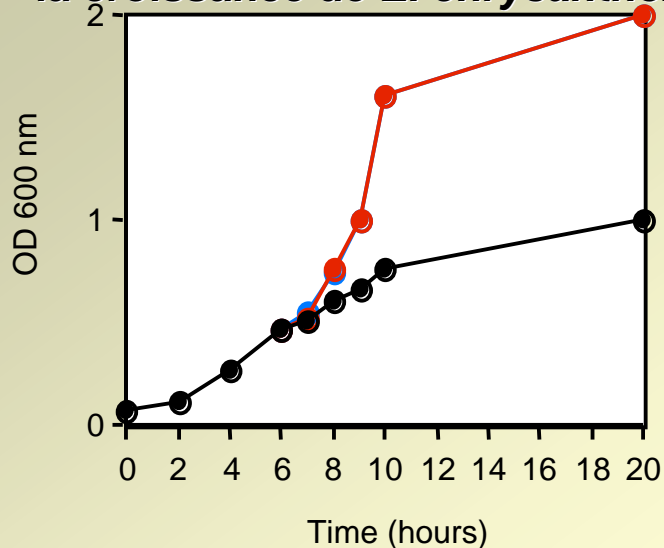
En cas de déficience en fer, *E. chrysanthemi* synthétise 2 sidérophores, la chrysobactine (monocatécholate ; $pFe = 17.1$) et l'achromobactine (produite seulement quand la synthèse de la chrysobactine est réprimée)

- Outil:
- souche sauvage
 - chrysobactine-achromobactine mutant négatif
 - chrysobactine -achromobactine-tonB mutant négatif

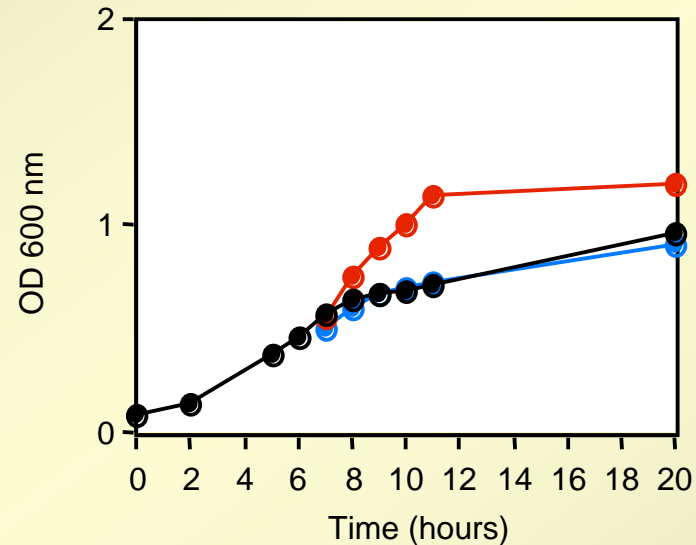


0.5 à 50 μM de complexe ferrique sont ajoutés au milieu de culture au début de la carence en fer
 La nutrition est suivie via la DO de l'absorbtion à 600 nm

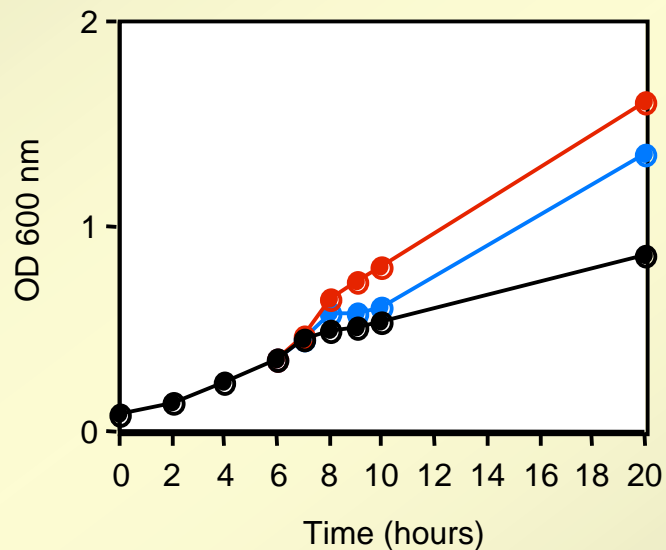
Effet des agrégats de fer sur la croissance de *E. chrysanthemi* 3937



Effet sur la croissance de *E. chrysanthemi* 3937 *acs cbs tonB*



Effect sur la croissance de *E. chrysanthemi* 3937 *acs cbs*



- no addition
- + C12
- + tripod

Conclusions :

- les agrégats permettent la nutrition
- C12 est meilleur que le tripod
- la voie naturelle des sidérophores est utilisée si elle est préservée
- la nutrition reste possible en son absence

~ 70-75% du transport du fer implique les recepteurs TonB-dependants Fct and/or 88Da avec Cbu de la membrane interne

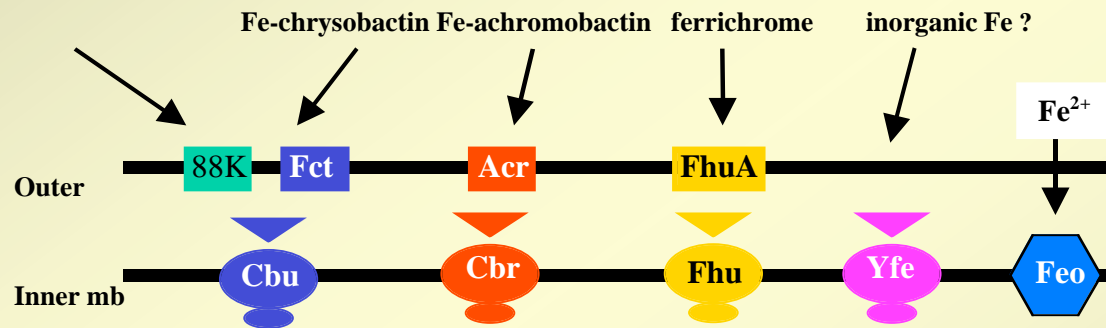
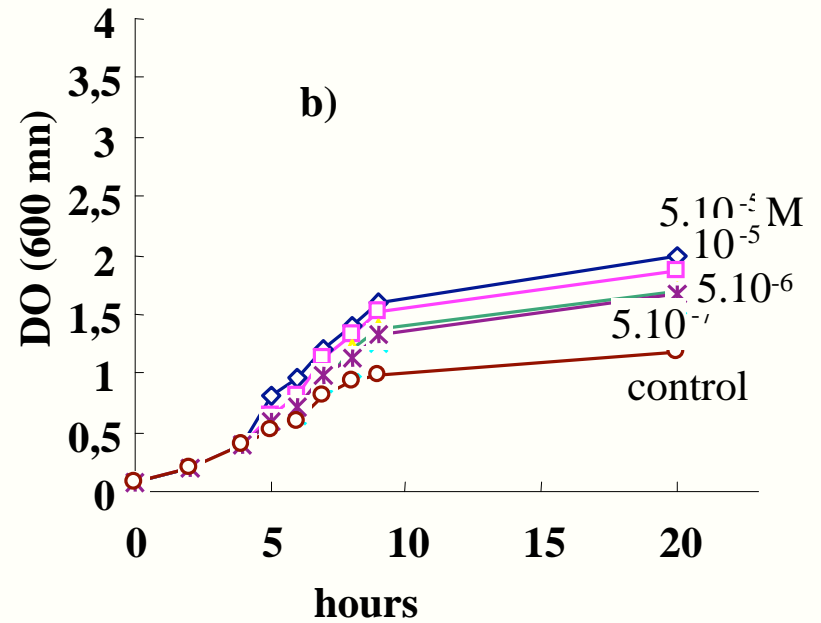
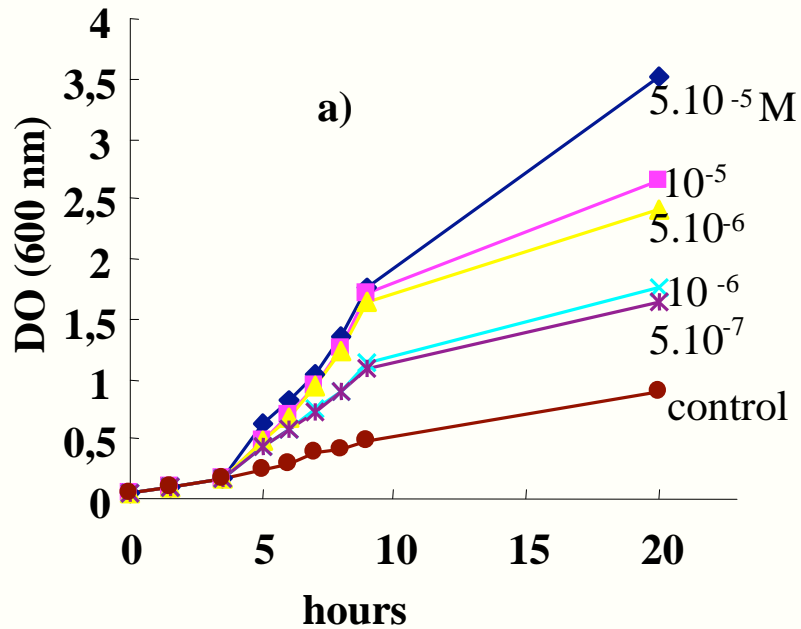


Fig (\$) Système de transport de Fer chez *Erwinia*

Pour les 25-30% restant, on peut supposer que les agrégats fusionnent avec la membrane, relarguant le fer dans le periplasme puis utilisent Yfe pour l'internaliser (Yfe n'est pas TonB dependant)



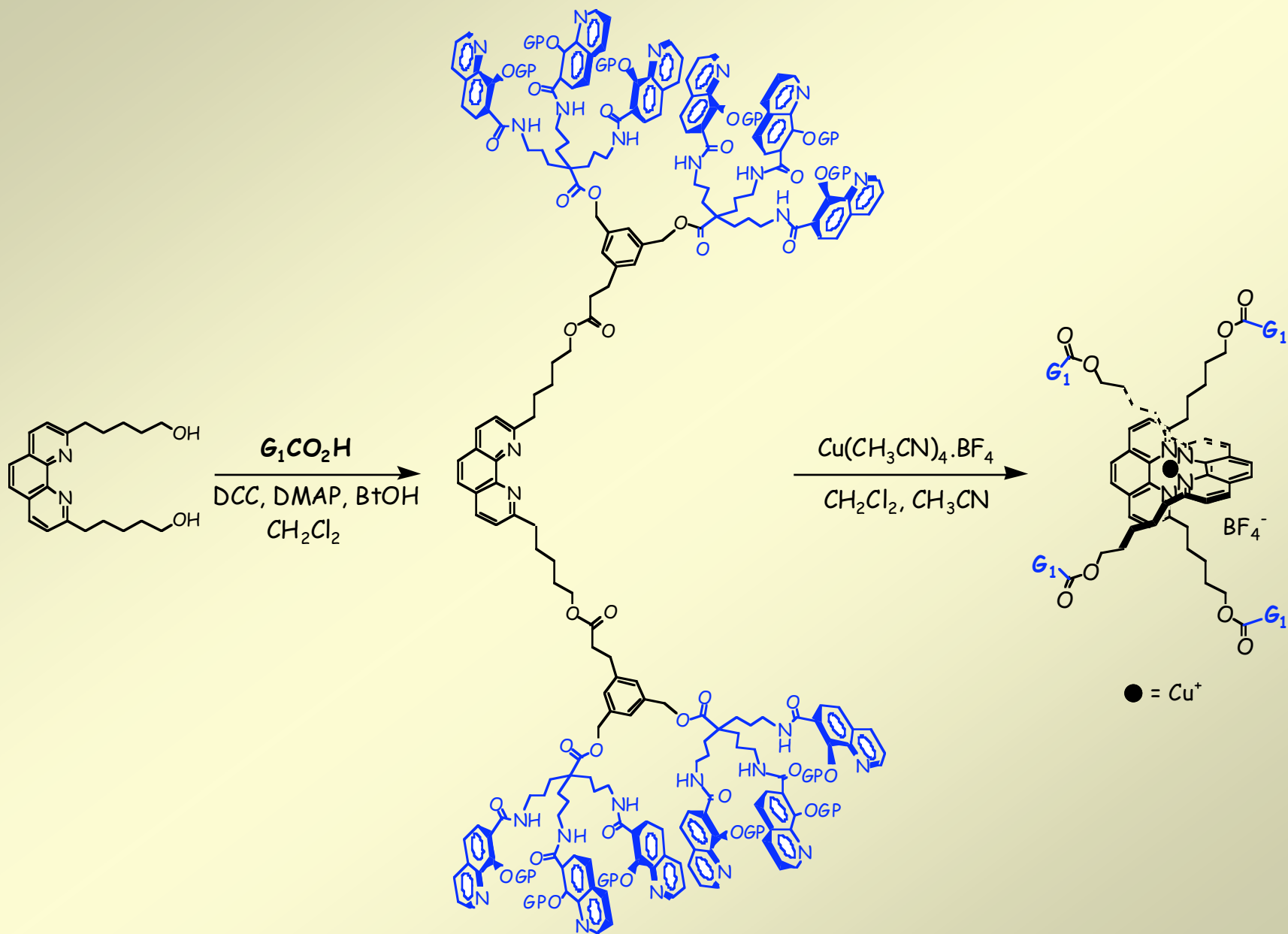
E. chrysanthemii 3937 Fe(L^T), fig. (a),
Fe-Trensox, fig. (b).

L'assimilation du fer est meilleure à partir des agrégats

Etudes en cours

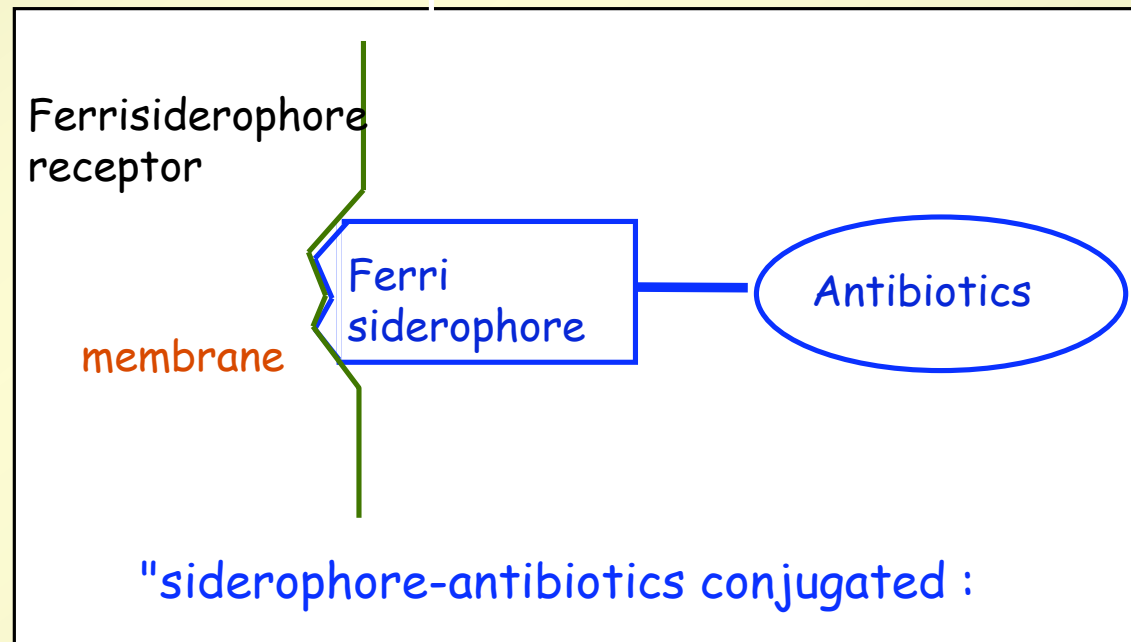
Chélation du fer d'organismes vivants
par les chélateurs amphiphiles

Prospective



Autres études en cours : Une stratégie nouvelle en antibiothérapie ?

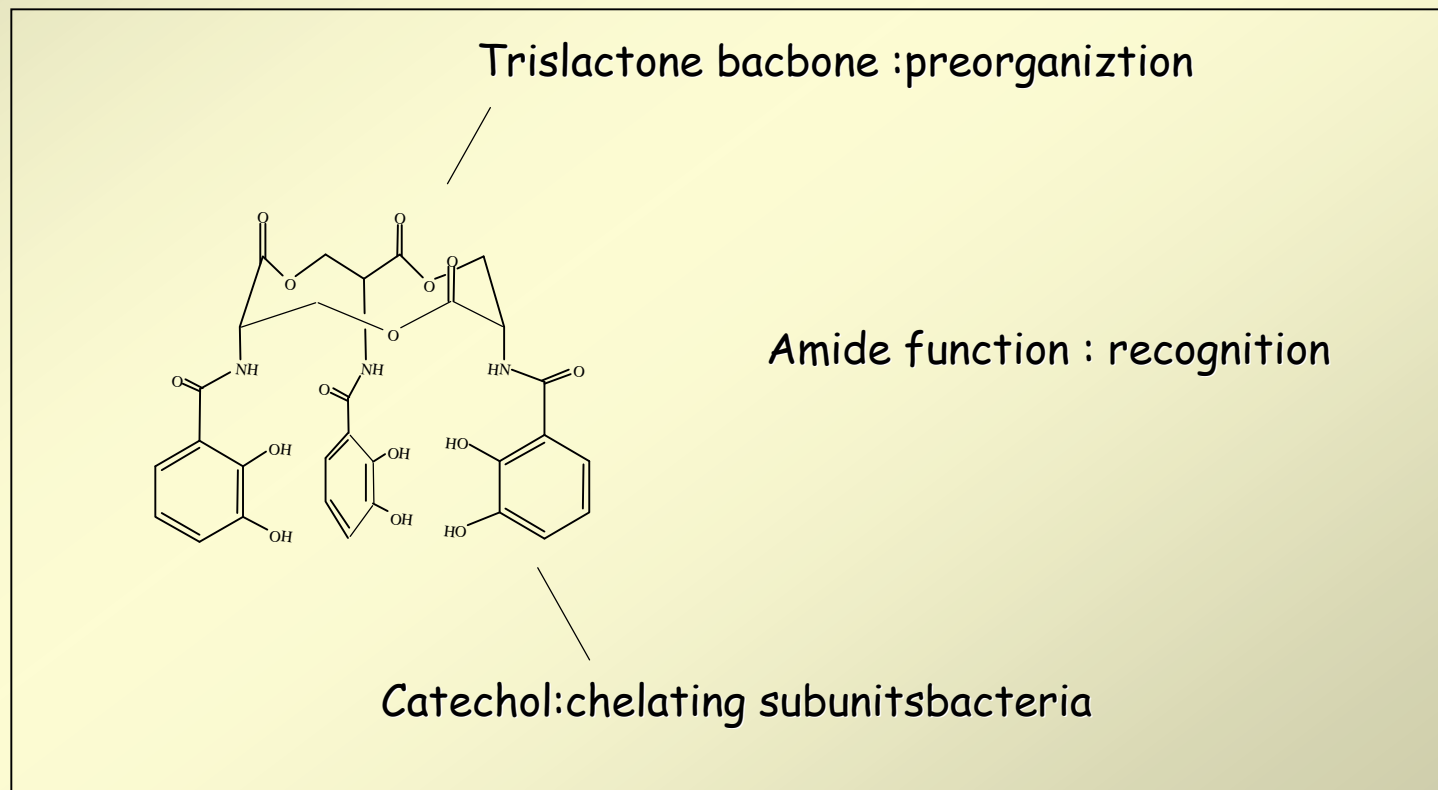
« The Trojan horse strategy »



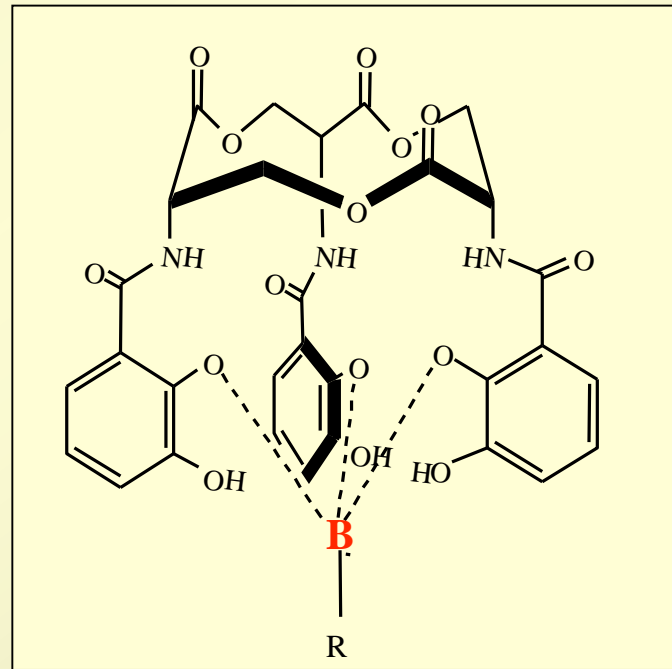
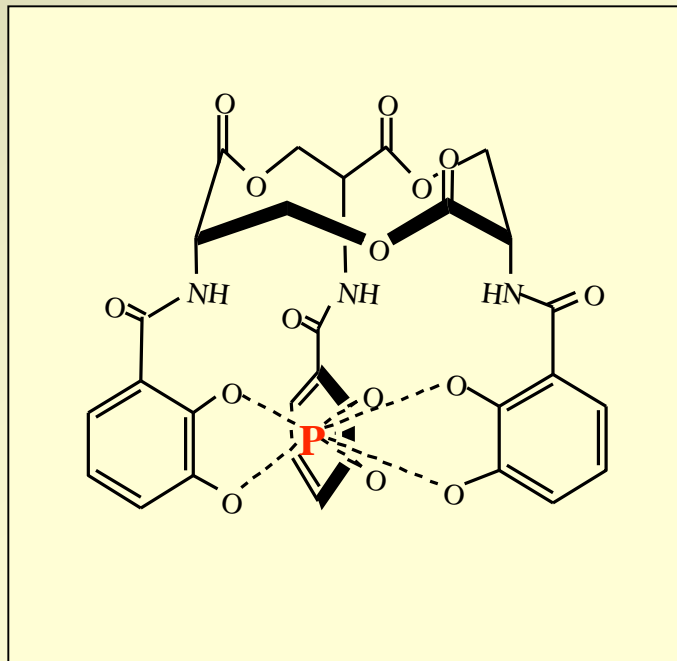
Une nouvelle stratégie en antibiothérapie ?

Leurres sélectifs pour une bactérie ciblée

Premiers travaux : E. Coli qui comporte un récepteur selectif de l' enterobactine



Phosphore et bore forcent l'entérobactine dans la conformation de son complexe ferrique



Chimie Biomimétique

(J.L. PIERRE)



GDR 1879



O-TRENTOX et dérivés

Paul BARET
Claude BEGUIN
Frédéric BIASO
Hakim BOUKHALFA
Catherine CARIS
Didier GAUDE
Giselle GELLON
Daniel IMBERT
Guy SERRATRICE
Fabrice THOMAS

Collaborations :

Anne-Marie ALBRECHT (Strasbourg)
Robert R. CRICHTON (Louvain la Neuve)
Jean-Pierre LAULHERE (Grenoble)
Gérard LESCOAT (Rennes)
Marc FONTECAVE (Grenoble)

Vésicules

Mariana APOSTOL
Paul BARET
Lucie BEDNAROVA
Amaury DU MOULINET
Guy SERRATRICE

Collaborations :

Dominique EXPERT (INRA, Paris)
Marie-José STEBE (Nancy)
Jacques DESBRIERES (Grenoble)
Jean-Luc PUTAUX (Grenoble)

Remerciements pour discussions :

Alvin CRUMBLISS (Durham, USA)
Alison BUTLER (Santa Barbara, USA)

Bioinspired chemistry....



